

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

Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen zur
Beeinflussung metabolischer Umbauprozesse bei Herzinsuffizienz

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

vorgelegt von
Thilo Wilhelm Nitsche
aus Oldenburg

Kiel (2022)

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Oliver Müller, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Inga Voges, Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.07.2023

gez.: Priv.-Doz. Dr. med. Martina-Elisabeth Spehlmann
Vorsitzende/r der Prüfungskommission

I. INHALTSVERZEICHNIS

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....V

1. EINLEITUNG	1
1.1. Herzinsuffizienz	1
1.1.1. Molekulare Mechanismen von Herzinsuffizienz	2
1.1.2. Signaltransduktion bei kardialer Hypertrophie	3
1.1.2.1. Signaltransduktion über Calcineurin	4
1.1.2.2. G-protein-gekoppelte Rezeptoren	4
1.2. Aktuelle Therapie von Herzinsuffizienz	5
1.3. Identifizierung neuer potenzieller Zielstrukturen zur Herzinsuffizienzbehandlung	5
1.3.1. Prolindehydrogenase (PRODH)	9
1.3.2. NAD(P)H-Quinone-Reduktase-1 (NQO1)	10
1.3.3. Prolyl-3-Hydroxylase-2 (P3H2/LEPREL1)	10
1.3.4. Phosphatidylserin-Synthase 1 (PTDSS1)	11
1.3.5. Solute Carrier Family 1 Member 1 und 3 (SLC1A1 und SLC1A3)	11
1.4.6. Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2A1 (SLCO2A1)	12
1.4. Adeno-assoziierte Viren	13
1.5. Fragestellung der Arbeit:	13
2. METHODEN	15
2.1. Materialien	15
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial	15
2.1.2. Chemikalien	17
2.1.3. Puffer und Lösungen	19
2.1.4. Medien	21
2.1.5. Enzyme	21
2.1.6. Primäre Antikörper	22
2.1.7. Sekundäre Antikörper	22
2.1.8. Primer	23
2.1.9. Kits	26
2.1.10. Plasmide	26
2.1.11. Virale Vektoren	26
2.1.12. Bakterien	27

2.1.13. Bereits vorhanden Proben aus vergangenen Tierexperimenten	27
2.1.14. Software.....	27
2.2. Mikrobiologische Methoden	28
2.2.1. Vorbereitung der Agarplatten.....	28
2.2.2. Herstellung elektronenkompetenter E.coli DH5 α	28
2.2.3. Transformation	28
2.2.4. Bakterienkultur in Flüssigmedium	29
2.2.5. Plasmid DNA-Extraktion, Mini Prep	29
2.2.6. Midi Prep.....	30
2.3. Zellkultur.....	30
2.3.1.NRVCMs.....	30
2.3.1.1. NRVCM Präparation	30
2.3.1.2. Kollagenisierung von Zellkulturplatten.....	33
2.3.1.3. Transduktion von NRVCMs durch AAV6.....	33
2.3.1.4. Stimulation der NRVCMs mit Phenylephrin oder Endothelin-1	34
2.3.2. Kardiale Fibroblasten	34
2.3.2.1. Kultivierung von kardialen Fibroblasten.....	34
2.3.2.2. Kryokonservierung von kardialen Fibroblasten	35
2.3.2.3. Revitalisierung von kardialen Fibroblasten.....	35
2.3.2.4. Transduktion von Fibroblasten.....	36
2.4. Molekularbiologische Methoden.....	37
2.4.1. Agarose-Gelelektrophorese	37
2.4.2. DNA-Extraktion aus Agarosegel.....	37
2.4.3. DNA und RNA Konzentrationsbestimmung.....	38
2.4.4. Klonierung des PRODH-Vektorplasmids für Maus und Ratte	38
2.4.5. RNA Isolierung aus Zellen.....	41
2.4.6. RNA Isolierung aus Zellen mit TRIzol® Reagenz	42
2.4.7. DNase-Verdau und Phenol-Chlorophorm Aufreinigung	42
2.4.8. cDNA Synthese	43
2.4.9. RNA-Extraktion aus Mausherzen	43
2.4.10. RNA Extraktion mit Quick-RNA Microprep Kit.....	43
2.4.11. RT-qPCR.....	44
2.4.11.1. qPCR mit Sybr Green.....	45
2.4.11.2. Multiplex qPCR.....	46

2.5. Biochemische Methoden	47
2.5.1. Proteinisolation aus Zellen	47
2.5.2. Proteinquantifizierung mit Tecan DC Assay.....	47
2.5.3. Trennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE.....	47
2.5.4. Western Blot.....	48
2.5.5. Immundetektion.....	48
2.6. Histologische Methoden.....	49
2.6.1. Immunfluoreszenzmikroskopie	49
2.6.2. Zellgrößenbestimmung von NRVCs	50
2.6.3. Lokalisationsbestimmung von PRODH	50
2.6.4. TUNEL Assay	51
2.6.5. Bestimmung der mitochondrialen Superoxid Menge.....	51
2.6.6. Färbung von Herzschnitten	52
2.7. Durchflusszytometrie	52
2.8. Verarbeitung von Proben aus <i>in vivo</i> Versuchen	53
2.9. Statistische Auswertung	53
3. ERGEBNISSE	54
3.1. Validierung potenzieller Kandidaten eines Screens auf metabolische Zielstrukturen bei Herzinsuffizienz	54
3.1.1. PRODH als potenzielle therapeutische Zielstruktur in Herzinsuffizienzmodellen	57
3.1.1.1. Vergleich der Expression von PRODH in Fibroblasten und NRVCs.....	58
3.1.1.2. Validierung der Funktionsfähigkeit von AAV6-ssTnT-PRODH.....	58
3.1.2. Effekte von PRODH in NRVCs	61
3.1.2.1. Keine Einflüsse durch PRODH-Überexpression auf Hypertrophes Genprogramm.....	61
3.1.2.2. Eine PRODH-Überexpression vermindert die Größe von NRVCs	62
3.1.2.3. Einfluss auf Apoptose.....	62
3.1.2.4. PRODH führt zu Verminderung mitochondrialer Superoxid Spezies	63
3.2. Identifikation von AAVs für Infektion kardialer Fibroblasten	64
3.2.1. <i>In vitro</i> Screening auf fibroblasteninfizierende AAVs.....	64
3.2.2. Durchflusszytometrie AAV9 SLR	65
3.2.3. Untersuchung von Herzschnitten nach AAV-SLR Injektion	66
4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	67

4.1. Screen und Bewertung verschiedener Gene als mögliche Zielstrukturen.....	67
4.1.1. NAD(P)H-Quinone-Reduktase-1 (NQO1).....	67
4.1.2. Prolyl-3-Hydroxylase-2 (P3H2/LEPREL1)	68
4.1.3. Prolindehydrogenase (PRODH).....	68
4.1.4. Phosphatidylserin-Synthase 1 (PTDSS1).....	69
4.1.5. Solute Carrier Family 1 Member 1 und 3 (SLC1A1 und SLC1A3)	70
4.1.6. Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2A1 (SLCO2A1)	70
4.2. Effekte durch Überexpression von PRODH in NRVCs.....	71
4.2.1. Einfluss von PRODH auf Apoptose.....	72
4.2.2. Einfluss von PRODH auf Zellgrößen und Hypertrophie	72
4.2.3. Einfluss von PRODH auf reaktive Sauerstoffspezies	73
4.2.4. Fazit zu Effekten von PRODH in NRVCs sowie weiteren potentiellen therapeutischen Zielstrukturen	74
4.3. AAV9-SLR als mögliches Fibroblasten infizierendes Adeno-assoziiertes Virus.....	75
5. ZUSAMMENFASSUNG	76
6. LITERATURVERZEICHNIS	78
7. ANHÄNGE	88
7.1. Tabellenverzeichnis.....	88
7.2. Abbildungsverzeichnis	89
7.3. Publikationen.....	90
7.4. Danksagung.....	91

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Adeno-assoziierte Viren
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Acta1	<i>skeletal muscle alpha actinin</i>
AF	Alexa Flour
ANF	<i>Atrial natriuretic factor</i>
ANG II	Angiotensin II
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP-1	Aktivatorprotein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT-1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosintriphosphat
β -MHC	<i>β-Isoform of myosin heavy chain)</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CMV	Cytomegalo-Virus
COX	Cyclooxygenase
Ct	<i>cycle threshold</i>
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Dyrk1a	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>
EAAT	<i>Excitatory amino acid transporter</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(eGFP)	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
(eYFP)	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	<i>Forward scatter</i>
Fw	<i>forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp130	Glykoprotein 130
GSA	Glutaminsemialdehyd
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HFmrEF	<i>Heart failure with mid-range ejection fraction</i>
HFpEF	<i>Heart failure with preserved ejection fraction</i>
HrEF	<i>Heart failure with reduced ejection fraction</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-18	Interleukin 18
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
kb	Kilobasenpaare
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth Medium</i>
LEPREL1	<i>Lepreca-like protein 1</i>
LSM	<i>Laser scanning mikroskop</i>

LPS	Lipopolysaccharide
Luc	Luciferase
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
mRNA	messenger messenger ribonucleic acid
Myh7	<i>myosin heavy chain 7</i>
n	Anzahl
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCS	<i>Newborn calf serum</i>
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NOX4	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat oxidase 4
Nppa	natriuretisches Peptid A
Nppb	natriuretisches Peptid A
NQO1	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat dehydrogenase [quinone] 1
NRVCMs	neonatale Ratten ventrikuläre Kardiomyozyten
n.s.	nicht signifikant
NT-proBNP	<i>N terminal pro brain natriuretic peptide</i>
P3H2	Prolyl 3 hydroxylase 2
P5C	Δ ¹ -pyrroline-5-carboxylsäure
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PGH	Prostaglandin H
PGT	Prostaglandintransporter
PTDSS1	Phosphatidylserine synthase 1
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RCAN	<i>Regulator of calcineurin</i>
RIPA	Radio Immunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

ROS	Reactive Sauerstoffspezies
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLC1A1	<i>Solute carrier family 1 member 1</i>
SLC1A3	<i>Solute carrier family 1 member 3</i>
SLC1A2	<i>Solute carrier family 1 member 2</i>
SLC1A6	<i>Solute carrier family 1 member 6</i>
SLC1A7	<i>Solute carrier family 1 member 7</i>
SLCO2A1	<i>Solute carrier organic anion transporter family member 2A1</i>
SOAT1	Sterol O-acetyltransferase 1
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TAC	<i>Trans aortic constriction</i>
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Transgen
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>terminal desoxynucleotidyl transferase- mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UV	ultraviolett
V _g	Virusgenom
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YT-Medium	Hefeextrakt-Trypton-Medium

1. Einleitung

1.1. Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist eine häufige Erkrankung. Es wird angenommen, dass weltweit 37,7 Millionen Menschen an Herzinsuffizienz leiden (1). Vor allem in der westlichen Welt stellt sie ein zunehmendes Problem dar. Dort liegt die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung zwischen ein und zwei Prozent (2). Einen besonderen Einfluss auf die Prävalenz hat das Alter. So beträgt die Prävalenz bei 55- bis 64-Jährigen 0,9 %, während sie bei über 85-Jährigen 17,4 % beträgt (3). Das Lebenszeitrisko bei 40-Jährigen eine Herzinsuffizienz zu entwickeln beträgt unter Männern 21,0% und unter Frauen 20,3% (4). Gleichzeitig ist die Prognose des Krankheitsbildes Herzinsuffizienz schlechter als mancher Krebserkrankungen. So betrug die 1-Jahres- bzw. 5-Jahres-Sterblichkeitsrate von neu erkrankten Herzinsuffizienzpatienten in einer Studie aus Olmstead County aus den Jahren 2000-2010 20,2% bzw. 50,6% (5). Aufgrund der hohen Prävalenz und schlechten Prognose, sowie der stetig alternden Gesellschaft besitzt das Krankheitsbild Herzinsuffizienz daher eine erhebliche Bedeutung für das Gesundheitssystem. Die heutige Klassifikation richtet sich in der Regel nach der Ejektionsfraktion, also dem Anteil des vom linken Herzen ausgeworfenen Volumen am gesamten enddiastolischen Volumen des linken Herzens. So werden von der *European Society of Cardiology* drei Typen der Herzinsuffizienz unterschieden: HFpEF (*heart failure with preserved ejection fraction*), HFmrEF (*heart failure with mildly reduced ejection fraction*) und HFrEF (*heart failure with reduced ejection fraction*) (6).

Ätiologisch gibt es viele verschiedene Mechanismen für Herzinsuffizienz. Dabei zählen ischämische, hypertensive, valvuläre, rheumatische und kongenitale Genese zu den häufigsten Gründen, die zu einer Herzinsuffizienz führen. Oft treten aber auch mehrere Ursachen gleichzeitig auf (7).

Neben den anderen genannten Ursachen spielen Bluthochdruckerkrankungen eine besondere Rolle im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz. So zeigte sich in der Framingham-Herz-Studie, dass 91% der Neuerkrankten an Herzinsuffizienz zuvor an Bluthochdruck litten (8). Gleichzeitig beträgt die Prävalenz von Bluthochdruck in Deutschland 31,6% (9) und stellt daher ein erhebliches Problem dar.

Pathomechanistisch führt die chronische Druckbelastung des Herzens zur Hypertrophie des linken Ventrikels. Dabei findet ein *Remodeling* statt, das letztlich zur klinischen

Herzinsuffizienz mit diastolischer Dysfunktion führt. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bleibt oft zunächst erhalten. Es zeigt sich das klinische Bild einer HFpEF (10; 11). Eine zusätzliche Volumenbelastung des Herzens kann zur Dilatation des linken Ventrikels führen, es kommt zur Ausbildung einer exzentrischen Hypertrophie und zur Abnahme der Ejektionsfraktion. Es zeigt sich das Bild einer HFrEF (10; 11).

1.1.1. Molekulare Mechanismen von Herzinsuffizienz

Auf molekularer Ebene wird die Hypertrophie über eine Vielzahl komplexer Signalkaskaden induziert (Abbildung 1) (12). Erstes Zeichen davon ist die Aktivierung eines hypertrophen Genprogramms bestehend aus *NPPA* (ANP), *MYH7* (*myosin heavy chain 7* kodiert für β -*Isoform of Myosin heavy chain*) und *ACTA1* (*Skeletal muscle α -actin*) (13). Dies wird auch diagnostisch genutzt, indem NT-proBNP als klinischer Marker für eine Herzinsuffizienz verwendet wird (14).

Der Prozess des *Remodelings* spielt eine entscheidende Rolle. Neben der Hypertrophie kommt es zu einer myokardialen Steifheit bedingt durch den Prozess der Fibrose (15). Vermehrte Ausschüttung von Cytokinen und Hormonen wie ANG II, TGF- β 1, IGF-1 und TNF- α führt zu einem Anstieg der Produktion von Extrazellulärmatrix (EZM) (16; 17). Dabei wandeln sich Fibroblasten unter Einfluss der genannten Cytokine und Hormone in Myofibroblasten um. Diese besitzen nicht nur Funktionen der Fibroblasten, sondern zeigen auch Merkmale von glatten Muskelzellen auf. Fibroblasten und Myofibroblasten produzieren vermehrt Prokollagen Typ I und III, das extrazellulär vernetzt wird (16; 17).

Gleichzeitig ist bekannt, dass auch Entzündungsprozesse an der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt sind. Es wurde entdeckt, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF- α vermehrt ausgeschüttet werden (18). Heute weiß man, dass neben TNF- α noch viele weitere Zytokine wie TGF- β , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, und IL-18 eine Rolle beim Entzündungsprozess im Herzen spielen (19).

Auch zelluläre Prozesse sind in diesen Entzündungsmechanismus involviert. Hierbei sind unter anderem Makrophagen beteiligt. Sie tragen zur Vermittlung der Entwicklung von Hypertrophie, *Remodeling* und Fibrose bei. Daneben sind noch weitere zelluläre Komponenten des Immunsystems wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Mastzellen und NK-Zellen an den kardialen Inflamationsprozessen beteiligt (20).

Gleichzeitig kommt es zu einer Veränderung des kardialen Metabolismus (21; 22). Dies äußert sich in mitochondrialer Dysfunktion und ATP-Mangel mit verminderter Aktivität von oxidativem mitochondrialem Glucosemetabolismus (23). Parallel lässt sich vor allem eine vermehrte Glykolyse und Ketonkörper-Oxidation finden (22), sowie eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (23).

Diese reaktiven Sauerstoffspezies spielen eine zentrale Rolle im Pathomechanismus der Herzinsuffizienz. Es wurde gezeigt, dass es bei Herzinsuffizienz zu einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen kommt (24). Sie führen unter anderem zu mitochondrialer Dysfunktion durch Verursachung mitochondrialer DNA-Schäden (25). Über weitere komplexe Signalkaskaden kommt es zu einem des myokardialen *Remodelings* sowie der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie (25; 26).

Daher hat sich in verschiedenen Studien gezeigt, dass es eine vielversprechende Strategie ist, mitochondriale Zielstrukturen therapeutisch zu nutzen, um mitochondriale Dysfunktion und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu reduzieren und dadurch die Progression einer Herzinsuffizienz zu hemmen (27).

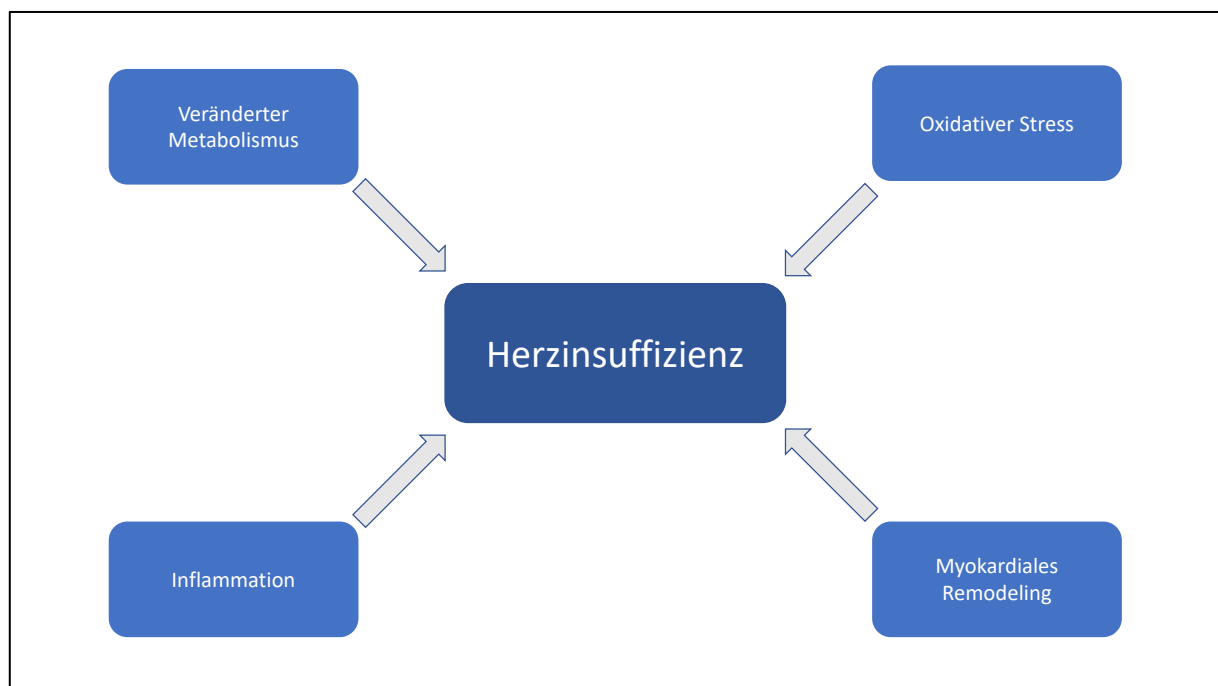


Abbildung 1: zusammenfassende Abbildung zu den Mechanismen bei Herzinsuffizienz

1.1.2. Signaltransduktion bei kardialer Hypertrophie

Heute sind viele molekulare Mechanismen bekannt, die zu kardialer Hypertrophie führen. Im Folgenden werden einige zentrale Mechanismen erläutert, die in einem Zusammenhang mit den

im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Arbeiten stehen. Es besteht nicht die Intention, sämtliche bekannte Mechanismen der kardialen Hypertrophie zu erläutern.

1.1.2.1. Signaltransduktion über Calcineurin

Calcineurin ist eine Serin-Threonin-Phosphatase. Sie besteht aus einer katalytischen A und regulatorischen B Untereinheit. Calcineurin katalysiert die Dephosphorylierung von NFAT. Dieser Prozess erfolgt Calcium- und Calmodulinabhängig (28). Durch Translokation von dephosphoryliertem NFAT in den Nukleus kann es seine Funktionen als Transkriptionsfaktor erfüllen (12). Dies führt zu einer erhöhten Aktivität der Promotoren Hypertrophie-begünstigender Gene, u.a. zu einer deutlich erhöhten Aktivität des BNP (*Brain natriuretic peptide*) - Promotors (29).

Es wurde gezeigt, dass TG-Calcineurinmäuse mit einer dauerhaften Calcineurinaktivität starke kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz aufweisen (29). TG-Calcineurinmäuse werden auch in dieser Arbeit genutzt, um mögliche neue therapeutische Zielstrukturen in der Pathogenese von Herzinsuffizienz zu validieren.

Calcineurin-defiziente Mäuse hingegen weisen eine verringerte kardiale Hypertrophieantwort auf und haben eine geringere basale Herzgröße (30).

1.1.2.2. G-protein-gekoppelte Rezeptoren

Bei den G-Protein gekoppelten Rezeptoren handelt es sich um 7-Transmembranrezeptoren.

Die Signaltransduktion erfolgt in der Regel über G-Proteine, zum Teil aber auch über G-Protein-unabhängige Signalweitergabe wie G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen-vermittelte Phosphorylierung oder Arrestin-Bindung (31).

Die G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$. Wenn GDP an die α -Untereinheit gebunden ist, besteht ein stabiler Komplex aus diesen 3 Untereinheiten. Bei Aktivierung des G- Proteins dissoziiert dieser Komplex in die $G\alpha$ Untereinheit und eine $G\beta\gamma$ Untereinheit. Beide Untereinheiten leiten die Signaltransduktion über verschiedene Kaskaden weiter. Es wird grundsätzlich zwischen G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren unterschieden. Diese vermitteln jeweils andere Signaltransduktionen (31).

Angiotensin II, Endothelin-1 und alpha-adrenerge Rezeptoren sind $G_{q/11}$ gekoppelte Rezeptoren. Über Aktivierung von Phospholipase C bedingen sie kardiale Hypertrophie und bei dauerhafter Aktivierung im Tiermodell auch eine Kardiomyopathie und kontraktile Dysfunktion (12; 32).

G_s-gekoppelte Rezeptoren, zu denen der β 1-Rezeptor und β 2-Rezeptor gehören, führen zur Aktivierung der Adenylatcyclase, die ATP zu cAMP umsetzt und darüber zur Aktivierung der Proteinkinase A führt. Die Aktivierung dieses Signalweges hat in verschiedenen Modellen zu Hypertrophie der Kardiomyozyten, Fibrose und Kardiomyopathien geführt (12).

Zu den G_i-gekoppelten Rezeptoren gehören kardiale muskarinerge Rezeptoren und auch der β 2-Rezeptor. Sie vermitteln gegenteilige Effekte zu G_s-gekoppelten Rezeptoren, indem sie zu einer Hemmung der Adenylatcyclase führen (12).

Phenylephrin, das in dieser Arbeit zur Hypertrophieinduktion von Kardiomyozyten verwendet wird, wirkt als Agonist am α 1-Adrenozeptor.

Es sind viele weitere Signaltransduktionskaskaden bekannt, die in den Mechanismus zur Ausbildung einer kardialen Hypertrophie eingreifen. Dazu zählen u.a. über kleine G-Proteine vermittelte Effekte, der MAP-Kinase Signalweg, der PI3K Signalweg, der Gp130/STAT3 Signalweg, transkriptionale Kontrolle der Hypertrophie durch MEF2/HDAC und weitere Mechanismen (12).

1.2. Aktuelle Therapie von Herzinsuffizienz

Zwar wurden in den letzten Jahren immer wieder neue Therapien für die Herzinsuffizienz zugelassen, allerdings ist die aktuelle Therapie zumeist primär symptomatisch und weniger kausal. Sie beschränkt sich auf ACE-Hemmer/AT-1 Antagonisten, β -Blocker, Mineralocorticoid Rezeptor Antagonisten, Angiotensin Rezeptor Neprilysin Inhibitoren und I_F-Kanal-Blocker und Diuretika (6). Diese Therapien wirken zwar lebenszeitverlängernd, können Symptome vermindern und Lebensqualität verbessern, sind aber keine kurativen Therapien und können stattgefundenen Umbauprozesse nur bedingt wieder rückgängig machen (33; 34; 35).

Daher ist die Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen zur Beeinflussung metabolischer Umbauprozesse wichtig, um ein besseres Verständnis der Herzinsuffizienz zu erlangen und neue vielleicht sogar kurative Therapien entwickeln zu können.

1.3. Identifizierung neuer potenzieller Zielstrukturen zur Herzinsuffizienzbehandlung

Zur Identifizierung neuer potenzieller metabolischer Zielstrukturen zur Herzinsuffizienzbehandlung erfolgte zu einem früheren Zeitpunkt in der Arbeitsgruppe eine Untersuchung in Zusammenarbeit mit der Firma Metanomics Health GmbH (21). Dabei wurde

das TAC- Modell (*Transaortic constriction*) verwendet (Abbildung 2 unter 1)). Es ist ein gut etabliertes Modell für eine Druckbelastung des Herzens mit daraus folgender linksventrikulärer Hypertrophie und resultierender Herzinsuffizienz (36). Dazu erfolgte bei Mäusen intraoperativ eine Konstriktion des Aortenbogens. Als Kontrolle dienten eine Gruppe genauso operierter Mäuse ohne Aortenkonstriktion (*Sham*) und eine Gruppe nicht operierter Mäuse. Nach zwei, vier und sechs Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und myokardiales Gewebe, Plasma, Skelettmuskel und Lebergewebe entnommen. Es erfolgte eine *multi-omics* Datenintegration von Metabolom und Transkriptom, um Zusammenhänge zwischen Genen und Metaboliten zu erkennen (Abbildung 2 unter 2).

Dazu wurden Metabolite der Expression ihrer entsprechenden Proteine zugeordnet basierend auf Protein-Assoziationen mithilfe der *Human Metabolom Database* (HMDB, www.hmdb.ca). Diese humanen Proteine wurden dann wiederum mithilfe von *HomoloGene* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>) Mausgenen zugeordnet.

Um zusammenhängende Regulierungen zu erkennen, wurden im Folgenden zwei Filter angewendet.

Filter 1_up: Signifikante Hochregulation der mRNA des Genes zu allen drei Zeitpunkten im TAC Modell im Vergleich zur *Sham* Kontrolle bei gleichzeitiger signifikanter Veränderung des zugehörigen Metaboliten. Dabei war irrelevant, ob eine Steigerung oder Verminderung des Metaboliten vorlag, solange die Veränderung zu allen drei Zeitpunkten gleichsinnig war.

Filter 1_down: Signifikante Herabregulation der mRNA des Genes zu allen drei Zeitpunkten im TAC Modell im Vergleich zur *Sham* Kontrolle bei gleichzeitiger signifikanter Veränderung des zugehörigen Metaboliten. Dabei war irrelevant, ob eine Steigerung oder Verminderung des Metaboliten vorlag, solange die Veränderung zu allen drei Zeitpunkten gleichsinnig war.

Unter anderem wurden durch diese Methode Zielstrukturen gefunden, von denen bereits bekannt ist, dass sie Einfluss auf Prozesse bei Herzinsuffizienz nehmen (z.B. SOAT1, NOX4 oder SLC22A5/OCTN2), was die Relevanz bzw. das Funktionieren der angewandten Methode bestätigt (37; 38; 21).

Die gefundenen Zielstrukturen wurden dann unter den Hypothesen „Reduktion des kardialen *Remodelings*“, „Reduktion der metabolischen Veränderung“, „Reduktion von myokardialen oxidativem Stress“ und „Reduktion von myokardialer Inflammation“ angelehnt an die Mechanismen bei Herzinsuffizienz (nach Abbildung 1) gegliedert: (Mit einem „*“ markiert ist die in vorliegender Arbeit untersuchte Zielstruktur. Einige der nicht markierten Zielstrukturen werden nun in anderen Untersuchungen parallel bearbeitet oder sollen noch bearbeitet werden.)

Reduktion des kardialen *Remodelings*

- ALDH18A1 (Aldehyde dehydrogenase 18 family member A1)
- LEPREL1, P3H2 (Prolyl 3-hydroxylase 2)
- LEPREL2/ P3H3 (Prolyl 3-hydroxylase 3)
- PLPBP/PROSC, (Pyridoxal phosphate binding protein)
- PPIB (Peptidylprolyl isomerase B)
- PRODH* (Proline dehydrogenase)

Reduktion der metabolischen Veränderung

- ABAT (4-aminobutyrat-aminotransferase)
- ACOT7 (Acyl-CoA thioesterase 7)
- ASNS (Asparagine synthetase (Glutamine-hydrolyzing))
- ATP1A2, (ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 2)
- CPT1B (Carnitine palmitoyltransferase 1B)
- SLC1A1 (Solute carrier family 1 member 1)
- SLC1A3 (Solute carrier family 1 member 3)
- SLC16A6, (Solute carrier family 16 member 1)
- SLC22A4/OCTN1 (Solute carrier family 22 member 4)
- SLC22A5/OCTN2 (Solute carrier family 22 member 5)

Reduktion von myokardialem oxidativem Stress

- CYB5R4 (Cytochrome b5 reductase 4)
- HMOX1 (Heme oxygenase 1)
- L2HGDH (L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase)
- NQO1, (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1)
- PPIA (Peptidylprolylisomerase A, Cyclophilin A)
- SRM (Spermidin synthase)

Reduktion von myokardialer Inflammation

- LBP (Lipopolysaccharide binding protein)
- Lyz (Lysozyme)
- SLCO2A1 (Solute carrier organic anion transporter family member 2A1)

Alternierende Hypothese:

- ASAHI (N-acylsphingosine amidohydrolase 1)
- ASS1 (Argininosuccinate synthase 1)
- NSMAF (Neutral sphingomyelinase activation associated factor)
- PTDSS1, (Phosphatidylserine synthase 1)
- SAMD8 (Sterile alpha motif domain containing 8)
- SQLE, (Squalene epoxidase)

Zur weiteren Bestätigung sollte zunächst die Regulation der verschiedenen Zielstrukturen in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Modellen zur Herzinsuffizienz untersucht werden.

Übergeordnetes Ziel ist es die verschiedenen identifizierten Zielstrukturen zunächst *in vitro* durch Überexpression oder Genesilencing weiter zu untersuchen (Abbildung 2 unter 5)). Dies ist u.a. Teil dieser Arbeit für die Zielstruktur PRODH. Um die Zielstrukturen weiter zu validieren sollen dann schließlich therapeutische Effekte vielversprechender Kandidatengene *in vivo* betrachtet werden (Abbildung 2 unter 7)).

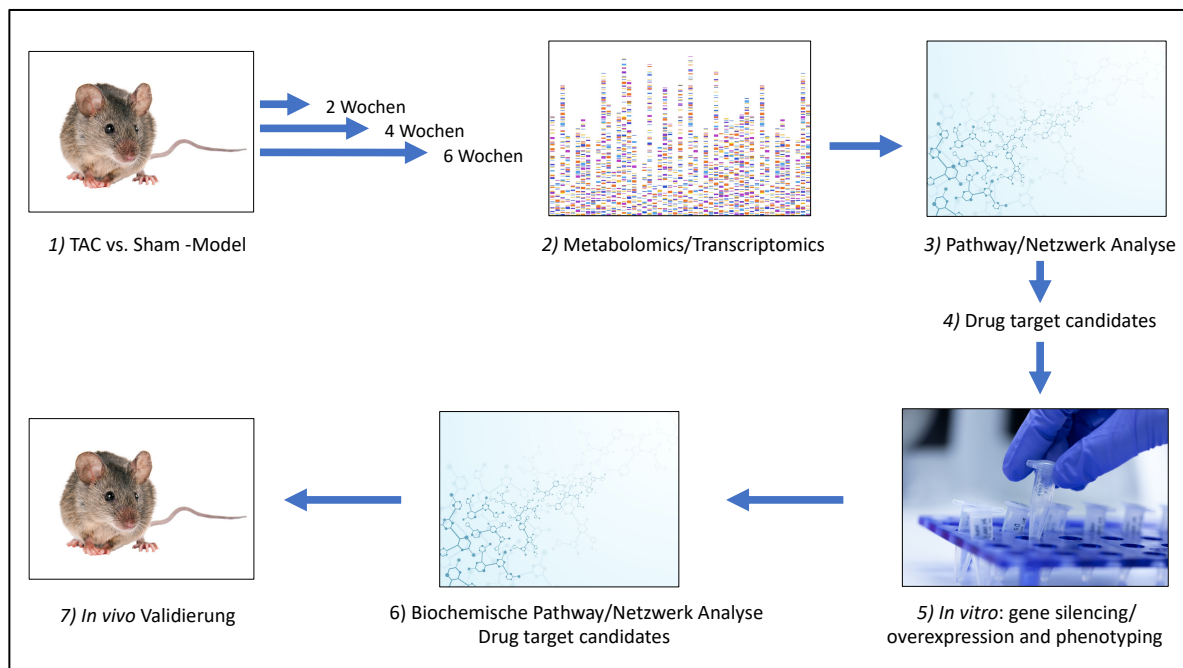


Abbildung 2 Vorgehen zur Identifizierung und Validierung neuer therapeutischer Zielstrukturen bei Herzinsuffizienz;

Die verwendeten Bilder wurden mit Standardlizenzen von AdobeStock erworben (Datei Nr. 301928778, 70254493, 176337479, 273173478).

Im Folgenden werden einige der vielversprechenderen Zielstrukturen vorgestellt, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurden:

1.3.1. Prolindehydrogenase (PRODH)

Von besonderem Interesse zeigte sich die Zielstruktur Prolindehydrogenase. Über die Rolle von PRODH in Kardiomyozyten ist bislang nur wenig bekannt und zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keine Publikation über PRODH in Herzzellen. Die meisten aktuellen Arbeiten stammen aus der Tumorforschung (39; 40). Außerdem besteht eine Assoziation von PRODH Varianten und neurologischen Erkrankungen (41; 42).

Prolindehydrogenase (PRODH) spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus von Prolin (Abbildung 3). Es ist das erste Enzym beim Abbau von Prolin. Es ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und katalysiert die Oxidation von Prolin zu P5C (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylsäure) (43; 44; 45). Dabei können Elektronen auf FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) übertragen werden, das die Elektronen auf die mitochondriale Elektronen-Transport-Kette weitergeben kann, um ATP zu produzieren. P5C kann gleichzeitig nichtenzymatisch zu Glutamatsemialdehyd (GSA) reagieren. Glutamatsemialdehyd kann in einem weiteren Schritt durch das Enzym Pyrrolin-5-Carboxylatdehydrogenase zu Glutamat abgebaut werden. Dabei werden Elektronen auf NAD^+ (Nicotinamidadenindinukleotid) übertragen. Das entstandene Glutamat kann über α -Ketoglutarat in den Citratzyklus aufgenommen werden und zur weiteren ATP-Produktion genutzt werden. Alle der genannten Schritte sind reversibel (43; 44; 45).

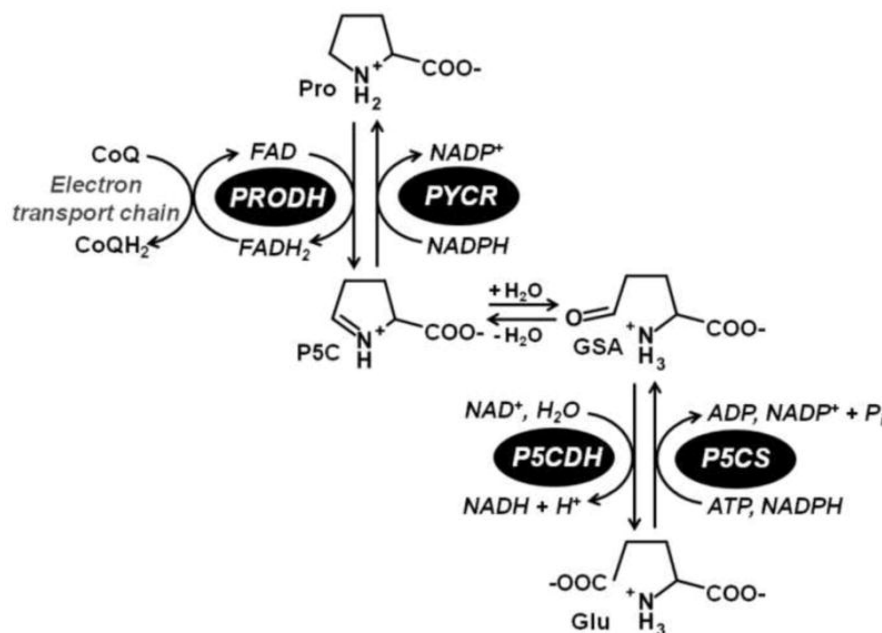


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Metabolismus von Prolin und Funktion von PRODH mit Erlaubnis des Elsevier Verlages übernommen aus Natarajan et al. 2012 (46)

Im Laufe der Arbeit zeigten weitere Publikationen, dass PRODH eine interessante Zielstruktur in der Pathogenese von Herzerkrankungen ist (47; 48).

1.3.2. NAD(P)H-Quinone-Reduktase-1 (NQO1)

NQO1 (NAD(P)H-Quinone-Reduktase-1) wurde 1958 durch Ernster und Navazio erstmals als DT-Diaphorase beschrieben (49).

Dieses ist ein zytoplasmatisches Enzym und katalysiert die Reduktion von Quinonen um zwei Elektronen in einem Schritt zu Hydroquinonen (50). So entstehen bei der Reaktion keine Semiquinonradikale.

Die entstandenen Hydroquinone haben ambivalente Effekte. Zum einen sind sie weniger toxisch als die Quinone, aus denen sie entstanden sind, zum anderen entstehen andere reaktive Sauerstoffspezies (51). Gleichzeitig spielt NQO1 eine weitere wichtige Rolle bei der Bekämpfung von reaktiver Sauerstoffspezies, indem es die antioxidative Form von α -Tocopherol (Vitamin E) generiert (52).

Aus der Tumorforschung ist eine Überexpression und Begünstigung maligner Prozesse in vielen Tumorarten bekannt (53). Die Überexpression von NQO1 könnte ein möglicher Mechanismus sein, wie maligne entartete Zellen ihrer erhöhten Last an reaktiver Sauerstoffspezies standhalten (54).

1.3.3. Prolyl-3-Hydroxylase-2 (P3H2/LEPREL1)

P3H2 (Prolyl-3-hydroxylase-2), auch bezeichnet als LEPREL1, wird vor allem im Golgiapparat und endoplasmatischem Retikulum exprimiert (55).

Es ist beteiligt an der posttranslationalen Modifikation von Kollagenen. Kollagene werden unter anderem durch Prolyl-4-Hydroxylasen, Prolyl-3-Hydroxylasen und Lysyl-Hydroxylasen co- und posttranslational hydroxyliert (56). Diese Enzyme gehören zu den 2-oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Die von ihnen katalysierten Modifikationen sind nötig, um spätere Quervernetzungen und Glykosylierungen zur Ausbildung der Makrostruktur des Kollagens zu ermöglichen. LEPREL1 gehört zu den Prolyl-3-Hydroxylasen.

Es wird angenommen, dass es eine besondere Rolle bei der Hydroxylierung von Kollagen IV einnimmt (56). Es wird daher vor allem in Geweben mit vielen Basalmembranen, in denen Kollagen IV vorhanden ist, exprimiert (56).

Insgesamt ist aber vergleichsweise wenig über die Funktion von LEPREL1 bekannt. Über die Rolle von LEPREL1 in Herzgewebe gibt es zurzeit keine Publikationen.

1.3.4. Phosphadidylserin-Synthase 1 (PTDSS1)

Phosphadidylserin spielt eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung von Zellmembranen. Es macht ca. 3-15% der Gesamtpospholipide aus (57).

Phosphadidylserin befindet sich zum Großteil in der inneren Schicht der Lipiddoppelschicht der Zellmembran (58). Dieses Verteilungsmuster wird aufrechterhalten durch ATP abhängige sogenannte „*Flippasen*“ (59; 60).

Bei verschiedenen Prozessen in Zellen kommt es zu einem Wechsel von Phosphadidylserin in den äußeren Layer der Lipiddoppelmembran, zum Beispiel bei der Apoptose. Dies hilft u.a. Makrophagen, apoptotische Zellen zu erkennen (61). Die Änderung des Verteilungsmusters wird dabei durch caspasenabhängige Abnahme der Aktivität der Flippasen verursacht (62). Die Umverteilung des Phosphadidylserin spielt auch eine wichtige Rolle in Thrombozyten bei der Blutgerinnung (63).

Die Biosynthese von Phosphadidylserin erfolgt durch die Phosphadidylserinsynthase 1 und 2. Sie sind vornehmlich in Mitochondrien assoziierten Membranen des ER lokalisiert (64).

Sie katalysieren die Synthese von Phosphadidylserin aus Phosphadidylcholin und Phosphadidylethanolamin. Dabei nutzt Phosphadidylserin-Synthase 1 Phosphadidylcholin und Phosphadidylethanolamin als Substrate, während die Phosphadidylsynthase 2 nur Phosphadidylethanolamin als Substrat nutzt (65). Es ist eine Inhibition der Phosphadidylsynthese durch negativen Feedbackmechanismus bei viel vorhandenem Phosphadidylserin bekannt (66).

PTDSS1 oder PTDSS2 defiziente Mäuse sind normal lebensfähig (67).

1.3.5. Solute Carrier Family 1 Member 1 und 3 (SLC1A1 und SLC1A3)

SLC1A1 (EAAT3, EAAC1), SLC1A3 (EAAT1, GLAST) gehören zu einer Familie an hochaffinen Glutamattransportern (68). Sie werden vor allem in neuronalen Zellen exprimiert und erfüllen dort die Aufgabe, den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat wieder aus dem synaptischen Spalt zu entfernen (68). Neben diesen Transportern gibt es noch weitere Mitglieder der hochaffinen Glutamat Transporter Familie. Dazu gehören SLC1A2 (EAAT2), SLC1A6 (EAAT4), SLC1A7 (EAAT5) (69).

Bei dem von den hochaffinen Glutamattransportern ermöglichtem Transport werden drei Natrium Ionen mit einem Proton mit jedem Glutamat Ion in die Zelle cotransportiert, während ein Kalium Ion in die gegensätzliche Richtung transportiert wird (70).

Mutationen in den entsprechenden Genen der Transporter sind oft mit neurologischen oder psychiatrischen Symptomen verbunden (71; 72; 73).

Die Glutamat-Transporter werden aber auch in anderen Organen als dem Gehirn exprimiert. Dort erfüllen diese Transporter oft metabolische Funktionen. So ist SLC1A1 an der Ausscheidung von Glutamat und Aspartat über die Niere beteiligt und kann bei Mutationen an der Auslösung von humaner Dicarbonsäure-Aminoacidurie beteiligt sein (74).

King et al zeigten 2004, dass die Expression von SLC1A1 in hypertrophen Herzen gegenüber gesunden deutlich erhöht ist. Außerdem zeigten sie, dass Aspartat Behandlung von hypertrophen Herzen eine größere Erhaltung von ATP, Glutamate und Glutamin und eine geringere Laktatproduktion nach Ischämie vorwiesen. Sie schlussfolgerten daraus, dass erhöhte Aspartattransporter-Expression und -Aktivität in hypertrophen Herzen eine erhöhte Aspartat-Aufnahme in Kardiomyozyten ermögliche und kardial protektiv wirke (75).

Außerdem wird angenommen, dass auch Glutamat zur ATP-Produktion unter hypoxischen Bedingungen beiträgt und EAATs dabei eine zentrale Rolle in Herzzellen spielen (76).

Andere Publikationen zeigen, dass SLC1A3 in Mitochondrien von Kardiomyozyten exprimiert wird und dort eine Rolle im Glutamat Metabolismus und für den Malat/Aspartat Shuttle spielt (77).

1.4.6. Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2A1 (SLCO2A1)

Entzündungsprozesse spielen bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine zentrale Rolle (Seite 2 in vorliegender Arbeit). Für die Biosynthese von Prostaglandinen wird Arachnoidonsäure zunächst durch Phospholipasen aus den Phospholipiden der Zellmembranen synthetisiert (78). Cyclooxygenasen (COX) bzw. PGH-Synthasen katalysieren die Reaktion zu Prostaglandin H₂ (79; 80). Prostaglandin H₂ kann durch weitere enzymatische Umbauschritte in die verschiedenen Prostaglandine (Prostaglandin D, Prostaglandin E, Prostaglandin F, Prostaglandin I) und Thromboxan A₂ umgewandelt werden (80; 81).

Die proinflammatorische Wirkung der Prostaglandine wird vor allem durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt (82). Um die Effekte der Prostaglandine zu beenden, ist deren Abbau nötig. Dieser Abbau in inaktive Metaboliten erfolgt intrazellulär durch die 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (15-PGDH) (83).

Da Prostaglandine Biomembranen bei physiologischem pH nicht überwinden können, ist sowohl für die Freisetzung von neu synthetisierten Prostaglandinen als auch für die Aufnahme

und anschließenden intrazellulären Abbau ein Prostaglandintransporter (PGT) notwendig (84; 85). Dieser Prostaglandintransporter wird durch das Gen *SLCO2A1* codiert (86).

Mutationen im *SLCO2A1* Gen sind u.a. bei chronischen Darmerkrankungen und bei hypertropher Osteoathropie gefunden worden (87; 88). Über die Rolle von *SLCO2A1* bei Herzerkrankungen ist zurzeit wenig bekannt.

1.4. Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) spielen heute eine wichtige Rolle für den gezielten Gentransfer in Zellen in der Grundlagenforschung, in klinischen Studien und bei bereits zur Patientenversorgung zugelassenen gentherapeutischen Medikamenten. Sie wurden ursprünglich in Adenoviruspräparationen entdeckt (89). Heute stellen sie nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* eine Möglichkeit für die spezifische Durchführung gentherapeutischer Ansätze dar. Sie ermöglichen eine relativ spezifische Infektion bestimmter Gewebe- bzw. Zelltypen. So führt eine systemische Injektion von AAV9 zu einer effektiven Infektion von Kardiomyozyten in Mäusen (90). Durch Nutzung von gewebspezifischen Promotoren lässt sich die Spezifität der Proteinexpression im gewünschten Gewebe weiter erhöhen. Gleichzeitig ist die Sicherheit einzelner AAVs zur Gentherapie einzelner Erkrankungen in klinischen Studien bestätigt worden und einige AAVs sind bereits in Europa zugelassen. So ist beispielsweise AAV2-hRPE65v2 (Voretigen neparvovec, Luxturna) zur Behandlung von erblicher Netzhautdystrophie durch RPE65-Mutation in Europa zugelassen (91; 92).

Daher stellen AAVs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein gutes Werkzeug zur Evaluation von möglichen therapeutischen Zielstrukturen auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar.

Dabei ist nicht nur die Transduktion von Kardiomyozyten, sondern auch die spezifische Transduktion von Fibroblasten interessant. Um dies zu ermöglichen, ist die Suche nach einem AAV nötig, der spezifisch und effizient kardiale Fibroblasten *in vitro* sowie *in vivo* transduziert.

1.5. Fragestellung der Arbeit:

Fragestellung dieser Arbeit war die Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen zur Behandlung der Herzinsuffizienz. Dazu sollte zunächst eine Validierung der Regulation der im Screen genannten Gene in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Herzinsuffizienzmodellen erfolgen, um dann eine potenzielle Zielstruktur auszuwählen und deren Effekte durch

Überexpression oder Genesilencing in NRVCs weiter zu untersuchen. Dazu wurde in dieser Arbeit PRODH ausgewählt.

Um für zukünftige Untersuchungen in Fibroblasten einen AAV-vermittelten Gentransfer vornehmen zu können, sollten in vorliegender Arbeit zudem im Labor vorhandene AAV-Varianten zur Transduktion von Fibroblasten charakterisiert werden.

2. Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung:

96 Well Black/clear Bottom Pit polymer Base
Black w/Lid Cell Culture Steril PS
Axiovert 40 C Mikroskop
BD FACS Canto II
Cell Scraper 16cm 2 position blade
Cellstar Zellkulturplatten 6,12 und 24 -well
Cellstar Zellkulturschalen 10cm Durchmesser
CFX96 Real Time PCR Detection Sytem
Chromatographie Papier
Cimarc Poly 15 Multipoint Rührer
CM3050 S Kryostat
CO₂-Inkubator BBD 6220
Coverslips 18mm diameter
Duomax 1030 Plattformschüttler
ECX-F26.M UV-trans illuminator
Elektroporationsküvette
Falcon™ Zellfilter 70µm Porengröße
Filterpapier 110mm
FluorChem Q MultiImage IIICamera
Galaxy MiniStar Microcentrifuge
Heraeus™ Brutschrank
Heraeus™ Fresco 21 Centrifuge
Heraeus™ Megafuge™ 40R Refrigerated Cetrifuge
Heraeus™ Pico 21 Centrifuge
Herasafe KS 15 Klasse II Sicherheitswerkbank
Horizon 11x14 Gel electrophoresis
Infinite M200Pro microplate reader
Laser scanning Microscope 800

Bezugsquelle:

Thermo Scientific
Fisher Scientific
ZEISS
Institut für Immunologie Kiel
Sarstedt
Greiner Bio One
Greiner Bio One
BioRAD
Whatman
Thermo Scientific
Leica Biosystems
Thermo Scientific
Karl Hecht KG
Heidolph
Peqlab
Peqlab
Thermo Scientific
Schleicher&Schuell
Alpha innotech
VWR
Thermo Scientific
Thermo Scientific
Thermo Scientific
Thermo Scientific
Thermo Scientific
Life Technologies
Tecan Life Sciences
Zeiss

MaxQ 8000 inkubierter Orbitalschüttler	Thermo Scientific
MicroPulser™ Electroporation	BioRad
Mikroskop BX 53	Olympus
Mini PROTEAN Tetra System	BioRad
Mr.Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop 2000 spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific
Neubauer-Zählkammer	Assistant
Nitrozellulose-Membran	Protran
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Parafilm	BEMIS
Pasteur Pipetten, Glas	ROTH
Petrischale 35x10 mm	Sarstedt
Pipetten Eppendorf-Reference	Eppendorf
Pipettenspitzen Biosphere Filtere Tip	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	BioRad
PP-Microplate 96 well	Greiner-Bio One
RCT Basic magnetic stirrer	IKA
Precellys 24 homogenizer	Peqlab
Precellys Zirconiumoxid-Beads 1,4 mm	Bertin Bioreagent
qRT-PCR plates, 96-well, multiply	Sarstedt
Quantum ST5 Geldokumentation	Vilber
RCT Basic Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5ml 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Röhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt
Roller Mixer SRT9	Stuart
S2020 1.8 Microbiological Safety Cabinet Class II	Thermo Scientific
Serologische Pipetten	Sarstedt
Seven Easy pH-meter	Mettler-Toledo
Steril-Cult 200 incubator	Labotect
Sterilfilter 0,2µm Porengröße	Nalgene Labware
SterilGARD Hood	The Baker Company
Subcell® Moel 192 Cell	BioRad
T100 Thermal Cycler	BioRad

TE1502S Präzisionswaage
 Thermal Personal Cycler
 Thermomixer Comfort
 Titan PCR-Arbeitsstation
 VacuSafe comfort Absaugsystem
 Vortex-Genie 2
 Wasserbad 3044
 Zellkulturflaschen 75cm², 175cm²
 Zentrifuge 5810

Sartorius
 Biometra
 Eppendorf
 ScanLaf
 Integra Biosciences
 Scientific Industries
 Köttermann
 Sarstedt
 Eppendorf

2.1.2. Chemikalien

2-Mercaptoethanol
 2YT-Medium
 Agarose
 Albumin Fraktion V, bovine
 Ammoniumperoxodisulfat (APS)
 Carbenicillin
 DAPI
 DEPC
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
 DMEM
 DNA Loading Dye 6x
 Colagen I – Solution, bovine skin
 EDTA
 Ethanol
 FCS Gold
 Fluor Safe Eindeckmedium
 Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder
 Glycin
 Glycerin
 HEPES
 Hefeextrakt

BioRad
 Carl Roth
 Biozym Scientific GmbH
 Merck KG
 Carl Roth
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 Carl Roth
 PAA Laboratories
 Fermentase
 BD Biosciences
 Serve Electrophoresis
 Carl Roth
 PAA Laboratories
 Merck KGaA
 Fermentas
 Carl Roth
 Carl Roth
 Carl Roth
 Carl Roth

iQ PowerMix Reagent, multiplex qRT	BioRad
Isopropanol	Carl Roth
Kanamycin	Sigma Aldrich
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth
L-Glutamin	Invitrogen
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
Natriumdeoxycholat	Carl Roth
NCS (Newborn Calf Serum)	PAA Laboratories
Page Ruler Plus prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd	Carl Roth
PBS	Invitrogen/GIBCO
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/GIBCO
PeqGREEN	PEQLAB - Life Science
Phenol/Chlorophorm/Isomylalkohol	Carl Roth
Phenylephrine	Sigma Aldrich
Protein-Assay dye-concentrate (Bradford)	BioRad
Phenylephrine	Sigma-Aldrich
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
SDS	Serva-Electrophoresis
TEMED 99% p,.a. Electrophoresis	ROTH
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Science Services
Tris-Base	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Tris Natriumcitrat	Carl Roth
Trypan Blau	Sigma-Aldrich
Triton X 100	Serva Electrophoresis
TRIzol® Reagenz	Invitrogen
Trypsin/EDTA Solution	Merck KGaA
Trypton	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vectashield HardSet Mounting Medium	Vecta-Labs

2.1.3. Puffer und Lösungen

2YT-Medium

3,1 % (w/v) 2xYT-Medium in dest. H₂O

ADS Puffer

1,16 mM NaCl

197 mM HEPES

94 mM NaH₂PO₄·H₂O

55.5 mM Glucose

53,6 mM KCl

8,3 mM Mg SO₄, pH=7,4, sterile Filtration

Laemmli Puffer (4 fach)

250 mM Tris pH 6,8

5% (w/v) SDS

40% (v/v) Glycerin

0,005% /w/v) Bromophenolblau

10% (v/v) 2 Mercaptoethanol

Laufpuffer, SDS PAGE (10 fach)

250 mM Tris

1,9 M Glycin

1% (w/v) SDS

Milch-Lösung (5%)

5% (w/v) Milchpulver in TBST

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na₂HPO₄

1,47 mM KH₂PO₄ (pH=7,4)

PFA Lösung (4%)

4% (w/v) PFA in PBS

RIPA Lysis Puffer

50 mM Tris-HCL
pH 7,5 titriert mit 1M NaOH
150 mM NaCl
0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat
1% (v/v) NP-40
0,2% (w/v) SDS

Direkt vor dem Ernten werden zu 1 ml Lysis Puffer folgende Inhibitoren hinzugegeben:

40 µl 25fach Proteinase-Inhibitor-Cocktail
10 µl Phosphatase-Inhibitor 2
10 µl Phosphatase-Inhibitor 3
1 µl 1 M DTT

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris -HCl pH 6,8

TAE Puffer (50-fach konzentriert)

3 M Tris-Acetat
0,05 M EDTA, pH 8,3

TBST

100mM Tris-HCL, pH=7,7
0,9 % (w/v) NaCl
0,4% (v/v) Tween 20

Transferpuffer

20 % (v/v) Methanol
25 mM Tris

192 mM Glycine
0,0037% (w/v) SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris, pH=8,8

Trypsin-EDTA Lösung (in PBS)

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

2.1.4. Medien

DMEM +++

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

DMEM ++-

DMEM Medium mit 4,5g/l Glucose und 110mg/l Natriumpyruvat
100 µg/ml Penicillin G
100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin

LB-Medium (Luria-Bertani)

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

2.1.5. Enzyme

ACC65I	Thermo Scientific
BamHI	Thermo Scientific
Complete Proteinase Inhibitor Cocktail	Roch Dianostics

Desoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich
Dream Taq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
PhosphataseInhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
Proteinase K	Invitrogen
SmaI	Thermo Scientific
Sall	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase (1U/μl)	Invitrogen
Trypsin-EDTA-Lösung 0,25% (w/v)	Invitrogen/GIBCO

2.1.6. Primäre Antikörper

Tabelle 1: verwendete primäre Antikörper

Name	Spezies (Ursprung)	Klonalität	Verdünnung	Katalognummer	Bezugsquelle
α -Actinin 2	Maus	Mono	1:200 (IH)	A7811	Sigma
α -Tubulin	Maus	Mono	1:8000 (WB)	T5168	Sigma
GAPDH	Maus	Mono	1:20000	G8795	Sigma
Anti-GFP-AF555	Kaninchen	Poly	1:400 (IH)	A31851	invitrogen
PRODH	Kaninchen	Poly	1:1000 (WB) 1:400 (IH)	PA5-72540	invitrogen

2.1.7. Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: verwendete sekundäre Antikörper

Name	Spezies (Ursprung)	Klonalität	Verdünnung	Katalognummer	Bezugsquelle
Anti-mouse IgG, AF 546	Esel	Poly	1:500 (IH) 1:1000 (WB)	A10036	invitrogen
Anti-mouse IgG, AF 647	Huhn	Poly	1:300 (IH)	A180677	invitrogen

Anti-mouse, HRP	Esel	Poly	1:20000 (WB)	715-035-150	Dianova
Anti-rabbit, AF 488	Huhn	Poly	1:400 (IH)	A21441	invitrogen
Anti-rabbit IgG, AF 546	Esel	Poly	1:400 (IH)	A10040	invitrogen
Anti-rabbit IgG, AF 647	Huhn	Poly	1:300 (IH)	A21443	invitrogen
Anti-rabbit IgG, HRP	Esel	Poly	1:10.000	711-035-152	Dianova

2.1.8. Primer

Primer für die Klonierung des Prodh Vektorplamids

MmProdh_Acc65I_F

GAGAGGTACCGTCGACATGCATGCCACCATGGCTCTCAAGCGCG TCTTC

MmProdh-BamHI-R

GAGAGGATCCTGCAGGACCG GTCTAGGCCGGATGGTGGGAAG

RnProdh-Acc65I-F2:

GAGAGGTACCGTCGACATGCATGCCACCATGGCTCTGAAGCG GGTC

Primer I Col_MmProdh_F

CTACATATGAAGCCACCAATGC (ebenfalls für Ratte passend)

seq_bGlobIgG_F

GACTCTTGCGTTTCTGATAGG

seq_MmProdh_F

CATGGAGAACTTACTGCAGTG (ebenfalls für Ratte passend)

seq_SV40polyA_R

TTTCACTGCATTCTAGTTGTGG

qPCR Primer

Name des Primers mit Sequenz

für folgende Spezies

M_Acot7_F1 AAAGCTTGGACATTGCGTC

Maus

M_Acot7_R1 TCCCCATTCTGGCTGTTAC

Maus

Rat_Acot7_F2 GAACCAGAGCAGTTCATCACAAG

Ratte

Rat_Acot7_R2 TCTTTAGAATGGTCCCTCCGTG	Ratte
Rat/M_Aldh18a1_F2 TCAATCATCTGGCTGACCTG	Maus und Ratte
Rat_Aldh18a1_R2 GCTGTTCAGTTTAGACGTGG	Ratte
M_Aldh18a1_R2 CTACGCTCTCTTGTGAGGAG	Maus
Rat/M_Asah1_F2 TTTGGAGAGGAAATGAGGGG	Maus und Ratte
Rat/M_Asah1_R2 CACCCAAGAAATATTCCAAAATCC	Maus und Ratte
M_Asns_F1 GTTTCTGGCTGTGTGTTTCAG	Maus
M_Asns_R1 TTTGACCATTTCCACAGACG	Maus
R_Asns_F1 TACGACAGTTCGAGCATCTG	Ratte
R_Asns_R1 TAGCCCTGTGTAAGCTCATC	Ratte
Rat/M_Ass1_F2 CAGGGACCATCCTTTACCAC	Maus und Ratte
Rat/M_Ass1_R2 GTGGCGAACAAATTCACATTC	Maus und Ratte
Rat/M_Atp1a2_F2 ACTTTCCCACAGAGAAGCTC	Maus
Rat/M_Atp1a2_R2 TCTGATATGATGCCCACACC	Maus
R_Atp2a1_F1 GGCGCTGAAGGAATATGAAC	Ratte
R_Atp2a1_R1 GGAGAGGATTCGGATGTCTG	Ratte
Rat/MCyb5r4_F1 CCAGGATGACTCCTTGAGAG	Maus und Ratte
M_Cyb5r4_R1 GTGATCACCAAGACATTGCC	Maus
Rat_Cyb5r4_R1GGGATCACCAAGACATTTCC	Ratte
Rat/M_Hmox1_F1 GACAGAAGAGGCTAAGACCG	Maus
M_Hmox1_R1 ATGAGCTAGTGCTGATCTGG	Maus
Rat_Hmox1_F2 CACAGACAGAGTTTCTTCGC	Ratte
Rat_Hmox1_R2 CATAAATTCCCCTGCCCACG	Ratte
Rat/M_Lpb_F1 CTGATCGAATCCAAAGTCGG	Maus und Ratte
M_Lpb_R1 AGGTCGTGGAGCTGAATATG	Maus
Rat_Lpb_R1 TCTTGTGGATCTGGAAGTCG	Ratte
Rat/M_Nqo1_F1 GGACATGAACGTCATTCTCTG	Maus und Ratte
Rat/_Nqo1_R1 TGGAGCAAAGTAGAGTGGTG	Ratte
M_Nqo1_R1 TGGAGCAAAATAGAGTGGGG	Maus
M_Nsmaf_F4 ACAGGGATAGCAGTGTCTTG	Maus
M_Nsmaf_R4 CGGCAACAGTAAACAAGAGG	Maus
Rat/M_Nsmaf_F2 ACAGCTATCTTGCAGTCACG	Ratte
Rat_Nsmaf_R2 CGTCATCATCTCTGCTTTGC	Ratte
M_P3h2_F2 GTGGTCTTTACGAGGCAATC	Maus

M_P3h2_R2	ACTGGAGGTAGTCGTAATGC	Maus
Rat_P3h2_F2	CAATGAAGATATGGTGTGCCG	Ratte
Rat_P3h2_R2	AGTTCTCGATTGGTGAGAGG	Ratte
Rat/M_P3h3_F1	GCTCTGAACCAGTACCAAAC	Maus und Ratte
Rat/M_P3h3_R1	GGTCCAAGAATCCGGGTC	Maus und Ratte
M_Plbp_F1	GCATCAAACCCTAAGATTCTGTC	Maus
M_Plbp_R1	ACGGTTTCCAGCATAGAGAG	Maus
Rat_Plbp_F1	AACGACTGAAGGTGATGGTG	Ratte
Rat_Plbp_R1	GGACAGCAACCTCTGGAAG	Ratte
Rat/M_Ppib_F1	GCCAACGATAAGAAGAAGGG	Maus und Ratte
Rat/M_Ppib_R1	GATGACACGATGGAAGTTGC	Maus und Ratte
Rat/M_Prodh1_F	TAACATATGTTCTGGAGGAGCTG	Maus
M_Prodh1_R	GCTGATTTGGTCACACATCC	Maus
Rat_Prodh_F3	GCCTTTGGTGTGGCTTTATC	Ratte
Rat_Prodh_R3	TCTCCCTCTTATTTGCTCCAC	Ratte
Rat/M_Ptdss1_F1	CTTCGAGCAGGTAAATCCC	Maus und Ratte
Rat/M_Ptdss1_R1	ACTAACGATTCTCTCCCAGG	Maus und Ratte
Rat/M_Samd8_F1	TGCGAAGGCTCTGTAGTCTG	Maus
M_Samd8_R1	GAGTCATTCCAAAGCCGCTC	Maus
Rat/M_Samd8_F2	TCGCTGCTTTACCATGTTTG	Ratte
Rat_Samd8_R2	GCCACTGAACATGTAATCCC	Ratte
Rat_Smr_F2	TCCAGTGCGAGATCGATGAG	Ratte
Rat_Smr_R2	GTGGAGAGTCAGCTTTGAGC	Ratte
M_Smr_F2	GGTCCAGTGCGAGATTGATG	Maus
M_Smr_R2	TGACGTCAAAGGCATCTTGG	Maus
Rat/M_Slc1a1_F1	TTTCTCCACCACCGTCATTG	Maus und Ratte
M_Slc1a1_R1	GTCTGTGATGTCATTCACTTTC	Maus
Rat_Slc1a1_R1	GCCTGTCCTGTTGATTTTCATTC	Ratte
Rat/M_Slc1a3_F2	GACATCACACTCATCATTGCAG	Maus
Rat/M_Slc1a3_R2	CGGTTCTTCAGTTCATGTGC	Maus
Rat/M_Slc1a3_F1	CGTGATCGGAAACATGAAGG	Ratte
Rat/M_Slc1a3_R1	ATCAAGAAGAGGATGCCAG	Ratte
Rat/M_Slc22a4_F1	AGACTGGATTCAGCTTCGTG	Maus und Ratte
Rat/M_Slc22a4_R1	AACCGACTTGCTCAGGATTTC	Maus und Ratte

Rat/M_Slco2a1_F1 TCCTCAACAAGTTCCTGGAG	Maus und Ratte
Rat/M_Slco2a1_R1 TGCAGAGGGAAAACAAAACG	Maus und Ratte

2.1.9. Kits

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
DC-Protein Assay Kit	BioRad
In situ Cell Death detection Kit Fluorescein	Roche
LunaScript™ RT SuperMix Kit	New England Biolabs GmbH
MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, live-cell imaging	Invitrogen
MitoTracker™ Red CMXRos	Invitrogen
NucleoSpin Plasmid Kit	Machery-Nagel
Qiagen PLUS Plasmid midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick-RNA Microprep Kit	Zymo Research
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix	Invitrogen

2.1.10. Plasmide

Vektor pSSV9-Tnt-MmLamp2(tv1)a (durch das Labor zur Verfügung gestellt)

2.1.11. Virale Vektoren

AAV6-ssTnT-Prodh
AAV6-ssTnT-Luc
AAV1-EGFP
AAV2-EGFP
AAV3-EGFP
AAV5-EGFP
AAV8-EGFP
AAV9-EYFP
AAV5-NEARSSS-EYFP
AAV5-NATQPWG-EYFP
AAV5-NGTPPTE-EYFP
AAV5-NGARSSS-EYFP

AAV5-NALPPRS-EYFP
AAV5-ANSVRGS-EYFP
AAV9-NTVRSVGCCP-EYFP
AAV9-NRTASSQ-EYFP
AAV9-DSRVDRR-EYFP
AAV9-NSTSRSG-EYFP
AAV9-NY3RPST-EYFP
AAV9-NSSRSVSCCP-EYFP
AAV9-NSVRNFG-EYFP
AAV9-SLRSPPS-EYFP (=AAV9-SLR)

2.1.12. Bakterien

- E. coli DH5 α

2.1.13. Bereits vorhanden Proben aus vergangenen Tierexperimenten

- delEx50 (C57BL/6delEx50) (93) (nach Injektion von AAV9-SLR oder PBS)
- Wistar Ratten (Wistar Albino outbred rat Tyr^c/Tyr^c)
- TG-Calcineurin (Tg(Myh6-Ppp3ca)37Eno) (29)
- TG-Dyrk1a (C57BL/6-MHCD1A-671.1) (94)

2.1.14. Software

- GraphPad Prism 6.01
- ImageJ FIJI
- Zen 2.3
- BD FACSDiva 8.0.1
- Adobe Photoshop CS6
- Microsoft Office Version 16.62

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Vorbereitung der Agarplatten

Zur Vorbereitung von Agarplatten wurde LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar in ddH₂O gelöst. Das entstandene Gemisch wurde autoklaviert und auf ca. 55°C im Wasserbad abgekühlt. Erst dann wurde das gewünschte Antibiotikum zugegeben. Die Lösung wurde daraufhin in 10 cm Petrischalen ausgegossen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie bei 4°C getrocknet.

Als Antibiotikum wurde je nach Bedarf Carbenicillin in einer Konzentration von 100µg/ml, Kanamycin in einer Konzentration von 50µg/ml oder Spectinomycin in einer Konzentration von 50µg/ml verwendet.

2.2.2. Herstellung elektronenkompetenter E.coli DH5α

Zur Herstellung elektronenkompetenter Bakterien wurden E.coli DH5α Stämme verwendet. Dazu wurde zunächst über Nacht 50 ml 2YT-Medium mit DH5α-Zellen bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1L 2YT-Medium mit 10 ml Übernachtskultur angeimpft. Kontrolle des Wachstums erfolgte mittels optischer Dichte Messung durch ein Photometer bei 600 nm. Anfangs sollte die Dichte bei ca. 0,1 liegen. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C und 200 rpm. Sobald eine optische Dichte von 0,4 bis 0,8 erreicht war, wurde die Bakterienkultur 10 Minuten im Eiswasserbad abgekühlt. Danach wurde bei 4000 rpm bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene *Pellet* wurde zwei Mal mit eiskaltem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die *Pellets* in 20 ml 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und in 50 ml Röhrchen zusammengeführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4000 rpm bei 4°C für 15 Minuten wurde in 1,5ml 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, jeweils 50µl in 200µl Reagiergefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3. Transformation

Für die Transformation von E. coli DH5α wurden die zuvor hergestellten 50 µl Aliquots auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 ng der gewünschten Plasmid-DNA in das Aliquot gegeben. Die Mischung erfolgte durch Auf- und Abpipettieren. Daraufhin wurde das Gemisch in eine auf -20°C vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2 kV, 200 Ω, 25 µF. 1 ml LB-Medium wurde den elektroporierten Bakterien zugegeben und

die Bakterien wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 700 rpm für eine Stunde.

Zur Selektion der Bakterien, die tatsächlich transformiert worden waren, erfolgte nun ein Ausstrich der Bakterien auf einer LB-Agarplatte, die ein entsprechendes Antibiotikum enthält. Dazu wurden sterile Glaskugeln verwendet. Die Agarplatten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4. Bakterienkultur in Flüssigmedium

Zum Ansetzen einer Bakterienkultur in Flüssigmedium wurde zunächst das zu verwendende LB-Medium mit dem abhängig vom Resistenzgen des Plasmids gewählten Antibiotikum versetzt. Das Medium wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft, die zuvor auf der Agarplatte gewachsen war. Dazu wurde eine Pipettenspitze genutzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht unter horizontalem Schütteln bei 200 rpm.

2.2.5. Plasmid DNA-Extraktion, Mini Prep

Zur Extraktion von Plasmid DNA aus kleinen E.coli DH5 α Kulturen wurde das NucleoSpin Mini Preparation-Kit (Machery-Nagel) verwendet. Alle folgenden Zentrifugationen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 11.000 g und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Dazu wurden zunächst 2 ml von jeder Kultur entnommen und eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, es wurden erneut je 2 ml der entsprechenden Kultur zum Bakterienpallet gegeben und erneut für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das *Pallet* in 260 μ l A1 Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 260 μ l A2 Puffer hinzugegeben und durch achtfaches Invertieren gemischt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 320 μ l A3 Puffer hinzugegeben und wieder durch achtfaches Invertieren gemischt. Es folgte Zentrifugation für 5 Minuten. Anschließend wurden 550 μ l des Überstandes auf die bereitgestellten Säulen gegeben und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der restliche Überstand auf die Säulen gegeben und erneut für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Dann wurde 500 μ l des bei 50°C vorgewärmten AW Puffers auf die Säulen gegeben und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 610 μ l A4 Puffer auf die Säulen gegeben. Es wurde erneut für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säulen ohne Puffer erneut für zwei Minuten zentrifugiert. Die Säulen wurden in neue 1,5 ml Reagiergefäße platziert und 50 μ l auf 70°C vorgewärmter AE Puffer auf

die Säulen gegeben. Es wurde für eine Minute inkubiert. Dann wurde eine Minute zentrifugiert, um die DNA-Plasmide aus der Säule zu eluieren. Die Plasmide wurden daraufhin auf Eis gelagert.

2.2.6. Midi Prep

Wenn größere Mengen Plasmid aus größeren Mengen Flüssigmedium extrahiert werden sollten, wurde das Plasmid Plus Midi Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die Verwendung erfolgte unter Beachtung der Betriebsanweisung des Herstellers. Es wurden die mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet.

Dafür wurde die Bakteriensuspension über Nacht hochgezogen. Dann wurde sie zunächst bei 4700 g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das *Pellet* wurde in 2 ml Puffer P1 (enthält RNase A) resuspendiert. Es wurde die gleiche Menge Puffer P2 hinzugegeben und durch invertieren gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde in gleicher Menge Puffer S3 zugegeben und das Lysat in ein QIAfilter *Cartidge* gegeben, das zuvor auf einem 50 ml Falcon platziert worden ist. Es wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde mit einem Stempel das Lysat durch die *Cartidge* gedrückt und im *Tube* aufgefangen. Dann wurden 2 ml BB Puffer zugegeben und durch invertieren gemischt. Das Lysat wurde in den *Tube Extender* auf dem QIAcac 24 plus gegeben und durch ca. 300 mbar durch die Säule gesaugt. Im Anschluss wurde mit 700 µl ETR gewaschen, indem es auf die Säule gegeben und mittels Vakuum abgesaugt wurde. Es wurden 700 µl PE hinzugegeben, das erneut durch das Vakuum abgesaugt wurde. Des Weiteren wurde die Säule zusätzlich bei 10.000 g für eine Minute zentrifugiert, um den Puffer zu entfernen. Daraufhin wurde die Säule in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß platziert und 200µl EB auf die Säule gegeben. Die Säule wurde so eine Minute stehen gelassen und anschließend für eine Minute zum Eluieren abzentrifugiert.

2.3. Zellkultur

2.3.1.NRVCMs

2.3.1.1. NRVCM Präparation

Im Folgenden wird die Gewinnung von NRVCMs (*Neonatal rat ventricular cardiac myocytes*) beschrieben. Wistar-Ratten im Alter von 1-3 Tagen wurden zunächst kurz in 75% Ethanol getaucht. Daraufhin wurden sie mit einer Schere dekapiert. Anschließend wurde durch einen

Schnitt mit der Schere entlang der linken Seite des Sternums der Brustkorb der Ratte eröffnet. Nach leichtem Spreizen mit der Schere und unter leichter Kompression des Abdomens wurde das Herz sichtbar und mithilfe der Schere in eine auf Eis gelagerte Petrischale mit ADS Puffer überführt. Die großen Gefäße, Vorhöfe und Reste der Lungen wurden entfernt. Die Ventrikel hingegen wurden in neuen ADS Puffer umgelagert. Danach wurden die Ventrikel mit einer Schere möglichst fein zerkleinert und in eine Verdauungslösung transferiert. Dabei wurde pro Herz 1 ml Verdauungslösung verwendet und so in 75 cm² Flaschen überführt, dass Gewebe von ca. 30 Herzen pro Flasche vorhanden war. Daraufhin erfolgte eine zwanzigminütige Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad.

Nachdem sich das Gewebe am Boden abgesetzt hatte, wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Danach erfolgte eine Wiederholung des Verdauungsschrittes mit neuer Verdauungslösung unter gleichen Bedingungen.

Um eine Lösung einzelner Zellen aus dem Gewebe zu erreichen, wurde ca. 40 Mal auf und ab pipettiert. Nach erneutem Absetzen des vorhandenen Gewebes am Flaschenboden wurde der Überstand durch einen Sterilfilter in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und 10 ml NCS (*Newborn Calf Serum*) in das Reaktionsgefäß hinzugegeben.

Es folgten weitere Verdauungsschritte bis zur vollständigen Verdauung des Gewebes. Gleichzeitig werden die 50 ml Reaktionsgefäße für fünf Minuten mit 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und das entstehende *Pellet* in je 10 ml NCS gelöst, mit den Suspensionen aus den anderen 50 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und zwischen den einzelnen Verdauungsschritten im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Die gesammelten Zellsuspensionen wurden erneut mit 1000 rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann in ADS-Puffer resuspendiert.

Jetzt bestand diese Zellsuspension aus verschiedenen Zelltypen, u.a. Fibroblasten, Erythrozyten und Kardiomyozyten. Die weitere Trennung der Zellen erfolgte anhand der Dichte mithilfe eines Percoll Gradienten. Dieser setzt sich aus *Top-Layer* (geringere Dichte) und einem Bottom Layer (höhere Dichte) zusammen. Diese werden mithilfe einer Stock Lösung hergestellt, die aus Percoll und zehnfach ADS Puffer besteht. Der *Top-Layer* wurde mit Phenolrot gefärbt, um eine bessere Unterscheidung der Phasen zu gewährleisten. Die Vorbereitung der *Layer* fand nach folgendem Schema statt:

Die Anzahl der nötigen Gradienten wurde nach folgender Formel berechnet:

Anzahl der präparierten Herzen/ 7 = Anzahl der Gradienten

Stock Solution:

4 Gradienten: 27 ml Percoll und 3 ml 10X ADS

6 Gradienten: 36 ml Percoll und 4 ml 10X ADS

8 Gradienten: 45 ml Percoll und 5 ml 10X ADS

Top-Layer (40,5%):

4 Gradienten: 9 ml Stock Solution und 11 ml 1xADS+Phenolrot

6 Gradienten: 13,5 ml Stock Solution und 16,5 ml 1xADS+Phenolrot

8 Gradienten: 18 ml Stock Solution und 122 ml 1xADS+Phenolrot

Bottom-Layer (58,5%):

4 Gradienten: 13 ml Stock Solution und 7 ml 1xADS farblos

4 Gradienten: 19,5 ml Stock Solution und 10,5 ml 1xADS farblos

4 Gradienten: 26 ml Stock Solution und 14 ml 1xADS farblos

Zunächst wurden 4 ml des *Top-Layers* in ein 15 ml Reagiergefäß pipettiert und daraufhin 3 ml des *Bottom-Layers* direkt auf den Boden des 15 ml Reagiergefäßes pipettiert.

Nachdem auf den Gradienten 2 ml der Zellsuspension gegeben worden waren, wurde für 30 Minuten bei 2400 rpm bei 4°C zentrifugiert. Dadurch entstanden folgenden Phasen (von oben nach unten)

- ADS
- Interphase mit Fibroblasten
- Roter ursprünglicher *Top-Layer*
- Interphase mit Kardiomyozyten
- Ursprünglicher *Bottom-Layer*
- Erythrozyten *Pallet*

Je fünf bis sechs Kardiomyozyteninterphasen wurden aus den jeweiligen Gradienten entnommen und zusammen in ein 50 ml Reagiergefäß transferiert. Diese wurde mit ADS Puffer auf 50 ml aufgefüllt und dann bei 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die entstandenen *Pallets* wurden erneut in ADS resuspendiert, gesammelt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Das *Pallet* wurde daraufhin in 10 ml DMEM +++ Medium gelöst.

Die Bestimmung der Konzentration der Zellsuspension erfolgte mithilfe der Methode nach Neubauer. Dafür wurden 150 µl der Zellsuspension mit 150 µl Trypan Blau gemischt. Dadurch erfolgte eine Anfärbung der toten Zellen. Ca. 10 µl davon wurden in eine Neubauer Zählkammer überführt und alle lebenden Zellen gezählt.

Nun konnten die Zellen in gewünschter Anzahl in vorgewärmtem DMEM +++ Medium auf die zuvor kollagenisierten Platten gegeben werden.

Dabei wurden für die Experimente folgende Zellzahlen pro Platte verwendet (Tabelle 3):

Tabelle 3: verwendete Zellkulturplatten für Experimente mit NRVCs

Verwendungszweck	Anzahl Wells pro Platte	Anzahl Zellen pro Well
RNA-Isolation	6-Well-Platte	1.000.000 in 2ml Medium
Protein-Isolation	6-Well-Platte	750.000 in 2ml Medium
Immunhistochemie	12- Well-Platte	180.000 in 1ml Medium

2.3.1.2. Kollagenisierung von Zellkulturplatten

Um das Anwachsen der Kardiomyozyten auf den Platten sicherzustellen, wurden diese einen Tag vor der Kardiomyozytenpräparation kollagenisiert. Dies erfolgte mit bovinem Kollagen Typ 1. Die Kollagenlösung (3,0 mg/µl) wurde mit 0,01 M HCl Lösung auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt.

Die Platten wurden über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgenommen und die Platten zwei Mal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Daraufhin wurden sie luftgetrocknet und anschließend bei nicht sofortiger Benutzung bis zu einer Woche bei 4°C gelagert.

2.3.1.3. Transduktion von NRVCs durch AAV6

Um eine Überexpression von PROD1 in den NRVCs zu erreichen, wurden in dieser Arbeit Adeno-assoziierte Viren genutzt (AAVs).

24 Stunden nach Aussaat der NRVCs erfolgte die Transduktion der NRVCs durch AAV6-ssTnT-Prod1 und als Kontrollvirus durch AAV6-ssTnT-Luc. Dieser wird verwendet, um Unterschiede beispielsweise durch den Infektionsprozess in den Zellen auszuschließen.

Dafür wurden die AAVs in vorgewärmtem DMEM ++- Medium in Suspension gebracht. Die Menge der Virussuspension wurde so gewählt, dass sich pro Zelle eine Viruszahl von 1×10^5 Virusgenomen (1×10^5 vg/cell) ergab.

Es wurde das alte DMEM +++ Medium entnommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um eventuelle Reste von Medium und apoptotische Zellen zu entfernen. Dann wurde das neue DMEM ++- Medium mit den AAVs zugegeben.

Bei Versuchen ohne Virustransduktion wurde lediglich das Medium nach einmaligem Waschen mit PBS zu DMEM ++- Medium gewechselt.

2.3.1.4. Stimulation der NRVCs mit Phenylephrin oder Endothelin-1

Zur Induktion von Hypertrophie der NRVCs wurde Phenylephrin (PE) eingesetzt. Es besitzt eine agonistische Wirkung am α 1-Adrenorezeptor. 24 h nach Transduktion der NRVCs erfolgte die Stimulation der NRVCs durch PE, indem zunächst das alte Medium abgenommen und dann durch frisches vorgewärmtes DMEM ++- Medium mit 100 μ M PE ersetzt wurde.

Als eine weitere Methode der Induktion von Hypertrophie wurde die Stimulation durch Endothelin-1 genutzt. Endothelin-1 bindet an Endothelinrezeptoren.

Genau wie die PE-Stimulation fand die Endothelin-1-Stimulation 24h nach der Transduktion der NRVCs statt. Dazu wurde das vorhandene Medium durch frisches vorgewärmtes DMEM ++- Medium mit 0,2 μ M Endothelin-1 ersetzt.

2.3.2. Kardiale Fibroblasten

2.3.2.1. Kultivierung von kardialen Fibroblasten

Zur Isolation von kardialen Fibroblasten wurde nach Organentnahme der linke Ventrikel zunächst mit eiskaltem PBS gespült. Danach wurde das Herz in PBS auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Herz in kleine Gewebestücke geschnitten, um diese dann in einer Enzymlösung aus Kollagenase I (40 μ g/mL) und DNase I (60 μ g/mL) in Serum-freien DMEM. Es erfolgte eine Inkubation für 45 Minuten unter kontinuierlichem Schütteln. Danach wurde bei 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das *Pellet* wurde in DMEM +++ Medium wieder aufgenommen und die Zellen in 75cm² Flaschen in 12 ml DMEM +++ Medium ausgesät (ein Herz pro 75cm²-Flasche). Nach 2 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel zur Entfernung nicht adhärent wachsender Zellen.

Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel alle 3-4 Tage. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zum Passagieren der adhärent wachsenden Fibroblasten wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden 3 ml Trypsin-EDTA

Lösung in die Flasche gegeben und für ca. 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle des Ablösens einzelner Zellen vom Flaschenboden wurden zum Stopp der Trypsinisierung 10 ml FCS haltiges DMEM +++ Medium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das *Zellpallet* in der nötigen Menge vorgewärmten DMEM +++ Medium resuspendiert, um in neuen 75cm² Flaschen ausgesät zu werden. Alternativ folgte zunächst eine Bestimmung der Konzentration der Zellsuspension durch die Methode nach Neubauer, um die Zellen im Folgenden für Versuche auf Zellkulturplatten auszusähen. Dabei wurden die Zellzahlen nach Tabelle 4 verwendet. Sollten Fibroblasten dabei auf *Coverslips* anwachsen, so wurden diese zuvor kollagenisiert. Die für die Experimente verwendeten Zellen stammten aus den Passagen 3-8.

Tabelle 4: verwendete Zellkulturplatte für Versuche mit kardialen Fibroblasten

Verwendungszweck	Anzahl Wells pro Platte	Anzahl Zellen pro Well
Immunhistochemie	12- Well-Platte	200.000 in 1 ml Medium
Immunhistochemie	96-Well-Platte	20.000 in 200 µl Medium
FACS	6-Well-Platten	750.000 in 2 ml Medium

2.3.2.2. Kryokonservierung von kardialen Fibroblasten

Um kardiale Fibroblasten in frühen Passagen zu kryokonservieren, wurden Fibroblasten aus einer 75 cm² Flasche wie oben beschrieben passagiert. Die Resuspension erfolgte allerdings in einem Gemisch aus 900 µl FCS und 100 µl DMSO. Die Zellsuspension wurde dann in ein Cryoröhrchen transferiert. Dieses wurde im Mr.FrostyTMFreezing Container platziert und zunächst bei -80°C gelagert. Durch den Mr.FrostyTMFreezing Container fand der Prozess des Einfrierens langsam statt. Er gewährleistete, dass die Temperatur pro Minute nur um 1°C sank. Am nächsten Tag wurde das Cryoröhrchen in einen Stickstofftank transferiert.

2.3.2.3. Revitalisierung von kardialen Fibroblasten

Zur Revitalisierung der Zellen wurde das Cryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurde sie in ein 50 ml Röhrchen gegeben, das bereits 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium enthielt. Dieses wurde daraufhin bei 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, um das toxische DMSO zu entfernen. Das *Pallet* hingegen

wurde in 12 ml DMEM +++ Medium resuspendiert und in eine 75cm² Flasche gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.2.4. Transduktion von Fibroblasten

Um mögliche Viruskandidaten zur Infektion von kardialen Fibroblasten zu identifizieren, wurden die kardialen Fibroblasten 24 h nach der Aussaat in einer 96 Well Platte mit verschiedenen AAVs der Serotypen 1, 2, 3, 5, 8, und 9 sowie darauf basierenden Varianten mit Peptidinserationen infiziert. Diese AAVs enthielten ein *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) oder ein *enhanced yellow fluorescent protein* (eYFP) als Reportergen unter Kontrolle des CMV-Promotors. Sie waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Die Infektion erfolgte in einer Dosis von 1x10⁵ vg/Zelle. Dafür wurde das vorhandene Medium der Fibroblasten abgenommen und die Fibroblasten mit PBS gewaschen. Danach wurde das auf 37°C vorgewärmte DMEM++- Medium mit der gewünschten Menge AAV hinzugegeben.

24 Stunden später erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit vorgewärmten DMEM ++- Medium. 48 Stunden nach diesem Mediumwechsel wurden die Zellen unter dem Vert.A1 Mikroskop der Firma Zeiss betrachtet, um infizierte Fibroblasten anhand des durch das Vektorgenom codierten GFPs zu identifizieren.

Folgende Viren wurden hinsichtlich der Infektion von kardialen Fibroblasten getestet:

AAV1-EGFP

AAV2-EGFP

AAV3-EGFP

AAV5-EGFP

AAV8-EGFP

AAV9-EYFP

AAV5-NEARSSS-EYFP

AAV5-NATQPWG-EYFP

AAV5-NGTPPTE-EYFP

AAV5-NGARSSS-EYFP

AAV5-NALPPRS-EYFP

AAV5-ANSVRGS-EYFP

AAV9-NTVRSVGCCP-EYFP

AAV9-NRTASSQ-EYFP

AAV9-DSRVDRR-EYFP

AAV9-NSTSRSG-EYFP
AAV9-NY3RPST-EYFP
AAV9-NSSRSVSCCP-EYFP
AAV9-NSVRNFG-EYFP
AAV9-SLRSPPS-EYFP (=AAV9-SLR)

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzuteilen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Es wurde 1% Agarose in TAE Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Der Lösung wurden 5 µg/ml *peqGREEN* hinzugegeben, was DNA anfärbt. Dann wurde das Gel in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt, um Taschen für die Proben zu bilden. Nachdem das Gel fest geworden war, wurde es in die Elektrophoresekammer überführt und mit den Proben beladen. Neben den Proben wurde als Maßstab ein *Ladder* aufgetragen. Dieser wurde je nach erwarteter Größe der Fragmente gewählt. Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Dadurch trennten sich die negativ geladenen DNA-Fragmente nach Größe auf. Es erfolgte eine Fotodokumentation unter UV-Licht.

2.4.2. DNA-Extraktion aus Agarosegel

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Dazu wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Reagiergefäß gegeben und gewogen. Anschließend wurde pro 1 mg Gel 3 µl Puffer QG zugegeben. Die Agarose wurde komplett gelöst, indem das Reagiergefäß bei 55°C geschüttelt wurde. Danach wurde pro 1 mg Gelfragment 1 µl Isopropanol hinzugegeben und gevortext. Anschließend wurde die entstandene Lösung auf eine der mitgelieferten Säulen transferiert. Es wurde eine Minute bei 18.000 g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, mit 750µl Puffer PE gewaschen und erneut für eine Minuten bei 18.000 g zentrifugiert. Es wurde erneut eine Minute bei 18.000 g zentrifugiert, ohne dass vorher Puffer auf die Säule gegeben wurde. Danach wurden 50 µl ddH₂O auf die Säule gegeben und nach einer Minute Inkubationszeit für eine Minute bei 18.000 g zum Eluieren der DNA zentrifugiert.

2.4.3. DNA und RNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte mithilfe des NanoDrop Photometers. Es wurde die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm gemessen und daraus die Konzentration der Proben bestimmt. Die Messung erfolgte immer mindestens zweifach und der Mittelwert beider Messungen wurde als Konzentration verwendet. Bei größeren Abweichungen wurde die Messung wiederholt.

2.4.4. Klonierung des PRODH-Vektorplasmids für Maus und Ratte

Zur Vervielfältigung der DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Dafür wurde ein Thermocycler verwendet in dem sich die Phasen Denaturierung (94°C), *Primerannealing* (63°C) und Elongation (68°C) cyclisch wiederholen. Zur Klonierung von PRODH wurde in diesem Fall als Template ein cDNA Pool aus Rattenniere bzw. Mausniere genutzt.

Es wurden die Primer MmPRODH-Acc65I-F2 und MmPRODH-BamHI-R für Maus und RnPRODH-Acc65I-F2 und MmPRODH-BamHI-R für Ratte verwendet. Die PCR erfolgte nach folgendem Ansatz (Tabelle 5):

Tabelle 5: PCR Ansatz zur Klonierung des Prodh Vektorplasmids

H2O	29,25 µl
10x Pfx Amplification Buffer	5,00 µl
10x Enhancer Solution	7,50 µl
MgSO ₄ (50mM)	1,00 µl
dNTPs (10mM)	1,50 µl
Primer I (10µM)	1,50 µl
Primer II (10µM)	1,50 µl
Platinum Pfx DNA Polymerase	0,75 µl
<u>Summe</u>	48,00 µl

Dabei wurde folgendes Temperaurschema im Thermocycler verwendet (Tabelle 6):

Tabelle 6: Temperaturschema der PCR zur Klonierung des Prodh Vektorplasmids

<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
94°C	5 min	1x
94°C	20 sek	45x
63°C	30 sek	
68°C	2 min 30 sek	
68°C	10 min	1x
4°C	∞	

Mit dem Primer RnProdh-Acc65I-F2 wurden neben Acc65I noch Sall + NsiI-Schnittstellen eingefügt. Mit dem Primer MmProdh-BamHI-R wurden neben BamHI noch SbfI + AgeI-Schnittstellen eingefügt.

Danach erfolgte eine Aufreinigung des PCR Produktes mithilfe Mini Preparation-Kit (Machery-Nagel) (Seite 29 in vorliegender Arbeit).

Es wurden die Konzentrationen mit dem NanoDrop Fotometer bestimmt.

Anschließend wurde ein Restriktionsverdau angesetzt. Es wurden je 1500 ng DNA eingesetzt. Aufgereinigtes Insert (PCR Produkt für Ratte bzw. Maus) und der Vektor pSSV9-Tnt-MmLamp2(tv1)a (durch das Labor zur Verfügung gestellt) wurden jeweils durch die Restriktionsenzyme ACC65I und BamHI geschnitten. Der Verdau erfolgte über Nacht in NEB 3.1 Puffer.

Das Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen.

Es wurden wie erwartet folgende Fragmente sichtbar:

pSSV-TnT-MmLamp2(tv1)a:	4109 bp und 1285 bp
MmPRODH:	1836 bp
RnPRODH:	1836 bp

Die Banden wurden ausgeschnitten und die DNA mithilfe der Gelextraktion extrahiert (Seite 37 in vorliegender Arbeit). Für die anschließende Ligation wurden Insert und Vektor in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Katalysiert wurde die Ligation durch die T4 DNA-Ligase (1 U/ μ l) in zugehörigem Puffer. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 25°C. Danach wurde für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert.

Es erfolgte die Transformation in elektrokompente E.coli DH5 α (Seite 28 in vorliegender Arbeit).

Anschließend wurden die E.coli DH5 α auf Carbenicillinplatten ausgestrichen. Es wurden Kulturen in 7 ml Flüssigmedium der angewachsenen Klone angelegt.

Nach Anwachsen erfolgte eine Kolonie-PCR. Als Primer wurden Primer I Col_MmPRODH_F und Primer II seqsv40polyA.R verwendet.

Es wurde folgender Ansatz verwendet (Tabelle 7):

Tabelle 7: Ansatz Kolonie-PCR

H ₂ O	19,45 µl
10x DreamTaq Green Buffer	2,50 µl
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
Primer I (10 mM)	0,75 µl
Primer II (10 mM)	0,75 µl
DreamTaq Green DNA Polymerase	0,30 µl
<u>Summe</u>	25 µl

Die Kolonie-PCR erfolgte nach folgendem Temperaturschema (Tabelle 8):

Tabelle 8: Temperaturschema Kolonie-PCR

<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
95°C	5 min	1x
95°C	30 sek	45x
60°C	30 sek	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x
4°C	∞	

Nach Auftragen auf ein Agarosegel wurde das erwartete 5166 bp lange Amplikon sichtbar. Aus dem zugehörigen Bakterienklon wurde eine Flüssigmedium Bakterienkultur angesetzt. Dann wurde durch Mini Prep (Seite 29 in vorliegender Arbeit) das DNA-Plasmid aus der Bakterienkultur extrahiert.

Zur Kontrolle, ob ITRs (*inverted terminal repeats*, Bestandteil von AAV Genom) während der Klonierung erhalten geblieben sind, erfolgte ein Verdau. Dazu wurden die Enzyme SmaI und SalI genutzt. Die Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. In der Gelelektrophorese zeigten sich die Fragmente in erwarteter Größe.

Anschließend wurden die Konstrukte zur Sequenzierung an die Firma „Eurofins“ gesendet. Es wurden die Primer seq-bGloblgG-F, seq_MmPRODH_F und seq_SV40polyA_R verwendet.

Eine schematische Darstellung des klonierten Plasmids pSSV9-TnT-RnProdh ist in Abbildung 4 zu sehen.

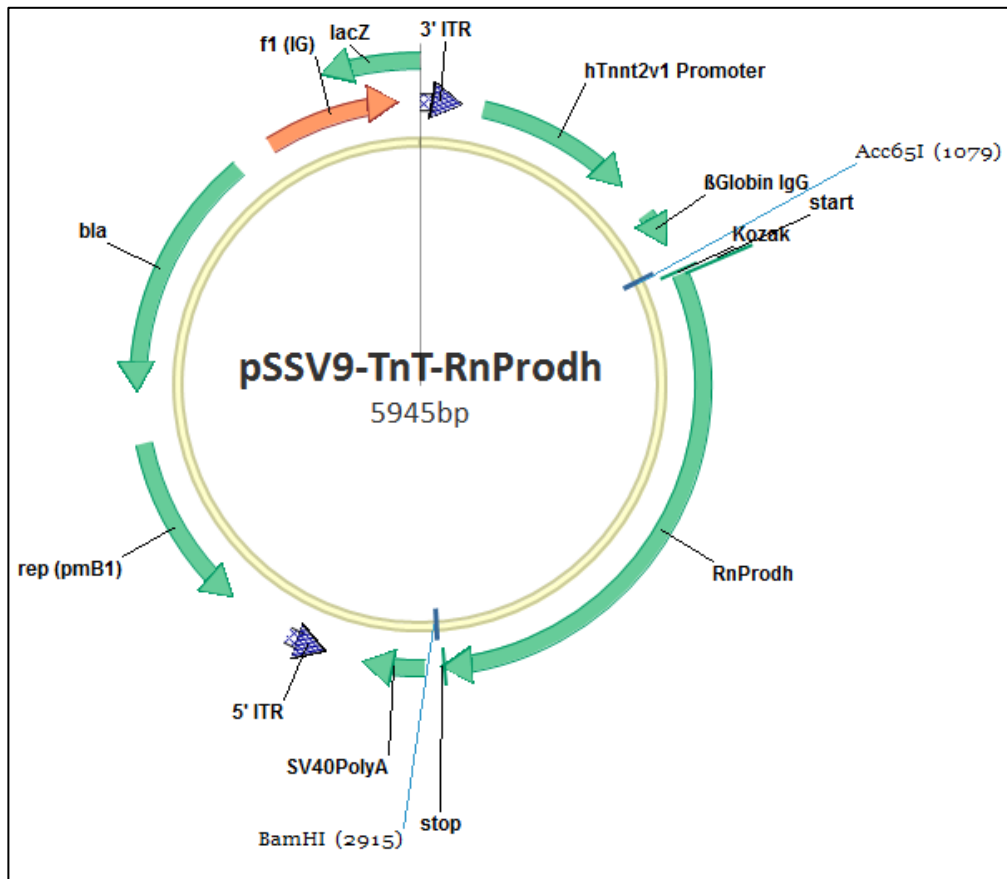


Abbildung 4: Plasmid: pSSV9-TnT-RnProdh (5945bp)

Die anschließende Produktion des AAV6-ssTnT-PRODH erfolgte durch Wiona Burmeister, Angela Lorenzen, Susanne Hille und Christopher Borowski, die ebenfalls Mitglieder der Arbeitsgruppe sind.

2.4.5. RNA Isolierung aus Zellen

Für die RNA Isolierung aus Zellen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden angewendet. Für die Untersuchung verschiedener potenzieller Targets unter Hypertrophie erfolgte die RNA Isolierung mittels einer TRIzol® Reagenz basierten Methode. Für spätere Experimente, welche die Überexpression von PRODH in NRVCs näher untersuchten, wurde das „Quick-RNA Micorprep Kit“ der Firma Zymo Research genutzt. Für die Umstellung der Methode war vor allem der deutlich geringere zeitliche Aufwand des Quick-RNA Micorprep Kit entscheidend. Vorteile der TRIzol® Reagenz Methode ist allerdings die deutlich größere Menge an RNA, die isoliert werden kann.

2.4.6. RNA Isolierung aus Zellen mit TRIzol® Reagenz

Für die gesamte Isolierung von RNA wurden RNase /DNase freie Materialien genutzt.

Die wie oben beschrieben behandelten Zellplatten (Seite 33 in vorliegender Arbeit) wurden für die Isolation von RNA zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml TRIzol® Reagenz auf jedes Well gegeben. Nach mehrfachem Auf- und Abpipettieren zum Lösen der Zellen vom Plattenboden wurde die Zellsuspension in 1,5 ml Reagiergefäße gegeben. Es wurden 200 µl Chloroform pro Reagiergefaß zugegeben, die Proben wurden durch 15-sekündiges Schütteln gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde für 15 Minuten mit 1200 g bei 4°C zentrifugiert. Es entstanden eine farblose wässrige Oberphase, die u.a. die RNA enthält, eine Interphase mit Protein und eine rote Unterphase. Die farblose wässrige Oberphase wurde vorsichtig entnommen und in neue 1,5 ml Reagiergefäße transferiert. Zur RNA Fällung wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und für zwei bis zwölf Stunden bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200 g und 4°C entstand ein RNA haltiges *Pallet*. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zum *Pallet* wurde 1 ml 75% Ethanol gegeben und nach Vortexen erneut für 5 Minuten bei 4°C mit 7500 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das entstandene *Pallet* bei Raumtemperatur getrocknet. Dabei wurde das zuvor noch weiße *Pallet* durchsichtig. Dann wurde das RNA haltige *Pallet* in 30 µl DEPC Wasser aufgenommen.

Anschließend wurde die RNA Konzentration mithilfe des Nanodrop Fotometers (Seite 37 in vorliegender Arbeit) bestimmt.

2.4.7. DNase-Verdau und Phenol-Chlorophorm Aufreinigung

Für den DNase-Verdau wurden 5 µg der zuvor isolierten RNA in 40 µl DEPC Wasser verwendet. Dazu wurden 5 µl DNase und 5 µl zugehöriger 10x Puffer gegeben. Es folgten 15 Minuten Inkubationszeit. Danach wurden weitere 50 µl DEPC-Wasser und 100 µl Phenol-Chlorophorm-Isoamylethanol hinzugegeben und gevortext. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen. Diesem Überstand wurden 300 µl abs. Ethanol und 10 µl 3M Na-Acetat Lösung zugegeben. Es wurde für 30 Minuten bei -20°C inkubiert und dadurch die RNA gefällt. Dann wurde für 40 Minuten mit 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das *Pallet* in 500 µl 75% Ethanol gewaschen. Es wurde für 5 Minuten erneut bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das *Pallet* bei Raumtemperatur getrocknet und in 10-16 µl

DEPC Wasser gelöst. Daraufhin wurde die RNA Konzentration erneut am Nanodrop Fotometer gemessen.

2.4.8. cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem Luna Script RT SuperMix Kit der Firma New England BioLabs Inc.

Dazu wurden 4 µl Luna Script RT Super Mix (5x) und bis zu 1 µg RNA gemischt. Der Reaktionsansatz wurde auf 20 µl mit DEPC Wasser aufgefüllt. Es wurden zwei Negativkontrollen verwendet. Eine Probe enthielt No-RT Control mix (5x) für einen Ansatz ohne Reverse Transkriptase (NRT). Ein weiterer Ansatz enthielt keine RNA (NTC).

Es folgte die Inkubation in einem Thermocycler:

- Primer Annealing bei 25°C für zwei Minuten
- cDNA-Synthese bei 55°C für zehn Minuten
- Hitze Inaktivierung bei 95°C für eine Minute

Zur späteren Verwendung der cDNA wurde sie auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.4.9. RNA-Extraktion aus Mausherzen

Zur Isolation von RNA aus Mausherzen mussten die Herzen zunächst mechanisch zerkleinert werden. Dies erfolgte mithilfe des *Precellys24 homogenizer*. Die verwendeten 2 ml Mikro Schraubröhren wurden zuvor mit dem Herzgewebe, 1 ml TRIzol und Keramikperlen mit einem Durchmesser von 1,4 bzw. 2,8mm befüllt. Nach der Homogenisierung wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei 12.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Dieser enthält u.a. die zu isolierende RNA, mit der nach demselben Protokoll weiter verfahren wird wie bei der Isolation von RNA aus NRVCs mithilfe von TRIzol® Reagenz (Seite 42 in vorliegender Arbeit).

2.4.10. RNA Extraktion mit Quick-RNA Microprep Kit

Für die Isolation von RNA mit dem Quick-RNA Microprep Kit wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt (Seite 33 ff. in vorliegender Arbeit). Dann wurden die Platten zunächst mit PBS gewaschen. Es wurde 300 µl RNA Lysis Puffer direkt auf die Wells gegeben. In gleicher Menge wurde 100% Ethanol hinzugegeben. Um die Zellen zu lösen, wurde mehrfach auf- und abpipettiert. Blasenbildung wurde dabei vermieden. Das entstandene Lysat wurde

entnommen und auf eine Zymo-Spin-Säule gegeben. Diese wurde dann für 30 Sekunden zentrifugiert. Wie alle der folgenden Zentrifugationen während der RNA Extraktion mittels Quick-RNA Microprep Kit erfolgte diese Zentrifugation bei 13.000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde 400 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Jetzt folgte ein DNase-Verdau auf der Säule. Dazu wurde die im Kit enthaltene DNase I verwendet. DNase I und DNase-Verdau-Puffer wurden dafür zunächst so gemischt, dass pro Säule 5 µl DNase I und 35 µl Dnase-Verdau-Puffer verwendet wurden. 40 µl der entstandenen Lösung wurde dann direkt auf jede Säule pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde auf jede Säule 400 µl des im Kit enthaltenen RNA-Prep-Puffer gegeben und für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach folgen zwei weitere Waschschrte. Zunächst wurde mit 700 µl Waschpuffer gewaschen, 30 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurde mit 400 µl Waschpuffer gewaschen, für zwei Minuten zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen.

Um die RNA aus der Säule zu lösen, wurde die Säule in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 16 µl DEPC-Wasser durch weitere 30 Sekunden Zentrifugation eluiert.

Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrops bestimmt (Seite 38 in vorliegender Arbeit) und anschließend mithilfe des LunaScript RT SuperMix Kit in cDNA umgeschrieben (Seite 43 in vorliegender Arbeit). Dann wurde ebenfalls auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt.

2.4.11. RT-qPCR

Zur Quantifizierung bestimmter mRNA-Sequenzen von unterschiedlichen Genen wurde die Methode der RT-qPCR (*Realtime quantitative polymerase chain reaction*) verwendet. Sie basiert auf der PCR.

Das Primerdesign für qPCR erfolgte mithilfe der Anwendung von Primer-BLAST des NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dabei wurde darauf geachtet, dass das PCR-Produkt zwischen 95 und 200 Basenpaaren Länge besaß und die Primer eine Schmelztemperatur zwischen 56°C und 60°C besaßen (optimal 57°C). Gleichzeitig sollte der maximale Unterschied der Schmelztemperaturen des *forward* und *reverse* Primers bei 1°C liegen. Außerdem wurde auf das Auftreten von mindestens einem Cytosin oder Guanodin innerhalb der letzten fünf Basenpaare geachtet, um eine höhere Primerbindungsspezifität zu erreichen. Dabei wurden Primerpaare favorisiert, zwischen denen ein Intron von mindestens

1000 Basenpaaren Länge existierte, um eine Amplifikation von genomischer DNA, die eventuell zuvor nicht vollständig durch die DNase I verdaut worden ist, bei der qPCR entgegenzuwirken. Die Primertestung erfolgte immer mit cDNA im Vergleich zu DEPC Wasser und gDNA.

2.4.11.1. qPCR mit Sybr Green

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) wurde in der Regel mit Platinum SYBR Green qPCR Super Mix der Firma Invitrogen durchgeführt.

Die qPCR basiert auf der Amplifikation von Sequenzen der Zielgene, die durch das ausgewählte Primerpaar umrandet werden. Der Farbstoff SYBR Green dient dem Nachweis doppelsträngiger DNA. In jedem Zyklus erfolgte eine Detektion der Fluoreszenz durch den *Cycler*. Die Fluoreszenz wird als Maß der Amplifikation der DNA verwendet. Das Gerät gibt einen Ct-Wert aus, bei dem die Fluoreszenzintensität einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Durch ins Verhältnis setzen der Ct-Werte des Zielgenes mit den Ct-Werten eines Housekeepinggenes wurden die qPCRs mittels der $\Delta\Delta C_t$ Methode ausgewertet.

Bei dem Hauskeepinggen handelt es sich um ein Gen, das durch die Versuchsbedingungen nicht reguliert worden ist. Als Houskeepinggen wurde in dieser Arbeit in der Regel Rpl32 verwendet. Zur Ausführung der qPCR wurde zunächst DEPC-Wasser und Platinum SYBR Green qPCR Super Mix gemischt. Dieses Gemisch wurde dann auf verschiedene 1,5 ml Reagiergefäße aufgeteilt. In jedes Reagiergefaß wurde jeweils ein Primerpaar für die verschiedenen Zielgene zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde dabei nach Tabelle 9 hergestellt.

In je ein Well der 96-Well-Platte wurden 18 µl des Wasser-Primer-SYBRGreen-Mix pipettiert. Danach wurden 2 µl cDNA mit einer Konzentration von 5 ng/µl zugegeben. Jede Probe wurde in technischen Duplikaten aufgetragen. Daraufhin wurde die Platte mit einer durchsichtigen Plastikfolie verschlossen, bei 1.000 g für eine Minute zentrifugiert und im qPCR *Cycler* plaziert. Die qPCR erfolgte dann nach dem Temperaturschema in Tabelle 10.

Tabelle 9: Reaktionsansatz der qPCR mit SYBR Green Super Mix

SYBR Green Super Mix	10 µl
Primer I (10 µM)	0,4 µl
Primer II (10 µM)	0,4 µl
DEPC-Wasser	7,2 µl
cDNA (5ng/µl)	2 µl

Tabelle 10: Temperaturschema qPCR mit SYBR Green Super Mix

<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
95°C	2 min	1x
95°C	5 sek	40x
60°C	30 sek	
95°C	10 sek	1x
60°C	5 sek	1x
95°C	5 sek	1x

2.4.11.2. Multiplex qPCR

Zur Bestimmung von Genen aus dem hypertrophen Genprogramm wurde Multiplex qPCR verwendet. Unter Verwendung des BioRad iQ Multiplex Powermix ermöglichte dies die gleichzeitige Bestimmung von Nppa, Nppb, Rcan und Rpl32 (als *Housekeepinggene*). Dabei wurden verschiedene spezifische Sonden für die jeweiligen Gene verwendet. Der Reaktions
Der Primer Mix bestand dabei aus Verhältnis von 1:1:2 von *Forward Primer* (10 µM) zu *Reverse Primer* (10 µM) zu Sonde (10 µM). Reaktionsansatz und Temperaturschema erfolgten nach Tabelle 11 und 12.

Tabelle 11: Reaktionsansatz der qPCR Multiplex

BioRad iQ Multiplex Powermix	10 µl
DEPC-H2O	6 µl
Rpl32 Mix	0,5 µl
Nppa Mix	0,5 µl
Nppb Mix	0,5 µl
Rcan1.4 Mix	0,5 µl

Tabelle 12: Temperaturschema Multiplex qPCR

<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
95°C	2 min	1x
95°C	15 sek	40x
60°C	45 sek	

2.5. Biochemische Methoden

2.5.1. Proteinisolation aus Zellen

Nachdem das Medium der Zellen abgenommen worden ist, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde zwischen 100 und 150 µl Lysepuffer auf ein Well gegeben, nachdem dem Lysepuffer DTT, Protease-Inhibitor, Phosphatase-Inhibitor 2 und 3 zugegeben wurde. Die Proben wurden ab diesem Zeitpunkt dauerhaft auf Eis gelagert, um einer Denaturierung entgegenzuwirken. Dann wurden die Zellen mit einem *Cell Scraper* der Firma Sarstedt durch gründliches Kratzen abgelöst. Die entstehende Suspension wird in ein Reagiergefäß überführt. Die Proben wurden nun drei Mal aufeinanderfolgend in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Zwischen den jeweiligen Gefrierschritten wurden die Proben 5 Sekunden gevortext. Danach wurden die Proben 20 Minuten bei 18.000 g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit, die die Proteine enthält, wurde in neue Reagiergefäße überführt, während das *Pallet* verworfen wurde.

2.5.2. Proteinquantifizierung mit Tecan DC Assay

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mithilfe des DC-Systems der Firma BioRad. Die Bestimmung erfolgte im 96-Well-Mikrotiterplattenformat. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA in Lysepuffer angesetzt. Diese Verdünnungen der Konzentration 2 µg/µl, 1 µg/µl, 0,5 µg/µl, 0,25 µg/µl und 0,125 µg/µl sowie eine Kontrolle ohne BSA wurden als Standard verwendet.

Daraufhin wurde Reagenz A' aus 1000 µl Reagenz A und 20 µl Reagenz S hergestellt. In jedes Well werden 200 µl Reagenz B und 25 µl Reagenz A' pipettiert. Danach wurden 5 µl der jeweiligen Proben bzw. des Standards hinzugeben. Nach fünf Sekunden vorsichtigem Schütteln wurde die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Messung erfolgte mit dem Infinite M20Pro Microplate reader der Firma Tecan Life Sciences.

2.5.3. Trennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE

Zur Trennung der Proteine nach Größe wurde ein SDS-PAGE gegossen. Dieses bestand aus einem Sammelgel (oben) und einem Trenngel (unten).

Als Trenngel wurde in der Regel ein 10%iges Gel verwendet. Zu dessen Herstellung wurden Acrylamid, Trenngelpuffer und destilliertes Wasser vermischt. Zum Schluss wurden TEMED und APS hinzugegeben und das Gel in seine Form gegossen. Um Luftblasen zu vermeiden

sowie eine glatte Gelgrenze zu gewährleisten, wurde Isopropanol auf das entstehende Gel pipettiert. Nach Aushärtung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel, bestehend aus Sammelgelpuffer, Acrylamid, destilliertem Wasser, TEMED und APS, auf das Trenngel gegossen. Im Sammelgel wurde ein Kamm platziert, damit Taschen für die Proben im Gel entstehen.

Während das Sammelgel polymerisierte, wurden die Proben vorbereitet. Die Proben wurden so verdünnt, dass alle die gleiche Proteinkonzentration enthielten. Zusätzlich wurde 4-fach Lämmli Puffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Das feste Gel wurde in der Laufkammer des Mini PROTEAN Tetra System von BioRad platziert, der Kamm wurde gezogen, die Taschen mit Laufpuffer gespült. Daraufhin wurden die Proben in die Taschen pipettiert. Als *Ladder* wurde vorwiegend der Page Ruler Plus prestained protein Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. An das Gel wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Diese wurde auf 120 V erhöht, sobald die Proteine das Sammelgel passiert hatten. Die Spannung wurde für ca. eine Stunde, abhängig von der Größe der zu trennenden Proteine aufrecht erhalten.

2.5.4. Western Blot

Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose Membran, wurde bei dem aus der Laufkammer entnommenen Gel zunächst das Sammelgel abgetrennt. Daraufhin wurde der Western Blot in folgender Reihenfolge in der Transferkassette zusammengebaut: Schwamm Filterpapier, Proteingel, Membran, Filterpapier, Schwamm. Dann wurde die Transferkassette in der Western Blot Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell platziert und über 1,5 Stunden eine Spannung angelegt. Die Stromstärke betrug 350 mA. Dabei befand sich die Membran auf Seite des Pluspols, das Gel auf Seite des Minuspols.

2.5.5. Immundetektion

Die Detektion von Proteinen erfolgte mittels Immundetektion. Dazu wurde die Membran zunächst mindestens eine Stunde zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen in fünfprozentiger TBST-Milch eingelegt. Daraufhin wurde ein spezifisch an das zu detektierende Protein bindender Antikörper in fünfprozentiger TBST-Milch verdünnt. In dieser Lösung wurde die Membran dann über Nacht in einem 50 ml Röhrchen unter ständigem Rollen inkubiert.

Danach wurde die Membran erneut viermal für fünf Minuten mit TBST unter Schütteln gewaschen. Es wurde ein zweiter Antikörper, der speziesabhängig an den primären Antikörper bindet, ebenfalls in fünfprozentiger TBST-Milch verdünnt. Dieser sekundäre Antikörper ist entweder HRP konjugiert oder mit dem Fluorophor Alexa Fluor 546 gekoppelt gewesen. In dieser Lösung wurde die Membran für ein bis zwei Stunden inkubiert. Danach wurde die Membran erneut viermal für fünf Minuten in TBST gewaschen.

Nun erfolgte die Detektion des Sekundärantikörpers. Dafür wurde das FluorChem Q System genutzt.

War der sekundäre Antikörper HRP konjugiert, so erfolgte die Detektion mittels Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent der Firma GE Healthcare. Dafür wurden zunächst die beiden gelieferten Lösungen A (Luminol-Lösung) und B (Peroxid-Lösung) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Diese wurde für 2 Minuten in einer Dunkelkammer inkubiert. Das HRP, das an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, katalysiert die Oxidation des Luminols durch die vorhandenen Peroxide. Dadurch entsteht eine Chemilumineszenz. Diese konnte anschließend mit dem FluorChem Q System detektiert werden.

Wurde statt des HRP konjugierten sekundären Antikörpers ein Alexa Fluor 546 tragender sekundärer Antikörper verwendet, wurde dessen Emission direkt durch das FluorChem Q System detektiert.

Die Quantifizierung erfolgte mittels Densitometrie. Dabei wurde das zu quantifizierende Protein in Relation zu einer nicht regulierten Ladekontrolle gesetzt, um eine mögliche Verwendung unterschiedlicher Proteinmengen zu berücksichtigen. Als Ladekontrolle wurden in dieser Arbeit α -Tubulin und GAPDH genutzt.

2.6. Histologische Methoden

2.6.1. Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung verschiedener Proteine mit dem LSM Mikroskop wurde die Methode der Immunfluoreszenz verwendet. Zumeist wurden dazu spezifische Antikörper genutzt, an die speziesspezifisch sekundäre Antikörper binden, an die ein Fluorophor gekoppelt ist. Es wurden aber auch verschiedene Assays, darunter der TUNEL Assay der Firma Roche, der MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxid Indikator der Firma ThermoFisher sowie der MitoTracker™ der Firma ThermoFisher verwendet.

Fibroblasten oder NRVCs wurden dazu zuvor auf 12-Well-Platten mit *Coverslips* oder auf 96-Well-Platten mit transparentem Glasboden ausgesät. Diese waren zuvor kollagenisiert worden. Die Platten wurden anschließend wie oben beschrieben behandelt (Seite 33 ff. in vorliegender Arbeit).

Vor der Fixierung wurden die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde 4% PFA auf die Zellen gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde drei Mal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit BSA 2,5% +0,1% Triton für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und permeabilisiert wurden. Nach Überführung der *Coverslips* in eine Feuchtkammer wurden die Zellen über Nacht mit dem primären Antikörper in 2,5% BSA+0,1% Triton bei 4°C inkubiert.

Daraufhin wurden die *Coverslips* drei Mal mit PBS gewaschen und dann 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit einem sekundären Antikörper in der Feuchtkammer inkubiert. Mit dem sekundären Antikörper wurde auch DAPI zugegeben, um Zellkerne zu markieren. Der sekundäre Antikörper bindet speziesspezifisch an den primären Antikörper und ist mit einem Fluorophor konjugiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die *Coverslips* noch einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die *Coverslips* auf dem Objektträger fixiert.

Alle Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Microscope 800 der Firma Zeiss gemacht.

2.6.2. Zellgrößenbestimmung von NRVCs

Die Zellen wurden zunächst wie oben beschrieben behandelt (Seite 33 ff. vorliegender Arbeit). Für die Zellgrößenbestimmung wurde dann als primärer Antikörper der α -Actinin 2 Maus Antikörper der Firma Sigma und der PRODH rabbit Antikörper der Firma Invitrogen genutzt. Als sekundäre Antikörper wurden der Anti-mouse IgG AF 546 und der Anti-rabbit IgG, AF 647 verwendet.

2.6.3. Lokalisationsbestimmung von PRODH

Zur Lokalisationsbestimmung von PRODH wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben behandelt und u.a. mit dem AAV6-ssTnT-PRODH infiziert (Seite 33 ff. in vorliegender Arbeit). Zur Anfärbung von Mitochondrien wurde zunächst MitoTracker™ Red CMXRos Arbeitslösung auf die noch lebenden Zellen gegeben. Die Zellen wurden daraufhin erneut 20 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach folgten Fixierung und Blocken wie oben beschrieben. Zur weiteren immunhistochemischen Färbung wurde der PRODH rabbit

Antikörper der Firma Invitrogen als primärer Antikörper verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-rabbit IgG, AF 647 verwendet.

2.6.4. TUNEL Assay

Zur Quantifizierung von Apoptose wurde das „In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ der Firma Roche genutzt. Dieses basiert auf der Markierung von freien 3'-OH Gruppen. Diese entstehen während der Apoptose durch DNA-Strangbrüche. Dazu wird die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) genutzt, ein Enzym, welches das Anhängen von veränderten, an fluorochrome gekoppelte Nukleotide an die freien 3'-OH Gruppen katalysiert. Dazu enthält das Kit eine „Enzyme Solution“ mit terminaler Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) und eine „Label Solution“ mit Nukleotiden in Reaktionspuffer.

Zur Verwendung des „In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen, für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert, dann drei Mal mit PBS gewaschen und daraufhin für zwei Minuten auf Eis mit 0,1% Triton und 0,1% Tris Natriumcitrat permeabilisiert. Dann wurde auf die Zellen eine Mischung aus je 5 µl „Enzyme Solution“ und 45 µl „Label Solution“ gegeben. Die Positivkontrolle wurde zuvor mit rekombinanter DNase I verdaut. Auf die Negativkontrolle wurde nur „Label Solution“ ohne „Enzyme Solution“ gegeben. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C in einer Feuchtkammer wurden die *Coverslips* erneut drei Mal mit PBS gewaschen.

Um noch weitere immunhistochemische Färbungen vorzunehmen, wurden unspezifische Bindestellen mit BSA 2,5% geblockt. Dann erfolgte die Färbung von PRODH und von Zellkernen durch DAPI nach dem oben erläuterten immunhistochemischen Prinzip.

Bilder der *Coverslips* wurden mithilfe des LSM 800 gemacht. Zur Auswertung wurden die apoptotischen Zellkerne ins Verhältnis mit der Gesamtzahl der Zellkerne gesetzt.

2.6.5. Bestimmung der mitochondrialen Superoxid Menge

Zur Bestimmung der mitochondrialen Superoxid Menge wurde der MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator verwendet. Nach Behandlung der Zellen wie oben (Seite 33 ff. in vorliegender Arbeit). beschrieben, wurde eine 5 µM MitoSOX™ Arbeitslösung aus MitoSOX™ und DMEM ++- Medium hergestellt. Das alte Medium wurde entnommen und durch die Arbeitslösung ersetzt. Daraufhin wurden die Zellen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, dann mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben behandelt. Parallel erfolgte eine Anfärbung von α -Actinin mittels des α -Actinin 2 Maus Antikörper der Firma Sigma.

Zur Auswertung wurde die Intensität des MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator ins Verhältnis zu den jeweiligen Zellgrößen gesetzt.

2.6.6. Färbung von Herzschnitten

In Tissue-Tek® eingebettetes Herzgewebe aus vergangenen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde verwendet. Dieses wurde mit dem Kryostaten in 5 µm dicke Schnitte geschnitten, die dann bei -80°C gelagert wurden. Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst in 4% PFA für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit PBS gewaschen. Es wurden mit einem Fettstift Kreise um die Gewebestücke gezeichnet. Dann erfolgte eine zweistündige Inkubation in Block Puffer (10% Ziegen Serum+0,1% Triton X-100) bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde mit Anti GFP 555 Antikörper (1:400) und DAPI zur Anfärbung von Zellkernen (1:1000) für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Es erfolgten zwei Waschschrte mit PBS und 0,05% Tween 20. Vor der Fixierung von Deckgläsern auf den Schnitten wurde zweimal mit PBS gewaschen.

2.7. Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des Anteils der durch den AAV9-SLR infizierten Fibroblasten wurde die Methode der Durchflusszytometrie (FACS) verwendet. Fibroblasten wurden zunächst auf 6-Well-Platten in einer Menge von 0,75 Millionen Zellen in 2 ml DMEM +++ Medium pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden wurden das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und die Zellen mit AAV9-SLR oder AAV9-WT, die jeweils für GFP codieren, in DMEM ++- Medium infiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt kein Virus. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf virusfreies DMEM ++- Medium.

Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde pro Well 500 µl Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und bei 37°C für 3-4 Minuten inkubiert. Um die Trypsinierung zu beenden wurden 500 µl +++ Medium mit 10% FCS hinzugegeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in Suspension genommen. Damit die Suspension frei von Zellklumpen war, wurde sie durch ein Zellsieb gefiltert. Danach wurde die Anzahl der Zellen mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Es erfolgte zweimalige Zentrifugation bei 1000 g für 5 Minuten und Waschen mit PBS. Dann wurden die Zellen in FACS- Puffer aufgenommen. Dafür wurde die Menge an FACS-Puffer so gewählt, dass eine Suspension von 1 Millionen Zellen pro ml entstand. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Zur FACS Messung wurde das BD FACS Canto II Gerät im Institut für Immunologie des UKSH Campus Kiel verwendet. Dort passieren die Fibroblasten einzeln einen Messbereich und werden durch einen Laser angestrahlt. Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) geben dabei Auskunft über Größe und Granularität der Zellen. Anhand der Autofluoreszenz der Zellen nach Anregung durch den Laser kann bestimmt werden, ob die Zellen GFP positiv und somit durch AAV9-SLR bzw. AAV9-WT infiziert worden sind.

2.8. Verarbeitung von Proben aus *in vivo* Versuchen

Zur Bestimmung, ob AAV9-SLR auch *in vivo* kardiale Fibroblasten befällt, wurde eingefrorenes Gewebe aus vergangenen Versuchen der Arbeitsgruppe genutzt. Dabei lag Gewebe von vier Wochen alten Mäusen der Linie delEx50 vor. Einer Gruppe der Tiere war AAV9-SLR (10^{12} vp pro Maus) in die Schwanzvene injiziert worden, der anderen Gruppe PBS als Kontrolle. Die Tiere hatten kontinuierlichen Zugang zu Nahrung und Wasser und wurden mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten.

Nach 3 Wochen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation euthanasiert und Herz, Aorta, Lunge, Leber, Niere wurden entnommen. Das Herzgewebe aus diesen Versuchen wurde in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht (S. 52).

2.9. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse in allen Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Zum Nachweis einer Signifikanz wurde bei zwei Gruppen der zweiseitige Student t-Test verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen wurde ein One-way ANOVA verwendet. Signifikanzniveaus mit $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism in der Version 6.01 verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Validierung potenzieller Kandidaten eines Screens auf metabolische Zielstrukturen bei Herzinsuffizienz

Um erfolgsversprechende therapeutische Zielstrukturen aus einem vorausgegangenen *Multi-omics-Screen* näher zu identifizieren, erfolgte eine Messung deren Expression auf mRNA Ebene in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen. Dazu wurden zunächst erfolgreich Primer für alle ausgewählten Gene entwickelt und getestet. Es erfolgten Messungen in NRVCMs, die für 24 bzw. 48 Stunden einen Hypertrophiestimulus in Form von PE oder Endothelin-1 erhalten haben. Außerdem erfolgten Messungen in verschiedenen Tiermodellen für Herzinsuffizienz. Dazu wurde u.a. das TAC Modell (Seite 6 in vorliegender Arbeit) verwendet. Des Weiteren erfolgten Messungen in transgenen Tiermodellen. Es wurden zum einen transgene Calcineurinmäuse genutzt als Modell für Herzinsuffizienz mit hypertropher Kardiomyopathie, in denen konstitutiv aktives Calcineurin überexprimiert wird, und zum anderen transgene Dyrk1a-Mäuse, in denen die Kinase Dyrk1a überexprimiert wird, als Modell einer Herzinsuffizienz bei dilatativer Kardiomyopathie.

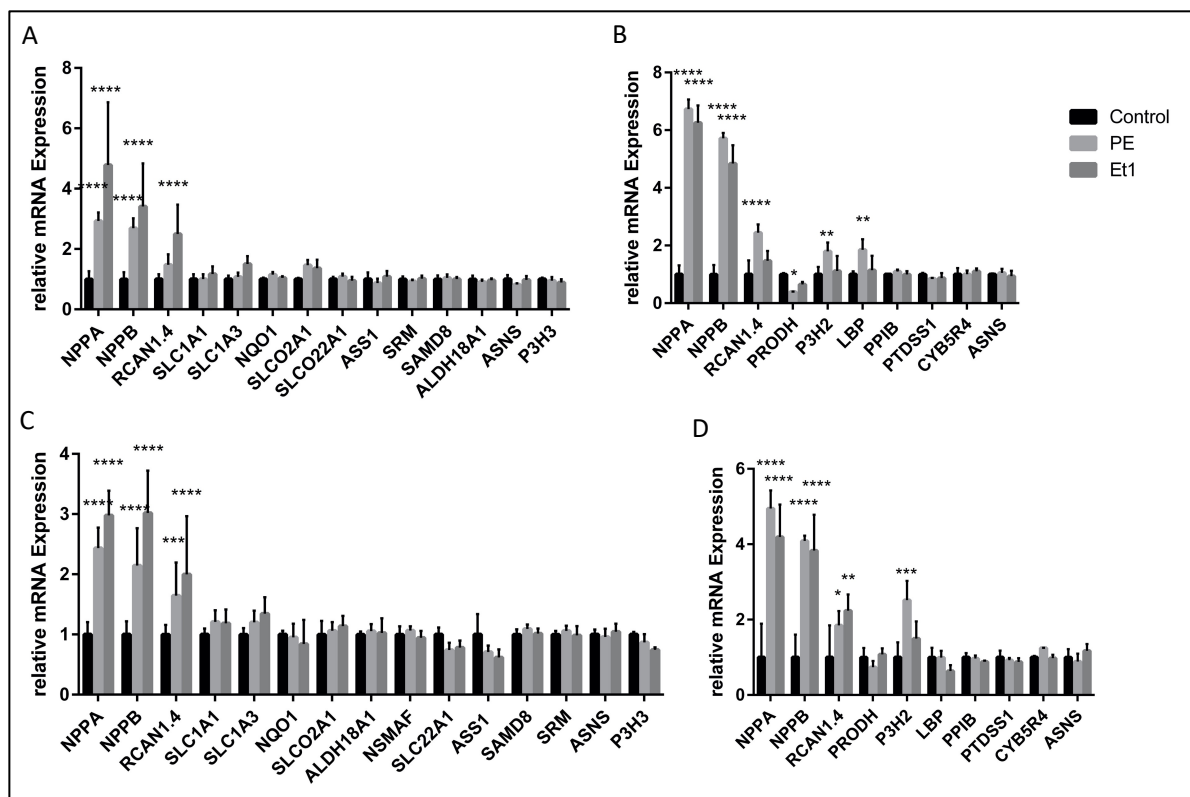


Abbildung 5: Relative mRNA Expression der zu validierenden Zielstrukturen in NRVCMs nach PE und Endothelin-1 (Et1)-Stimulation nach 24 Stunden (A, B) und nach 48 Stunden (C, D);

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ im Vergleich zur Expression in der Kontrolle; Als Nachweis der erfolgreichen Stimulation mit PE und Et1 wurden NPPA, NPPB und RCAN1.4 bestimmt

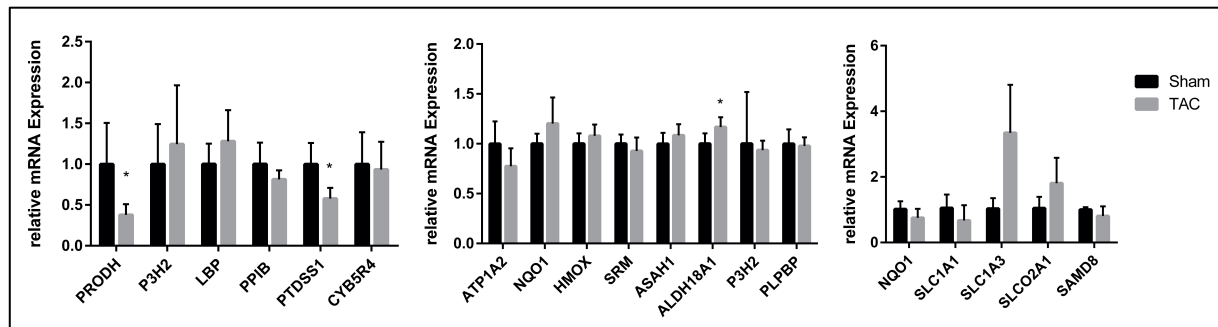


Abbildung 6: Relative mRNA Expression potenzieller Zielstrukturen in TAC operierten Mäusen im Vergleich zu Sham operierten Mäusen; * $P < 0,05$ im Vergleich zur Expression im Wildtyp

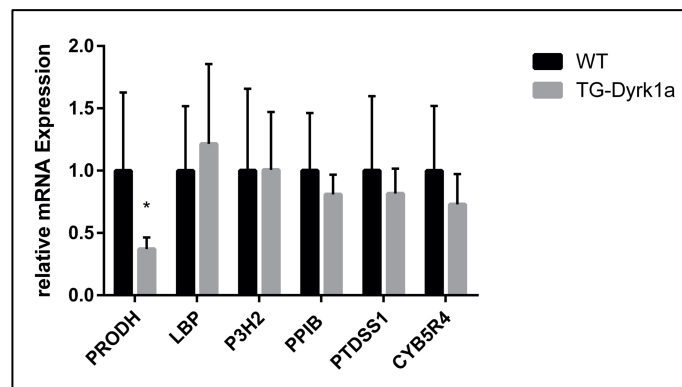


Abbildung 7: Relative mRNA Expression potenzieller Zielstrukturen in TG-Dyrk1a-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (WT); * $P < 0,05$ im Vergleich zur Expression in Wildtyp Mäusen

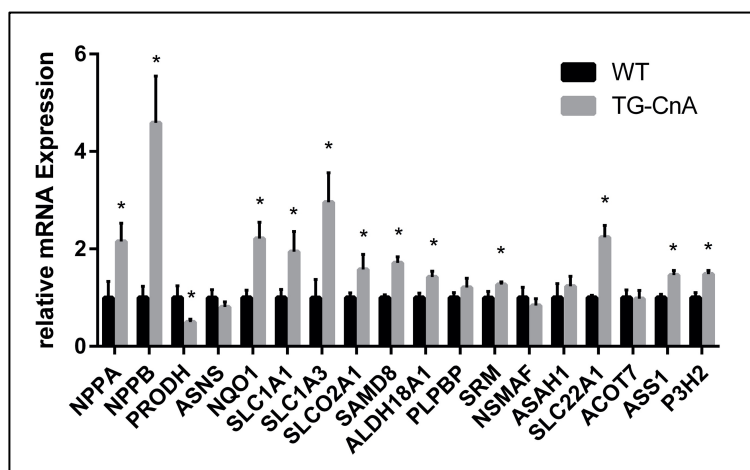


Abbildung 8: Relative mRNA Expression potenzieller Zielstrukturen in TG-Calcineurin-Mäusen

im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (WT); * $P < 0,05$ im Vergleich Expression in Wildtyp-Mäusen; Als Kontrolle der Hypertrophie wurden auch die Expression von NPPA und NPPB bestimmt.

In allen Modellen zeigt sich eine Regulation verschiedener ausgewählter Zielstrukturen. Im Folgenden werden die auffälligsten von ihnen beschrieben (Abbildung 5 bis Abbildung 8):

Nqo1 zeigte keine nennenswerte Regulation in NRVCs und eine leichte, aber nicht signifikante Hochregulation im TAC-Modell. Dafür war in den TG-Calcineurin-Mäusen eine signifikante Hochregulation auf das 2,2fache der Kontrollgruppe detektierbar.

P3h2 hingegen zeigte eine deutliche und signifikante Hochregulation in PE stimulierten NRVCs. Allerdings war die Regulation in den Tiermodellen nur geringfügig. So war im TAC-Modell eine leichte, aber nicht signifikante Hochregulation erkennbar, während in den TG-Dyrk1a-Mäusen keine Regulation erkennbar war.

Prodh zeigte in fast allen verwendeten Modellen eine signifikante Regulation. So war *Prodh* in PE stimulierten NRVCs nach 24 Stunden herabreguliert. Die gleiche Tendenz zeigte sich auch nach 48 Stunden, allerdings nicht signifikant. Auch in den Tiermodellen war *Prodh* reguliert. Es war im TAC-Modell, TG-Dyrk1a Mäusen und in TG-Calcineurin-Mäusen signifikant herabreguliert.

Bei *Ptdss1* war eine leichte nicht signifikante Herabregulation in den hypertrophiestimulierten NRVCs erkennbar, während im TAC-Modell eine deutliche signifikante Herabregulation auf das 0,58 fache der Kontrollgruppe zu sehen war. Auch in den TG-Dyrk1a-Mäusen zeigte sich eine leichte, aber nicht signifikante Herabregulation.

Slco2a1 war leicht hochreguliert in hypertrophiestimulierten NRVCs nach je 24 und 48 Stunden. Auch im TAC-Modell war eine nicht signifikante Hochregulation erkennbar. In TG-Calcineurin-Mäusen war die Hochregulation signifikant.

Slc1a1 zeigte eine leichte, aber nicht signifikante Überexpression in hypertrophiestimulierten NRVCs. In den TG-Calcineurin-Mäusen war eine signifikante Hochregulation von *Slc1a1* auf nahezu das doppelte der Kontrollgruppe erkennbar. Im Gegensatz dazu war *Slc1a1* im TAC-Modell, wenn auch nicht signifikant, leicht herabreguliert.

Slc1a3 zeigte eine leichte, aber nicht signifikante Überexpression in hypertrophiestimulierten NRVCs sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden. Gleichzeitig zeigte sich eine Hochregulation im TAC-Modell, die allerdings nicht signifikant war. Außerdem zeigte sich eine deutliche und signifikante Hochregulation auf das nahezu dreifache der Kontrollgruppe in TG-Calcineurin-Mäusen.

Viele andere potenzielle Zielstrukturen zeigten in den betrachteten Modellen nur wenig bis keine Regulation (z.B. *Asns*, *Asah1*, *Nsmaf*, *Ppib*, *Srm*). Andere Zielstrukturen waren in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen gegensinnig reguliert. So war *Ass1* in

hypertrophiestimulierten NRVCs eher herunterreguliert, während sich in TG-Calcineurin-Mäusen eine signifikante Hochregulation zeigte.

3.1.1. PRODH als potenzielle therapeutische Zielstruktur in Herzinsuffizienzmodellen

Wie oben beschrieben, zeigte sich, dass *Prodh* im TAC-Modell, in TG-Calcineurin-Mäusen und in TG-Dyrk1a-Mäusen sowie auch in PE stimulierten NRVCs nach 24 signifikant herabreguliert ist (Abbildung 5 und Abbildung 9).

Außerdem konnte festgestellt werden, dass *Prodh* nicht nur auf Ebene der mRNA unter Herzinsuffizienzbedingungen im Tiermodell herabreguliert ist, sondern dass auch auf Proteinebene deutlich weniger PRODH in TG-Calcineurin-Mäusen vorhanden ist (Abbildung 10).

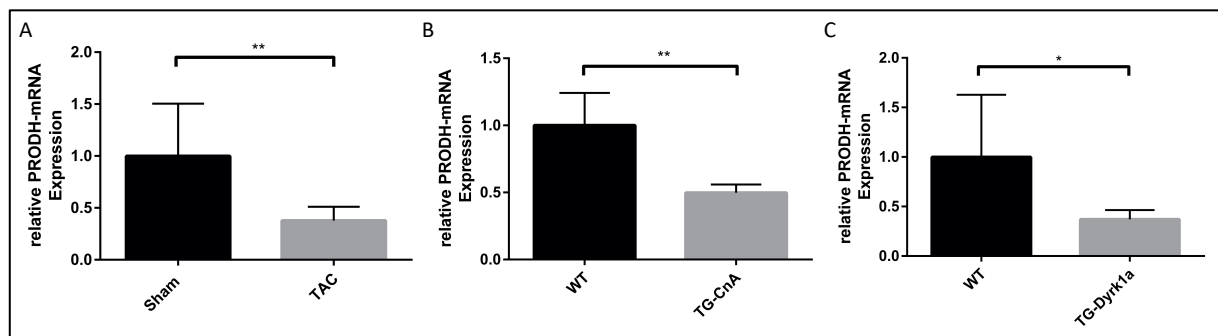


Abbildung 9: Prodh Expression in verschiedenen in vivo Herzinsuffizienz Mausmodellen

(A): relative PRODH-mRNA Expression in TAC operierten Mäusen im Vergleich zu Sham operierten Mäusen; (B): relative PRODH-mRNA Expression in TG-Calcineurin-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen (WT); (C): relative PRODH-mRNA Expression in TG-Dyrk1a-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen (WT);

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

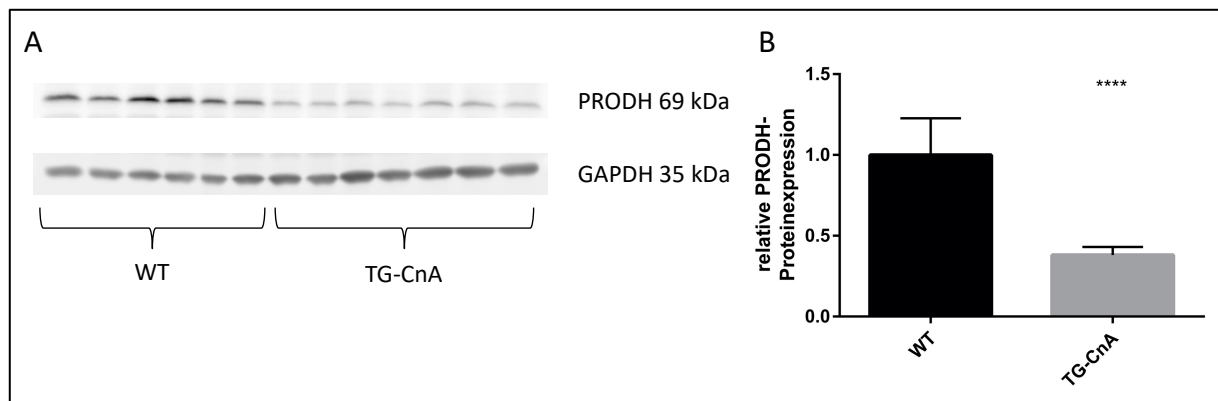


Abbildung 10: PROD H Proteinexpression in TG-Calcineurin-Mäusen (TG-CnA) im Vergleich zu Wildtypkontrollen (WT) (A) Banden im Westernblot; (B) statistische Auswertung

3.1.1.1. Vergleich der Expression von PROD H in Fibroblasten und NRVCs

Da es sich bei den untersuchten Proben der Tiermodell um Lysate ganzer Herzen handelt, wurde im Folgenden untersucht, ob PROD H vor allem in Fibroblasten oder Kardiomyozyten exprimiert wird. Dazu wurden NRVCs und die bei ihrer Preparation ebenfalls gewonnen Fibroblasten untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die mRNA Expression von PROD H in NRVCs etwa vierfach höher ist als in Fibroblasten (Abbildung 11).

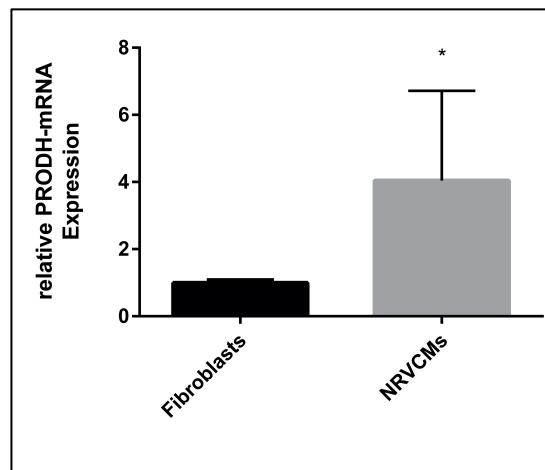


Abbildung 11 Relative PROD H-mRNA Expression in neonatalen Fibroblasten und NRVCs

3.1.1.2. Validierung der Funktionsfähigkeit von AAV6-ssTnT-PROD H

Nach erfolgreicher Klonierung von *Prod h* in das Vektorplasmid (Seite 38 in vorliegender Arbeit) wurden die adeno-assoziierten Viren AAV6-ssTnT-Prod h und AAV6-ssTnT-Luc durch Mitarbeiter: innen der Arbeitsgruppe produziert.

Für die folgenden Experimente in NRVCs konnte durch qPCR gezeigt werden, dass PRODH bei einer Dosis des viralen Vektors von $1 \cdot 10^5$ vg/Zelle auf mRNA-Ebene knapp 10.000-fach überexprimiert wurde im Vergleich zur Gruppe, die AAV6-ssTnT-Luc als Kontrolle erhalten hat (Abbildung 12 A).

Außerdem konnte mithilfe von Western Blott Analyse gezeigt werden, dass AAV6-ssTnT-ProdH auch auf Proteinebene eine starke Überexpression bedingt (Abbildung 12 B).

Des Weiteren wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die Lokalisation des überexprimierten PRODH untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das durch den AAV6-ssTnT-ProdH überexprimierte PRODH in einem MitoTracker™ Assay, der Mitochondrien anfärbt, mit Mitochondrien kolokalisiert ist (Abbildung 13)

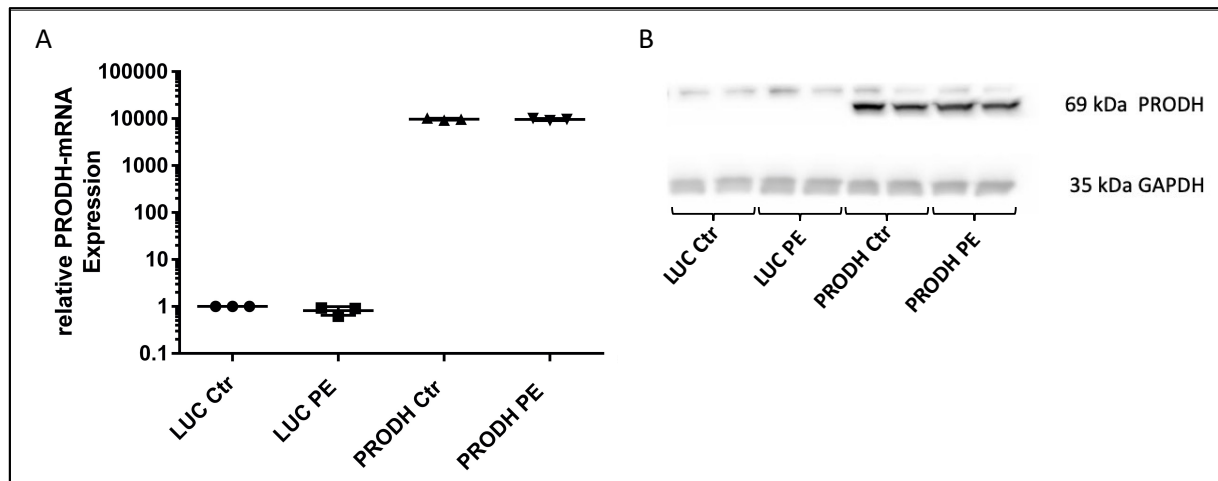


Abbildung 12: PRODH Expression in NRVCs nach Infektion mit AAV6-ssTnT-ProdH

(A) Expression PRODH-mRNA in NRVCs nach Infektion mit AAV6-ssTnT-ProdH (PRODH) oder AAV6-ssTnT-Luc (LUC) und Stimulation mit PE (PE) bzw. ohne Stimulation mit PE (Ctr); (B) Expression von PRODH-Protein in NRVCs nach Infektion mit AAV6-ssTnT-ProdH (PRODH) oder AAV6-ssTnT-Luc (LUC) und Stimulation mit PE (PE) bzw. ohne Stimulation mit PE (Ctr)

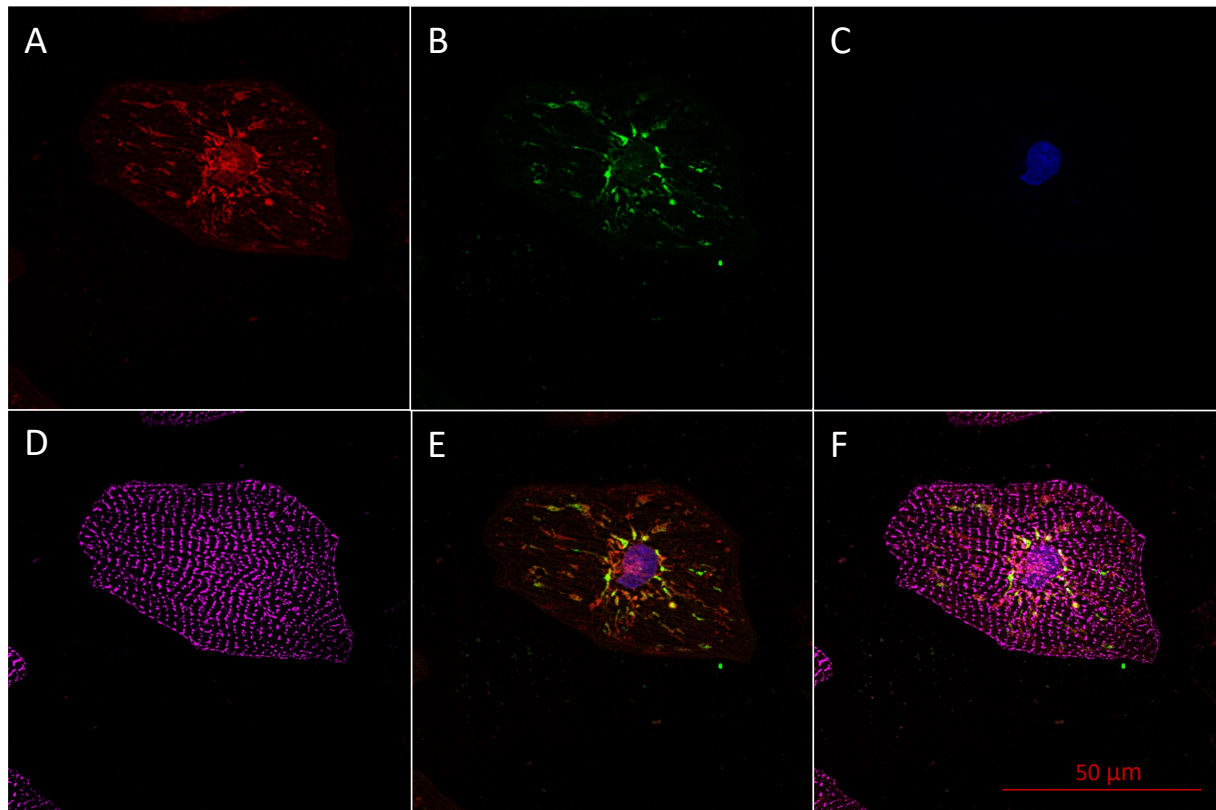


Abbildung 13: Repräsentative Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines durch AAV6-ssTnT-Prodh infizierten NRVC

Rot: Mitotracker, Grün: PRODh, Blau: DAPI, Pink: α -ACTININ

(A) nur Mitotracker, (B) nur PRODh, (C) nur DAPI, (D) nur α -Actinin, (E) Mitotracker+ PRODh+ DAPI, (F) Mitotracker+ PRODh+ DAPI+ α -ACTININ

3.1.2. Effekte von PRODH in NRVCMs

3.1.2.1. Keine Einflüsse durch PRODH-Überexpression auf Hypertrophes Genprogramm

Es erfolgte Überexpression von PRODH in NRVCMs und Hypertrophiestimulation durch PE. Es konnte gezeigt werden, dass eine PE-Stimulation im Gegensatz zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der relativen mRNA Expression von *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1.4* führte. Allerdings zeigte die Überexpression von PRODH sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der PE-Gruppe keinen Unterschied auf die relative mRNA Expression von *Nppa*, *Nppb* und *Rcan1.4* (Abbildung 14).

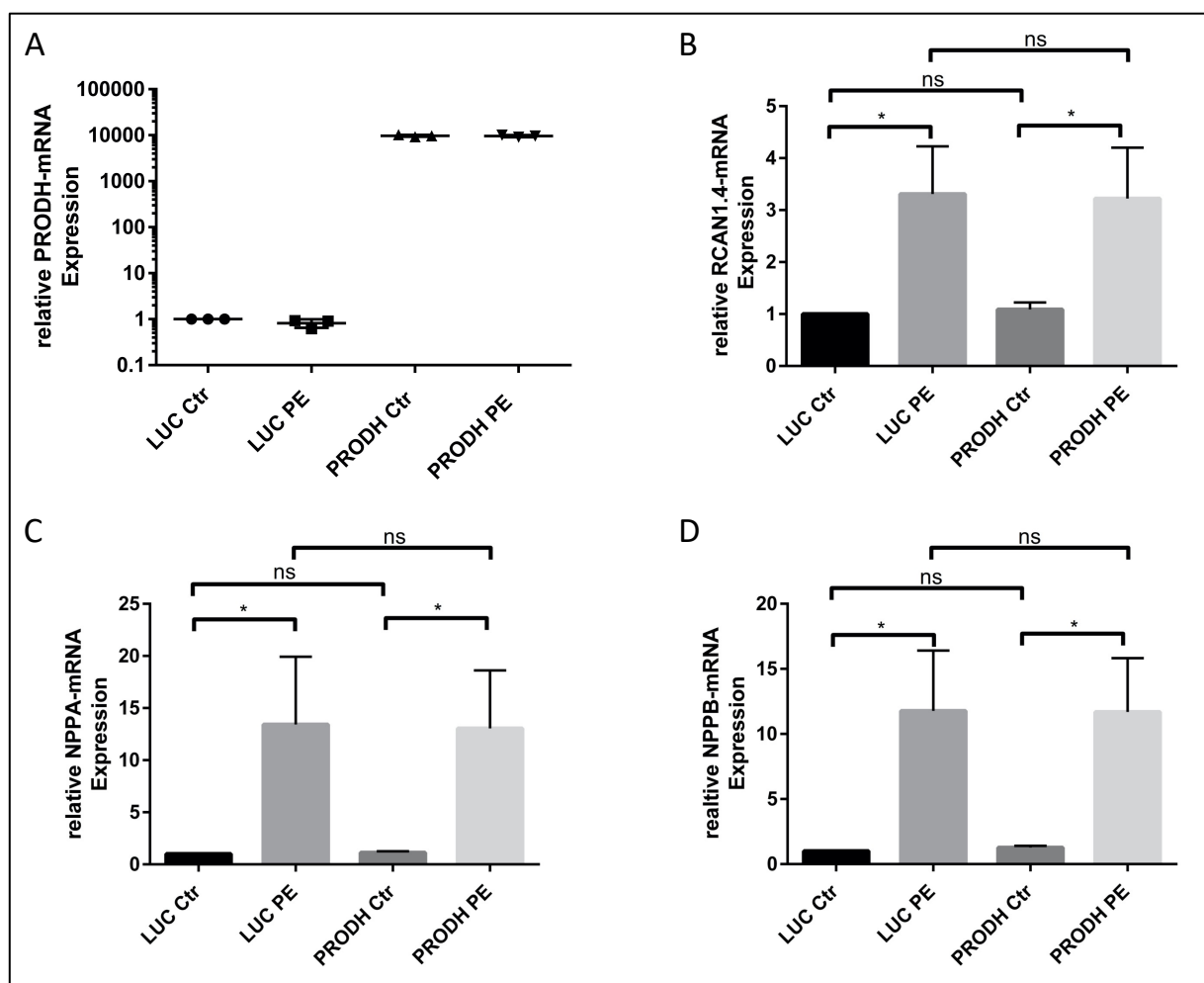


Abbildung 14: Einfluss einer PRODH Überexpression auf das Hypertrophe Genprogramm in NRVCMs

nach Infektion mit AAV6-ssTnT-Prodh (PRODH) oder AAV6-ssTnT-Luc (LUC) und Stimulation mit PE (PE) bzw. ohne Stimulation mit PE (Ctr): (A) relative PRODH-mRNA-Expression; (B) relative Rcan1.4-mRNA Expression; (C) relative NPPA-mRNA Expression; (D) relative NPPB-mRNA Expression; * P<0,05

3.1.2.2. Eine PRODH-Überexpression vermindert die Größe von NRVCMs

Des Weiteren wurden die Zellgrößen von NRVCMs nach PRODH Überexpression und Hypertrophiestimulation durch PE untersucht. Es ist zu erkennen, dass PE zu einem signifikanten Anstieg der Zellgrößen in der AAV6-ssTnT-ProdH und der AAV6-ssTnT-Luc Gruppe führte. Außerdem zeigte sich, dass NRVCMs mit einer Überexpression von PRODH eine signifikant kleinere Zellgröße hatten als mit dem Kontrollvirus infizierte NRVCMs. Dieser Zusammenhang ergab sich sowohl unter PE-Stimulation als auch in der Kontrollgruppe (Abbildung 15).

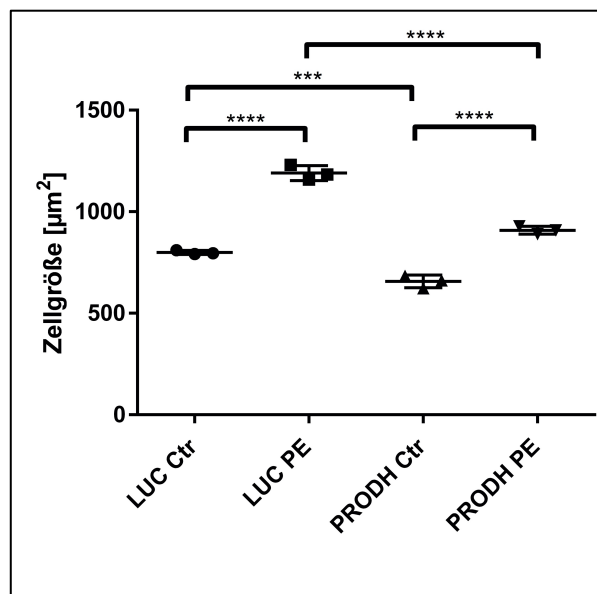


Abbildung 15: Zellgrößen von NRVCMs in μm^2 nach Infektion mit AAV6-ssTnT-ProdH (PRODH) oder AAV6-ssTnT-Luc (LUC) und Stimulation durch PE (PE) bzw. ohne Stimulation durch PE (Ctr); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$**

3.1.2.3. Einfluss auf Apoptose

Die Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels TUNEL-Assay. Es ist zu erkennen, dass der Anteil apoptotischer Zellen unter den PE stimulierten Zellen signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe. Außerdem zeigte sich eine Tendenz, dass unter den mit AAV6-ssTnT-ProdH infizierten Zellen der Anteil der apoptotischen Zellen leicht geringer war als unter den mit AAV6-ssTnT-Luc infizierten Zellen. (nicht signifikant). Es wird aber deutlich, dass AAV6-ssTnT-ProdH nicht zu einer Vergrößerung des Anteils apoptotischer Zellen geführt hat (Abbildung 16).

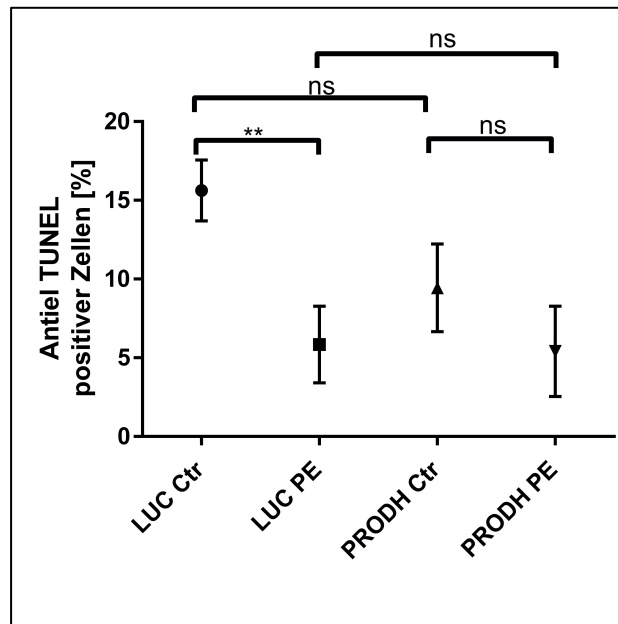


Abbildung 16: Anteil TUNEL positiver NRVCs in % nach Infektion mit AAV6-ssTnT-Prod h (PRODH) oder AAV6-ssTnT-Luc (LUC) und Stimulation durch PE (PE) bzw. ohne Stimulation durch PE (Ctr); * P<0,05; ** P<0,01

3.1.2.4. PRODH führt zu Verminderung mitochondrialer Superoxid Spezies

Die Messung der mitochondrialen Superoxid Spezies erfolgte immunfluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung des MitoSOX™ Assays. Es zeigte sich, dass mit AAV6-ssTnT-Prod h infizierte Zellen signifikant weniger mitochondriale Superoxid Spezies aufwiesen als mit AAV6-ssTnT-Luc infizierte Zellen ohne PE-Stimulation (Abbildung 17). Unter PE-Stimulation ergab sich lediglich eine kleine Tendenz, die allerdings nicht signifikant war. Außerdem zeigte sich nach PE-Stimulation eine Abnahme der mitochondrialen Sauerstoffspezies, was kritisch betrachtet werden muss (Diskussion Seite 73 in vorliegender Arbeit).

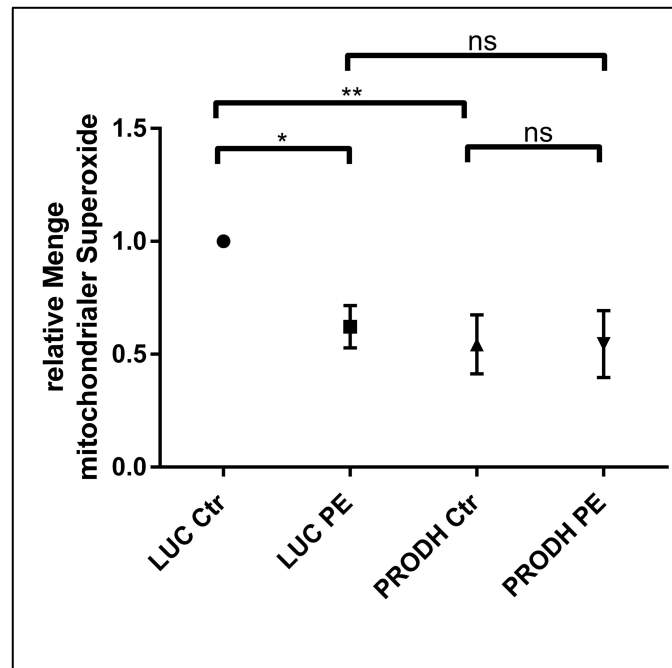


Abbildung 17: relative Menge mitochondrialer Superoxide in NRVCs nach Infektion mit AAV6-ssTnT-ProdH (PRODH)

oder AAV6-ssTnT-Luc (LUC) und Stimulation durch PE (PE) bzw. ohne Stimulation durch PE (Ctr);

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

3.2. Identifikation von AAVs für Infektion kardialer Fibroblasten

3.2.1. *In vitro* Screening auf fibroblasteninfizierende AAVs

Nach Infektion von Fibroblasten durch verschiedene für GFP codierende AAVs erfolgte eine Beurteilung der Fluoreszenz unter dem Vert.A1 Mikroskop der Firma Zeiss. Es wurde nur bei AAV9-SLR ein deutliches Fluoreszenzsignal beobachtet. Bei den übrigen 20 getesteten AAVs (Seite 36 f. in vorliegender Arbeit) waren nur sehr geringe bis gar keine Fluoreszenzsignale sichtbar. Daher schloss sich im Folgenden die weitere Untersuchung von AAV9-SLR zur Infektion von Fibroblasten an.

3.2.2. Durchflusszytometrie AAV9 SLR

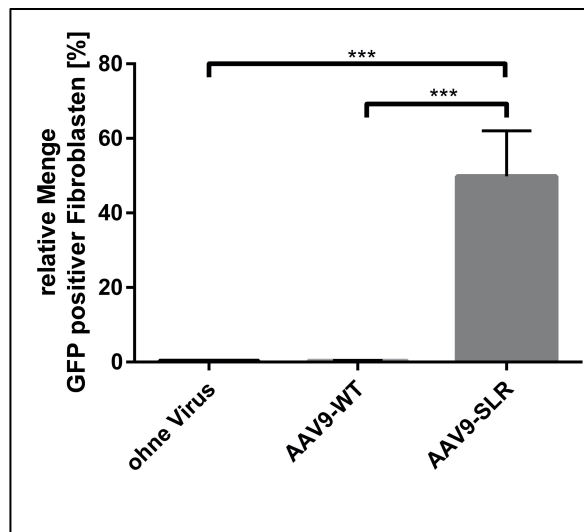


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Bestimmung der relativen Menge GFP positiver Fibroblasten

an der Gesamtzahl der vitalen Fibroblasten nach in vitro Infektion mit Infektion mit AAV9-WT und AAV9-SLR und eine Kontrolle ohne Virus; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

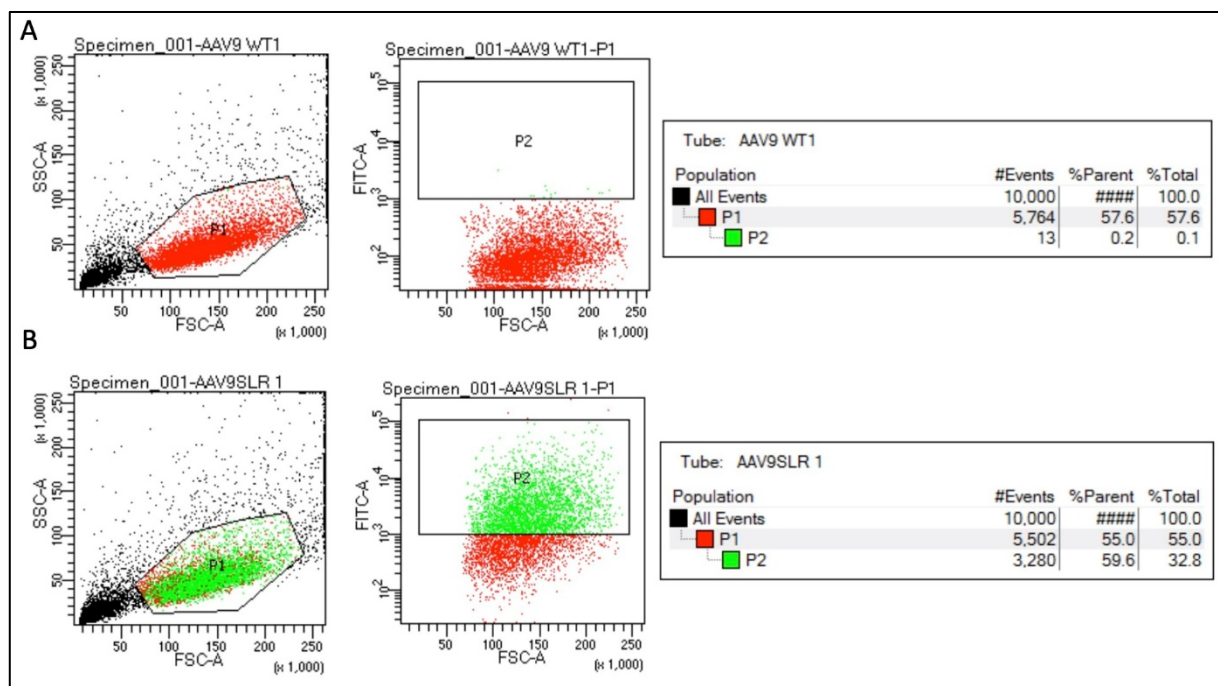


Abbildung 19: Beispielhafte durchflusszytometrische Messung von mit AAV9-WT infizierten kardialen Fibroblasten

(A) und von mit AAV9-SLR infizierten kardialen Fibroblasten (B); SSC=Side Scatter; FSC=Forward Scatter; P1=Menge der gemessenen vitalen Zellen; P2= Menge der GFP positiven Fibroblasten Anteil von P1.

Nach *in vitro* Infektion von kardialen Fibroblasten durch AAV9-WT und AAV9-SLR bzw. einer Kontrolle ohne Virus erfolgte die Bestimmung der Menge der durch die viralen Vektoren infizierten Fibroblasten mittels Durchflusszytometrie. Dabei stellten sich in der AAV9-WT Gruppe und in der Kontrollgruppe jeweils 0,32% der kardialen Fibroblasten als positiv dar, während in der AAV9-SLR Gruppe 49,84% der Zellen positiv waren (Abbildung 18). In den einzelnen Messungen ist ein deutlicher Shift zugunsten eines erhöhten GFP Nachweises festzustellen (Abbildung 19).

3.2.3. Untersuchung von Herzschnitten nach AAV-SLR Injektion

In den vorliegenden Proben ist in der Gruppe mit für GFP codierender AAV9-SLR in die Schwanzvene injizierter Mäuse durch Immunfluoreszenzmikroskopie kein GFP Signal in den zugehörigen Schnitten der Herzen detektierbar gewesen.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Screen und Bewertung verschiedener Gene als mögliche Zielstrukturen

Im Folgenden wird für einzelne erfolgsversprechend erscheinende Zielstrukturen diskutiert, inwieweit sie funktionelle und therapeutische Effekte auf Herzinsuffizienz haben könnten und warum sich für oder gegen eine weitere Untersuchung dieser Zielstrukturen entschieden wurde. Eine Diskussion aller untersuchten Zielstrukturen aus dem eingangs erwähnten Screen wird nicht angestrebt und würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Daher wurde sich nur auf die erfolgsversprechenden Kandidaten konzentriert.

Zur weiteren Evaluation wurde hier v.a. die Regulation der möglichen Zielstrukturen in verschiedenen Modellen der Herzinsuffizienz betrachtet. Allerdings wurde hier bis auf die Untersuchung von PRODH nur die mRNA-Ebene berücksichtigt, da eine Betrachtung auf Proteinebene, bei der Antikörper gegen alle Zielstrukturen nötig gewesen wären, sowohl mit einem sehr hohen Kosten- als auch mit einem sehr hohen zeitlichen Aufwand verbunden gewesen wäre. Über Regulationen auf Proteinebene durch bspw. Hemmung von Enzymen und anderen Mechanismen kann hier keine abschließende Aussage getroffen werden. Dies muss bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Außerdem sollte bei der Suche nach einer möglichen Zielstruktur beachtet werden, dass nur aufgrund der Tatsache, dass ein Gen in den verschiedenen Modellen zur Herzinsuffizienz keine Regulation zeigt, dies nicht zwangsweise bedeutet, dass es als mögliche therapeutische Zielstruktur keinen Nutzen zeigen könnte.

Trotzdem wird die Regulation in den verschiedenen Modellen zur Herzinsuffizienz hier dazu genutzt, um Zielstrukturen zu identifizieren, die mit den verschiedenen Pathomechanismen der Herzinsuffizienz verknüpft sind.

4.1.1. NAD(P)H-Quinone-Reduktase-1 (NQO1)

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Publikation über die Rolle von NQO1 in Herzzellen bei Herzinsuffizienz. Aufgrund der antioxidativen Wirkung (Seite 10 in vorliegender Arbeit) könnte NQO1 zu einer Abnahme von reaktiven Sauerstoffspezies in Herzzellen führen und über diesen Mechanismus zu vermindertem ROS-getriggertem *Remodeling* und Hypertrophie beitragen.

In den Validierungsdaten des Screens zeigte sich zwar in den TG- Calcineurin Mäusen eine deutliche Hochregulation von NQO1. Allerdings ist die Regulation in den TAC- operierten

Tieren sowie in den *in vitro* Daten aus NRVCs nur gering. Diese Tatsache stellt in Frage, ob NQO1 wirklich eine übergeordnete Rolle in den Escape-Mechanismen aus der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt. Trotzdem könnte NQO1 eine interessante Zielstruktur zur Behandlung von Herzinsuffizienz sein.

4.1.2. Prolyl-3-Hydroxylase-2 (P3H2/LEPREL1)

LEPREL1 ist ein interessantes Target und könnte durch seine Rolle bei der posttranslationalen Modifikation von Kollagen (Seite 10 in vorliegender Arbeit) Einfluss auf Fibrose bei Herzinsuffizienz haben. Eine mögliche Hypothese könnte sein, dass eine Inhibition von LEPREL1 zu einer Reduktion von Fibrose führt.

Vor allem in unseren *in vitro* Daten hat sich eine Hochregulation von LEPREL1 auf mRNA-Ebene gezeigt und auch im TAC Model ist eine Hochregulation zu erkennen. Es stellt sich allerdings die Frage, inwieweit Kardiomyozyten der richtige Angriffspunkt für die Zielstruktur LEPREL1 sind oder ob ein therapeutischer Ansatz in Fibroblasten aussichtsreicher ist, da v.a. diese für die Kollagenproduktion bei Fibrose unter Herzinsuffizienz verantwortlich sind (16).

Bei der weiteren Untersuchung dieser Zielstruktur wäre auch hier ein AAV, der effektiv und spezifisch *in vitro* und *in vivo* Fibroblasten befällt, nützlich.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist über die Rolle von LEPREL1 im Herzen nichts bekannt.

4.1.3. Prolinhydrogenase (PRODH)

Zu Beginn unserer Arbeit ist noch nichts über die Rolle von PRODH in Herzzellen bekannt gewesen. Aufgrund seiner zentralen Rolle im Abbau der Aminosäure Prolin (Seite 9 in vorliegender Arbeit) könnte eine Überexpression von PRODH weitreichende Folgen für den Zellmetabolismus haben. So könnte die Übertragung von Elektronen auf die Elektronentransportkette bei der Oxidation von Prolin zu P5C und die Nutzung des Abbauproduktes Glutamat im Citratzyklus zur Energiegewinnung genutzt werden (45). Dies könnte die bei Herzinsuffizienz bekannte ATP-Defizienz (23) ausgleichen und eine alternative Energiequelle zum Glukosemetabolismus darstellen. Ob dies auch Einfluss auf die bei Herzinsuffizienz auftretende mitochondriale Dysfunktion hat, ist eine weitere interessante Fragestellung.

Es ist bekannt, dass die Verfügbarkeit von Prolin Einfluss auf die Regulation der Kollagenproduktion haben kann (95). Wenn es also bei erhöhter Aktivität von PRODH zu einer Verringerung des Substrates Prolin käme, könnte dies daher Auswirkungen auf die Produktion

von Extrazellulärmatrix und insbesondere von Kollagenen haben. Dadurch könnte PRODH auch Einfluss auf die Fibrose bei Herzinsuffizienz haben.

In allen unseren untersuchten Modellen zur Herzinsuffizienz (TG- Calcineurin Mäuse, TG-Dyrk1a Mäuse, TAC operierte Mäuse, PE bzw. Endothelin-1 stimulierte NRVCN) hat sich eine deutliche und signifikante Herabregulation von PRODH im Gegensatz zur Kontrollgruppe gezeigt. Die gleichsinnige Regulation in all diesen Modellen bestärkt uns in der Einschätzung der Relevanz dieses Effekts. Gleichzeitig besteht ein breites Spektrum an Hypothesen über mögliche Effekte von PRODH auf die Pathogenese von Herzinsuffizienz. Daher haben wir uns für eine weitere Untersuchung von PRODH als mögliche therapeutische Zielstruktur bei Herzinsuffizienz entschieden.

4.1.4. Phosphatidylserin-Synthase 1 (PTDSS1)

PTDSS1 ist eine interessante Zielstruktur, da es die Synthese von Phosphatidylserin katalysiert, was eine Rolle bei vielen wichtigen Prozessen wie Apoptose und Blutgerinnung spielt (Seite 11 in vorliegender Arbeit).

In den verschiedenen Modellen für Herzinsuffizienz hat sich eine Herabregulation gezeigt. So war die PTDSS1 Expression im TAC-Modell deutlich und auch in den Dyrk1a1-TG Mäusen und in PE/Endothelin-1 stimulierten NRVCNs leicht verringert. Dass die Regulation in allen drei Modellen gleichsinnig ist, spricht für deren Bedeutsamkeit. Warum sie in dieser Form auftritt, bleibt allerdings unklar.

Eine mögliche Hypothese zur Nutzung von PTDSS1 als therapeutische Zielstruktur bei Herzinsuffizienz könnte sein, dass ein weiterer *Knock-down* von PTDSS1 zu verringerten Phosphatidylserinspiegeln führen kann. Dadurch wäre der Gesamtanteil von Phosphatidylserin in der Zellmembran verringert, wodurch Phosphatidylserin bei Apoptose in geringerem Maße in die äußere Lipiddoppelschicht wechseln kann. Dadurch könnte die apoptotische Signalweitergabe und das Phagozytosesignal an Makrophagen unterbunden werden und somit Herzgewebe erhalten bleiben.

Allerdings stellt sich die Frage, ob PTDSS1 in diesen Prozess überhaupt Einfluss hat, da noch weitere Regulationsmechanismen wie beispielsweise „Flippasen“ vorhanden sind (62). Außerdem besteht die Kritik, dass zur Beeinflussung der Apoptose wahrscheinlich die Wahl einer zentraleren Zielstruktur sinnvoller wäre. Des Weiteren sollte hinterfragt werden, ob es überhaupt sinnvoll ist, Apoptose bei kranken Zellen verhindern zu wollen. Vielleicht sollte ein Ansatzpunkt zur Therapie der Herzinsuffizienz nicht im Erhalt von Kardiomyozyten durch

alleinige Bewahrung vor Apoptose liegen, sondern vielmehr eine Funktionsverbesserung der vorhandenen Kardiomyozyten erreicht werden, um Apoptose erst gar nicht nötig zu machen. Da sich gezeigt hat, dass sich PTDSS1 defiziente Mäuse normal entwickeln (67), ist nicht davon auszugehen, dass sich eine Herabregulation beispielsweise mittels eines AAVs in Kardiomyozyten toxisch auf die Zellen auswirken könnte. Trotzdem ist unklar, ob PTDSS2 Funktionen von PTDSS1 in diesem Modell übernehmen könnte und so einen möglichen therapeutischen Effekt kaschiert. Aus diesen Gründen haben wir uns gegen eine weitere Untersuchung von PTDSS1 als therapeutische Zielstruktur entschieden.

4.1.5. Solute Carrier Family 1 Member 1 und 3 (SLC1A1 und SLC1A3)

In den Daten konnte außerdem eine Überexpression von SLC1A1 und SLC1A3 in verschiedenen Hypertrophie-Modellen gezeigt werden. Dies deckt sich mit Daten aus der Literatur (75). So waren SLC1A1 und SLC1A3 in PE und Endothelin-1 stimulierten NRVCs und in TG-Calcineurin-Mäusen überexprimiert. Einzig im TAC-Modell konnte aus unbekannten Gründen eine verminderte Expression von SLC1A1 festgestellt werden, während SLC1A3 wie in den anderen Herzinsuffizienzmodellen hochreguliert war.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass verglichen mit den anderen Zielstrukturen über die Rolle von SLC1A1 und SLC1A3 im Herzen schon relativ viel bekannt ist (75; 76; 77). In den meisten Publikationen stand dabei bislang vor allem die Kardioprotektivität durch Überexpression im Hinblick auf Ischämien und ATP Mangel im Vordergrund.

Eine andere Überlegung wäre, ob eine Hemmung von SLC1A1 oder SLC1A3 einen protektiven Einfluss auf die metabolische Umbauprozesse bei nicht ischämischer Herzinsuffizienz hat. Da es allerdings noch andere Mitglieder der SLC1 Familie gibt, die ähnliche Funktionen haben, bleibt zu beachten, dass eventuell diese die Funktionen von SLC1A1 oder SLC1A3 kompensatorisch übernehmen könnten.

Daher haben wir uns gegen die weitere Untersuchung von SLC1A1 oder SLC1A3 als Zielstruktur zur Beeinflussung von Herzinsuffizienz entschieden.

4.1.6. Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2A1 (SLCO2A1)

Da SLCO2A1 in den Entzündungspathomechanismus bei Herzinsuffizienz eingreifen könnte (Seite 12 in vorliegender Arbeit), ist es eine interessante Zielstruktur im Hinblick auf neue

therapeutische Ansätze der Herzinsuffizienz, denn wie eingangs erläutert spielt der Entzündungsmechanismus eine zentrale Rolle im Pathomechanismus der Herzinsuffizienz.

In den Daten dieser Arbeit konnte eine deutliche Hochregulation im TAC Modell, TG-Calcineurin-Mäusen und leichte Hochregulation in PE bzw. Endothelin-1 stimulierten NRVCs gezeigt werden. Die gleichsinnige Regulation in allen genannten Modellen macht einen zufälligen Zusammenhang unwahrscheinlich.

Zur weiteren Untersuchung von SLCO2A1 könnte sowohl eine *Knock-down* als auch eine weitere Überexpression interessant sein. Ein *Knock-down* könnte bei gleichbleibender Prostaglandinproduktion zu einer geringeren Freisetzung und geringeren Entzündungsreaktion führen. Eine weitere Überexpression hingegen könnte infolge einer erhöhten Clearance von Prostaglandinen durch den Prostaglandintransporter zu einem erhöhten intrazellulären Abbau über die 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (15-PGDH) führen (83). Da beide Mechanismen vorstellbar sind und über die Rolle von SLCO2A1 im Herzen nur wenig bekannt ist, wäre eine Untersuchung beider Ansätze sinnvoll.

4.2. Effekte durch Überexpression von PRODH in NRVCs

Bei den verschiedenen Tiermodellen zur Herzinsuffizienz, die zur Reevaluation des Screens genutzt wurden, hat es sich bei den Proben immer um Lysate ganzer Herzen gehandelt. Daher wurde zuerst die Expression von PRODH in NRVCs und Fibroblasten vergleichend betrachtet. Da PRODH in NRVCs vierfach höher exprimiert war, wurde entschieden die Funktionen und möglichen therapeutischen Effekte von PRODH zunächst in NRVCs weiter zu untersuchen. Um eine Überexpression von PRODH zu ermöglichen, erfolgte die Produktion eines AAV-Vektors. Dazu wurde ein AAV6 mit TnT-Promotor zur Expression von PRODH verwendet (AAV6-ssTnT-ProdH). AAV6-ssTnT-Luc, das zur Expression von Luciferase in infizierten Zellen führt, wurde als Kontrolle verwendet. Dies diente dazu, um mögliche Effekte auszuschließen, die durch die Virusinfektion bedingt sind.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass der produzierte AAV6-ssTnT-ProdH eine Überexpression von PRODH *in vitro* ermöglicht. Dieser Nachweis erfolgte zunächst auf mRNA Ebene durch qPCR sowie auf Proteinebene durch Westernblot. Dabei taten sich lange Zeit zahlreiche Probleme bei der Proteindetektion auf. Erst nach mehrfachem Wechsel auf einen funktionierenden Antikörper einer anderen Firma konnte erfolgreich natives und transgenes Protein in den Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine fast 10.000 fache

Überexpression von *Prodh* auf mRNA-Ebene und auch die Überexpression auf Proteinebene war sehr stark ausgeprägt. Eine möglicher Kritikpunkt kann an dieser Stelle sein, dass derart hohe Überexpressionen fern von jeglichen physiologischen Modellen sein könnten. Allerdings nehmen wir an, dass diese so starke relative Überexpression vor allem durch eine sehr geringe PRODH Grundexpression in Herzzellen entsteht. Gleichzeitig hat sich in den weiteren Versuchen auch herausgestellt, dass die Nutzung einer geringeren Menge AAV die Anzahl der infizierten Zellen deutlich reduziert. Daher wurde in den weiteren Versuchen eine Dosis des viralen Vektors von 10^5 Virusgenomen pro Zelle gewählt.

Durch Immunfluoreszenzmikroskopie konnte bestätigt werden, dass das überexprimierte PRODH in Mitochondrien lokalisiert ist, indem eine Kolo-kalisation mit der Mitochondrien anfärbenden Reagenz MitoTracker™ nachgewiesen wurde.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass die AAV vermittelte Überexpression ein valides Modell einer suffizienten Überexpression von PRODH in kardialen Mitochondrien ist und PRODH dort seine Funktion erfüllen sollte. Dies bildet die Grundlage für alle weiteren Versuche, die mögliche funktionelle Effekte von PRODH in Kardiomyozyten untersuchen sollen. Ob das transgene PRODH seine enzymatische Funktion genau wie das native PRODH erfüllt, bleibt hier allerdings offen.

4.2.1. Einfluss von PRODH auf Apoptose

Zunächst wurde deutlich, dass eine Überexpression von PRODH auch auf hohe relative Spiegel nicht toxisch auf NRVCs wirkt. So konnte durch TUNEL-Assay nachgewiesen werden, dass die Anzahl der apoptotischen Zellen durch Infektion mit AAV6-ssTnT-*Prodh* nicht zunimmt. Dies ist vergleichbar mit Ergebnissen aus aktueller Literatur. Wang et al. beschrieben 2020, dass eine adenovirale Überexpression von *Prodh* in der Ratten-Kardiomyozyten-Zelllinie H9c2 unter hypoxischen Bedingungen sogar zu einer reduzierten Anzahl von apoptotischen Zellen führt, verglichen mit der Infektion durch Kontrollvirus unter ebenfalls hypoxischen Bedingungen (48).

4.2.2. Einfluss von PRODH auf Zellgrößen und Hypertrophie

Der Einfluss auf eine Hypertrophie von NRVCs wurde auf mRNA Ebene im Hinblick auf das hypertrophe Genprogramm untersucht. Zunächst zeigte sich, dass PE-Stimulation zu einer Hochregulation von *Nppa*, *Nppb* und *Rcan* führte. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass durch die PE-Stimulation eine Hypertrophie-Induktion in den verschiedenen Versuchen

erreicht wurde, da bereits von anderen Autoren gezeigt wurde, dass Hochregulation des hypertrophen Genprogramms mit Hypertrophie verbunden ist (13).

Allerdings war durch die Überexpression von PRODH mittels AAV kein Effekt auf *Nppa*, *Nppb*, *Rcan* Expression sichtbar. Dies kann zum einen bedeuten, dass PRODH keinen Effekt auf das Genexpressionsprogramm bei Hypertrophie hat. Zum anderen muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass die Anzahl der erfolgreich infizierten Zellen oft eine Problematik darstellte. Wie sich in den immunfluoreszenzmikroskopischen Versuchen deutlich wurde, war oft ein großer Anteil der Kardiomyozyten nicht oder nur gering infiziert. Daher könnten mögliche Effekte des PRODHs auf Hypertrophie und das hypertrophe Genprogramm durch nicht infizierte Zellen kaschiert worden sein.

Daher erfolgte eine weitere Untersuchung der Hypertrophie mittels Zellgrößenmessung. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass Stimulation durch den $\alpha 1$ -Adrenorezeptor Agonisten PE wie angenommen zu einer Erhöhung der Zellgröße führt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression von PRODH zu einer signifikanten Reduktion der Zellgrößen von Kardiomyozyten führt. Dieser Effekt trat sowohl bei mit PE stimulierten Zellen als auch bei nicht mit PE stimulierten Zellen auf. Dies lässt annehmen, dass PRODH wahrscheinlich nicht direkt spezifisch in die G-protein gekoppelte Hypertrophie Signaltransduktionskaskade eingreift, die durch PE stimuliert wird. Trotzdem ergaben sich deutliche Effekte, die von therapeutischem Nutzen sein könnten.

Gleichzeitig konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf Zellsterben zurückzuführen ist, denn zuvor konnte festgestellt werden, dass eine PRODH Überexpression zu keinem Anstieg von Apoptose führt (TUNEL-Assay, Seite 62 dieser Arbeit).

Allerdings zeigten sich bei der Messung der Zellgrößen methodische Probleme, da trotz der Virusmenge von 10^5 Virusgenomen pro Zelle viele Zellen nicht durch den AAV PRODH infiziert wurden. Daher erfolgte eine Parallelfärbung von PRODH. Nur Zellen, die eine PRODH Überexpression aufwiesen, wurden bei den Zellgrößenmessungen berücksichtigt.

4.2.3. Einfluss von PRODH auf reaktive Sauerstoffspezies

Wie in der Einleitung erwähnt, nehmen Reaktive Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle bei der Herzinsuffizienz ein und können mitochondriale Dysfunktion bedingen (24; 25).

Durch die Messungen in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRODH Überexpression in Kardiomyozyten zu einer verringerten Produktion von mitochondrialer Sauerstoffspezies führt. Dies könnte einen therapeutischen kardioprotektiven Effekt haben.

Allerdings ist anzumerken, dass hier im Gegensatz zu anderen Publikationen PE zu einer Abnahme der Superoxidspiegel geführt hat, während in der Literatur PE zu einer Zunahme der Superoxidspiegel führt (96; 97). Daher muss die gesamte Messung kritisch betrachtet werden. In der Literatur finden sich auch widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss von PRODH auf Superoxidspiegel. Es ist beschrieben, dass eine PRODH Überexpression in verschiedenen Krebszelllinien eine erhöhte ROS Produktion bedingt (98; 99). Allerdings finden sich in neueren Publikationen über Effekte von PRODH in Herzzellen Ergebnisse, die mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar sind. So führt in human Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen eine PRODH Überexpression zu geringeren ROS-Spiegeln unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (47). Auch in einer Ratten Kardiomyozyten Zelllinie konnte gezeigt werden, dass PRODH Überexpression in verringerte ROS-Spiegeln resultiert (48).

Daher kann bei Zusammenführung von Daten aus der Literatur und den Daten dieser Arbeit davon ausgegangen werden, dass PRODH in Herzzellen einen protektiven Effekt gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies haben könnte. Dies könnte auch therapeutische Effekte auf das kardiale *Remodeling* in zukünftigen *in vivo* Versuchen nahelegen.

4.2.4. Fazit zu Effekten von PRODH in NRVCs sowie weiteren potentiellen therapeutischen Zielstrukturen

Nach dem Nachweis von erfolgreicher AAV-vermittelter *in vitro* Überexpression von PRODH in Mitochondrien von NRVCs konnte gezeigt werden, dass PRODH Effekte auf Zellgröße, Apoptose und ROS Spiegel hat.

Die Ergebnisse sind vereinbar mit Ergebnissen anderer Publikationen, die im Laufe dieser Arbeit erschienen sind. Diese untersuchen zwar auch die Rolle von PRODH im Herzen, legen allerdings ihren Focus auf Infarktgeschehen und Hypoxie (47; 48), während in dieser Arbeit auch Einflüsse auf Hypertrophie untersucht wurden. Daher sehen wir uns zu Teilen aufgrund dieser Publikationen in unseren Daten bestätigt.

Eine weitere Untersuchung von PRODH ist von Interesse. Um mögliche Effekte von PRODH u.a. auf Hypertrophie und kardiales *Remodeling in vivo* zu prüfen, könnte das TAC-Modell, das auch eingangs zur Identifizierung von PRODH als mögliches Target von Herzinsuffizienz geführt hat, verwendet werden. Gleichzeitig muss diskutiert werden, ob diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Es ist bereits beschrieben, dass die PRODH Expression auch

in humanen Proben mit ischämischer und nicht ischämischer Herzinsuffizienz deutlich herabreguliert ist (47).

Außerdem ist die Rolle von PRODH in kardialen Fibroblasten noch weitestgehend unbekannt. Mithilfe neuer effektiver und spezifischer AAVs könnten hier Fortschritte erzielt werden. Dabei könnte geprüft werden, inwieweit PRODH zu einer Seneszenz auch in kardialen Fibroblasten führen kann, was bereits aus anderen Versuchen bekannt ist (99; 100). Außerdem gilt zu untersuchen, ob PRODH durch die Verwendung von Prolin als Substrat Einfluss auf die ebenfalls Prolin verbrauchende Kollagenproduktion hat, die im Wesentlichen zur Fibrose bei Herzinsuffizienz beiträgt.

Außerdem ist die Untersuchung weiterer potenzieller therapeutischer Zielstrukturen (z.B. NQO1, SLCO2A1) und deren Rolle bei Herzinsuffizienz von Interesse.

4.3. AAV9-SLR als mögliches Fibroblasten infizierendes Adeno-assoziiertes Virus

Es konnte gezeigt werden, dass AAV9-SLR *in vitro* kardiale Fibroblasten effektiv transduziert. Allerdings konnte fluoreszenzmikroskopisch nicht nachgewiesen werden, dass auch *in vivo* kardiale Fibroblasten infiziert werden. Ursachen könnten sein, dass die AAV-Vektorkonzentration, die schließlich im Herzen und in der Umgebung der Fibroblasten *in vivo* erreicht wird, deutlich geringer ist als *in vitro*. Außerdem könnte die Menge an gebildetem GFP in den Fibroblasten zu gering für eine Detektion sein. Zudem muss diskutiert werden, ob methodische Probleme vorlagen, wie beispielsweise unzureichend erfolgreiche Injektion in die Schwanzvene der Maus oder unzureichende Anfärbbarkeit von GFP durch den GFP Antikörper bedingt durch geringe GFP Konzentrationen. Gleichzeitig stellt sich die Frage, wie spezifisch das AAV9-SLR Zellen befällt und ob noch weitere Zelltypen befallen werden. Dies könnte in weiteren Experimenten oder therapeutischen Ansätzen mit AAV9-SLR zu Artefakten führen. Effekte auf Fibroblasten könnten durch Effekte in anderen Zelltypen verschleiert werden oder nicht vorhandene suggeriert werden. Trotzdem bleibt AAV9-SLR ein interessanter Vektor, dessen Eigenschaften weiter untersucht werden sollten und mit dessen Hilfe die Funktionen verschiedener Zielstrukturen wie bspw. von PRODH in kardialen Fibroblasten zumindest *in vitro* idealerweise unter Verwendung eines Fibroblasten-spezifischen Promotors charakterisiert werden könnten.

5. Zusammenfassung

Fragestellung dieser Arbeit ist die Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen zur Behandlung der Herzinsuffizienz. Gegeben waren zu Beginn der Arbeit die Ergebnisse eines vorausgegangenen Screens in Zusammenarbeit mit der Firma Metanomics Health GmbH, der Aortenkonstriktion als etabliertes Modell für eine erhöhte Druckbelastung des Herzens mit daraus folgender linksventrikulärer Hypertrophie und resultierender Herzinsuffizienz in Mäusen nutzte.

Auf Grundlage dieser Daten erfolgte zunächst eine Validierung der im Screen gefundenen Gene in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen der Herzinsuffizienz.

Im Folgenden wurde eine potenzielle Zielstruktur ausgewählt und deren Effekte in ventrikuläre Kardiomyozyten aus neonatale Ratten weiter zu untersucht. Dazu wurde in dieser Arbeit das Enzym Prolindehydrogenase ausgewählt, über dessen Rolle in Kardiomyozyten zu Beginn dieser Arbeit unbekannt war.

Prolindehydrogenase spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus von Prolin. Es ist das erste Enzym beim Abbau von Prolin. Es ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und katalysiert die Oxidation von Prolin zu Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylsäure. Dabei können Elektronen auf Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) übertragen werden, das die Elektronen auf die mitochondriale Elektronen Transport Kette weitergeben kann, um ATP zu produzieren. Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylsäure kann gleichzeitig nichtenzymatisch zu Glutamatsemialdehyd reagieren. Glutamatsemialdehyd kann in einem weiteren Schritt durch das Enzym Pyrrolin-5-carboxylatdehydrogenase zu Glutamat abgebaut werden. Dabei werden Elektronen auf Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) übertragen. Das entstandene Glutamat kann über α -Ketoglutarat in den Citratzyklus aufgenommen werden und zur weiteren ATP Produktion genutzt werden.

Um Effekte von Prolindehydrogenase in ventrikulären Rattenkardiomyozyten zu untersuchen, wurde ein adenoassoziertes Virus des Serotyps 6 zur Überexpression von Prolindehydrogenase hergestellt und in seiner Funktion überprüft, indem die Überexpression auf mRNA-Ebene, Protein-Ebene sowie die zelluläre Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch in Mitochondrien nachgewiesen wurde.

Anschließend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Prolindehydrogenase zu einer signifikanten Abnahme des Zellwachstums infolge eines hypertrophen Stimulus führt. Apoptose als mögliche Ursache konnte ausgeschlossen werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Prolindehydrogenase eine Abnahme der mitochondrialen Sauerstoffspezies

bedingt. Diese *in vitro* Ergebnisse bestätigen, dass Prolindehydrogenase eine mögliche neue therapeutische Zielstruktur zur Behandlung von Herzinsuffizienz darstellen könnte. Daher sind weitere Untersuchungen in *in vivo* Modellen zur weiteren Evaluation der Zielstruktur sinnvoll. Außerdem ist die Rolle von Prolindehydrogenase in kardialen Fibroblasten unbekannt. Um diese weiter zu untersuchen zu können, sind etablierte Modelle zur *in vitro* als auch *in vivo* Regulation von Zielstrukturen in kardialen Fibroblasten notwendig. Dazu wurden verschiedene Varianten von adenoassoziierten Viren verschiedener Serotypen zunächst *in vitro* immunfluoreszenzmikroskopisch bezüglich deren Transduktion von kardialen Fibroblasten getestet. Dabei zeigte sich eine Transduktion durch die Variante AAV9-SLR. Dies konnte durchflusszytometrisch bestätigt werden. Im Folgenden konnte allerdings immunfluoreszenzmikroskopisch keine Transduktion von kardialen Fibroblasten *in vivo* nachgewiesen werden. Trotzdem ist AAV9-SLR aufgrund der vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse als erfolgsversprechender Kandidat zur Transduktion von kardialen Fibroblasten zu benennen und seine Eignung sollte *in vivo* weiter untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Vos, T., Flaxman, A.D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., Aboyans, V., Abraham, J., Ackerman, I., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., Ali, M.K., Alvarado, M., Anderson, H.R., Anderson, L.M., Andrews, K.G., Atkinson, C., Baddour, L.M., Bahalim, A.N. et al. (2012) Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380(9859), 2163-96.
2. Mosterd, A., Hoes, A.W. (2007) Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 93(9), 1137-46.
3. Bleumink, G.S., Knetsch, A.M., Sturkenboom, M.C., Straus, S.M., Hofman, A., Deckers, J.W., Witteman, J.C., Stricker, B.H. (2004) Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 25(18), 1614-9.
4. Lloyd-Jones, D.M., Larson, M.G., Leip, E.P., Beiser, A., D'Agostino, R.B., Kannel, W.B., Murabito, J.M., Vasan, R.S., Benjamin, E.J., Levy, D. (2002) Framingham Heart Study. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 106(24), 3068-72.
5. Gerber, Y., Weston, S.A., Redfield, M.M., Chamberlain, A.M., Manemann, S.M., Jiang, R., Killian, J.M., Roger, V.L. (2015) A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med*. 175(6), 996-1004.
6. Authors/Task Force Members: McDonagh, T.A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R.S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Crespo-Leiro, M.G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A.W., Jaarsma, T., Jankowska, E.A., Lainscak, M., Lam, C.S.P., Lyon, A.R., McMurray, J.J.V., Mebazaa, A., Mindham, R., Muneretto, C., Francesco Piepoli, M., Price, S., Rosano, G.M.C., Ruschitzka, F., Kathrine Skibellund, A.; ESC Scientific Document Group. (2022) 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 24(1):4-131.

7. **Ziaecian, B., Fonarow, G.C.** (2016) Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 13(6), 368-78.
8. **Levy, D., Larson, M.G., Vasan, R.S., Kannel, W.B., Ho, K.K.L.** (1996) The Progression From Hypertension to Congestive Heart Failure. *JAMA.* 275(20), 1557-62.
9. **Neuhauser, H.K., Adler, C., Rosario, A.S., Diederichs, C., Ellert, U.** (2015) Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in Germany 1998 and 2008-11. *Hum Hypertens.* 29(4), 247-53.
10. **Messerli, F.H., Rimoldi, S.F., Bangalore, S.** (2017) The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. *JACC Heart Fail.* 5(12), 948.
11. **Slivnick, J., Lampert, B.C.** (2019) Hypertension and Heart Failure. *Heart Fail Clin.* 15(4), 531-541.
12. **Frey, N., Olson, E.N.** (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 65, 45-79.
13. **Chien, K.R., Knowlton, K.U., Zhu, H., Chien, S.** 1991 Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* 5(15), 3037-46.
14. **Hall, C.** (2005) NT-ProBNP: the mechanism behind the marker. *J Card Fail.* 11(5 Suppl), S81-3.
15. **Berk, B.C., Fujiwara, K., Lehoux, S.** (2007) ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest.* 117(3), 568-75.
16. **González, A., Schelbert, E.B., Díez, J., Butler, J.** (2018) Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol.* 71(15), 1696-1706.
17. **Weber, K.T., Sun, Y., Bhattacharya, S.K., Ahokas, R.A., Gerling, I.C.** (2013) Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol.* 10(1), 15-26.
18. **Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H.M., Packer, M.** (1990) Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 323(4), 236-41.
19. **Bartekova, M., Radosinska, J., Jelemensky, M., Dhalla, N.S.** (2018) Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. *Heart Fail Rev.* 23(5), 733-758.
20. **Adamo, L., Rocha-Resende, C., Prabhu, S.D., Mann D.L.** (2020) Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 17(5), 269-285.

21. **Müller, O.J., Heckmann, M.B, Ding, L., Rapti, K., Rangrez, A.Y., Gerken, T., Christiansen, N., Rennefahrt, U.E.E., Witt, H., González Maldonado, S., Ternes, P., Schwab, D.M., Ruf, T., Hille, S., Remes, A., Jungmann, A., Weis, T.M., Kreußner, J.S., Gröne, H.J., Backs, J., Schatz, P., Katus, H.A., Frey N.** (2019) Comprehensive plasma and tissue profiling reveals systemic metabolic alterations in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 115(8), 1296-1305.
22. **Karwi, Q.G., Uddin, G.M., Ho, K.L., Lopaschuk, G.D.** (2018) Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart. *Front Cardiovasc Med.* 5, 68.
23. **Doenst, T., Nguyen, T.D., Abel, E.D.** (2013) Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res.* 113(6), 709-24.
24. **Belch, J.J., Bridges, A.B., Scott, N., Chopra, M.** (1991) Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J.* 65(5), 245-8.
25. **Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S.** (2011) Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301(6), H2181-90.
26. **Sabri, A., Hughie, H.H., Lucchesi, P.A.** (2003) Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal.* 5(6), 731-40.
27. **Kiyuna, L.A., Albuquerque, R.P.E., Chen, C.H., Mochly-Rosen, D., Ferreira, J.C.B.** (2018) Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. *Free Radic Biol Med.* 129, 155-168.
28. **Crabtree, G.R.** (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell.* 96(5), 611-4.
29. **Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., Olson, E.N.** (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 93(2), 215-28.
30. **Bueno, O.F., Wilkins, B.J., Tymitz, K.M., Glascock, B.J., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., Molkentin, J.D.** (2002) Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(7), 4586-91.
31. **Hilger, D., Masureel, M., Kobilka, B.K.** (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol.* 25(1), 4-12.
32. **Sakata, Y., Hoit, B.D., Liggett, S.B., Walsh, R.A., Dorn, G.W. 2nd.** (1998) Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation.* 97(15), 1488-95.

33. **Group, CONSENSUS Trial Study.** (1987) Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 316(23), 1429-35.
34. **Granger, C.B., McMurray, J.J., Yusuf, S., Held, P., Michelson, E.L., Olofsson, B., Ostergren, J., Pfeffer, M.A., Swedberg, K., CHARM Investigators and Committees.** (2003) Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet.* 362(9386), 772-6.
35. **Böhm, M., Young, R., Jhund, P.S., Solomon, S.D., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., Rouleau, J.L., Shi, V.C., Swedberg, K., Zile, M.R., Packer, M., McMurray, J.J.V.** (2017) Systolic blood pressure, cardiovascular outcomes and efficacy and safety of sacubitril/valsartan (LCZ696) in patients with chronic heart failure and reduced ejection fraction: results from PARADIGM-HF. *Eur Heart J.* 38(15), 1132-1143.
36. **deAlmeida, A.C., van Oort, R.J., Wehrens, X.H.** (2010) Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp.* (38), 1729.
37. **Abuzhalihan, J., Wang, Y.T., Ma, Y.T., Fu, Z.Y., Yang, Y.N., Ma ,X., Li, X.M., Liu, F., Chen, B.D.** (2019) SOAT1 methylation is associated with coronary heart disease. *Lipids Health Dis.* 18(1), 192.
38. **Chen, X., Xu, S., Zhao, C., Liu, B.** Role of TLR4/NADPH oxidase 4 pathway in promoting cell death through autophagy and ferroptosis during heart failure. (2019) *Biochem Biophys Res Commun.* 516(1), 37-43.
39. **D'Aniello, C., Patriarca, E.J., Phang J.M., Minchiotti, G.** (2020) Proline Metabolism in Tumor Growth and Metastatic Progression. *Front Oncol.* 10, 776.
40. **Tanner, J.J., Fendt, S.M., Becker, D.F.** (2018) The Proline Cycle As a Potential Cancer Therapy Target. *Biochemistry.* 57(25), 3433-3444.
41. **Zinkstok, J., Schmitz, N., van Amelsvoort, T., Moeton, M., Baas, F., Linszen, D.** (2008) Genetic variation in COMT and PRODH is associated with brain anatomy in patients with schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 7(1), 61-9.
42. **Willis, A., Bender, H.U., Steel, G., Valle, D.** (2008) PRODH variants and risk for schizophrenia. *Amino Acids.* 35(4), 673-9.
43. **Adams, E., Frank, L.** (1980) Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annu Rev Biochem.* 49, 1005-61.

44. **Phang, J.M.** (1985) The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr Top Cell Regul.* 25, 91-132.
45. **Adams, E.** (1970) Metabolism of proline and of hydroxyproline. *Int Rev Connect Tissue Res.* 5, 1-91.
46. **Natarajan, S.K., Zhu, W., Liang, X., Zhang, L., Demers, A.J., Zimmerman, M.C., Simpson, M.A., Becker, D.F.** (2012) Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. *Free Radic Biol Med.* 53(5), 1181-91.
47. **Moreira, J.B.N., Wohlwend, M., Fenk, S., Åmellem, I., Flatberg, A., Kraljevic, J., Marinovic, J., Ljubkovic, M., Bjørkøy, G., Wisløff, U.** (2019) Exercise Reveals Proline Dehydrogenase as a Potential Target in Heart Failure. *Prog Cardiovasc Dis.* 62(2), 193-202.
48. **Wang, J., Xue, Z., Hua, C., Lin, J., Shen, Z., Song, Y., Ying, H., Lv, Q., Wang, M., Zhou, B.** (2020) Metabolomic Analysis of the Ameliorative Effect of Enhanced Proline Metabolism on Hypoxia-Induced Injury in Cardiomyocytes. *Oxid Med Cell Longev.* 2020, 8866946.
49. **Ernster, L., Navazio, F.** (1958) Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chem Scand* . 12, 595-602.
50. **Brunmark, A., Cadenas, E., Lind, C., Segura-Aguilar, J., Ernster, L.** (1987) DT-diaphorase-catalyzed two-electron reduction of quinone epoxides. *Free Radic Biol Med.* 3(3), 181-8.
51. **Ross, D., Kepa, J.K., Winski, S.L., Beall, H.D., Anwar, A., Siegel, D.** (2000) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact.* 29(1-2), 77-97.
52. **Siegel, D., Bolton, E.M., Burr, J.A., Liebler, D.C., Ross, D.** (1997) The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharmacol.* 52(2), 300-5.
53. **Zhang, K., Chen, D., Ma, K., Wu, X., Hao, H., Jiang, S.** (2018) NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) as a Therapeutic and Diagnostic Target in Cancer. *J Med Chem.* 61(16), 6983-7003.
54. **Madajewski, B., Boatman, M.A., Chakrabarti, G., Boothman, D.A., Bey, E.A.** (2016) Depleting Tumor-NQO1 Potentiates Anoikis and Inhibits Growth of NSCLC. *Mol Cancer Res.* 14(1), 14-25.

55. **Järnum, S., Kjellman, C., Darabi, A., Nilsson, I., Edvardsen, K., Aman, P.** (2004) LEPREL1, a novel ER and Golgi resident member of the Leprecan family. *Biochem Biophys Res Commun.* 317(2), 342-51.
56. **Tiainen, P., Pasanen, A., Sormunen, R., Myllyharju, J.** (2008) Characterization of recombinant human prolyl 3-hydroxylase isoenzyme 2, an enzyme modifying the basement membrane collagen IV. *J Biol Chem.* 283(28), 19432-9.
57. **Vance, J.E., Tasseva, G.** (2013) Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 831(3), 543-54.
58. **Schick, P.K., Kurica, K.B., Chacko, G.K.** (1976) Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest.* 57(5), 1221-6.
59. **Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., Fujii, T.** (2016) Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ.* 23(6), 952-61.
60. **Zachowski, A., Henry, J.P., Devaux, P.F.** (1989) Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature.* 340(6228), 75-6.
61. **Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M.** (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 148(7), 2207-16.
62. **Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T.R., Matsuda, F., Nagata, S.** (2014) Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science.* 344(6188), 1164-8.
63. **Bervers, E.M., Comfurius, P., van Rijn, J.L., Hemker, H.C., Zwaal, R.F.** (1982) Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem.* 122(2), 429-36.
64. **Stone, S.J., Vance, J.E.** (2000) Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J Biol Chem.* 275(44), 34534-40.
65. **Tomohiro, S., Kawaguti, A., Kawabe, Y., Kitada, S., Kuge O.** (2009) Purification and characterization of human phosphatidylserine synthases 1 and 2. *Biochem J.* 418(2), 421-9.
66. **Hasegawa, K., Kuge, O., Nishijima, M., Akamatsu, Y.** (1989) Isolation and characterization of a Chinese hamster ovary cell mutant with altered regulation of phosphatidylserine biosynthesis. *J Biol Chem.* 264(33), 19887-92.

67. **Arikketh, D., Nelson, R., Vance, J.E.** (2008) Defining the importance of phosphatidylserine synthase-1 (PSS1): unexpected viability of PSS1-deficient mice. *J Biol Chem.* 283(19), 12888-97.
68. **Kanai, Y., Hediger, M.A.** (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 360(6403), 467-71.
69. **Kanai, Y., Cl  men  on, B., Simonin, A., Leuenberger, M., Lochner, M., Weisstanner, M., Hediger, M.A.** (2013) The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med.* 34(2-3), 108-20.
70. **Zerangue, N., Kavanaugh, M.P.** (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature.* 383(6601), 634-7.
71. **Li, W., Su, X., Chen, T., Li, Z., Yang, Y., Zhang, L., Liu, Q., Shao, M., Zhang, Y., Ding, M., Lu, Y., Yu, H., Fan, X., Song, M., Lv, L.** (2020) Solute Carrier Family 1 (SLC1A1) Contributes to Susceptibility and Psychopathology Symptoms of Schizophrenia in the Han Chinese Population. *Front Psychiatry.* 11, 559210.
72. **Shukla, T., Nadella, R.K., Taj M J, .R.J., Ganesh, S., Nestadt, G., Purushottam, M., Jain, S., Reddy, Y.C.J., Viswanath, B.** (2020) Association of SLC1A1 gene polymorphism with obsessive compulsive disorder in a sample from southern India. *Exp Clin Psychopharmacol.* 28(6), 617-621.
73. **Huang, X., Zhang, Q., Chen, X., Gu, X., Wang, M., Wu, J.** (2019) A functional variant in SLC1A3 influences ADHD risk by disrupting a hsa-miR-3171 binding site: A two-stage association study. *Genes Brain Behav.* 18(5), e12574.
74. **Bailey, C.G., Ryan, R.M., Thoeng ,A.D., Ng ,C., King, K., Vanslambrouck, J.M., Auray-Blais, C., Vandenberg, R.J., Br  er, S., Rasko, J.E.** (2011) Loss-of-function mutations in the glutamate transporter SLC1A1 cause human dicarboxylic aminoaciduria. *J Clin Invest.* 121(1), 446-53.
75. **King, N., Lin, H., McGivan, J.D., Suleiman, M.S.** (2004) Aspartate transporter expression and activity in hypertrophic rat heart and ischaemia-reperfusion injury. *J Physiol.* 556(Pt 3), 849-58.
76. **Piccirillo, S., Magi, S., Castaldo, P., Preziuso, A., Lariccia, V., Amoroso, S.** (2020) NCX and EAAT transporters in ischemia: At the crossroad between glutamate metabolism and cell survival. *Cell Calcium.* 86, 102160.
77. **Ralphe, J.C., Segar, J.L., Schutte, B.C., Scholz, T.D.** (2004) Localization and function of the brain excitatory amino acid transporter type 1 in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* 37(1), 33-41.

78. **Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billah, M.M., Hannun, Y.A.** (1991) Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* 5(7), 2068-77.
79. **Smith, W.L., Marnett, L.J., DeWitt, D.L.** (1991) Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther.* 49(3), 153-79.
80. **Seo, M.J., Oh, D.K.** (2017) Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 66, 50-68.
81. **Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D.** (2014) Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochim Pol.* 61(4), 639-49.
82. **Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F.** (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79(4), 1193-226.
83. **Samuelsson, B.** (1964) Metabolism of prostaglandin E, in guinea pig lung: the structure of two metabolites. *J Biol Chem.* 239, 4097-102.
84. **Kanai, N., Lu, R., Satriano, J.A., Bao, Y., Wolkoff, A.W., Schuster, V.L.** (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science.* 268(5212), 866-9.
85. **Chan, B.S., Satriano, J.A., Pucci, M., Schuster, V.L.** (1998) Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and *Xenopus* oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT". *J Biol Chem.* 273(12), 6689-97.
86. **Nakanishi, T., Nakamura, Y., Umeno, J.** (2021) Recent advances in studies of SLCO2A1 as a key regulator of the delivery of prostaglandins to their sites of action. *Pharmacol Ther.* 223, 107803.
87. **Umeno, J., Esaki, M., Hirano, A., Fuyuno, Y., Ohmiya, N., Yasukawa, S., Hirai, F., Kochi, S., Kurahara, K., Yanai, S., Uchida, K., Hosomi, S., Watanabe, K., Hosoe, N., Ogata, H., Hisamatsu, T., Nagayama, M., Yamamoto, H., Abukawa, D., Kakuta, F., Onodera, K., Matsui, T., Hibi, T., Yao, T., Kitazono, T., Matsumoto, T.; CEAS study group.** (2018) Clinical features of chronic enteropathy associated with SLCO2A1 gene: a new entity clinically distinct from Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 53(8), 907-915.
88. **Zhang, Z., Xia, W., He, J., Zhang, Z., Ke, Y., Yue, H., Wang, C., Zhang, H., Gu, J., Hu, W., Fu, W., Hu, Y., Li, M., Liu, Y.** (2012) Exome sequencing identifies SLCO2A1 mutations as a cause of primary hypertrophic osteoarthropathy. *Am J Hum Genet.* 90(1), 125-32.

89. **Hoggan, M.D., Blacklow, N.R., Rowe, W.P.** (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 55(6), 1467-74.
90. **Pacak, C.A., Mah, C.S., Thattaliyath, B.D., Conlon, T.J., Lewis, M.A., Cloutier, D.E., Zolotukhin, I., Tarantal, A.F., Byrne, B.J.** (2006) Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res.* 99(4), e3-9.
91. **Kirschner, J., Cathomen, T.** (2020) Gene Therapy for Monogenic Inherited Disorders. *Dtsch Arztebl Int.* 117(51-52), 878-885.
92. **Russell, S., Bennett, J., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K.A., Walshire, J., Kehoe, T.L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L.A., Hudson, F.P., Dingfield, L., Zhu, X., Haller, J.A., Sohn, E.H., Mahajan, V.B., Pfeifer, W., Weckmann, M., Johnson, C., Gewaily, D., Drack, A., Stone, E., Wachtel, K., Simonelli, F., Leroy, B.P., Wright, J.F., High, K.A., Maguire, A.M.** (2017) Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 390(10097), 849-860.
93. **Amoasii, L., Long, C., Li, H., Mireault, A.A., Shelton, J.M., Sanchez-Ortiz, E., McAnally, J.R., Bhattacharyya, S., Schmidt, F., Grimm, D., Hauschka, S.D., Bassel-Duby, R., Olson, E.N.** (2017) Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* 9(418), ean8081.
94. **Hille, S., Dierck, F., Kühl, C., Sosna, J., Adam-Klages, S., Adam, D., Lüllmann-Rauch, R., Frey, N., Kuhn, C.** (2016) Dyrk1a regulates the cardiomyocyte cell cycle via D-cyclin-dependent Rb/E2f-signalling. *Cardiovasc Res.* 110(3), 381-94.
95. **Karna, E., Szoka, L., Huynh, TYL., Palka, J.A.** (2020) Proline-dependent regulation of collagen metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 77(10), 1911-1918.
96. **Javadov, S., Baetz, D., Rajapurohitam, V., Zeidan, A., Kirshenbaum, L.A., Karmazyn, M.** (2006) Antihypertrophic effect of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 inhibition is mediated by reduced mitogen-activated protein kinase activation secondary to improved mitochondrial integrity and decreased generation of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther.* 317(3), 1036-43.

97. **Purushothaman, S., Nair, R.R.** (2016) Mitoprotective antioxidant EUK-134 stimulates fatty acid oxidation and prevents hypertrophy in H9C2 cells. *Mol Cell Biochem.* 420(1-2), 185-94.
98. **Donald, S.P., Sun, X.Y., Hu, C.A., Yu, J., Mei, J.M., Valle, D., Phang, J.M.** (2001) Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res.* 61(5), 1810-5.
99. **Nagano, T., Nakashima, A., Onishi, K., Kawai, K., Awai, Y., Kinugasa, M., Iwasaki, T., Kikkawa, U., Kamada, S.** (2017) Proline dehydrogenase promotes senescence through the generation of reactive oxygen species. *J Cell Sci.* 130(8), 1413-1420.
100. **Nagano, T., Nakano, M., Nakashima, A., Onishi, K., Yamao, S., Enari, M., Kikkawa, U., Kamada, S.** (2016) Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci Rep.* 6, 31758.
101. **Kain, D., Amit, U., Yagil, C., Landa, N., Naftali-Shani, N., Molotski, N., Aviv, V., Feinberg, M.S., Goitein, O., Kushnir, T., Konen, E., Epstein, F.H., Yagil, Y., Leor, J.** (2016) Macrophages dictate the progression and manifestation of hypertensive heart disease. *Int J Cardiol.* 203, 381-95.
102. **Shirazi, L.F., Bissett, J., Romeo, F., Mehta, J.L.** (2017) Role of Inflammation in Heart Failure. *Curr Atheroscler Rep.* 19(6), 27.

7. Anhänge

7.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete primäre Antikörper	22
Tabelle 2: verwendete sekundäre Antikörper.....	22
Tabelle 3: verwendete Zellkulturplatten für Experimente mit NRVCs.....	33
Tabelle 4: verwendete Zellkulturplatte für Versuche mit kardialen Fibroblasten.....	35
Tabelle 5: PCR Ansatz zur Klonierung des Prodh Vektorplasmids.....	38
Tabelle 6: Temperaturschema der PCR zur Klonierung des Prodh Vektorplasmids	38
Tabelle 7: Ansatz Kolonie-PCR	40
Tabelle 8: Temperaturschema Kolonie-PCR	40
Tabelle 9: Reaktionsansatz der qPCR mit SYBR Green Super Mix.....	45
Tabelle 10: Temperaturschema qPCR mit SYBR Green Super Mix	46
Tabelle 11: Reaktionsansatz der qPCR Multiplex	46
Tabelle 12: Temperaturschema Multiplex qPCR.....	46

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: zusammenfassende Abbildung zu den Mechanismen bei Herzinsuffizienz	3
Abbildung 2 Vorgehen zur Identifizierung und Validierung neuer therapeutischer Zielstrukturen bei Herzinsuffizienz;	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Metabolismus von Prolin und Funktion von PRODH	9
Abbildung 4: Plasmid: pSSV9-TnT-RnProdh (5945bp)	41
Abbildung 5: Relative mRNA Expression der zu validierenden Zielstrukturen in NRVCs 54	
Abbildung 6: Relative mRNA Expression potenzieller Zielstrukturen in TAC operierten Mäusen	55
Abbildung 7: Relative mRNA Expression potenzieller Zielstrukturen in TG-Dyrk1a-Mäusen	55
Abbildung 8: Relative mRNA Expression potenzieller Zielstrukturen in TG-Calcineurin-Mäusen	55
Abbildung 9: Prodh Expression in verschiedenen in vivo Herzinsuffizienz Mausmodellen...	57
Abbildung 10: PRODH Proteinexpression in TG-Calcineurin-Mäusen (TG-CnA) im Vergleich zu Wildtypkontrollen (WT) (A) Banden im Westernblot; (B) statistische Auswertung	58
Abbildung 11 Relative PRODH-mRNA Expression in neonatalen Fibroblasten und NRVCs	58
Abbildung 12: PRODH Expression in NRVCs nach Infektion mit AAV6-ssTnT-Prodh....	59
Abbildung 13: Repräsentative Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines durch AAV6-ssTnT-Prodh infizierten NRVC	60
Abbildung 14: Einfluss einer PRODH Überexpression auf das Hypertrophe Genprogramm in NRVCs	61
Abbildung 15: Zellgrößen von NRVCs in μm^2 nach Infektion mit AAV6-ssTnT-Prodh....	62
Abbildung 16: Anteil TUNEL positiver NRVCs in % nach Infektion mit AAV6-ssTnT-Prodh	63
Abbildung 17: relative Menge mitochondrialer Superoxide in NRVCs nach Infektion mit AAV6-ssTnT-Prodh (PRODH)	64
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Bestimmung der relativen Menge GFP positiver Fibroblasten	65
Abbildung 19: Beispielhafte durchflusszytometrische Messung von mit AAV9-WT infizierten kardialen Fibroblasten.....	65

7.3. Publikationen

Nitsche, T., Hille, S., Remes, A., Borowski, C., Burmeister, W., Frank, D., Frey, D., Muller, O.J.: Proline dehydrogenase (PRODH) as a metabolic target in cardiac health, Posterbeitrag mit Abstract, Annual Congress of the Heart Failure Association of European Society of Cardiology online 2021

7.4. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof Dr. med. Oliver Müller für die Bereitstellung des Themas, die ständige Ansprechbarkeit, die wissenschaftliche Unterstützung und das gegebene Vertrauen bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Susanne Hille für die qualifizierte, stetige Betreuung meiner Arbeit und strukturierte Anleitung im Labor. Außerdem danke ich Dr. rer. nat. Anca Remes, die stets mit Ratschlägen, Unterstützung und aufmunternden Worten zur Seite stand. Zudem danke ich allen Mitarbeitern der Molekularen Kardiologie in Kiel für ihre ständige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Christopher Borowski, Wiona Burmeister, Angela Lorenzen und Susanne Hille für die Herstellung der in dieser Arbeit genutzten viralen Vektoren sowie die Hilfestellung bei der Klonierung des Prodh-Vektorplasmids.

Am meisten danke ich meinen Eltern und meiner Schwester sowie meinen Großeltern für ihre bedingungslose Unterstützung und ihren Rückhalt, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.