

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

DIE ROLLE DES NEUEN KARDIALEN GLANZSTREIFENPROTEINS
MYOZAP IN VITRO UND *IN VIVO*.
CHARAKTERISIERUNG EINES TRANSGENEN MAUSMODELLS

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

vorgelegt von

REZA POYANMEHR

aus Isfahan, Iran

Kiel 2019

1. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Derk Frank
 2. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Oliver Müller
- Tag der mündlichen Prüfung : 10.08.2020

für pete.

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungen	1
1. Einleitung	5
1.1. Glanzstreifen	5
1.1.1. Desmosomen	6
1.1.2. Adherens Junctions	8
1.1.3. Gap Junctions	11
1.2. Kardiale Hypertrophie und Kardiomyopathie	12
1.2.1. Hypertrophe Kardiomyopathie	13
1.2.2. Dilatative Kardiomyopathie	15
1.3. Die Rolle des Glanzstreifens in Kardiomyopathien	16
1.4. Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Material	20
2.1.1. Geräte, Verbrauchsmaterial und Operationsbedarf	20
2.1.2. Chemikalien	23
2.1.3. Enzyme	24
2.1.4. Antikörper	25
2.1.5. Kits	26
2.1.6. Oligonukleotide	26
2.1.7. Vektoren und Plasmide	27
2.1.8. Puffer und Lösungen	27
2.1.9. Medien	30
2.1.10. Zelllinien	31
2.1.11. Versuchstiere	31
2.2. Methoden	33
2.2.1. Mikrobiologische Methoden – Bakterien	33
2.2.1.1. Transformation von Bakterien durch Elektroporation	33
2.2.1.2. Herstellung der Selektivnährböden	33
2.2.1.3. Beimpfung der Selektivnährböden	33

2.2.2.	Zellbiologische Methoden	34
2.2.2.1.	Gewinnung von NRVCMS	34
2.2.2.2.	Aufreinigung von NRVCMS	35
2.2.2.3.	Lumineszenzmessung mit Tecan	36
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden - DNA	36
2.2.3.1.	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	36
2.2.3.2.	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.3.3.	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	38
2.2.3.4.	Plasmid-Extraktion aus Bakterien	38
2.2.3.5.	Die Gateway-Klonierung	39
2.2.3.6.	Transfektion der HEK293A-Zellen	40
2.2.3.7.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA mittels NanoDrop	41
2.2.4.	Molekularbiologische Methoden – RNA	41
2.2.4.1.	RNA-Isolation und Real Time-PCR	41
2.2.4.2.	Klonierung einer microRNA für Myozap-knockdown	42
2.2.5.	Molekularbiologische Methoden – Proteine	42
2.2.5.1.	Myozap-Protein Präparation	42
2.2.6.	Immunoblots	42
2.2.7.	Transverse Aortenkonstriktion (TAC)	43
2.2.8.	Echokardiografie und morphometrische Untersuchungen	45
2.2.9.	Histologische Untersuchungen	46
2.2.10.	Statistische Auswertung	47
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Myozap aktiviert den SRF-Signalweg	48
3.2.	Myozap wirkt konzentrationsabhängig	49
3.3.	Myozap-transgene Mäuse reagieren empfindlich auf Druckbelastung	51
3.4.	Myozap-transgene Mäuse entwickeln vermehrt Fibrose bei gleichzeitiger Zellhypertrophie	56
3.5.	Myozap-transgene Mäuse zeigen keine erhöhte Sterblichkeit verglichen mit ihrer Wildtyp-Kohorte	59

3.6. Myozap-transgene-Mäuse zeigen eine hochsignifikante Hochregulation SRF-abhängiger Zielgene, die durch TAC potenziert wird	60
3.7. Myozap-transgene-Mäuse zeigen erhöhte UPR-Aktivität	62
3.8. Myozap transgene Mäuse zeigen erhöhte UPR-abhängige Apoptose und Autophagie	68
4. Diskussion	74
4.1. Myozap-Überexpression und Proteinaggregat-vermittelte Kardiomyopathie	74
4.2. Myozap-Proteinaggregate und die Rolle von UPR, Apoptose und Autophagie	78
4.3. Die Rolle des SRF-Signalwegs in Kardiomyopathien und kardialem Remodelling	80
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis	83
7. Eigene Publikationen	90
8. Danksagung	92

II. Abkürzungen

A	Aggregate
AD	Aktivierungsdomäne
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
ANP	Atrial natriuretic Peptide
AoB	Aortic Banding, Synonym für TAC = Transverse Aortic Constriction
Arm	Armadillo
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
B	Bovin
BNP	Brain natriuretic Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
BW	Gesamtkörpergewicht, Bodyweight
CBD	Catenin-binding domain
cDNA	Complementary DNA
CoIP	Co-Immunopräzipitation
DBD	DNA-binding domain
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dcs	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
EA	Extrazelluläre Ankerdomäne
EC	Extrazelluläre Cadherindomäne
EF	Ejektionsfraktion

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
EST	Expressed sequence tag
Et al.	Abk. für et alii; "und Andere"
FCS	Fetal calf serum
FS	Fractional Shortening
H	Human
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HEK	Human embryonic kidney (Bezeichnung einer Zelllinie)
His	Histidin
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HW	Herzgewicht
IA	Intrazelluläre Ankerdomäne
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
ICS	Intrazelluläre Catenin-Bindungsdomäne
ID	Intercalated Disc (Glanzstreifen)
IP	Immunpräzipitation
Ire1 α	Inositol-requiring Enzyme 1 α
IVSd	Interventrikuläre Septumsdicke in Diastole
IVSs	Interventrikuläre Septumsdicke in Systole
kDa	Kilo-Dalton
L	Lunge
LA	Linker Vorhof
LC-3	Microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3
LungW	Lung Weight / Lungengewicht
LV	Linker Ventrikel / Herzkammer
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter

LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Diameter
LVPWd	Linksventrikulärer Hinterwanddiameter in Diastole
LVPWs	Linksventrikulärer Hinterwanddiameter in Systole
M	Maus
MLC2	Myosin-light-Chain-2
MYBPC3	Myosin-binding-protein-C3
MYH7	Myosin-heavy-Chain-7
MYL2	Myosin regulatory light chain 2
MRIP	Myosin phosphatase RhoA interacting protein
n	Number, Versuchsanzahl
nppa	natriuretic peptide A, siehe ANP
nppb	natriuretic peptide B, siehe BNP
NRVCM	Neonatal rat ventricular Cardiomyocytes
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phenylephrin
PEG	Polyethylenglykol
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PW	Posterior Wall / Herz hinterwand
R	Ratte
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messengerRNA
miRNA	micro-RNA
RT	Reverse Transkription

RV	Rechter Ventrikel / Herzkammer
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PHT	Plötzlicher Herztod
SERCA2a	Sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a
SRF	Serum Response Factor
TAE	Tris-Acetat EDTA
TAC	Transverse Aortenkonstriktion, siehe AoB
TBST	Tris Buffered Saline
TG	Transgen
TM	Transmembrandomäne
TNNT-2	Kardiales Troponin Typ 2
UPR	Unfolded-Protein-Response
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
Y2H	Yeast Two-Hybrid
Z	Z-Scheibe
ZO1	Zonula Occludens-1

1. Einleitung

1.1. Der Glanzstreifen

So wie auch bei Skelettmuskulatur, handelt es sich bei Herzmuskulatur um quergestreifte Muskulatur. Nichtsdestotrotz unterscheidet sie sich durch zahlreiche Charakteristika von dieser. Neben der häufigen Einkernigkeit ist der Glanzstreifen (Discus intercalaris bzw. Intercalated disc) eines der spezifischen Charakteristika der Myokardzelle [1].

Hierbei handelt es sich um eine hochspezialisierte Zell-Zell-Verbindungsstruktur, die aus einem Komplex verschiedener Verbundproteine gebildet wird. Zu diesen zählen Desmosomen (auch genannt Macula adherens), Adherens junctions (aus dem Engl.: Adhäsionsverbindungen) in Form der Fasciae adherentes, sowie Gap Junctions (aus dem Engl.: Lückenverbindungen) [2]. Desmosomen verbinden Intermediärfilamente mit dem Glanzstreifen, in dem sie als Verankerung dienen. Sie sind am Glanzstreifen lokalisiert, wobei die Intermediärfilamente, allen voran Desmin und Vimentin, in die aus Desmosomen gebildeten Strukturen einstrahlen. Aktinfilamente sind ebenfalls am Glanzstreifen verankert. Ihre Konsolidierung erfolgt an den Adherens Junctions.

Gap Junctions sind aus Connexinen und Pannexinen aufgebaute Kanäle, die zwischen zwei benachbarten Zellen den Austausch kleinerer Moleküle, wie second messenger (aus dem Engl.: sekundärer Botenstoff) oder Ionen gewährleisten [3]. Konsekutiv erfolgt über Gap Junctions die Impulsübertragung zur Erregungsausbreitung zwischen Kardiomyozyten, welche das gesamte Myokard als ein *funktionelles Synzytium* agieren lassen. Der Glanzstreifen stellt in Zusammenschau also eine komplexe Proteinstruktur des Myokards dar, welches die mechanische Integrität gewährleistet und die elektrische Kopplung und Erregungsausbreitung während einer Systole sicherstellt.

1.1.1 Desmosomen

Desmosomen, auch Maculae Adherentes, sind vor allem in Haut und Herz vorkommende Zellverbindungen, die besonders hohem mechanischem Stress, bzw. Scherkräften, gewachsen sind.

Sie sorgen für die Verankerung unterschiedlicher Intermediärfilamente am Sarkolemma. Im myokardialen Gewebe sind namentlich das Desmin und das Vimentin besonders hervorzuheben [4].

Hauptsächlich drei große Proteinfamilien stellen die Grundbausteine der Desmosomen: 1. Cadherine, 2. Armadillo-Proteine, sowie 3. Plakine.

Cadherine sind Transmembranproteine, deren Carboxyl-Ende cytosolwärts gerichtet ist. Dabei sind mittlerweile unterschiedliche Untergruppierungen wie Desmocolline und Desmogleine bekannt. Von jeder Untergruppierung sind wiederum diverse Isotypen beschrieben, die auch in ihrer unterschiedlichen Ausprägung im Herzmuskelgewebe vorkommen [5]. Gemeinsame Grundstruktur aller Cadherine sind extrazelluläre Cadherin-Domänen, an die sich eine extrazelluläre Ankerdomäne anschließt. Diese geht in eine Transmembrandomäne über, die wiederum cytosolseitig von einer intrazellulären Ankerdomäne abgeschlossen wird [6].

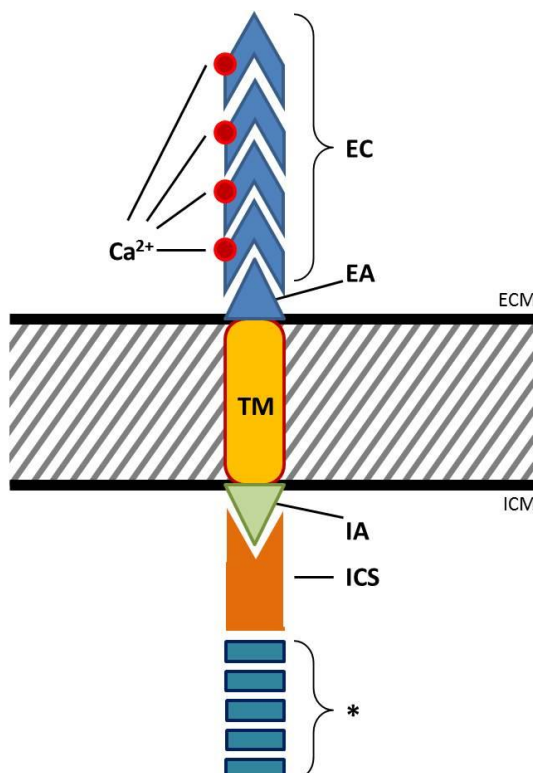


Abbildung 1-1 Die Grundstruktur desmosomaler Cadherine, wie Desmoglein und Desmocollin. Abbildung modifiziert nach [7]. EC = extrazelluläre Cadherin Domäne, EA = extrazelluläre Ankerdomäne, TM = Transmembrandomäne, IA = intrazelluläre Ankerdomäne, ECM = extrazelluläre Matrix, ICM = intrazelluläre Matrix, ICS = intrazelluläre Catenin-Bindungsstelle, Ca²⁺ = Kalzium, * = desmosomale Proteine, wie Plakoglobin.

Die zweite große Proteingruppe in Desmosomen sind Armadillo-Proteine. Das gemeinsame Kennzeichen dieser Proteine ist eine Motivsequenz aus Aminosäuren, die im Protein repetitiv vorliegt, wobei sich die Proteine durch die unterschiedliche Anzahl an Motivsequenzen unterscheiden. Namentlich sei hier das Plakoglobin (γ -Catenin) genannt, welches z.B. 13 Motivsequenzwiederholungen enthält [8] und in Desmosomen, wie auch in Adherens Junctions, zu finden ist. Besonders auffallend ist die Tatsache, dass es direkt an Cadherine, Desmoplakine, oder auch Plakophiline bindet und eine Defizienz dieses Gens in Mäusen zu embryonaler Letalität führt, wobei sich histologisch eine Aufhebung der typischen Glanzstreifenstruktur und das gänzliche Fehlen von Desmosomen nachweisen lassen. Diese Veränderungen gehen mit schweren Herzmuskeldefekten einher, die zur Lebensunfähigkeit des Embryos führen [9]. Darüber hinaus konnten Lewis *et al.* 1997 schon eine subzelluläre Kommunikation zwischen Desmosomen und Adherens Junctions nachweisen und zeigen, dass Plakoglobin auch als Signalmolekül dient. Ein weiteres Armadillo-Protein ist Plakophilin-2, welches, außer in Herzmuskelzellen, auch in folliculären Lymphknotenzellen zu finden ist [10]. Auch eine intranukleäre Lokalisation in der Zelle wurde beschrieben [6].

Die dritte große Gruppe der desmosomalen Proteine sind Plakine, z.B. Desmoplakin, die innerhalb desmosomaler Strukturen des Kardiomyozyts an Intermediärfilamente wie Desmin binden [7, 11] und diese über Armadilloproteine wie das o.g. Plakoglobin oder Plakophilin-2 mit desmosomalen Cadherinen verankern [12].

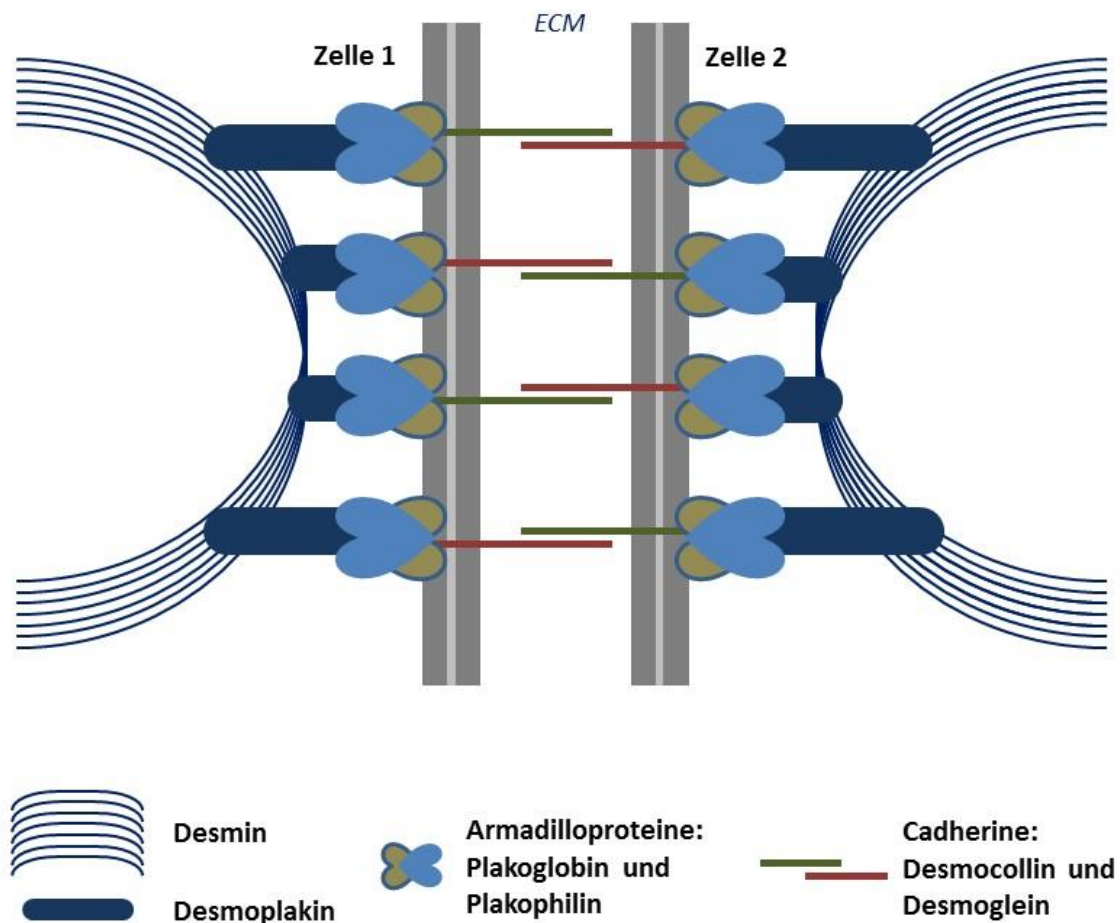


Abbildung 1-2: Aufbau des Desmosoms modifiziert nach [13]. Das Intermediärfilament Desmin ist über Desmoplakin mit Plakophilin und Plakoglobin verbunden. Diese beiden Armadilloproteine binden direkt an die desmosomalen transmembranären Cadherine Desmocollin und Desmoglein. Über diese Kette sind Intermediärfilamente mit der Plasmamembran verbunden.

1.1.2. Adherens Junctions

Eine weitere Struktur in der Plasmamembran, welche eine essenzielle Rolle für die Mechanik und Polarität des Kardiomyozyts spielt, ist die Adherens Junction. Ihre besondere Rolle liegt in der Verbindung der Aktinfilamente mit der Plasmamembran. Darüber hinaus verbinden Adherens Junctions auch zellübergreifend (über Cadherine und Nectine) benachbarte Kardiomyozyten und sorgen so für eine adäquate Kontraktion, die sich dann über das gesamte Gewebe erstrecken kann. Auch wurde für Adherens Junctions eine Signalfunktion im Sinne einer zentralen Schalt- und

Anlaufstelle diverser Moleküle beschrieben. So ließ sich zeigen, dass diverse Gruppen von Kinasen und Phosphatasen die Aktivität der Cadherine, sowie ihre Lokalisation, beeinflussen. Rho-GTPasen modulieren zum Beispiel die Aktivität der Catenine und auch anderer Adherensproteine [14].

Die beiden Proteinkomplexe, die den wesentlichen Anteil an der transzellulären Verankerung und Stabilität der Adherens junctions ausmachen, sind zum einen Cadherin-Catenin-Komplexe und zum anderen Nectin-Afadin-Komplexe [15].

Dabei stellen jeweils die Cadherine bzw. die Nectine die transmembranöse Domäne des jeweiligen Komplexes dar. Cadherine binden auf intrazellulärer Seite über β -Catenin an α -Catenin. Es wurde allerdings auch eine Verbindung zwischen β -Catenin und Plakoglobin beschrieben, welches wiederum seinerseits mit α -Catenin bindet. Die tragende Rolle des α -Catenin liegt in der soliden Bindung mit F-Aktin, welches als Teil des Sarkomers für die Kontraktion der Muskelzelle mit von Bedeutung ist. Weitere Verbindungspartner von α -Catenin sind α -Actinin und ZO-1 (Zonula Occludens-Protein 1) [16].

Wie schon zuvor beschrieben (siehe Abbildung 1-1), bestehen klassische Cadherine aus fünf extrazellulären kalziumbindenden Domänen, die über eine extrazelluläre Ankerdomäne in den transmembranösen Teil übergehen. Auf intrazellulärer Seite bieten Cadherine eine Catenin-Bindungsstelle, mit der sie vornehmlich an β -Catenin binden. Zhurinsky *et al.* konnten im Jahr 2000 zeigen, dass Cadherine bei Abwesenheit von β -Catenin auch ersatzweise an Plakoglobin binden können [17]. Die extrazelluläre Domäne des Cadherins geht eine Interaktion mit Cadherinen benachbarter Zellen ein und sorgt somit für eine Zell-Zell-Adhäsion [18].

Nectin, das im Gegensatz zu Cadherinen kalziumunabhängig ist, geht auf intrazellulärer Seite eine Verbindung mit Afadin ein, welches hierbei den direkten Bindungspartner von Aktin darstellt. Analog zu den Cadherinen geht auch die extrazelluläre Domäne des Nectins eine Interaktion mit benachbarten Nectinen ein und trägt so, neben der Cadherine, zum Gewebeverbund bei.

Eine schematische Darstellung der Adherens Junctions zeigt Abbildung 1-3.

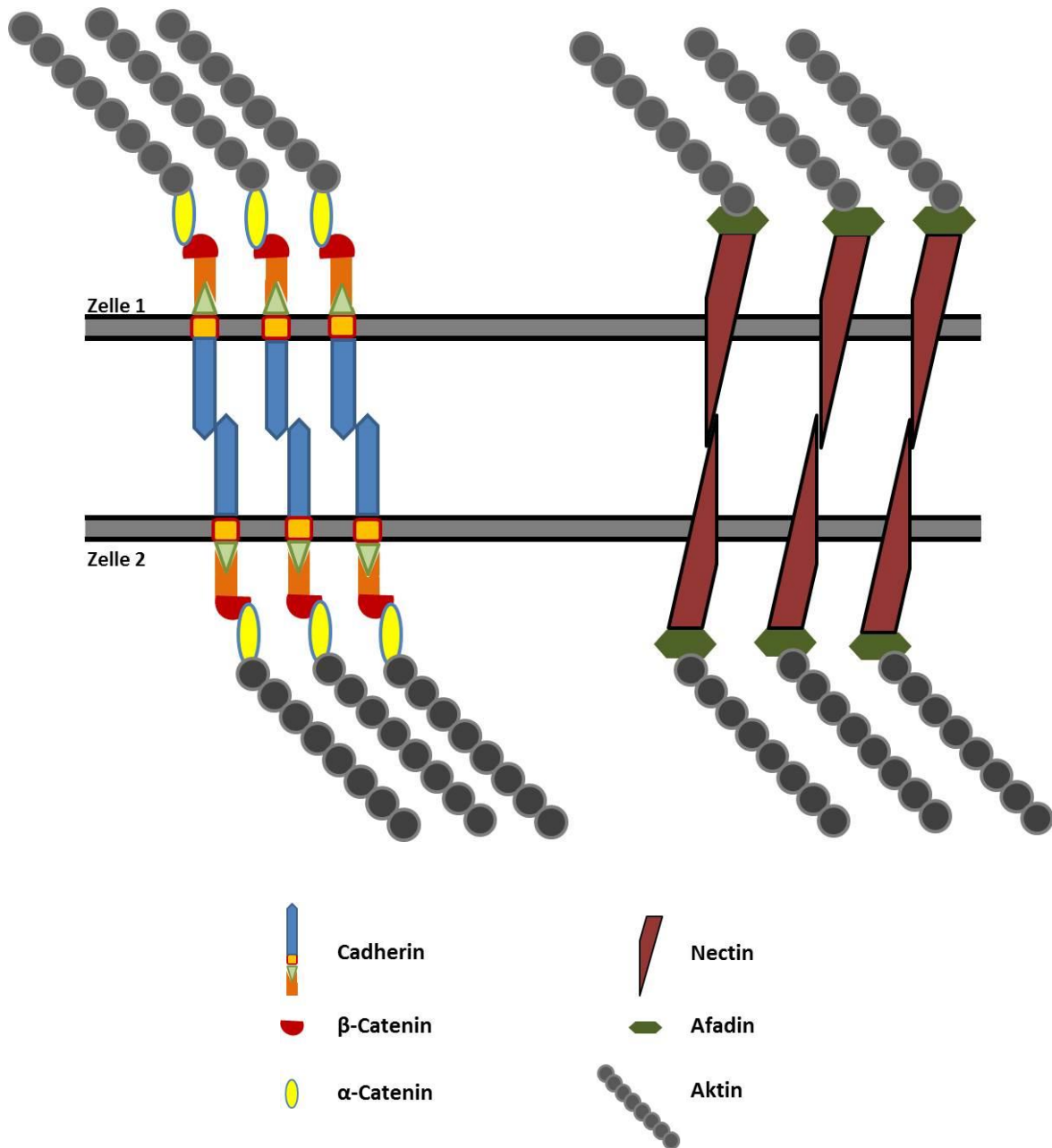


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung einer Adherens Junction modifiziert nach [93]. Die Verbindung zweier Zellen wird über Nectine, bzw. Cadherine aufgebaut. Nectin bindet intrazellulär an Afadin. Analog bindet Cadherin an β-Catenin. Afadin bindet zum einen direkt an Aktin, vermag dies aber auch über eine Bindung mit α-Catenin zu bewerkstelligen (nicht dargestellt). Der Cadherin-β-Catenin-Komplex bindet über α-Catenin an Aktin.

1.1.3. Gap Junctions

Eine weitere Struktur des Glanzstreifens ist die Gap Junction (Lückenverbindung). Wie der Name schon impliziert, besteht im Bereich der Gap Junctions eine Lücke von etwa 2-4 nm zwischen den Plasmamembranen benachbarter Zellen, die in diesen Bereichen von Kanälen durchsetzt sind [20]. Sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau und ihrer Funktion essenziell von den bisher genannten Glanzstreifenstrukturen. Ihre wohl markanteste Besonderheit liegt in der Tatsache, dass Sie die Zytoplasmen der benachbarten Zellen direkt verbindet [3]. Diese direkte Verbindung wird über Poren gewährleistet, die unter anderem aus Connexinen und Pannexinen aufgebaut sind [3, 19]. Hierbei bilden sechs Connexine ein so genanntes Connexon, welches transmembranös einen Kanal bildet, das auf gegenüberliegender juxtazellulärer Seite in den Kanal des jeweiligen gepaarten Connexons übergeht [20]. Dieser gemeinsame Kanal ist durchlässig für Moleküle mit einer Größe von bis zu 1 kD, wie zum Beispiel Elektrolyte oder second messenger, wie cAMP und IP₃ [21].

Eine weitere wichtige Rolle von Gap Junctions im Herzmuskelgewebe, ist die Weiterleitung elektrischer Signale, wodurch konsekutiv eine adäquate Kontraktion gewährleistet werden kann [20, 22, 23]. Abbildung 1-4 zeigt zwei benachbarte Connexone.

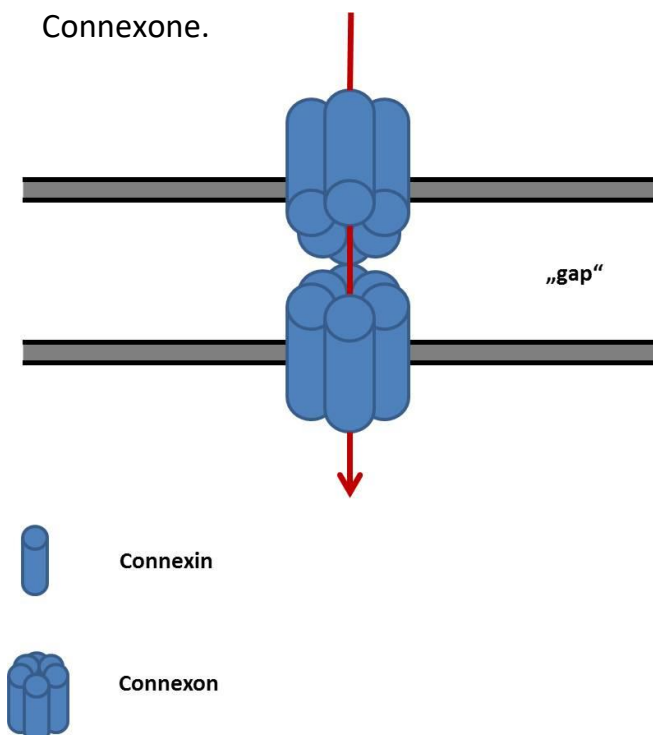


Abbildung 1-4: Sechs Connexine bilden ein Connexon. Zwei benachbarte Connexone verbinden sich.

1.2. Kardiale Hypertrophie und Kardiomyopathie

Laut Statistischem Bundesamt in Wiesbaden stehen Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems unangefochten an der Spitze der Todesursachenstatistik. Allein im Jahr 2013 betrug die Zahl Herztoter über 354.000 (Statistisches Bundesamt 2015). Dies entspricht 39% aller Todesfälle und führt die Liste noch vor Platz 2 (Maligne Neubildungen, 25% aller Todesfälle) an. Zu den Grunderkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems zählen, neben atherosklerotischen Veränderungen im Sinne einer koronaren Herzkrankheit, auch embolische Geschehen, Herzrhythmusstörungen, arterieller Hypertonus, Herzinsuffizienz und Kardiomyopathien. Hierbei ist die Schnittfläche zwischen Kardiomyopathien und Herzinsuffizienz mitunter recht groß. So können gewisse Kardiomyopathien in fortgeschrittenen Stadien in eine Herzinsuffizienz münden. Dabei ist eine Kardiomyopathie definiert als eine Erkrankung des Herzmuskels in Abwesenheit einer koronaren Herzkrankheit, eines arteriellen Hypertonus, Klappenerkrankungen und angeborener Herzfehler. Zusammengefasst werden die Ursachen also rein kardial bzw. genetisch gesehen. Man unterscheidet hier eine familiäre Häufung von einer idiopathischen Ursache. Beschrieben sind allerdings Mutationen in vornehmlich sarkomeren Genen, wie die für β -Myosin-Heavy-Chain, Plakoglobin oder Desmoplakin. Auch im Rahmen von Syndromen, wie die Friedreichs Ataxie, des Noonans Syndroms oder Leopards Syndroms, sind Kardiomyopathien gehäuft beobachtet worden [94]. Gemeinsam ist allen Entitäten eine Dysfunktion des Myokards, die sich auf elektrische oder mechanische Störungen zurückführen lässt und im Falle einer HCM (hypertrophe Kardiomyopathie) in eine Hypertrophie, insbesondere des linken Ventrikels, mündet. Diese, in der Regel progrediente Hypertrophie, kann letzten Endes zu einer Herzinsuffizienz führen [24]. Zwingend zu unterscheiden von dieser pathologischen Art der Hypertrophie ist die physiologische Hypertrophie, die im Sinne einer Adaptation bei Sportlern oder während der Gravidität auftritt. Ausschlaggebend für die pathologische Hypertrophie ist das *Remodeling* des Myokards, welches über eine ventrikuläre Dilatation mit systolischer

Dysfunktion und malignen ventrikulären Arrhythmien, in ein Herzversagen und letztlich auch in einen plötzlichen Herztod münden kann [25].

1.2.1 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die Hypertrophie am Herzen kann in eine konzentrische und exzentrische Hypertrophie unterteilt werden [26]. Hierbei kann der Reiz zur Hypertrophierung durch eine erhöhte Druckbelastung, z.B. bei Klappenstenosen oder im Rahmen arterieller Hypertonie erfolgen [33, 34]. Ebenso kann auch eine Volumenbelastung bei Klappeninsuffizienzen zu einer Hypertrophie führen [34]. Eine klinisch von außen nicht eruierbare Ursache der Hypertrophie, stellen genetische Mutationen zum Beispiel im Gen des β -Myosin-Heavy-Chain (MYH7), des Myosin-Binding-Protein C (MYBPC3) oder des kardialen Troponin T (TNNT 2) dar [27, 28, 29]. Diese primäre Form der Kardiomyopathie wird *Hypertrophe Kardiomyopathie* (HCM) genannt und betrifft im Wesentlichen den linken Ventrikel. Überzufällig ist das interventrikuläre Septum ausgeprägt hypertrophiert, weshalb die Hypertrophie bisweilen auch als asymmetrisch bezeichnet wird. Maron BJ *et al.* konnten schon 1983 einen direkten Zusammenhang zwischen HCM und plötzlichem Herztod (PHT) nachweisen und 1995 zeigen, dass die HCM mit einer Prävalenz von 1:500 eine der häufigsten Ursachen eines PHT junger Menschen ist [30, 31]. Dabei zeigte sich der häufigste Gendefekt in dem schon o.g. MYH7 Gen. Mit nahezu gleicher Häufigkeit ließen sich Defekte im MYBPC3-Gen nachweisen. Beide zeigen eine Häufigkeit von knapp 30 % aller HCM-Mutationen [32].

Eine Hypertrophie ist definiert als eine Gewebezunahme in Folge einer Zunahme der Zellgröße, in diesem Fall des Kardiomyozyts (im Gegensatz zur Hyperplasie, die eine Gewebezunahme in Folge einer Zunahme der Zellzahl beschreibt). Die Kardiomyozyten versuchen so, den erhöhten Ansprüchen durch den erhöhten biomechanischen Stress in Form erhöhter Wandspannung gerecht zu werden [33]. Diese Anpassungsvorgänge führen unter anderem zu einer erhöhten Proteinbiosynthese und zu vermehrter Fibrose [32, 35]. Besonders problematisch ist hierbei die Tatsache, dass die Fibrose, nebst der Hypertrophie per se, die Compliance

des Herzens herabsetzt und es so zu einer diastolischen Funktionsstörung des Herzens kommt, wohingegen die systolische Funktion zunächst unberührt bleibt [36].
Abbildung 1-5 zeigt die Mechanismen, die zur diastolischen Dysfunktion führen können.

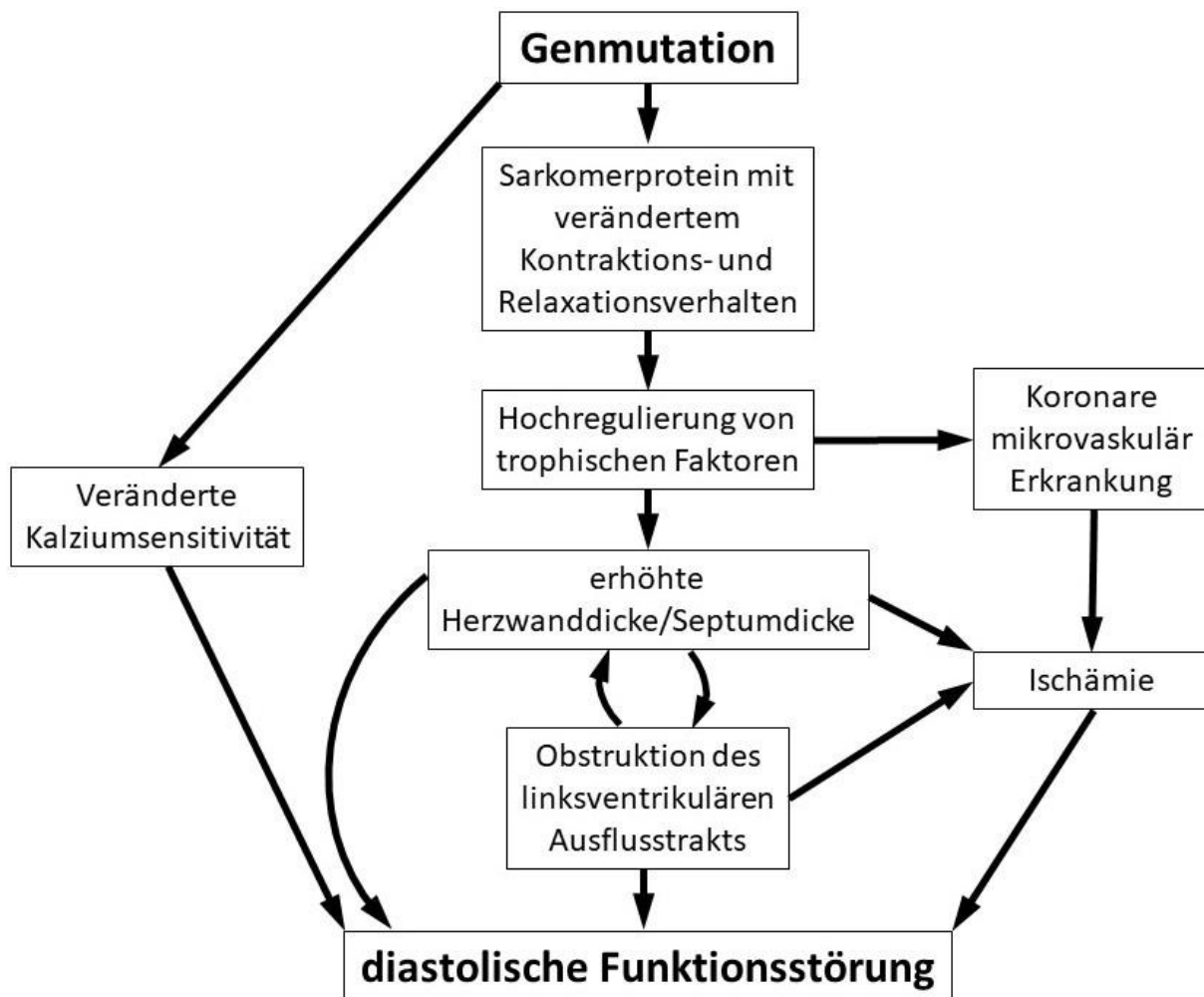


Abbildung 1-5: Mechanismen, die bei HCM zu diastolischer Dysfunktion führen. Übersetzt und modifiziert aus [44].

Wie oben bereits erwähnt, lassen sich außer Gendefekte auch äußere Stimuli ausmachen, die zu einer Hypertrophie des Myokards führen. Diese Stimuli, z.B. Druck- und Volumenbelastung, führen über intrazelluläre Signalkaskaden zu einer erhöhten Transkription prohypertropher Gene, die über eine erhöhte Proteinsynthese und Neuorganisation der Sarkomere zur Hypertrophie führen [37].

1.2.2 Dilatative Kardiomyopathie

Etwas häufiger als die hypertrophe Kardiomyopathie, ist die *dilatative Kardiomyopathie* (DCM) [38]. Wie der Name impliziert, handelt es sich morphologisch um eine Erweiterung des ventrikulären Durchmessers, die in Folge zu einer systolischen Fehlfunktion mit einer verringerten Ejektionsfraktion (EF) einhergeht [24].

Wie oben bereits erwähnt, scheinen genetische Mutationen die häufigste Ursache einer Kardiomyopathie zu sein. So wurden schon Mutationen in Genen beschrieben, die für Glanzstreifenproteine wie Desmoplakin kodieren. Auch Zellmembranproteine wie Dystrophin, Z-Scheibenproteine wie Desmin, Titin oder Aktin, sowie Sarkomerproteine, wie Troponine und das o.g. MYH7, scheinen betroffen zu sein [40]. Ungeachtet dessen betonten Frey und Katus 2008, dass Myokarditiden oder Autoimmunerkrankungen letztlich auch in einer DCM münden können, weswegen einer gerichteten Anamnese, abseits apparativer und genetischer Diagnostik, eine gewichtige Bedeutung zu kommt [40].

Zur apparativen Diagnostik zählt aufgrund ihrer ubiquitären Verfügbarkeit und ihrer hohen Sensitivität allen voran die Echokardiografie [41]. In ihr zeigt eine DCM neben einer Kammererweiterung, oft eine deutliche Reduktion der Wandstärke begleitet von Hypo- und Akinesien [24]. Auch die DCM ist neben einer HCM eine der häufigeren Ursachen des PHT [24, 42]. Es ist schon seit längerem bekannt, dass sie ebenfalls mit einer erhöhten Prävalenz an Vorhofflimmern einher geht, jedoch zeigten Tuomainen *et al.* 2014, dass paradoxerweise der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD) bei DCM Patienten mit VHF signifikant kleiner ist als bei DCM Patienten im Sinusrhythmus [43]. Abbildung 1-6 zeigt eine Synopsis hereditärer Kardiomyopathien und eine Auswahl ihrer betroffenen Proteine.

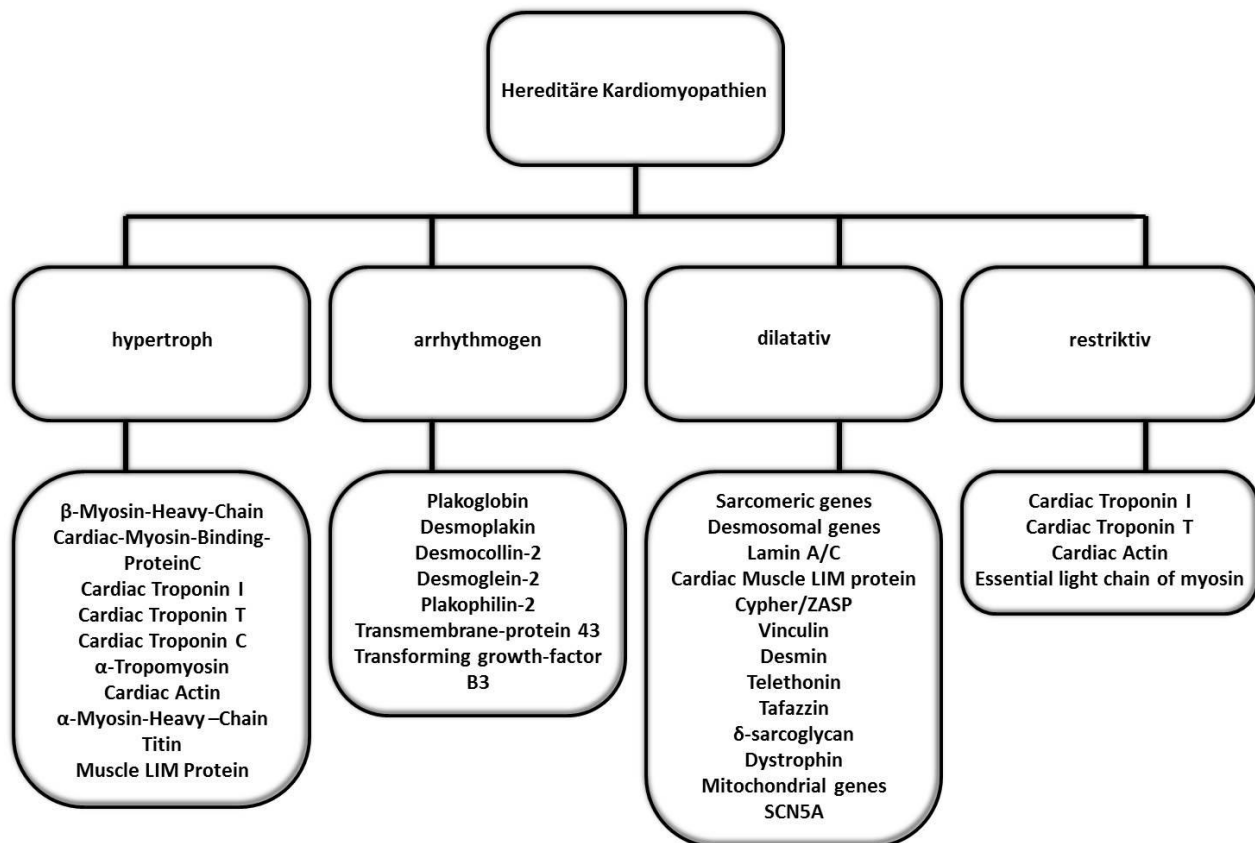


Abbildung 1-6: Die Klassifikation hereditärer Kardiomyopathien. Bearbeitet aus [53].

1.3. Die Rolle des Glanzstreifens in Kardiomyopathien

Die klassische Vorstellung von Zell-Zell-Verbindungen am Glanzstreifen beinhaltete die drei oben genannten strukturell unterschiedlichen Komponenten: Desmosomen, Adherens Junctions und Gap Junctions. Bennett *et al.* schlugen darüber hinaus 2006 eine weitere bisher nicht bekannte Verbindungsart vor: die *Transitional Junction* (aus dem Engl.: Übergangsverbindung), die eine spektrin-reiche Region am Rande des Glanzstreifens darstellt [35, 45]. Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen unter der Leitung von Prof. Franke (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) zeigten ferner keine strikte Separation der desmosomalen Proteine von Adherens Junctions. Vielmehr ließen sich die ursprünglich charakteristisch desmosomal geltenden Proteine, wie Desmoplakin oder Plakophilin-2, auch in Adherens Junctions nachweisen. Dies führte zur Abkehr des klassischen Bildes dieser Zellverbindungen

und ließ das Konzept einer „*Area Composita*“ im Sinne einer Zellverbindungseinheit wahrscheinlicher erscheinen [46, 47].

Das myokardiale Gewebe ist während einer Muskelkontraktion großen Druck-, Zug-, und Scherkräften ausgesetzt. Um als Einheit fungieren zu können und die Kontraktion weiterleiten zu können, muss die Integrität der Desmosomen und Adherens Junctions gewährleistet sein. Unlängst wurden schon Genmutationen in desmosomalen Proteinen beschrieben, die zu unterschiedlichen Pathologien im Sinne hereditärer Kardiomyopathien führen. Mutationen für Desmoplakin, Plakophilin-2 oder auch des Intermediärfilaments Desmin führen mitunter zu DCM oder auch zu der sehr viel selteneren ARVCM (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy) [48, 49], bzw. der Naxos-Krankheit (ARVCM + wolliges Haar + Keratoderma) [50, 51].

Ein Foto dieser, zur Kategorie der „*orphan disease*“ zählenden Krankheit, zeigt Abbildung 1-7.

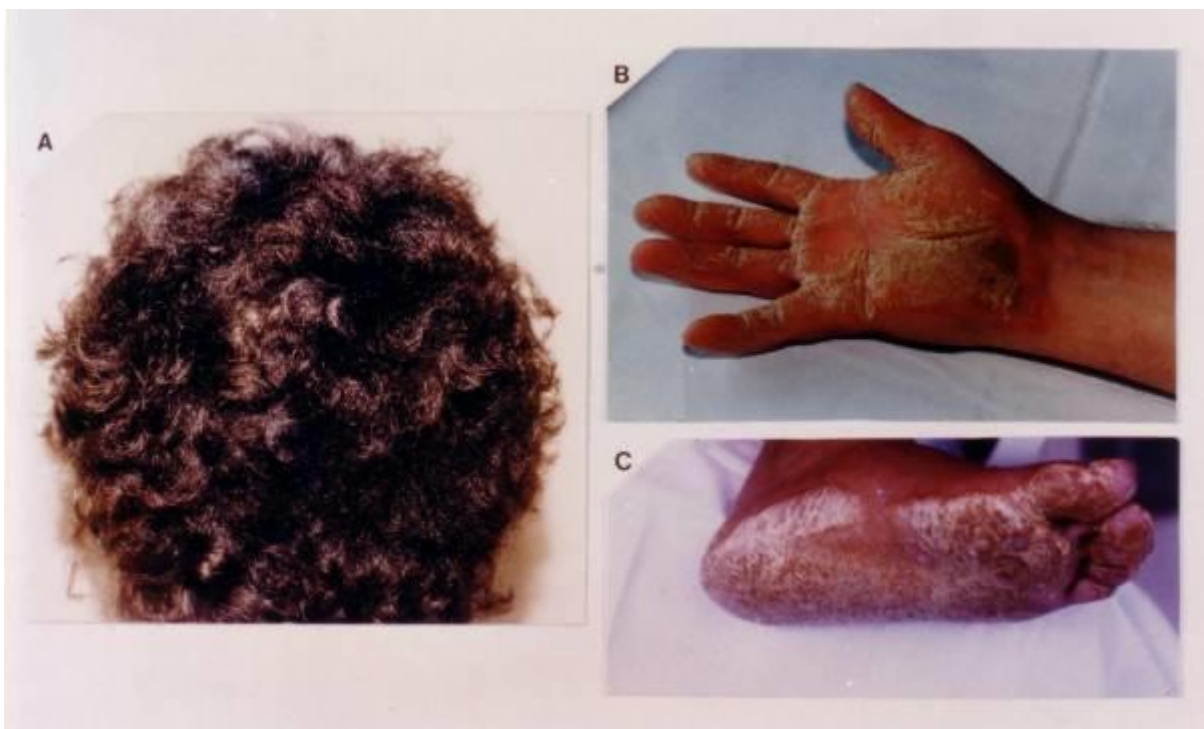


Abbildung 1-7. Die kardiokutane Naxos-Krankheit. A = wolliges Haar, B = palmare Keratose, C = plantare Keratose. Aus [51].

Mutationen im Cadherin Desmoglein-2 wiederum führten beispielsweise zu einer elektronenmikroskopisch sichtbaren Verkürzung der Desmosomen mit hochsignifikanten Funktionseinbußen und letztlich einer DCM [52].

Die Komplexität der Kardiomyopathien und die augenfällige Rolle des Glanzstreifens als „Hotspot“ hereditärer Erkrankungen eröffneten einen neuen molekular-kardiologischen Forschungsschwerpunkt und führten zu einer Vielzahl an Publikationen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten zahlreiche Mutationen in Genen identifiziert werden, die für Glanzstreifenproteine kodieren. Auch neue, noch unbekannte Glanzstreifenproteine und Isotypen wurden in diesem Zusammenhang entdeckt. So entdeckten *Seeger und Frank et al.* 2010 ein neues Gen, welches für ein 463 Aminosäuren langes Protein kodiert, das den Namen ‚Myozap‘ (**My**ocardium-enriched **zo**nula occludens-1-**asso**ciated **p**rotein) erhielt [54].

In vorangehenden Publikationen konnte gezeigt werden, dass Myozap insbesondere im Herzen und hier subzellulär, vor allem am Glanzstreifen, exprimiert wird. Es co-lokalisiert mit diversen anderen Glanzstreifenproteinen, zum Beispiel mit β -Catenin, N-Cadherin, Plakophilin-2, Desmoplakin und ZO-1 [54 – 56]. Interessanterweise zeigte eine Co-Immunopräzipitation eine Interaktion mit Dysbindin, einem bis dahin nur in neuronalem Gewebe bekannten Protein, das bis her nur mit Schizophrenie in Verbindung gebracht wurde und welches sich, ähnlich wie Myozap, als Aktivator des RhoA-abhängigen SRF-Signalwegs (SRF = Serum-Response-Factor) herausstellte. Dies führte letztlich zu der Hypothese, dass Dysbindin womöglich einen gleichsinnigen Effekt auf die Hypertrophie von Kardiomyozyten habe. Überexpressionsversuche in NRVCMS zeigten schließlich eine starke RhoA-induzierte Hypertrophie der Kardiomyozyten über den SRF-Signalweg [57].

Erste *in vitro* Daten offenbarten, dass Myozap den SRF-Signalweg aktiviert, wohingegen dieser durch MRIP (Myosin Phosphatase-RhoA Interacting Protein) inhibiert wird. Auch das o.g. Dysbindin interagiert mit RhoA und vermag analog wie Myozap den SRF-Signalweg zu aktivieren.

Ziel dieser Doktorarbeit ist die bisher in HEK293T-Zellen gefundenen Ergebnisse in Kardiomyozyten zu reproduzieren und die Rolle des Myozaps *in vivo* zu studieren. Für die *in vitro* Experimente wurden adenovirale Konstrukte kloniert, die als Vektoren zu einer erhöhten Myozap-Expression in NRVCM (neonatal rat ventricular cardiomyocytes) führten. Um den Einfluss des Myozaps *in vivo* und unter Druckbelastung zu studieren, wurden Myozap-transgene Mäuse und ihre Wildtypen einer Nachlasterrhöhung durch eine transverse Aortenkonstriktion zugeführt (transverse aortic constriction, TAC). Postoperativ wurden diese Tiere und ihre Kontrollgruppen echokardiografisch untersucht. Um die durch die TAC entstandene Hypertrophie darüber hinaus quantifizieren zu können, wurden die Mäuse und ihre Herzen morphometrisch untersucht und Gewebeproben für molekulare und histologische Analysen entnommen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

-alphabetisch sortiert-

Adhesive clear qPCR seals	Sheets Biozym Scientific GmbH
Agarplatten	Sarstedt
Axiovert 40 CFL mit HBO50	Zeiss
Branson 2200 Ultrasonic Cleaner	Polzin Laborbedarf
Culture Flask 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt
Culture Plate cellstar 24/12/6 well	Greiner, Bio-One
Deckgläser	Menzel Gläser
Duomax 1030	Heidolph
Elektroporations-Küvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH
Fireboy IBS Integra	Biosciences
FlourChemQ	Alpha-Innotech
Galaxy Mini Star Centrifuge	VWR
Gefrierschrank -80°C REVCO ULTIMA PLUS	Thermo Scientific
Heracell 240 i	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge X3R centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus PICO21 Centrifuge	Thermo Electron Corporation
Hera safe	Thermo Scientific
High Performance Ultraviolet- UVP Transilluminator	Infinite M200 PRO-TECAN
Inkubator 37°C	Heraeus Instruments
Inkubator steri cult 200	Labotect
MAX Q 8000	Thermo Scientific
Megafuge 16R	Thermo Scientific
Micro Pulser	Bio-Rad Laboratories
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss

Mikroskop MZ 6	Leica
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories
MultimageIII®	Alpha Innotech
Multipipette® plus	Eppendorf
My Cycler	Bio-Rad Laboratories
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth
Objektträger	Superior Marienfeld
Paramix (Vortexer)	inlabo
Parafilm „M“	Labaratory Film
Paramix Labortechnik II	Julabo Labortechnik GmbH
Pasteurpipetten 230 mm	ROTH
PCR Platte 96 well, farblos	Biozym Scientific GmbH
Personal cycler	Biometra®
Power Pack Basic /HC	Bio-Rad Laboratories
Power PackP25 Biometra®	
Pipette automatisch Research pro 5-100 µl	Eppendorf
Pipetten, manuell	Eppendorf
Pipetten, manuell	GILSON
Pipetten, serologische 2 ml, 5 ml,10 ml,25 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
RCT basic safety control	IKA®
Röhrchen 14 ml, 50 ml BD	Falcon
Safe Seal microtube 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Spectrophotometer Nanodrop	peqLab Biotechnologie GmbH
SterilGard Biosafety Cabinet	The Baker Company
Stretcher Flexlink SHEL-LAB	
Sub-Cell GT Bio-Rad Laboratories	
Sub-Cell GT Wide Mini Bio-Rad Laboratories	

Superfrost-Plus Menzel Gläser	Thermo Scientific
System VX-65 (Autoklav)	System
System DB-23 (Autoklav)	System
Tetramax 100	Heidolph
Thermal Cycler C1000™	Bio-Rad Laboratories
Thermomixer comfort	Eppendorf
Variomag Poly	Thermo Scientific
Vacunsafe comfort	IBS INTEGRA BIO SCIENCES
Vivid 7 pro	Dräger
Vortex-Genie2	Scientific Industries
Wasserbad GFL	Polizin Laborbedarf
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Zentrifuge Fresco 21	Thermo scientific
Zentrifuge Galaxy Mini star	VWR

Operationsbedarf:

2 x feine stark gebogene chirurgische Pinzetten Aesculap, 100 mm (4")

2 x feine gerade chirurgische Pinzetten Aesculap, 100 mm (4")

1 x feine leicht gebogene chirurgische Pinzette, 100 mm (4")

1 x blaue Braunüle (22 Gauge), BBraun. Melsungen

1 x Intubationsspatel

1 x Stahlkanüle, 27 Gauge

1 x Beatmungsapparat inklusive Vaporizer, Harvard Apparatus

Isofluran zur Inhalationsnarkose, Baxter, USA

Mikroskop, MZ 6, Leica

1 x OP-Tischchen, Harvard Apparatus

1 x Temperaturmesssonde, Harvard Apparatus

Buprenorphin, Temgesic, Reckitt-Benckiser

1 X 1 ml Spritze, BBraun, Melsungen

6-0 Faden und 4-0 Faden, Prolene, Ethicon

2.1.2 Chemikalien

-alphabetisch sortiert-

Agarose	Biozym
Albumin fraction V	Merck
Ammonium persulfat (APS)	Carl Roth
Bis-Tris	Carl Roth
Collagenase Type 2	Cell Systems Biotech. Vertrieb
Collagen, Bovine, Type1 BD	BioScience
Collagen Solution	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Carbenicillin	Carl Roth
Dapi	Invitrogen
DMEM	Invitrogen-Gibco
Endothelin1	Sigma
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Fetal Bovine Serum	Biochrom
Fötales Kälberserum	PAA-Laboratories
Glycerin	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Kanamycin	Sigma
L-Glutamine	Invitrogen-Gibco
Methanol ROTIPURAN	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
MgSO ₄	Thermo Scientific
NatriumAcetat	Carl Roth
Newborn calf serum	Invitrogen
Qiazol®Lysis Reagent	Qiagen
PEG/MgCl ₂ 30 % Solution	Invitrogen

Pancreatin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen-Gibco
Percoll	GE Healthcare
Phenylephrinehydrochloride	Sigma-Aldrich
Ponceau Solution	Sigma-Aldrich
Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
Roti® P/C/I	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
N,N,N,N-tetramethylethylenediamine	Carl Roth
Tissue-Tek Compound	Sakura
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Trypan blue Solution	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	PAA-Laboratories GmbH

Farbstoffe für die Fibrosefärbung

Fast Green
Sirius Red

2.1.3 Enzyme

Dream Taq DNA Polymerase	Fermentas
Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
MscI (Restriktionsenzym)	Fermentas
PacI (Restriktionsenzym)	New England Biolabs
Proteinase K	Invitrogen

2.1.4 Antikörper

Anti alpha Actinin (mouse)	Sigma-Aldrich
Anti-Ad.Virus (goat) FITC-konjugiert	Meridian
Anti-BiP (rabbit polyclonal)	Cell Signaling
Anti-Caspase-12 (rabbit polyclonal)	Cell Signaling
Anti-IRE α (rabbit polyclonal)	Cell Signaling
Anti-Myozap (rabbit polyclonal)	nicht kommerziell
Anti-Myozap (mouse monoclonal)	nicht kommerziell
Anti-p62 (rabbit polyclonal)	Cell Signaling
Anti-myc-tag (mouse monoclonal)	Cell Signaling
Anti-PDI (rabbit polyclonal)	Cell Signaling
Anti-PERK (rabbit polyclonal)	Cell Signaling
Anti-LC3 (rabbit polyclonal)	Cell Signaling
Anti-SRF (mouse monoclonal)	Cell Signaling
Anti-Catenin (mouse monoclonal)	Zymed, San Francisco, USA
Anti-N-Cadherin (mouse monoclonal)	Biosciences, Heidelberg, D
Anti-Plakophilin-2 (mouse monoclonal)	Progen, Bath, UK
Anti-Hexon-Antikörper (FITC-gekoppelt)	Sigma-Aldrich
Anti-mouse GAPDH	Sigma-Aldrich
Anti-goat IgG- HRP- konjugiert (donkey)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MCIP (rabbit)	nicht kommerziell
Anti-mouse IgG HRP-konjugiert (goat)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-mouse CY3	Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit IgG HRP-konjugiert (donkey)	Santa Cruz Biotechnology
Lectin from Tritium vulgaris FICT-konjugiert	Sigma-Aldrich

2.1.5 Kits

Express SYBER Green ER	Invitrogen
IQ™ Multiplex Powermix	Bio-Rad Laboratories
Lipofectamin 2000 and Plus™ Reagent	Invitrogen
NucleoSpinR Plasmid	Macherey-Nagel
DNA, RNA and protein purification:	
Plasmid Maxi Kit 25	Qiagen
Plasmid Midi Kit 100	Qiagen
Plasmid Mini Kit 100	Qiagen
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen
TaqMan® MICRO-RNA Reverse	Invitrogen
Transcription Kit	Thermo-Scientific

2.1.6 Oligonukleotide

Primer für die Realtime-PCR (Eurofins MWG Operon)

qPCR Myh7 F 5'-GCA-GCA-GTT-GGA-TGA-GCC-ACT-3'

qPCR Myh7 R 5'-TCG-GTG-CCT-GAA-GCT-CCT-TG-3'

qPCRmNppa109 5'-CCC-TGG-GCT-TCT-TCC-TCG-TCT-T-3'

qPCRmNppa229 5'-TCC-AGG-TGG-TCT-AGC-AGG-TTC-TTG-3'

qPCRmNppb635 5'-CAC-TTC-AAA-GGT-GGT-CCC-AGA-GC-3'

qPCRmNppb519 5'-GTC-GTT-TGG-GCT-GTA-ACG-CAC-T-3'

MYH7r_135_F 5'-CAA-GCA-GCA-GTT-GGA-TGA-GCC-3'

MYH7r_135_R 5'-TCC-TCG-ATG-CGT-GCC-TGA-AG-3'

NPPAr_128_F 5'-AAA-CTG-AGG-GCT-CTG-CTG-GC-3'

NPPAr_128_R 5'-GGC-TGT-TAT-CTT-CGG-TAC-CGG-AAG-3'

NPPBr_124_F 5'-TCCGGA-TCC-AGG-AGA-GAC-TTC-G-3'

NPPBr_124_R 5'-TCC-TAA-AAC-AAC-CTC-AGC-CCG-TC-3'

Oligonukleotide für die Gateway Klonierungen (Eurofins MWG Operon)

4.34_attBF: 5'-GGGG ACAA GTTT GTAC AAAA AAGC TGGC TAGTA TGTC CATA
TTAG GACA TCTA CC-3')

4.74_attBF: 5'-GGGG ACAA GTTT GTAC AAAA AAGC TGGC TAAAT GAGT CTTC
GGAC CTCG-3')

pGL4_attBRpA: 5'-GGGG ACCA CTTT GTAC AAGA AAGC TGGG TTTTA CCAC ATTT
GTAG AGGT TTTA CTTG-3'

2.1.7 Vektoren/ Plasmide

pAd/CMV/V5-Dest		Invitrogen
pDONR 221		Invitrogen
pGL4.15	[luc2P/Hygro]	Promega, Mannheim, Germany
pGL4.27	[luc2P/minP/Hygro]	Promega, Mannheim, Germany
pGL4.34	[luc2P/SRF-RE/Hygro]	Promega, Mannheim, Germany
pGL4.74	[hRluc/TK]	Promega, Mannheim, Germany

2.1.8 Puffer und Lösungen

ADS-Puffer (10x konzentriert)

1,16 M NaCl	Sigma-Aldrich
197 mM HEPES	Sigma-Aldrich
94 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Sigma-Aldrich
55,5 mM Glukose	Sigma-Aldrich
53,6 mM KCL	Sigma-Aldrich
8,3 mM MgSO ₄	Sigma-Aldrich

DNA-Ladepuffer (6x konzentriert)	Fermentas
1 kb DNA Ladder (Gene Ruler)	Fermentas

1 kb Plus DNA Ladder (Gene Ruler)	Fermentas
DreamTaq Green Buffer	Thermo Scientific

Kernlysepuffer

1 M Tris	Sigma-Aldrich
5 M NaCl	s.o.
1 M MgCl ₂	s.o.
1 % Triton x	s.o.
Phosphatase Inhibitor 1	Biozym
Phosphatase Inhibitor 2	s.o.
Proteinase Inhibitor 25x	s.o.
1 M DTT	Sigma-Aldrich

Laufpuffer für SDS-PAGE (10x konzentriert)

Tris Base	Sigma-Aldrich
Glycin	s.o.
1 % SDS	s.o.
pH 8,3	s.o.
Page Ruler™ Plus, Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PBS	PAA-Laboratories
Pfu Buffer 10x	Fermentas

Protein-Ladepuffer nach Laemmli (4x konzentriert)

Tris Base	Sigma-Aldrich
Glycerin	s.o.
SDS	s.o.
0,5 M EDTA	s.o.
Bromphenol blau	s.o.
pH 6,8	

Sammelgelpuffer

500 nM TRIS	Sigma-Aldrich
0,4 % SDS	s.o.
pH 6,8	

TAE-Puffer

2 M Tris Base	Sigma-Aldrich
Eisessig	s.o.
0,5 M EDTA	s.o.
10x TBS	s.o.
0,25 M Tris Base	s.o.
1,5 M NaCl	s.o.
25 % HCl	s.o.
1x TBST	s.o.
10x TBS	s.o.
Tween 20 0,1 %	s.o.
ddH ₂ O	s.o.

Transferpuffer für Western Blotting (für 3 Liter)

17,4 g Tris Base	Sigma-Aldrich
87,0 g Glycin	s.o.
3 g 10 % SDS-Lösung	s.o.
600 ml Methanol	s.o.

Trenngelpuffer für Polyacrylamidgele

1,5 M TRIS	Sigma-Aldrich
0,4 % SDS	s.o.

2.1.9 Medien

Medien zur Bakterienkultur

Bakterienkulturmedien wurden bei 4°C und 5 % CO₂ gelagert und nach der Herstellung autoklaviert:

2YT-Medium (Luria/Miller)

Carl Roth

0,5 % (w/v) NaCl

1,6 % (w/v) Trypton

1 % (w/v) Hefeextrakt

LB-Medium

1,0 % (w/v) NaCl

Carl Roth

1,0 % (w/v) Trypton

s.o.

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

s.o.

Medien zur Zellkultur

Die Medien für die Zellkultur wurden vor Gebrauch 30 Min im Wasserbad bei 37°C warmgestellt und bei 4°C und 5 % CO₂ gelagert:

Serumfreies Medium

DMEM High Glucose (4,5 g/l)

PAA Laboratories

100 U/l Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

10 % FCS Gold (Fetal bovine Serum)

Biochrom

Serumhaltiges Medium

DMEM High Glucose (4,5 g/l)

PAA Laboratories

100 U/l Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

Transfektionsmedium

DMEM High Glucose (4,5 g/l)

PAA Laboratories

2 mM L-Glutamin

2.1.10 Zelllinien

HEK-Zellen 293A (**H**uman **E**mbyronic **K**idney)

HEK-293A ist eine humane embryonale Nierenzelllinie, die sich seit den 70er Jahren als eine zuverlässige und leicht kultivierbare Zelllinie erwiesen hat. Sie ist ein Transformationsprodukt mit einem humanen Adenovirus Typ 5 und kann somit Anteile des benutzten viralen Genoms aufnehmen. Für diese Arbeit wurde ausschließlich mit HEK-293A gearbeitet, da diese Variante adenovirale E1-Proteine exprimiert, die eine Amplifikation und Herstellung von rekombinanten Adenovirus-Konstrukten besonders unterstützt. Serumfreies Medium ist das Medium der Wahl für diese Zelllinie.

2.1.11 Versuchstiere

Alle Mäuse entstammen dem Stamm *Mus musculus* mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6. Für die Durchführung der Arbeit an den Mäusen lag ein genehmigter Tierversuchsantrag (Aktenzeichen V242-7224.121-4(61-5/10)) durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt u. ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein vor.

Generierung einer transgenen Myozap-Maus

Von Seeger *et al.* wurde an der Universität Heidelberg eine Myozap-transgene Maus mit kardialer Überexpression generiert. Im Expressionskonstrukt wurde hierfür der Myozap-cDNA ein α -MHC-Promoter vorangestellt, um die kardiale Überexpression

sicher zu stellen [62]. Die murine Myozap-cDNA wurde an ein C-Terminales myc-tag kloniert, an dem sich ein *human growth hormone (hGH) poly(A)+* Signal befand.

Nach Sequenzanalysen des Konstruktes wurde dieses an der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung der Universität Heidelberg in einen murinen Pronukleus mit C57BL/6-Hintergrund mikroinjiziert. Anschließend erfolgte die Validierung der kardialen Überexpression von Myozap über Schwanz-Biopsien und quantitativer Realtime-PCR-Analyse der extrahierten DNA [54, 63]. Die Generierung dieses transgenen Mausmodells folgte den Tierschutzgesetzen der Länder Baden-Württemberg und Schleswig-Holstein, sowie den universitätsinternen Tierschutzbestimmungen der Universität Heidelberg und Universität Kiel.

Ratten (*Rattus norvegicus*)

Zur Gewinnung der Kardiomyozyten (NRVCM) wurden ein bis drei Tage alte Ratten vom Wistar-Stamm genutzt. Ein normaler Wurf brachte 10-12 Tiere hervor, durchschnittlich lagen 9-10 Würfe vor. Die Tiere wurden bei Charles River Laboratories bestellt und im Tierstall der Universitätsklinik Kiel verpaart. Zur Gewinnung der Kardiomyozyten siehe Methodenteil 2.2.2.1.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden - Bakterien

2.2.1.1. Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Zur Transformation mittels Elektroporation wurde der, für diesen Vorgang weitverbreitete, Stamm DH10B verwendet. DH10B-*E.coli*-Bakterien lassen sich elektrokompotent aufbereiten und durch Einfrieren adäquat konservieren.

Die Bakterien wurden in Eppendorf-Cups auf Eis vorsichtig aufgetaut und anschließend 2 µl der Plasmid-DNA hinzugefügt. Beides wurde unter schonendem Auf- und Abpipettieren vermischt und anschließend in eine im Tiefkühlfach vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde stets nach Standardschema mit 2,5 kV bei einem elektrischen Widerstand von 200 Ω und einer elektrischen Kapazität von 25 µF durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml 2YT-Medium von Carl Roth vermischt und in ein neues Reaktionsgefäß zur weiteren Inkubation überführt. Inkubiert wurde für eine Stunde bei 37°C und 250 rpm.

2.2.1.2. Herstellung der Selektivnährböden

Zur Herstellung von Selektivnährböden wurde LB-Medium mit Agar versetzt. Das Gemisch wurde anschließend autoklaviert und zur weiteren Bearbeitung auf ca. 60°C heruntergekühlt. Bei 60°C erfolgte die Hinzufügung des jeweils benötigten Antibiotikums (Kanamycin). Der flüssige Ansatz wurde im Anschluss in Petrischalen überführt und in der Sterilbank bei Raumtemperatur zur Abkühlung und Abtrocknung gelassen. Die Lagerung erfolgte gekühlt bei 4°C.

2.2.1.3. Beimpfung der Selektivnährböden

Der Transformationsansatz mit den DH10B-Zellen und dem 2YT-Medium wurde nach der einstündigen Inkubation abzentrifugiert, ca. 800 µl des Überstandes abpipettiert

und das Pellet in dem verbliebenen Restvolumen resuspendiert. Aus dieser konzentrierten Suspension wurden 10 µl entnommen und auf der Agarplatte mittels eines Drigalski-Spatels ausgestrichen. Inkubiert wurde für 24 h über Nacht bei 37°C. Bei erfolgreicher Beimpfung konnten die einzelnen Kolonien mittels einer Pipettenspitze geerntet und in einem neuen Medium weiterverarbeitet werden.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Gewinnung von NRVCMs

Zur Gewinnung von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten (NRVCM = *Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes*) wurden pro Präparation ca. 100 – 120 neugeborene, ein bis drei Tage alte Ratten (Wistar-Stamm) nach vorheriger Kopf- und Thoraxdesinfektion mittels einer 70 %igen Ethanollösung unter Verwendung einer Schere dekapitiert und anschließend hemisternotomiert. Die ca. 5-7 mm kleinen Herzen wurden anschließend mit der Schere von den System- und Pulmonalgefäßen getrennt und sofort in einfach konzentrierten, auf Eis gekühlten, ADS-Puffer gegeben. Hier wurden unter der Sterilbank die Herzen von den verbliebenen Gefäßen und Vorhöfen befreit und die so aufbereiteten Herzkammern in eine neue Schale mit einfach konzentriertem ADS-Puffer überführt. Anschließend mussten die Ventrikel mit Scheren weiter zerkleinert werden. Zur Verdauung der Gewebestücke wurde eine Lösung bestehend aus 0,5 mg/ml Collagenase Typ 2 mit 0,6 mg/ml Pancreatin in einfach konzentriertem ADS-Puffer verwendet. Der gesamte Verdauansatz wurde in einer Kulturflasche in ein Wasserbad gebracht (37°C) und unter 40 rpm inkubiert. Nach einer halben Stunde konnte die Verdauung verworfen werden. Dieser Schritt wurde mit neuer Verdauung nochmals für 20 Min wiederholt. Anschließend wurde die Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen und durch einen Cell-Strainer in ein 50 ml Gefäß gegeben. Zur Blockierung der Verdauenzyme wurden 8 ml NCS (newborn-calf-serum) in die Suspension gegeben. Um den Überstand entfernen zu können wurde die gesamte Suspension nun bei 135 g für 5 Min zentrifugiert und das

Zellpellet konzentriert nochmals in 5 ml NCS resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden nun bei 37°C unter 5 % CO₂ aufbewahrt.

2.2.2.2. Aufreinigung von NRVCMS

Da es beim ersten Verdauungsschritt ebenso zu einer Isolation von begleitenden Fibroblasten oder Erythrozyten kommt, ist eine Aufreinigung der Kardiomyozyten vonnöten. Hierfür wurden die Zellen mittels eines Percoll-Gradienten nach ihrer Dichte getrennt. Der Percoll-Gradient bestand aus einer Percollstammlösung aus 27 ml Percoll und 3 ml 10 X ADS-Puffer. Aus dieser Stammlösung wurde je eine weitere Lösung bestehend aus 9 ml Percollstammlösung und 11 X ADS-Puffer mit Phenolrot hergestellt, sowie eine weitere Lösung mit 13 ml Percollstammlösung mit 7 ml 1 X ADS-Puffer. Beide Lösungen mit nun unterschiedlicher Konzentration und Dichte wurden sukzessive in 4 X 15 ml Falcons gegeben und zwar derart, dass sie sich nicht vermischten und sich so eine Phase darstellte. Daraufhin wurden 2 ml der Zellsuspension langsam auf die oberste Phase hinzugegeben, so dass letztlich drei Phasen entstanden. Die Falcons wurden gekühlt (4°C) bei 770 g für eine halbe Stunde zentrifugiert, woraufhin sich die Zellen in den Phasen ihrer Dichte nach auftrennten. Aufgrund der geringsten Größe und Dichte bildeten das unterste Pellet die Erythrozyten. Über ihnen befanden sich die Kardiomyozyten und ganz oben am Übergang der obersten zur mittleren Phase die Fibroblasten. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Kardiomyozyten entnommen und in 1 X ADS-Puffer überführt und bei 135 g für 5 Min nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet abermals mit 1 X ADS-Puffer resuspendiert und nochmals nach gleichem Schema zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die NRVCMS wurden dann in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10 % FCS, Streptomycin/Penicillin und L-Glutamin (von PAA) überführt. Die Zellen konnten von hier an in serumfreiem Medium unter regelmäßigem Mediumwechsel infiziert und nach 48 h geerntet werden.

2.2.2.3. Lumineszenzmessung mit Tecan

Die NRVCMS wurden nach sorgfältiger Aufbereitung wie unter 2.2.2.2. beschrieben in 6-Well-Platten ausgesät und am Tag nach der Entnahme mit den unter 2.2.3.6. beschriebenen Adenoviren infiziert. Als Negativkontrolle für die Überexpressionsversuche diente hierbei Ad_{Lac}, sowie miR_{neg} für die „*Knockdown*“-Versuche. Um eine eventuelle Dosisabhängigkeit Myozaps in Kardiomyozyten nachzuweisen, wurden die Wells mit jeweils 20 IFU, 40 IFU und 80 IFU Ad_{Myozap} infiziert. Um die Rolle von RhoA im Myozap-Signalweg zu untersuchen, wurde darüber hinaus je nach Versuchsansatz auch zusätzlich mit 10 IFU Ad_{RhoA} infiziert. Bestandteil jedes Ansatzes waren die zuvor ebenfalls klonierten Reportergene Ad_{SRF-RE-luc} (Leuchtkäfer Luciferase, 10 IFU) und zur Normierung und als interne Kontrolle Ad_{Ren-luc} (Renilla-Luciferase, 10 IFU). Alle Ansätze wurden sechsfach durchgeführt. 24h nach Infektion erfolgte ein Mediumswechsel und nach weiteren 24h die Lösung der NRVCMS von den Wells und die Lyse mit passivem Lysepuffer. Die Zelldebris wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein 96-well transferiert. Zu diesem Überstand wurde die Luciferase-Reagenz DUAL-GLO von Promega (Mannheim) hinzugegeben und die Chemilumineszenz in einem Infinite m200 PRO System von Tecan (Österreich) gemessen.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden - DNA

2.2.3.1. Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Um DNA zu vervielfältigen wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewendet. Als Template dienten je nach Versuch cDNA, Plasmid-DNA oder genomische DNA. Zur Anwendung kam die Dream Taq-DNA-Polymerase von Fermentas, wobei sich die Anwendungen je nach Sequenzlänge und Guanin/Cytosin-Gehalt unterschieden. Taq-Polymerasen besitzen im Allgemeinen keine Exonukleasefunktion (proofreading). Tabelle 2-1 zeigt den Standardreaktionsmix. Dieser Mix wurde je nach Template variiert.

Reagenzien	Volumina
Template DNA	Je nach Template variabel
10X Dream-Taq-Buffer (inkl. 20 mM MgCl ₂)	5 µl
Nukleotid-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 µl
Vorwärts-Primer (10 µM) (inkl. attb-Site)	1 µl
Rückwärts-Primer (10 µM) (inkl. attb-Site)	1 µl
Dream-Taq-DNA-Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	Auf 50 µl auffüllen

Tabelle 2-1: Standardreaktionsmix für PCR. Für Plasmid-PCR wurden Primer verwendet mit inkludierten attb-Sites (als Bindungsstelle für die Plasmide).

Für die Amplifikation von DNA-Molekülen wurde ein Standardprogramm verwendet, das je nach Moleküllänge, Cytosin/Guanin-Gehalt und benötigter Menge leicht variiert wurde. Das Standardprogramm ist Tabelle 2-2 zu entnehmen.

	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Initialdenaturierung	95°C	2 min	1X
Denaturierung	95°C	15 sec	32 – 35X
Annealing	59°C - 65°C	30 sec	
Elongation	68°C – 72°C	55 sec – 4 min	
Finale Elongation	68°C – 72°C	10 min	1X
Abschließende Kühlung	4°C	unbegrenzt	1X

Tabelle 2-2: Standardprogramm für die Amplifikation von DNA

2.2.3.2. Agarose-Gelelektrophorese

Eine physikalisch einfache Methode DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzuteilen bietet die Agarose-Gelelektrophorese. In dem Agarosegel werden die negativ geladenen DNA-Fragmente einem elektrischen Feld ausgesetzt, woraufhin eine Wanderung der DNA-Fragmente durch das Gel hindurch stattfindet. Hierfür wurden 1 % Agarose in TAE-Puffer in einer Mikrowelle geschmolzen und nach deren Abkühlung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugesetzt. Das noch warme flüssige Gel wurde in Gel-Schlitten gegossen und an einer Seite eine Vorrichtung (Kamm) zur Aussparung der Proben-Taschen eingefügt. Nach Abkühlung und Polymerisierung des Gels wurde dieses in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gestellt. Linksseitig erfolgte die Auftragung der DNA-Ladder, die restlichen Taschen blieben für die DNA-Fragmente. Das elektrische Feld wurde stets bei 10 V/cm angelegt, woraufhin die Auftrennung begann und je nach Größe des Gels und je nach Größe der Fragmente ca. 45 Min beanspruchte. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

2.2.3.3. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um an den aufgetrennten Agarosegelen weiterarbeiten zu können, mussten die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Gel zurückgewonnen werden. Hierfür musste die entsprechend benötigte Bande aus dem Gel isoliert und ausgeschnitten werden. Zur Extraktion und Purifikation der Bande wurde, mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits von Qiagen, die Bande isoliert und aufgereinigt. Hierfür wurde das Standardprotokoll von QIAquick verwendet.

2.2.3.4. Plasmid-Extraktion aus Bakterien

Um nach erfolgreicher Transformation die Plasmide aus den Bakterien zu erhalten, wurde mit Hilfe des Nucleo-Spin Plasmid Kits von Macherey-Nagel nach Standardprotokoll eine Plasmidextraktion vorgenommen. Hierfür wurden von der

entsprechenden Bakteriensuspension 5 ml entnommen und bei 11000 g für 30 Sekunden abzentrifugiert um das Pellet in 250 µl Puffer A1 zu resuspendieren. Der nächste Schritt bestand in der Hinzugabe des alkalischen Lysepuffers A2 und in achtmaligem Invertieren der Cups. Es folgte eine fünf minütige Lysereaktion, welche durch die Neutralisierung mittels 300 µl Puffer A3 beendet wurde. In diesem Schritt kam es zur Abtrennung der chromosomalen DNA, die durch eine zehn minütige Zentrifugation bei 11000 g von der Plasmid-DNA abgetrennt wurde. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA konnte im nächsten Schritt durch weitere Zentrifugation an die Säulenmembran der Cups des Kits binden und wurde durch den Puffer A4 weiter gewaschen. Die Trocknung erfolgte bei 11000 g für 2 Min. Eluiert wurden die extrahierten Plasmide in 50 µl ddH₂O.

2.2.3.5. Die Gateway-Klonierung

Bei der Gateway-Klonierung von Invitrogen (Karlsruhe) handelt es sich um eine effiziente Klonierungsmethode, bei der, unter Zuhilfenahme des Bakteriophagen Lambda, DNA-Sequenzen (wie z. B. Plasmide) über einen Ausgangsvektor (Entry-Vektor) in einen oder mehrere Expressionsvektoren (Destination-Vektor) kloniert werden können. Für die Rekombination wurde das mitgelieferte Kit verwendet (Clonase II, Proteinase K). Ausgangsplasmide waren pGL4.15 [luc2P/Hygro], pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro], pGL4.34 [luc2P/SRF-RE/Hygro] und pGL4.74 [hRluc/TK] (alle Promega, Mannheim), die durch PCR mit speziellen Primern (inklusive der attB-Sites) amplifiziert wurden. Durch die Integrierung der attB-Sites in die Primer konnte ein PCR-Schritt übersprungen werden. Für die beiden Plasmide (4.34 und 4.74) wurden folgende Primer verwendet: 4.34_attBF (5'->3' GGGG ACAA GTTT GTAC AAAA AAGC TGGC TAGTA TGTC CATA TTAG GACA TCTA CC) und 4.74_attBF (5'->3' GGGG ACAA GTTT GTAC AAAA AAGC TGGC TAAAT GAGT CTTC GGAC CTCG) und pGL4_attBRpA (5'->3' GGGG ACCA CTTT GTAC AAGA AAGC TGGG TTTTA CCAC ATTT GTAG AGGT TTTA CTTG). Nach Protokoll wurde von dem PCR-Ansatz 7 µl für die BP-Reaktion eingesetzt und 2 µl Clonase II, sowie 1 µl

pDonR221-Plasmid (Life Technologies, Karlsruhe) hinzugegeben. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C, wonach die Clonase II mittels 1 µl Proteinase K innerhalb von 10 Min bei 37°C inaktiviert wurde. Von diesem Ansatz wurden 2 µl für eine Transformationsreaktion in DH10B-*E.coli*-Zellen eingesetzt und nach erfolgreicher Transformation auf kanamycinhaltigen 2YT-Agarplatten ausgestrichen. Anschließend erfolgte die Plasmidisolation mittels Nucleo-Spin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Protokoll. Die gepickten Klone wurden zur Sequenzierung zu Eurofins MWG Operon geschickt. Komplette und fehlerfreie Nukleotidsequenzen dienten als Ausgangsvektor von denen mittels der LR-Reaktion, die Plasmid-DNA in den Expressionsvektor kloniert wurde. Die LR-Reaktion bestand aus 200 ng des Ausgangsvektors, 200 ng des Expressionsvektors pAd/CMV/V5-DEST, 2 µl Clonase II und ddH₂O. Die Inkubation und Inaktivierung, sowie die Transformation und DNA-Isolation erfolgte analog zur BP-Reaktion und den Folgeschritten mit dem Unterschied, dass hier die Ausstreichung der DH10B-Stämme auf carbenicillinhaltigen Agarplatten erfolgte.

2.2.3.6. Transfektion der HEK293A-Zellen

Um rekombinante adenovirale Konstrukte zu generieren wurde der ViraPower™ Adenoviral Kit von Life Technologies (Karlsruhe) verwendet. Der pAd/CMV/V5-DEST Expressionsvektor wurde mittels des Restriktionsenzym Pac1 geschnitten und linearisiert. Die Transfektion erfolgte nach Standardprotokoll: Die in 6-well Platten ausgesäten HEK293A-Zellen mussten für die Transfektionsreaktion eine Konfluenz von 70-90 % (ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen) erreichen. Es wurden dabei vier Lipofectamin-Ansätze mit jeweils 150 µl DMEM und jeweils 6, 9, 12 und 15 µl Lipofectamin2000 vorbereitet. In einem weiteren Reagenzglas wurden nun 700 µl DMEM mit 14 µg Insert-DNA verdünnt und aus diesem jeweils 150 µl zu den vorherigen vier Ansätzen gegeben und alles für 20 Min inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz (Lipofectamin + Insert-DNA) vorsichtig tropfenweise auf die HEK-Zellen gegeben. Nach 12 h Stunden erfolgte ein erster Mediumwechsel ohne Antibiotikum, nach

weiteren 24 h ein zweiter mit Antibiotikum. Um den Virustiter zu bestimmen wurden die infizierten HEK293A-Zellen mit fluoreszierenden Anti-Hexon-Ak gefärbt und aus der Anzahl der infizierten Zellen der Titer berechnet.

2.2.3.7. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA mittels NanoDrop

Die Konzentrationsbestimmung und Reinheitsprüfung der Nukleinsäuren, insbesondere nach Plasmidextraktion aus DH10B Zellen und nach DNA-Extraktion aus Agarosegelen, erfolgte durch den NanoDrop der Firma Thermo Scientific. Über dieses System erfolgte eine physikalische Messung via Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm.

2.2.4. Molekularbiologische Methoden – RNA

2.2.4.1. RNA-Isolation und Real Time-PCR

Zur quantitativen Real Time PCR wurde die RNA aus Kardiomyozyten der linken Herzkammer mittels QIAzol Lysereagenz von Qiagen nach Standardprotokoll isoliert. 1 µg dieser gewonnenen Total-RNA wurde weiter mit Superscript III cDNA Synthese Kit von Life Technologies (Darmstadt) in cDNA transkribiert. Es wurde Express Sybr GreenER (ebenfalls Life Technologies) für die quantitative RT-PCR in einem CFX96-Real-Time-System von Biorad verwendet. Tabelle 2-3 zeigt das PCR-Schema:

	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Initialdenaturierung	95°C	3 min	1X
Denaturierung	95°C	15 sec	40X
Annealing und Extension	60°C	45 sec	

Tabelle 2-3: Zyklusprotokoll für die qRT-PCR.

2.2.4.2. Klonierung einer microRNA für Myozap-knockdown

Für einen effizienten *in vitro knockdown* von Myozap wurde eine microRNA (miR-Myozap) mittels des BLOCK-iT RNAi-Designers von Invitrogen generiert und nach Standard in den pcDNA6.2 Entry-Vektor kloniert. Im nächsten Schritt wurde, ausgehend von diesem Entry-Vektor, das Konstrukt über eine LR-Reaktion in den Expressionsvektor pDonR221 von Life Technologies nach Standardprotokoll der Gateway-Technologie kloniert. Zur Technik der Gateway-Klonierung siehe 2.2.3.5.

2.2.5. Molekularbiologische Methoden – Proteine

2.2.5.1. Myozap-Protein Präparation

Nach Präparation der Herzen und Entfernung der Vorhöfe, sowie Entfernung des rechten Ventrikels, wurden die linken Ventrikel aller Versuchsgruppen (WT-Sham, TG-Sham (aus dem Engl.: Sham-OP = Schein-OP), WT-TAC, TG-TAC) separat in einem Puffer, bestehend aus 20 mM Tris (pH 7,5), 10 mM DTT, 1 % NP40 (v/v), 500 mM NaCl und 12,5 % Glycerin (v/v) mit einem Ultra-Turrax von IKA homogenisiert. Zur Pufferlösung wurde des Weiteren der Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablet von Roche, sowie die Phosphatase-Inhibitor-Cocktails 2 und 3 von Sigma-Aldrich hinzugegeben. Die Zelldebris wurde über eine Zentrifugation bei 14000 g für 20 Min bei 4°C abzentrifugiert und entfernt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration photometrisch mit einem Infinite m200 PRO-System von Tecan (Groedig, Österreich) nach Biorad Bradford / BCA Protokoll gemessen.

2.2.6. Immunoblots

Zur Herstellung der Immunoblots wurden die oben beschriebenen Proteine in 10 % oder 12 % SDS-PAGE gebracht und nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran transferiert. Hier wurde der Ansatz für 1 Stunde mit 5 % Milch mit TBST-Puffer geblockt und anschließend über Nacht mit den

Primärantikörpern behandelt. Am nächsten Morgen wurden die Antikörper mit TBST-Puffer gewaschen und mit einem Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) erneut behandelt. Die so separierten Proteinbanden wurden mit dem ECL Select-Kit von GE Healthcare (Freiburg) katalysiert und mit dem Fluorchem Q Imaging System von Biozym (Hessisch Oldendorf) sichtbar gemacht. Die densitometrische Analyse der Banden erfolgte entweder ebenfalls mit dem Fluorchem Q Imaging System oder mit ImageJ Softwareversion 1.46.

2.2.7. Transverse Aortenkonstriktion

Bei der transversen Aortenkonstriktion (transverse aortic constriction = TAC, auch Aortic Banding = AoB) handelt es sich um eine künstliche Nachlastserhöhung durch Verkleinerung des aortalen Lumens nach Abgang des *Truncus brachiocephalicus*. Für die Durchführung der TAC an den Mäusen lag ein genehmigter Tierversuchsantrag (Aktenzeichen V242-7224.121-4(61-5/10)) durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt u. ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein vor.

Die Operation wurde inklusive der Sham-Operation (Scheinoperation), stets vom selben Operateur, in allen Konditionen durchgeführt (WT-Sham, TG-Sham, WT-TAC, TG-TAC). Durchschnittsalter aller zur Operation herangezogenen Mäuse betrug acht Wochen. Um die Zahl möglicher Einflussfaktoren zu reduzieren, wurden nur Mäuse eines Geschlechts operiert (männliche Mäuse). Vor jeder Operation wurden die Mäuse zur Gewichtsbestimmung für die adäquate Analgosedierung gewogen und mit 0,1 mg/Kg KG Buprenorphin s.c. analgosediert. Eingeleitet wurde die Narkose der Mäuse in einer mit 4 % Isofluran plus 0,8 l O₂ gefluteten Kammer. Nach initialer Narkose wurden die Mäuse thorakal rasiert und mittels eines kleinen Laryngoskopspatels zügig nach Seldinger-Technik intubiert, bevor die kurze Narkosewirkung des Gases flüchtete. Als Tubus diente eine blaue Braunüle (22 Gauge), an welche die Beatmungsmaschine angeschlossen war. Beatmet wurde mit

2 % Isofluran und 0,8 l O₂ bei einem Tidalvolumen von 0,15 ml und einer Atemfrequenz von 150 Zügen/min. Nach Fixierung der Maus erfolgte eine anterolaterale Thorakotomie von 4 mm Länge auf Höhe des zweiten ICR. Der Zugang zur Aorta erfolgte mediastinal, wobei auf die Unversehrtheit der Pleuren geachtet werden musste. Der bilobuläre Thymuskörper musste gespalten werden, so dass die Darstellung der Aorta erfolgen konnte. Nach vorsichtiger Freipräparation der Aorta wurde ein monofiler 6-0 Prolene Faden zwischen *Truncus brachiocephalicus* und *A. carotis communis sinistra* herumgeführt und vorsichtig, aber bestimmt, gegen eine Kanüle von 27 Gauge Stärke ligiert. Um die akute, transient vollständige, Obstruktion der Aorta so kurz wie möglich zu halten, mussten ohne Zeitverlust zwei gleich- und ein gegensinniger Knoten erfolgen, woraufhin die Kanüle zügig entfernt werden konnte. Der Thorax wurde verschlossen und die Haut mit 4-0 Prolene in Einzelknopfnahntechnik adaptiert. Zur schnelleren Rekonvaleszenz wurden die Mäuse anschließend unter wärmendes Rotlicht und letztlich bis zur weiteren Untersuchung für 28 Tage in die Tierhaltung gebracht. Scheinoperierte Mäuse erhielten die gleiche Operation mit gleicher Analgosedierung und gleicher OP-Dauer, jedoch ohne Konstriktion der Aorta.



Abbildung 2-1 A: OT = Operations-Tisch, T = Temperatursonde, K = Stromkabel für den beheizten OP-Tisch, Tub = Tubus.

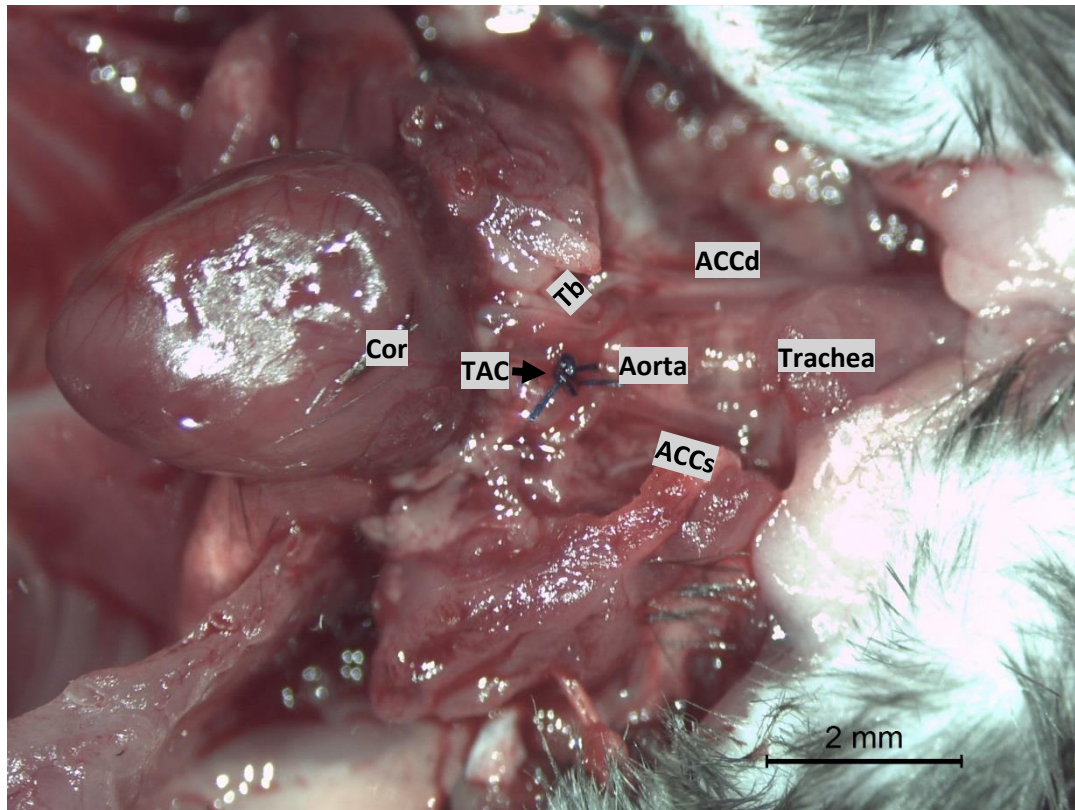
B

Abbildung 2-1 B: Cor = Herz, TAC = Ligatur, ACCs = A. carotis communis sinistra, ACCd = A. carotis communis dextra, Tb = Truncus brachiocephalicus. Thymus und Lungen wurden zur besseren Darstellung entfernt.

2.2.8. Echokardiografie und morphometrische Untersuchungen

28 Tage post operationem wurden an den operierten Mäusen abschließende echokardiografische und morphometrische Untersuchungen durchgeführt. Die Echokardiografien wurden transthorakal mit einem Vivid 7 System und einem I13L Transducer (14.1 MHz) von GE Healthcare durchgeführt. Eingeleitet wurde die Untersuchung zur besseren Compliance mit einer leichten Narkose unter 1,5 % Isofluran mit 0,8 l O₂ über eine Maske von Harvard Apparatus. Um eine höchstmögliche Messgenauigkeit zu erreichen wurden die Mäuse geblindet geschallt, also in unbekannter Reihenfolge und unwissentlich der Kondition, d.h. TAC, SHAM, WT und TG. Der Untersucher wusste also zu keinem Zeitpunkt, ob es sich bei der gerade untersuchten Maus um einen Wildtyp oder eine transgene Maus handelt, bzw. ob die Maus TAC-operiert wurde oder nur eine scheinoperierte Maus war. Die Untersuchung wurde auf dem beheizbaren OP-Tisch durchgeführt, um eine

Unterkühlung der Maus zu verhindern. Es erfolgten stets drei Messungen in M-Mode, nachdem die ideale Mess-Ebene (auf Höhe der Papillarmuskeln) in B-Mode festgestellt wurde. Gemessen wurde in kurzer Herzachse: linksventrikulärer endsystolischer und enddiastolischer Durchmesser, interventrikuläre Septumstärke in Systole und Diastole, Herzhinterwandstärke in Systole und Diastole und zur Bestimmung der linksventrikulären kontraktilen Dysfunktion das *Fractional shortening* (Verkürzungsfraction). Nach abgeschlossener Echokardiografie wurden die Mäuse unter Narkose getötet und über den epigastrischen Bogen der Thorax eröffnet. Es erfolgte die Entnahme der Herzen und der Lungen, sowie gleichzeitig die Messung ihrer Gewichte. Die Lungen wurden entsorgt und die Herzen zur weiteren Proteinanalyse, RNA-Analyse und histologischen Schnitten in flüssigem Stickstoff (LN₂) schockgefroren und bei -80°C asserviert.

2.2.9. Histologische Untersuchungen

Nach Lagerung bei -80°C konnten die Herzen für Kryoschnitte herangezogen werden. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und mit auf -20°C gekühltem Aceton für 10 Min fixiert. Anschließend erfolgten drei Waschgänge mit PBS. Für die Immunfluoreszenzschnitte mussten die Kryoschnitte zunächst mit 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) permeabilisiert und anschließend mit 2 % BSA für eine Stunde geblockt werden. Im nächsten Schritt wurden die Proben über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörpern inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach Waschung des Primärantikörpers eine Inkubation für 60 min mit den jeweiligen Sekundärantikörpern (Cy3, Dianova, Hamburg; Alexa 488, Invitrogen, Karlsruhe und Fluorescein, Vector Labs, Burlingame, USA) bei Raumtemperatur. Nach Protokoll wurden die Antikörper 1:200 verdünnt. Als Eindeckmedium wurde Vectashield Mounting medium mit DAPI (Vector Labs, Burlingame, USA) oder Fluoromount (Biozol, Eching) verwendet. Die Bilder wurden nach erfolgreicher Färbung mit dem Axiophot, LSM 510 UV und dem Axioskop 2 Plus, beide von Carl Zeiss Jena, gemacht.

Für weitere histologische Untersuchungen wurden die Schnitte entweder zur Hypertrophievisualisierung HE-, oder zur Fibrosevisualisierung entsprechend mit Sirius red/Fast green gefärbt. Eine Lectin-Färbung (mit Lectin aus *Triticum vulgare*, L4985, Sigma-Aldrich) wurde für die Zellgrößenbestimmung FITC-gekoppelt durchgeführt. Die Bilder wurden mit einem Keyence BZ-9000 Mikroskop aufgenommen und, außer der Lectin-Bilder, mit der Keyence Image-Software ausgewertet. Die Zellgrößenbestimmung über die Lectin-Färbung wurde mit ImageJ Softwareversion 1.46 durchgeführt.

2.2.10. Statistische Auswertung

Für alle statistischen Auswertungen wurden die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen, bzw. Standardfehler ermittelt. Die Überprüfung aller Ergebnisse der Experimente auf Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen und gepaarten Student-t-Test, bzw. als Varianzanalyse mittels des two-way-ANOVA, gefolgt von einem Student-Newman-Keuls post-hoc-Test. Zur Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichung, Standardfehler, two-way-ANOVA (plus Student-Newman-Keuls) und dem Student-t-Test wurde GraphPad Prism 5.0 verwendet. Als signifikant galten alle Werte, die: *: $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡ $< 0,001$ entsprachen.

3. Ergebnisse

3.1. Myozap aktiviert den SRF-Signalweg

Schon 2007 beschrieben Hughes und Fehon eine modulatorische Wirkung von ERM-Proteinen auf den Rho-abhängigen Signalweg [58]. Auf Grund der ERM-ähnlichen Domäne, die in Myozap enthalten ist, wurde schon früher eine Korrelation zwischen Myozap und dem Rho-abhängigen SRF-Signalweg postuliert [54]. Auf diesen Annahmen aufbauend konnten Seeger und Frank *et al.* in HEK293T-Zellen zeigen, dass Myozap über den SRF-Signalweg den sm22-Promoter aktiviert.

Um nun mögliche Effekte des Myozaps auf den RhoA-abhängigen SRF-Signalweg auch in Kardiomyozyten zu zeigen, wurde ein adenovirales Konstrukt kloniert, welches mehrere SRF-Bindestellen (*SRF-responsive elements, SRF-RE*) aufwies, denen ein Luciferase-Reportergen nachgeschaltet war. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Konstrukt mit einem Minimal-Promoter und ohne SRF-Bindestellen verwendet. Ein weiteres adenovirales Konstrukt, eine Renilla-Luciferase, diente zur Normierung der Transfektionseffizienz. Um die Expression von Myozap in NRVCM zu stimulieren bedienten wir uns ebenfalls eines adenoviralen Vektors, der die Gensequenz für Myozap enthielt. LacZ stellte hier die Negativkontrolle dar. Abbildung 3-1 A zeigt das Verhältnis zwischen Minimal-Promoter, LacZ und dem SRF-Luciferase-Reportergen in Abwesenheit von Myozap. Eine Transfektion von NRVCM mit Ad_{LacZ} bzw. Ad_{RhoA} führte in Gegenwart des SRF-Luciferase-Reportergens zu einer hoch signifikanten Heraufregulation der Luciferaseaktivität, wohingegen die Luciferaseaktivität beim Minimal-Promoter im basalen Bereich blieb. Das eine Transfektion mit der Negativkontrolle Ad_{LacZ} allein zu einer erhöhten Luciferaseaktivität führte, lässt sich durch den natürlichen basalen Myozap und RhoA-Gehalt der NRVCM erklären.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Myozap in NRVCM zu einer zweifach höheren Aktivität des SRF-Luciferase-Reportergens führte (Abbildung 3-1 B). In Gegenwart des SRF-Aktivators RhoA konnte sogar eine Vervierfachung gegenüber der Negativkontrolle verzeichnet werden (Abbildung 3-1 B).

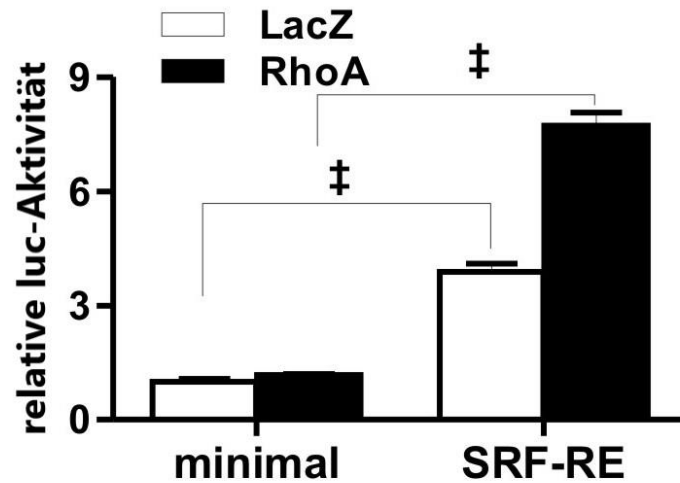
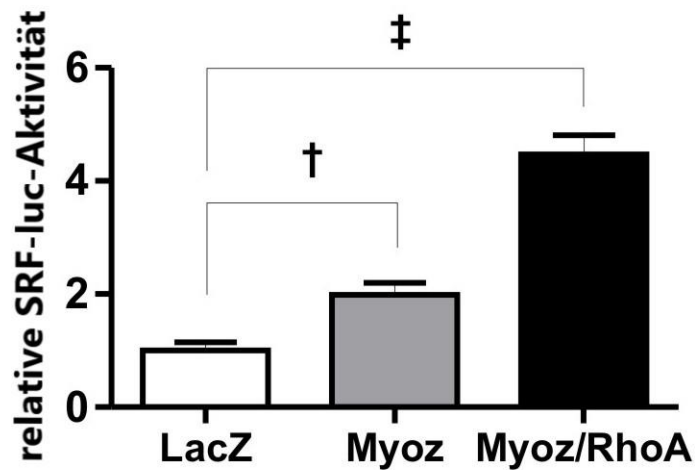
A**B**

Abbildung 3-1 A+B. A: RhoA aktiviert das SRF-Luciferase Reportergen, wohingegen der Minimal-Promoter stumm bleibt B: Myozap aktiviert den SRF-Signalweg. In Gegenwart des SRF-Aktivators RhoA vermag Myozap SRF exponentiell zu aktivieren. Für A und B gilt n = 6. *: p < 0.05, †: p < 0.01, ‡: p < 0.001.

3.2. Myozap wirkt konzentrationsabhängig

Um zu überprüfen, wie groß die Abhängigkeit des SRF-Signalweges von Myozap ist und um zu determinieren, ob Myozap eine notwendige Bedingung für eine SRF-Aktivierung ist, untersuchten wir die SRF-Luciferaseaktivität bei ansteigender Myozap-Konzentration. Analog führten wir über microRNA-Experimente *in vitro* ein konzentrationsabhängiges *knockdown* des intrazellulären Myozaps durch.

Es zeigte sich, dass die Signalaktivität des Luciferase-Reportergens mit ansteigender Transfektionskonzentration des Myozaps ebenfalls anstieg. Die Konzentrationsabhängigkeit der Myozapüberexpression zeigt Abbildung 3-2.

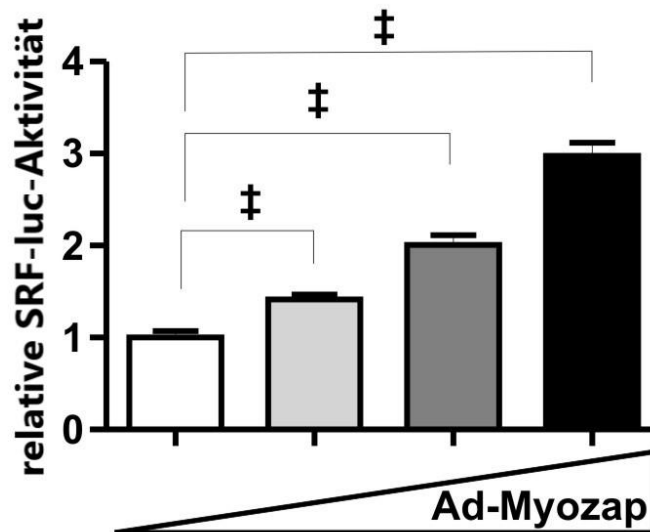


Abbildung 3-2 Die SRF-Luciferaseaktivität steigt proportional mit steigender Myozap-Konzentration an. Der weiße Balken stellt die Negativkontrolle dar. Transfiziert wurde mit 20 IFU, 40 IFU und 80 IFU (IFU = infectious units, n = 6). *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$, ‡: $p < 0.001$.

Ähnlich der steigenden Myozap-Konzentration, wollten wir das Signalverhalten und somit konsekutiv die Abhängigkeit des Serum-Response-Factors bei fallender Myozap-Konzentration testen. Hierfür bedienten wir uns einer synthetischen microRNA, die spezifisch für Myozap ist. MicroRNA, auch miR, sind im Gegensatz zu mRNA, nichtcodierende Nukleotide, die eine besondere Rolle in der Genregulation spielen, allen voran beim Gen-Silencing. Sie regulieren auf post-transkriptioneller Ebene die Genexpression [59], in diesem Fall die Myozaps. Es konnte in Gegenwart von RhoA durch eine gesteigerte Transfektion mit einem microRNA-tragenden Adenovirus ein *Silencing (knockdown)* in NRVCs erreicht werden. Dieser Effekt ließ sich in Abwesenheit von RhoA nicht in gleichem Maße reproduzieren, so dass sich schlussfolgern lässt, dass Myozap sowohl notwendig als auch hinreichend für die SRF-Aktivierung in Kardiomyozyten ist. Abbildung 3-3 zeigt den dosisabhängigen *knockdown* von Myozap in Kardiomyozyten in An- und Abwesenheit von RhoA.



Abbildung 3-3: Der dosisabhängige *knockdown* von Myozap in Kardiomyozyten in An- und Abwesenheit von RhoA. Für den *knockdown* wurde eine Myozap-spezifische microRNA verwendet. ‡: $p < 0.001$.

3.3. Myozap-transgene Mäuse reagieren empfindlich auf Druckbelastung

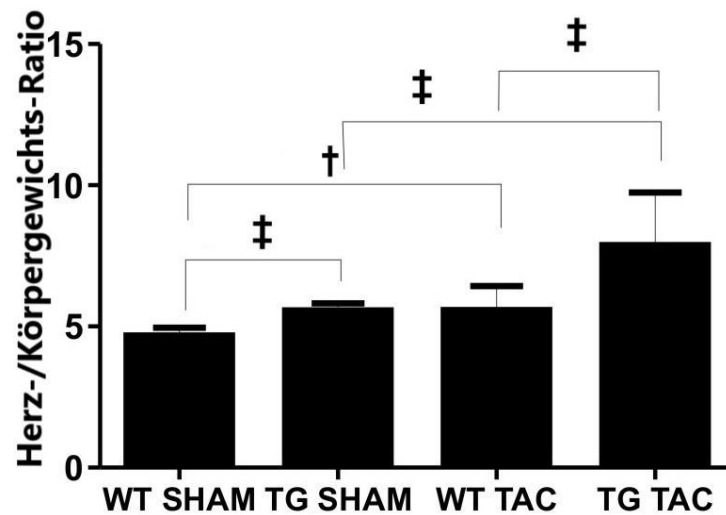
Um die Funktion des Myozaps auch *in vivo* zu studieren, generierten Seeger *et al.* ein transgenes Mausmodell, welches Grundlage vorliegender *in vivo*-Daten ist. Die transgenen Mäuse zeigten eine isoliert kardiale Überexpression von Myozap, die durch die Klonierung einer Myozap-cDNA in ein Konstrukt erreicht wurde, welches unter der Regulation des α -MHC-Promoters stand. Über eine Mikroinjektion in eine Eizelle konnte so eine erste Parentalgeneration generiert werden. Die für diese Arbeit verwendete Maus-Linie (TG #71) zeigte, verglichen zum Wildtyp, eine 10,7-fach höhere Transkriptionrate von Myozap. Um bei zukünftigen Ergebnissen einen qualitativen Vergleich, sowie eine Quantifizierung durchführen zu können, wurden Baseline-Daten der Mäuse erhoben.

Es zeigte sich zwar keine Zunahme des Gesamtkörpergewichts, jedoch eine deutliche Zunahme des Herzgewichts und somit auch ein deutlicher Herz-/Körpergewichtsquotient. Baseline Echokardiographie zeigte in 56 Wochen alten

Mäusen eine linksventrikuläre Dilatation von 19,5 % gegenüber dem Wildtyp. Abbildung 3-4 A zeigt die zunehmende Hypertrophie in der transgenen Mausgruppe ($p < 0,001$; WT SHAM und TG SHAM)) und bestätigte die von Seeger *et al.* erhobenen Daten. Die mäßige Kardiomyopathie der transgenen Baseline-Mäuse ließ die Annahme zu, dass sich die Kardiomyopathie unter Stressbedingungen, wie einer Nachlasterhöhung im Sinne eines Hypertrophie-Stimulus, exazerbieren lässt. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden acht Wochen alte transgene Mäuse bzw. Wildtyp-Mäuse einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) zugeführt. Hier wurde, wie oben beschrieben, mittels einer 6/0 Prolene-Naht, die Aorta zwischen *Truncus brachiocephalicus* und *A. carotis communis sinistra* auf einen definierten Durchmesser verengt, in diesem Fall mit einer 27 Gauge-Nadel auf 0,4 mm. Eine weitere Gruppe wurde einer Sham-Operation zugeführt, deren Ablauf analog der TAC-Operation verlief, bei der jedoch die Konstriktion der Aorta unterblieb. Diese Gruppe diente als Negativgruppe. Wir untersuchten alle vier Gruppen (WT-SHAM, WT-TAC, TG-SHAM und TG-TAC) vier Wochen post operationem. Dabei wurden morphometrische und echokardiografische Daten erhoben. Neben dem Herzgewicht, bzw. des Herz-/Körpergewichtsquotienten, wurden die Gewichte des isoliert linken Ventrikels (Linksherzhypertrophie) und der Lunge (Lungenödem als Zeichen der Linksherzschwäche und Nachlasterhöhung) erhoben. Proben der Herzen wurden RNA- und Proteinuntersuchungen zugeführt. Darüber hinaus wurden die Herzen histologisch auf Hypertrophie, Fibrose und weiterführend mittels Immunfluoreszenz untersucht. Echokardiografischer Schwerpunkt lag in der Beurteilung der linksventrikulären systolischen Dysfunktion, gemessen anhand des *Fractional shortenings* (FS) und in den linksventrikulären Dimensionen. Es zeigte sich wie erwartet eine signifikante Zunahme der Herzgröße, bzw. des Herz-/Körpergewichtsverhältnisses (HW/BW von $4,63 \text{ mg/g} \pm 0,08$ in WT Sham auf $5,53 \text{ mg/g} \pm 0,21$ in WT TAC mit $p < 0,05$). Diese Zunahme lag innerhalb der transgenen Gruppe bei Werten von $5,49 \text{ mg/g} \pm 0,07$, in der TG Sham-Gruppe bei $7,80 \text{ mg/g} \pm 0,51$ und in der TG TAC-Gruppe zeigte sich ein hoch signifikanter Wert mit $p < 0,001$. Analog verhielt sich das Verhältnis des Gewichts des linken Ventrikels zum

Körpergewicht (LV/BW-Ratio). Dabei lag die transgene Sham-Gruppe bei allen morphometrischen Erhebungen mit $p < 0,05$ statistisch signifikant über der Wildtyp Sham-Gruppe. Abbildung 3-4 A + B zeigt die Zunahme des Herzgewichts in Relation zum Körpergewicht.

A



B

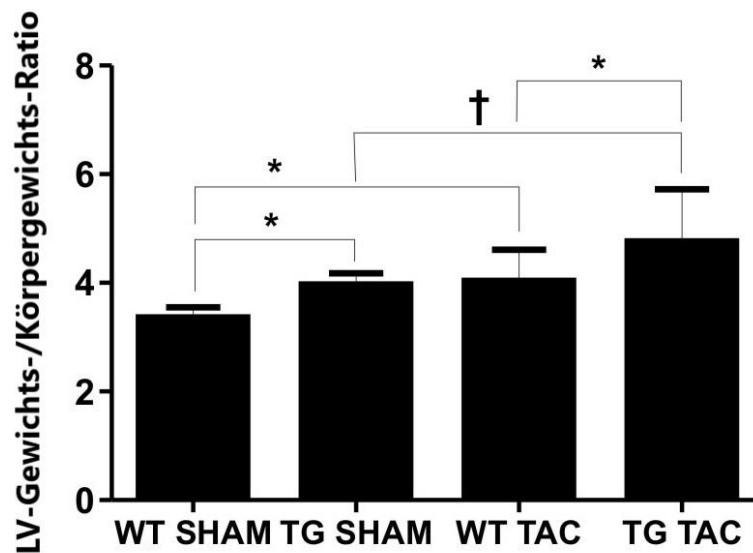


Abbildung 3-4 A+B. A zeigt die Zunahme des Herzgewichtes in Relation zum Körpergewicht. B zeigt die isolierte LV-Gewichtszunahme in Relation zum Körpergewicht. * $< 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡ $< 0,001$.

Um die pathologisch-morphologischen Veränderungen auf ihren funktionellen Einfluss zu prüfen, wurden echokardiografische Untersuchungen direkt vor der terminalen Organentnahme durchgeführt. Hierbei wurden die Mäuse unter leichter

Isoflurannarkose transthorakal echokardiografiert. Hier zeigte die transgene Sham-Kohorte mit $p < 0,01$ eine deutliche LV-Dysfunktion im Sinne eines Kontraktilitätsverlustes, verglichen mit der WT Sham-Kohorte. Diese Dysfunktion ließ sich durch eine TAC weiter steigern. Die Dysfunktion war begleitet durch eine linksventrikuläre Dilatation, die innerhalb der WT Gruppe von Sham $3,60 \text{ mm} \pm 0,09$ auf TAC $4,05 \pm 0,12$ gewachsen ist. Abermals deutlicher zeigte sich der Zuwachs des LVEDD mit $p < 0,05$ ($p=0,0189$) in der transgenen Gruppe von Sham $3,75 \text{ mm} \pm 0,09$ auf TAC $4,31 \text{ mm} \pm 0,09$. Abbildung 3-5 A + B zeigt die echokardiografisch erhobene LVEDD der vier Gruppen. FS bildet hierbei die linksventrikuläre Dysfunktion ab.

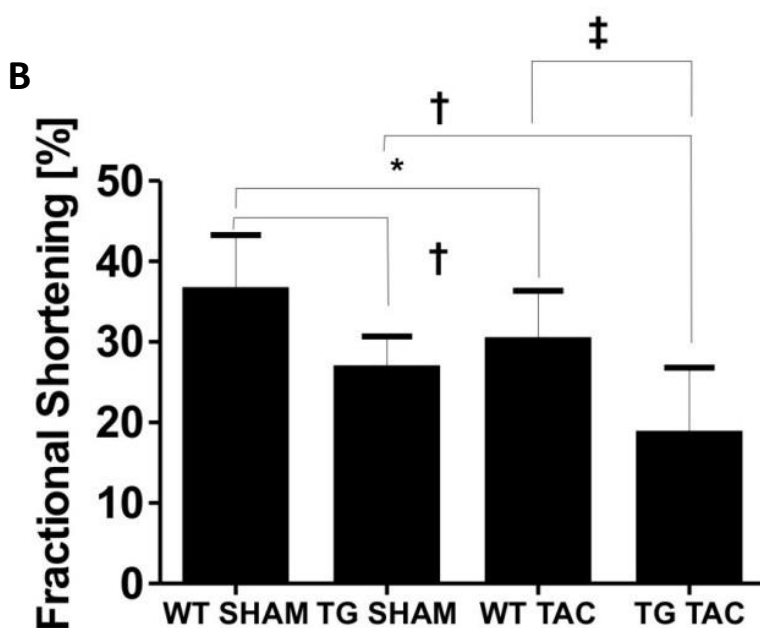
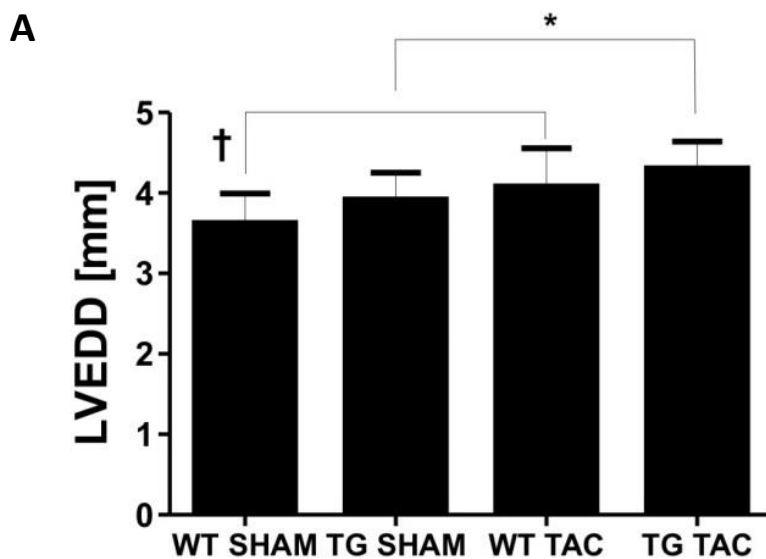


Abbildung 3-5 A+B: A zeigt die dilatative Komponente der induzierten Kardiomyopathie. LVEDD = Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter. B zeigt die Kontraktilitätsstörung in Form einer FS-Abnahme. Die transgene, operierte Gruppe zeigt die größte Dysfunktion nach Druckbelastung gegenüber allen Gruppen. Allerdings zeigt schon die transgene, Sham-Gruppe eine systolische Funktionsstörung gegenüber der WT Sham-Gruppe.

* $< 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡ $< 0,001$.

	HW/BW [mg/g]	LV/BW [mg/g]	LungW/BW [mg/g]	IVSd [mm]	IVSs [mm]	LVEDD [mm]	LVESD [mm]	LVPWd [mm]	LVPWs [mm]	FS [%]
WT-SHAM (n=15)	4,63 ± 0,08 *a, *c	3,36 ± 0,05 *a, *c n=10	5,88 ± 0,14	0,96 ± 0,03	1,45 ± 0,03	3,60 ± 0,09 †a	2,33 ± 0,10 †a, *c	0,93 ± 0,04	1,30 ± 0,05	36,79 ± 1,61 †a, †c
TG-SHAM (n=15)	5,49 ± 0,07 †b, *c	3,96 ± 0,07 †b, *c n=8	6,36 ± 0,45 †b	1,05 ± 0,02 *b	1,39 ± 0,03	3,75 ± 0,09 †b	2,73 ± 0,15 †b, *c	1,07 ± 0,06	1,42 ± 0,05	28,75 ± 1,88 †b, †c
WT-TAC (n=13)	5,53 ± 0,21 *a, †d	4,03 ± 0,21 *a, †d n=7	7,39 ± 0,60 †d	1,00 ± 0,02 †d	1,40 ± 0,03	4,05 ± 0,12 †a	2,91 ± 0,13 †a, †d	0,88 ± 0,04	1,22 ± 0,05	30,41 ± 1,56 †a, †d
TG-TAC (n=12)	7,80 ± 0,51 †b, †d	4,76 ± 0,36 †b, †d n=7	11,54 ± 1,08 †b, †d	1,19 ± 0,06 *b, †d	1,45 ± 0,06	4,31 ± 0,09 †b	3,47 ± 0,15 †b, †d	1,01 ± 0,07	1,28 ± 0,11	19,25 ± 2,54 †b, †d

Tabelle 3-1: Übersicht über die morphometrischen und echokardiografischen Daten in allen vier Gruppen. Statistische Berechnung mittels Two-Way-ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test. *: p < 0,05, †: p < 0,01, ‡ < 0,001.

3.4. Myozap-transgene Mäuse entwickeln vermehrt Fibrose bei gleichzeitiger Zellhypertrophie

Um die makroskopischen Ergebnisse auch auf mikroskopisch-histologischer Ebene zu untersuchen, führten wir, nach Fertigung histologischer Schnitte im Bereich des linken und rechten Ventrikels, Lektin-Färbungen durch. Die Färbungen wurden von Alexander Bernt M.Sc. am UKSH Campus Kiel durchgeführt. Lektine sind Pflanzenproteine, die unterschiedliche membranäre Kohlenhydratmotive binden können ohne eine Enzymaktivität auszulösen [60]. Dies führte, auch auf Grund ihrer Kohlenhydratspezifität, zur weiten Verbreitung als histologischer Farb-/Markierstoff. Mit Hilfe der Lektin-Färbung konnten die Zellgrenzen visualisiert und so die gesamte Kardiomyozytengröße gemessen werden. Es zeigte sich, dass selbst die TG-Sham-Gruppe im Vergleich zur WT-Sham-Gruppe signifikant größere Kardiomyozyten aufwies. Diese Hypertrophie ließ sich abermals durch eine transverse Aortenkonstriktion aggravieren. Gemessen wurde hierbei die Zellfläche in μm^2 von $n = 149 - 336$ Zellen pro Gruppe die wiederum von zwei bis drei Mäusen stammen, siehe Abbildung 3-6 A + B.

A

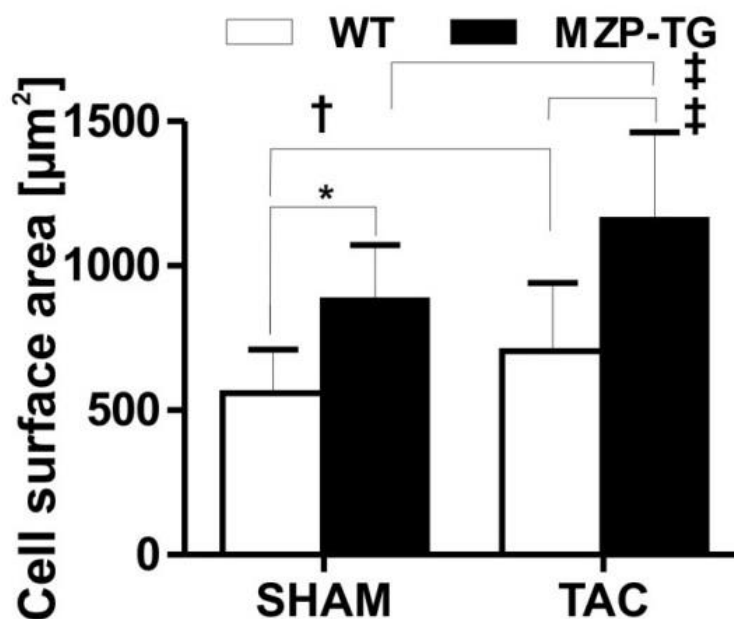


Abbildung 3-6 A: Schon die TG-Sham-Zelloberfläche zeigt eine deutliche Hypertrophie verglichen mit der WT-Sham-Gruppe. Durch TAC lässt sich diese Hypertrophie hochsignifikant induzieren. Die stärkste Hypertrophie zeigte die transgene Gruppe nach Konstriktion. *: $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡: $p < 0,001$.

B

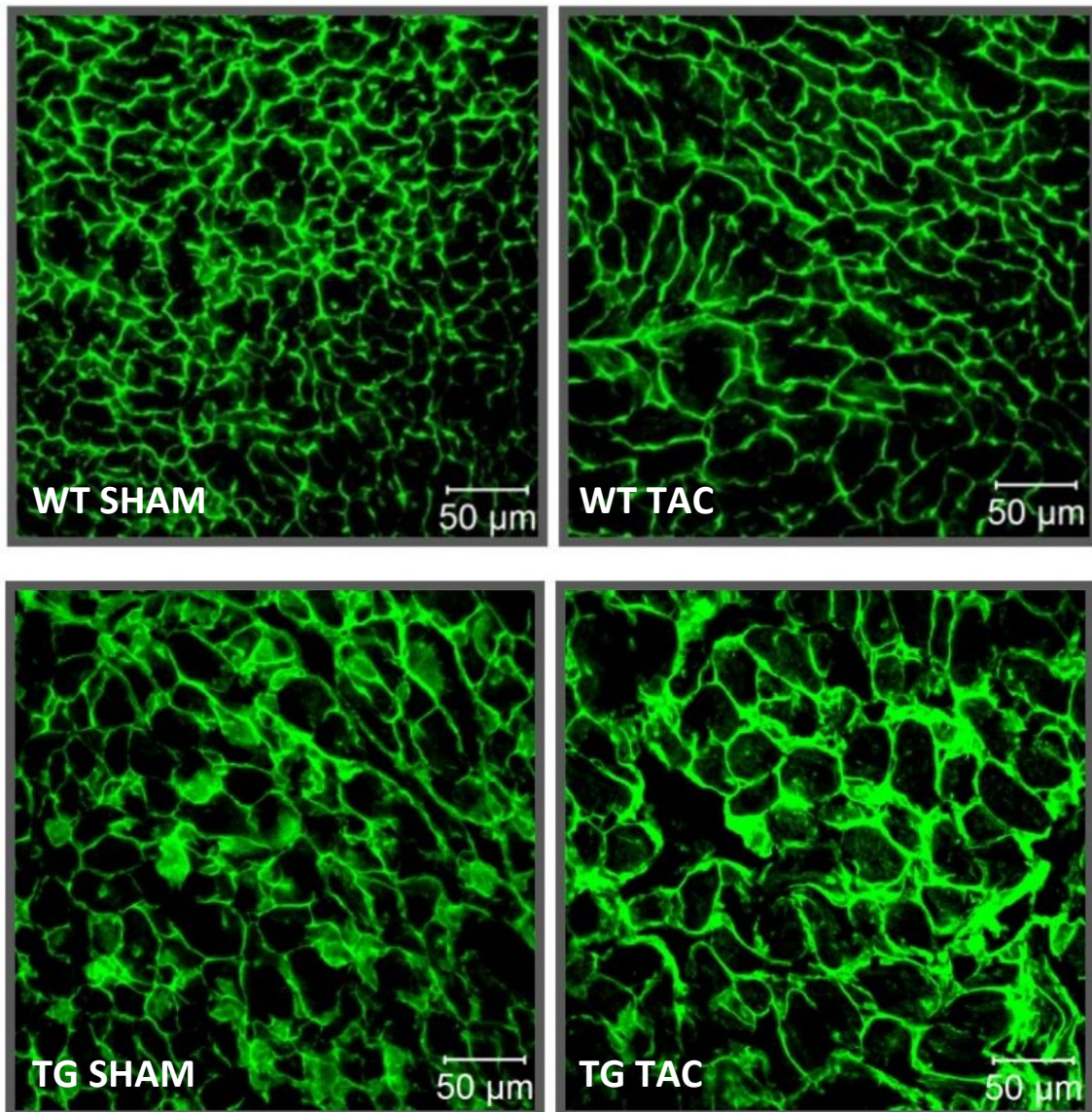


Abbildung 3-6 B: Histologische Schnitte lektin gefärbter Kardiomyozyten.

Eine begleitende Fibrosierung bei Kardiomyopathien und Hypertrophien ist unlängst bekannt [61]. Um eine Quantifizierung etwaiger Fibrose vornehmen zu können färbten wir histologische Schnitte der Herzen aller vier Gruppen mit Sirius red und Fast green. Die Färbungen wurden von Frau Gabriele Brunke, UKSH Campus Kiel, durchgeführt.

Hierbei zeigten scheinoperierte transgene Mäuse mikroskopisch eine erhöhte Fibrose, die durch TAC mit konsekutiver Nachlasterrhöhung aggraviert werden konnte, siehe Abbildung 3-7. Abbildung 3-8 zeigt eine entsprechende Quantifizierung der Fibrose.

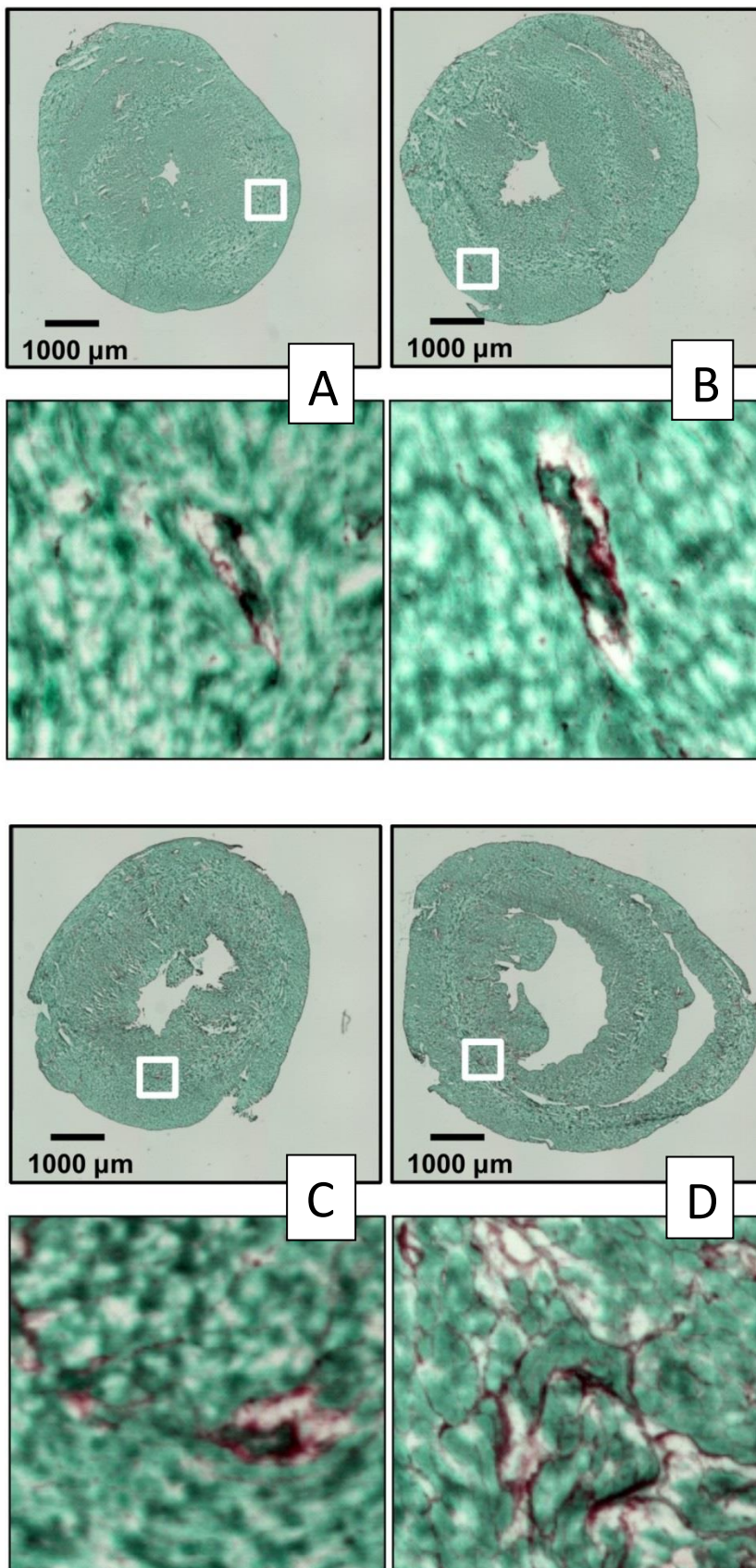


Abbildung 3-7: Sirius red / Fast green-Färbung histologischer Schnitte. Unter jedem Schnitt zeigt sich eine representative Vergrößerung. A = WT SHAM, B = TG SHAM, C = WT TAC, D = TG TAC

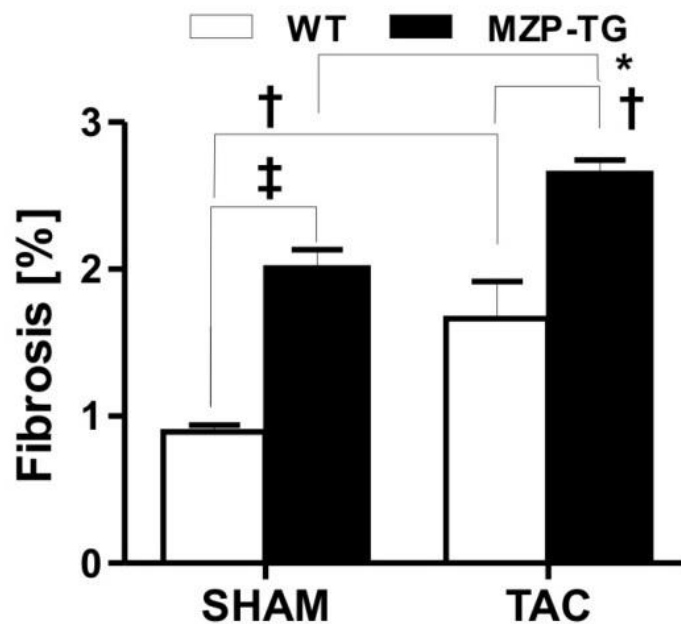


Abbildung 3-8: Quantifizierung der Fibrosefläche anhand histologischer Schnitte. n = 3 pro Gruppe. Statistische Berechnung mittels Two-Way-ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test. *: p < 0,05, †: p < 0,01, ‡ < 0,001.

3.5. Myozap-transgene Mäuse zeigen keine erhöhte Sterblichkeit verglichen mit ihrer Wildtyp-Kohorte

Abbildung 3-9 zeigt eine Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit der einzelnen Gruppen. Von insgesamt n = 63 operierten Mäusen, starben aus den Sham-Gruppen (jeweils n = 15) keine Tiere. Aus der WT-TAC Gruppe überlebten 13 von 16 Mäusen. Aus der TG-TAC Gruppe 12 von 17. Dies entspricht einer Überlebensrate von 81,25 % in der WT TAC Gruppe und 79,59 % in der TG TAC Gruppe. Eine statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Somit zeigte sich ein vergleichbares Überleben der aortenkonstriktierten Mäuse in der Wildtyp-Kohorte verglichen zur Transgen-Kohorte.

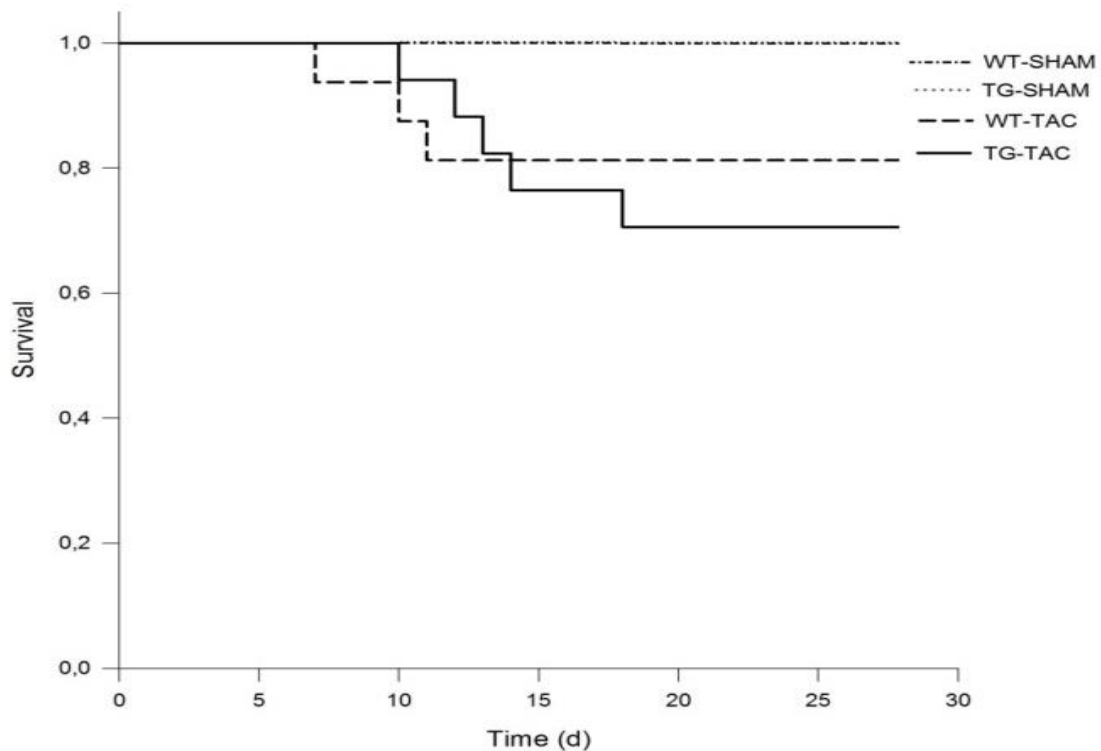


Abbildung 3-9: Kaplan-Meier-Kurve des postoperativen Überlebens aller vier Gruppen nach Aortenkonstriktion. Aus den beiden Sham Gruppen überlebten alle Mäuse. Die transgene TAC Gruppe zeigte ein vergleichbares Überleben zur wildtypen TAC Gruppe.

3.6 Myozap-TG-Mäuse zeigen eine Hochregulation SRF-abhängiger Zielgene, die durch TAC potenziert wird

Wie bereits unter 3.1 beschrieben, aktiviert Myozap den intrazellulären SRF-Signalweg *in vitro*. Um die Auswirkungen auf den Signalweg *in vivo* weiter zu untersuchen, wurde die Expression typischer Zielgene des SRF-Signalwegs analysiert [65, 65]. Typische Zielgene (und ihre Proteine) sind in diesem Zusammenhang die beiden natriuretischen Peptide *Nppa* und *Nppb*, sowie *Myh7* und *C-fos*. Hierbei konnten die *in vitro*-Daten *in vivo* bestätigt werden. Ein Jahr alte Myozap-transgene Mäuse zeigten eine hoch signifikante Heraufregulation der oben genannten SRF-Zielgenproteine.

Hierbei wurden für jede Gruppe n = 7 Mäuse untersucht. *Nppa* zeigte eine ca. 8 fache Heraufregulation, ähnlich wie *Myh7*. *Nppb* und *C-fos* zeigten in der Myozap-Gruppe eine Verdopplung der Expressionsrate.

Um das Verhalten dieser Gene auch unter Druckbelastung zu untersuchen, wurden aus TAC-operierten Mäusen Proben für mRNA Quantifizierungen entnommen. Es zeigte sich, wie erwartet unter Aortenkonstriktion eine ausgeprägte Hochregulation der SRF-Zielgene.

Unerwartet war jedoch die Tatsache, dass *C-fos* allein durch transgene Überexpression hochreguliert zu sein scheint. In aortenkonstriktierten Mäusen konnte nur innerhalb der transgenen Gruppe eine weitere Induktion der Expression erreicht werden, während die Quantifizierung der *C-fos* mRNA innerhalb der Wildtyp-Gruppe ein konstantes Ergebnis ergeben hat. Dies könnte darauf schließen lassen, dass *C-fos* eine Sonderstellung (besonders sensitiv reagierend) im SRF-Signalweg in transgenen Myozap-Mäusen inne hat.

Für die Quantifizierung der SRF-Zielgene wurden n = 5-6 Mäuse pro Gruppe untersucht. Abbildungen 3-10 A und B zeigen die Hochregulation der SRF-Zielgene nach einem Jahr, bzw. nach Aortenkonstriktion.

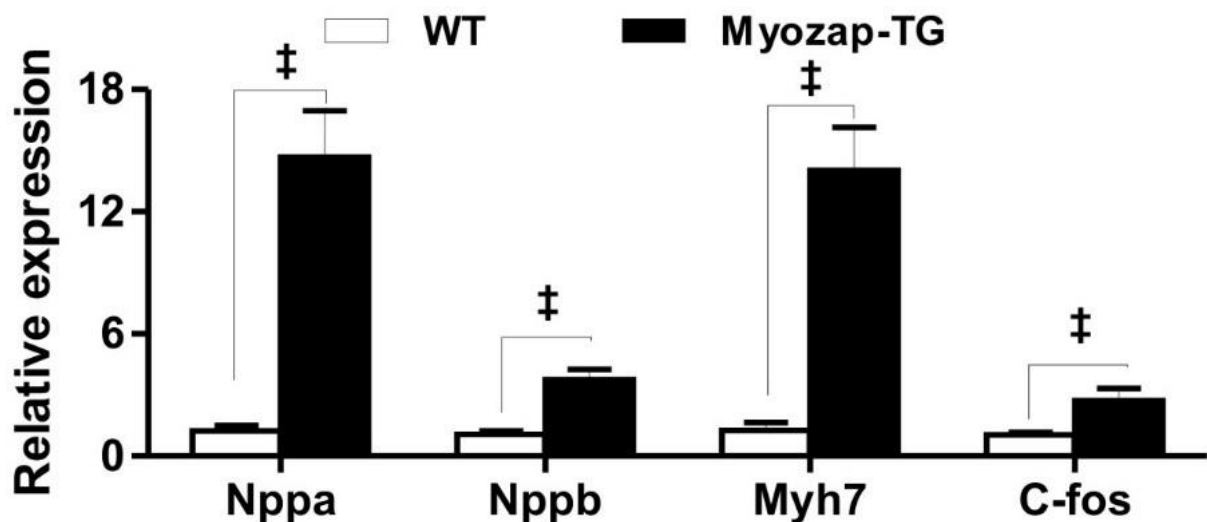


Abbildung 3-10 A: Kardiale mRNA-Expression der SRF-Zielgene *nppa*, *nppb*, *myh7* und *c-fos* in ein Jahr alten Myozap-TG-Mäusen verglichen zu ihrer Wildtyp-Gruppe. n = 7 pro Genotyp. .*: p < 0,05, †: p < 0,01, ‡ < 0,001.

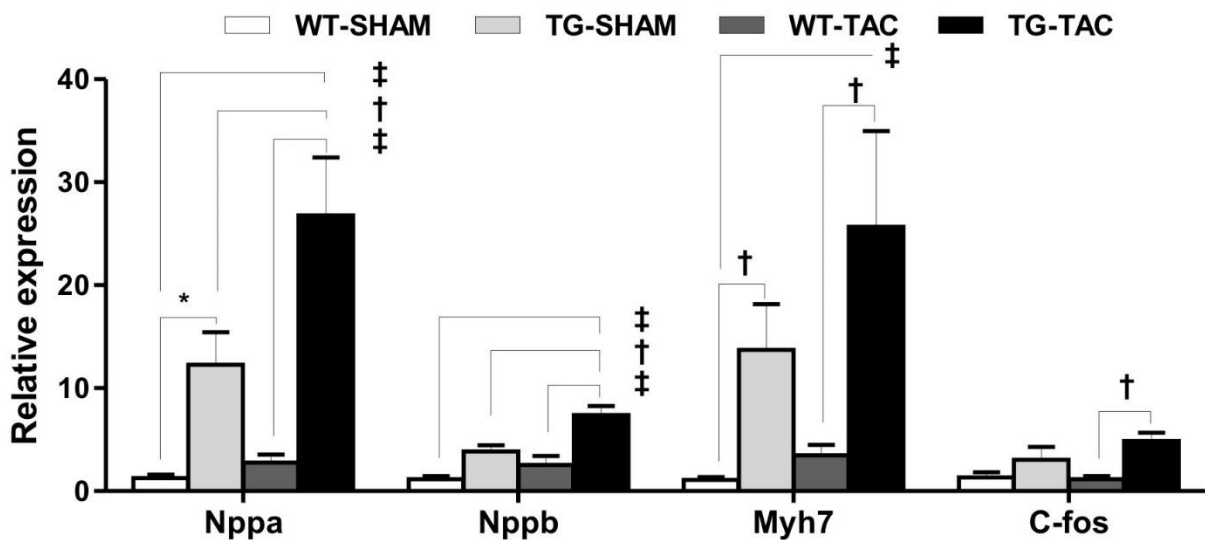


Abbildung 3-10 B: Kardiale mRNA-Expression der SRF-Zielgene *nppa*, *nppb*, *myh7* und *c-fos* in Wildtyp-Mäuse und Myozap-TG-Mäusen +/- TAC. n = 5-6 pro Gruppe. *: p < 0,05, †: p < 0,01, ‡ < 0,001.

3.7. Myozap transgene Mäuse zeigen erhöhte UPR-Aktivität

Das endoplasmatische Retikulum (ER) dient, unter anderem, der richtigen Faltung und Aufbereitung cytosomaler und transmembraner Proteine. Äußere Faktoren und genetische Faktoren können hierbei zu einer Störung der ER-Funktion führen, die zu einer Akkumulation fehlgefalteter und ungefalteter Proteine, insbesondere im ER-Lumen, aber auch im Zytoplasma, führt.

Dieser Zustand wird als ER-Stress bezeichnet [68, 69]. ER-Stress aktiviert eine Signalkaskade, die mitunter als 'Unfolded Protein Response (UPR)' bezeichnet wird, deren Ziel die Wiederherstellung der ER-Homöostase und konsekutiv die Milderung des ER-Stresses ist. Bei frustranen ER-Stress-Verhältnissen leitet die UPR letztlich die Apoptose ein [68].

Es ist mittlerweile bekannt, dass die UPR auch im Rahmen unterschiedlichster Herzerkrankungen, wie Kardiomyopathien, eine gewichtige Rolle spielt [70].

Um unsere Hypothese eines erhöhten UPR im Rahmen von ER-Stress bei Myozap-Überexpression und Aggregatbildung zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ashraf Rangrez vom UKSH Campus Kiel, die Expression mehrerer wichtiger Mitglieder der UPR-Signalkaskade, wie die Proteinkinasen IRE1 α und PERK, sowie die

Proteinisomerase PDI in ein Jahr alten Myozap-transgenen Mäusen und in aortenkonstriktierten Mäusen, bzw. in Sham-Mäusen analysiert. Hierbei zeigte sich eine einheitliche Hochregulation von PERK, IRE1 α und PDI in ein Jahr alten Myozap transgenen Mäusen (siehe Abbildung 3-11 A und B), sowie eine Dysregulation der UPR-Proteine in aortenkonstriktierten Myozap-transgenen Mäusen (siehe Abbildung 3-12 A und B).

A

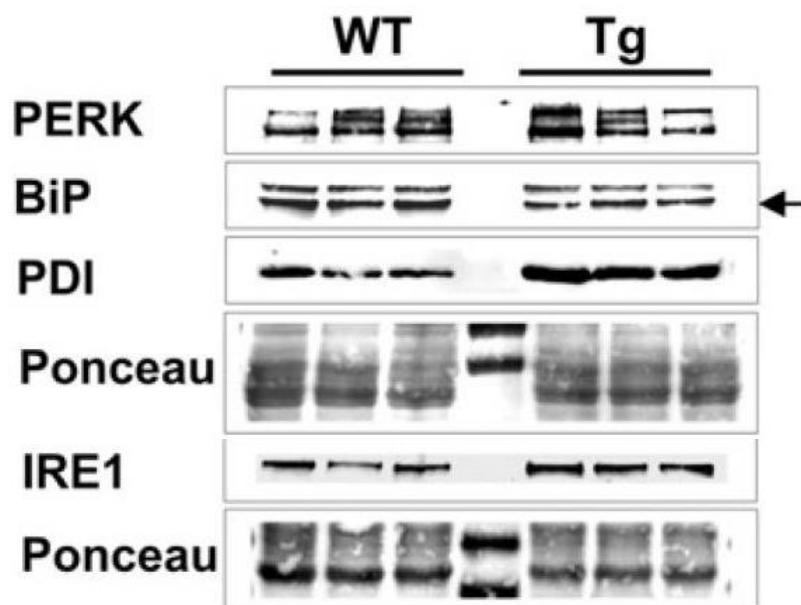


Abbildung 3-11 A: Unfolded Protein Response (UPR) in 1 Jahr alten Myozap transgenen Mäusen. Immunoblots für PERK, IRE1 α , BiP und PDI mit n = 6.

B

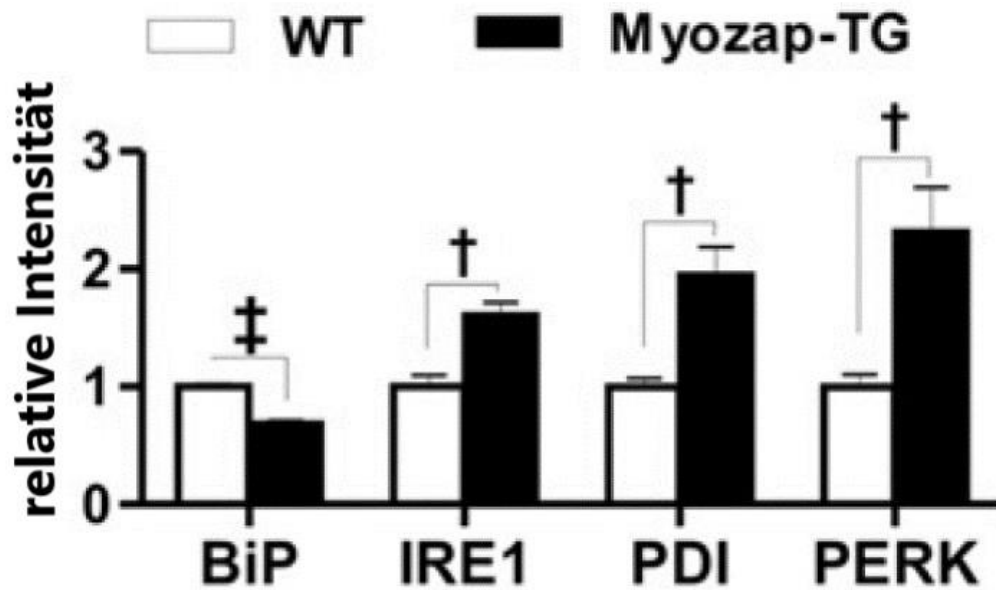


Abbildung 3-11 B: Unfolded Protein Response (UPR) in 1 Jahr alten Myozap transgenen Mäusen. Densitometrische Analyse der jeweiligen Blots aus Abbildung 3-11 A. Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. *: $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡: $p < 0,001$.

A

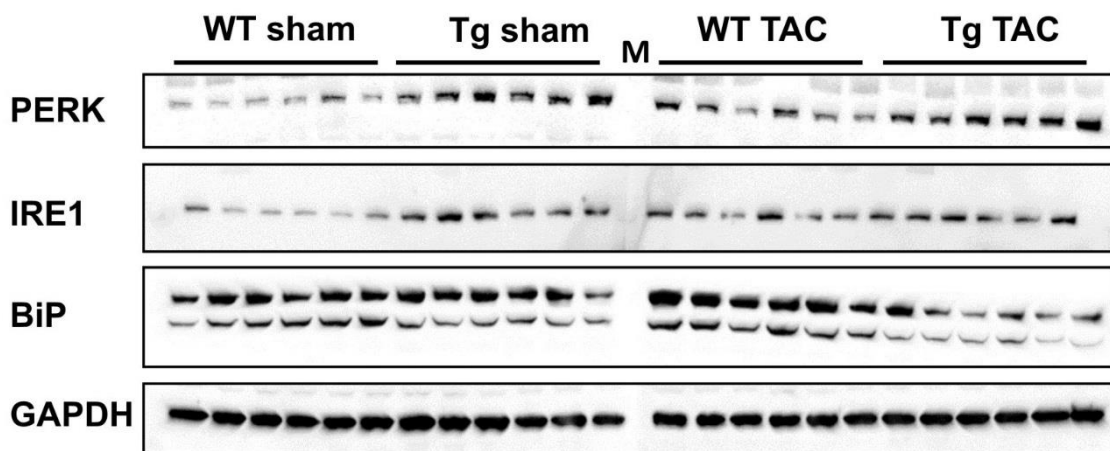


Abbildung 3-12 A: Immunoblots für PERK, IRE1 α und BiP mit $n = 6$. Im Blot zeigt sich eine Dysregulation der typischen UPR-Proteine.

B

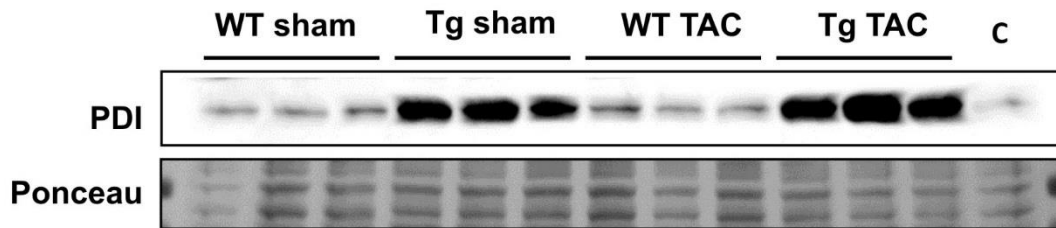
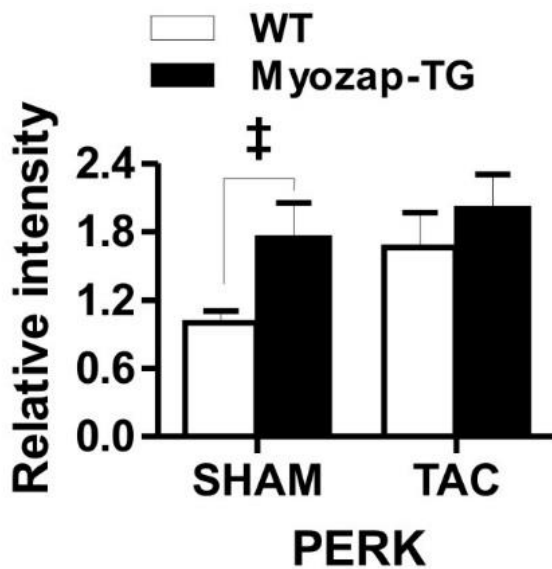


Abbildung 3-12 B: Repräsentativer Blot von PDI mit $n = 9$. Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. *: $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡ $< 0,001$.

Auffällig war, dass sich unter Aortenkonstriktion eine deutliche Hochregulation dieser Proteine in Wildtypmäusen zeigen ließ, wohingegen in der transgenen TAC-Gruppe eine deutliche Hochregulation ausblieb. Zudem zeigte sich überraschenderweise eine hochsignifikante Runterregulation des Chaperones BiP. Die densitometrischen Auswertungen der entsprechenden Blots zeigen die Abbildungen 3-13 A-D.

A



B

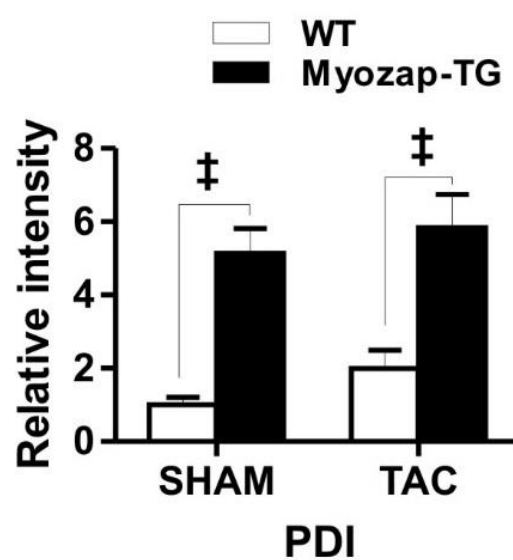


Abbildung 3-13 A+B: Densitometrische Auswertung der Blots aus 3-12 A. Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. *: $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡ $< 0,001$.

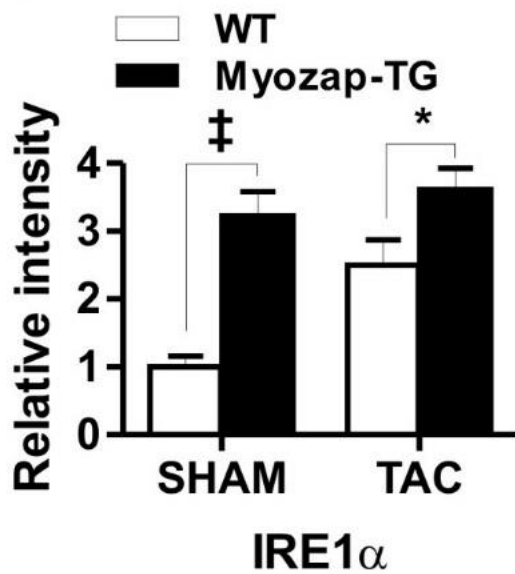
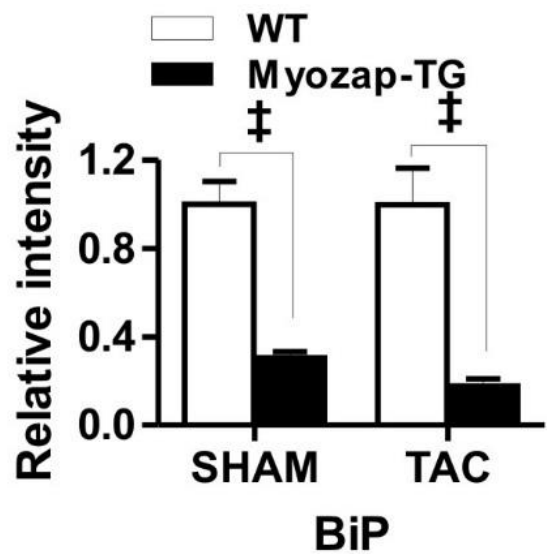
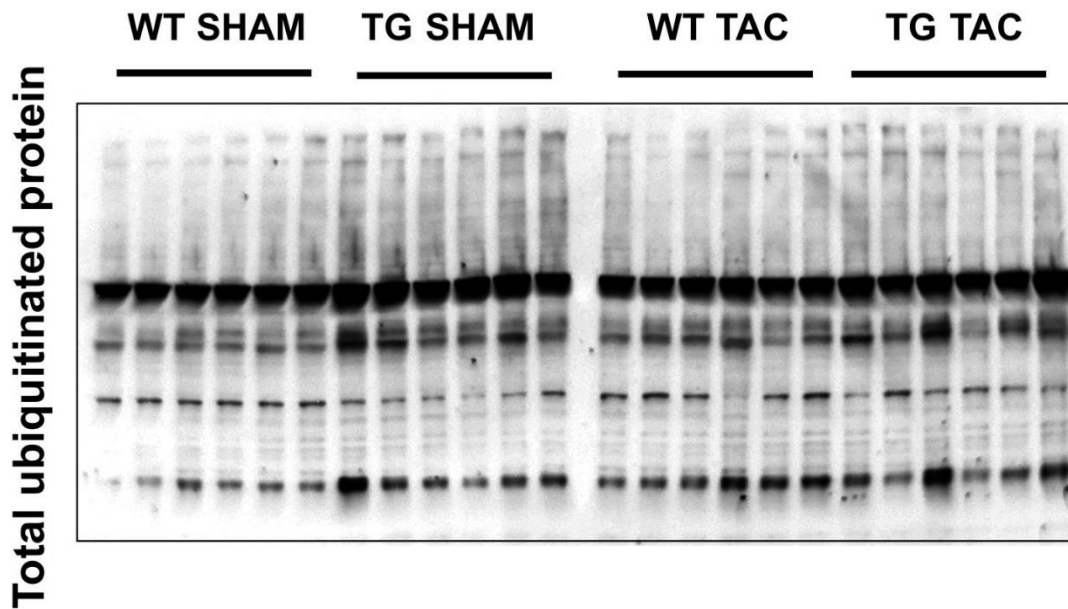
C**D**

Abbildung 3-13 C+D. Densitometrische Auswertung der Blots aus 3-12 A. Für A bis D zeigte sich, dass unter TAC eine Hochregulation dieser Proteine in transgenen Mäusen ausblieb. In Wildtypmäusen zeigte sich indes eine deutlich Hochregulation der UPR-Proteine. Zudem zeigte sich eine hochsignifikante Herabregulation des Chaperones BiP. Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. *: $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡: $p < 0,001$.

Ranek *et al.* zeigten 2013, dass eine erhöhte Proteasomenaktivität eine große Rolle in der Proteindegradierung in Desmin-ähnlichen Kardiomyopathien spielt [71].

Aus diesem Grund untersuchten wir die Gesamtubiquitinierung in Myozap-transgenen Mäusen. Wie in Abbildung 3-14 A und B ersichtlich, zeigte sich eine signifikant höhere Ubiquitinierung in Myozap-transgenen Mäusen, wobei auch hier eine Aortenkonstriktion keine weitere Ubiquitinierung in der transgenen Gruppe provozieren konnte, während sich durch eine TAC in der Wildtyp-Gruppe eine höhere Proteasomenaktivität induzieren ließ. Die fehlende Induzierbarkeit der Proteasomenaktivität und der UPR in der transgenen Gruppe, ist vereinbar mit einer Sättigung dieses Effektes.

A



B

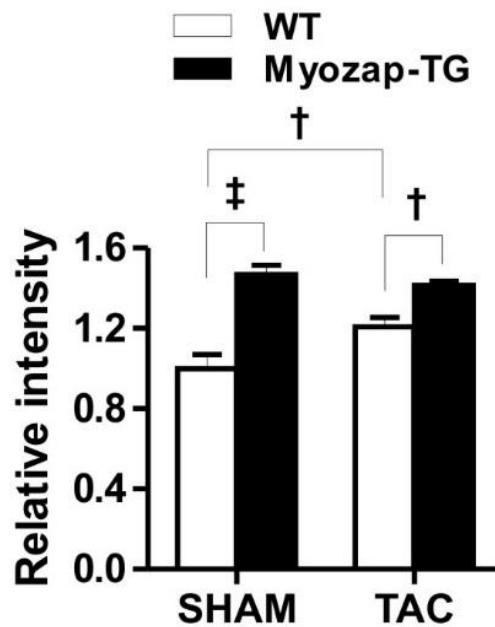


Abbildung 3-14 A+B. Ubiquitinierung in aortenkonstriktierten Myozap transgenen Mäusen. A zeigt den entsprechenden Western Blot. B zeigt die entsprechende Quantifizierung mit n = 6. Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ Software 6). Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. †: p < 0,01, ‡ < 0,001.

3.8. Myozap-transgene Mäuse zeigen erhöhte UPR-abhängige Apoptose und Autophagie

Der Ausfall von Kardiomyozyten, zum Beispiel im Rahmen des myokardialen Remodellings bei Herzinsuffizienz im Rahmen von Myokardinfarkten und dem konsekutiven Ersatz durch Narbengewebe, spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer kontraktile Dysfunktion und somit in Herzmuskelerkrankungen an und für sich [72]. Um weiter den Effekt von Myozap auch auf eine etwaige Apoptose im Rahmen dieses myokardialen Remodellings nachzugehen, untersuchten wir, ob durch die UPR-Aktivierung eine Apoptosenkaskade in Gang gesetzt wurde. Tatsächlich zeigte sich eine deutliche Hochregulation der Gesamt-Caspase 12 und der aktivierten gespalteten Caspase 12 (Cl. Caspase 12) in ein Jahr alten Myozap transgenen Mäusen, wie in dem Western-Blot in Abbildung 3-15 A und B ersichtlich. Die Blots wurden in Zusammenarbeit mit Frau Katharina Stiebeling und Dr. Ashraf Rangrez, beide UKSH Campus Kiel, fertiggestellt.

A

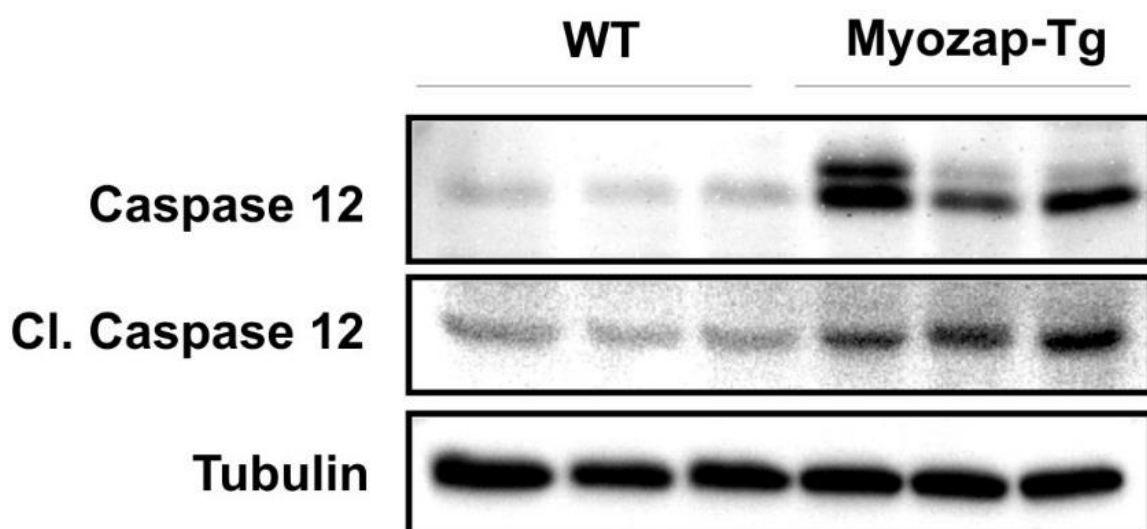


Abbildung 3-15 A: UPR-abhängige Apoptose in Myozap ein Jahr alten Myozap transgenen Mäusen (Immunoblot für Gesamt Caspase 12)

B

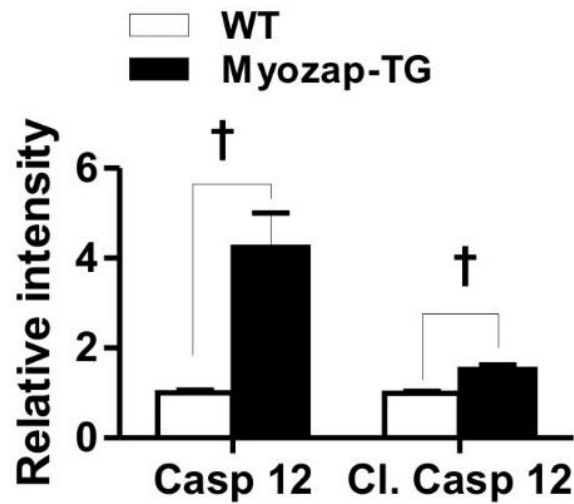


Abbildung 3-15 B: Entsprechende Densitometrie zu A. Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. *: $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡: $p < 0,001$.

Eine analoge Entwicklung zeigten Myozap-transgene Sham-operierte Mäuse verglichen mit der Sham-operierten Wildtyp-Gruppe, Abbildung 3-16 A und B. Trotz der signifikanten Hochregulation der Gesamt-Caspase 12 in Myozap-transgenen Mäusen, konnte keine weitere Zunahme der Gesamt-Caspase 12 durch Nachlasterhöhung mittels Aortenkonstriktion induziert werden. Auch dieses Ergebnis zeigt sich konsistent mit der oben beschriebenen Sättigung.

A

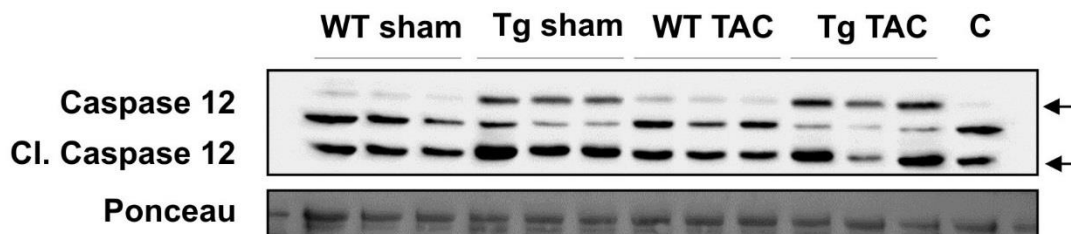


Abbildung 3-16 A: UPR-abhängige Apoptose in aortenkonstriktierten Myozap transgenen Mäusen. Immunoblots. Cl. Caspase = gespaltene Caspase (cleaved Caspase)

B

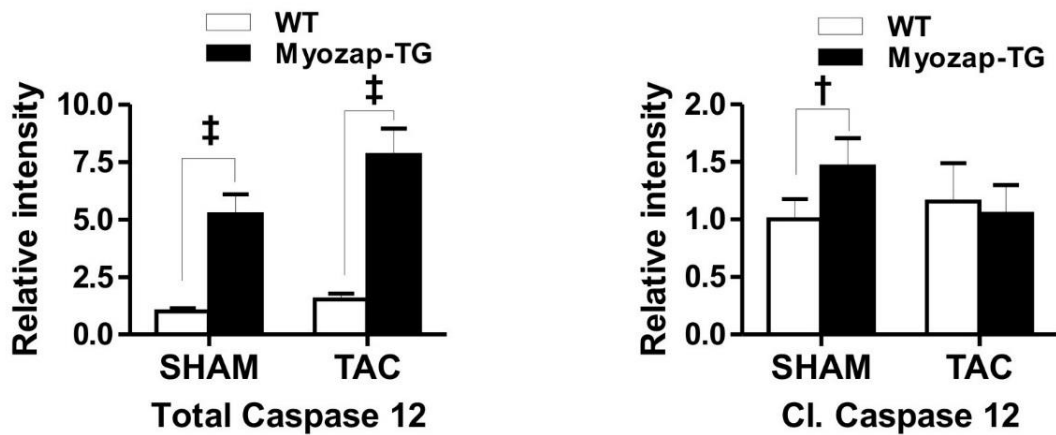


Abbildung 3-16 B: Entsprechende Densitometrie. n = 9. Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. *: $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$.

In enger Korrelation zur Apoptose steht die Autophagie, die einen zellulären Proteinabbauweg im Sinne einer Qualitätskontrolle darstellt und eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des Herzversagens spielt [73]. Um mögliche Effekte der Myozap-Überexpression auf zelluläre Autophagie zu prüfen, quantifizierten wir die Autophagosomenformierung mittels eines LC3-Western-Blots. LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) ist ein im Zytoplasma gelöstes Protein mit einem molekularen Gewicht von ca. 17 kDa. Während der Autophagie umfließen Autophagosomen zytoplasmatische Proteine und Organellen. In ihrer Membran ist LC3-II verankert, welches die weitere Autophagie steuert und mitunter für eine Verschmelzung der Autophagosomen mit Lysosomen sorgt [74].

Hier zeigte sich interessanterweise ein Muster, welches stark an UPR-induzierte Apoptose erinnerte.

Die aktivierte Autophagie-assoziierte Form von LC3 (LC 3-II) zeigte sich signifikant hochreguliert in Myozap-transgenen Mäusen, wobei sich die LC3-II-Aktivität abermals durch Aortenkonstriktion nur in der Wildtyp-Gruppe, jedoch nicht in der transgenen Gruppe induzieren ließ, siehe Abbildung 3-17 A und B.

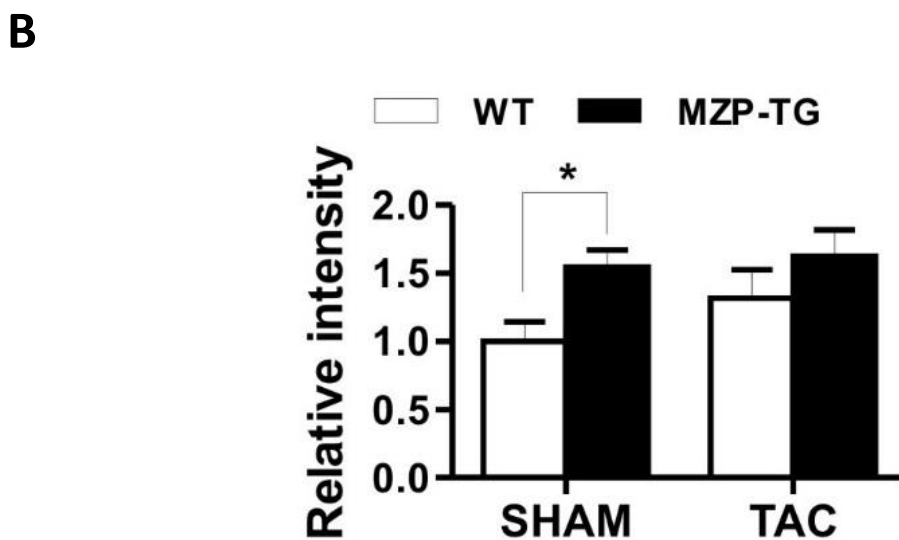
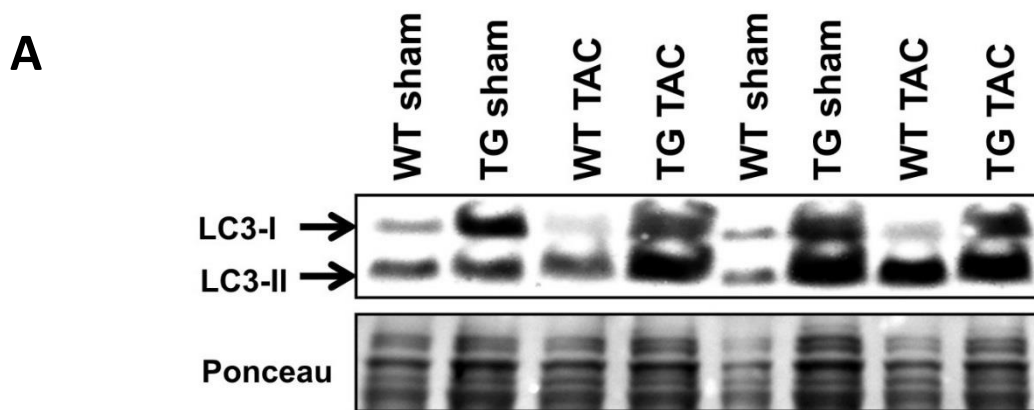


Abbildung 3-17: Die Aktivierung der Autophagie in Myozap transgenen Mäusen, gemessen anhand der LC3-II Aktivität mit $n = 6$. A zeigt den LC3-Western-Blot, B die entsprechende Densitometrie. Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. *: $p < 0,05$.

Um den Verlauf der Autophagie weiter zu untersuchen, analysierten wir die Expressionsrate des Autophagiemarkers p62. p62 erkennt toxische Abfallprodukte der Zelle, die es durch Sequestrierung und Autophagie zu bereinigen versucht [75].

Wie in Abbildung 3-18 A und B zu sehen, zeigt sich p62 in Myozap transgenen Mäusen deutlich hochreguliert. Auch in p62-immungefärbten Herzschnitten zeigte sich im Bereich der Proteinaggregate ein signifikantes p62-Signal.

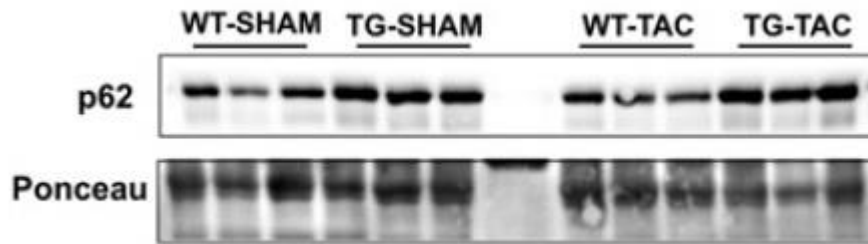
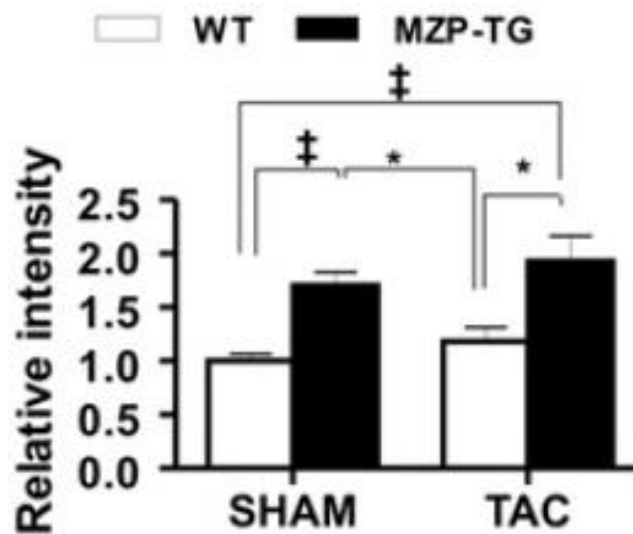
A**B**

Abb 3-18: Der Autophagiemarker p62 zeigt sich in Myozap transgenen Mäusen deutlich hochreguliert. A zeigt den p62-Western-Blot, B die entsprechende Densitometrie. Statistische Auswertung mittels Two-way ANOVA. *: $p < 0,05$.

Bemerkenswerterweise wurde bereits von Zheng *et al.* 2011 beschrieben, dass erhöhte p62-Spiegel typisch für Proteinopathien, wie die Desmin-ähnlichen-Kardiomyopathien, seien [76]. In Zusammenschau deuten diese Ergebnisse also auf eine gewichtige Rolle der Apoptose und Autophagie in Myozap-transgenen Mäusen und folglich in Kardiomyozyten mit Myozap-Proteinaggregaten hin. Abbildung 3-19 zeigt die p62-Immunfärbung in Myozap transgenen Mäusen.

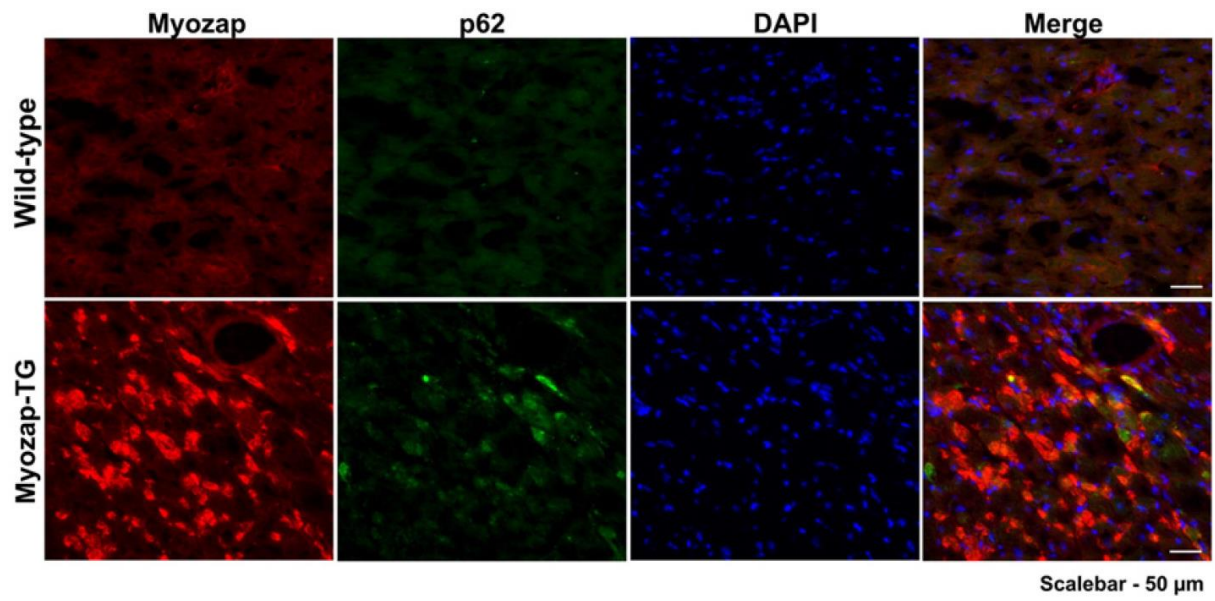


Abbildung 3-19: p62-Immunfärbung in Proteinaggregaten von Myozap transgenen Mäusen.

4. Diskussion

4.1. Myozap-Überexpression und Proteinaggregat-vermittelte-Kardiomyopathie

Es wird in dieser Arbeit das neue kardiale Glanzstreifenprotein ‚Myozap‘ in seiner *in vitro*- und *in vivo*-Funktion beschrieben. Schon vorherige Publikationen (Frank *et al.*, 2014; Seeger *et al.*, 2010) deuteten auf eine RhoA-abhängige SRF-Aktivierung durch Myozap hin [54, 96].

Myozap interagiert und kolokalisiert mit weiteren Glanzstreifenproteinen [54], wie zum Beispiel Desmoplakin oder ZO-1. Auch die vorliegende Arbeit bestätigte die vorangehenden Publikationen, dass Myozap den RhoA-abhängigen SRF-Signalweg hochgradig aktiviert.

Für den Glanzstreifen wurde schon zuvor eine eminente Rolle in hereditären Kardiomyopathien beschrieben [77]. Auch für den SRF-Signalweg wurde gezeigt, dass er Herzhypertrophie und Herzversagen in fördernder Weise beeinflusst [78], so dass die Hypothese postuliert wurde, dass Myozap eine modulatorische Wirkung auf diesen Weg hat. Es konnte nun in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Überexpression von Myozap, auch ohne Nachlasterhöhung oder weitere Stressinduktion, eine Kardiomyopathie mit hypertropher Komponente und Funktionsstörung verursacht. Unter Nachlasterhöhung durch Aortenkonstriktion konnte dieser kardiomyopathische Phänotyp im Sinne einer hochgradigen systolischen LV-Dysfunktion und starker Hypertrophie mit dilatativer Komponente noch weiter exazerbiert werden. Gleichsinnige Ergebnisse zeigten freiwillige Laufradexperimente von Myozap transgenen Mäusen, die nach 7, 10 und 17 Wochen einen ähnlichen, jedoch mildereren, Phänotyp zeigten [54, 79]. Hierbei ist die adaptive (oder auch physiologische) von der maladaptiven (oder auch pathologischen) Hypertrophie zu unterscheiden. Während die adaptive Hypertrophie in Wachstumsphasen, während der Schwangerschaft oder wie bei den o.g. Laufradexperimenten im Rahmen sportlicher Tätigkeit auftritt, handelt es sich bei der

maladaptiven Hypertrophie um eine Reaktion der Herzmuskelzellen auf extrinsische pathologische Reize. Klassischerweise wird diese kardiale Hypertrophie, im Rahmen des kardialen Remodelings, in eine konzentrische oder exzentrische Hypertrophie unterteilt, die durch Druck- oder Volumenbelastung, wie bei Klappenstenosen und Klappeninsuffizienzen oder wie im Rahmen dieser Arbeit durch Aortenkonstriktion unter Laborbedingungen, ausgelöst werden kann [95].

Schon die Arbeitsgruppe um Frank und Seeger *et al.* beschrieb Proteinaggregate in histologischen Schnitten von Myozap-transgenen Mäusen, die noch keinem extrinsischen Stimulus ausgesetzt waren. Hierbei zeigten sich überraschenderweise große Myozap-Proteinaggregate in der Nähe der Glanzstreifen in Kardiomyozyten der transgenen Gruppe, während die Glanzstreifen der Wildtyp-Herzen einen typischen und unauffälligen Aufbau zeigten. Ferner stellte sich die Integrität des Glanzstreifens an den Stellen gestört dar, an denen die Aggregate sehr nah an diesen heran kamen. Elektronenmikroskopische Bilder von Ultradünnschnitten bestätigten die Anwesenheit der großen Proteinaggregate in Glanzstreifennachbarschaft. Ebenso wurde in den Myozap-Aggregaten ebenfalls Desmoplakin gefunden, welches konsequenterweise zu der Annahme führen muss, dass die subzelluläre Umverteilung des Desmoplakins die Lokalisation des Desmins beeinflusst [54]. Zu prüfen wäre, ob sich die Aggregatbildung durch Nachlasterhöhung mittels Aortenkonstriktion oder etwa einer Phenylephrin-Pumpe weiter steigern lässt.

Interessanterweise zeigten ultrastrukturelle Analysen innerhalb der Proteinaggregate nicht nur eine isolierte Myozap-Aggregatbildung, sondern ferner auch weitere Aggregatbildungen von Desmoplakin und Plakoglobin, womit sich eine phänotypische Nähe zu Desmin-ähnlichen Kardiomyopathien zeigen ließ. Desmin-ähnliche Kardiomyopathien weisen ähnliche Proteinaggregate auf und sind in den meisten Fällen auf Mutationen im Desmin-Gen oder im α B-Crystallin-Gen, einem Desmin-Chaperon, zurückzuführen [66, 67]. Wang *et al.* zeigten schon 2001, dass diverse Mutationen im Desmin-Gen zu Proteinaggregaten führen, die, Analog zu den Myozap-Aggregaten, nicht nur Desmin enthielten, sondern auch weitere Zellproteine mit einschlossen [80]. Auch wurde gezeigt, dass die Hochregulation von Desmin im

Herzen mit hereditären, hypertrophen Kardiomyopathien, sowie der terminalen Herzinsuffizienz in Zusammenhang steht und auch diese Hochregulation zu einer Aggregatformation des Proteins führt. Im Falle des Desmins ließ sich zeigen, dass die Desmin-Aggregate der natürlichen Enzymmaschinerie der Zelle nicht mehr zugänglich waren, welches sich auch für die Myozap-Aggregate annehmen lässt und im weiteren Verlauf zu untersuchen wäre. Interessanterweise zeigten die Versuche von Wang *et al.*, dass zehn Wochen nach Geburt, die Proteinaggregate voll ausgebildet waren und ein nicht weiter provozierbarer Steady-state erreicht wurde [80].

McLendon und Robbins führten 2011 an, dass ein wesentlicher Anteil der Desmin-Aggregate fehlgefaltet seien und dass, neben der Desmin-Aggregate, auch lösliche Pre-Amyloid-Oligomere eine gewichtige Rolle in der Schwächung der Herzmuskelzellen spielen [97]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit erhobenen Echokardiografie-Daten, die über das *Fractional Shortening* eine deutliche Herzmuskelschwäche zeigten. Darüberhinaus beeinflussen Proteinaggregate die mitochondriale Funktion in negativer Weise und führen zu einem abnormalen Metabolismus, sowie einer veränderten Gesamtstruktur der Zelle [97].

Es konnte ferner gezeigt werden, dass nicht die intrazelluläre Gesamtkonzentration der in den Proteinaggregaten miterfassten Glanzstreifenproteine erhöht war, sondern, dass der Glanzstreifen selbst eine geringere Konzentration der jeweiligen Proteine aufwies, es somit zu einer subzellulären Verlagerung der Proteine gekommen ist. In Anbetracht der Analogien zu Desmin-ähnlichen Kardiomyopathien wurden die Proteinaggregate auf eine Kollokalisierung mit Desmin untersucht. Interessanterweise zeigte sich eine Verlagerung des Desmins weg vom Glanzstreifen. Dies schien umso außergewöhnlicher, da unter physiologischen Bedingungen Desmin am Glanzstreifen mit Myozap kollokalisiert. Mit konventionellen Methoden ließ sich keine direkte Beteiligung von Desmin an der Aggregatbildung nachweisen. Neuere, unpublizierte Daten legen jedoch eine gewisse Rolle von Desmin an der Bildung von Myozap-Transgen-assoziierten Aggregaten nahe (u.a. Dr. Ashraf Rangrez und Prof. Dr. Andreas Tholey).

Eine Verlagerung von Desmin und anderen Glanzstreifenproteinen wie Desmoplakin, vom Glanzstreifen, konnte auch bei kardialer TNF- α -Überexpression beobachtet werden. Analog der Myozap-Überexpression, ging auch diese mit einer Aggregatbildung einher, jedoch mit dem Unterschied, dass diese Proteinaggregate stets Desmin beinhalteten [81]. Generell scheint die Proteinaggregatbildung ein nicht selten auftretender Mechanismus in der Pathogenese (idiopathisch-dilatativer) Kardiomyopathien zu sein. So konnte bereits gezeigt werden, dass Proteinaggregate in DCM mit einem veränderten Ca²⁺-Haushalt und konsekutive veränderter Kontraktilität in Zusammenhang stehen [82]. Ferner zeigten Laser-Mikrodissektionsschnitte mit markierungsfreier massenspektrometrischer Quantifizierungsanalyse von Patienten mit Desminopathien jedweder Mutation, eine Vielfalt von bis zu 22 unterschiedlichen Proteinen innerhalb der Aggregate [83]. In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten dieser Proteine Z-Scheiben-Proteine waren und dass Aggregatformationen myofibrillärer Myopathien, wie die Desminopathien auch, von der Z-Scheibe ausgehen, wurde die Hypothese angenommen, dass die Proteinaggregatbildung in Myozap-transgenen Mäusen einem ähnlichen Mechanismus unterliegt, zumal auch Myozap am Glanzstreifen und zum Teil an der Z-Scheibe lokalisiert ist und die Aggregate stets in direkter Nachbarschaft des Glanzstreifens aufzufinden waren. Es soll allerdings angemerkt sein, dass nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte, dass die Aggregatformationen in den Myozap-transgenen Mäusen, eine generelle und unspezifische Reaktion auf die Überexpression eines Gens an sich ist. Gegen dieses Argument spricht das Vorhandensein dieser Aggregate in einer weiteren Myozap TG-Linie mit deutlich geringerer Expressionsrate. Zudem stellt sich vor allem die Funktionalität der Proteinüberexpression durch erhöhte SRF-Aktivität (*in vitro* und *in vivo*) eher als spezifische Wirkung und nicht als bloßes Nebenprodukt der Überexpression dar, bei der eher ein fehlerhaftes und fehlgefaltetes Protein mit ausbleibender SRF-Aktivierung zu erwarten wäre. Zusätzlich sind viele weitere hunderte transgene Mausmodelle bekannt, die den gleichen α -MHC-Promoter verwenden und bei denen eine Aggregatformation ausbleibt.

4.2. Myozap-Proteinaggregate und die Rolle von UPR, Apoptose und Autophagie

Es konnte schon in ungestressten transgenen Mäusen eine erhöhte Konzentration der cleaved-Caspase 12 (aus dem Engl.: gespaltene Caspase 12) gemessen werden, was für vermehrte Apoptosevorgänge spricht. Interessanterweise ließ sich die Apoptoserate durch Nachlasterhöhung nicht weiter exazerbieren. Da die cleaved-Caspase 12 ein klassisches Enzym der UPR-vermittelten Apoptose ist und diese durch ER-Stress induziert werden kann [84], sind die Myozap-Proteinaggregate wohl der wahrscheinlichste Auslöser dieses Prozesses. Übereinstimmend mit diesem Prozess waren in Myozap-transgenen Mäusen die typischen UPR-vermittelten Faktoren PERK, IRE1 α und PDI deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu waren jedoch die Konzentrationen des Chaperons BiP hochgradig verringert, was auf einen erhöhten Verbrauch des Proteins hindeutet. Hauptaugenmerk liegt gegenwärtig in der therapeutischen Herunterregulation von BiP. So konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation, durch die entsprechende siRNA von BiP, Krebszellen einer Gen- oder Chemotherapie zugänglicher machte [98]. In diesem Kontext spielt BiP eine wichtige Rolle in der Pathogenese diverser Krebszellen (u.a. Prostata, Hoden, Brust), die durch eine Mutation des Tumorsuppressorgens REIC/Dkk-3 immortalisiert wurden. Tanimoto *et al.* konnten zeigen, dass adenovirale Infektionen mit Ad-REIC erst dann zu einer Tumorsuppression führten, wenn die Zellen (PC3) parallel über eine Herunterregulation durch BiP-siRNA sensibilisiert wurden. Dies führte zu der Annahme, dass Ad-REIC via ER-Stress tumorsupprimiert und dass die BiP-Konzentration somit als valider Test für die Effektivität einer Gentherapie herangezogen werden könnte [98]. Um herauszufinden, ob eine Beeinflussung der BiP-Konzentration einen verstärkenden bzw. abschwächenden Effekt auf die Apoptose sowie die UPR-Aktivität der Kardiomyozyten hat, wäre es interessant den Zusammenhang weiter zu untersuchen und gegebenenfalls auch zu evaluieren, ob ein ähnlicher oder gar gegensinniger Effekt in Myozap-KO-Mäusen nachzuweisen ist. So

wäre in Zukunft eine ähnliche gentherapeutische Rolle des BiP im Sinne eines positiven kardialen Remodellings denkbar.

Wie o.g. konnte eine erhöhte UPR-Aktivität, analog zur cleaved Caspase-12-Konzentration, schon in ungestressten Myozap-transgenen Mäusen nachgewiesen werden. In beiden Fällen ließ sich die Expression jedoch durch eine Aortenkonstriktion mit konsekutiver Nachlasterrhöhung nicht weiter exazerbieren. In enger Korrelation zur UPR-Aktivität steht auch die beobachtete erhöhte Autophagierate in Myozap-transgenen Mäusen. Es bleibt dabei allerdings offen, ob es sich hierbei um einen protektiven oder maladaptiven Mechanismus handelt. Über erhöhte Autophagieraten in Herzerkrankungen berichteten schon Nemchenko *et al.*, wobei auch hier der kausale Zusammenhang offen blieb [85]. Generell spricht die gegenwärtige Datenlage jedoch eher für einen protektiven Mechanismus [86]. Zheng *et al.* zeigten, dass die Autophagie in Desminopathien des Herzens deutlich gesteigert ist und als adaptive Antwort der Zellen auf die Überexpression der fehlgefalteten Proteine zurückzuführen ist. Darüberhinaus ließ sich in proteinopathischen Herzen eine erhöhte p62-Konzentration messen. Über p62 ist bekannt, dass es Aggregatformation begünstigt und konsekutive, im Sinne eines proteotoxischen Zellschutzes, die Autophagie aktiviert.

Im Umkehrschluss lässt sich hieraus jedoch vermuten, dass die fehlende weitere Induzierbarkeit der womöglich protektiven Autophagie zu fortschreitendem Remodelling der Myozap-transgenen Mäuse wohl beigetragen hat. ER-Stress, UPR und Autophagie sind desweiteren eng an einen weiteren Mechanismus der Proteindegradierung gekoppelt: dem Ubiquitin-Proteasom-System.

Für das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) wurde nicht nur gezeigt, dass es in Kardiomyozyten fehlgefaltete, beschädigte und funktionlose Proteine, sowie Proteinaggregate degradieren kann, es kann vielmehr ganze intrazelluläre Signalwege durch Regulation der jeweiligen Proteinkonzentrationen beeinflussen [87]. Kommt es jedoch zu einer Störung des UPS, sammeln sich die ubiquitinierten Proteine intrazellulär an. Diese intrazelluläre Pathologie wird als *proteasomal functional insufficiency (PFI)* (aus dem Engl.: proteasomale Funktionsstörung) bezeichnet, einem

wichtigen Faktor in der Pathogenese der Desmin-ähnlichen-Kardiomyopathie [88]. Bemerkenswerterweise lässt sich umgekehrt durch eine Stimulation der Proteasomenaktivität der Ausprägungsgrad der Desmin-ähnlichen-Kardiomyopathie mildern [71]. Auch in Myozap-transgenen Mäusen zeigte sich intrazellulär die für die PFI typische, deutlich erhöhte Konzentration von gelösten polyubiquitinierten Proteinen, die dem proteasomalen Abbau zugeordnet waren. Analog der Ergebnisse der UPR-Analysen zeigte auch hier eine Nachlastserhöhung keine weitere Erhöhung der intrazellulären Konzentration an ubiquitinierten Proteinen in Myozap-transgenen Mäusen, sodass dieses Ergebnis ebenfalls als Sättigungseffekt des UPS interpretiert werden kann.

4.3. Die Rolle des SRF-Signalwegs in Kardiomyopathien und kardialem Remodelling

Da sich durch Aortenkonstriktion keine weitere Aktivierung der UPR (Unfolded Protein Response) und der daraus folgenden Apoptose, Autophagie und PFI induzieren ließ, stellte sich die Frage, welche Mechanismen zur kontraktile Dysfunktion und den strukturellen Verschlechterungen in Myozap-transgenen Mäusen führten. Es konnte in 3.1 und 3.2 gezeigt werden, dass Myozap zugleich notwendig und hinreichend für den SRF-Signalweg in Kardiomyozyten ist. Konsequenterweise führte die kardiale Überexpression von Myozap zu einer signifikanten Aktivierung SRF-abhängiger Gene, zum Beispiel *Nppa* und *Nppb*, wie auch dem SRF-Zielprotein *C-fos*. Hier allerdings, ließen sich die Expressionen SRF-abhängiger Gene durch Nachlastserhöhung mittels Aortenkonstriktion weiter induzieren. Auch die intranukleäre Expression von SRF zeigte sich in Myozap-transgenen Mäusen deutlich erhöht. SRF kontrolliert als Transkriptionsfaktor die Aktivierung unterschiedlichster muskelspezifischer Gene und ist so essenziell, dass ein herzspezifischer *knockout* von SRF zu embryonaler Letalität führt [89, 90]. Andererseits führt eine erhöhte SRF-Aktivität aufgrund einer transgenen Überexpression zu einer Kardiomyopathie mit Herzmuskelhypertrophie, kardialer

Fibrose, LV-Dilatation und kontraktile Dysfunktion [91]. In gleichem Sinne führte nun die Überexpression von Myozap, als *upstream*-Aktivator des SRF-Signalwegs, zu kardialem Remodelling. Ähnliches konnte auch für STARS (Striated muscle activator of Rho signaling) nachgewiesen werden [92]. Ein ähnlicher pathophysiologischer Effekt zeigte sich in einem weiteren transgenen Mausmodell mit der Überexpression der Histon-Trimethyllysin-Demethylase JMJD2A, bei der es ebenfalls zu einer verstärkten kardialen Hypertrophie mit gleichzeitiger SRF-Induktion gekommen ist [99]. JMJD2A ist ein noch nicht genug erforschter Transkriptions-Kofaktor, der enzymatisch die Demethylierung des Histons H3 und einiger Lysine katalysiert und der über den SRF-Signalweg induziert werden kann.

Vielversprechende und noch nicht publizierte Daten aus unserem Labor, bestätigen den Zusammenhang der SRF-Aktivität und der kardialen Hypertrophie in gegensinnigen Versuchen mit Myozap-KO-Modellen. So deuten die ersten Daten auf eine reduzierte SRF-Aktivität mit konsekutiver Reduktion SRF-abhängiger Gene in Myozap-*knockdown* Kardiomyozyten hin. Es zeigten sich zum Beispiel die Konzentrationen für *C-fos*, *Myl2* und *Serca2a* (alle SRF-abhängig) deutlich verringert [100].

Es konnte also gezeigt werden, dass Myozap eine Kardiomyopathie mit Proteinaggregatbildung verursacht, während eine erhöhte SRF-Aktivität, als Reaktion auf die Nachlasterhöhung, zu progressivem kardialen Remodelling und Herzversagen führt. Die bisher unbekannt Rolle des Myozaps in kardialer Hypertrophie als Antwort auf erhöhter Nachlast ließ sich außerdem in dem o.g. *Knockout*-Modell von Rangrez *et al.* weiter bestätigen. Myozap defiziente Mäuse reagierten auf Nachlasterhöhung mit deutlicher Hypertrophie, welche morphologisch und histologisch messbar war und zeigten begleitend eine signifikante Hochregulation Hypertrophie-typischer Gene (und Genprodukte), wie *Nppa*, *Nppb* und β -*myosin heavy chain* (MHC). In Zusammenschau weisen die Daten Myozap als einen der wenigen Glanzstreifenproteine aus, das eine wichtige Rolle in der Induktion kardialer Hypertrophie als Antwort auf biomechanischen Stress inne hat.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kardiale Überexpression des neuen Glanzstreifenproteins Myozap eine Kardiomyopathie induzieren kann und dass diese durch Nachlasterhöhung mittels Aortenkonstriktion weiter exazerbiert werden kann. Die hier provozierte Kardiomyopathie geht auf subzellulärer Ebene mit der Bildung von Proteinaggregaten einher, die, außer unseres transgenen Proteins, noch weitere Glanzstreifenproteine beinhaltet, wie zum Beispiel Desmoplakin. In ihrer Gesamtheit ähnelt dieser Phänotyp stark den Desmin-ähnlichen-Kardiomyopathien.

Hiermit lässt sich ein neues Konzept postulieren, nämlich dass der Phänotyp der Desmin-ähnlichen-Kardiomyopathien von anderen Glanzstreifenproteinen nachgeahmt werden kann. Nebst einer Proteinaggregatbildung führte die Nachlasterhöhung in Myozap-transgenen Mäusen zur Induktion des SRF-Signalwegs. Somit scheint Myozap als Aktivator des SRF-Signalwegs unter Nachlasterhöhung kardiales Remodelling zu begünstigen.

6. Literaturverzeichnis:

- [1]. Junqueira und Carneiro 2005, Histologie, 6. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- [2]. Forbes, M.S. and N. Sperelakis, Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function, *Tissue Cell*, 1985. **17**(5):p. 605-48
- [3]. Mese, G., Richard, G. and White T.W., Gap Junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 2007, **127**, 2516-2524
- [4]. Green, K.J. and C.A. Gaudry, Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(3): p. 208-16
- [5]. Garrod, D.R., Merritt, A.J. and Nie Z., Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 2002 **14**(5): p. 537-45
- [6]. Hatzfeld, M., The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol*, 1999. **186**: p.179-224
- [7]. Garrod, D. and Chidgey M., Desmosome structure, composition and function. *Biochem Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 572-87
- [8]. Stokes, D.L., Desmosomes from a structural perspective. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(5): p. 565-71
- [9]. Bierkamp, C., et al, Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Dev Biol*, 1996. **180**(2):p.780-5
- [10]. Hatzfeld, M., Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochem Biophys Acta*, 2007, **1773**(1):p. 69-77
- [11]. Getsios, S., Huen, A.C. and Green K.J., Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(4): p. 271-81
- [12]. Smith, E.A., and E. Fuchs, Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol* 1998. **141**(5):p. 1229-41
- [13]. Van Tintelen, J.P. et al, Molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: emerging horizon?, *Curr Opin Cardiol*. 2007. **22**(3):185-92
- [14]. Nelson, W.J., Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature*, 2003. **422**(6933):p. 766-74
- [15]. Niessen, C.M., Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(11): p. 2525-32
- [16]. Imamura, Y., et al, Functional domains of α -Catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol*, 1999. **144**(6): p.1311-22
- [17]. Zhurinsky, J., M. Shtutman and A. Ben-Ze'ev, Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol*. 2000. **20**(12):p. 4522-6

- [18]. Halbleib, J.M., and W.J. Nelson, Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*, 2006. **20**(23): p. 3199-214.
- [19]. Daisuke Fushiki, et al, Phylogenetic and bioinformatic analysis of gap junction-related proteins, innexins, pannexins and connexins. *Biomed Res*. 2010 Apr; **31**(2): p.133-42.
- [20]. Goodenough D.A., Paul D.L., Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Jul;1(1):a002576
- [21]. Weber, P.A., et al., The Permeability of Gap Junction Channels to Probes of Different Size Is Dependent on Connexin Composition and Permeant-Pore Affinities. *Biophys J*. 2004 Aug; **87**(2): 958–973.
- [22]. Haraguchi, Y., et al, Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation. *Biomaterials*. 2006 Sep; **27**(27):4765-74. Epub 2006 Jun 5.
- [23]. Pereda A.E., et al, Gap junction-mediated electrical transmission: regulatory mechanisms and plasticity. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan; **1828**(1):134-46
- [24]. Maron, B.J., et al, Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006 Apr 11; **113**(14):1807-16.
- [25]. Hill J.A. and Olson E.N., Cardiac plasticity. *N Engl J Med*, 2008. **358**(13): p. 1370-80.
- [26]. Berenji K., Drazner M.H., Rothermel B.A. and Hill J.A., Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(1): p. H8-H16.
- [27]. Ho C.Y., et al, Genetic Causes of Sarcomeric Cardiomyopathies: State of the Art. *Cardiovasc Res*. 2015 Jan 29. pii: cv025.
- [28]. Jääskeläinen P., et al, A new common mutation in the cardiac beta-myosin heavy chain gene in Finnish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Ann Med*. 2014 Sep; **46**(6):424-9
- [29]. Kuster D.W., et al, A hypertrophic cardiomyopathy-associated MYBPC3 mutation common in populations of South Asian descent causes contractile dysfunction. *J Biol Chem*. 2015 Jan 12. pii: jbc.M114.607911.
- [30]. Maron B.J., S.E. Epstein, and W.C. Roberts, Hypertrophic cardiomyopathy: a common cause of sudden death in the young competitive athlete. *Eur Heart J*, 1983. **4**, Suppl F: p. 135-44
- [31]. Maron B.J., et al, Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*, 1995. **92**(4): p. 785-9.
- [32]. Marian, A.J., Genetic determinants of cardiac hypertrophy. *Curr Opin Cardiol*, 2008 **23**(3): p. 199-205

- [33]. Frey, N., Olson EN., Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003; 65:45-79
- [34]. Frey, N., et al, Hypertrophy of the heart: a new therapeutiv target? *Circulation*, 2004. **109**(13):p.1580-9
- [35]. Frank D., et al, Mice with cardiac-restricted overexpression of Myozap are sensitized to biomechanical stress and develop a protein-aggregate-associated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Jul;72:196-207.
- [36]. Morimoto, S., Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res.* 2008. **77**(4): p.659-66
- [37]. Heineke, J., and J.D. Molkentin, Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(8): p. 589-600
- [38]. Valantine H.A., et al, Frequency of familial nature of dilated cardiomyopathy and usefulness of cardiac transplantation in this subset. *Am J Cardiol.* 1989 Apr 15;63(13):959-63.
- [39]. Olivotto, I., et al., Defining phenotypes and disease progression in sarcomeric cardiomyopathies: contemporary role of clinical investigations. *Cardiovasc Res.* 2015 Jan 28. pii: cvv024. [Epub ahead of print]
- [40]. Frey N., Katus H.A., Dilated cardiomyopathy as a genetic disease: molecular and clinical aspects. *Internist (Berl)*. 2008 Jan;49(1):43-50.
- [41]. Millar L., Sharma S., Diagnosis and management of inherited cardiomyopathies. *Practitioner.* 2014 Oct;258(1775):21-5, 2-3.
- [42]. Kärkkäinen S, Peuhkurinen K., Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med.* 2007;39(2):91-107.
- [43]. Tuomainen P.O., et al., Idiopathic dilated cardiomyopathy and chronic atrial fibrillation. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2014 Mar;34(2):133-7.
- [44]. Losi et al., Echocardiography in patients with hypertrophic cardiomyopathy: usefulness of old and new techniques in the diagnosis and pathophysiological assessment. *Cardiovasc Ultrasound.* 2010 Mar 17;8:7. doi: 10.1186/1476-7120-8-7.
- [45]. Bennett P.M., Maggs A.M., Baines A.J., Pinder J.C. The Transitional Junction: A New Functional Subcellular Domain at the Intercalated Disc. *Mol Biol Cell.* 2006 Apr;17(4):2091-100
- [46]. Delmar M. The intercalated disk as a single functional unit. *Heart Rhythm* 2004;1:12–3.
- [47]. Franke WW, Borrmann CM, Grund C, Pieperhoff S. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur J Cell Biol* 2006;85:69–82.
- [48]. Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 2004;36:1162–4.

- [49]. Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, et al. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 2000;9:2761–6
- [50]. Coonar A.S., et al, Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21. *Circulation*. 1998 May 26;97(20):2049-58.
- [51]. Protonotarios N., Tsatsopoulou A., Naxos disease: cardiocutaneous syndrome due to cell adhesion defect. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Mar 13;1:4.
- [52]. Posch M.G., et al, A missense variant in desmoglein-2 predisposes to dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab*. 2008 Sep-Oct;95(1-2):74-80
- [53]. Daniel J. and W.J. McKenna, Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2012 Feb; **33**(3): 296–304.
- [54]. Seeger TS, Frank D, Rohr C, Will R, Just S, Grund C, et al. Myozap, a novel intercalated disc protein, activates serum response factor-dependent signaling and is required to maintain cardiac function in vivo. *Circ Res* 2010;106:880–90.
- [55]. Pieperhoff S, Rickelt S, Heid H, Claycomb WC, Zimbelmann R, Kuhn C, et al. 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* 2012;16:1709–19.
- [56] Rickelt S, Kuhn C, Winter-Simanowski S, Zimbelmann R, Frey N, Franke WW. Protein Myozap—a late addition to the molecular ensembles of various kinds of adherens junctions. *Cell Tissue Res* 2011;346:347–59.
- [57] Rangrez AY, Bernt A, Poyanmehr R, Harazin V, Boomgaarden I, Kuhn C, et al. Dysbindin is a potent inducer of RhoA-SRF-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 2013; 203:643–56.
- [58]. Hughes S.C., Fehon R.G., Understanding ERM proteins—the awesome power of genetics finally brought to bear. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Feb; **19**(1):51-6. Epub 2006 Dec 18.
- [59]. He L., Hannon G.J., MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul; **5**(7):522-31.
- [60]. Kostrominova, T.Y., Application of WGA lectin staining for visualization of the connective tissue in skeletal muscle, bone and ligament/tendon studies. *Microsc Res Tech*. 2011 Jan; **74**(1): 18–22.
- [61]. Almaas V.M., et al., Noninvasive assessment of myocardial fibrosis in patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 2014 Apr;100(8):631-8
- [62]. Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem*. 1991;266:9180-5.
- [63]. Seeger, T.S., Molekulare und funktionelle Charakterisierung eines neuen herzspezifischen Proteins: „Myozap“ 2009, Naturwiss. Diss. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- [64]. Balza Jr RO, Misra RP. Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2006;281:6498–510.

- [65]. Nelson TJ, Balza Jr R, Xiao Q, Misra RP. SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:479–89.
- [66]. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, et al. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 1998;20:92–5.
- [67]. Goldfarb LG, Park KY, Cervenakova L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, et al. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998;19:402–3.
- [68]. Osowski C.M. and Urano F., Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* 2011; 490: 71–92.
- [69.] Sano R, Reed J.C., ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):3460-70
- [70]. Groenendyk J, Sreenivasaiah PK, Kim do H, Agellon LB, Michalak M. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res* 2010;107:1185–97.
- [71]. Ranek MJ, Terpstra EJ, Li J, Kass DA, Wang X. Protein kinase g positively regulates proteasome-mediated degradation of misfolded proteins. *Circulation* 2013;128:365–76.
- [72]. Dorn IIGW. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 2009;81:465–73.
- [73]. Nemchenko A, Chiong M, Turer A, Lavandero S, Hill JA. Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:584–93.
- [74]. Tanida I., Ueno T., Kominami E., LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol.* 2008; 445:77-88.
- [75]. Rusten T.E., Stenmark H., p62, an autophagy hero or culprit? *Nat Cell Biol.* 2010 Mar;12(3): 207-9.
- [76]. Zheng Q., Su H., Ranek M.J., Wang X., Autophagy and p62 in cardiac proteinopathy. *Circ Res* 2011;109:296–308.
- [77]. Delmar M, McKennaWJ. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res* 2010;107:700–14.
- [78]. Kuwahara K, Nakao K. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: transcriptional pathways and novel therapeutic targets in heart failure. *J Pharmacol Sci* 2011;116:337–42.
- [79]. Frey N, Frank D, Lippl S, Kuhn C, Kogler H, Barrientos T, et al. Calcineurin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J Clin Invest* 2008;118:3598–608.
- [80]. Wang X, Osinska H, Dorn II GW, Nieman M, Lorenz JN, Gerdes AM, et al. Mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* 2001;103:2402–7.
- [81]. Panagopoulou P, Davos CH, Milner DJ, Varela E, Cameron J, Mann DL, et al. Desmin mediates TNF-alpha-induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure. *J Cell Biol* 2008;181:761–75.

- [82]. Gianni D, Li A, Tesco G, McKay KM, Moore J, Raygor K, et al. Protein aggregates and novel presenilin gene variants in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2010;121:1216–26.
- [83]. Maerkens A, Kley RA, Olive M, Theis V, van der Ven PF, Reimann J, et al. Differential proteomic analysis of abnormal intramyoplasmic aggregates in desminopathy. *J Proteomics* 2013;90:14–27.
- [84]. Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:1105–10.
- [85]. Nemchenko A, Chiong M, Turer A, Lavandero S, Hill JA. Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:584–93.
- [86]. Zheng Q, Su H, RanekMJ, Wang X. Autophagy and p62 in cardiac proteinopathy. *Circ Res* 2011;109:296–308.
- [87]. Willis MS, Townley-TilsonWH, Kang EY, Homeister JW, Patterson C. Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res* 2010;106:463–78.
- [88]. Liu J, Chen Q, Huang W, Horak KM, Zheng H, Mestril R, et al. Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts. *FASEB J* 2006;20:362–4.
- [89]. Parlakian A, Tuil D, Hamard G, Tavernier G, Hentzen D, Concordet JP, et al. Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2004;24:5281–9.
- [90]. Miano JM, Ramanan N, Georger MA, de Mesy Bentley KL, Emerson RL, Balza Jr RO, et al. Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17132–7.
- [91]. Zhang X, Azhar G, Chai J, Sheridan P, Nagano K, Brown T, et al. Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1782–92.
- [92]. Kuwahara K, Teg Pipes GC, McAnally J, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, et al. Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of MEF2 signaling and SRF activity. *J Clin Invest* 2007;117:1324–34.
- [93]. Ogita et al., Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010 Jun 11; 86(6): 621–629.
- [94]. Elliot et al., Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2008 Jan;29(2):270-6
- [95]. Berenji K., Drazner M.H., Rothermel B.A. and Hill J.A., Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(1): p. H8-H16.
- [96]. Frank D, Rangrez AY, Poyanmehr R, Seeger TS, Kuhn C, Eden M, Stiebeling K, Bernt A, Grund C, Franke WW, Frey N., Mice with cardiac-restricted overexpression of Myozap are sensitized to

biomechanical stress and develop a protein-aggregate-associated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Jul;72:196-207.

[97]. McLendon PM, Robbins J., Desmin-related cardiomyopathy: an unfolding story. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Oct;301(4):H1220-8

[98]. Tanimoto et al., Down-regulation of BiP/GRP78 sensitizes resistant prostate cancer cells to gene-therapeutic overexpression of REIC/Dkk-3. *Int. J. Cancer.* 2009 July: 126, 1562–1569

[99]. Zhang QJ, Chen HZ, Wang L, Liu DP, Hill JA, Liu ZP. The histone trimethyllysine demethylase JMJD2A promotes cardiac hypertrophy in response to hypertrophic stimuli in mice. *J Clin Invest* 2011;121:2447–56.

7. Eigene Publikationen

1.) Frank D, Rangrez AY, **Poyanmehr R**, Seeger TS, Kuhn C, Eden M, Stiebeling K, Bernt A, Grund C, Franke WW, Frey N, *Mice with cardiac-restricted overexpression of Myozap are sensitized to biomechanical stress and develop a protein-aggregate-associated cardiomyopathy.*

J Mol Cell Cardiol. 2014 Jul;72:196-207.

2.) Rangrez AY, Bernt A, **Poyanmehr R**, Harazin V, Boomgaarden I, Kuhn C, Rohrbeck A, Frank D, Frey N., *Dysbindin is a potent inducer of RhoA-SRF-mediated cardiomyocyte hypertrophy.*

J Cell Biol. 2013 Nov 25;20

3.) Rangrez AY, Matthias E, **Poyanmehr R**, Katharina S, Franziska D, Bernt A, Kuhn C, Lüllmann-Rauch R, Frank D, Frey N, *Myozap Deficiency Promotes Adverse cardiac Remodeling via differential regulation of MAPK/SRF- and β -catenin/GSK-3 β -signaling.*

J Biol Chem. 2016 Feb 19; doi: 10.1074/jbc.M115.689620.

4.) Hanke JS, Rojas SV, **Poyanmehr R**, Deniz E, Avsar M, Berliner D, Haverich A, Schmitto JD, *Minimal-invasive Left Ventricular Assist Device Implantation with Outflow Graft Anastomosis to the Left Subclavian Artery.* Artif Organs. 2016 Jun;40(6):610-2. doi: 10.1111/aor.12590

5.) **Poyanmehr R**, Feldmann C, Hanke J, Schmitto J. *Urgent Driveline Repair Under Catecholamine Support After Total Driveline Cut.* Artif Organs. 2017 Jul;41(7):686-687. doi: 10.1111/aor.12958.

6.) Hanke JS, Krabatsch T, Rojas SV, **Poyanmehr R**, Deniz E, Avsar M, Martens A, Shrestha M, Damme L, Farrar D, Haverich A, Netuka, I, Schmitto JD. *In-vitro Evaluation of Inflow Cannula Fixation Techniques in Left Ventricular Assist Device Surgery.*

Artif Organs. In Revision

7.) Ius F, Natanov R, Salman J, Kuehn C, Sommer W, Avsar M, Siemeni T, Bobylev D, **Poyanmehr R**, Boethig D, Optenhoefel J, Schwerk N, Haverich A, Warnecke G, Tudorache I. *Extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation may not impact overall mortality risk after transplantation: results from a 7-year single-centre experience.* Eur J Cardiothorac Surg. 2018 Aug 1;54(2):334-340. doi: 10.1093/ejcts/ezy036.

8.) Ius F, Verboom M, Sommer W, **Poyanmehr R**, Knoefel AK, Salman J, Kuehn C, Avsar M, Siemeni T, Erdfelder C, Hallensleben M, Boethig D, Schwerk N, Mueller C, Welte T, Falk C, Haverich A, Tudorache I, Warnecke G. *Preemptive treatment of early donor-specific antibodies with IgA- and IgM-enriched intravenous human immunoglobulins in lung transplantation*. Am J Transplant. 2018 Sep;18(9):2295-2304. doi: 10.1111/ajt.14912. Epub 2018 Jun 3.

9.) Sommer W, Salman J, Avsar M, Hoeffler K, Jansson K, Siemeni TN, Knoefel AK, Ahrens L, **Poyanmehr R**, Tudorache I, Braubach P, Jonigk D, Haverich A, Warnecke G. *Prediction of transplant outcome after 24-hour ex vivo lung perfusion using the Organ Care System in a porcine lung transplantation model*. Am J Transplant. 2019 Feb;19(2):345-355. doi: 10.1111/ajt.15075. Epub 2018 Sep 12.

10.) **Poyanmehr R**, Sommer W, Ius F, Salman J, Siemeni T, Avsar M, Kuehn C, Greer M, Gottlieb J, Welte T, Haverich A, Tudorache I and Warnecke G. *Predicted total lung capacity ratio between donors and recipients does not predict outcomes in non-volume reduced lung transplantation*. Submitted

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Norbert Frey und Herrn Prof. Dr. Derk Frank danke ich für die Überlassung des äußerst spannenden Themas und die herausragende Betreuung.

Prof. Frank möchte ich im speziellen danken für die konzeptionelle Hilfe und das Vermitteln der wissenschaftlichen Herangehensweise und Trouble-Shootings von Forschungsarbeiten. Auch für die außerwissenschaftliche Hilfestellungen möchte ich mich hier bedanken und für die Tatsache, dass trotz der starken zeitlichen Belastung im klinischen Alltag er immer Zeit für mich gefunden hat.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe gilt mein besonderer Dank. Sie halfen mir bei kleinen und großen Problemen und sorgten auf unglaublich professionelle Weise dafür, dass die Arbeitsabläufe in diesem großen Laborteam problemfrei und effizient vonstatten gingen.

Insbesondere Frau Katharina Stiebeling und Herrn Dr. Ashraf Rangrez gilt mein größter Dank. Beide investierten viel Zeit für Hilfestellungen, Tipps und Tricks. Vor allem möchte ich Frau Stiebeling für die einzigartige technische Hilfe und die großartigen Blots danken und Dr. Rangrez für alle densitometrischen Analysen, aber auch den wissenschaftlichen Hilfestellungen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Meinem Bruder Dr. Ali Poyanmehr danke ich für das Wecken des wissenschaftlichen Interesses in mir und meiner Schwester Dr. Shahrzad Poyanmehr für die stete Motivation am Ball zu bleiben. Ihr seid die besten Geschwister die man sich wünschen kann. Vorallem meiner Mutter gebührt größter Dank dafür, dass sie mir stets geholfen hat, mir meine Lebensziele und -träume greifbarer zu machen. Ihre Unterstützung war und ist von unschätzbarem Wert.