

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

Charakterisierung der STE20-Kinase MST4 – einem Bestandteil von STRIPAK-Komplexen – im Kontext der Entwicklung und Progression der humanen Herzinsuffizienz

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

vorgelegt von
Marius Benedikt Leye
aus Hamburg

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Norbert Frey

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Baukrowitz

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.02.2025

gez.: Prof. Dr. med. Norbert Frey

Vorsitzender der Prüfungskommission

Für meine Eltern, die meine Neugier geweckt haben.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz, Kardiomyopathien und Hypertrophie	1
1.1.1 Epidemiologie von Kardiovaskulären Erkrankungen	1
1.1.2 Herzinsuffizienz	2
1.1.3 Kardiomyopathien	3
1.1.4 Kardiale Hypertrophie	5
1.2 Molekulare Signalwege	6
1.2.1 Kardiales fetales Genprogramm	6
1.2.2 Calcineurin und NFAT	7
1.2.3 Hippo-Signalweg	8
1.2.4 Proteinkinase C	9
1.2.5 Apoptose	9
1.3 Striatin interagierende Phosphatase und Kinase Komplexe (STRIPAK-Komplexe)	11
1.4 Mammalian STE20-like kinase 4 (MST4)	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Enzyme	25
2.1.4 Puffer und Lösungen	25
2.1.5 Zellmedien	29
2.1.6 Antikörper	30
2.1.7 Kits	32
2.1.8 Primer	32
2.1.9 Short interfering RNA (siRNA)	34
2.1.10 Adenovirale Konstrukte	34
2.1.11 Zelllinien	34
2.1.12 Versuchstiere	34
2.1.13 Humane Proben	36
2.1.14 Software	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten	37
2.2.2 Isolation adulter Rattenkardiomyozyten	39
2.2.3 Generierung rekombinanter Adenoviren	41
2.2.4 Vermehrung von Adenoviren in HEK-293A-Zellen	43
2.2.5 Überexpression von MST4	45
2.2.6 Knockdown von MST4	47
2.2.7 Behandlung von Zellen mit Hesperadin	48
2.2.8 Behandlung von Zellen mit Phenylephrin	49

2.2.9	Behandlung von Zellen mit biomechanischer Dehnung „Stretch“	49
2.2.10	Kultivierung von Zellen in Hypoxie	50
2.2.11	RNA-Isolation	51
2.2.12	cDNA-Synthese und quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	52
2.2.13	Proteinisolation	55
2.2.14	Proteinkonzentrationsbestimmung (Bio-Rad DC Protein-Assay)	56
2.2.15	Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford Protein-Assay)	57
2.2.16	SDS-PAGE und Western Blot.....	57
2.2.17	Co-Immunpräzipitation.....	61
2.2.18	Immunzytochemie & Immunhistochemie	62
2.2.19	Zellgrößenbestimmung.....	63
2.2.20	Färbung von gespaltener Caspase 3	64
2.2.21	Untersuchung von ARVCM mittels IonOptix®	64
2.2.22	MTT-Assay.....	66
2.2.23	Analyse des Phosphoproteoms	67
2.2.24	Statistische Auswertung	69
3	Ergebnisse.....	70
3.1	Expression von MST4 in verschiedenen Geweben.....	70
3.2	Expression von MST4 in humanen Herzen mit Herzinsuffizienz	70
3.3	Immunchemische Darstellung von MST4 in Kardiomyozyten und Myokard	71
3.4	Co-Immunpräzipitation von MST4	72
3.5	Expression von MST4 in verschiedenen Modellen von Kardiomyopathie und kardialer Hypertrophie	73
3.5.1	Expression von MST4 in Herzen von MLP-Knockout-Mäusen.....	73
3.5.2	Expression von MST4 in Herzen von Calsarcin-1-Knockout-Mäusen	75
3.5.3	Expression von MST4 in Herzen von Calcineurin-transgenen Mäusen	76
3.5.4	Expression von MST4 in Herzen von Mäusen nach Konstriktion der Aorta transversa	76
3.5.5	Expression von MST4 in NRVCN nach biomechanischer Dehnung „Stretch“	77
3.5.6	Expression von MST4 in NRVCN während Hypoxie	78
3.5.7	Expression von MST4 in NRVCN in Abhängigkeit von der Zelldichte.....	79
3.6	Auswirkungen der Überexpression von MST4, der Hemmung durch Hesperadin und des Knockdowns von MST4.....	81
3.6.1	Dosisfindung des generierten Adenovirus.....	81
3.6.2	Transfektionszeit der siRNA.....	83
3.6.3	Auswirkungen auf verschiedene Proteine der Apoptose	84
3.6.4	Anfärbung von gespaltener Caspase 3	87
3.6.5	Viabilitäts-Bestimmung mittels MTT-Assay.....	87
3.6.6	Auswirkung auf die Expression von TAZ	88
3.6.7	Bestimmung der Zellgröße	89
3.6.8	Auswirkungen auf die Expression fetaler Gene.....	90
3.6.9	Auswirkungen auf Kontraktilität und Calciumhaushalt	91
3.7	Auswirkungen der Überexpression von MST4 und der Hemmung durch Hesperadin auf das Phosphoproteom in NRVCN	96

3.7.1	Massenspektrometrie und explorative Datenanalyse.....	96
3.7.2	Funktionelle Analyse.....	98
3.7.3	Mögliche Kinasesubstrate von MST4.....	101
3.7.4	Am stärksten regulierte Proteine	105
4	Diskussion	107
4.1	MST4 ist eine kardiale STRIPAK-Kinase mit unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen	108
4.1.1	MST4 wird im Herzen exprimiert.....	108
4.1.2	Verschiedene subzelluläre Lokalisationen von MST4 in Kardiomyozyten	108
4.1.3	MST4 als Mitglied von STRIPAK-Komplexen in Kardiomyozyten.....	109
4.2	MST4-Expression wird unterschiedlich reguliert.....	111
4.3	Biologische Effekte durch MST4 in Kardiomyozyten	113
4.3.1	Experimentelle Veränderung der MST4-Expression und Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin.....	113
4.3.2	MST4 hemmt Apoptose	115
4.3.3	MST4 verursacht Hypertrophie	117
4.3.4	MST4 erhöht die Kontraktilität von Kardiomyozyten.....	118
4.3.5	Auswirkungen auf den Hippo-Signalweg	119
4.4	Kinasesubstrate von MST4 in Kardiomyozyten	120
4.4.1	MST4 als Kinasesubstrat von MST4	120
4.4.2	Weitere mögliche Kinasesubstrate von MST4.....	120
4.4.3	Vermehrte Phosphorylierung von PKC Kinasesubstraten	127
4.5	Durch MST4-Überexpression regulierte Proteine	129
4.5.1	Durch MST4-Überexpression vermehrt exprimierte Proteine	129
4.5.2	Durch MST4-Überexpression vermindert exprimierte Proteine	134
4.6	Ausblick.....	140
5	Zusammenfassung.....	143
6	Abstract	146
7	Veröffentlichungen.....	149
8	Literaturverzeichnis	150
9	Abbildungsverzeichnis	167
10	Tabellenverzeichnis	169
11	Danksagung.....	170
12	Anhang.....	171
12.1	Funktionelle Analyse	171
12.1.1	Kontrast 1 MST4 48 h vs. LacZ 48 h	171
12.1.2	Kontrast 2: MST4 72 h vs. LacZ 72 h	174
12.1.3	Kontrast 3: MST4 + Hes 72 h vs. LacZ 72 h	176
12.1.4	Kontrast 4: MST4 + Hes 72 h vs. MST4 72 h	178
12.1.5	Kontrast 5: (MST4 48 h vs. LacZ 48 h) vs. (MST4 72 h vs. LacZ 72 h).....	179
12.1.6	Kontrast 6: Unbehandelt 72 h vs. LacZ 72 h	182

II Abkürzungsverzeichnis

A		BÄK	Bundesärztekammer
Abb.	Abbildung	BCAT1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic
ACE	Angiotensin converting enzyme	BMP	Bone Morphogenetic Protein
ACTA1	Actin Alpha 1, Skeletal Muscle	bp	Basenpaar
ACTA2	Actin Alpha 2, Smooth Muscle (auch SMA)	BSA	Bovines Serumalbumin
ACTC1	Actin Alpha 1, Cardiac Muscle	C	
ACTN2	Actinin Alpha 2	c PARP1	Cleaved (gespaltenes) PARP1
AdLacZ	Adenovirus mit Konstrukt für β -Galactosidase	Ca ²⁺	Calcium
AdMST4	Adenovirus mit Konstrukt für MST4	CaMKIII	Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein Kinase III (auch EEF2K)
ADP	Adenosindiphosphat	CaMKII- δ	Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II δ
ADRA1A	Adrenergic receptor, alpha 1a	cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
AFAP1L1	Actin filament-associated protein 1 like 1	Caspase	CysteinyI-aspartate specific protease
ALDH2	Aldehyd Dehydrogenase 2	Cav1.2	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
AMPK	AMP-activated protein kinase	CAV3	Caveolin 3
ANOVA	Varianzanalyse	CAVIN2	Caveolae-associated protein 2
APAF1	Apoptotic protease-activating factor 1	CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
APC Protein	Adenomatöses Polyposis Coli Protein	CCM3	cerebral cavernous malformation 3 (auch PDCD10)
APS	Ammonium persulfate	CD44	Cluster of differentiation antigen 44
ARHGAP24	Rho GTPase-activating protein 24	Cdc42	Cell Division Cycle 42
ARVCM	Adulte Rattenventrikelkardiomyozyten	cDNA	Komplementäre DNA
ARVCM	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	CHK1	Checkpoint kinase 1
ATG4B	Autophagy Related 4B Cysteine Peptidase	CKMT2	Creatine kinase S-type, mitochondrial (auch KCRS)
ATP	Adenosintriphosphat	CnA	Calcineurin Untereinheit A
ATP1A3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 (auch AT1A3)	CNN1	Calponin-1
B		CNN2	Calponin-2
B2M	Beta-2-microglobulin	Co-IP	Co-Immunpräzipitation
		COL11A1	Collagen alpha-1(XI) chain

COQ8A	Atypical kinase COQ8A, mitochondrial	FCS	Fetales Kälberserum, auch Fetales bovines Serum (FBS)
CRYM	Ketimine reductase mu-crystallin	FC-Wert	Fold Change Wert (Vielfache Veränderung)
CS1	Calsarcin 1	FDPS	Farnesyl pyrophosphate synthase (auch FPS)
CST3	Cystatin C	FILIP1	Filamin-A-interacting protein 1 (auch FLIP1)
Ct	Cycle treshold	fl PARP1	Full-length (vollständiges) PARP1
CTGF	Connective tissue growth factor (auch CNN2)	FLNA	Filamin A
CTTNBP2	Cortactin Binding Protein 2	FZD1	Frizzled-1
CTTNBP2 NL	CTTNBP2 N-Terminal Like NL		
Cx43	Connexin 43 (auch GJA1)		
D		G	
DALY	Disability-adjusted Lifeyears	G	Gauge (Maßeinheit für Kanülengröße)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	GAIP	G Alpha Interacting Protein
DCM	Dilatative Kardiomyopathie	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser	GATA	GATA-binding factor (GATA ist die DNA-Sequenz Guanin, Adenin, Thymin Adenin)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	GCKII/III	Germinal Center Kinase II/III
DMSO	Dimethylsulfoxid	GIPC	GAIP-interacting protein, C-Terminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (auch DNS)	GJA1	Gap Junction Protein Alpha 1 (auch Connexin 43)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	GLUT4	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4 (auch SLC2A4)
DTT	Dithiothreitol	GM130	Golgi matrix protein 130
DUB	Deubiquitinase	GO_BP	Gene Ontology – biologische Prozesse
E		GO_CC	Gene Ontology – zelluläre Komponenten
E41L1	Band 4.1 like protein 1 (auch 4.1N, EPB4L1)	GO_MF	Gene Ontology – molekulare Funktionen
EAAT1	Excitatory amino acid transporter 1 (auch SLC1A3)	GP130	Glykoprotein 130 (auch IL6ST)
ECL	Enhanced chemiluminescence	GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	GTP	Guanosintriphosphat
EEF2K	Eukaryotische elongation factor 2 kinase (auch CaMKIII)		
EF2	Elongation factor 2	H	
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	H2AC6	Histone H2A type 1-C
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin-Familie		
F			
FADD	Fas-associated death domain		

HA12	RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain	IL6ST	Interleukin-6 receptor subunit beta (auch GP130)
HCM	Hypertrophische Kardiomyopathie	INO1	Inositol-3-phosphate synthase 1 (auch ISYNA1)
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel	J	
HEK293	Human embryonic kidney cells 293	JNK	c-Jun N-terminal kinases
HeLa-Zellen	Zervixkarzinomzellen „Henrietta Lacks“	JNK	Januskinase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffersubstanz	K	
Hes	Hesperadin	K	Tausend
HFmEF	Heart Failure with mid-range Ejection Fraction (Herzinsuffizienz mit mittlerer Auswurffraktion)	kDa	Kilodalton
HFpEF	Heart Failure with preserved Ejection Fraction (diastolische Herzinsuffizienz)	KHK	Koronare Herzkrankheit
HFREF	Heart Failure with reduced Ejection Fraction (systolische Herzinsuffizienz)	KO	Knockout
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1	L	
HLA	Humanes Leukozytenantigen	LacZ	β -Galactosidase
HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	LAMB2	Laminin subunit beta-2
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)	LATS1/2	Large Tumor Suppressor Kinase 1/2
I		LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
ICD	International Classification of Diseases	Lck	Lymphocyte Cell-Specific Protein-Tyrosine Kinase
ICM	ischämische Kardiomyopathie	LC-MS	Flüssigkeitschromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung
IE	Internationale Einheiten	LDLR	Low-density lipoprotein receptor
I _f	Funny current	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein (auch LGALS3BP, LG3BP)
IF	Immunfluoreszenz	LKB1	liver kinase B1 (auch STK11)
ifu	Infektiöse Einheit	LTCC	Spannungsabhängige Calcium-Kanäle vom L-Typ
IGF	Insulin Like Growth Factor	M	
IgG	Immunglobulin G	MAGI1	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1 (auch BAP1)
IL6	Interleukin 6	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
		MAP4K4	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4
		MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKAP-K1	Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 1	NCX1	Natrium-Calcium-Austauscher
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (auch MACS)	NF	Non-failing
MBP	Basisches Myelinprotein	NFAT	Nuclear factor of activated T cells
MEF-2	Myocyte enhancer factor	NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
MHC	Myosin Heavy Chain (auch MYH)	NP-40	Nonyl phenoxypolyethoxyethanol
MHC	Major histocompatibility complex	NPPA	Natriuretic Peptide A (auch ANP, ANF)
MINK1	Misshapen-like kinase 1	NPPB	Natriuretic Peptide B (auch BNP)
Mio	Millionen	NRT	No reverse transcriptase
MKK1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	NRVCM	Neonatale Rattenventrikelkardiomyozyten
MLP	Muscle Lim Protein	NTC	No-template-control
MO25	Mouse protein 25	NT-Pro-BNP	N-terminal pro B-type natriuretic peptide
Mob	Mps One Binder	NYHA	New York Heart Association
MOB1A/B	Mob Kinase Activator 1A/B	<hr/>	
moi	multiplicity of infection (ifu pro Zelle)	O	
Mps	monopolar spindle	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein 1
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore	ORF	Open reading frame
mRNA	Messenger RNA	<hr/>	
mRNA	Messenger RNA	P	
MST1-4	Mammalian sterile-20-like kinase 1-4	p38	Protein 38kDa
MST4	Mammalian STE20-like kinase 4, auch Serine/Threonine Kinase 26 (STK26)	PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
MT2A	Metallothionein-2	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	PCP4	Calmodulin regulator protein Purkinje Cell Protein 4 (auch PEP19)
MUC18	Cell surface glycoprotein MUC18 (auch MCAM, CD146)	PCR	Polymerasekettenreaktion
<hr/>		PDCD10	programmed cell death 10
N		PDLIM3	PDZ and LIM domain protein 3 (auch ALP)
n	Anzahl	PE	Phenyephurin
NA	Not applicable (unzutreffend)	PEA15	Astrocytic phosphoprotein PEA-15
nAB	No Antibody	PGC1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (auch PPARGC1A, PRGC1)
NCS	Neonatales Kälberserum		

PHK	Phosphorylase Kinase	RPL32	Large Ribosomal Protein 32
PIR	Pirin	RPLP0	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
PKA	Proteinkinase A	rpm	Umdrehungen pro Minute
PKC	Proteinkinase C	RRM2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 (auch RIR2)
PLM	Phospholemman	RYR2	Ryanodinrezeptor 2
PLN	Phospholamban		
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat		
pMST4	Phosphoryliertes MST4	S	
PP1	Protein Phosphatase 1	SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
PP2A	Protein-Phosphatase 2A	SARS	Severe acute respiratory syndrome
PPP1R14C	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14C (auch PP14C, KEPI)	SARS-CoV-2	SARS-Coronavirus 2
PVDF	Polyvinylidenfluorid	SAV1	Salvador Homolog 1
p-Wert	Signifikanzwert	SCMC2	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2 (auch SLC25A25, APC3)
Q		SDS	Natriumlaurylsulfat
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
R		SEM	Standardfehler
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systeme	SIKE	suppressor of IKK ϵ
Rac1	Rac Family Small GTPase 1	siMST4	siRNA gegen MST4
RBP1	Retinol-binding protein 1 (auch RET1)	siNeg	siRNA ohne Zielsequenz (Negativkontrolle)
RCAN	regulator of calcineurin (auch MCIP)	siPos	siRNA gegen GAPDH (Positivkontrolle)
RCM	restriktive Kardiomyopathie ohne Hypertrophie und Dilatation	siRNA	Short/small interfering RNA
Reg3 β	Regenerating islet-derived protein 3 beta	SLMAP	Sarcolemmal membrane-associated protein
RERE	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
RhoA	Ras Homolog Family Member A	SPS1	Sporulation-specific protein 1 (auch STK25, SOK1)
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay	SRF	Serum response factor
RISC	RNA-induced silencing complex	STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
RLGPB	Ral GTPase-activating protein subunit beta (auch RALGAPB)	STC1	Stanniocalcin-1
RNA	Ribonukleinsäure (auch RNS)	STK	Serine/Threonine Kinase
ROBO1	Roundabout homolog 1		

STRIP1	Striatin Interacting Protein 1 (auch FAM40A)	TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
STRIP2	Striatin Interacting Protein 2 (auch FAM40B, Myoscape)	U	
STRIPAK- Komplex	Striatin interagierende Phosphatase und Kinase Komplex	UBA	Ubiquitin-associated
STRN	Striatin	UBX	Ubiquitin regulatory X
STRN3	S/G ₂ nuclear autoantigen	UBXN1	UBX domain-containing protein 1 (auch SAKS1)
STRN4	Zinedin	UKSH Kiel	Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel
T		V	
T178	Threonin an Position 178	v/v	Volume per volume
TAC	Konstriktion der transversen Aorta	VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
TAGLN	Transgelin (auch SM22- α)	VLNC	Linksventrikuläre Noncompaction- Kardiomyopathie
TAGLN	Transgelin (auch SM22- α)	vs.	Versus (gegenübergestellt)
Taq	Thermus aquaticus	W	
TAZ	Transcriptional Coactivator with PDZ-Binding Motif	w/v	Weight per volume
TBST	Tris-buffered saline Tween 20	WB	Western Blot
TEF	Thyrotrophic Embryonic Factor	Wnt	Wingless and Int-1
TEMED	Tetramethylethylenediamine	WSF- Domäne	Aminosäuren Tryptophan, Serin, Phenylalanin
TG	Transgen	WT	Wildtype (Kontrolle)
TM9SF1	Transmembrane 9 superfamily member 1 (auch MP70)	X	
TMEM10 6B	Transmembrane protein 106B (auch T106B)	XIRP2	Xin actin-binding repeat- containing protein 2 (auch CMYA3)
TMT	Tandem- Atommassenmarkierungen	Y	
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α	YAP1	Yes-associated protein 1
Tnl	Troponin I	YLD	Years lived with Disability
TNNT2	Troponin T2, cardiac	YLL	Years of Life Lost
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6	YSK1	Yeast Sps1/Ste20-related Kinase 1

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz, Kardiomyopathien und Hypertrophie

1.1.1 Epidemiologie von Kardiovaskulären Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit der wichtigste Faktor für Mortalität und Morbidität und machen daher einen großen Teil der sogenannten Global Burden of Disease (globale Krankheitslast) aus. Die Disability-adjusted Lifeyears (DALYs) sind ein Parameter, der Mortalität und Morbidität kombiniert und quantifiziert. DALYs setzen sich zusammen aus den Lebensjahren, die durch Tod vor Erreichen der statistischen Lebenserwartung verloren gehen (Years of Life Lost, YLL) und den mit Beeinträchtigung gelebten Lebensjahren bis zur statistischen Lebenserwartung (Years lived with Disability, YLD). Über 15 % der weltweiten DALYs wurden 2019 durch Kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht. In Deutschland liegt dieser Anteil sogar bei über 18 %, allerdings knapp hinter onkologischen Ursachen (Roser & Ritchie, 2016). Noch größer ist die Bedeutung bei der Todesursache. Weltweit sind kardiovaskuläre Erkrankungen für über 32 % der Todesursachen verantwortlich, in Deutschland sogar über 37 % (Ritchie & Roser, 2018).

Anteile an der weltweiten Krankheitslast nach Ursache, 2019

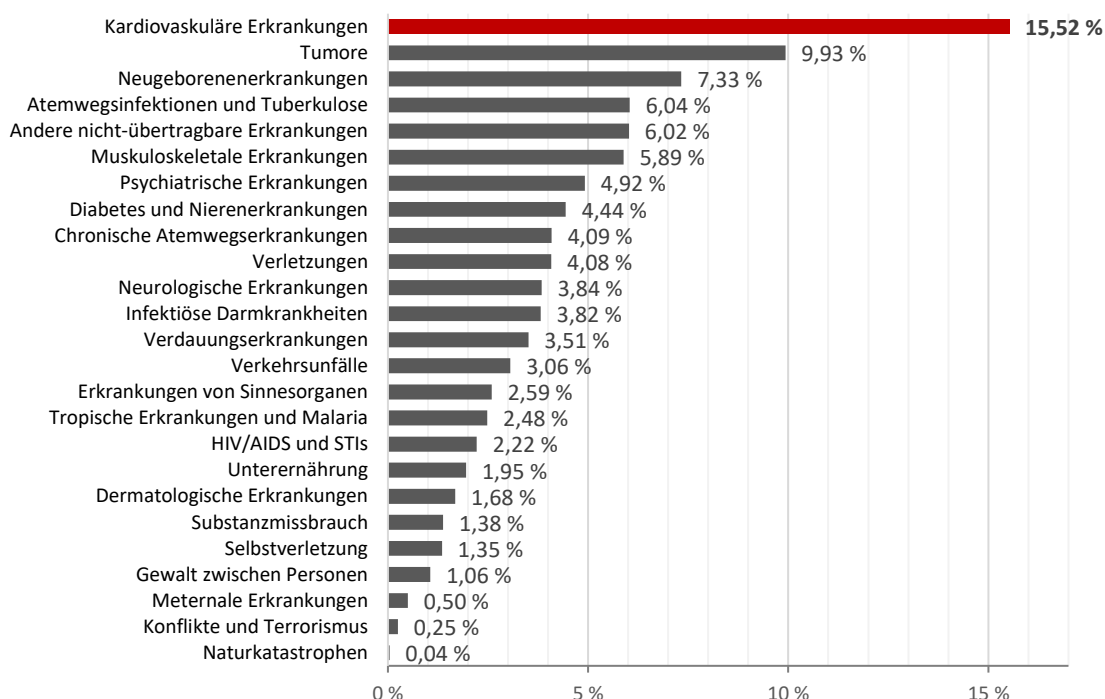


Abbildung 1-1: Kardiovaskuläre Erkrankungen haben den größten Anteil an der weltweiten Krankheitslast (adaptiert nach Roser & Ritchie, 2016)

Die weltweite Mortalität und Morbidität kann in DALYs (disability-adjusted life years) gemessen werden. Über 15 % der DALYs sind durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht. Daten auf [OurWorldInData.org/burden-of-disease](https://ourworldindata.org/burden-of-disease) Lizenz: CC BY.

In Deutschland war die Herzinsuffizienz (ICD-10 I50) 2019 mit 2,45 % der über 19 Millionen Diagnosen die häufigste Krankheitsdiagnose stationär behandelter Patientinnen und Patienten (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021). In den Diagnosedaten des Statistischen Bundesamtes taucht nur die ICD-10-Kennung für gesunde Neugeborene (ICD-10 Z38) häufiger auf. Die vollstationäre Hospitalisationsrate für Herzinsuffizienz ist in den vergangenen Jahren deutlich gestiegen und hat sich von 2000 bis 2019 um mehr als 40 % gesteigert auf 510 pro 100.000 Personen. Männer sind beinahe ein Drittel häufiger betroffen und die Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter. In Verbindung mit dem demografischen Wandel ist daher anzunehmen, dass die Belastung für Patientinnen und Patienten sowie für das Gesundheitssystem insgesamt zunehmen wird (Birner et al., 2021).

1.1.2 Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist ein akuter oder chronischer Zustand, bei dem das Herz nicht mehr in der Lage ist, den Körper mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Durch das unzureichende Herzzeitvolumen kann bei Belastung – im fortgeschrittenen Stadium auch in Ruhe – kein stabiler Stoffwechsel stattfinden. Es kommt zu kompensatorischen Reaktionen, z.B. zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems, die zu weitreichenden neurohumoralen und metabolischen Veränderungen führen.

Klinisch ist eine Herzinsuffizienz definiert durch die Kombination aus typischen Symptomen, z.B. Atemnot, Müdigkeit und Flüssigkeitseinlagerungen sowie einer kardialen Funktionsstörung.

Die Einteilung der Herzinsuffizienz findet klinisch nach drei verschiedenen Kriterien statt. Erstens kann nach dem betroffenen Teil des Herzens zwischen einer Links-, Rechts- oder Globalinsuffizienz differenziert werden. Zweitens gibt es die Einteilung in die akute und die chronische Form. Drittens unterscheidet man die systolische Herzinsuffizienz (Heart Failure with reduced Ejection Fraction, HFrEF), bei der die linksventrikuläre Pumpfunktion eingeschränkt ist, von der diastolischen Herzinsuffizienz (Heart Failure with preserved Ejection Fraction, HFpEF), bei der die diastolische Füllung eingeschränkt ist. Außerdem bildet sich in den letzten Jahren die Begrifflichkeit der Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter Auswurfraction (Heart Failure with mildly reduced Ejection Fraction, HFmrEF) heraus, die Charakteristika der beiden vorgenannten Formen verbindet, wohl aber am ehesten der HFrEF ähnelt (McDonagh et al., 2021).

Der Schweregrad der Herzinsuffizienz wird anhand der klinischen Symptome nach der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) in Grad I (asymptomatisch) bis IV (schwer) eingeteilt.

Die verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz sind meist nicht klar voneinander zu trennen und bei den meisten Patientinnen und Patienten liegen Kombinationen vor. Auch die Ursachen klinisch ähnlicher Präsentationen sind sehr heterogen.

Die häufigsten Ursachen sind Auswirkungen koronarer Herzerkrankungen und Bluthochdruck. Seltener Gründe sind z.B. verschiedene Formen von Kardiomyopathien, Herzrhythmusstörungen, Klappenerkrankungen oder angeborene Herzfehler. Auch bei den Ursachen bestehen oft Kombinationen. Entsprechend ist auch die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz nicht einheitlich.

Grundsätzlich beginnt die systolische Herzinsuffizienz mit einer Schädigung des Herzmuskels, z.B. durch erhöhten Druck oder verminderte Sauerstoffversorgung. Kurzfristig kann die linksventrikuläre Funktionsstörung kompensiert werden, z.B. durch Aktivierung des Sympathikus oder des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Langfristig führen diese Mechanismen aber zu einer weiteren Schädigung des Myokards und damit zu einem Teufelskreis unter dem auch alle anderen Organsysteme leiden.

Therapeutische Ansätze beziehen sich daher auf die Durchbrechung des Teufelskreises und der pharmakologischen Hemmung der überschießenden Kompensationsmechanismen mit z.B. ACE-Inhibitoren, Angiotensinrezeptorblockern, Betarezeptorblockern, Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten. Im akuten oder weit fortgeschrittenen Stadium müssen außerdem kreislaufunterstützende Arzneimittel oder mechanische Systeme eingesetzt werden. Letzte Therapiemöglichkeit ist die Herztransplantation, von der in Deutschland aber jährlich nur wenig mehr als 300 stattfinden. Daher handelt es sich hierbei um keine Option, mit der den vielen Patientinnen und Patienten realistischerweise geholfen werden kann (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019).

Trotz der extrem hohen Belastung für die Gesellschaft durch die Herzinsuffizienz und enormen therapeutischen Fortschritten in den letzten Jahren setzen die vorhandenen Behandlungsoptionen sehr spät und undifferenziert in der Pathophysiologie ein. Das liegt daran, dass die detaillierten molekularen Mechanismen der Herzinsuffizienz bisher nur sehr begrenzt verstanden sind.

1.1.3 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Herzmuskels, die zu einer Einschränkung dessen Funktion führen. Die American Heart Association unterscheidet in einer Konsensus-Veröffentlichung aus 2006 zwischen primären Kardiomyopathien, die hauptsächlich oder ausschließlich das Myokard betreffen und sekundären Kardiomyopathien, bei denen eine Myokard-Beteiligung im Rahmen einer Multisystemerkrankung auftritt (Maron et al., 2006).

Davon abgegrenzt werden Auswirkungen auf das Myokard durch andere kardiovaskuläre Erkrankungen. Dazu gehören Klappenerkrankungen, systemischer Bluthochdruck, angeborene Herzfehler und die koronare Herzerkrankung, die zu einer ischämischen Schädigung des Myokards führt und zum Teil als ischämische Kardiomyopathie bezeichnet wird.

Zu den sekundären Kardiomyopathien gehören z.B. Folgen von Amyloidosen, Speichererkrankungen wie Hämochromatose oder Morbus Fabry, toxischen Schädigungen, Sarkoidose, Diabetes mellitus Typ I und anderen endokrinen Erkrankungen, genetischen Syndromen wie Noonan-Syndrom, Muskeldystrophien, Mangelernährung, Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematodes oder rheumatoide Arthritis, Elektrolytstörungen sowie chemische und radiologische Auswirkungen onkologischer Therapien.

Primäre Kardiomyopathien werden weiter nach zugrunde liegender Ursache eingeteilt in „genetisch“, „erworben“ und „gemischt“ (Maron et al., 2006; McKenna et al., 2017).

Zu den genetischen Kardiomyopathien gehört die autosomal-dominante Hypertrophische Kardiomyopathie (HCM), die mit einer Prävalenz von 1:500 die wohl häufigste Kardiomyopathie darstellt und gleichzeitig einer der häufigsten Gründe für plötzlichen Herztod bei jungen Menschen ist. Es sind eine Reihe von Genmutationen bekannt, die zur HCM führen, z.B. in schweren Ketten von Myosinen (Myosin Heavy Chain, MHC), Myosin-Bindeproteinen C (Myosin-binding protein C), kardialen Troponinen und hauptsächlich anderen Proteinen des Sarkomers. Die klinische Ausprägung ist jedoch heterogen und die Gründe hierfür sind noch nicht vollständig bekannt. Deutlich seltener treten andere genetische Kardiomyopathien auf. Dazu gehören die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC), die Linksventrikuläre Noncompaction-Kardiomyopathie (LVNC), Erkrankungen des Reizleitungssystems sowie der Ionenkanäle (Dadson et al., 2017; Maron et al., 2006; McKenna et al., 2017).

Die häufigste Kardiomyopathie mit aus genetischer und/oder nicht-genetischer Ursache ist die Dilatative Kardiomyopathie, die den dritthäufigsten Grund für Herzinsuffizienz und den häufigsten Grund für eine Herztransplantation darstellt. Es kommt zu einer Dilatation des linken Ventrikels bei normaler Wandstärke. Das Alter bei der Manifestation ist sehr heterogen. Ebenso wird auch eine große Bandbreite an Ursachen diskutiert: Neben Infektionen, Toxinen, Autoimmunerkrankungen und Systemerkrankungen deutet die familiäre Häufung von DCM-Fällen in 30-50% der Fälle ebenso auf eine genetische Komponente hin, die jedoch nicht immer monokausal zu sein scheint. Als mögliche assoziierte Gene wurden hauptsächlich Gene des kontraktilen Apparates sowie des Zytoskeletts identifiziert. Die häufigsten sind Titin, Laminin A und C sowie MHC7. Erwähnenswert ist auch, dass Männer von der DCM dreimal so häufig betroffen sind wie Frauen (Dadson et al., 2017; Maron et al., 2006).

Auch bei der seltenen primären restriktiven Kardiomyopathie ohne Hypertrophie und Dilatation (RCM) scheinen genetische und nicht-genetische Ursachen eine Rolle zu spielen. Diskutiert werden auch hier v.a. sarkomerische Mutationen (Dadson et al., 2017; Maron et al., 2006).

Zu den erworbenen Kardiomyopathien gehören die Myokarditis, die durch Stress induzierte Tako-Tsubo-Kardiomyopathie (Broken Heart Syndrome), schwangerschaftsassozierte Kardiomyopathie, eine Schädigung des Myokards durch Tachykardie (Tachymyopathie) sowie bei Neugeborenen von Müttern mit Diabetes mellitus (Maron et al., 2006).

1.1.4 Kardiale Hypertrophie

Herzmuskelzellen im adulten Organismus sind weitestgehend postmitotische Zellen, das heißt sie können sich nicht mehr teilen. Daher kann der Herzmuskel, anders als viele andere Organe, auf vermehrte Belastung im Sinne von biomechanischem Stress nicht mit einer Erhöhung der Zellzahl (Hyperplasie) reagieren, sondern nur durch Hypertrophie (Frey & Olson, 2003).

Hypertrophie zeichnet sich aus durch eine Vergrößerung der Zelle, verstärkte Synthese bestimmter Proteine und einer verstärkten Organisation der Sarkomere. Dadurch kann im physiologischen Rahmen, z.B. beim normalen postnatalen Wachstum oder bei sportlicher Belastung, eine Verminderung des biomechanischen Stresses wie z.B. die erhöhte Wandspannung, hervorgerufen werden. Im pathophysiologischen Kontext geraten diese initial adaptiven Mechanismen allerdings außer Kontrolle und sind assoziiert mit einem Fortschreiten der Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod. Pathologische Stimuli für Myokardhypertrophie sind z.B. Bluthochdruck, Klappenerkrankungen, die zu Druck- oder Volumenbelastung führen, Myokardinfarkt, Speichererkrankungen und genetische Erkrankungen. Bei der pathologischen Hypertrophie ist in der Folge eine Abnahme der Kontraktilität zu beobachten, ein Untergang von Kardiomyozyten mit fibrotischem Umbau des Myokards, einer veränderten Expression von Genen, die für kardiale Calciumströme wichtig sind und einer erhöhten Expression fetaler Gene wie z.B. ACTA1, MYH7, NPPA, NPPB. Das Produkt von Letzterem, NT-Pro-BNP, wird als wichtigster Biomarker in der klinischen Routine-Diagnostik der Herzinsuffizienz genutzt. Die genannten pathologischen Veränderungen werden auch als kardiales Remodeling bezeichnet. Ein Voranschreiten dieser Prozesse mündet schlussendlich in einer kontraktilen Dysfunktion und Herzinsuffizienz. Das Vorliegen einer Myokardhypertrophie ist per se mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Wie und zu welchem Grad es umkehrbar ist, ist noch nicht ausreichend verstanden. Die einzelnen Veränderungen sind interindividuell – bzw. im Laborkontext in Abhängigkeit vom eingesetzten Hypertrophie-Modell – unterschiedlich ausgeprägt (Frey & Olson, 2003; Nakamura & Sadoshima, 2018).

Trotz extensiver Forschung und großen Fortschritten in den letzten Jahrzehnten konnten die molekularen Signalwege noch nicht ausreichend verstanden werden, um ein allgemeingültiges molekulares Modell der kardialen Hypertrophie zu zeichnen und entsprechend spezifische Therapien zu entwickeln. Es bleibt eine wissenschaftliche Herausforderung, Mechanismen der physiologischen und pathologischen Hypertrophie voneinander zu trennen und herauszufinden, ob beobachtete

Veränderungen Auslöser oder Effekt der Hypertrophie sind (Frey & Olson, 2003; Nakamura & Sadoshima, 2018).

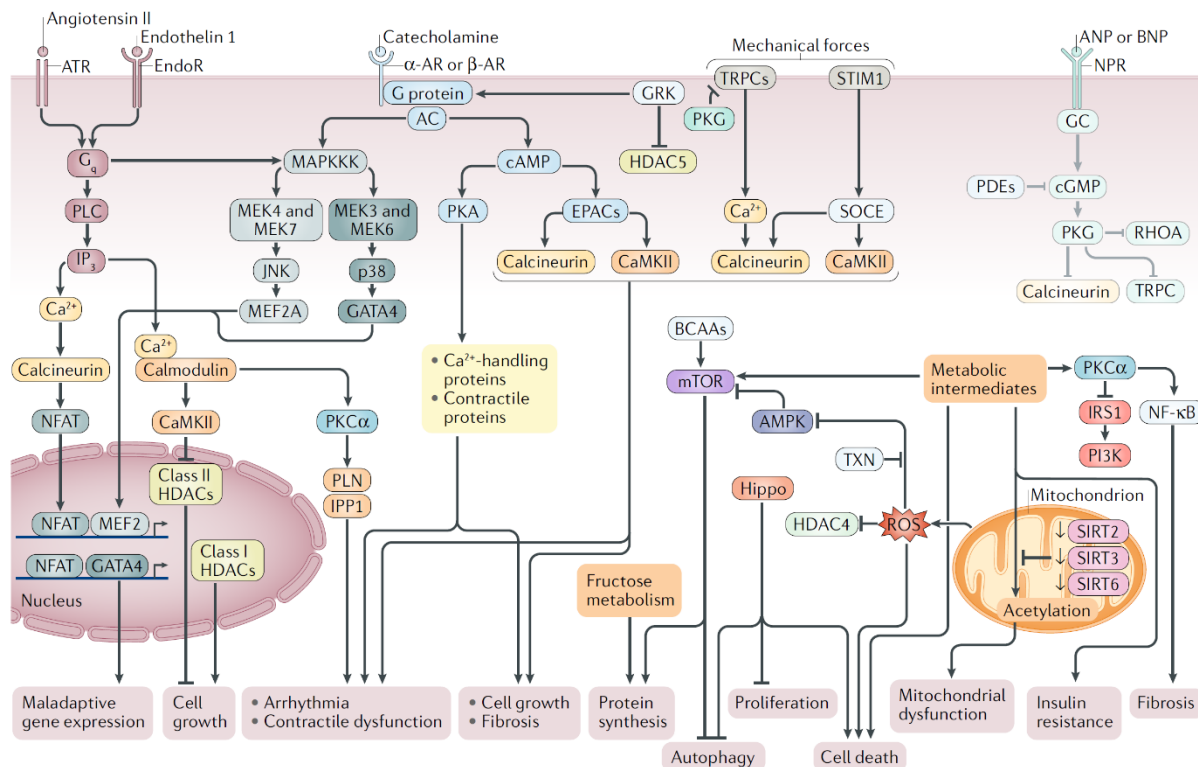


Abbildung 1-2: Signalwege der pathologischen Hypertrophie (Nakamura & Sadoshima, 2018)

Die molekularen Mechanismen der pathologischen Hypertrophie des Herzens sind hoch komplex und bisher nur teilweise verstanden. Einige der wichtigen Signalwege sind hier skizziert.

1.2 Molekulare Signalwege

Im Folgenden werden einige molekulare Signalwege im Kontext von Herz-Kreislauf-erkrankungen besprochen, die im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielen.

1.2.1 Kardiales fetales Genprogramm

Das fetale Genprogramm der kardialen Hypertrophie besteht aus einer Reihe von Genen, die eigentlich nur während der Herzentwicklung stark exprimiert werden. Kurz nach der Geburt werden sie herunterreguliert. Kommt es jedoch zu pathologischer Hypertrophie und Remodeling, ist die Expression dieser Gene im Ventrikelmuskel wieder erhöht (Dadson et al., 2017; Frey & Olson, 2003).

Die Gene c-myc, c-jun und c-fos werden durch erhöhten Stress hochreguliert und führen wiederum zur Überexpression weiterer Gene. Die Transkription findet hauptsächlich über SRF, GATA, NFAT, TEF und MEF-2 statt.

Zu den wichtigsten Zielgenen gehören die der natriuretischen Peptide A und B (NPPA bzw. ANP/ANF, NPPB bzw. BNP), die zu einer Vasodilatation und verstärkten Natriumausscheidung führen. BNP bzw.

dessen Vorläufer NT-Pro-BNP wird auch in der klinischen Routine als Serum-Marker für die Herzinsuffizienz genutzt. Außerdem werden die adulten kontraktilen Proteine α -MHC und α -kardiales Actin (ACTC1) vermehrt durch die fetalen Isoformen β -MHC und α -Skelettmuskel Actin (ACTA1) ersetzt (Dadson et al., 2017).

Die kardiale Rhythmik wird hauptsächlich von HCN-Kanälen (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel) kontrolliert, deren Strom auch als I_f bezeichnet wird. Im adulten Myokard findet eine Expression dieser Kanäle hauptsächlich in den Schrittmacherzentren statt und kaum im gesunden Ventrikelmyokard. Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es jedoch zu einer Re-Induktion der Gene von HCN-Kanälen, sodass sie wie während der Herzentwicklung auch wieder im Ventrikelmyokard zu finden sind. Gleiches gilt für Calcium-Kanäle vom T-Typ. Diese Re-Expression spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Entwicklung systolischer Dysfunktion und Arrhythmien.

Die Gene Actin Alpha 2 (ACTA2, SMA) und Transgelin (TAGLN, SM22- α) sind im adulten gesunden Organismus hauptsächlich in glatten Muskelzellen exprimiert und nicht mehr im Ventrikelmyokard. Unter pathologischen Verhältnissen kommt es auch hier wieder zu einer erneuten Expression (Kuwahara et al., 2012).

1.2.2 Calcineurin und NFAT

Die Phosphatase Calcineurin vermittelt Calcium-abhängig in verschiedenen Geweben eine Vielzahl von Effekten über eine Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie (nuclear factor of activated T-cells), die dadurch in den Nukleus translozieren und zur vermehrten Expression verschiedener Gene führen. In Immunzellen wird so beispielsweise IL-2 exprimiert (Chaklader & Rothermel, 2021; Frey & Olson, 2003).

Eine Aktivierung dieses Signalweges führt in Kardiomyozyten zu einer starken Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Dabei werden auch Proteine dephosphoryliert, die cAMP-abhängig phosphoryliert werden. Eine Inhibition von Calcineurin durch Cyclosporin A oder Tacrolimus, die z.B. bei Autoimmunerkrankungen erfolgreich angewandt wird, ergab im Kontext der kardialen Hypertrophie bisher stark divergierende Ergebnisse, die einem klinischen Einsatz im Wege stehen. Eine Ursache dafür ist auch die hohe erforderliche Dosis, die z.B. nephrotoxisch ist (Chaklader & Rothermel, 2021; Frey & Olson, 2003).

Genetische in-vitro und in-vivo Modelle konnten jedoch zeigen, dass eine Überexpression von Calcineurin-inhibierenden Proteinen im Herzen einen positiven Effekt auf die kardiale Funktion hat. Aortenkonstriktion, Aktivierung von Adenorezeptorantagonisten oder Calcineurin-Überexpression verursachen normalerweise pathologische Hypertrophie. Die Überexpression von RCAN-Proteinen (regulator of calcineurin, auch myocyte-enriched calcineurin-interacting proteins (MCIP)), die die Calcineurin-Aktivität hemmen, verhindern in diesen Modellen die Hypertrophie. Allerdings gibt es auch

hier Daten, die ein erhöhtes Risiko für kardiale Dekompensation durch RCAN-Überexpression sowie eine Rolle von RCAN in der physiologischen Hypertrophie durch Training zeigen. Außerdem wird RCAN1.4 durch Calcineurin/NFAT-Aktivierung exprimiert und ist somit Teil einer hemmenden Feedback-Schleife. Die Höhe der mRNA-Expression kann als Indikator für die Aktivität des Signalwegs genutzt werden (Chaklader & Rothermel, 2021; Frey & Olson, 2003).

Ferner führt eine kardiospezifische Deletion der regulatorischen Untereinheit CnB1 bei Mäusen zu einer Herzinsuffizienz und tödlichen Arrhythmien.

Interessant im Verständnis der Rolle von Calcineurin im Herzen ist neben einer circadianen Rhythmik die zunehmende Aktivität des Signalwegs vom Epikard zum Endokard im gesunden Organ. Dies korreliert mit der transmuralen Zunahme von mechanischem Stress, diastolischer und systolischer Calcium-Konzentration und Dauer des Aktionspotentials (Chaklader & Rothermel, 2021).

1.2.3 Hippo-Signalweg

Der Hippo-Signalweg ist ein evolutionär hochgradig konservierter zellulärer Mechanismus, der grundsätzlich Zellproliferation und Überleben inhibiert. Im Herzen spielt er dadurch eine integrale Rolle in der Regulation der Organgröße, Apoptose und Autophagie.

Die Hippo-Homologe bei Säugetieren sind MST1 und MST2, die durch zellulären Stress aktiviert werden und den Hippo-Signalweg starten. Vermutlich besteht eine enge Verknüpfung mit anderen Signalwegen wie z.B. dem Wnt/ β -Catenin-, dem BMP- oder dem G-Protein-gekoppelten-Rezeptor-Signalweg. Zusammen mit SAV1 werden die Kinasen LATS1 und LATS2 sowie deren Partner MOB1A und MOB1B phosphoryliert. Das wiederum führt zur Phosphorylierung von YAP1 und TAZ, die dadurch vermehrt abgebaut werden.

Ist der Hippo-Signalweg inaktiv, agieren YAP1 und TAZ als Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Genen fördern, die zu erhöhtem Kardiomyozyten-Wachstum und -Überleben führen. In der embryonalen Entwicklung wird über die Aktivierung der IGF- und Wnt-Signalwege, Inaktivierung von GSK3 β und erhöhte β -Catenin-Level das kardiale Wachstum gefördert (Chen et al., 2020; Wang et al., 2018).

In Patienten mit HCM und Mäusen mit Druckbelastung durch Aortenkonstriktion wurden erhöhte YAP1-Level gemessen und verminderte Phosphorylierung, was einer Inaktivierung des Hippo-Signalweges entspricht. Im Myokardinfarkt-Modell führt die Aktivität von YAP1 bzw. die Inaktivierung des Hippo-Signalweges zu einer verbesserten Regeneration und Kontraktilität. Überexpression von aktiviertem YAP1 führt dazu, dass eigentlich post-mitotische Kardiomyozyten proliferieren können. Durch den Knockdown von YAP1 sterben Mäuse-Embryonen im fetalen Stadium (Chen et al., 2020; Wang et al., 2018).

Allerdings gibt es auch hier scheinbar widersprüchliche Daten. Bei kardialen Stress durch Myokardinfarkt oder Druckbelastung werden MST1 und LATS1/2 aktiviert und führen so über eine Aktivierung des Hippo-Signalweges zu einer vermehrten Apoptose und reduzierten Autophagie, was in einer Herzinsuffizienz resultiert. Das gleiche Ergebnis kann auch durch eine MST1-Überexpression erzielt werden. Eine Überexpression von inaktivem MST1 hat zwar keine Auswirkungen im gesunden Herzen. Wird das Herz im Myokardinfarkt-Modell geschädigt, scheint die verminderte MST1-Aktivität aber schützend zu sein (Chen et al., 2020; Nakamura & Sadoshima, 2018; Wang et al., 2018).

Es ist offensichtlich noch nicht vollständig verstanden, in welchen Stress-Situationen Kardiomyozyten mit einer Aktivierung und in welchen mit einer Inaktivierung des Hippo-Signalweges reagieren. Daher ist auch noch unklar, wie eine therapeutische Regulation am sinnvollsten wäre.

1.2.4 Proteinkinase C

Von der in allen Geweben exprimierten Proteinkinase C (PKC) existieren mehrere Isoformen, die bei der Pathogenese der kardialen Hypertrophie möglicherweise eine Rolle spielen. In Patientinnen und Patienten mit DCM ist die Gesamtaktivität von PKC erhöht, was wohl hauptsächlich durch eine Re-Aktivierung von PKC- β zu erklären ist, die eigentlich im adulten Ventrikelmyokard kaum exprimiert wird. Passend dazu führt eine Aktivierung von PKC durch z.B. PMA sowie eine Überexpression von PKC- α , - β und - ϵ zu hypertrophen Phänotypen. Teilweise scheinen sich allerdings auch hier verschiedene Untersuchungen zu widersprechen. Das hängt möglicherweise z.B. mit der Integration von PKC in Proteinkomplexen zusammen (Frey & Olson, 2003; Singh et al., 2017).

Bei der ischämischen Präkonditionierung, die zu einem geringeren Ischämie/Reperfusion-Schaden führt, konnte eine Aktivierung bzw. eine veränderte Expression der verschiedenen PKC-Isoformen beobachtet werden. Trotz jahrzehntelanger Forschung konnte daraus jedoch noch kein erfolgreicher humaner Therapieansatz entwickelt werden (Singh et al., 2017).

Die Isoform PKC- δ scheint bei kardialer Ischämie pro-apoptotische Effekte zu haben, während die ϵ -Isoform Apoptose verhindert, unter anderem indem sie im Mitochondrium die Aldehyd Dehydrogenase 2 (ALDH2) aktiviert (Singh et al., 2017).

Aktivierung von PKC erfolgt über die Phosphorylierung an verschiedenen Positionen, die Spaltung z.B. mittels Caspasen oder durch Second messenger wie Diacylglycerol. Die genauen Mechanismen sind Isoform- sowie Zelltyp-spezifisch (Kikkawa et al., 2002).

1.2.5 Apoptose

Apoptose ist definiert als ein Caspase-abhängiger genetisch-kontrollierter Zelltod und wird dadurch von anderen Formen wie der Nekrose, dem autophagischen Zelltod, Nekroptose oder Pyroptose abgegrenzt, wobei die Grenzen teilweise fließend verlaufen. Charakteristischerweise sind einzelne

Zellen oder kleine Gruppen von Zellen betroffen, die energieabhängig in Apoptosekörperchen mit Membran fragmentiert werden. Diese werden ohne Aktivierung von Inflammation durch Nachbarzellen oder professionell phagozytierenden Zellen aufgenommen (Rodríguez et al., 2002).

Bei der Aktivierung der Apoptose wird wiederum zwischen dem intrinsischen und den extrinsischen Weg unterschieden. Der intrinsische oder mitochondriale Weg wird durch intrazellulären Stress wie oxidativen Stress, hohe Calciumkonzentration oder DNA-Schäden ausgelöst. Dadurch wird die äußere Mitochondrien-Membran permeabel (Bildung der mitochondrial permeability transition pore (MPTP)) und Cytochrom C kann in das Zytosol übertreten. Dort aktiviert Cytochrom C mit APAF1 (apoptotic protease-activating factor 1) Caspase 9, die wiederum die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert. Die Aktivierung findet durch proteolytische Abspaltung von Prodomänen statt und erfolgt exponentiell. Die Effektor-Caspasen schneiden daraufhin zelluläre Proteine und weitere Effektor-Enzyme C-terminal von Aspartat. Ein wichtiges Ziel der Effektor-Caspasen ist das DNA-Reparatur-Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1), welches proteolytisch gespalten wird.

Der extrinsische Apoptose-Weg wird durch extrazellulären Stress ausgelöst, z.B. vermittelt durch Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) oder die Bindung anderer Liganden an spezifische Todesrezeptoren. Dies führt zur Rekrutierung von FADD (Fas-associated death domain) und Procaspase 8, die dadurch aktiviert wird und ebenfalls die gemeinsame Endstrecke mit den Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert.

Apoptose spielt im Herzen nicht nur eine Rolle während der Embryonalentwicklung sondern auch bei kardiovaskulären Erkrankungen. Erhöhte kardiale Apoptose-Aktivität findet sich z.B. bei Patientinnen und Patienten mit KHK, DCM, Myokarditis und in explantierten insuffizienten Herzen. Bereits eine geringgradige Induktion von Apoptose durch kardiale Caspase-8-Überexpression führt in Mäusen zu einem tödlichen DCM-Phänotyp, der durch eine Caspase-Inhibition verhindert werden kann.

Myokardiale Ischämie führt nicht nur zu nekrotischem Zelltod sondern auch zu Apoptose. Da es sich bei Apoptose um einen energieverbrauchenden Zelltod handelt, lösen Ischämie-assoziierte Faktoren wie Hypoxie, Azidose, oxidativer Stress, hohe Calciumkonzentration und Zytokine wahrscheinlich in Abhängigkeit von der intrazellulären ATP-Konzentration entweder Apoptose oder andere Formen des Zellunterganges aus. Dies könnte auch ein wichtiger Faktor in der Entstehung des postischämischen Reperfusionsschadens sein. Durch Reperfusion können auf der einen Seite geschädigte Kardiomyozyten gerettet werden, auf der anderen Seite könnte die Reperfusion auch die für die Apoptose notwendige Energie zur Verfügung stellen (Rodríguez et al., 2002).

Zur Regulation von Apoptose im pathologischen Kontext wird eine Reihe von Signalwegen diskutiert. Beispielsweise führt eine Inaktivierung des Hippo-Signalweges zu verminderter Apoptose im Myokardinfarkt-Tiermodell, während gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des Signalweges zu einer vermehrten Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Weges führt.

Eine Aktivierung von Calcineurin scheint auf der anderen Seite vor Apoptose zu schützen und eine Inaktivierung des Signalweges induziert Apoptose. Als möglicher Vermittler wird die vermehrte Expression von α -Crystallin B diskutiert. Allerdings herrscht auch hier keine absolute Klarheit über die Rolle des Signalweges, da in einer anderen Studie eine kardiospezifische Überexpression einer inaktiven Form von Calcineurin zu einer verminderten Apoptose-Rate in Kardiomyozyten führte.

In klinischen Studien konnte eine direkte Inhibition von Caspasen allerdings noch zu keinen Erfolgen führen. Oft fand statt Apoptose dann Nekrose statt, weil wahrscheinlich zu spät in den Prozess des Zellunterganges eingegriffen wurde. Andererseits gibt es auch Untersuchungen, die keinen Zusammenhang zwischen Apoptose-Index der Kardiomyozyten und der Ausprägung der Herzinsuffizienz finden konnten. Auch ist noch größtenteils unklar, welche pathogenetische Rolle Apoptose in anderen Zellen als Kardiomyozyten spielt, die immerhin 70% der kardialen Zellen ausmachen und möglicherweise deutlich höhere Apoptose-Raten im Kontext von Herzkrankheiten zeigen. Einige Autoren argumentieren gar, dass das Apoptose in adulten Kardiomyozyten insgesamt kaum noch stattfindet und daher die Ergebnisse, die aus neonatalen Kardiomyozyten stammen, nicht übertragbar seien. Umstritten sei beispielsweise, ob Apoptose zu Fibrose führe (Corbalan et al., 2016; Xia et al., 2016).

1.3 Striatin interagierende Phosphatase und Kinase Komplexe (STRIPAK-Komplexe)

Die Proteine der Striatin-Familie Striatin (STRN), S/G₂ nuclear autoantigen (STRN3) und Zinedin (STRN4) sind in vielen Geweben stark exprimiert und spielen in verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle. Sie besitzen zwar keine eigene katalytische Aktivität, fungieren aber als Gerüst für eine Reihe an Phosphatasen und Kinasen sowie anderen Proteinen, mit denen sie verschiedene Komplexe bilden, die als STRIPAK-Komplexe bezeichnet werden. Funktionelle Homologe von STRIPAK-Proteinen wurden in evolutionär weit entfernten Organismen wie Pilzen gefunden. Im Folgenden liegt der Schwerpunkt auf STRIPAK-Komplexen in Säugetieren (Hwang & Pallas, 2014; Shi et al., 2016).

Am häufigsten sind die Untereinheiten A und C der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) Teil von STRIPAK-Komplexen. Für PP2A scheinen die Komplexe die Untereinheit B zu ersetzen. Von dieser existieren verschiedene Isoformen, die regulatorische oder „targeting“-Funktionen haben, sodass eine ähnliche Rolle von STRIPAK-Komplexen für PP2A angenommen wird (Huang et al., 2021).

Die ersten Kinasen, die man diesen Komplexen zugeordnet hat, gehören zu der Familie der Germinal Center Kinase III (GCKIII): MST3 (mammalian STE20-like kinase 3, STK24), MST4 (STK26) und YSK1 (Yeast Sps1/Ste20-related Kinase 1, STK25, SOK1) (Hwang & Pallas, 2014; Shi et al., 2016).

Weitere Kern-Proteine der Komplexe sind Mob3 (Mps one binder homolog 3), Mob4, PDCD10 (programmed cell death 10, cerebral cavernous malformation 3 (CCM3)), STRIP1 (FAM40A), STRIP2 (FAM40B, Myoscape) (Hwang & Pallas, 2014; Shi et al., 2016).

Andere Mitglieder scheinen für spezifische Funktionen rekrutiert zu werden. Dazu gehören CTTNBP2, CTTNBP2NL, SLMAP (sarcolemmal membrane-associated protein), SIKE (suppressor of IKK ϵ) oder MINK1 (Misshapen-like kinase 1). Bei einigen Proteinen ist unklar, ob sie Teil der klassischen STRIPAK-Komplexe mit PP2A und einer Kinase sind oder Teil von sogenannten STRIPAK-ähnlichen Komplexen. Dazu gehören Dynein, GIPC (GAIP-interacting protein, C-Terminus), APC Protein, Deubiquitinase (DUB), Trabid, CCT/TCP-1-Chaperonin Proteine, MAP4K4 sowie Calcium-Calmodulin. Insgesamt existieren deutlich über 100 Varianten von STRIPAK-Komplexen bzw. STRIPAK-ähnlichen Komplexen in Säugetieren (Hwang & Pallas, 2014; Shi et al., 2016; Tang et al., 2019).

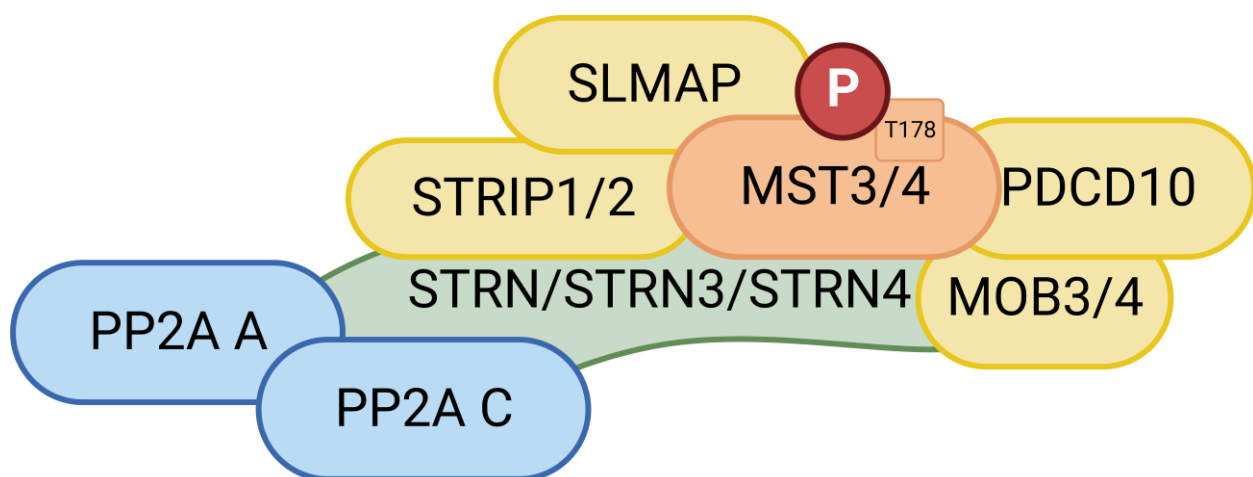


Abbildung 1-3: Schematischer Aufbau eines STRIPAK-Komplexes (adaptiert nach Hwang & Pallas, 2014; Tang et al., 2019)

Am Gerüst aus Proteinen der Striatin-Familie (STRN/STRN3/STRN4) setzt sich ein STRIPAK-Komplex zusammen. Die Phosphatase-Aktivität wird verursacht durch die Untereinheiten A und C der Protein-Kinase 2A (PP2A). Weiterhin gehören Kinasen der Germinal Center Kinase III Familie (GCKIII) wie MST3 und MST4 zu STRIPAK-Komplexen. Andere STRIPAK-Proteine sind z.B. STRIP1, STRIP2/Myoscape, SLMAP, PDCD10, MOB3 und MOB4. Insgesamt gibt es wahrscheinlich über 100 mögliche Variationen von STRIPAK und STRIPAK-assoziierten Komplexen.

Innerhalb der Komplexe scheint PP2A die Funktion der Kinasen hemmen zu können. Insbesondere bei den GCKIII-Kinasen konnte gezeigt werden, dass Mutationen, die zu einer verminderten PP2A-Bindung führen, zu einer Hyperphosphorylierung und damit zu einer Aktivierung führen. Der selbe Effekt tritt auch bei einer Inaktivierung von PP2A ein. Insgesamt spielen Phosphorylierungen verschiedener Domänen von STRIPAK-Proteinen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Zusammensetzung der Komplexe (Hwang & Pallas, 2014).

STRIPAK-Funktionen wurden im Kontext von verschiedensten zellulären Prozesse beschrieben, z.B. Zellzyklus, Mitose, Fokalkontakte, Endozytose, Zell-Zell-Interaktionen, Golgi-Zusammensetzung, Transkription, Calcium-Signalwege, Östrogen-Signalwege, Vesikeltransport, Zellpolarität und Zytokinese. Viele funktionelle Untersuchungen beziehen sich allerdings auf einzelne Proteine, die Teil von STRIPAK-Komplexen sein können. Inwiefern STRIPAK-Komplexe bei den jeweiligen Funktionen eine Rolle spielen, ist jedoch noch kaum verstanden. In verschiedenen zellulären Kompartimenten unterscheidet sich die Zusammensetzung der STRIPAK-Komplexe, aber auch hier ist wenig darüber bekannt, wie diese gesteuert wird. Ebenso ist eine Bedeutung von STRIPAK-Komplexen im Herzen noch nicht konkret untersucht (Hwang & Pallas, 2014; Shi et al., 2016; Tang et al., 2019).

Für das Protein SLMAP wird beispielsweise eine Rolle bei der Fusion von Myoblasten und der Organisation der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten beschrieben. Es konnte eine Co-Lokalisation mit verschiedenen wichtigen Proteinen beobachtet werden und es wird vermutet, dass SLMAP durch verschiedene Isoformen am Transport in die jeweiligen Kompartimente beteiligt ist. Zu den Interaktionspartnern gehören Myosin als Teil des kontraktile Apparates; die Proteinen des T-Tubulus Caveolin 3 (CAV3) und spannungsabhängige Calcium-Kanäle vom L-Typ (LTCC) sowie Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums wie der Ca^{2+} -ATPase und der für die Calcium-abhängige Calcium-Ausschüttung verantwortlichen Ryanodinrezeptor 2 (RYR2). Eine Überexpression von bestimmten SLMAP-Isoformen in Mäusen verursacht pathologisches Remodeling mit erhöhter Expression fetaler Gene, vergrößertem sarkoplasmatischen Retikulum sowie einer verminderten Expression von Proteinen, die bei kardialen Calciumströmen eine Rolle spielen. Diese verminderte Expression entspricht der Situation im Herzen von Menschen mit Herzinsuffizienz. Allerdings konnte bei Patientinnen und Patienten mit dilatierten Ventrikeln eine verminderte Expression von allen SLMAP-Isoformen beobachtet werden. Ob diese Erkenntnisse sich auf SLMAP in STRIPAK-Komplexen beziehen, ist unklar (Hwang & Pallas, 2014; Nader, 2019).

Striatin-Mutationen sind assoziiert mit verlängerten QRS-Zeiten, ARVC und DCM. Eine subzelluläre Lokalisation ist insbesondere an den Zell-Zell-Kontakten (Glanzstreifen, Disci intercalares) beschrieben. Die Herabregulation führt zu einer verminderten spontanen Kontraktionsrate in isolierten Kardiomyozyten. Insgesamt wird auch Striatin eine wichtige Funktion bei der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten zugeschrieben. Eine direkte Interaktion mit SLMAP in Kardiomyozyten konnte bereits gezeigt werden (Hwang & Pallas, 2014; Nader, 2019).

STRIP2 ist in insuffizienten humanen Herzen vermindert exprimiert. Von Eden et al. konnte gezeigt werden, dass STRIP2 in Kardiomyozyten direkt mit dem Calciumkanal vom L-Typ interagiert und eine verminderte Expression von STRIP2 zu deutlich verminderten Calciumströmen führt. Daraus resultiert eine verminderte Kontraktilität. Durch eine Überexpression hingegen kommt es zu deutlich erhöhten

Calciumströmen und die Funktion von insuffizienten Kardiomyozyten wird verbessert. Auch im Zebrafisch- und Mausmodell konnte gezeigt werden, dass STRIP2 wichtig für Calciumströme ist und ein Knockout im Herzen deutlich verminderte Calciumströme sowie reduzierte Kontraktilität zum Ergebnis hat. Eine mögliche Begründung dafür ist die beobachtete verminderte Dichte an der Zelloberfläche der Calciumkanäle vom L-Typ bei STRIP2-Knockout. Es wird postuliert, dass STRIP2 die Stabilität der Calciumkanäle an der Zelloberfläche erhöht durch eine verbesserte Interaktion zwischen dem Kanal und Alpha-Actinin (Eden et al., 2016).

Neben den beschriebenen Rollen in kardiovaskulären Erkrankungen werden viele weitere Beteiligungen von STRIPAK-Komplexen in pathophysiologischen Kontexten diskutiert, beispielsweise bei Diabetes mellitus Typ 2, Autismus, zerebralen Kavernomen und verschiedensten onkologischen Erkrankungen.

Insbesondere in diesem Zusammenhang wird auch eine Interaktion von STRIPAK-Komponenten mit dem Hippo-Signalweg diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Phosphatase-Aktivität von STRIPAK MST1 und MST2 dephosphorylieren kann, damit die Hippo-Aktivität hemmt und damit zelluläres Überleben fördert. Außerdem wird eine direkte Interaktion von SLMAP mit MST1/2 beschrieben sowie von STRIP1 mit MST2. Die Interaktion ist möglicherweise abhängig von der Phosphorylierung von MST1/2, die ebenfalls eng mit deren Aktivität zusammenhängt. Bei höherer Zelldichte konnte eine vermehrte Phosphorylierung gezeigt werden, die zu einer vermehrten Interaktion zwischen MST1/2 und SLMAP sowie zwischen MST1/2 und STRIP1 führt. LKB1 interagiert außerdem mit MST4 und wird ebenfalls mit dem Hippo-Signalweg in Verbindung gebracht (Huang et al., 2021; Hwang & Pallas, 2014; Tang et al., 2019).

1.4 Mammalian STE20-like kinase 4 (MST4)

Die Serin/Threonin Proteinkinase MST4 (STK26) ist Teil der MST-Kinasefamilie zu der neben MST4 noch MST1 (STK4), MST2 (STK3), MST3 (STK24) und YSK1 (STK25, SOK1) gehören. MST1 und MST2 werden wiederum zur Gruppe der Germinal Center Kinases II (GCKII) gezählt und MST3, MST4 und YSK1 zur Gruppe der Germinal Center Kinases III (GCKIII). Über die GCKIII-Gruppe ist deutlich weniger bekannt als über die GCKII-Gruppe. MST4 wurde 2001 erstbeschrieben (Lin et al., 2001; Qian et al., 2001) und ist insgesamt wenig untersucht, im Kontext von STRIPAK-Komplexen noch weniger. Zur Rolle von MST4 im Herzen gibt es bisher noch keine Publikationen und die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig Untersuchungen dazu.

Der Genlocus für humanes MST4 ist Xq26. MST4 selber besteht aus 416 Aminosäuren und hat eine berechnete Molekularmasse von ca. 47 kDa, wobei die Laufhöhe im Western Blot eher 52 kDa entspricht. Die Homologie zu anderen Spezies ist sehr hoch. Zur Ratte und zur Maus beträgt sie 98 %.

N-terminal befindet sich die Kinase Domäne, die innerhalb der GCK-Familie relativ stark konserviert ist. Es folgt eine Linker-Region mit einer WSF-Domäne (Aminosäuren Tryptophan, Serin, Phenylalanin), die für die Interaktion mit anderen Proteinen wichtig ist und C-terminal eine Dimerisations-Domäne. Über den MST4-spezifischen C-terminalen Abschnitt wird die Aktivität reguliert. Es gibt mehrere Serin- und Threonin-Reste die phosphoryliert werden können. Wichtig ist wahrscheinlich insbesondere T178, welches mit der katalytischen Aktivität von MST4 korreliert. Diese Aminosäure ist außerdem Ziel von Autophosphorylierung und wichtig für die Dimerisation. Unklar ist, ob MST4 nur in der homodimeren Form aktiv ist. Allerdings führen bestimmte Punktmutationen, die die Homodimerisation verhindern, zu einer deutlichen Reduktion der Kinaseaktivität *in vitro* (S. Chen et al., 2018; Huang et al., 2017; Record et al., 2010; Shi et al., 2013).

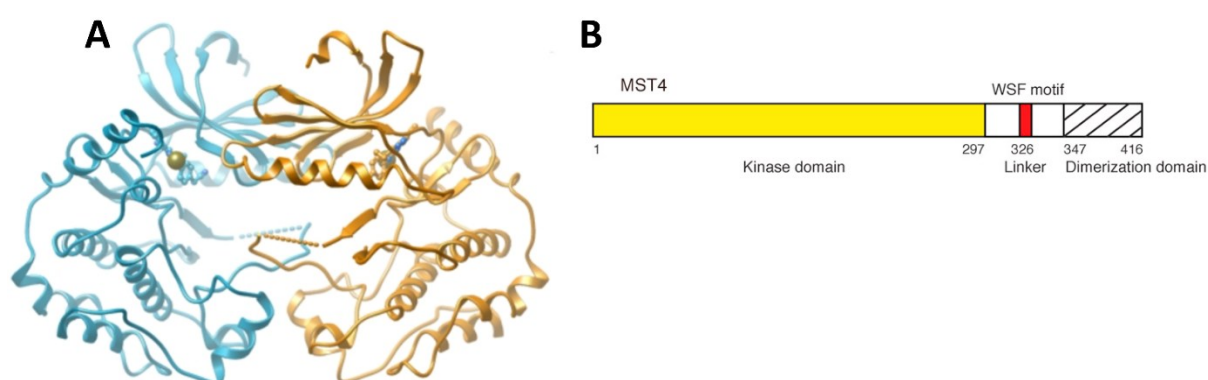


Abbildung 1-4: Struktur von MST4 (Record et al., 2010 (A); Shi et al., 2013 (B))

A zeigt die Quartärstruktur von zwei MST4-Proteinen, die ein Homodimer bilden. B zeigt die Abfolge von Kinase-, Linker- und Dimerisations-Domäne von MST4.

Neben den oben genannten Interaktionen mit STRIPAK-Proteinen sind Interaktionen mit PDCD10, MO25 und GM130 bekannt. GM130 scheint die Lokalisierung am Golgi-Apparat zu fördern und die Aktivität zu hemmen, während die anderen beiden eine Lokalisierung an der Plasmamembran fördern. Die Interaktion mit MO25 geschieht über die WSF-Domäne und führt zu einer Aktivierung der Kinaseaktivität, zumindest *in vitro* gegenüber dem unspezifischen Kinase-Substrat Basisches Myelinprotein (MBP) (M. Chen et al., 2018; S. Chen et al., 2018; Shi et al., 2013).

Zu den bisher beschriebenen Substraten von MST4 gehören Proteine aus der Ezrin/Radixin/Moesin-Familie (ERM-Familie) als Reaktion auf oxidativen Stress. In diesem Zusammenhang scheint die MST4-Aktivität das Zellüberleben zu fördern. Über den gleichen Signalweg wirkt MST4 auch an der Formation von Mikrovilli in intestinalen Epithelzellen mit. Es werden außerdem Proteine aus verschiedenen Signalwegen wie ERK, p38, JNK und NF- κ B diskutiert. Auch TRAF6 kann im Rahmen von Inflammation direkt phosphoryliert werden. Insgesamt sind die Daten zu MST4-Substraten allerdings nicht einheitlich (M. Chen et al., 2018; S. Chen et al., 2018; Huang et al., 2017; Xiong et al., 2016). Weitere

beschriebene Substrate sind ATG4B (Huang et al., 2017), ASAP3 (auch ACAP4 genannt) nach PKA-Aktivierung (Yuan et al., 2017) sowie Inhibitoren der Protein Phosphatase 1 wie z.B. PPP1R14C (Madsen et al., 2015).

In HEK293T-Zellen konnten Xiong et al. zeigen, dass eine Überexpression von MST4 sowie eine verstärkte Aktivierung durch Überexpression von MO25 zu vermehrter Apoptose in der Propidiumiodid-Färbung und im TUNEL-Assay. Eine Überexpression einer MST4-Form ohne Kinaseaktivität (kinase dead) sowie von Formen, die die Interaktion mit MO25 stören, haben hingegen keine Auswirkung auf die Apoptose (Xiong et al., 2016).

Erhöhte Expression von MST4 in Hypophysentumoren scheint zu erhöhter Zellproliferation und vermehrtem Überleben in hypoxischer Umgebung zu führen. Als mögliche Mechanismen werden eine Aktivierung der p38-MAPK-, HIF-1- und AKT-Signalwege diskutiert. Der ursprünglich als Aurora-B-Kinase-Inhibitor Hesperadin wurde in diesem Zusammenhang in einem strukturbasierten Screen als möglicher Inhibitor von MST4 identifiziert. Dies konnte dadurch erhärtet werden, dass die Effekte von MST4 auf Apoptose und Zellproliferation in nanomolekularen Konzentrationen dosisabhängig aufgehoben werden. Hemmeffekte auf andere Kinasen wie AMPK, Lck, MKK1, MAPKAP-K1, CHK1 und PHK wurden bei Hesperadin-Konzentrationen von 1 μ M berichtet (Xiong et al., 2016). In einer anderen Untersuchung konnte Hesperadin im Kontext der kardialen Reperfusion/Ischämie als Inhibitor von CaMKII- δ identifiziert werden. Hesperadin hatte in vitro und in vivo einen protektiven Effekt auf Kardiomyozyten. In vitro waren Konzentrationen von 200 nM wirksam (Zhang et al., 2022).

In Brusttumoren wurde eine Korrelation zwischen der Erhöhung der MST4-Expression und der Krebsprogression sowie einer negativen Prognose gefunden. Möglicherweise fördert MST4 hier die Migration von Tumorzellen. Allerdings existieren ebenso Daten zu pro-apoptotischen Effekten von MST4 in Brusttumoren. Auch in Prostatatumorzellen fördert eine MST4-Überexpression Proliferation, Wachstum sowie Zellmigration in vitro wie auch im Tiermodell (M. Chen et al., 2018; Huang et al., 2017; Xiong et al., 2016).

In Pankreastumoren bindet MST4 phosphorylierungsabhängig an MOB4 und hemmt dadurch die Aktivität von MST1, indem es deren Bindung an MOB1 hemmt. Dadurch wird die Hippo-Aktivität vermindert und Transkription durch YAP gesteigert. Das verursacht einen pro-onkogenetischen Effekt durch vermehrtes Zellwachstum und vermehrte Zellmigration. Die Bildung des MST1-MOB1-Komplexes kann auch durch direkte Interaktion von MST4 mit MOB1 und MST1 mit MOB4 gestört werden. In humanen Proben ist MST4 hochreguliert und die Höhe der Expression ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (M. Chen et al., 2018).

Glioblastome können sich vor Strahlenschäden durch vermehrte MST4-Expression schützen. Über eine Phosphorylierung aktiviert MST4 ATG4B, welches dadurch vermehrt LC3-II aktiviert und damit

Autophagie induziert. Dieser Mechanismus schützt die Tumorzellen vor dem Untergang. Dies könnte eine Erklärung für die schlechtere Prognose von bestimmten Glioblastomen mit erhöhter MST4-Expression sein (Huang et al., 2017).

Auch in kolorektalen Tumoren ist eine vermehrte MST4-Aktivität mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Ein möglicher Mechanismus ist die Phosphorylierung von β -Catenin, das dadurch gleichzeitig nicht mehr abgebaut werden kann und aktiviert wird (H. Zhang et al., 2021).

Die direkte Phosphorylierung und damit Inaktivierung von YAP1 durch MST4 in Magenkarzinomen hingegen hemmt die Tumorprogression. Eine verminderte MST4-Expression ist mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. (An et al., 2020) Diesen Ergebnissen widerspricht eine andere Publikation, die eine Assoziation zwischen erhöhter MST4-Expression und einer schlechteren Prognose zeigt. In Versuchen führte eine MST4-Überexpression über die Aktivierung des Ezrin-Signalweges zu vermehrter Tumorzellmigration in vitro und Tumordinvasion und -metastasierung in vivo (Li et al., 2019).

In Mäusen mit intrazerebralen Blutungen wird MST4 im geschädigten Gehirn verstärkt exprimiert. Die Inhibition von MST4 durch den Inhibitor Hesperadin führt zu einer Reduktion des Hirnödems und zu einer Verbesserung der neurologischen Funktion. Als Mechanismus wird die Inhibition der Autophagie durch MST4-Inhibition diskutiert. Nach Hesperadin-Applikation konnten geringere Level der Autophagie-Marker LC3 sowie Phospho-AKT beobachtet werden (Wu et al., 2020).

Zusammengefasst sind die zellulären Prozesse vielfältig, an denen die Serin/Threonin Proteinkinase MST4 beteiligt ist, und scheinen zellspezifisch zu sein. Beispielsweise konnte in einigen Zelltypen eine Inhibition, in anderen eine Aktivierung der Apoptose beobachtet werden. Viele der bisher hauptsächlich in onkologischen Kontexten untersuchten Signalwege sowie Interaktionspartner spielen auch in kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle, weswegen sich eine wissenschaftliche Auseinandersetzung mit MST4 nahezu aufdrängt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine erstmalige Charakterisierung der STRIPAK-Kinase MST4 in Herzmuskelzellen und im Kontext der Herzinsuffizienz.

STRIPAK-Komplexe werden immer stärker als wichtige Knotenpunkte in verschiedenen zellulären Signalwegen gesehen und als mögliche therapeutische Ziele z.B. bei onkologischen Erkrankungen diskutiert. Erste Ergebnisse zu einzelnen STRIPAK-Proteinen wie STRIP2 oder SLMAP legen diese Funktion auch bei kardiovaskulären Erkrankungen nahe. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Rolle MST4 bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz spielen könnte. Daher werden die

Expression sowie die Aktivität von MST4 in verschiedenen Modellen von Herzinsuffizienz und Hypertrophie untersucht.

Zudem wird die Expression von MST4 in verschiedenen Geweben sowie in explantierten insuffizienten Herzen untersucht. Um Hinweise auf die subzelluläre Lokalisierung von MST4 zu bekommen, werden sowohl humanes Herzgewebe als auch isolierte Kardiomyozyten von Ratten mit einem Antikörper gegen MST4 angefärbt. Außerdem soll untersucht werden, ob MST4 im Herzen mit anderen STRIPAK-Proteinen interagiert.

Im nächsten Schritt werden die Expression bzw. die Aktivität von MST4 experimentell verändert, um die Auswirkungen und die Funktion von MST4 in Kardiomyozyten zu untersuchen.

Abschließend soll das gesamte Phosphoproteom von Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der MST4-Expression charakterisiert werden, um potentielle Kinase-Ziele von MST4 und beeinflussbare Signalwege in Kardiomyozyten zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
µStep System (Lichtquelle, Filter, Controller)	IonOptix
Absaugsystem Vacusafe	Integra Bioscience
Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare
Autoklaven	Systec VX-150
Cell Framing Adapter CFA300	IonOptix
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
Chromatographiepapier	Whatman
Deckgläser 18 mm Durchmesser	VWR International
ECX-F26.M UV-Transluminator	Peqlab Biotechnologie
Eismaschine AF100	Scotsman
Faltenfilter 110 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
Fluorescence System Interface	IonOptix
Fluoreszenz Beleuchtung Intensilight C-HGFI	Nikon
Fluovac System	Harvard Apparatus
Handschuhe Latex	Peha-soft (Hartmann)
Handschuhe Nitril	Nitra-Tex
Homogenisator Precellys 24	Bertin Instruments
Inkubator Heracell VIOS 250i CO2	Thermo Fisher Scientific
Inkubator Steri-Cult 200	Labotec
Kamera FluorChem Q	Alpha Innotech
Kühlschrank -20°C Revco Ultima Plus	Liebherr
Kühlschrank 4°C Profiline	Liebherr
Kühlschrank -80°C TSX Series	Thermo Fisher Scientific
Langendorff-Apparat	Bochem Instrumente
Ligatur, polyfil, 6-0	Ethicon
Magnetrührer CIMAREC i	Thermo Fisher Scientific

Bezeichnung	Hersteller
Magnetrührer RCT Basic	IKA
Magnetrührer Variomag Poly	Thermo Fisher Scientific
MaxQ 8000 Schüttler	Thermo Fisher Scientific
Messzylinder	VWR
Mikroplattenleser Infinite M200Pro	Tecan
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss Microscopy
Mikroskop BZ-9000	Keyence
Mikroskop LSM800	Carl Zeiss Microscopy
Mikroskop MSCP1-40 (Fluoreszenz)	Motic
Mikroskop Olympus BX53	Olympus
Mikroskop SMZ25	Nikon
Mikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss
Mikrotiterplatte 48-well Polystyrol	Thermo Fisher
Mikrozentrifuge Galaxy Ministar	VWR International
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories
Multiply-µStrip 8er Kette	Sarstedt
MyoCam-S Power	IonOptix
MyoPacer Field Stimulator	IonOptix
Neubauer-Zählkammer	Assistent
Objektträger 76x26x1 mm	MARIENFELD
Parafilm	Bemis
Pasteurpipetten, Glas	Carl Roth
PCR Folien, adhäsiv, farblos	Biozym Scientific
PCR Platte 96-Well, farblos	Biozym Scientific
Petrischale 35*10 mm	Sarstedt
pH-Messgerät Seven Easy	Mettler Toledo
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher
Pinzetten	Fine Science Tools
Pipette Multipette M4	Eppendorf
Pipette Multipipette Plus	Eppendorf
Pipette Reference	Eppendorf
Pipette Reference 2	Eppendorf

Bezeichnung	Hersteller
Pipette Research	Eppendorf
Pipette Research plus	Eppendorf
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments
Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories
PP-Mikroplatte 96-Well	Greiner Bio-One
Präzisionswaage TE1502S	Sartorius
QIAvac 24 Plus	Qiagen
Reagiergefäße Biosphere SafeSeal0,5/1,5/2,0 mL	Sarstedt
Reagiergefäße SafeSeal0,5/1,5/2,0 mL	Sarstedt
Röhrchen, 15/50 mL	Sarstedt
Röhrchen, luftdurchlässig, 14 mL	Sarstedt
Scheren	Fine Science Tools
Schlauchpumpe	Ismatec
Serologische Pipetten, 2/5/10/25 mL	Sarstedt
Spektrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Sterifilter 0,2 µm Porengröße	Nalgene Labware
SteriGARD Hood	The Baker Company
Sterilwerkbank HeraSafe KS	Thermo Fisher
Sterilwerkbank MaxiSafe 2030i	Thermo Fisher
Stretchmaschine FX5000T-FLK	Flexcell International
Thermal Cycler MyCycler	Bio-Rad Laboratories
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Arbeitsstation	Scanlaf
Tube Roller 10 basic	IKA
Tube Roller Mixer SRT6	Stuart
Tube Rotator SB3	Stuart
Umwälzthermostat DC1	Haake
Vevo 1100 VisualSonics Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad 3042	Köttermann

Bezeichnung	Hersteller
Wasserbad B3	Haake
XCell Surelock Midi-Cell	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflaschen T75/T175 cm ²	Sarstedt
Zellkulturplatte 6 Well Bioflex	Flexcell International Corporation
Zellkulturplatten Cellstar® 6-, 12-, 24-Well	Greiner Bio-One
Zellschaber 16 cm/ 25 cm	Sarstedt
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Pico 21	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Agar	Carl Roth
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Carbenicillin	Carl Roth
cOmplete™ Mini Protease inhibitor cocktail	Roche
DAPI	Roche
DEPC	Carl Roth
DMEM	gibco
DMEM Advanced	gibco
DMSO	Sigma Aldrich
DNA Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific
dNTP	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Fisher Scientific
DTT	Carl Roth
Dynabeads™ Protein G	Thermo Fisher Scientific
EDTA	Serva Electrophoresis
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Thermo Fisher Scientific

Bezeichnung	Hersteller
Fetales Kälberserum	Capricorn Scientific
Fluor Preserve Reagent	Calbiochem
Formamid	Sigma Aldrich
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Glukose	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
Hesperadin	Selleck Chemicals
iQ Multiplex 2000	Bio-Rad Laboratories
Isofluran	Baxter
Isopropanol	Carl Roth
Isoproterenol	Calbiochem
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kanamycin	Sigma Aldrich
Kollagen I- Lösung aus Rinderhaut	BD Biosciences
LB-Agar X969	Carl Roth
LB-Medium X968	Carl Roth
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamin RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific
Magnesiumheptasulfat	Carl Roth
Medium 199 (M2154)	Sigma Aldrich
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Natriummonohydrogenphosphat	Carl Roth
NCS (Newborn Calf Serum)	PAA Laboratories
Neugeborenes Kälberserum	Capricorn Scientific
NP-40	Sigma Aldrich
Pankreatin	Sigma Aldrich

Bezeichnung	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Percoll	GE Healthcare
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Phenylephrin	Sigma Aldrich
PhosSTOP Phosphatase inhibitor cocktail	Sigma Aldrich
Phusion Puffer	Thermo Fisher Scientific
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
QIAzol Lysis Reagenz	Qiagen
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
SDS	Serva Electrophoresis
SensiFAST SYBR	Bioline
Spectinomycin	Carl Roth
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
TEMED	Carl Roth
Tissue-Tek	Sakura Finetek Germany GmbH
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich
Tryptone	Sigma Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich

2.1.3 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Collagenase Typ 2	Worthington/Cellsystems
Complete-Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma Aldrich
Dream Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Gateway BP-Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Gateway LR-Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Pac I	New England Biolabs
Pfu DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma Aldrich
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
Trypsin/EDTA-Lösung	Merck

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 ADS-Puffer (10x)

Substanz	Konzentration
NaCl	1,16 M
HEPES	197 mM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	94 mM
Glukose	55,5 mM
KCl	53,6 mM
MgSO ₄	8,3 mM

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Einstellung des pH auf 7,4, Sterilfiltration

2.1.4.2 Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA-Puffer)

Substanz	Konzentration
NP-40	1 % (v/v)
Natriumdesoxycholat	1 % (w/v)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	0,1 % (w/v)
NaCl	150 mM
Natriumphosphat-Puffer ad pH 7,2	10 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Einstellung des pH auf 7,5

2.1.4.3 ELB-Puffer

Substanz	Konzentration
HEPES	50 mM
NaCl	250 mM
EDTA	5 mM
NP-40	1 % (v/v)

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser

2.1.4.4 SysQuant Puffer

Substanz	Konzentration
Urea	8 M
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
NaCl	75 mM

Urea in Wasser lösen, dazu ggf. erwärmen (nicht über 30 °C), Tris-HCl und NaCl hinzugeben und pH auf 8,2 einstellen. Pro 10 ml Puffer eine Tablette cComplete Mini Protease inhibitor (Roche) und eine Tablette PhosSTOP (Sigma-Aldrich) hinzugeben.

2.1.4.5 Proben-Puffer nach Laemmli (4x)

Substanz	Konzentration
Tris pH 6,8	250 mM
SDS	5 % (w/v)
Glyzerin	40 % (v/v)
Bromphenolblau	0,005 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	10 % (v/v)

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser

2.1.4.6 Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)

Substanz	Konzentration
Tris	250 mM
Glycin	1,9 M
SDS	1 % (w/v)

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Einstellung des pH auf 8,3

2.1.4.7 Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

Substanz	Konzentration
Tris	500 mM
SDS	0,4 % (w/v)

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Einstellung des pH auf 6,8

2.1.4.8 Trenngelpuffer für SDS-PAGE

Substanz	Konzentration
Tris	1,5 mM
SDS	0,4 % (w/v)

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Einstellung des pH auf 8,8

2.1.4.9 TBS-Lösung

Substanz	Konzentration
Tris-Cl	100 mM
NaCl	0,9 % (w/v)

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Einstellung des pH auf 7,5

2.1.4.10 Transferpuffer für Wester Blot

Substanz	Konzentration
Methanol	20 % (v/v)
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,037 % (w/v)

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Einstellung des pH auf 8,3

2.1.4.11 NRVC M Verdau-Puffer

Substanz	Konzentration
Kollagenase Typ II	0,5 mg/ml
Pankreatin	0,6 mg/ml

Lösung aller Substanzen in 1x ADS-Puffer (2.1.4.1), Sterilfiltration

2.1.4.12 ARVC M Isolations-Puffer Vorrat (10x)

Substanz	Konzentration
NaCl	1,204 M
KCl	147 mM
KH ₂ PO ₄	6 mM
NaH ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	6 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	12 mM
HEPES	100 mM

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Einstellung des pH auf 7,4 mit NaOH, Sterilfiltration

2.1.4.13 ARVC M Isolations-Puffer

Substanz	Konzentration
NaHCO ₃	4,6 mM
Taurin	30 mM
2,3-Butanedionmonoxim (BDM)	10 mM
Glukose	5,5 mM
10x ARVC M Isolations-Puffer Vorrat (s. 2.1.4.11)	10 % (v/v)

Lösung aller Substanzen in destilliertem Wasser, Sterilfiltration

2.1.4.14 ARVC M Verdau-Puffer

Substanz	Konzentration
Kollagenase Typ II (Worthington Cat#LS004177, Aktivität 260- 290 U/mg)	90 mg/50ml
CaCl ₂	40 µM

Lösung aller Substanzen in 50 ml ARVC M Isolations-Puffer (s. 2.1.4.13), Sterilfiltration

2.1.4.15 ARVCM Stop-Puffer

Substanz	Konzentration
BSA	1 % (w/v)
CaCl ₂	12,5 µM

Lösung aller Substanzen in 100 ml ARVCM Isolations-Puffer (s. 2.1.4.13), Sterilfiltration

2.1.4.16 ARVCM Calciumtolerationspuffer

	Substanz	Konzentration
Calciumtolerationspuffer I	CaCl ₂	100 µM
Calciumtolerationspuffer II	CaCl ₂	400 µM
Calciumtolerationspuffer III	CaCl ₂	900 µM

Hinzugabe der jeweiligen Menge CaCl₂ (aus 100 mM Stock-Lösung) zu jeweils 25 ml ARVCM Stop-Puffer (s. 2.1.4.15)

2.1.4.17 Kollagenlösung für NRVC

1 ml von 0,01 M Salzsäure in Wasser ansetzen und 16,7 µl Kollagen-I-Stammlösung (3 mg/ml) hinzugeben. Die finale Konzentration des Kollagens beträgt dann 49 µg/ml.

2.1.5 Zellmedien**2.1.5.1 Medium zum Anwachsen von NRVC**

Substanz	Konzentration
Fetales Kälberserum (FCS)	10 % (v/v)
Penicillin G	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM

Lösung aller Substanzen in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (gibco)

2.1.5.2 Medium zur Serumdeprivation von NRVC

Substanz	Konzentration
Penicillin G	100 U/l
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM

Lösung aller Substanzen in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (gibco)

2.1.5.3 Medium zur Transfektion von NRVC

Substanz	Konzentration
L-Glutamin	2 mM

Lösung des L-Glutamin in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (gibco)

2.1.5.4 Medium zur Kultur von HEK-293A-Zellen

Substanz	Konzentration
FCS	10 % (v/v)
Penicillin G	100 U/l
Streptomycin	100 µg/l
L-Glutamin	2 mM

Lösung aller Substanzen in Advanced DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (gibco)

2.1.5.5 ARVCM-Medium

Substanz	Konzentration
Kreatin	10 mM
Taurin	20 mM
BSA	1 % (w/v)
Penicillin G	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM

Lösung von Kreatin, Taurin und BSA in Medium 199 mit Earles-Salzen und Natriumbicarbonat, Sterilfiltration, Hinzugabe von Penicillin G, Streptomycin und L-Glutamin

2.1.5.6 ARVCM-Medium mit Fura-2AM

Zu ARVCM-Medium (s. 2.1.5.5) wurden pro ml Medium 2 µl Fura-2AM (Stock-Lösung 1 mM in DMSO) hinzugegeben, sodass eine Konzentration von 2 µM im Medium erreicht wurde.

2.1.6 Antikörper

Eingesetzte Antikörper, inklusive Verdünnung nach Anwendung: Western Blot (WB), Immunfluoreszenz (IF), Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

2.1.6.1 Primärantikörper

Zielprotein	Spezies, Klonalität	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
Caspase 3	Kaninchen, poly	Cell Signaling	#9662S	WB 1:1.000
Caspase 3, gespalten	Kaninchen, mono	Cell Signaling	#9664	IF 1:400
Caspase 7	Kaninchen, poly	Cell Signaling	#9492S	WB 1:1.000
Cav 1.2	Maus, mono	Origene	TA309306	IF 1:100
GAPDH	Maus, poly	Sigma	G8795	WB 1:10.000 Co-IP 1:100
MST4	Kaninchen, poly	Cell Signaling	#3822	WB 1:1.000 IF 1:100
MST4	Kaninchen, mono	Abcam	ab52491	WB 1:1.000 Co-IP 1:100
MST4, Phospho-T178	Kaninchen, mono	Abcam	ab76579	WB 1:1.000
PARP	Kaninchen, poly	Cell Signaling	#9542	WB 1:1.000
SLMAP	Kaninchen, poly	Novus Biologicals	NBP1-81398	WB 1:1.000
STRIP2	Kaninchen, poly	Proteintech	25163-AP	WB 1:1.000
TAZ	Kaninchen, mono	Cell Signaling	#8418	WB 1:3.000
VEGFA	Kaninchen, poly	Abcam	ab46154	WB 1:1.000
α -Actinin 2	Maus, mono	Sigma	A7811	IF 1:200
α -Tubulin	Maus, mono	Sigma	T5168	WB 1:8.000

Tabelle 2-1: Eingesetzte Primärantikörper**2.1.6.2 Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Spezies, Klonalität	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 546	Ziege, poly	Thermo Fisher	A11030	WB 1:2.000 IF 1:400
Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 546	Esel, poly	Thermo Fisher	A10036	IF 1:500
Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	Huhn, poly	Thermo Fisher	A21200	IF 1:500
Anti-Mouse IgG, HRP	Ziege, poly	Dianova	115-035-146	WB 1:10.000
Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 546	Esel, poly	Thermo Fisher	A10040	IF 1:400
Anti-Rabbit IgG, HRP	Ziege, poly	Dianova	111-035-045	WB 1:10.000

Tabelle 2-2: Eingesetzte Sekundärantikörper

2.1.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
DC-Protein Assay	Bio-Rad
LunaScript RT SuperMix Kit	New England BioLabs
NucleoSpin Plasmid, Mini Kit	Macherey & Nagel
Plasmid PlusMidi Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Quick-RNA Microprep Kit	Zymo Research

2.1.8 Primer

2.1.8.1 Primer für Sybr-Green qRT-PCR

Gen	Spezies	Beschreibung	Sequenz
MST4	Maus, Mensch, Ratte	forward	CCCTCAGAGAGTCATGGACC
		reverse	CGGGGTCAACTTGTCATCTT
Ezrin	Ratte	forward	CCCTCAGAGAGTCATGGACC
		reverse	CGGGGTCAACTTGTCATCTT
VCAM1	Mensch	forward	GAATGGGAAGGTGACGAATG
		reverse	AGATTCACAAGTTGCTGTGC
IL6	Mensch	forward	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG
		reverse	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
RPL32	Maus, Ratte	forward	GGTGGCTGCCATCTGTTTTACG
		reverse	CCGCACCCTGTTGTCAATGC
18S	Maus, Mensch, Ratte	forward	GCACGGCCGGTACAGTGAAA
		reverse	GCGCCCGTCGGCATGTATTA
VEGFA	Ratte	forward	CAGGCTGCACCCACGACAGA
		reverse	GACGGCAATAGCTGCGCTGG
RPLP0	Ratte	forward	ATCTCCCCCTTCTCCTTCGGGC
		reverse	CAGGGCCTGCTCTGTGATGTCC

Tabelle 2-3: Eingesetzte Primer für Sybr-Green qRT-PCR

2.1.8.2 Primer für Multiplex-qRT-PCR

Gen	Spezies	Beschreibung	Sequenz
NPPA	Maus, Ratte	forward	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG
		reverse	ACCTCATCTTCTACCGGCAT
		Sonde	FAM-TGATGGATTTC AAGAACCTGCTAGACCA-BHQ1
NPPB	Maus	forward	ACAAGATAGACCGGATCGGA
		reverse	AGCCAGGAGGTCTTCCTACA
		Sonde	HEX-TCAGTGCGTTACAGCCCAAACGA-BHQ1
NPPB	Ratte	forward	AGAAGATAGACCGGATCGGC
		reverse	AGCCAGGAGGTCTTCCTAAA
		Sonde	HEX-TCAGCCCGTCACAGCCCAAGCGA-BHQ1
RCAN 1.4	Maus, Ratte	forward	TAGCTCCCTGATTGCTTGTG
		reverse	GGATTCAAATTTGGCCCTGG
		Sonde Ratte	CY5.5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-ECL
		Sonde Maus	CY5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-BHQ2
RPL32	Maus, Ratte	forward	CTGCTGATGTGCAACAAATCT
		reverse	GCTGTGCTGCTCTTCTACAAT
		Sonde	RED-ACTGTGCTGAGATTGCTCACAATGTGT-BHQ2

Tabelle 2-4: Eingesetzte Primer für Multiplex-qRT-PCR

2.1.8.3 Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren (Gateway-Protokoll)

Verwendung	Beschreibung	Sequenz
Gateway Open Reading Frame Ad MST4	forward	GCTGGCACCATGGCCCACTCACCGG
	reverse	GCTGGGTCGCCGTTAAGGGGATTCATCCGCG
Adapter zur Komplettierung der attB-sites	attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGGCACC
	attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCC
M13-Primer zur Integration in pDONR221-Vektor	forward	GTA AACGACGGCCAG
	reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabelle 2-5: Eingesetzte Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren

2.1.9 Short interfering RNA (siRNA)

Silencer™ Select Pre-Designed siRNA von Thermo Fisher Scientific

Name	Katalognummer	Beschreibung
siRNA-Negativkontrolle Nr. 1	4390843	Negativkontrolle ohne Zielsequenz
GAPDH Positivkontroll-siRNA	4390849	Positivkontrolle, siRNA gegen GAPDH-mRNA
siMST4 ID s165383	4390771	siRNA gegen MST4-mRNA, Exon 8 (siMST4-A in Abbildungen)
siMST4 ID s165382	4390771	siRNA gegen MST4-mRNA, Exon 4 (siMST4-B in Abbildungen)

Tabelle 2-6: Eingesetzte siRNA

2.1.10 Adenovirale Konstrukte

Virusname	Sequenz Referenz	Abkürzung in Abbildungen	Beschreibung
Ad_MST4	NM_133729.1 (227-1499)	AdMST4	Konstrukt zur Überexpression von MST4
Ad_LacZ	CP034658.1 (328149-331223)	AdLacZ/Kontrolle	Konstrukt zur Überexpression von β -Galaktosidase, Kontrolle bei Überexpressionsversuchen

Tabelle 2-7: Eingesetzte adenovirale Konstrukte

2.1.11 Zelllinien

2.1.11.1 HEK293-A Zellen

HEK293-A Zellen stammen ab von HEK293 Zellen, einer permanenten Zelllinie von humanen embryonalen Nierenzellen. Dieser Subklon enthält eine stabile Kopie des E1 Gen des humanen Adenovirus Typ 5, dessen Produkt, das E1 Protein, notwendig ist für die Replikation von rekombinanten Adenoviren (Graham et al., 1977). Die Zellen wurden ursprünglich von der American Type Culture Collection bezogen.

2.1.12 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde nach positiver Beurteilung durch die Ethik-Kommission beim Umwelt- und Landwirtschaftsministerium Schleswig-Holstein genehmigt und überwacht.

2.1.12.1 Ratten vom Wistar-Stamm

Männliche und weibliche Ratten (*Rattus norvegicus*) vom Wistar-Stamm wurden von Charles-River Laboratories, Wilmington (US-MA) bezogen und in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikum

Schleswig-Holstein, Campus Kiel (UKSH Kiel) verpaart. Aus ein bis drei Tage alten Tieren werden NRVCN isoliert (s. 2.2.1). Aus etwa sechs Wochen alten Tieren werden ARVCN isoliert (s. 2.2.2).

2.1.12.2 MLP-Knockout-Mäuse (MLP-KO)

Das Muscle Lim Protein (MLP) kommt nur in quergestreifter Muskulatur vor und ist dort für die Organisation und Regulation der Funktion zuständig. Ein homozygoter Knockout von MLP (MLP (-/-)) in Mäusen (*Mus musculus*) vom Stamm C57BL/6N führt zu einer Störung der kardialen Zytoarchitektur. Außerdem ist als Phänotyp nach der Geburt eine dilatative Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz zu beobachten (Arber et al., 1997). Die Kontrolltiere (WT) vom gleichen Stamm besitzen keinen Knockout. Die Mäuse wurden von der Universität Heidelberg übernommen und in der Zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel gehalten. Für diese Arbeit wurden bereits vorhandene Proteinlysate freundlicherweise von Dr. Simone Martini überlassen.

2.1.12.3 Calcineurin-transgene Mäuse (CnA-TG)

Mithilfe eines α -MHC-Expressionsvektors wurde cDNA für eine dauerhaft aktive Form der katalytischen Calcineurin Untereinheit A (CnA) in das Genom von Mäusen (*Mus musculus*) vom Stamm FVB integriert. Die resultierende Bezeichnung lautet „Tg(Myh6-Ppp3ca)37Eno“ bzw. „C57BL/6N-0707Cna“. Durch den Expressionsvektor ist die Expression von CnA abhängig von der Aktivierung des Promotors für α -MHC (Myosin Schwere Kette 6, MYH6), die herzspezifisch stattfindet. Die transgenen Tiere entwickeln kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Molkentin et al., 1998). Die Kontrolltiere (WT) vom gleichen Stamm besitzen keine genetische Veränderung. Die Mäuse wurden von der Universität Heidelberg übernommen und in der Zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel gehalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Proteinlysate verwendet.

2.1.12.4 Calsarcin-1-Knockout-Mäuse (CS1-KO)

Calsarcin-1 (Myozenin 2) ist ein muskelspezifischer Inhibitor des Calcineurin-Signalweges. Ein Knockout von Calsarcin-1 in Mäusen (*Mus musculus*) vom Stamm C57BL/6N führt daher zu einer verstärkten Aktivität dieses Signalweges, insbesondere bei biologischem Stress. Daraus resultiert im Herzen eine vermehrte Aktivität von Hypertrophie-assoziierten Genen. Hypertrophie ist allerdings erst bei erhöhtem biologischen Stress zu beobachten, z.B. im Rahmen einer Druckbelastung durch Aortenkonstriktion (Frey et al., 2004). Die Kontrolltiere (WT) vom gleichen Stamm besitzen keinen Knockout. Die Mäuse wurden von der Universität Heidelberg übernommen und in der Zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel gehalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Proteinlysate verwendet.

2.1.12.5 Mäuse mit Konstriktion der Aorta transversa (TAC)

Um eine erhöhte Druckbelastung im linken Ventrikel mit den daraus resultierenden pathologischen Veränderungen hervorzurufen, kann die Aorta in Höhe des Aortenbogens (Aorta transversa)

konstringiert werden. Dazu wird unter sterilen Kautelen in Narkose der linke Hemithorax über einen interkostalen Zugang eröffnet, eine Ligatur um eine 27G-Nadel (Außendurchmesser 0,4mm) durchgeführt, die Nadel entfernt, sodass der Durchmesser der Aorta 0,4mm beträgt und der Thorax wieder verschlossen. Bei den Kontrolltieren (Sham) war das Vorgehen gleich, jedoch wurde keine Ligatur um die Aorta gelegt. 2 Wochen nach der Prozedur wurden die Tiere für die Analyse getötet. Die verwendeten Mäuse (*Mus musculus*) vom Stamm C57BL/6N wurden von Charles-River Laboratories, Wilmington (US-MA) bezogen und in der zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel gehalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Proteinlysate verwendet.

2.1.13 Humane Proben

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Samuel Sossalla und dem Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen, wurden Proben aus humanen Herzen bezogen. Nach Herztransplantationen wurden den explantierten Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und ischämischer Kardiomyopathie (ICM) Proben entnommen. Als Kontrollproben wurde nicht für die Diagnostik genutztes Material von Routine-Myokardbiopsien der transplantierten Herzen verwendet. Dieses Vorgehen wurde durch die Ethik-Kommission der Universität Göttingen genehmigt.

2.1.14 Software

Bezeichnung	Entwickler
Bio-Rad CFX Maestro	Bio-Rad
BioRender.com	BioRender
BZ-II Analyzer	Keyence
Image J 1.53a	National Institutes of Health
IonWizard Core + Analysis, SoftEdge, SarcLen	IonOptix
Magellan	Tecan
Office-Suite	Microsoft
Photoshop	Adobe
Prism	GraphPad
Zen 2.3	Zeiss Microscope Software

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten

2.2.1.1 Prinzip/Hintergrund

Kardiomyozyten sind postmitotische Zellen (Lüllmann-Rauch, 2012), sodass primäre Zellen als Modell genutzt werden. Dafür werden die Zellen aus Herzen ein bis drei Tage alter Ratten vom Wistar-Stamm herausgelöst und anschließend werden die Kardiomyozyten von anderen Zellen in einer Suspension getrennt. Die neonatalen Kardiomyozyten lassen sich, anders als adulte Kardiomyozyten, ohne größere Verluste vier Tage in Kultur halten. Dabei kommt es allerdings zu einer Veränderung der Zellen, die oft am dritten oder vierten Tag durch ein Pulsieren der Zellen sichtbar wird. Außerdem bilden die neonatalen Zellen noch nicht die gleiche reife Zellarchitektur aus, wie adulte Zellen (Ali et al., 2020; Eden et al., 2016).

2.2.1.2 Vorgehen

2.2.1.2.1 Präparation der Rattenherzen

Die Tiere wurden nach kurzer Desinfektion durch Eintauchen in 70%igen Ethanol per Dekapitation getötet, der Thorax durch einen linksparemedianen Schnitt eröffnet und das Herz durch leichten Druck auf das Abdomen des Tieres und Unterminieren mit einer Schere herausgelöst und in eiskalten ADS-Puffer überführt. Anschließend wurde unter einer Sterilwerkbank auf Eis das Blut herausgewaschen und Vorhöfe, Gefäße sowie sonstiges nicht-ventrikuläres Gewebe entfernt. Die Herzen wurden in frischen ADS-Puffer überführt, dieser wurde abgesaugt und die Herzen mithilfe einer Schere homogen zerkleinert.

2.2.1.2.2 Gewebeverdau

Die zerkleinerten Herzen wurden in die Verdauungslösung (1 ml pro Herz) gegeben, auf 75cm²-Flaschen verteilt (25-30 Herzen pro Flasche) und für 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad schüttelnd inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Gewebe mit frischer Verdauungslösung erneut für 20 Minuten inkubiert und anschließend mehrfach auf- und abpipettiert. Durch ein Zellsieb wurde der Überstand in ein 50ml-Tube überführt und mit 10 ml NCS versetzt. Das restliche Gewebe in der 175cm²-Flasche wurde erneut verdaut, auf- und abpipettiert und der Überstand durch ein Zellsieb in ein 50ml-Tube überführt und mit 10 ml NCS versetzt. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis das Gewebe vollständig in Suspension übergegangen ist, meist zwei- bis dreimal. Anschließend wurden die isolierten Zellen fünf Minuten bei 1.000 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 10 ml NCS resuspendiert und jeweils vier bis fünf Pellets in 50ml-Tubes

zusammengeführt. Die gepoolte Zellsuspension wurde anschließend erneut fünf Minuten bei 1.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und in ADS resuspendiert.

2.2.1.2.3 Isolation der Kardiomyozyten

Die Kardiomyozyten wurden aus der Zellsuspension mithilfe eines Percoll-Dichtegradienten isoliert. Dafür wurden in einem 15ml-Tube zwei Phasen durch Hinzugabe unterschiedlicher Mengen von ADS zu Percoll hergestellt. Die mit Phenolrot gefärbte Oberphase wurde mit einer farblosen Unterphase unterschichtet. Die Zellsuspension wurde vorsichtig auf die Oberphase gegeben. Das Tube wurde 30 Minuten bei 2.400 rpm und 4 °C ohne Bremse zentrifugiert. Am Grund ist ein Pellet aus hauptsächlich Erythrozyten entstanden, darüber die ursprüngliche Unterphase an deren Übergang zur Oberphase sich eine Interphase mit Kardiomyozyten gebildet hat. Zwischen der Oberphase und dem ADS ohne Percoll hat sich eine Interphase mit Fibroblasten gebildet. ADS, Fibroblasten-Interphase und der Großteil der Oberphase wurden abgesaugt und verworfen. Fünf bis sechs Kardiomyozyten-Interphasen wurden in einem 50ml-Tube gepoolt, das Tube mit ADS auf 50ml aufgefüllt und fünf Minuten bei 1.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem die Pellets gepoolt und erneut mit ADS gewaschen wurden, wurden sie schließlich in FCS-haltigem Kardiomyozytenmedium resuspendiert.

2.2.1.2.4 Auszählen und Aussäen

Es wurden 150 µl der Zellsuspension entnommen und mit 150 µl Trypanblau versetzt. Avitale Zellen nehmen den Farbstoff auf, sodass sich diese von den vitalen Zellen unterscheiden. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden ausschließlich die vitalen Zellen gezählt und die Konzentration in der Zellsuspension errechnet. Je nach Versuch wurde eine unterschiedliche Anzahl von Zellen auf unterschiedlich große Platten ausgesät. Damit die Zellen adherent anwachsen können, wurden die Wells der Platten zuvor mit einer Kollagenlösung (49 µg/ml) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet, mit ddH₂O gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

Wenn nicht anders angegeben, war die Verteilung der NRVCM folgendermaßen:

Versuchstyp	Zellkulturplatte	Zellen/Well	Medium/well (ml)
Protein-Isolierung	6-Well	10 ⁶	2
Protein-Isolierung	10cm-Schale	10 ⁷	10
RNA-Isolierung	6-Well	0,75x10 ⁶	2
Immunzytochemie	12-Well mit Coverslip	0,2x10 ⁶	1
MTT-Assay	24-Well	0,15x10 ⁶	0,5
Stretch	6-Well-Stretch	1,5x10 ⁶	2

Tabelle 2-8: Eingesetzte Zellzahl in Abhängigkeit von der Zellkulturplatte

2.2.2 Isolation adulter Rattenkardiomyozyten

2.2.2.1 Prinzip/Hintergrund

Für elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten oder die Untersuchung der Zellarchitektur ist der Einsatz von Kardiomyozyten von ausgewachsenen Zellen notwendig. Neonatale Kardiomyozyten besitzen noch nicht die typische Zigarrenform, keine T-Tubuli und zeigen bei elektrischer Stimulation keine gerichtete Kontraktion. Adulte Rattenkardiomyozyten werden aus etwa sechs Wochen alten Ratten vom Wistar Stamm isoliert. Dafür wird der Brustkorb der Ratten eröffnet, das Herz herausgelöst und mithilfe einer Langendorff-Apparatur mit einer Verdaulösung durchspült. Im Anschluss werden die Zellen mechanisch isoliert und an steigende Calciumkonzentrationen gewöhnt, die Konzentration ermittelt und auf mit Laminin behandelten Platten ausgesät. Nachdem die Zellen festgewachsen sind, können sie entweder zur Untersuchung der Zytoarchitektur fixiert werden oder es kann ein Adenovirus hinzugegeben werden und innerhalb eines Tages für eine Überexpression sorgen. Die Zellen können nach etwa 24 h mithilfe eines IonOptix-Systems auf Kontraktilität und Calciumströme untersucht werden. Adulte Kardiomyozyten überleben in Kultur weit schlechter als neonatale, sodass bei deutlich späteren Messungen meist keine Kontraktion mehr feststellbar ist. Eine Dedifferenzierung startet allerdings bereits kurz nach der Isolation und zeigt sich z.B. durch ausbleibende Reaktion bzw. Übergang in Apoptose bei elektrischer Stimulation oder Verlust der Querstreifung. Um möglichst viele vitale Zellen untersuchen zu können, ist ein rasches Arbeiten bei der Exzision des Herzens notwendig sowie die richtige Temperatur und Zeit beim Verdau und die Beschichtung der Wells mit einer hohen Konzentration Laminin (Bastug-Özel et al., 2019).

2.2.2.2 Vorgehen

2.2.2.2.1 Präparation des Rattenherzens

Eine etwa sechs Wochen alte Ratte vom Wistar Stamm wurde mittels Isofluran narkotisiert, die vollständige Areflexie überprüft, der Bauchraum eröffnet und das Zwerchfell von den Rippen getrennt. Möglichst weit lateral wurden die Rippen mit einer kräftigen Schere von kaudal nach kranial zertrennt und das Thoraxschild am unteren Ende des Brustbeins hochgeklappt. Während das Herz noch geschlagen hat, wurden etwa 20 IE Heparin in die untere Hohlvene injiziert. Mit einer kleinen Pinzette und einer kleinen Schere wurden Thymus bzw. Thymusrestkörper entfernt und die Aorta bis zum Aortenbogen freigelegt. Das Herz wurde an der Aorta gegriffen und die Aorta etwa am Aortenbogen durchtrennt. Zum Herauslösen des Herzens wurden anschließend Lungengefäße und Hohlvenen durchtrennt, wobei diese Strukturen vorher gut dargestellt werden mussten, da sich die Thoraxhöhle beim Durchtrennen der Aorta mit Blut füllt. Schließlich wurde das Herz in eiskaltes PBS überführt, um den Hypoxieschaden möglichst gering zu halten.

2.2.2.2.2 *Gewebeverdau*

Das Herz wurde durch mehrfaches Ausdrücken mit einer kleinen Pinzette ausgespült. Dadurch gelang auch die sichere Identifikation der Aorta, aus der ein deutlicher Blutfluss ersichtlich war. Es wurden mögliche Reste von Lungengewebe entfernt und die Aorta mit einer mit Isolationspuffer gespülten Knopfkanüle bis knapp oberhalb der Aortenklappe kanüliert. Um eine Perfusion mit der Verdaulösung über die Herzkranzarterien sicherzustellen, durfte die Aortenklappe nicht durchstoßen und damit beschädigt werden. Die Kanüle wurde mithilfe einer Klemme und einem geflochtenen chirurgischen Faden befestigt. Der richtige Sitz wurde überprüft, indem mit einer Spritze Isolationspuffer injiziert wurde und die Herzkranzarterien sich daraufhin entfärbt haben. Das kanülierte Herz wurde in einen mit Isolationspuffer gespülten Langendorff-Apparatur eingespannt. Die Perfusion mit Verdaulösung wurde auf 8 ml/min und die Temperatur des Wasserbades 41 °C gestellt. Dadurch entsprach die Temperatur am Herzen 37 °C. Die durch das Herz gelaufene Verdaulösung wurde aufgefangen und dem Kreislauf erneut zugeführt. Regelmäßig wurde durch leichten Druck mit zwei Fingern überprüft, ob das Herz bereits seine Elastizität verloren hatte. Meist dauerte der Verdau etwa fünfzehn bis zwanzig Minuten.

Anschließend wurde das Herz aus der Apparatur genommen, kanülierte Aorta und Vorhöfe abgetrennt und etwa eine halbe Minute in einer 10cm-Schale in einer geringen Menge Verdaulösung mit einer Schere zerteilt. Danach wurden 5 ml Stop-Puffer, dessen Albumin die Wirkung der Kollagenase unterbinden sollte, hinzugefügt. Mit einer Stabpipette mit großer Öffnung oder mit abgeschnittener und abgeflammter Spitze wurde für etwa zwei bis drei Minuten auf- und abpipettiert, bis kein Gewebe mehr erkennbar war. Die Zellsuspension wurde durch einen 200µm-Filter in ein 50ml-Tube überführt und die letzten Zellen mit Stop-Puffer von der 10cm-Schale gewaschen.

2.2.2.2.3 *Calciumtoleration*

Nach zehn Minuten bei Raumtemperatur haben sich die meisten Zellen am Boden gesammelt, der Überstand wurde größtenteils abgesaugt und verworfen und etwa 5ml des Calciumtolerationspuffer I (100 µM) hinzugegeben. Nach etwa zwei Minuten wurden der Rest der 25 ml des Puffers hinzugegeben. Nach etwa zehn Minuten wurde wieder der Überstand abgesaugt und verworfen und die Tolerations mit dem Puffer II (400 µM) wiederholt. Zuletzt wurde Puffer III (900 µM) hinzugegeben. Nach etwa zehn Minuten wurde so viel des Überstands abgesaugt, dass das Zellpellet in ca. 10 ml Puffer zurückgeblieben ist.

2.2.2.2.4 *Auszählen und Aussäen*

Das Pellet wurde durch leichtes Schütteln im verbliebenen Puffer resuspendiert und etwa 10 µl der Zellsuspension auf beide Seiten der Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen gezählt. In Abhängigkeit von der Zellzahl wurde die Suspension entweder weiter konzentriert durch Abnahme von

Überstand oder durch Hinzugabe von Calciumtolerationspuffer III weiter verdünnt. Die Zielkonzentration betrug etwa 100 bis 200 Zellen pro Mikroliter, sodass 40.000-50.000 Zellen in 100-300 µl für die Untersuchung mit dem IonOptix-System auf 6-Well-Platten ausgesät werden konnten. Diese 6-Well-Platten wurden zuvor mit etwa 10-20 µl Laminin-Lösung (1 mg/ml) behandelt und im Wärmeschrank bei 60 °C oder bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Isolation von Proteinen wurden die Zellen direkt auf die Laminin-beschichteten Wells ausgesät, für die Untersuchung im IonOptix-System wurden zuvor quadratische Deckgläschen eingelegt und diese beschichtet. Für eine direkte Fixierung der Zellen für die Immunzytologie wurden einige Tausend Zellen auf Laminin-beschichtete Deckgläschen in 12-Well-Platten ausgesät.

Nach etwa einer Stunde waren die Zellen leicht festgewachsen und konnten entweder fixiert werden oder es konnten 2 ml ARVCM-Medium pro Well (6-Well-Platte), ggf. mit Inhibitor und/oder Virus hinzugegeben werden.

2.2.3 Generierung rekombinanter Adenoviren

2.2.3.1 Prinzip/Hintergrund

Zur Überexpression von Proteinen wird DNA mithilfe von rekombinanten Adenoviren in Zellen eingeschleust und dort von den Zellen transkribiert und translatiert. Die verwendeten humanen Adenoviren Typ 5 sind zum einen so verändert, dass sie sich nur in HEK-293A-Zellen vermehren können (s. 2.2.4) und zum anderen besitzen sie eine Sequenz, die es ermöglicht, eine ausgewählte cDNA-Sequenz dort einzusetzen. Dazu wird das Gateway-Klonierungssystem verwendet. Die Sequenz muss richtig im Leserahmen, dem sogenannten Open Reading Frame (ORF) angeordnet sein, um später das richtige Genprodukt zu erhalten. Dazu wird sie in der sogenannte ORF-PCR mithilfe von Primern aus erworbener cDNA – z.B. aus Mäusen – vermehrt und mit Adapter-Primern erweitert, damit die Sequenz von sogenannten attB-Rekombinationsstellen flankiert wird. Über diese Adapter wird die Sequenz in den eigentlichen Vektor eingebaut und HEK-293A-Zellen damit infiziert. Dort werden mithilfe des dort vorhandenen E1-Gens Viren hergestellt, die sich wie unter 2.2.4 beschrieben vermehren lassen (Eden et al., 2016).

2.2.3.2 Vorgehen

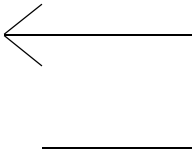
Zur Klonierung der notwendigen Plasmide waren zwei PCR-Durchgänge notwendig: Im ersten wurde die Zielsequenz amplifiziert und im zweiten die flankierenden attB-Rekombinationsstellen angefügt. Die dafür verwendeten Primer sind unter 0 beschrieben.

Für die erste Reaktion wurden 10 µl Phusion-Puffer (5x), 1 µl dNTP-Mix, je 2,5 µl der beiden Gateway-Primer (10 nM), 0,5 µl der Phusion-Polymerase (2000 U/ml) und 5 ng der erworbenen cDNA mit ddH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen angesetzt. Die PCR wurde im Thermocycler nach folgendem Schema durchgeführt:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek	
Denaturierung	98 °C	30 sek	
Annealing	55 °C	30 sek	
Elongation	68 °C	2 min	
Finale Elongation	68 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Per Gelelektrophorese und UV-Detektion wurde überprüft, ob ein PCR-Produkt in der richtigen Größe entstanden ist. Anschließend wurde die zweite PCR nach dem gleichen Schema durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der Lösung mit den attB-Primern angesetzt. Das Ergebnis dieser Reaktion wurde ebenfalls per Gelelektrophorese aufgetrennt, die passende Bande aus dem Gel herausgeschnitten und die cDNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert. 130 ng dieser cDNA mit der Ziel-Sequenz wurden mit 150 ng des Entry-Vektors pDONR221 und Elutions-Puffer auf 8 µl Gesamtvolumen angesetzt. 2 µl BP-Clonase wurden hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C wurde die BP-Reaktion beendet.

1 µl des Produktes wurden anschließend zu 50 µl von frisch aufgetauten E. coli Bakterien vom Stamm DH10B gegeben und per Elektroporation (2,5 kV, 200 Ω, 25 µF) in diese transformiert. Die Bakteriensuspension wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen und in einem frischen Röhrchen für 1 h bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Suspension zur Selektion auf kanamycinhaltigen Agar ausgestrichen. Nur die Bakterien, die über den pDONR221-Vektor neben der Zielsequenz auch ein Resistenzgen gegen Kanamycin erhalten hatten, konnten sichtbare Kolonien bilden. Diese wurden am Folgetag mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und in je 6 ml LB-Medium mit 6 µl Kanamycin überführt. Die massenhafte Vermehrung der Plasmid-haltigen Bakterien fand bei 37 °C für 24 h statt. Per Plasmid-Präp wurden die Plasmide aus den Bakterien isoliert, die Konzentration der DNA bestimmt und eine PCR durchgeführt. Dazu wurden 10 µg Plasmid, 2,5 µl Taq-Puffer (10x), 0,5 µl dNTP-Mix, jeweils 0,75 µl der M13-Primer (10 nM) und 0,125 µl der Taq-Polymerase (5 U/µl) mit ddH₂O auf 25 µl aufgefüllt. Die PCR fand nach folgendem Schema statt:

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 sek	
Annealing	45 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Das PCR-Produkt wurde per Gelelektrophorese aufgetrennt, die passende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, durch die Firma Eurofins, Luxembourg, sequenziert und das Sequenzierungsergebnis mit der Ziel-Sequenz verglichen. Stimmte diese überein folgte die LR-Reaktion zur Integration in den Destinationsvektor, den eigentlichen Adenovirus pAd/CMV/V5.

180 ng des Produktes aus der BP-Reaktion wurden mit 150 ng Destinationsvektor mit Elutions-Puffer auf 8 µl Gesamtvolumen gebracht, 2 µl LR-Clonase wurden hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 1 µl Proteinase K und Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C beendet.

Es erfolgte wieder eine Transformation in DH10B-Bakterien per Elektroporation, wie oben beschrieben, und ein Ausstreichen der Bakterien auf Carbenicillin-haltigem Agar. Erfolgreich transformierte Bakterien enthielten ein Carbenicillin-Resistenzgen, sodass darüber die Selektion stattfand. Es folgten die gleichen Schritte wie nach der ersten Transformation und der Verdau der Plasmide durch Pac-I-Restriktionendonukleasen über Nacht.

Mithilfe von Lipofectamin wurden die Plasmide in HEK-293A-Zellen transfiziert und es wurde ein möglichst hochkonzentriertes Viruslysat hergestellt, welches für die Vermehrung, wie unter 2.2.4 beschrieben, verwendet wurde (Kluge et al., 2019).

2.2.4 Vermehrung von Adenoviren in HEK-293A-Zellen

2.2.4.1 Prinzip/Hintergrund

Die eingesetzten humanen Adenoviren Typ 5 besitzen kein replizierfähiges Genom, sodass sie grundsätzlich zwar das jeweilige Gen in die Wirtszelle einbringen, sich dort jedoch nicht vermehren können. HEK-293A-Zellen sind eine immortalisierte adhärent wachsende Zelllinie, die zusätzlich das E1-Gen besitzt, dessen Produkt den Viren zur Replikation fehlt. Daher können sich die E1-defizienten Viren in HEK-293A-Zellen vermehren. Aufgrund des Wachstums in einer singulären Schicht lässt sich gut beobachten, wann die Zellen große Mengen des Virus hergestellt haben. Zu diesem Zeitpunkt werden die Zellen lysiert, das Virus wird aliquotiert und ein Titer bestimmt, nach dem sich das eingesetzte Volumen bei der Infektion richtet (Eden et al., 2016).

2.2.4.2 Vorgehen

2.2.4.2.1 Kultivierung von HEK293-A-Zellen

Die Zellen können in 10 % (v/v) DMSO in FCS kryokonserviert in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Sie wurden anschließend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, mit Medium versetzt und auf T-75cm²-Zellkulturflaschen verteilt. Bei 37 °C und 5 % CO₂ verdoppelt sich die Zellzahl etwa alle 36 h. Bei einer Konfluenz von 70-90 %, meist nach drei bis vier Tagen, wurden die Zellen passagiert und auf größere Zellkulturflaschen verteilt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und

mit 5ml pro Flasche vorgewärmter 0,25 % (v/v) Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Zur Unterbrechung der Enzymreaktion wurde FCS-haltiges Medium hinzugegeben, die Suspension wurde in ein 50ml-Tube überführt und 5 min bei 1.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in frisches HEK-Medium aufgenommen und die Zellen einer Zellkulturflasche auf sechs neue T-175cm²-Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.4.2.2 *Vermehrung von Adenoviren*

Bei einer Konfluenz der HEK-293A-Zellen von etwa 80 % in den T175cm²-Zellkulturflaschen wurden sie mit dem zu vermehrenden Adenovirus infiziert. Nach etwa 48-72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnte eine Virusvermehrung anhand der kugeligen Form der Zellen lichtmikroskopisch beobachtet werden. Bevor sich der Zellrasen durch Absterben der Zellen vom Untergrund abgelöst hat, wurden die vitalen Zellen durch kräftiges Klopfen abgelöst und mit dem Medium in 50ml-Tubes überführt. Die Suspension wurde 10 min bei 1500 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen, das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert und in ein 2ml-Gefäß überführt. Zur Zellyse und Virusfreisetzung wurde die Suspension dreimal abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C unter leichtem Schütteln aufgetaut. Die Überreste der Zellen wurden 10 min abzentrifugiert und der virushaltige Überstand in Aliquots von 20-50 µl bei -80 °C eingefroren.

2.2.4.2.3 *Titerbestimmung der Adenoviren-Suspension*

Auf einer 24-Well-Platte wurden pro Well 300.000 HEK-293A-Zellen ausgesät. Eine Verdünnungsreihe wurde aus einem Adenovirusaliquot hergestellt mit Verdünnungen von 10⁻² bis 10⁻⁷, jeweils zwei Wells pro Verdünnungsstufe infiziert und 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen einige Minuten getrocknet und 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Das Methanol wurde abgenommen, die Zellen mit 1 % (w/v) BSA in PBS gewaschen, 1 h mit einem FITC-gekoppelten Anti-Hexon-Antikörper inkubiert, erneut mit 1 % (w/v) BSA in PBS gewaschen und mit PBS überschichtet. Unter einem Fluoreszenzmikroskop konnten die infizierten Zellen anhand des FITC identifiziert und gezählt werden. Bei 200-facher Vergrößerung wurden 10 Gesichtsfelder eines Wells gezählt und der Mittelwert pro Gesichtsfeld gebildet. Dieser wurde mit der Anzahl der Gesichtsfelder pro Well einer 24-Well-Platte bei der gewählten Vergrößerung, 313, multipliziert. Das Produkt wurde durch das Produkt aus gewähltem Verdünnungsfaktor und eingesetztem Volumen der Virussuspension dividiert. Dieses Ergebnis gab die Anzahl von infektiösen Einheiten (ifu) pro Milliliter Virussuspension an und wurde zur Bestimmung des einzusetzenden Volumens bei der Infektion verwendet (Kluge et al., 2019).

2.2.5 Überexpression von MST4

2.2.5.1 Prinzip/Hintergrund

In dieser Arbeit soll die Funktion von MST4 untersucht werden. Dazu ist es sinnvoll, die Menge des Proteins in der Zelle zu erhöhen und die Folgen zu beobachten. Bezogen auf MST4 spiegelt dies auch die Situation in Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie wider (s. 3.2). Dafür wurden Adenoviren eingesetzt, die DNA enthalten, die für MST4 kodiert. Diese DNA wird vom Virus in die Zellen eingebracht und dort translatiert, sodass die Expression von MST4 erhöht wird. Die Infektion und die vermehrte Proteinproduktion haben bereits einen Einfluss auf die Zellen, unabhängig von der konkreten Proteinfunktion selbst. Als Kontrolle wurde daher ein Virus genutzt mit cDNA für das bakterielle LacZ-Gen, das für β -Galaktosidase kodiert und die keine Auswirkungen auf die Regulation von Hypertrophie in Herzmuskelzellen besitzt (Will et al., 2010).

Die Viruskonzentration und die Dauer der Infektion wurde zu Beginn variiert und eine Infektionsdosis und -dauer für die späteren Versuche gewählt und beibehalten. Das im Folgenden beschriebene Verfahren beschreibt das grundsätzliche Vorgehen. In Abhängigkeit vom Versuch können weitere Substanzen hinzugefügt worden sein oder Zeitpunkte verändert worden sein. Details dazu sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

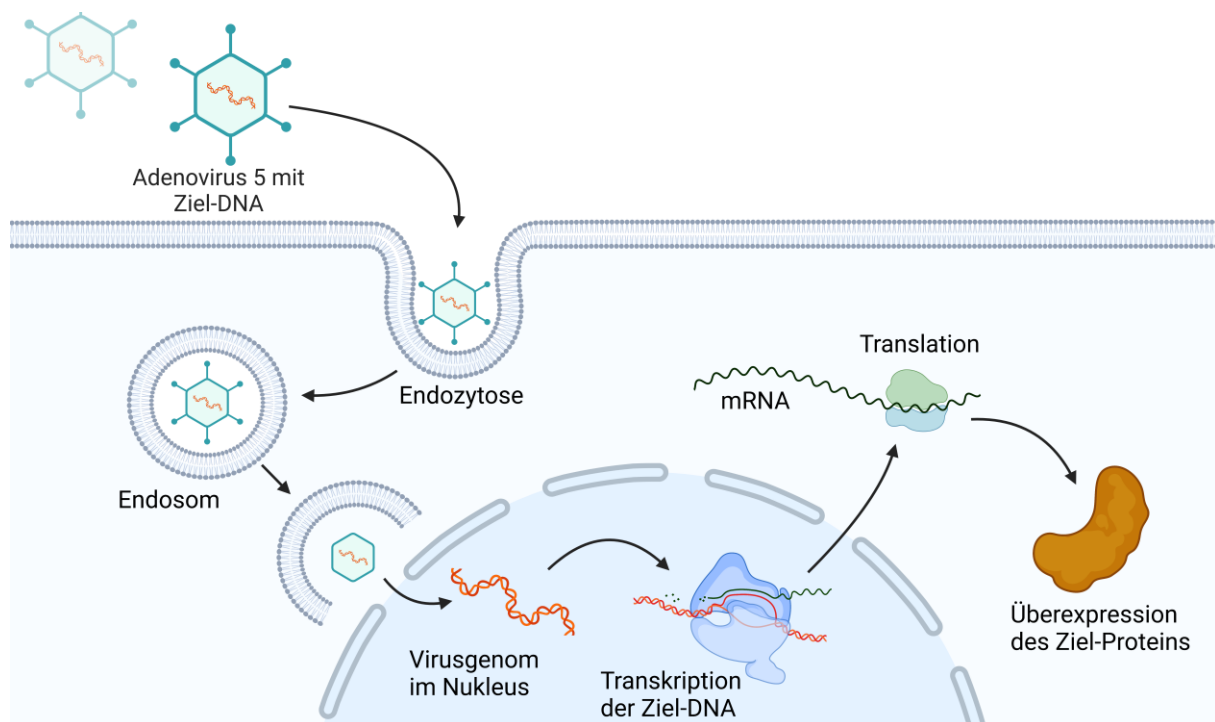


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der adenoviralen Überexpression

Der Adenovirus 5 mit der Ziel-DNA wird per Endozytose in die Zelle aufgenommen. Dort gelangt das Virusgenom in den Nukleus, wo die Ziel-DNA mit zelleigenen Mechanismen in mRNA transkribiert wird. Per Translation wird aus dieser das Ziel-Protein hergestellt.

2.2.5.2 Vorgehen in NRVCM

2.2.5.2.1 Tag 0

Die isolierten NRVCM wurden je nach Verwendungszweck auf Zellkulturplatten in serumhaltigem Medium ausgesät (s. 2.2.1.2.4) und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.5.2.2 Tag 1

Die Zellen wurden, wie auch an den folgenden Tagen, lichtmikroskopisch auf Verteilung, Vitalität und mögliche Kontamination untersucht. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit den Adenoviren. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt, die Zellen wurden mit 37 °C warmem PBS gewaschen und virushaltiges Medium ohne Serum auf die Zellen gegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden für die Überexpression von MST4 25 infektiöse Einheiten (ifu) vom MST4-Adenovirus pro Zelle eingesetzt.

2.2.5.2.3 Tag 3

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte 48 h nach der Infektion ein Mediumwechsel. Dazu wurde das Medium abgesaugt und frisches serumfreies NRVCM-Medium wieder hinzugegeben.

2.2.5.2.4 Tag 4

Nach etwa 72 h wurde eine ausreichende Überexpression bei der beschriebenen Viruslast erreicht. Zur Zellernte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und der weiteren Auswertung zugeführt.

2.2.5.3 Vorgehen in ARVCM

2.2.5.3.1 Tag 0

Nach der Isolation der ARVCM, dem Aussäen und dem etwa einstündigen Festwachsen der Zellen auf den Laminin-beschichteten Wells der 6-Well-Platten (s. 2.2.1.2.4), wurden die Zellen mit dem MST4-Adenovirus infiziert. Dazu wurden pro Well 2 ml virushaltiges ARVCM-Medium hinzugegeben. Da sich ARVCM nicht lange in Kultur halten lassen und der Infektionserfolg deutlich geringer als bei NRVCM zu sein scheint, wurde eine Viruskonzentration von 500 ifu/Zelle eingesetzt. Ein Mediumwechsel wurde aufgrund der schlechten Adhärenz der Zellen und der kurzen Zeit in Kultur nicht durchgeführt.

2.2.5.3.2 Tag 1

Etwa 24 h nach Infektion wurde eine ausreichend Überexpression von MST4 erreicht. Die Zellen wurden entweder per IonOptix-System ausgewertet (s. 2.2.21) oder die Proteine isoliert (s. 2.2.13).

2.2.6 Knockdown von MST4

2.2.6.1 Prinzip/Hintergrund

Um die Funktion von MST4 und die Rolle in bestimmten Signalwegen genauer zu beleuchten, ist neben der Überexpression auch ein Knockdown – also eine Verminderung der Proteinmenge – sinnvoll. Dies ist z.B. mithilfe von short/small interfering RNA (siRNA) möglich. Dabei handelt es sich um kurze RNA-Moleküle (ca. 20 bp), die eine Basensequenz besitzen, die komplementär zu einem Teil der Ziel-mRNA ist. Die siRNA wird in Liposomen inkapsuliert und kann so die Zellbarriere überwinden. Nach der Transfektion lagert sich die siRNA mithilfe des RNA-induced silencing complex (RISC) an die Ziel-mRNA an, verhindert die Translation der mRNA und bewirkt stattdessen ihren Abbau. Dieser Mechanismus, der sich einer zellulären Abwehr gegen virale Infektionen bedient, verringert also die Produktion des jeweiligen Ziel-Proteins. In Abhängigkeit vom Umsatz des Ziel-Proteins kann so nach einiger Zeit eine Reduktion der Proteinkonzentration erreicht werden. Es wird dabei antibiotikafreies Medium verwendet, da ansonsten Antibiotika über die Liposomen in die Zelle gelangen können und dort den Stoffwechsel stören (Hu et al., 2020).

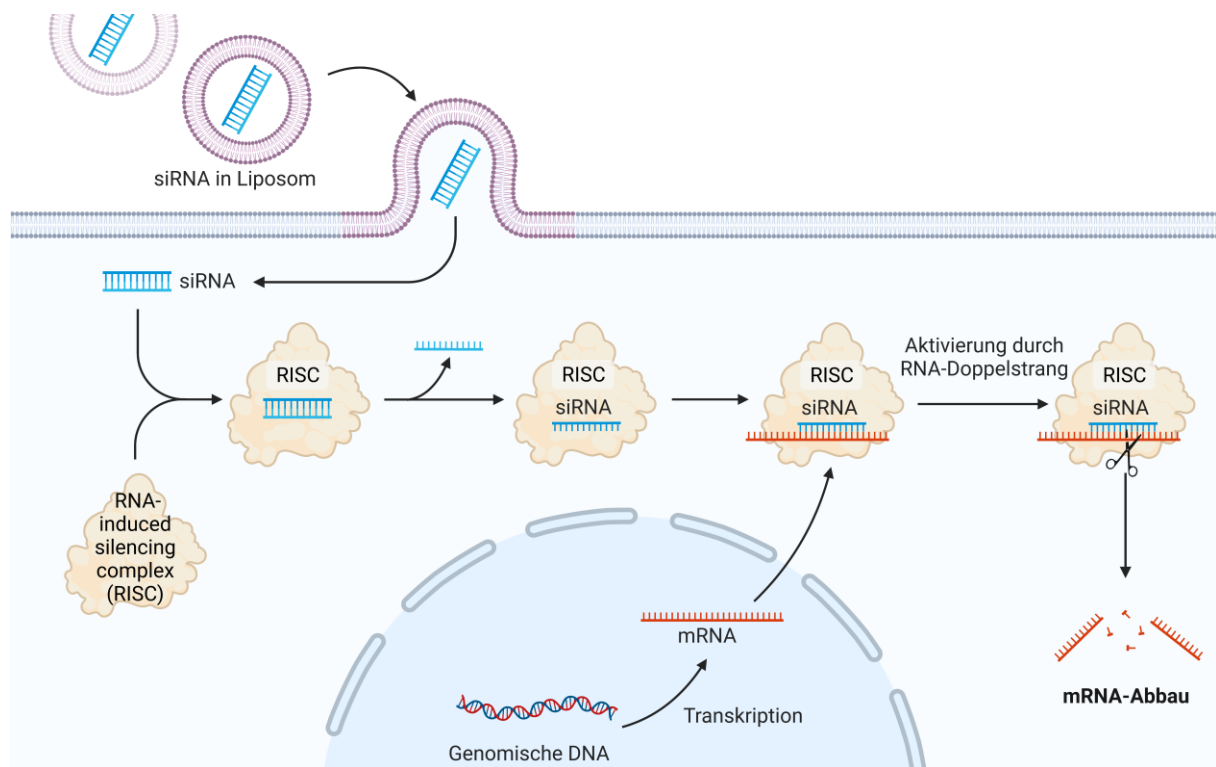


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Funktionsweise von siRNA

Die short/small interfering RNA (siRNA) tritt mithilfe von Liposomen in die Zelle ein (Transfektion). Als Teil des RNA-induced silencing complex (siRNA) bindet die siRNA die Ziel-mRNA. Dies führt zur Aktivierung des Komplexes und zum Abbau der mRNA.

2.2.6.2 Vorgehen in NRVCN

2.2.6.2.1 Tag 0

Die isolierten NRVCN wurden je nach Verwendungszweck auf Zellkulturplatten in serumhaltigem Medium ausgesät (s. 2.2.1.2.4) und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.6.2.2 Tag 1

Die Zellen wurden, wie auch an den folgenden Tagen, lichtmikroskopisch auf Verteilung, Vitalität und mögliche Kontamination untersucht. Im Anschluss erfolgte die Transfektion mit der siRNA. Dazu wurde die siRNA mit Lipofectamin RNAiMAX nach Herstellerangabe in Medium angesetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zellmedium wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit 37 °C warmem PBS gewaschen und Medium ohne Serum und ohne Antibiotika auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden pro Well 300 µl der siRNA-Lösung hinzugegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden für den Knockdown von MST4 bzw. die Kontrollen eine Konzentration der siRNA im Well von 5 nM genutzt.

2.2.6.2.3 Tag 3

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte 48 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel. Dazu wurde das Medium abgesaugt und frisches serum- und antibiotikafreies NRVCN-Medium wieder hinzugegeben.

2.2.6.2.4 Tag 5

Wenn nicht anders angegeben fand die Zellernte 4 Tage nach der Transfektion statt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und der weiteren Auswertung zugeführt.

2.2.7 Behandlung von Zellen mit Hesperadin

2.2.7.1 Prinzip/Hintergrund

Das Molekül Hesperadin ist ein beschriebener Inhibitor für MST4 (Xiong et al., 2016). Um die Auswirkungen einer Inhibition von MST4 zu untersuchen, wurde der Inhibitor dem jeweiligen Zellmedium zum gleichen Zeitpunkt wie Überexpressionsviren beigemischt und auch bei jedem Mediumwechsel wieder zugefügt. Eine wirksame Menge wurde zu Beginn ermittelt und für die weiteren Versuche wurde, soweit nicht anders beschrieben, eine Konzentration von 100 nM eingesetzt. Hesperadin ist nur in DMSO ausreichend löslich und wird dadurch besser membrangängig. Die Stock-Lösung in DMSO wurde 1:1.000 (v/v) in Medium verdünnt und anschließend auf die jeweils eingesetzte Konzentration verdünnt. Bei einer Konzentration von 100 nM Hesperadin betrug die Konzentration von DMSO 1:100.000 (v/v). Generell wird bei einer Konzentration von weniger als 1:1.000 (v/v) davon ausgegangen, dass DMSO alleine keine Auswirkungen auf die Zelle hat. Dennoch wurde die Kontrollgruppe mit DMSO ohne Hesperadin behandelt.

2.2.7.2 Vorgehen in NRVC

An Tag 1 wurde dem serumfreien virushaltigen Medium entweder 100 nM Hesperadin oder der Kontrollgruppe das gleiche Volumen DMSO ohne Hesperadin hinzugefügt. Dies wurde beim Mediumwechsel, meist an Tag 3, wiederholt.

2.2.7.3 Vorgehen in ARVC

Dem virushaltigen Medium wurden entweder 100 nM Hesperadin oder der Kontrollgruppe das gleiche Volumen DMSO ohne Hesperadin hinzugefügt und dieses Medium zu den Zellen nach deren Anwachsen gegeben.

2.2.8 Behandlung von Zellen mit Phenylephrin

2.2.8.1 Prinzip/Hintergrund

Der α_1 -Adrenrezeptoragonist Phenylephrin (PE) löst bei isolierten NRVC Hypertrophie aus. Um die Auswirkungen verschiedener Bedingungen auf diese Stimulation zu untersuchen oder die Expression verschiedener Gene und Proteine bei der Stimulation zu untersuchen, werden isolierte NRVC an Tag 2 mit PE behandelt (Kluge et al., 2019).

2.2.8.2 Vorgehen

An Tag 2 wurde serumfreies NRVC-Medium mit einer PE-Konzentration von 100 μ M vorbereitet. Das Medium wurde von den NRVC abgesaugt und pro Well einer 6-Well-Platte wurden 2 ml PE-Medium hinzugegeben. Wurden die Zellen zuvor mit Virus behandelt, musste dieser nicht erneut hinzugegeben werden, weil innerhalb eines Tages das jeweilige Gen ausreichend in die Zelle eingeschleust werden konnte und in den nachfolgenden Tagen translatiert werden konnte. An Tag 4 wurde aus den Zellen RNA isoliert (s. 2.2.9), Proteine isoliert (s. 2.2.13) oder die Zellgröße bestimmt (s. 2.2.19).

2.2.9 Behandlung von Zellen mit biomechanischer Dehnung „Stretch“

2.2.9.1 Prinzip/Hintergrund

Zyklische biaxiale Dehnung („Stretch“) von NRVC ist ein etabliertes Modell für biomechanischen Stress, wie er z.B. bei einer Druckbelastung durch chronischen Bluthochdruck vorkommt. Es kommt zu einer Überexpression Hypertrophie-assoziiierter Gene. Mithilfe des FlexCell System kann diese Dehnung über einen längeren Zeitraum in einer Inkubator-Umgebung durchgeführt werden (Frank et al., 2008).

2.2.9.2 Vorgehen

Die NRVC wurden, wie unter 2.2.1 beschrieben, isoliert und auf eine 6-Well-Platte mit flexibler Silikonmembran in serumhaltigen Medium ausgesät (s. 2.2.1.2.4) und bei 37 °C und 5 % CO₂ für drei Tage inkubiert. Anschließend erfolgte ohne Mediumwechsel die biaxiale Dehnung mithilfe des FlexCell Systems mit einer Frequenz von 1 Hz für 48 Stunden. Die Elongation wurde auf 20 % eingestellt und

erfolgte in radiärer zirkumferentieller Richtung. Die Kontrollzellen wurden auf der gleichen Art von Platten ausgesät und im FlexCell System inkubiert, jedoch nicht gedehnt.

Zur Zellernte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und je nach Verwendungszweck geerntet.

2.2.10 Kultivierung von Zellen in Hypoxie

2.2.10.1 Prinzip/Hintergrund

Sowohl bei chronischen Formen der Herzinsuffizienz als auch bei akuten Geschehen wie dem Myokardinfarkt spielt Hypoxie und die Reaktion der Kardiomyozyten auf diese eine Rolle. In vitro ist ein mögliches Modell zur Simulation dieser Situation die Kultivierung von Zellen in einem Inkubator, in dem eine hypoxische Atmosphäre herrscht. Während die NRVCN normalerweise bei einer normalen Sauerstoffkonzentration von 20 % kultiviert werden, wird diese im Hypoxie-Inkubator auf 1 % verringert, indem Stickstoff eingeleitet wird. Die CO₂-Konzentration beträgt, wie auch in anderen Inkubatoren, 5 %. Bei der geringen Sauerstoffkonzentration muss der Stoffwechsel der Kardiomyozyten größtenteils anaerob ablaufen. Dieser Versuchsaufbau lässt sich auch mit anderen Konditionen, z.B. der Überexpression von MST4 oder der Behandlung mit Hesperadin, kombinieren (Rangrez, Pott, et al., 2017).

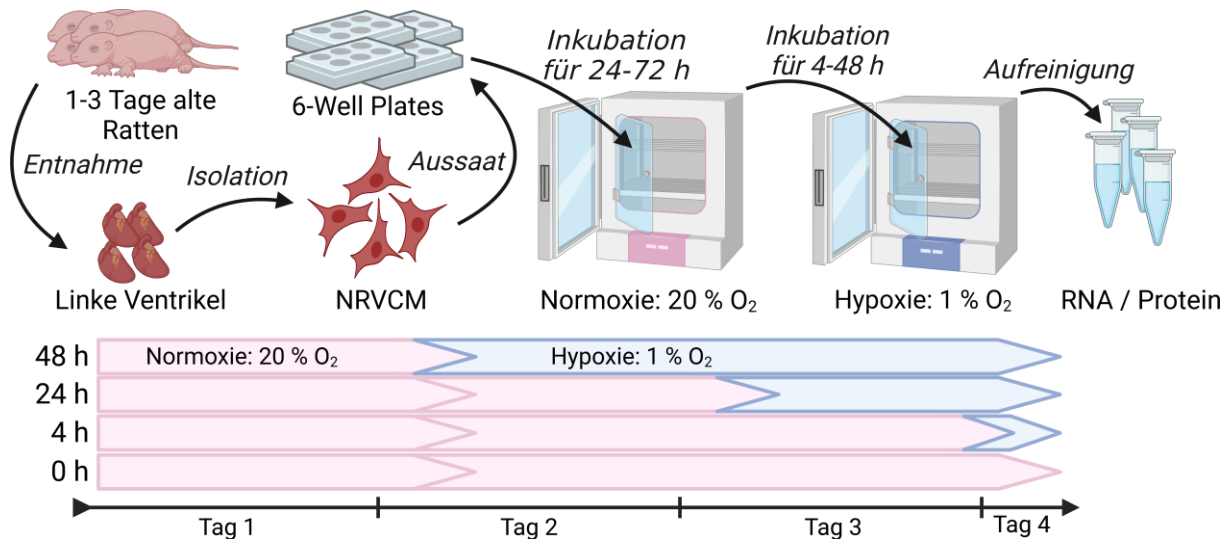


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Kultivierung von NRVCN in Hypoxie

NRVCN werden aus den linken Ventrikeln neonataler Ratten isoliert. Diese werden auf 6-Well-Platten ausgesät, für 24 h in Normoxie inkubiert und es findet ein Mediumwechsel statt. Je nach Gruppe wurden die Zellen 4-48 h vor der Ernte in den Hypoxie-Inkubator überführt und dort weiter kultiviert. Die Kontrollgruppe verblieb die gesamte Zeit in Normoxie.

2.2.10.2 Vorgehen

Die NRVCM wurden, wie unter 2.2.1 beschrieben, isoliert und ggf. wurden an Tag 1 Viren und/oder Inhibitoren hinzugegeben. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte an Tag 2, ca. 24 h nach der Infektion, ein Mediumwechsel und der Transfer der Zellen in den Hypoxie-Inkubator (1 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit). Die Kontrollgruppe verblieb im Normoxie-Inkubator (20 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit). Es wurden zu Beginn verschiedene Hypoxie-Zeiten untersucht, indem die Hypoxie zu verschiedenen Zeitpunkten gestartet wurde. Spätere Versuche wurden mit einer Inkubationszeit von 48 h durchgeführt, sodass die Zellen an Tag 4 zur Auswertung der RNA-Isolation, der Protein-Isolation oder dem MTT-Test zugeführt wurden.

2.2.11 RNA-Isolation

2.2.11.1 Prinzip/Hintergrund

Nukleinsäuren sind löslich in Wasser und unlöslich in Ethanol und Isopropanol. Diese Eigenschaft, sowie die Adsorption von Nukleinsäuren an spezielle Säulen wird genutzt, um RNA von Proteinen und anderen Zellbestandteilen zu trennen. Anschließend wird genomische DNA durch eine DNase abgebaut. Damit die RNA intakt bleibt, muss bei der Verarbeitung genau darauf geachtet werden, dass keine Kontamination mit RNasen geschieht, z.B. indem ausschließlich RNase-freie Materialien eingesetzt werden. Es wurde das Quick-RNA Microprep Kit von Zymo Research entsprechend der Herstellerangaben genutzt (Ahlberg et al., 2021; Kluge et al., 2019).

2.2.11.2 Vorgehen

2.2.11.2.1 RNA-Isolation aus NRVCM

Wenn nicht anders angegeben, wurde an Tag 4 das Medium von den NRVCM abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 300 µl des Lyse-Puffers und anschließend das gleiche Volumen von absolutem Ethanol hinzugegeben. Alle hier genutzten Materialien waren ausdrücklich DNase-/RNase-frei. Die Zellen wurden durch mehrfaches Spülen des Wells mit einer Pipette abgelöst und die Suspension wurde in eine Zymo-Spin Säule überführt.

RNA wurde durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 g aus der Suspension gelöst und der Durchfluss wurde verworfen. Mit 400 µl Waschpuffer aus vier Teilen absolutem Ethanol und einem Teil Waschpufferkonzentrat wurden die Säulen durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 g gewaschen. Pro Säule wurden 5 µl DNase I und 35 µl DNase Verdau Puffer hinzugegeben und die DNA für 15 Minuten bei Raumtemperatur verdaut. Anschließend wurden 400 µl RNA Prep Puffer hinzugegeben und die Säule für 30 Sekunden bei 13.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 700 µl Waschpuffer und Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 g gewaschen und erneut mit 400 µl Waschpuffer und 2 Minuten Zentrifugation bei 13.000 g. Zum Eluieren der aufgereinigten RNA wurde

die Säule in ein neues 1,5 ml-Tube überführt, 15 µl Wasser hinzugegeben und für 30 Sekunden bei 13.000 g zentrifugiert, sodass der Durchfluss die RNA enthielt. Deren Konzentration wurde im nächsten Schritt gemessen, um danach in cDNA umgeschrieben zu werden.

2.2.11.2.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Das zu untersuchende Gewebe wurde entnommen, mit PBS gewaschen und bei -80 °C eingefroren. Nach mindestens einer Stunde wurde das Gewebe aufgetaut und in ein besonders stabiles Röhrchen überführt. Es wurden Keramikperlen und mindestens 300 µl des Lyse-Puffers hinzugegeben. Anschließend wurde das Gewebe mithilfe eines Homogenisators komplett aufgelöst, der Zellschrott abzentrifugiert und der Überstand in ein neues RNA-freies Gefäß überführt. Es wurde das gleiche Volumen an absolutem Ethanol hinzugegeben, wie es zuvor vom Lyse-Puffer eingesetzt wurde. Die Suspension wurde in eine Zymo-Spin Säule überführt und die weitere RNA-Isolation fand wie bei der Isolation aus Zellen statt.

2.2.12 cDNA-Synthese und quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

2.2.12.1 Prinzip/Hintergrund

RNA besitzt keine besonders hohe Stabilität. Als Messwert für eine Genexpression gilt aber die Messenger-RNA, deren relative Menge bei der qRT-PCR festgestellt werden soll. Daher wird die isolierte RNA enzymatisch per reverse Transkription in DNA, sogenannte komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Deren Menge ist proportional zur Menge der in der Probe vorhandenen RNA. Um die Expression verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können, ist es wichtig, dass die gleiche Menge RNA in cDNA umgeschrieben wird. Die RNA-Konzentration ist proportional zur Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von RNA, sodass die RNA-Konzentration per Absorptionsphotometrie ermittelt werden kann.

Zur quantitativen Analyse der cDNA wird die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) verwendet. Dabei werden ausgewählte Abschnitte der cDNA durch sogenannte Primer vervielfältigt. Dabei handelt es sich um Oligonukleotide von etwa 20 bp, die spezifisch an die ausgewählten Abschnitte binden. Um den zu amplifizierenden Abschnitt zu begrenzen, flankieren ein sogenannter forward-Primer und ein reverse-Primer die Sequenz. Bei der PCR werden mehrfach die Phasen Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation durchlaufen. Durch Erhitzen auf 95 °C wird die doppelsträngige DNA voneinander getrennt. Bei einer Temperatur von etwa 60 °C, die Primer-spezifisch ist, lagern sich die Primer an die spezifischen cDNA-Abschnitte an. Die Elongation, also das Abschreiben der spezifischen cDNA durch eine DNA-Polymerase, findet bei etwa 70 °C statt. Die eingesetzte DNA-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq). Diese Bakterium

lebt in heißen Quellen, daher ist die Taq-Polymerase sehr hitzestabil und damit vorteilhaft für diese Anwendung. Dieser PCR-Zyklus wird 40-mal durchlaufen, sodass eine Amplifikation von 2^{40} (über eine Billionen) erreicht werden kann.

Zur quantitativen Analyse wird nach jeder Elongation die Menge an cDNA gemessen. Aus der Anzahl vergangener Zyklen, bis die gemessene cDNA-Menge den sogenannten Ct-Wert überschreitet, kann auf die ursprünglich vorhandene cDNA-Menge geschlossen werden.

Für die Messung der Detektion kann ein Farbstoff verwendet werden, der an doppelsträngige DNA bindet. Die Bindung erfolgt unspezifisch, sodass in einem Ansatz nur die Menge eines Targets untersucht werden kann.

Mehrere Targets in einem Ansatz können untersucht werden, wenn zusätzlich zu den forward- und reverse-Primern Oligonukleotide eingesetzt werden, an denen ein Fluoreszenzfarbstoff, eine sogenannte Sonde, gebunden ist. Die Lichtemission des Farbstoffs wird durch einen sogenannten Quencher unterdrückt und die Oligonukleotide binden spezifisch innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz. Findet diese Bindung statt, werden Quencher und Farbstoff durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase bei der Elongation voneinander getrennt und der Farbstoff kann detektiert werden (Kluge et al., 2019).

Zur Auswertung wird die sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt (Livak & Schmittgen, 2001), bei der die Expression des Target-Gens ins Verhältnis gesetzt wird zu einem sogenannten Housekeeping-Gen, dessen Expression durch die Versuche nicht beeinflusst wird und so technische Ungenauigkeiten ausgeglichen werden.

2.2.12.2 Vorgehen

2.2.12.2.1 cDNA-Synthese

Um die genau gleiche Menge RNA in cDNA umzuschreiben, wurde die Konzentration der aufgereinigten und von genomischer DNA befreiten RNA mit einem Spektralphotometer bei 260nm gemessen. Es wurden zwei Messungen mit je einem Mikroliter Probe durchgeführt und der Mittelwert dazu verwendet, um einen Mikrogramm RNA in cDNA umzuschreiben.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem LunaScript RT SuperMix Kit von New England BioLabs. Dazu wurde ein Mikrogramm RNA in 16 μl Wasser verdünnt und 4 μl LunaScript RT SuperMix hinzugegeben. Es wurden auch die beiden Kontrollen auf mögliche Kontamination angefertigt. Es gab einen Ansatz mit RNA aber ohne Reverse Transkriptase und stattdessen mit 4 μl No-RT Control Mix (no reverse transcriptase, NRT). Die andere Kontrolle enthielt nur 16 μl Wasser ohne RNA aber 4 μl LunaScript RT SuperMix (no-template-control, NTC).

Für alle Proben und die beiden Kontrollen fand anschließend ein Durchgang von folgendem Protokoll in einem Thermocycler statt:

Primerhybridisierung (Annealing)	25 °C	2 min
cDNA-Synthese	55 °C	10 min
Hitzeinaktivierung der Enzyme	95 °C	1 min

Zuletzt wurden alle Reaktionsansätze mit Wasser auf 5 ng/μl oder 10 ng/μl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.12.2.2 *qRT-PCR*

Für jede qRT-PCR wurde ein sogenannter Mastermix angesetzt, von dem jeweils 18 μl in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und jeweils 10 oder 20 ng cDNA in 2 μl Wasser hinzugegeben wurden. Jede Probe wurde in technischen Duplikaten oder meist Triplikaten gemessen. Zum Ausschluss möglicher Kontamination wurde in jedem Ansatz eine Kontrolle mit Wasser ohne cDNA (no-template-control, NTC) eingesetzt und eine Kontrolle, bei der keine Reverse Transkriptase zugegeben wurde und daher keine cDNA enthalten ist (no reverse transcriptase, NRT).

SybrGreen-Mastermix pro Well

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

Multiplex-Mastermix pro Well

BioRad iQ Multiplex Powermix	10 μl
RPL32 Mix	0,5 μl
NPPA Mix	0,5 μl
NPPB Mix	0,5 μl
RCAN1.4 Mix	0,5 μl
dH ₂ O	6 μl

Ein Primer-Mix bestand jeweils aus dem gleichen Volumen forward Primer (10 μM) und reverse-Primer (10 μM) sowie dem doppelten Volumen an dazugehöriger Sonde (10 μM).

Die mit Proben beladenen Platte wurde kurz abzentrifugiert und mit einem Real-Time PCR Detection System von BioRad ausgewertet. Dabei wurden folgende Protokolle verwendet:

SybrGreen qRT-PCR

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	5 sek	
Annealing/Elongation	60 °C	30 sek	
Detektion			

Multiplex qRT-PCR

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	15 sek	
Annealing/Elongation	60 °C	45 sek	
Detektion			

Zur Auswertung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurden die Mittelwerte der C_t -Werte eines technischen Duplikates oder Triplikates gebildet. Von den Mittelwerten wurden die Mittelwerte der endogenen Kontrolle, z.B. RPL32, subtrahiert, sodass man den ΔC_t -Wert für das jeweilige Target erhielt: $\Delta C_t_{target} = C_t mean_{target} - C_t mean_{RPL32}$. Den $\Delta\Delta C_t$ Wert erhielt man, indem man vom ΔC_t -Wert der jeweiligen Probe den ΔC_t -Wert der Kontrollbedingung subtrahiert hat: $\Delta\Delta C_t_{target/Bedingung} = \Delta C_t mean_{target/Bedingung} - \Delta C_t mean_{target/control}$. Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert als negativer Exponent zur Basis zwei ergibt die n-fache Expression (FC): $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Diese Expression wurde auf die Kontrollbedingung normalisiert (nFC), indem sie durch den Mittelwert der FC-Werte der Kontrollbedingungen dividiert wurde: $nFC = \frac{FC_{target/Bedingung}}{FC mean_{target/control}}$.

Die nFC-Werte bzw. deren Mittelwerte pro Versuchsbedingung wurden für alle weiteren statistischen Analysen und graphischen Darstellung verwendet (Kluge et al., 2019).

2.2.13 Proteinisolation**2.2.13.1 Prinzip/Hintergrund**

Die in der PCR detektierte mRNA ist nicht der eigentliche Effektor innerhalb der Zelle, sondern die daraus translatierten Proteine. Eine Veränderung der mRNA-Expression ist aufgrund von z.B. Regulationsmechanismen der Zelle nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit einer Veränderung der dazugehörigen Proteinkonzentration. Daher ist es sinnvoll die Proteinexpression zu untersuchen, insbesondere weil MST4 eine Kinase ist, die Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von Proteinen nehmen kann.

Die Zellen werden mit einem Puffer lysiert, der Inhibitoren enthält, die einen Abbau der Proteine und eine Veränderung der Phosphorylierung verhindern sollen (Borlepawar et al., 2017).

2.2.13.2 Vorgehen

Wenn nicht anders angegeben, wurde an Tag 4 das Medium von den NRVCN abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Bei ARVCN begann die Isolation bereits an Tag 1. Anschließend wurden pro Well in einer 6-Well-Platte 100 µl RIPA-Puffer mit Inhibitoren hinzugegeben und die Zellen bei -80 °C eingefroren. Nach mindestens einer Stunde wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und die Suspension mithilfe eines Zellschabers und einer Pipette in ein 1,5ml-Cup überführt.

Proteinisolation aus Gewebe wurde durchgeführt, indem Gewebe (ca. 30 mm³ bzw. 100-200 mg) in 1 ml RIPA-Puffer gegeben wurde und mithilfe eines Homogenisators mechanisch homogenisiert wurde.

Die Suspension wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 10 °C unter leichtem Schütteln aufgetaut. Anschließend wurde Zelldebris 20 min bei 12.000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5ml-Cup überführt. Die Konzentration der Proteinproben wurde bestimmt und SDS-PAGE durchgeführt. Nicht unmittelbar verwendete Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.14 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bio-Rad DC Protein-Assay)

2.2.14.1 Prinzip/Hintergrund

Bei Protein-Proben, die in RIPA geerntet wurden, wurde das DC Protein Assay von BioRad zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet, weil dieser Test robust gegenüber eingesetzten Detergenzien ist. Dabei reagieren Proteine mit alkalischer Kupfertartrat-Lösung und es kommt zu einer Reduktion von Folin, was zu einem blauen Farbumschlag führt. Dieser wird photometrisch gemessen (Borlepawar et al., 2017).

2.2.14.2 Vorgehen

Von jeder Proteinprobe wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte Triplikate von je 5 µl aufgetragen. Bei sehr hohen Konzentrationen wurde vorher eine Verdünnung der Proben in Lysispuffer durchgeführt. Es wurde außerdem Lysispuffer zur Bestimmung eines Leerwertes aufgetragen sowie eine BSA-Verdünnungsreihe (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 µg/ml). Anschließend wurde in jedes Well 25 µl der Reagenz A' gegeben, die aus 49 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz S besteht. Von der Folin-haltigen Reagenz B wurden 200 µl pro Well hinzugegeben. Es wurde für 15 min inkubiert, initial unter leichtem Schütteln und die Platte im Mikroplattenleser bei 750 nm ausgewertet. Die

Proteinkonzentration wurde von der dazugehörigen Software anhand der BSA-Verdünnungsreihe errechnet.

2.2.15 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford Protein-Assay)

2.2.15.1 Prinzip/Hintergrund

Einige Lysispuffer, darunter der verwendete SysQuant-Puffer, enthalten Bestandteile in so hoher Konzentration, dass es zu einer Interferenz beim Bio-Rad DC Protein-Assay kommen würde. Alternativ kann, bei Abwesenheit von z.B. Detergenzien, der Bradford-Test verwendet werden, der ähnlich funktioniert. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet in saurem Milieu mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Die ungebundene Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm, die komplexierte Form bei 595 nm und wird photometrisch gemessen (Kluge et al., 2019).

2.2.15.2 Vorgehen

Von jeder Proteinprobe wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte Triplikate von je 2 µl aufgetragen. Bei sehr hohen Konzentrationen wurde vorher eine Verdünnung der Proben in Lysispuffer durchgeführt. Es wurde außerdem Lysispuffer zur Bestimmung eines Leerwertes sowie eine BSA-Verdünnungsreihe (2,56; 1,28; 0,64; 0,32 µg/ml) aufgetragen. Anschließend wurde ein Teil Bradford-Reagenz in 4 Teilen Wasser verdünnt und 200 µl dieser verdünnten Lösung in jedes Well gegeben. Es wurde für 5 min unter leichtem Schütteln inkubiert, die Platte im Mikroplattenleser bei 595 nm ausgewertet und die Proteinkonzentration von der dazugehörigen Software anhand der BSA-Verdünnungsreihe errechnet.

2.2.16 SDS-PAGE und Western Blot

2.2.16.1 Prinzip/Hintergrund

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot dienen der qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen. Bei der SDS-PAGE wandern Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch ein Polyacrylamidgel im elektrischen Feld. Die so aufgetrennten Proteine können ebenfalls durch ein elektrisches Feld auf eine Membran transferiert werden, auf der sie mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können.

Damit die Laufgeschwindigkeit der Proteine nur abhängig ist von der Größe, werden sie vor dem Auftragen bei 95 °C denaturiert und mit SDS versetzt. Dieses trägt ebenfalls zur Denaturierung bei. Durch Anlagerung an die Proteine sorgt SDS für eine konstante negative Ladung pro Masse, sodass die Proteine bei der Gelelektrophorese zum positiven Pol wandern.

Das eingesetzte Gel besteht aus einem grobporigen Sammelgel mit niedrigerem pH und geringerer Leitfähigkeit zur Verdichtung der Proteinproben und einem Trenngel. Dessen Dichte ist abhängig von der Masse des zu untersuchenden Proteins bzw. besitzt einen Dichtegradienten.

Nach der Gelelektrophorese werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran aus PVDF oder Nitrozellulose ebenfalls mit einem elektrischen Feld transferiert. Dies geschieht entweder als sogenannter „wet Blot“ in einem Tank mit Transferpuffer oder als „semi-dry Blot“ direkt zwischen zwei großen Elektroden.

Auf den Membranen werden die Proteine polar gebunden. Unspezifische Bindungsstellen werden durch Milch oder BSA blockiert und die Membranen werden mit einem Primärantikörper für das zu untersuchende Protein inkubiert. Es handelt sich dabei entweder um einen einzigen Klon eines Antikörpers, der an nur ein Epitop des Proteins bindet (monoklonal) oder um mehrere Antikörperklone für verschiedene Epitope des selben Proteins (polyklonal). Der gebundene Primärantikörper wird, nachdem nicht gebundene Antikörper mit dem detergenzienhaltigen Waschpuffer TBST entfernt wurden, mit einem Sekundärantikörper nachgewiesen. Dieser Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Fc-Teil des verwendeten Primärantikörpers. Er ist mit einem detektierbaren Element, einem Enzym oder einem Fluoreszenzfarbstoff, gekoppelt.

Für die quantitative Analyse wird die detektierte Intensität, die proportional zur Proteinmenge ist, auf die Intensität einer Ladekontrolle normalisiert. Die Ladekontrolle ist ein Protein, dessen Expression nicht durch die Versuchsbedingungen reguliert wird. Dieses Protein wird ebenfalls mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Enzym- oder Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Mittels Densitometrie wird die Intensität der jeweiligen Proteinbanden quantifiziert (Borlepawar et al., 2017).

2.2.16.2 Vorgehen

2.2.16.2.1 Herstellung der Gele

Die Dichte des Trenngels richtete sich nach der Masse des zu untersuchenden Proteins. Das Sammelgel von selbst hergestellten Gelen war immer gleich. In folgender Tabelle ist die Zusammensetzung des Sammelgels und beispielhaft die Zusammensetzung eines 10%igen Acrylamid-Trenngels dargestellt.

	30 % Acrylamid	dH ₂ O	Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer	10 % APS	TEMED
Trenngel 10 %	3,3 ml	3,9 ml	2,6 ml	NA	60 µl	30 µl
Sammelgel	0,8 ml	2,9 ml	NA	1,4 ml	30 µl	15 µl

Acrylamid, Wasser und jeweiliger Puffer wurden vermischt und zur Katalyse der Polymerisation APS und TEMED hinzugegeben. Das Trenngel-Gemisch wurde zwischen die vorbereiteten Glasscheiben gegeben und, um einen geraden Abschluss zu erhalten, mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde der Isopropanol abgenommen und das Sammelgel-Gemisch hinzugegeben. Darin wurde ein Kamm platziert zur Schaffung von Taschen für das Auftragen der Proteinproben.

Für die gleichzeitige Analyse von mehr als 15 Proben wurden vorgegossene sogenannte Midi-Gele von Invitrogen verwendet.

2.2.16.2.2 *Vorbereitung der Proteinproben*

Anhand der Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 2.2.14) wurden die Proben so vorbereitet, dass identische Mengen an Protein mit 4x Laemmli-Puffer und Lysispuffer gemischt wurden. Zur Denaturierung der Proteine wurden diese Ansätze fünf Minuten bei 95 °C unter leichtem Schütteln erhitzt.

2.2.16.2.3 *SDS-PAGE*

Die Kämme der Gele wurden gezogen, aus den Taschen wurden Gelreste herausgespült und die Gele in eine Laufkammer eingespannt, die mit Laufpuffer gefüllt wurde. In mindestens eine Tasche wurde ein Größenstandard pipettiert, der bei der Detektion eine Größenbestimmung der Banden ermöglichte. An das Gel wurde eine Stromspannung, meist 70 V, angelegt, die erhöht wurde, meist auf 120 V, nachdem die Proteinproben das Trenngel erreicht hatten. Die Gelelektrophorese wurde beendet, nachdem die Lauffront, erkennbar durch das Bromphenolblau des Laemmli-Puffers, das Ende des Gels erreicht hatte.

Wurden vorgegossene Gele verwendet, wurde auch der dazugehörige Laufpuffer verwendet.

2.2.16.2.4 *Proteintransfer (Western Blot), wet Blot*

Der Transferpuffer wurde aus einem Teil 10x Transferpuffer, zwei Teilen Methanol und sieben Teilen Wasser vorbereitet. Das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen wurde aus seiner Hülle gelöst und mit einer in Methanol aktivierten PVDF Membran oder einer lediglich im Transferpuffer befeuchteten Nitrozellulose Membran in eine Kassette und in die Laufkammer gespannt. Die Membran lag dabei auf Seite der Anode. Zum Transfer wurde eine Stromstärke von 350 mA für 100 Minuten angelegt.

2.2.16.2.5 *Proteintransfer (Western Blot), semi-dry Blot*

Eine andere Möglichkeit des Transfers stellt der sogenannte semi-dry Blot dar. Dafür wird das Gel mit einer Membran in eine mit dem gleichen Transferpuffer befeuchteten Kammer gegeben und leichter Druck ausgeübt. Es wird für 35 min eine Spannung von 25 V angelegt.

2.2.16.2.6 Detektion

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran unter leichtem Schütteln etwa eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % (w/v) Milchpulver oder 5 % (w/v) BSA in TBST inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper ebenfalls in Milch oder BSA in TBST verdünnt und die Membran über Nacht bei 4 °C rollend darin inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde dreimal mit TBST von der Membran abgewaschen. Die Membran wurde etwa eine Stunde bei Raumtemperatur rollend mit dem Sekundärantikörper in Milch oder BSA in TBST inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBST wurde der Sekundärantikörper detektiert.

Sekundärantikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren, wurden direkt detektiert und dabei, in Abhängigkeit vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff, angeregt. Es wurde ein Bild bei der entsprechenden Emissions-Wellenlänge gemacht.

Bei einer Kopplung des Sekundärantikörpers mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) erfolgte die Detektion per Biochemilumineszenz. Dazu wurde Amersham ECL Select (GE Healthcare) zu gleichen Teilen aus den Reagenzien A und B hergestellt und auf die Membran gegeben. Überschüssiges ECL Select wurde entfernt und nach kurzer Inkubation ein Bild aufgenommen, bei der die emittierte Lumineszenz mit der Wellenlänge 425 nm detektiert wurde.

Als Ladekontrolle wurde ein nicht-reguliertes Protein verwendet. Dabei wurde, wie vorher beschrieben, die Membran in einem spezifischen, verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligen Waschen wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper inkubiert und dieser detektiert

2.2.16.2.7 Densitometrie

Die entstandenen Bilder wurden mittels Adobe-Photoshop farbinvertiert und die zu untersuchende Proteinbande gerade ausgerichtet. Weitere Manipulation der Bilder fand nicht statt. Die vorbereiteten Bilder wurden in der Software Image J geöffnet und die Farbdichte der jeweiligen Banden ermittelt.

Der quantitative Wert des zu untersuchenden Proteins D_{Protein} wurde auf die Farbdichte der Ladekontrolle $D_{\text{Ladkontrolle}}$ der jeweiligen Probe normalisiert, um die relative Farbdichte nD_{Protein} zu erhalten:
$$nD_{\text{Protein}} = \frac{D_{\text{Protein}}}{D_{\text{Ladkontrolle}}}$$

Die normalisierten Werte der einzelnen Proben nD_{Protein} wurden auf die normalisierten und gemittelten Werte der Kontrollbedingungen $nD_{\text{Protein/Mittelwert Kontrolle}}$ normalisiert, sodass man die relative Intensität I_{Protein} , die proportional zur relativen Proteinexpression ist, erhalten hat:
$$I_{\text{Protein}} = \frac{nD_{\text{Protein}}}{nD_{\text{Protein/Mittelwert Kontrolle}}}$$

2.2.17 Co-Immunpräzipitation

2.2.17.1 Prinzip/Hintergrund

Mithilfe der Co-Immunpräzipitation können direkte Protein-Protein-Interaktionen identifiziert werden. Die Proteine werden nach der Zellernte nicht denaturiert, sodass Proteinverbindungen bestehen bleiben. Spezifische Antikörper isolieren daher nicht nur das Protein, an das sie direkt binden sondern auch alle mit diesem Ziel-Protein interagierende Proteine. Diese können dann im Isolat per Western Blot mit weiteren Antikörpern nachgewiesen werden. Es werden dabei immer eine Positivkontrolle mit unbehandeltem Proteinlysate sowie zwei Negativkontrollen mituntersucht. Die erste Negativkontrolle erhält keinen Antikörper, daher sollten im Isolat keine Proteine aus den NRVCN nachweisbar sein. Die zweite Negativkontrolle wird mit einem Antikörper gegen ein Protein inkubiert, von dem bekannt ist, dass keine direkten Interaktionen bestehen. Deshalb sollte im Isolat lediglich dieses Protein aus den NRVCN nachweisbar sein (Borlepawar et al., 2017).

2.2.17.2 Vorgehen

NRVCN wurden wie in 2.2.1 beschrieben isoliert, auf 10cm-Platten ausgesät und mit ELB-Puffer geerntet. Die Proteinkonzentration wurde per DC-Assay (s. 2.2.14) bestimmt. Anschließend wurden mehrere Fraktionen mit je 500 µg Protein in 500 µl ELB vorbereitet sowie eine kleinere Fraktion mit ca. 100 µg Protein in 100 µg ELB, die unmittelbar bei -20 °C weggefroren wurde (Input, Positivkontrolle). Der zweiten Fraktion wurde ebenfalls kein Antikörper hinzugefügt aber die folgenden Schritte durchgeführt (nAB-Control, Negativkontrolle). Ein Antikörper gegen das Protein GAPDH wurden der dritten Fraktion hinzugegeben (GAPDH-Control, Negativkontrolle) und die vierte Fraktion wurde mit dem Antikörper gegen das zu untersuchende Protein behandelt.

Die letzten drei Fraktionen wurden über Nacht bei 4 °C auf einem rotierenden Rad langsam drehend inkubiert. Am Folgetag wurden jeweils 30 µl „Dynabeads“ zu diesen Fraktionen hinzugegeben und die Ansätze erneut für 4 h drehend bei 4 °C inkubiert. In den Fraktionen mit Antikörpern kam es dabei zur Bindung der Antikörper an die magnetischen Kügelchen. Anschließend fanden 5 Waschschriffe zum Entfernen der nicht-gebundenen Proteine statt. Dafür wurde das Röhrchen jeweils auf ein magnetisches Rack platziert, der Überstand abgenommen und verworfen. Es wurde erneut ELB hinzugefügt und 5 min drehend bei 4 °C drehend inkubiert. Die gewaschene Fraktion wurde mit 50 µl Laemmli-Puffer bei 95 °C 5 min inkubiert. Dabei wurden alle vorhandenen Proteine denaturiert und Bindungen an die Magnetkügelchen gelöst. Diese wurden nach kurzem Abzentrifugieren mithilfe des magnetischen Racks zurückgehalten, während das Isolat in ein neues Gefäß überführt wurde. Von den drei so behandelten Fraktionen sowie von der Input-Fraktion wurden anschließend je 10 µl bei einem Western Blot (s. 2.2.16) eingesetzt, in dem dann mit einem spezifischen Antikörper potentielle Interaktionspartner dargestellt werden konnten.

2.2.18 Immunzytochemie & Immunhistochemie

2.2.18.1 Prinzip/Hintergrund

Um die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle zu untersuchen, werden diese mithilfe von spezifischen Antikörpern dargestellt. Für diese Arbeit wurden einzelne Kardiomyozyten mittels Immunzytochemie und Gewebeproben mittels Immunhistochemie analysiert. Die Zellen oder das Gewebe werden fixiert, permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend werden die auf Deckgläschen befindlichen Proben mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert, der an das zu untersuchende Antigen bindet. Die Bindung des Primärantikörpers wird anschließend mit einem Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet, dargestellt. Der Sekundärantikörper wird nach der Spezies, aus der der Primärantikörper stammt, gewählt und ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, welcher unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Zur Orientierung werden außerdem meist die Zellkerne mit DAPI angefärbt, das bei Bindung an DNA blau fluoresziert. Es können verschiedene Antigene mit Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies und Sekundärantikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kombiniert werden, um eine Co-Lokalisation von verschiedenen Proteinen zu untersuchen. Mithilfe eines Konfokalmikroskops lässt sich die Probe dreidimensional auflösen und so eine räumliche Nähe von verschiedenen Antigenen darstellen. Falsch-positive Ergebnisse von Antigenen, die nur in der Probe zufällig übereinander liegen aber nicht wirklich co-lokalisieren, werden dabei verhindert (Borlepawar et al., 2017).

2.2.18.2 Vorgehen

2.2.18.2.1 Immunzytochemie

Die auf Coverslips adherent gewachsenen NRVCN oder ARVCN wurden nach Entfernung des Kulturmediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für zehn Minuten mit 4% (v/v) Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Das Formaldehyd wurde entfernt, die Probe gewaschen und die Zellen durch Übersättigung für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 0,1 % (v/v) TritonX und 2,5 % BSA (w/v) in PBS permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 2,5 % (w/v) in PBS über Nacht bei 4 °C. Reste des Primärantikörpers wurden mit PBS abgewaschen und die Probe eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem in 2,5 % (w/v) BSA in PBS verdünnten Sekundärantikörper und DAPI in einer Verdünnung von 1:5.000 inkubiert. Die Inkubation fand zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffs in einer lichtundurchlässigen Kammer statt. Das Deckgläschen wurde dreimal in PBS gewaschen, in destilliertes Wasser getaucht und mit FluorPreserve auf einem Objektträger fixiert. Nach dessen Aushärtung wurden Bilder mit Fluoreszenzmikroskopen erstellt.

2.2.18.2.2 Immunhistochemie

Das Vorgehen bei der Immunhistochemie ist grundsätzlich genauso, wie bei der Immunzytochemie, allerdings handelt es sich bei den Proben nicht um isolierte Zellen sondern um Gewebeschnitte.

Die Gewebeproben wurden in Einbettmedium auf Glycerinbasis (Tissue Tek) in einem Gefäß mit Trockeneis (-78,4 °C) eingefroren. Es wurden Schnitte am Kryostat mit einer Dicke von ca. 6 µm gefertigt, diese auf einem Objektträger aufgefangen und für 10 min mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Das Formaldehyd wurde entfernt, die Probe gewaschen und die Zellen durch Übersichtung für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 0,1 % (v/v) TritonX und 2,5 % BSA (w/v) in PBS permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden blockiert. Es folgte eine dreimalige Waschung mit PBS und die Inkubation mit dem Primärantikörper in 2,5 % (w/v) BSA in PBS über Nacht bei 4 °C. Reste des Primärantikörpers wurden mit PBS abgewaschen und die Probe eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem in 2,5 % (w/v) BSA in PBS verdünnten Sekundärantikörper und DAPI in einer Verdünnung von 1:5.000 inkubiert. Die Inkubation fand zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffs in einer lichtundurchlässigen Kammer statt. Am Ende wurde der Objektträger dreimal in PBS gewaschen, in destilliertes Wasser getaucht und mit FluorPreserve ein Deckgläschen darauf fixiert. Nach der Aushärtung wurden Bilder mit Fluoreszenzmikroskopen erstellt.

2.2.19 Zellgrößenbestimmung

2.2.19.1 Prinzip/Hintergrund

Eine zentrale Reaktion von Kardiomyozyten auf Stress ist die Hypertrophie, also die Zunahme der Größe der einzelnen Zellen. Um diesen Mechanismus zu untersuchen, kann die Größe der Zellen immunzytochemisch untersucht werden, indem die Zellgrenzen mit einem Antikörper gegen Bestandteile des Zytoskeletts dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde dazu α -Actinin verwendet, das in Kombination mit einem Sekundärantikörper die Zelle anfärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Kluge et al., 2019).

2.2.19.2 Vorgehen

12-Well-Platten mit Coverslips wurden vorbereitet und Zellen mit einer Dichte von 180.000 Zellen pro Well ausgesät und das jeweilige Experiment durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen an Tag 4, wie unter 2.2.17 beschrieben, mit einem Antikörper gegen α -Actinin und mit DAPI angefärbt. Bei 200-facher Vergrößerung wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ9000 pro Coverslip 25 Bilder mit einem Z-Stapel von jeweils drei Bildern angefertigt. Mithilfe der Software BZ-II Analyser wurden die Bilder zu einem Bild zusammengefügt, das für die Auswertung verwendet wurde. Die Cell-Count-Funktion erlaubte es, die Zellgrenzen zu erkennen, die Zellen sowie deren Kerne zu zählen und die Zellgröße (bzw. die zweidimensionale Zellfläche) zu bestimmen. Es wurden Zellen von

der weiteren Auswertung ausgenommen, die mehr als einen Kern besaßen, kleiner als $150\ \mu\text{m}^2$ oder größer als $3000\ \mu\text{m}^2$ waren. Denn hierbei handelte es sich meist um fehlerhafte Messungen oder Fibroblasten. Pro Coverslip konnten so mehrere hundert Einzelzellen analysiert werden.

2.2.20 Färbung von gespaltener Caspase 3

2.2.20.1 Prinzip/Hintergrund

Caspase 3 ist ein zentraler Effektor der Apoptose, die v.a. durch Initiator-Caspasen gespalten und damit aktiviert wird. In aktivierter Form spaltet sie wiederum andere zelluläre Proteine und ist so an der Vermittlung des programmierten Zelltods beteiligt. Mit einem Antikörper, der spezifisch an gespaltene Caspase 3 bindet, nicht jedoch an die ungespaltene Form, lassen sich Zellen darstellen, die Apoptose ausführen. NRVCN in Kultur befinden sich trotz aller Bemühungen in einem Milieu, in dem ein gewisser Anteil abstirbt, zumeist kontrolliert durch Apoptose. Um die Auswirkung von verschiedenen Bedingungen auf diese Apoptose-Rate zu untersuchen, kann gespaltene Caspase 3 per Immunzytochemie angefärbt und ins Verhältnis zur Anzahl der mit DAPI angefärbten Zellkerne auf dem gleichen Coverslip gesetzt werden (Borlepawar et al., 2017).

2.2.20.2 Vorgehen

12-Well-Platten mit Coverslips wurden vorbereitet, Zellen mit einer Dichte von 180.000 Zellen pro Well ausgesät und das jeweilige Experiment durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen an Tag 4, wie unter 2.2.17 beschrieben, mit einem Antikörper gegen gespaltene Caspase 3 und mit DAPI angefärbt. Bei 200-facher Vergrößerung wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ9000 pro Coverslip 10 Bilder, über den Coverslip verteilt, erstellt. Anschließend wurde mit der Software gespaltene Caspase 3 gezählt, die sich durch die Bindung der beiden Antikörper als fluoreszierender Punkt darstellte. Außerdem wurde damit die Anzahl der DAPI-gefärbten Kerne ermittelt. Diese wurden miteinander ins Verhältnis gesetzt.

2.2.21 Untersuchung von ARVCN mittels IonOptix®

2.2.21.1 Prinzip/Hintergrund

Bei vielen Herzerkrankungen spielt die Veränderung der Kontraktilität der einzelnen Kardiomyozyten eine zentrale Rolle, die bei den postmitotischen Zellen nicht anderweitig kompensiert werden kann. Eng damit verbunden sind die Calciumströme der Kardiomyozyten. Mithilfe des IonOptix-Systems lässt sich die Kontraktilität einer einzelnen Kardiomyozyte analysieren, die durchschnittliche Kontraktilität ihrer Sarkomere sowie die Calciumströme. Die isolierten ARVCN werden mit dem Calcium-Farbstoff Fura-2AM inkubiert. In dieser Zeit tritt das Fura-2AM in die Zelle ein und wird der Acetoxymethylester mit zelleigenen Esterasen abgespalten, sodass der Austritt von Fura-2 verhindert wird. Im IonOptix-System wird jeweils ein Coverslip mit adherenten Zellen untersucht. In einer speziellen Vorrichtung

wird der Coverslip eingespannt und die Zellen mit einigen Tropfen Medium bedeckt. Über dieses Medium werden mit einer Frequenz von 2 Hz die Zellen mit einem biphasischen Puls elektrisch stimuliert. Eine Zelle kann per Kameramikroskop in der dazugehörigen Software dargestellt werden. Die Zellgrenzen sowie die Abstände der Querstreifung werden erkannt und die Länge der Zelle bzw. die durchschnittliche Zelle werden grafisch dargestellt. Darüber lassen sich dann verschiedene Parameter der Kontraktilität errechnen und miteinander vergleichen. Die Kontraktion wird durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration eingeleitet, welche durch aktiven Transport rasch wieder absinkt. Fura-2 hat einen isosbestischen Punkt, das heißt, bei einer Wellenlänge von 360nm ist die Absorption von freiem Fura-2 genauso, wie vom Fura-2-Calcium-Komplex. Daraus folgt, dass eine Veränderung der Absorption bei dieser Wellenlänge nur von der Gesamtkonzentration des Fura-2 abhängt und nicht vom Calcium. Freies Fura-2, das sich antiproportional zur intrazellulären Calciumkonzentration verhält, hat ein Absorptionsmaximum bei 380 nm. Durch Absorptionsmessung bei 380 nm und bei 360 nm kann auch die Konzentration von Calcium-gesättigtem Fura-2 ermittelt werden und daraus die intrazelluläre Konzentration von Calcium. Die Konzentration des Fura-2 nimmt im Laufe des Versuchs langsam durch Ausbleichung und aktiven Transport aus der Zelle ab. Daher wird zu Beginn und zum Ende der Messung die Absorption bei 360 nm gemessen und diese auf den Zeitraum dazwischen interpoliert. Damit wird eine deutlich höhere Messfrequenz erreicht, als durch abwechselndes Messen bei 360 nm und 380 nm.

Die Calciumkonzentration lässt sich ebenfalls darstellen, sodass sich verschiedene Parameter errechnen und miteinander vergleichen lassen. Pro Coverslip können immer nur wenige Zellen analysiert werden, weil nicht nur die jeweils analysierte Zelle elektrisch stimuliert wird, sondern auch alle anderen Zellen. Die elektrische Stimulation erzeugt großen Stress bei den Zellen, sodass irgendwann eine Reaktion bei der gewählten Spannung ausbleibt oder die Zelle sogar in Apoptose eintritt. Die Stromspannung wurde im Laufe des Versuchs konstant bei 10 V gehalten, weil hierbei eine ausreichende Anzahl Zellen kontrahiert hat und gleichzeitig die Schädigung der anderen Zellen gering gehalten wurde (Eden et al., 2016).

2.2.21.2 Vorgehen

2.2.21.2.1 Vorbereitung mit Fura-2AM

Die isolierten ARVCM (s. 2.2.2) wurden nach etwa eintägiger Überexpression von MST4 bzw. Behandlung mit Hesperadin in Kultur für die Untersuchung vorbereitet. Dafür wurde ARVCM-Medium mit einer Fura-2AM-Konzentration von 2 μ M angesetzt. Das Kulturmedium wurde abgesaugt. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 2 ml des Fura-2-haltigen Mediums hinzugegeben. Nach 20 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde dieses Medium abgesaugt und erneut 2 ml pro Well Fura-2-freies ARVCM-Medium hinzugegeben.

2.2.21.2.2 *Elektrische Stimulation der ARVCM*

Nach weiteren 20 min im Inkubator wurde der quadratische Coverslip aus dem Well genommen und in die Mikroskop-Kammer eingespannt. Mit einer Transferpipette wurden einige Tropfen des Mediums hinzugegeben und die Zellen unter dem Mikroskop bei geringer Vergrößerung betrachtet. Es wurde die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 2 Hz, einer Stromspannung von 10 V und einem biphasischen Puls gestartet. Eine kontrahierende Zelle wurde herausgesucht, die Stimulation gestoppt, die Vergrößerung auf 400-fach gewechselt und der Strahlengang auf die Kamera umgeleitet. Die Kamera wurde so eingestellt, dass die Zelle längs in der Software sichtbar war. Die Zellgrenzen und die Sarkomere wurden anhand des Kontrastes erkannt. Hierzu mussten Schwellenwerte verändert werden und ggf. nicht der Kontrast, sondern dessen Veränderung (Derivat), verwendet werden. Nachdem die Stimulation erneut gestartet wurde, wurde überprüft, ob die Zellgrenzen und die Sarkomere korrekt erkannt wurden. Anschließend wurde die Messung gestartet. Für die Messung der Calciumkonzentration wird die Absorption 100 ms bei 360 nm gemessen und anschließend, bis zum Ende der Messung, bei 380 nm. Nach etwa 10-30 Sekunden wurde die Messung der Zelle und die Stimulation beendet und automatisch noch einmal die Absorption bei 360 nm gemessen. Dieses wurde solange auf dem gleichen Coverslip wiederholt, bis sich keine neuen stimulierbaren Zellen mehr fanden.

2.2.21.2.3 *Auswertung der Messung*

Bei jeder Messung wurden die intrazelluläre Calciumkonzentration, die Länge der Zelle und die durchschnittliche Länge eines Sarkomers gegen die Zeit aufgetragen. Es wurden außerdem bei jeder Stimulation Markierungen gesetzt. Aus der Analyse konnten die Messpunkte ausgeschlossen werden, bei denen es sich offensichtlich um Fehlmessungen handelte. So konnte beispielsweise ein durch das Bild schwimmender Partikel das korrekte Erkennen der Zellgrenze kurzzeitig verhindern. Im Anschluss berechnete das Programm eine durchschnittliche Kurve für den Verlauf der Calciumkonzentration, der Zelllänge und der durchschnittlichen Sarkomerlänge während einer Kontraktion. Anhand dieser Kurve wurden verschiedene Werte für den Vergleich zwischen der einzelnen Versuchsgruppen errechnet.

2.2.22 MTT-Assay

2.2.22.1 **Prinzip/Hintergrund**

Mit dem MTT-Assay kann die metabolische Aktivität von Zellen, die stark mit der Viabilität der Zellen korreliert, gemessen werden. Den NRVCN wird dazu der gelbe MTT-Farbstoff ins Medium gegeben. Dieser wird in vitalen Zellen zu einem blau-violetten wasserunlöslichen Formazan reduziert. Die Zellen und das MTT werden anschließend gelöst und die Formazan-Konzentration photometrisch bestimmt, die proportional zur Glykolyserate und damit zur Anzahl der vitalen Zellen ist (Borlepawar et al., 2017).

2.2.22.2 Vorgehen

In einer 24-Well-Platte wurden 150.000 Zellen pro Well ausgesät und der jeweilige Versuch durchgeführt. An Tag 4 wurde das Medium abgenommen und pro Well 10 % (v/v) des Mediums durch MTT-Reagenz ersetzt. Die Zellen wurden für 4 Stunden in ihren jeweiligen Bedingungen inkubiert und anschließend der Lösungsvermittler hinzugegeben. Über Nacht wurden die Zellen und das Formazan gelöst. Die Platten wurden 5 Minuten leicht geschüttelt und 200 µl aus jedem Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Die Formazan-Konzentration wurde mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 585 nm gemessen.

2.2.23 Analyse des Phosphoproteoms

2.2.23.1 Prinzip/Hintergrund

Das Phosphoproteom einer Zelle beschreibt die Gesamtheit ihrer Proteine inklusive aller Phosphorylierungen als posttranslationale Modifikation. Kinasen sind die Hauptursache für diese Phosphorylierungen.

Eine Untersuchung des Phosphoproteoms kann dazu beitragen, mögliche direkte und indirekte Targets einer Kinase zu identifizieren und die Auswirkungen des Proteins auf die Zusammensetzung der Proteine insgesamt zu analysieren.

Die verschiedenen Versuchsgruppen werden dazu mithilfe des SysQuant® phosphoproteomic workflow von Proteome Sciences, London, untersucht und miteinander verglichen.

Die Proteine werden zu Peptiden verdaut, unterschiedlich markiert und per Massenspektrometrie bestimmt. Mit bioinformatischen Mitteln werden aus den Daten der Massenspektrometrie die dazugehörigen Proteine inklusive Phosphorylierungen identifiziert und die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsgruppen miteinander verglichen (Britton et al., 2014).

2.2.23.2 Vorgehen

2.2.23.2.1 Generierung der Proteinlysate

Wie unter 2.2.1 beschrieben, wurden NRVCN auf 10cm-Schalen mit einer Dichte von 10 Millionen Zellen pro Schale ausgesät. Von folgenden Versuchsgruppen wurden jeweils drei Replikate generiert:

	LacZ 48 h	MST4 48h	Unbehandelt 72 h	LacZ 72 h	MST4 72 h	MST4 + Hes 72 h
AdLacZ (moi)	50	0	0	50	0	0
AdMST4 (moi)	0	50	0	0	50	50
Infektionszeit (h)	48	48	72	72	72	72
Hesperadin (nM)	0	0	0	0	0	100

Tabelle 2-9: Versuchsgruppen des Phosphoproteomics-Versuchs

Die Zellen wurden an Tag 3 bzw. an Tag 4 in Abhängigkeit von der angestrebten Infektionszeit dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, es wurden je 600 µl SysQuant Puffer pro Schale hinzugegeben und die

Schalen wurden bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden sie auf Eis aufgetaut und mit Zellschaber und Pipette in ein 1,5ml-Gefäß überführt. Dieses wurde 20 min bei 14.000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5ml-Gefäß überführt. Die Probe wurde kurz gevortext und 50 µl wurden für die interne Analyse abgenommen.

2.2.23.2.2 *Interne Analyse*

Aufgrund des für die spätere Analyse notwendigen Puffers konnte kein DC-Assay für die Proteinkonzentrationsmessung durchgeführt werden. Stattdessen wurde mit dem 50µl-Aliquot ein Bradford-Assay (s. 2.2.15) durchgeführt. Anhand der Ergebnisse wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Überexpression von MST4 bzw. die Hemmung von MST4 gelungen war. Anschließend wurden die eigentlichen Proteinproben an Proteome Sciences zur Analyse des Phosphoproteoms auf Trockeneis per Kurier übersandt.

2.2.23.2.3 *Analyse bei Proteome Sciences*

Die Firma Proteome Sciences, London, hat ebenfalls eine Qualitätskontrolle der eingesandten Proben durchgeführt, insbesondere um zu überprüfen, ob die Proteinkonzentration ausreichend groß war und die Proben den Transport unbeschadet überstanden haben. 1,2 mg Protein jeder Probe wurden auf die gleiche Konzentration verdünnt. Aus allen Proben wurde eine Referenzprobe gepoolt und in vier Aliquots zu je 800 µg aufgeteilt. 800 µg jeder Probe wurden mit Dithiotreitol reduziert, mit Iodacetamid alkyliert, mit Trypsin zu Peptiden verdaut und für die Massenspektrometrie mit sogenannten Tandem-Atommassenmarkierungen (TMT) markiert. Die 18 Proben wurden auf zwei sogenannte TMT11plex-Messproben aufgeteilt und jeweils gepoolt, sodass etwa 8,8 mg Protein pro Messprobe vorhanden waren. Diese Messproben wurden angesäuert, verdünnt, entsalzen und lyophilisiert. Die so vorbereiteten Proben wurden z.T. weiter konzentriert und der Flüssigkeitschromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) zugeführt. Es wurde die Korrektheit der Messung überprüft und es erfolgte eine bioinformatische Auswertung.

2.2.23.2.4 *Bioinformatische Auswertung*

Die Datenqualität wurde auf mögliche Ausreißer überprüft. Eine explorative Analyse mittels Hauptkomponentenanalyse wurde durchgeführt, um die durch die Messung verursachten Schwankungen ausgleichen zu können.

Anschließend wurden immer zwei Gruppen folgendermaßen miteinander verglichen:

Kontrast 1	MST4 48h vs. LacZ 48h
Kontrast 2	MST4 72h vs. LacZ 72h
Kontrast 3	MST4 + Hes 72h vs. LacZ 72h
Kontrast 4	MST4 + Hes 72h vs. MST4 72h
Kontrast 5	(MST4 48h vs. LacZ 48h) vs. (MST4 72h vs. LacZ 72h)
Kontrast 6	Unbehandelt 72h vs. LacZ 72h

Tabelle 2-10: Kontraste des Phosphoproteomics-Versuchs

Die Expression der Peptide, Proteine und Phosphoproteine wurden für jeden Kontrast miteinander verglichen, Grenzen für Signifikanz und Foldchange festgelegt und die jeweiligen Ergebnisse dargestellt. Für Kontrast 1 wurde eine Grenze für den p-Wert von kleiner als 0,01 bzw. kleiner als 0,05 auf Proteinebene festgelegt und eine veränderte Expression von mindestens 1,4 bzw. 1,3 auf Proteinebene. Für alle anderen Kontraste wurde eine Grenze für den p-Wert von kleiner als 0,001 festgelegt und ein Fold Change von mindestens 1,7 auf Peptid- und Phosphopeptidebene und von mindestens 1,3 auf Proteinebene. Anhand dieser Grenzen wurden für alle drei Ebenen Volcano-Plots erstellt, die ausreichend stark und signifikant veränderte Peptide, Phosphopeptide und Proteine darstellen.

Auf Basis von Kontrast 4 wurden Clusterheatmaps für alle drei Ebenen erstellt.

Schließlich analysierte Proteome Sciences die Ergebnisse mit einer eigenen Software funktionell mithilfe der Datenbank „Gene Ontology“. Es wurden regulierte biologischen Prozesse, zelluläre Kompartimente und molekulare Funktionen untersucht und die am stärksten regulierten für jeden Kontrast dargestellt.

2.2.24 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung wurde mit den Programmen SigmaPlot und GraphPad Prism durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die grafische Darstellung als Mittelwert und Standardfehler (SEM). Die statistische Analyse erfolgte bei 2 Gruppen mittels t-Test und bei mehreren Gruppen mittels One-Way/Two-Way ANOVA gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test. Als statistisch signifikant wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit $\alpha < 0,05$ angesehen. Die Signifikanzniveaustufen wurden folgendermaßen gekennzeichnet: signifikant ($p < 0,05$ *), hochsignifikant ($p < 0,01$ **), höchstsignifikant ($p < 0,001$ ***) (Borlepawar et al., 2017; McHugh, 2011).

3 Ergebnisse

3.1 Expression von MST4 in verschiedenen Geweben

Die Expression von MST4 unterscheidet sich je nach Gewebe. Im Herzen und in der Skelettmuskulatur sowie in Leber und Niere ist die Expression bei Mäusen besonders hoch (Abbildung 3-1 A). Bei Ratten kann eine besonders hohe Expression ebenfalls im Herzen sowie in der Leber beobachtet werden (Abbildung 3-1 B).

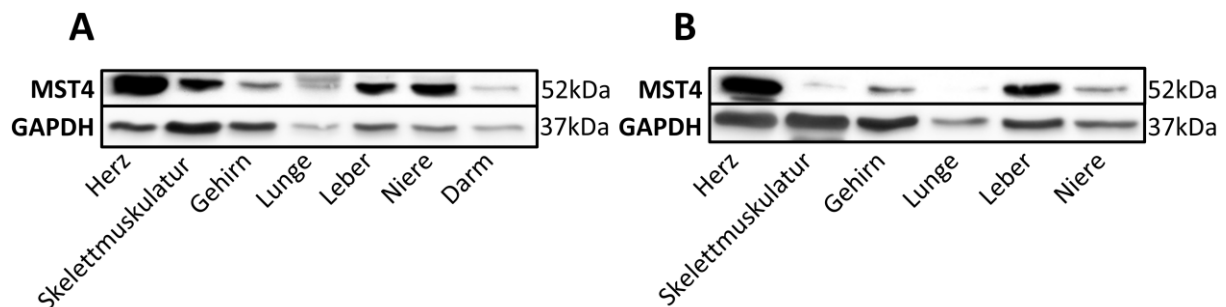


Abbildung 3-1: MST4 wird im Herzen stark exprimiert

Western Blot mit Proteinlysaten aus verschiedenen Geweben einer adulten Maus (A) und einer adulten Ratte (B). Insbesondere im Herzen und der Leber beider Tiere sowie der Skelettmuskulatur der Maus zeigt sich eine starke Expression von MST4.

3.2 Expression von MST4 in humanen Herzen mit Herzinsuffizienz

Im Rahmen von Herztransplantationen werden routinemäßig Biopate sowohl aus den explantierten Herzen als auch aus den transplantierten Herzen genommen. Aus diesem Material können im Rahmen von Forschungsvorhaben auch Proteinlysate generiert werden, in denen die Expression von Proteinen bei Herzinsuffizienz untersucht werden kann.

In Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie zeigt sich eine statistisch signifikante Überexpression von MST4, im Mittel um den Faktor 5,71. Bei Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie ist diese Überexpression etwas geringer. Sie liegt durchschnittlich beim 3,83-fachen der Kontrollgruppe (Abbildung 3-2).

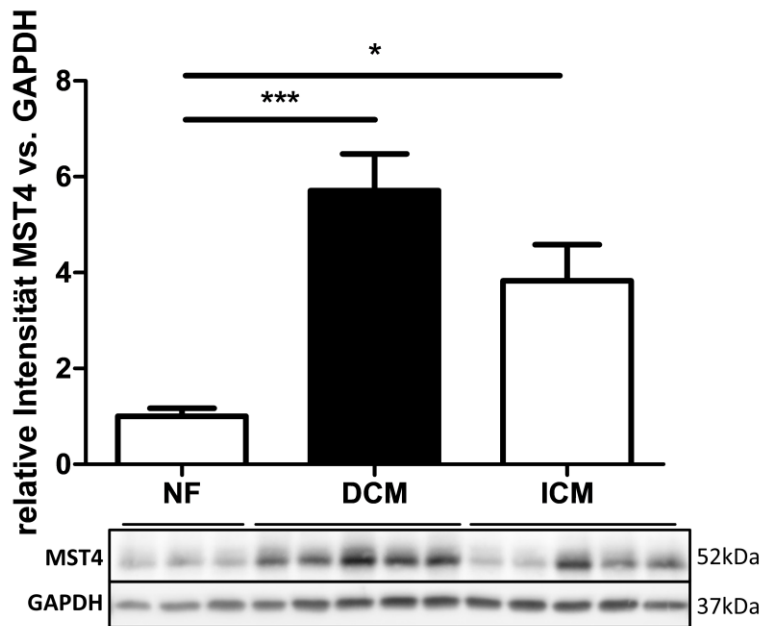


Abbildung 3-2: MST4 wird in Herzen von Patienten mit dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie vermehrt exprimiert

Western Blot mit Proteinlysaten aus Proben von humanen Herzen ohne Herzinsuffizienz (NF, n=6), Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM, n=10) und ischämischer Kardiomyopathie (ICM, n=9). Gezeigt werden repräsentative Western Blots. Die Proben stammen von Biopsien im Rahmen von Herztransplantationen. Die Herzen ohne Herzinsuffizienz sind die transplantierten Herzen, während die Herzen mit Kardiomyopathie die explantierten Herzen sind.

3.3 Immunchemische Darstellung von MST4 in Kardiomyozyten und Myokard

MST4 scheint in isolierten Kardiomyozyten eine andere subzelluläre Lokalisation zu haben als in intaktem Myokard. In isolierten Kardiomyozyten aus adulten Ratten ist die Ausrichtung von MST4 in der immunchemischen Darstellung eher longitudinal mit einer besonders starken Anfärbung in direkter Nähe zum Kern sowie auch im Nukleus selbst (Abbildung 3-3 A). In gesundem humanen Myokard, das im Rahmen von Routine-Probenentnahmen gewonnen wurde, lässt sich MST4 immunchemisch v.a. an den Glanzstreifen an den Zell-Zell-Kontakten darstellen. Ein longitudinales Muster ist ebenfalls erkennbar, jedoch deutlich schwächer als die Anfärbung an den Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 3-3 B).

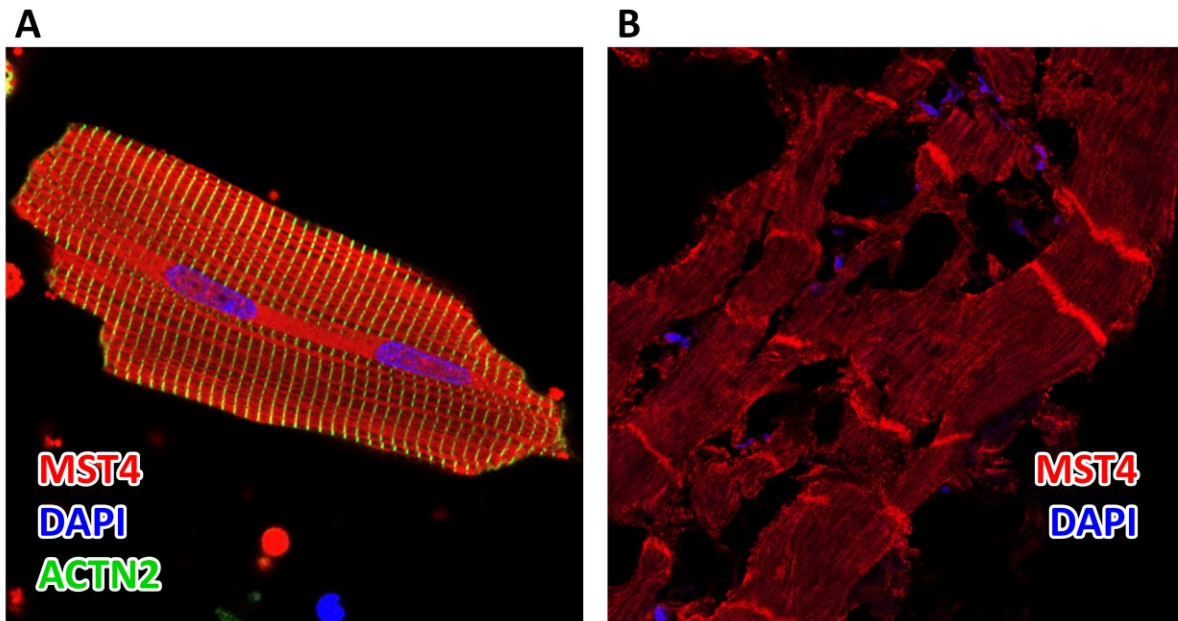


Abbildung 3-3: MST4 scheint unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen zu haben

Immunchemische Darstellung von MST4 (rot) in isolierten Kardiomyozyten von adulten Ratten (A) sowie in humanem Myokard (B). Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt. In A ist Actinin Alpha 2 (ACTN2) zusätzlich in grün angefärbt.

3.4 Co-Immunpräzipitation von MST4

Mithilfe der Co-Immunpräzipitation können direkte Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. Wird MST4 mit einem spezifischen Antikörper gegen MST4 und damit verbundenen magnetischen Kügelchen aus nicht-denaturierten NRVCN-Proteinlysaten isoliert, so werden auch direkte Interaktionspartner mit in das Isolat überführt. Diese Interaktionspartner können mittels Western Blot anschließend dargestellt werden. Die STRIPAK-Proteine Myoscape/STRIP2 und SLMAP interagieren auch in NRVCN mit MST4 (Abbildung 3-4).

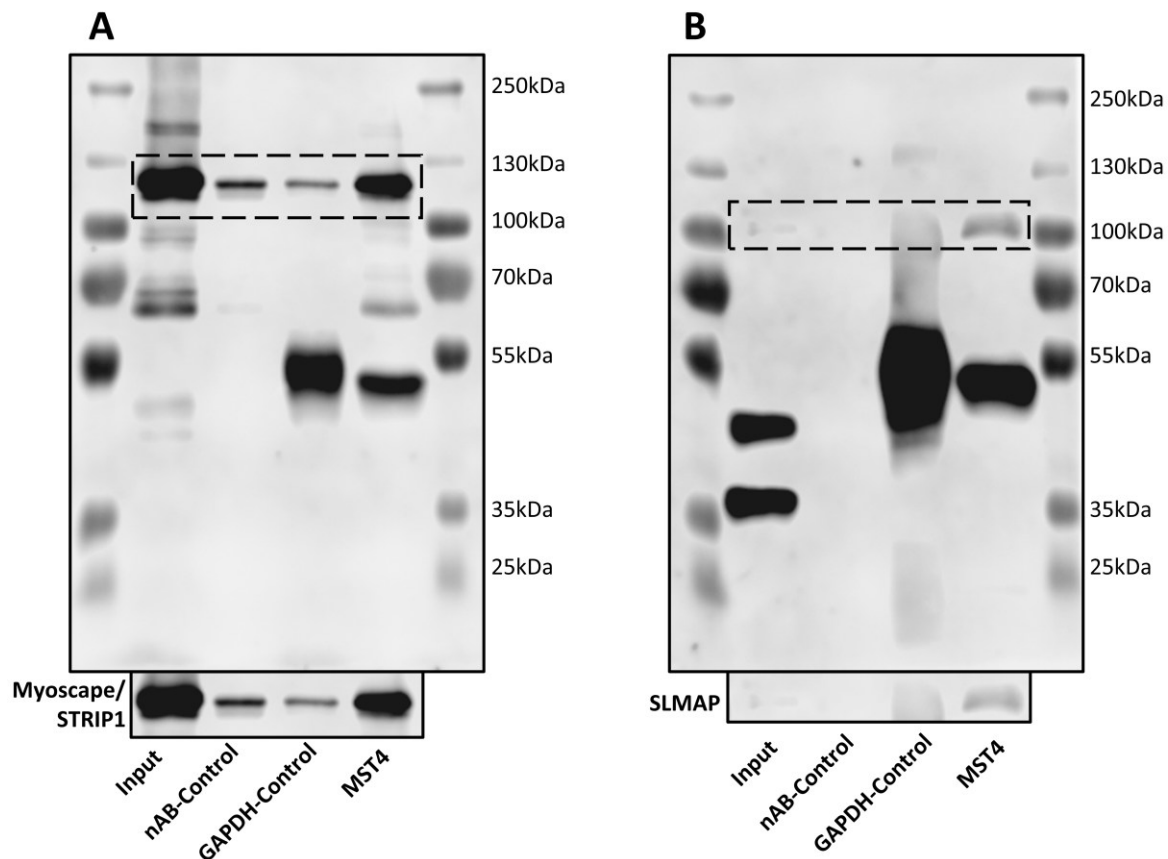


Abbildung 3-4: MST4 interagiert direkt mit den STRIPAK-Proteinen Myoscape/STRIP2 (A) und Sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP, B) in NRVCN

Western Blot von Proteinproben aus MST4-überexprimierenden NRVCN (A) und nativen NRVCN (B). Aus den Proteinlysaten (Input) sind direkte Interaktionspartner von MST4 mittels Co-Immunpräzipitation isoliert worden, d.h. es wurde mit einem Antikörper gegen MST4 (MST4) „gefischt“. Zur Negativkontrolle wurden außerdem Fraktionen hergestellt, bei denen kein Antikörper verwendet wurde (nAB-Control) und ein Antikörper gegen das Kontroll-Protein GAPDH (GAPDH-Control). Die Western Blots wurden anschließend mit einem Antikörper gegen Myoscape/STRIP2 (A) und SLMAP (B) inkubiert. Die entstehende markierte Bande zeigt, dass Myoscape/STRIP2 und SLMAP direkt mit MST4 interagieren. Die anderen deutlich sichtbaren Banden entstehen durch Rückstände des „Fishing-Antikörpers“, die durch den Sekundärantikörper dargestellt werden. Links und rechts wurden jeweils Größenstandards aufgetragen.

3.5 Expression von MST4 in verschiedenen Modellen von Kardiomyopathie und kardialer Hypertrophie

Ausgehend von der erhöhten MST4-Expression in humanen insuffizienten Herzen soll die differentielle Expression von MST4 in verschiedenen pathophysiologisch relevanten Modellen untersucht werden, um mögliche Hinweise auf die Rolle von MST4 in den jeweiligen Zusammenhängen zu erhalten.

3.5.1 Expression von MST4 in Herzen von MLP-Knockout-Mäusen

Mäuse, die kein funktionsfähiges MLP-Gen besitzen, entwickeln nach der Geburt einen Phänotypen, der einer dilatativen Kardiomyopathie entspricht und in einer Herzinsuffizienz mündet (Arber et al.,

1997). In Herzen aus diesen Tieren wird MST4 leicht überexprimiert. Auf Protein-Ebene um den Faktor 2,49 (Abbildung 3-5 B) und auf mRNA-Ebene um den Faktor 2,28 (Abbildung 3-5 A), wobei diese Änderung knapp nicht-signifikant ist ($p = 0,057$). Gleichzeitig nimmt die Phosphorylierung pro MST4 in den MLP-KO-Hezen auf etwa 57 % im Vergleich zum Wildtyp ab (Abbildung 3-5 D), sodass die Gesamtmenge an phosphoryliertem und damit mutmaßlich aktivem MST4 keine signifikante Veränderung zeigt (Abbildung 3-5 C).

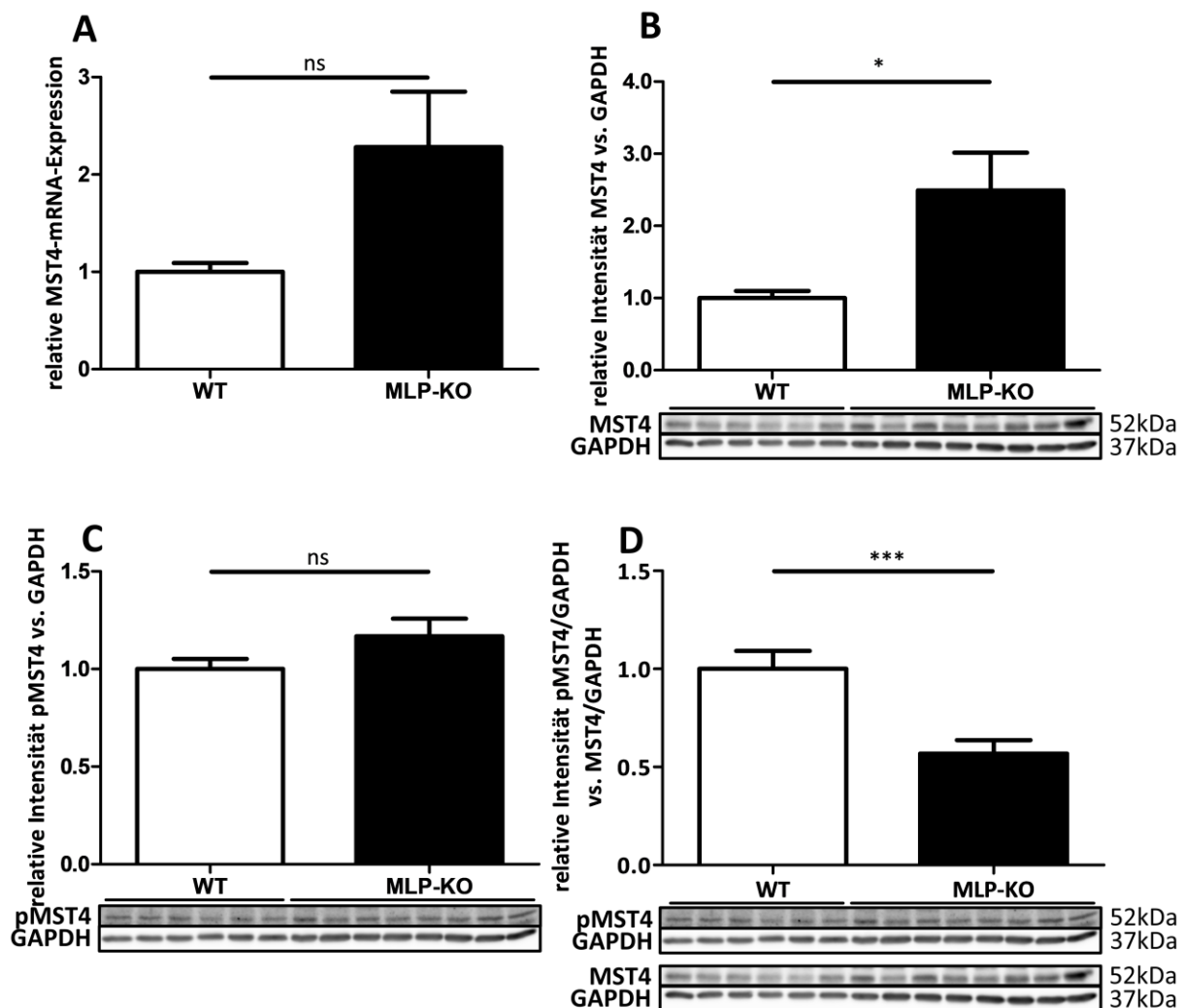


Abbildung 3-5: MST4 wird in Herzen von Mäusen ohne funktionsfähiges MLP-Gen (MLP-KO) im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermehrt exprimiert, während die Menge an phosphoryliertem MST4 stabil bleibt

Analyse von qPCR-Daten (A) von Proben aus Mäuseherzen ohne funktionsfähiges MLP-Gen (MLP-KO, $n=19$) und im Vergleich dazu Mäuseherzen mit funktionsfähigem MLP-Gen (WT, $n=15$). Western Blots (B-D) mit Proteinlysaten von MLP-KO-Tieren (MLP-KO, $n=14$) im Vergleich zu Wildtypen (WT, $n=10$). Gezeigt werden jeweils repräsentative Western Blots.

3.5.2 Expression von MST4 in Herzen von Calsarcin-1-Knockout-Mäusen

Der Calcineurin-NFAT-Signalweg kann durch einen Mangel an Calsarcin-1, das diesen Signalweg normalerweise hemmt, verstärkt werden. In Mäusen, in denen dieses Gen nicht exprimiert wird (CS1-KO), steigt die MST4-Expression etwa um den Faktor 2,49 auf Protein-Ebene (Abbildung 3-6 B). Auf mRNA-Ebene ist diese Veränderung jedoch nicht zu beobachten (Abbildung 3-6 A). Auch in diesen Tieren ist zu beobachten, dass die Phosphorylierung pro MST4 abnimmt (auf ca. 40 %, Abbildung 3-6 D) und so die Gesamtmenge an phosphoryliertem MST4 konstant gehalten wird (Abbildung 3-6 C).

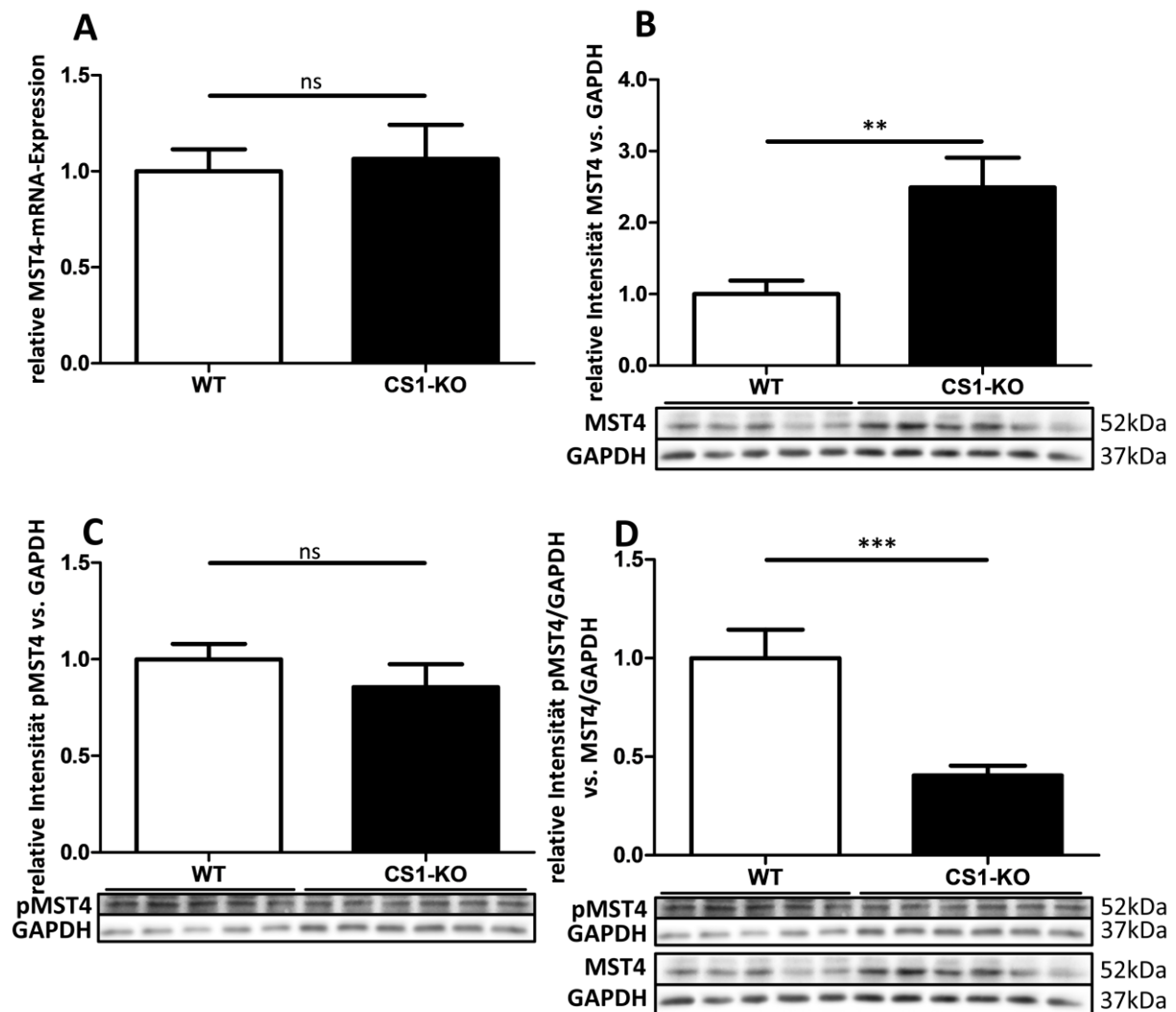


Abbildung 3-6: MST4 wird in Herzen von Mäusen ohne funktionsfähiges Calsarcin-1-Gen (CS1-KO) im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermehrt exprimiert, während die Menge an phosphoryliertem MST4 stabil bleibt

Analyse von qPCR-Daten (A) von Proben aus Mäuseherzen ohne funktionsfähiges CS1-Gen (CS1-KO, n=13) und im Vergleich dazu Mäuseherzen mit funktionsfähigem CS1-Gen (WT, n=11). Western Blots (B-D) mit Proteinlysaten von CS1-KO-Tieren (CS1-KO, n=14) im Vergleich zu Wildtypen (WT, n=11). Gezeigt werden jeweils repräsentative Western Blots.

3.5.3 Expression von MST4 in Herzen von Calcineurin-transgenen Mäusen

Ein weiteres Modell der Herzinsuffizienz ist die dauerhafte Aktivierung der katalytischen Calcineurin Untereinheit A (CnA). In Mäusen, in denen dies durch genomische Veränderung erreicht wird (CnA-TG) beträgt die Expression von MST4 im Vergleich zum Wildtyp (WT) ca. 55 % (Abbildung 3-7).

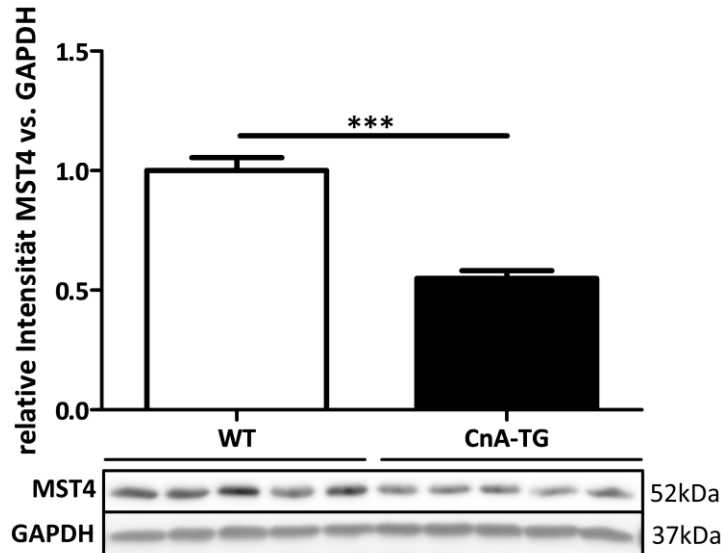


Abbildung 3-7: MST4 wird in Herzen von transgenen Mäusen mit dauerhafter Aktivierung der Calcineurin Untereinheit A (CnA-TG) im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermindert exprimiert

Western Blot mit Proteinlysaten aus Herzen von Calcineurin-A-transgenen Mäusen (CnA-TG, n=5) im Vergleich zu Proteinlysaten aus Herzen von Wildtyp-Mäusen (WT, n=5).

3.5.4 Expression von MST4 in Herzen von Mäusen nach Konstriktion der Aorta transversa

Wird die Aorta von Mäusen auf Höhe des Aortenbogens operativ durch eine Ligatur dauerhaft verengt, erhöht sich dadurch die Nachlast des Herzens ähnlich wie bei einem arteriellen Hypertonus. Dieser erhöhte Widerstand führt am Herzen zu einer auf ca. 39 % verminderten Expression von MST4 im Vergleich zu Tieren, die derselben Operation unterzogen wurden aber deren Aorta nicht dauerhaft verengt wurde (Abbildung 3-8).

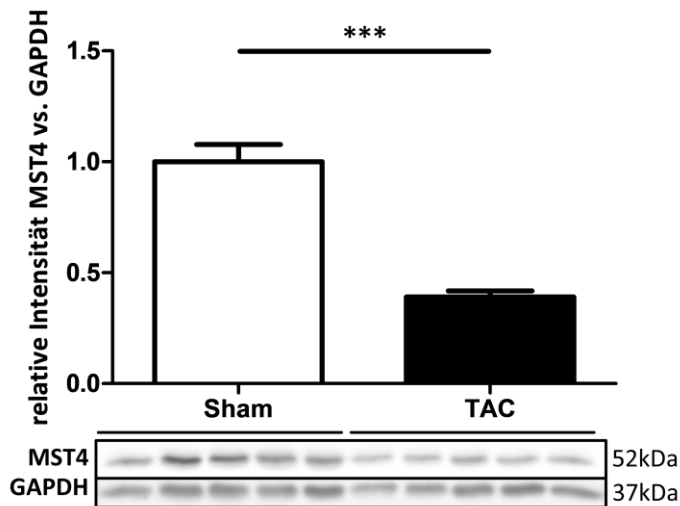


Abbildung 3-8: MST4 wird in Herzen von Mäusen mit verengter transverser Aorta vermindert exprimiert

Western Blot mit Proteinlysaten aus Herzen von Mäusen, deren transverse Aorta operativ dauerhaft verengt wurde (TAC, n=5) im Vergleich zu Tieren, die ebenfalls operiert wurden aber deren Aorta nicht dauerhaft verengt wurde (Sham, n=5).

3.5.5 Expression von MST4 in NRVCN nach biomechanischer Dehnung „Stretch“

Werden NRVCN regelmäßig biaxial gedehnt, simuliert dies eine Volumenbelastung, auf die u.a. mit einer vermehrten Expression von mRNA der fetalen Gene NPPA, NPPB und RCAN1.4 reagiert wird (Abbildung 3-9 B-D). Es konnte gezeigt werden, dass außerdem die Expression von MST4-mRNA um ca. 24 % statistisch signifikant ansteigt (Abbildung 3-9 A).

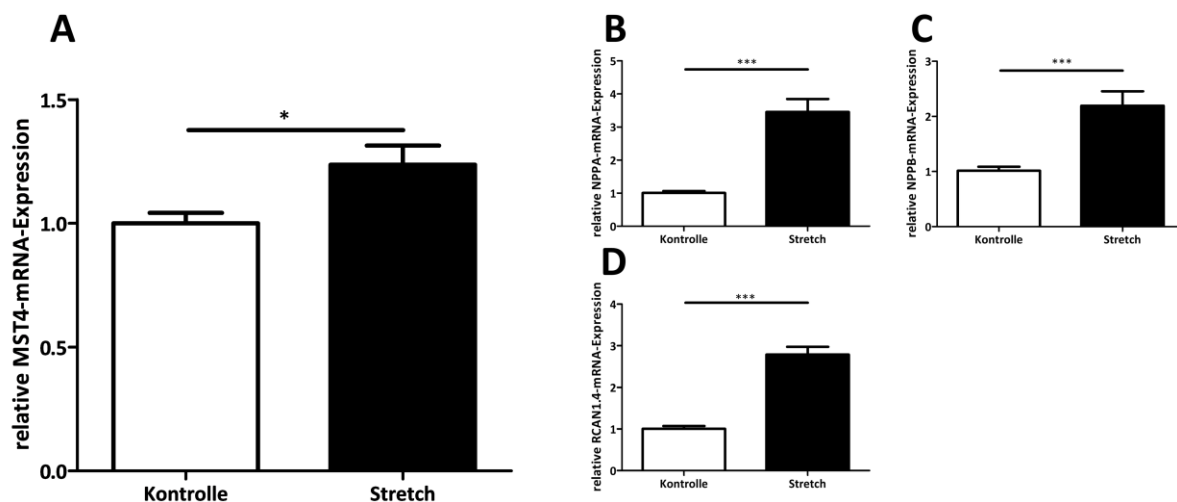


Abbildung 3-9: Stretch führt zu vermehrter MST4-Expression

Analyse von qPCR-Daten von NRVCN, die für 48 h mit einer Frequenz von 1 Hz um ca. 20 % gedehnt wurden (Stretch) im Vergleich zu Zellen, die nicht gedehnt wurden (Kontrolle). Dieser Vorgang simuliert eine Volumenbelastung für die Kardiomyozyten, die mit einer vermehrten Expression der fetalen Gene NPPA, NPPB und RCAN1.4 reagieren (B-D). Die Daten stammen von 3 unabhängigen Versuchen mit je 3-6 Replikaten pro Gruppe.

3.5.6 Expression von MST4 in NRVCN während Hypoxie

Unter hypoxischen Bedingungen werden in NRVCN bestimmte Signalwege aktiv, um darauf zu reagieren. Ein zentraler Vermittler, der bei Hypoxie verstärkt exprimiert wird, ist der Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA, Abbildung 3-10 C-D). Die Expression von MST4 in NRVCN steigt nach 4 h Hypoxie leicht an, wobei dieser Anstieg nicht statistisch signifikant ist (Abbildung 3-10 A-B) und zu diesem Zeitpunkt auch noch kein statistisch signifikanter Anstieg von VEGFA erkennbar ist. Bei länger andauernder Hypoxie sinkt die Expression. Nach 24 h liegt sie auf mRNA-Ebene bei 85 % gegenüber der Kontrollgruppe und auf Protein-Ebene bei 87 %. Werden NRVCN 48 h in Hypoxie inkubiert, sinkt die MST4-mRNA auf 57 % gegenüber der Normoxie-Gruppe (Abbildung 3-10 B) und die Proteinmenge von MST4 auf 47 % (Abbildung 3-10 A).

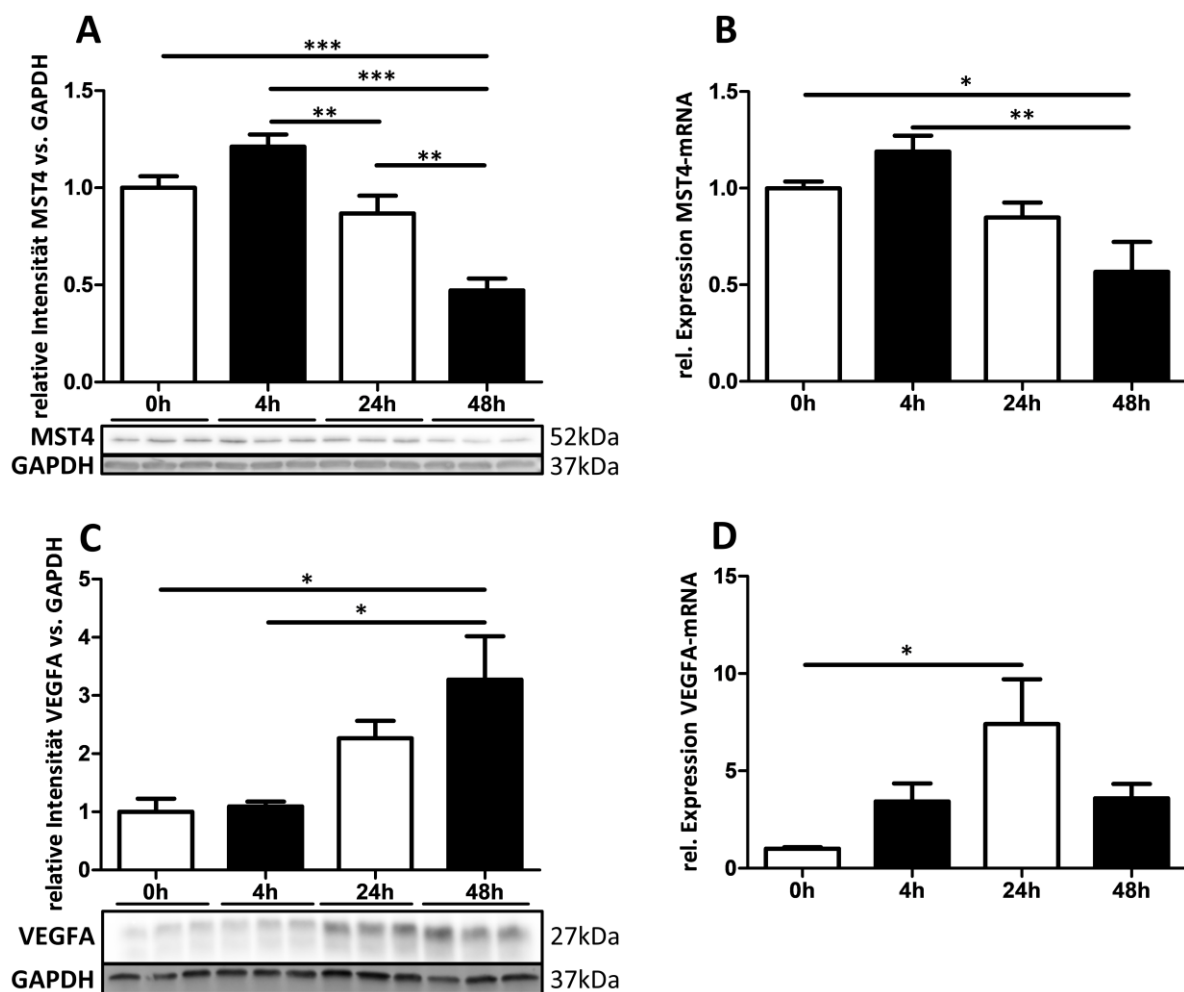


Abbildung 3-10: Unter Hypoxie-Bedingungen wird MST4 vermindert exprimiert

Analyse von Western Blot (A, C) und qPCR-Daten (B, D) von NRVCN, die vor der Zellernte 0 h (Normoxie-Kontrolle), 4 h, 24 h und 48 h unter hypoxischen Bedingungen (1 % Sauerstoffkonzentration) inkubiert wurden. C und D zeigen exemplarisch anhand von Daten aus einem (C) bzw. zwei (D) Versuchen die Aktivierung eines Hypoxie-induzierten Signalwegs durch verstärkte VEGFA-Expression. Die Daten von A stammen von 3 unabhängigen Versuchen mit je n=3, die Daten von B von 2 unabhängigen Versuchen mit je n=3.

3.5.7 Expression von MST4 in NRVCN in Abhängigkeit von der Zelldichte

Werden NRVCN mit zunehmender Dichte in 6-Well-Platten ausgesät erhöht sich v.a. die Zahl der Zell-Zell-Kontakte. In den meisten Versuchen wurden 750.000 bis 1.000.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte (9,6 cm²) ausgesät, was einer Dichte von ca. 78.000-104.000 Zellen/cm² entspricht. Diese Varianz scheint keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die MST4-Expression zu haben. Werden hingegen nur 250.000 Zellen ausgesät, also ca. 26.000 Zellen/cm², beträgt die MST4-Expression nur noch ca. 47 % im Vergleich zu einer Millionen pro Well. Bei 500.000 Zellen pro Well beträgt die MST4-Expression ca. 83 % und ist nicht mehr statistisch signifikant. Erhöht man die Zelldichte noch weiter auf 1,5 Millionen oder 2 Millionen, scheint die MST4-Expression wieder abzunehmen. Im One-Way-ANOVA ist dieser Trend allerdings nicht statistisch signifikant.

Ein ähnliches Bild zeigt sich beim phosphorylierten und damit aktiven MST4: Bei der geringsten untersuchten Zelldichte von 250.000 Zellen pro Well beträgt die Gesamtmenge vom phosphoryliertem MST4 nur ca. 34 % der Menge bei einer Millionen Zellen pro Well. Wird die Zelldichte weiter erhöht, nimmt diese Menge wieder ab. Bei 1,5 Millionen Zellen pro Well ist sie statistisch signifikant auf ca. 73 % der Menge bei einer Millionen Zellen pro Well reduziert.

Die relative Phosphorylierung pro MST4 hingegen ändert sich nicht statistisch signifikant in Abhängigkeit von der Zelldichte.

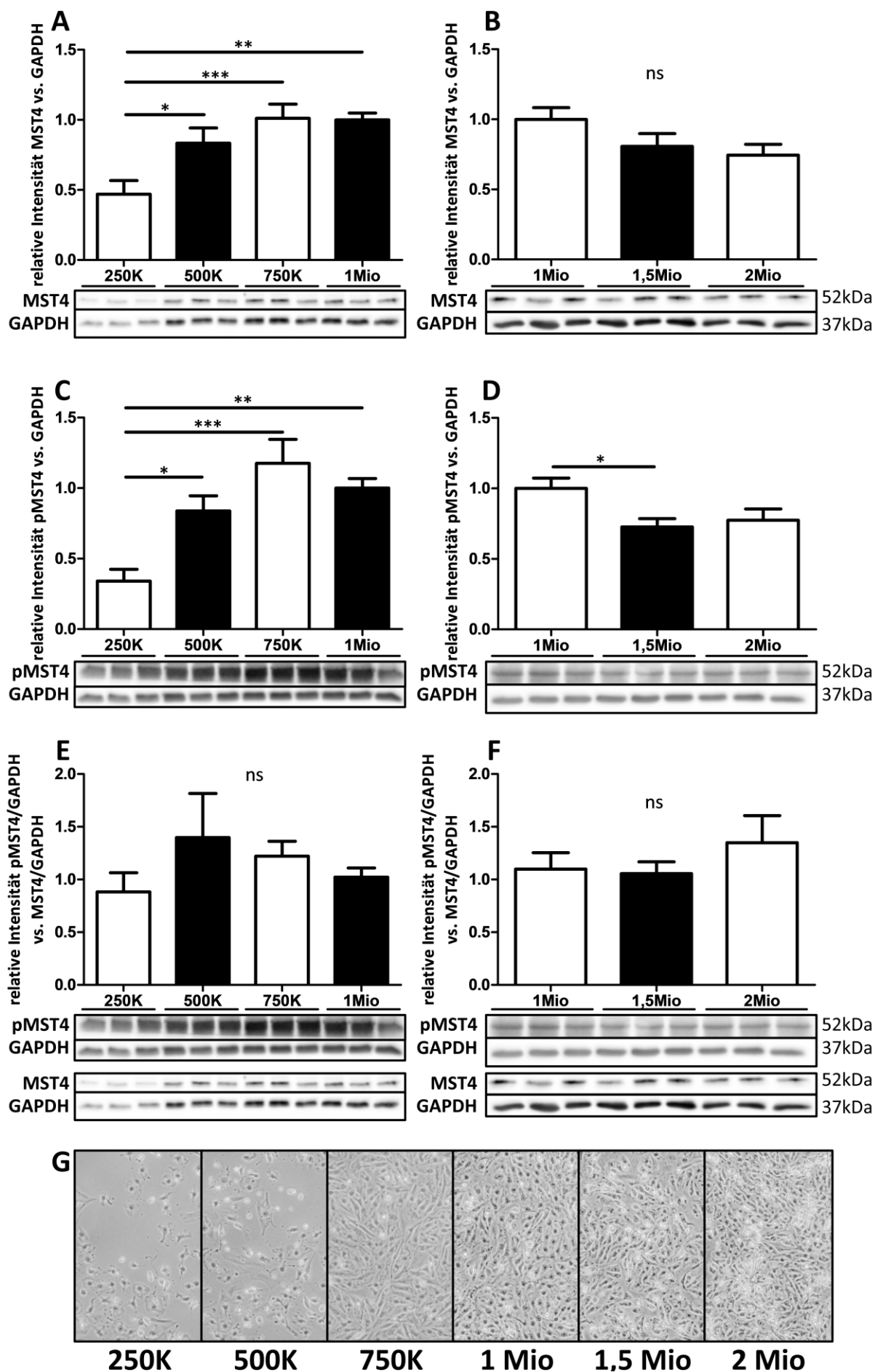


Abbildung 3-11: Die Expression von MST4 (A-B), sowie die Gesamtmenge an phosphoryliertem MST4 (pMST4, C-D) ist bei geringer Zelldichte vermindert und scheint bei sehr hoher Zelldichte ebenfalls wieder abzunehmen. Die relative Phosphorylierung pro MST4 bleibt stabil (E-F).

Western Blot mit Proteinlysaten aus NRVCN, die in verschiedener Dichte in 6-Well-Platten ausgesät wurden. Die Zellzahl pro Well betrug 250.000 (250K), 500.000 (500K), 750.000 (750K), 1.000.000 (1 Mio), 1.500.000 (1,5 Mio) und 2.000.000 (2 Mio). Es wurden 4 unabhängige Experimente durchgeführt mit je n=3 pro Gruppe. Gezeigt werden jeweils repräsentative Western Blots. G zeigt repräsentative Aufnahmen von NRVCN unterschiedlicher Zelldichte.

3.6 Auswirkungen der Überexpression von MST4, der Hemmung durch Hesperadin und des Knockdowns von MST4

Nachdem die Auswirkungen auf MST4 durch äußere Veränderungen untersucht wurden, ist es außerdem sinnvoll, die Auswirkungen einer veränderten MST4-Expression und -Aktivität auf biologische Prozesse zu untersuchen. Diese Veränderungen werden durch Adenoviren, den Inhibitor Hesperadin und short/small interfering RNA (siRNA) hervorgerufen.

3.6.1 Dosisfindung des generierten Adenovirus

Der wie in 2.2.3 beschrieben generierte Adenovirus mit MST4-Sequenz wurde mit verschiedenen Infektionsdosen und -zeiten in NRVCN getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von MST4 stabil funktioniert und mit zunehmender Dosis und Zeit zunimmt. Bereits die vergleichsweise geringe Infektionsdosis von 25 moi, also 25 Viren pro zu infizierender Zelle (25 ifu/Zelle), konnte eine starke MST4-Überexpression gut reproduzierbar hervorrufen (Abbildung 3-12).

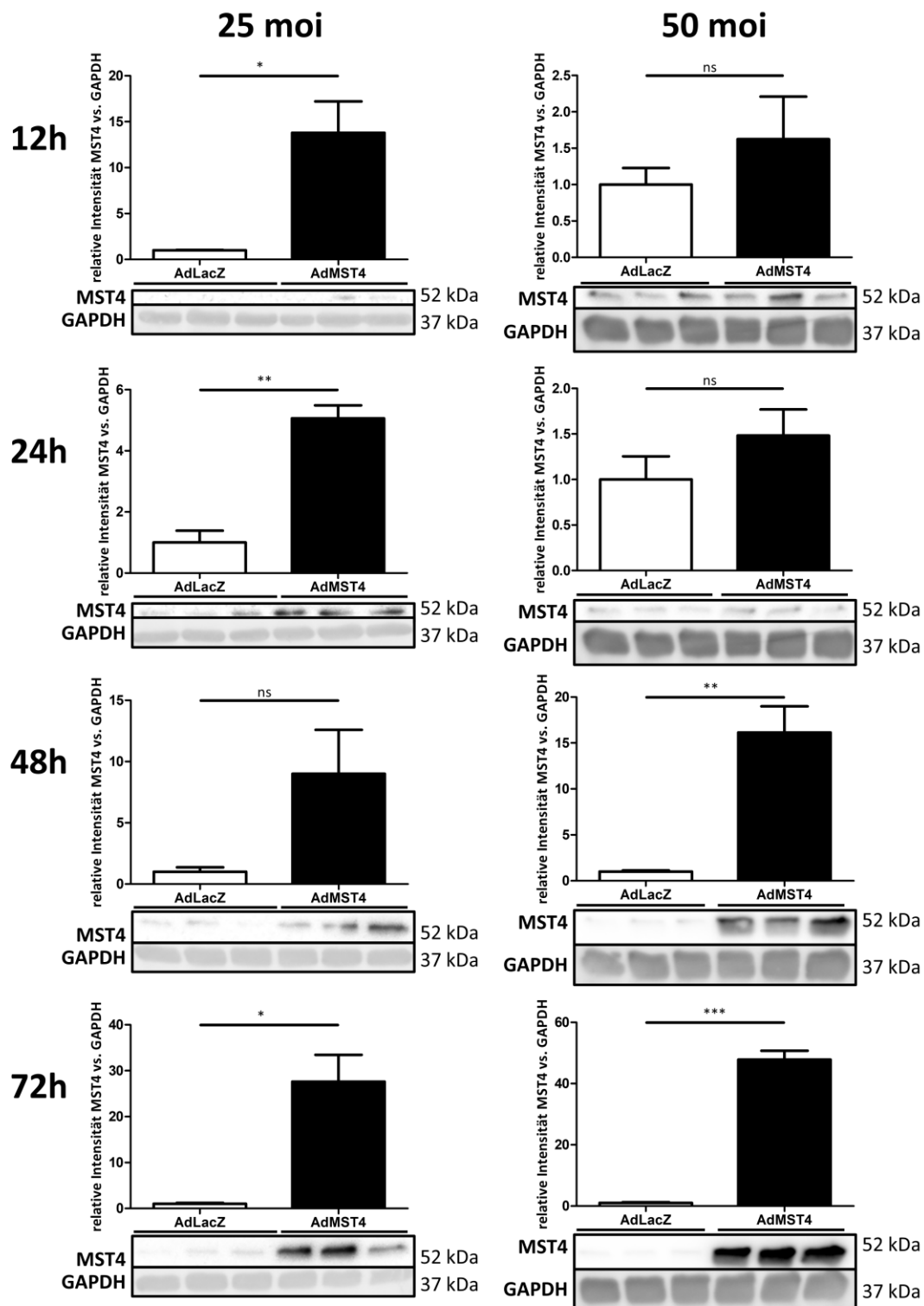


Abbildung 3-12: Adenovirale Überexpression von MST4 in Abhängigkeit von Infektionsdosis und Infektionszeit

Western Blot mit Proteinlysaten aus NRVCN, die entweder mit 25 moi oder 50 moi eines Adenovirus mit LacZ- (AdLacZ) oder MST4-Genom (AdMST4) behandelt wurden. Die Ernte der Zellen erfolgte 12, 24, 48 oder 72 Stunden nach der Infektion. Dieser Versuch wurde zu Beginn einmalig durchgeführt mit n=3 pro Gruppe.

3.6.2 Transfektionszeit der siRNA

Short/small interfering RNA (siRNA) kann durch Inkapsulierung in Lipidpartikel die Zellwand überschreiten und so in das Zytosol gelangen. Dort bindet die speziell hergestellte siRNA mithilfe des RNA-induced silencing complex (RISC) an die jeweilige mRNA des Zielgens und sorgt dafür, dass die mRNA nicht translatiert werden kann sondern stattdessen abgebaut wird. In der Folge kommt es zu einer verminderten Expression des Zielgens, also einem Knockdown. Das Ausmaß des Knockdowns hängt u.a. davon ab, wie groß der Turnover des Proteins ist, d.h. wie viel im Beobachtungszeitraum durch zelleigene Mechanismen abgebaut wird, während weniger hergestellt wird.

Die beiden eingesetzten siRNA gegen MST4 konnten in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 5 nM sowohl nach neun (Abbildung 3-13 B) als auch bereits nach vier Tagen (Abbildung 3-13 A) einen deutlichen Knockdown von MST4 auf Protein-Ebene erzielen. Nach vier Tagen waren nur noch etwa 14 % (siMST4-A) bzw. 21 % (siMST4-B) des MST4 der Kontrollgruppe detektierbar. Nach neun Tagen sank dieser Wert weiter auf 4 % (siMST4-A) bzw. 15 % (siMST4-B).

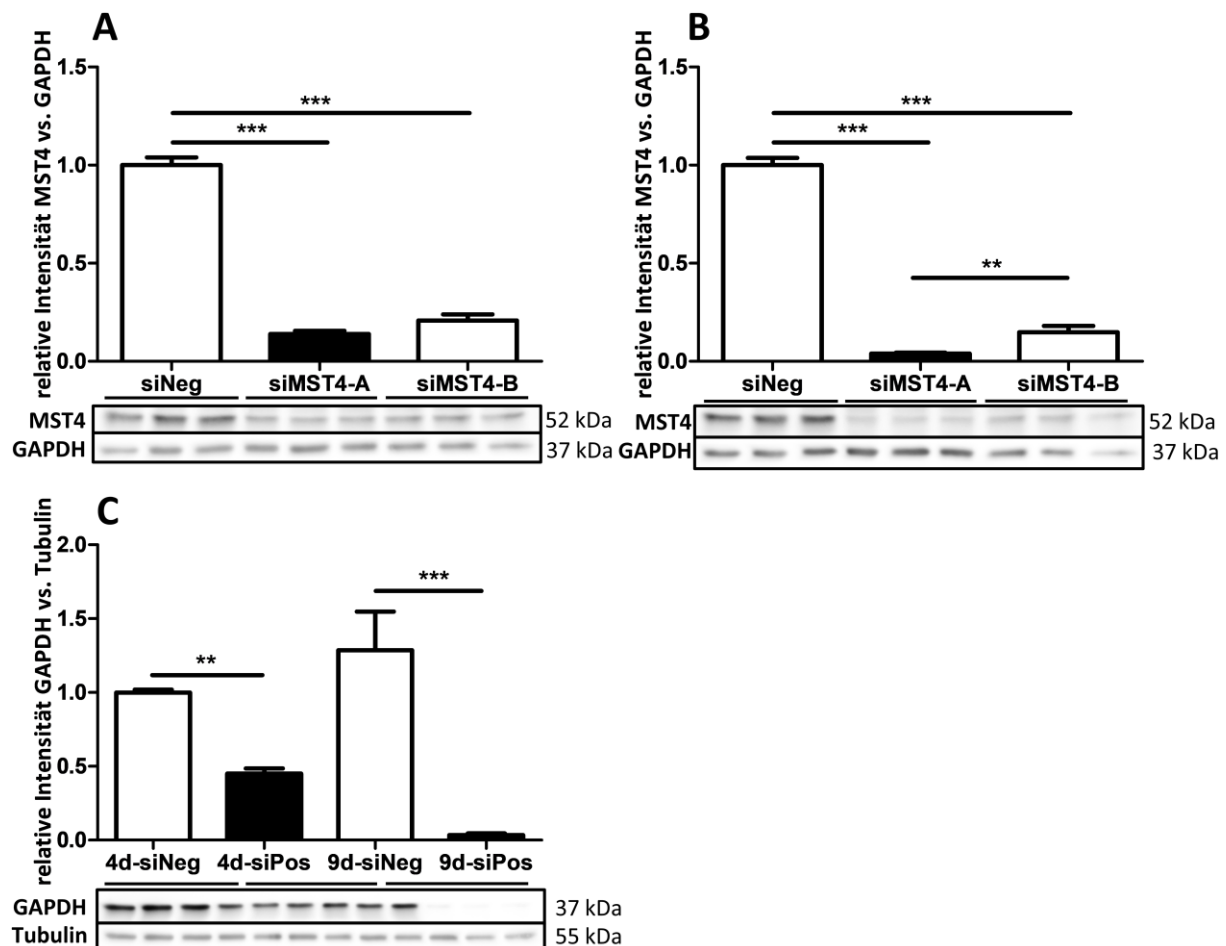


Abbildung 3-13: Bereits vier Tage nach der Transfektion mit siRNA gegen MST4-mRNA wird ein deutlicher Knockdown auf Protein-Ebene erreicht

Western Blot mit Proteinlysaten aus NRVCN, die einen Tag nach der Aussaat von je einer Millionen Zellen pro Well einer 6-Well-Platte mit 5 nM mit siRNA gegen MST4 (siMST4-A und siMST4-B), GAPDH (siPos) oder einer Kontroll-RNA (siNeg) behandelt wurden. Die Zellernte erfolgte vier Tage (A) oder

neun Tage (B) nach der Transfektion. Durch beide siRNA gegen MST4 ist nach beiden Transfektionszeiträumen eine deutliche Abnahme von MST4 auf Protein-Ebene sichtbar. C zeigt den Knockdown von GAPDH durch die Positivkontroll-siRNA. Dieser Versuch wurde zu Beginn zweimalig durchgeführt mit je n=3 pro Gruppe. Gezeigt werden jeweils repräsentative Western Blots.

3.6.3 Auswirkungen auf verschiedene Proteine der Apoptose

Das DNA-Reparatur-Enzym Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) ist eines der Hauptziele der Apoptose. Durch aktivierte Caspasen wird es gespalten und aus dem 116 kDa großen Protein entsteht u.a. ein Fragment mit einer Größe von 89 kDa.

Für den programmierten Zelltod, Apoptose, spielen Mitglieder der Cystein-Aspartat-Protease-Familie (Caspasen) eine zentrale Rolle. Durch verschiedene Stimuli wird die Apoptose der Zelle eingeleitet und in diesem Rahmen werden die Pro-Caspasen gespalten und damit aktiviert. Die aktivierten Caspasen spalten dann ihrerseits weitere pro-apoptotische Enzyme sowie Bestandteile der Zelle. Wichtige Vertreter sind die Caspasen 3 und 7.

Apoptose findet sowohl in vivo als auch in Zellkultur dauerhaft auf einem gewissen Niveau statt. Durch Interventionen kann die Rate an Apoptose erhöht oder vermindert werden, was z.B. anhand der Spaltung von PARP1 und verschiedenen Caspasen gemessen werden kann.

Die adenovirale Überexpression von MST4 in NRVCN (Abbildung 3-14 E) mit einhergehender Erhöhung der Menge an phosphoryliertem und damit katalytisch aktivem MST4 um etwa den Faktor 10,5 (Abbildung 3-14 F) hemmt einige zentrale Schaltunkte der Apoptose statistisch signifikant. So ist in diesen Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit einem LacZ-Adenovirus infiziert wurden, der Anteil von gespaltenem PARP1 im Vergleich zu ungespaltenem PARP1 bei etwa 73 % (Abbildung 3-14 A). Der Anteil von aktivierter Caspase 7 beträgt nur noch ca. 20 % (Abbildung 3-14 B). Auch die Spaltung von Caspase 3 nimmt ab auf ca. 31 % für ein Spaltprodukt von 17 kDa Größe (Abbildung 3-14 C) bzw. auf 48 % bei 19 kDa (Abbildung 3-14 D).

Wird MST4 hingegen mithilfe von siRNA gegen MST4-mRNA signifikant auf ca. 48 % (siMST4-A) bzw. 42 % (siMST4-B) reduziert (Abbildung 3-15 E), vermindert sich interessanterweise die Menge von phosphoryliertem MST4 nicht signifikant (Abbildung 3-15 F). In der Folge kommt es auch zu keiner statistisch signifikanten Regulation der bei der Überexpression regulierten Schaltunkte der Apoptose (Abbildung 3-15 A, C, D). Lediglich eine der beiden eingesetzten MST4-siRNA (siMST4-A) zeigt eine statistisch signifikante Zunahme von Spaltprodukten von Caspase 7 (Abbildung 3-15 B).

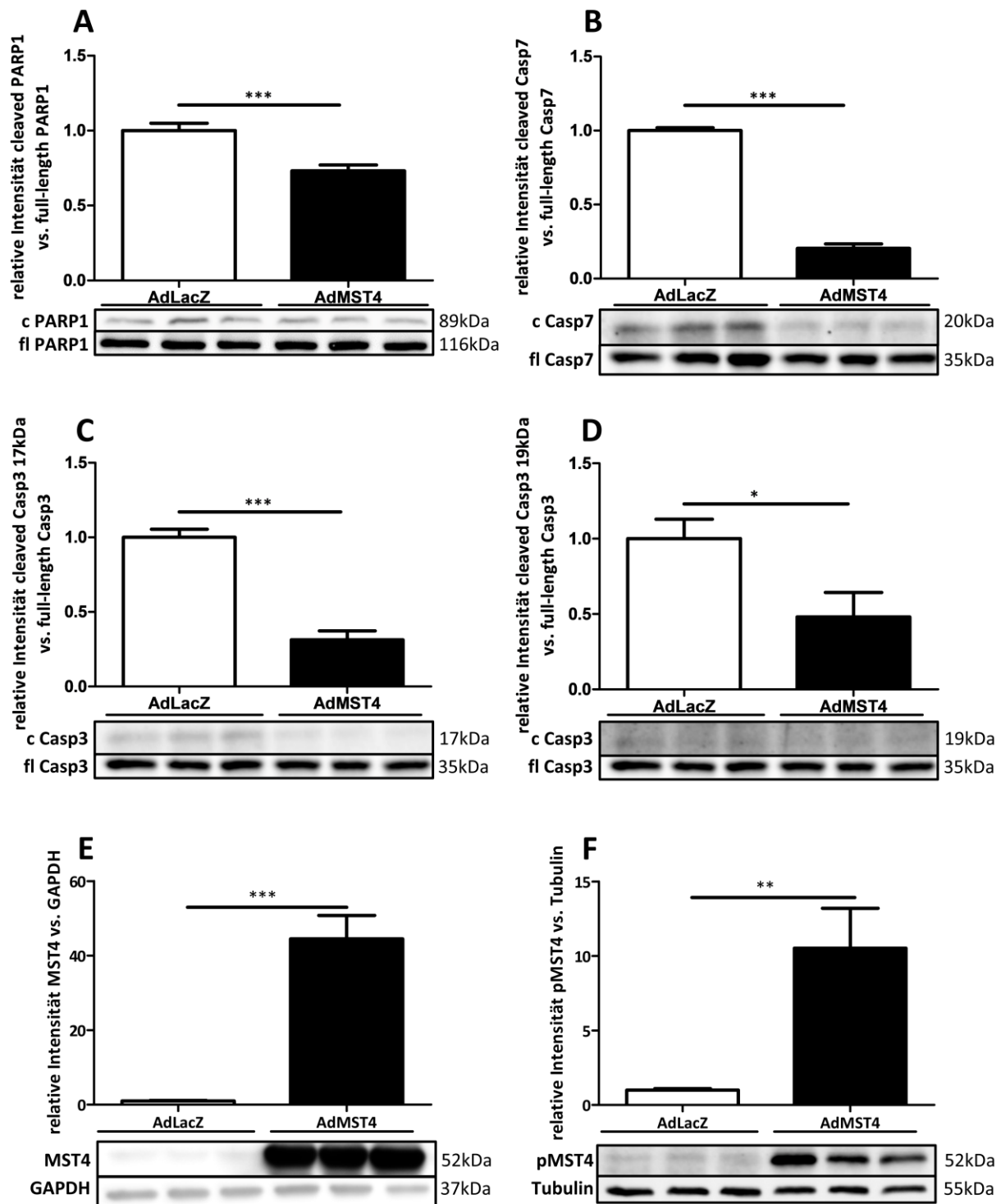


Abbildung 3-14: Die adenvirale Überexpression von MST4 in NRVCM hemmt zentrale Vorgänge der Apoptose

Western Blot mit Proteinlysaten aus NRVCM, die einen Tag nach der Aussaat von je einer Millionen Zellen pro Well einer 6-Well-Platte mit 25 moi eines MST4-Adenovirus (AdMST4) oder eines Kontrollvirus (AdLacZ) infiziert wurden. Es ist eine Abnahme von Spaltprodukten der Poly (ADP-ribose) Protease 1 (c PARP1) im Vergleich zum vollständigen (full-length) Enzym (fl PARP1) sowie der Caspasen 3 (c Casp3 / fl Casp3) und 7 (c Casp7 / fl Casp7) gezeigt. Beachtenswert ist außerdem das in F gezeigte verstärkte Vorkommen von phosphoryliertem und damit aktivem MST4, das mit dessen Überexpression (E) einhergeht. Es wurden 2 (E), 3 (B, D) bzw. 4 (A, C, E) unabhängige Experimente ausgewertet mit je n=3 pro Gruppe. Gezeigt werden jeweils repräsentative Western Blots.

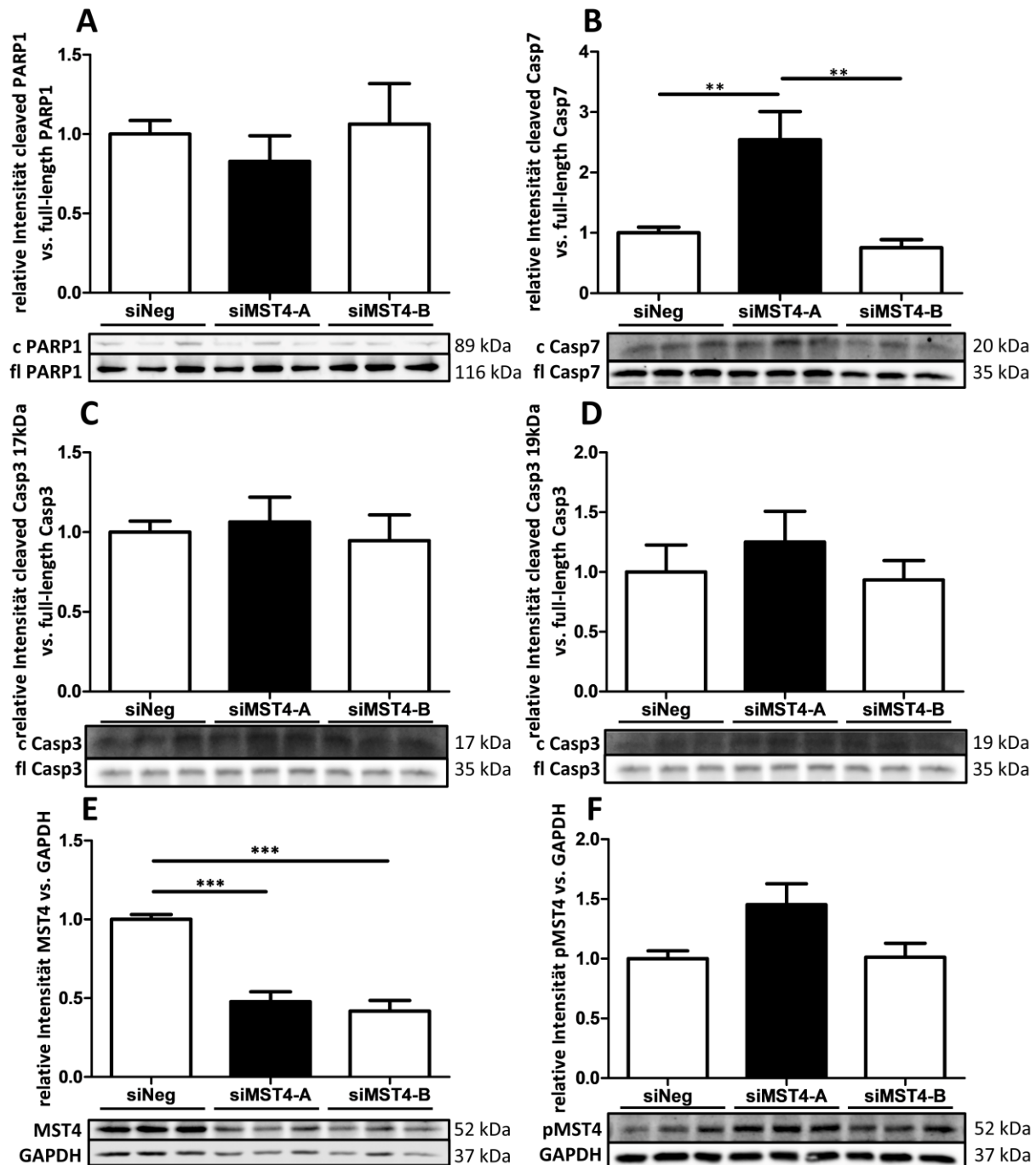


Abbildung 3-15: Der Knockdown von MST4 mithilfe von siRNA führt zu keiner signifikanten Regulation der Apoptose

Western Blot mit Proteinlysaten aus NRVCN, die einen Tag nach der Aussaat von je einer Millionen Zellen pro Well einer 6-Well-Platte mit 5 nM zwei verschiedenen siRNA gegen MST4-mRNA (siMST4-A und siMST4-B) oder einer Kontroll-siRNA (siNeg) behandelt wurden. Es ist keine signifikante Regulation der Spaltprodukte von PARP1 (A) und Casp3 (C, D) zu erkennen. Lediglich bei einer der zwei siRNA gegen MST4-mRNA ist die Menge an Caspase 7 Spaltprodukten (c Casp7, B) erhöht. Eine mögliche Erklärung für die Ausbleibende Verminderung von phosphoryliertem und damit aktivem MST4 (F) trotz Knockdown der Gesamtmenge von MST4 (E). Es wurden 2 (B, D) bzw. 4 (A, C, E, F) unabhängige Experimente durchgeführt mit je n=3 pro Gruppe. Gezeigt werden jeweils repräsentative Western Blots.

3.6.4 Anfärbung von gespaltener Caspase 3

Gespaltene Caspase 3 lässt sich auch mithilfe der Immunfluoreszenz anfärben (Abbildung 3-16 B-C). Das deutlich verminderte Vorkommen in Kardiomyozyten, die MST4 überexprimieren, zeigt sich auch mit dieser Methode. Während in Kontroll-Zellen ca. 15 % der Kardiomyozyten gespaltene Caspase 3 beinhalten, sind es bei den MST4-überexprimierenden Zellen lediglich 3,4 %, was einer statistisch signifikanten Reduktion auf ca. 22 % entspricht (Abbildung 3-16 A).

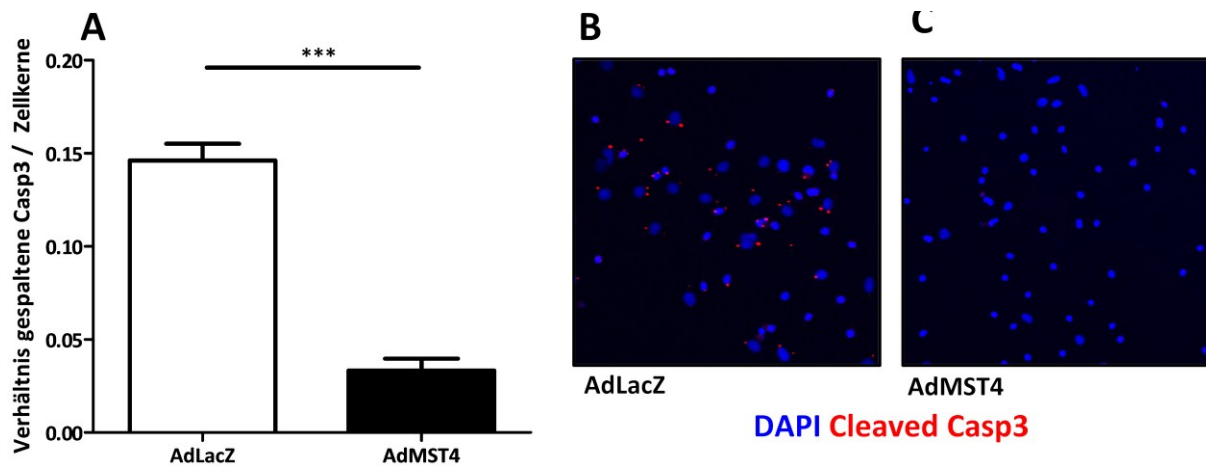


Abbildung 3-16: MST4-Überexpression führt zu verminderter Anfärbung von gespaltener Caspase 3
Analyse von Immunfluoreszenz-Bildern von NRVCN, in denen entweder LacZ (AdLacZ) oder MST4 (AdMST4) adenoviral überexprimiert (A). Die fixierten Zellen wurden mit einem Antikörper (rot) inkubiert, der ausschließlich an gespaltene Caspase 3 bindet sowie mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die gespaltene Caspase 3 und die Zellkerne wurden anschließend auf Aufnahmen eines Fluoreszenz-Mikroskop Software-gestützt gezählt und ein Verhältnis gebildet. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt und je Gruppe jeweils 30 Bilder mit einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen und analysiert. B und C zeigen repräsentative Bilder.

3.6.5 Viabilitäts-Bestimmung mittels MTT-Assay

Das MTT-Assay bestimmt die Stoffwechselaktivität von Zellen *in vitro*, die mit der Viabilität der Zellen korreliert. Wie erwartbar nimmt die Viabilität der NRVCN in einem Hypoxie-Inkubator mit 1 % Sauerstoff stark ab, auf etwa 69 % in der Gruppe des Kontrollvirus und 64 % in der MST4-Gruppe. Insgesamt scheint es keinen statistisch signifikanten Unterschied in diesem Assay zu machen, ob MST4 überexprimiert wird oder nicht. Die Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin hingegen reduziert die Viabilität. In Normoxie auf 72 % in der LacZ-Gruppe und 64 % in der MST4-Gruppe. In Hypoxie ist keine statistisch signifikante Veränderung sichtbar (Abbildung 3-17).

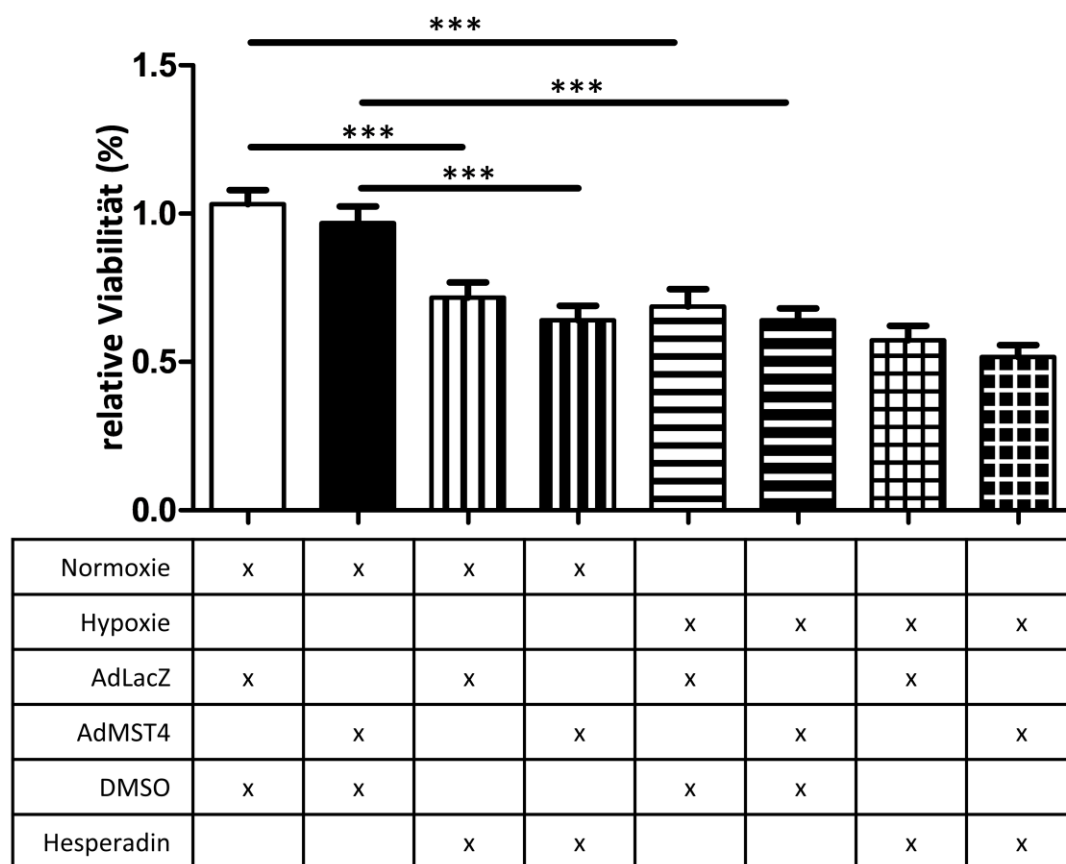


Abbildung 3-17: Hesperadin reduziert die Viabilität von NRVC

Analysen von MTT-Assays zur Viabilitätsbestimmung von NRVC, die 1. in Normoxie oder Hypoxie (1 % Sauerstoff) inkubiert wurden, 2. mit einem Adenovirus infiziert wurden, der LacZ (AdLacZ) oder MST4 (AdMST4) überexprimiert und 3. mit dem Inhibitor Hesperadin behandelt wurden oder nur dessen Lösungsmittel DMSO. Pro Well einer 24-Well-Platte wurden 150.000 NRVC ausgesät und einen Tag später mit den jeweiligen Viren infiziert und mit dem Inhibitor bzw. der Kontrolle behandelt. Einen weiteren Tag später wurde die Hypoxie-Gruppe in einen Inkubator mit 1 % Sauerstoff transferiert. Zwei Tage darauf wurde das MTT-Reagenz hinzugefügt und die Wells photometrisch ausgewertet und auf die Stoffwechselaktivität von komplett unbehandelten NRVC normalisiert. Es wurden 4 unabhängige Versuche mit je n=6 durchgeführt.

3.6.6 Auswirkung auf die Expression von TAZ

Ein zentraler Signalweg von Zellen ist der Hippo-Signalweg, der bei Aktivierung zu einer Phosphorylierung von TAZ führt, die in einem Abbau von TAZ resultiert. Dadurch kann TAZ nicht mehr aus dem Zytosol in den Kern translozieren um dort als Transkriptionsfaktor zu wirken.

Eine Überexpression von MST4 führt zu einer leicht erhöhten Expression von TAZ im Vergleich zur Kontrollgruppe um ca. 18 %, die jedoch nicht statistisch signifikant ist. Die Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin führt wider Erwarten zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der TAZ-Expression um ca. 60 %, die durch gleichzeitige Überexpression von MST4 wieder auf etwa den Wert der Kontrollgruppe abnimmt (Abbildung 3-18 A).

Beim Knockdown von MST4 mit siRNA konnte eines der eingesetzten Konstrukte (siMST4-B) eine Reduktion der TAZ-Expression um ca. ein Viertel erzielen. NRVCN, die mit dem anderen Konstrukt behandelt wurden, zeigten keinen Unterschied in der TAZ-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 3-18 B).

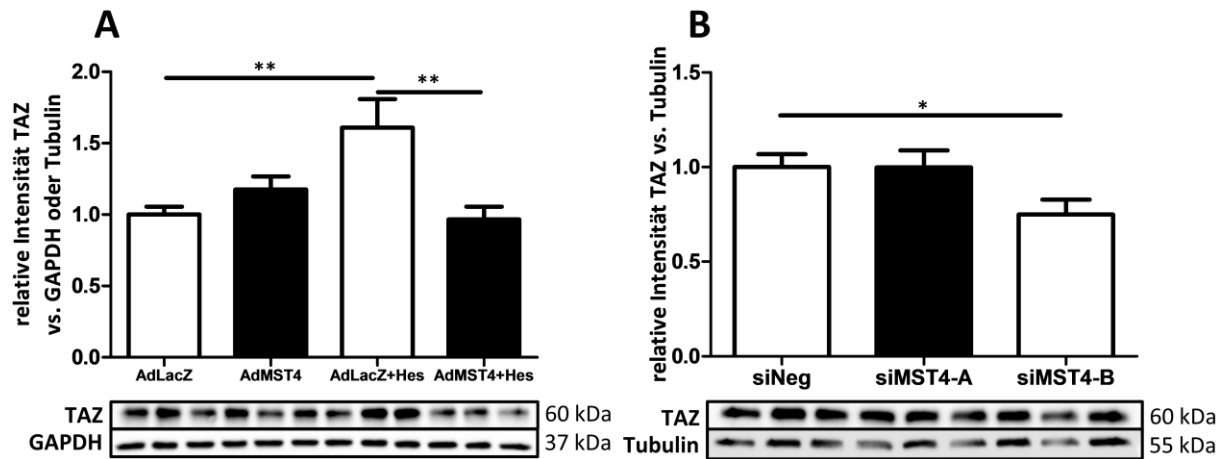


Abbildung 3-18: Der Knockdown von MST4 reduziert die Expression von TAZ

Western Blot mit Proteinlysaten aus NRVCN, die einen Tag nach der Aussaat von je einer Millionen Zellen pro Well einer 6-Well-Platte mit Adenoviren und Inhibitor (A) oder siRNA (B) behandelt wurden. Es wurden 25 moi eines Adenovirus eingesetzt, der LacZ (AdLacZ) oder MST4 (AdMST4) überexprimiert. Die Konzentration des Inhibitors Hesperadin betrug 100 nM (+Hes). Die siRNA wurde mit einer Konzentration von 5 nM eingesetzt und richtete sich gegen MST4-mRNA (siMST4-A und siMST4-B) oder war eine Kontroll-siRNA (siNeg). Es wurden 4 unabhängige Experimente durchgeführt mit je n=3 pro Gruppe. Es handelt sich um die gleichen Zellen wie in Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15. Gezeigt werden jeweils repräsentative Western Blots.

3.6.7 Bestimmung der Zellgröße

Kardiomyozyten sind weitestgehend postmitotische Zellen, daher spielt in regulativen Prozessen insbesondere die Größe der einzelnen Zelle eine Rolle. Diese lässt sich auch in vitro an isolierten NRVCN messen. Werden NRVCN adenoviral zu einer Überexpression von MST4 gebracht, so sind die Zellen im Schnitt ca. 13 % größer als Kontrollzellen, die LacZ überexprimieren. Wird eine Hypertrophie bereits chemisch durch den Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin induziert (Zunahme um ca. 18 % LacZ vs. LacZ+PE), lässt sich bei zusätzlicher MST4-Überexpression noch eine leichte Größenzunahme von ca. 4 % beobachten (Abbildung 3-19).

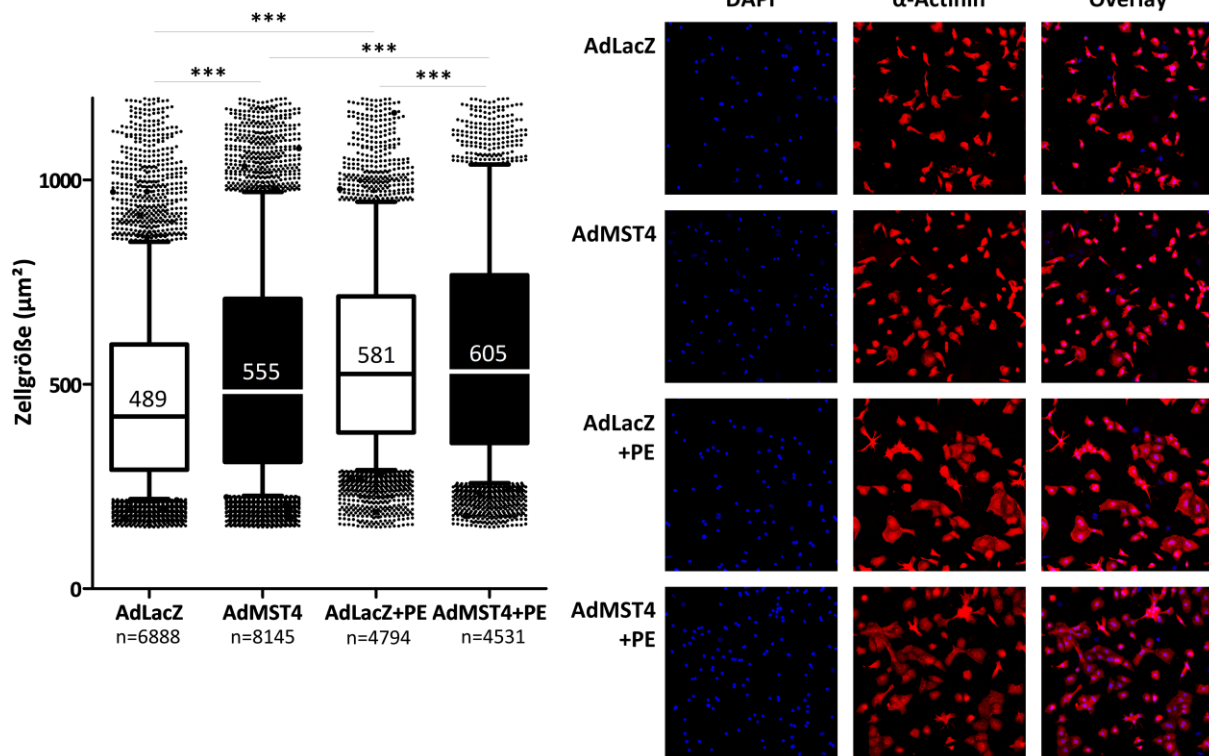


Abbildung 3-19: MST4-Überexpression führt zu Hypertrophie in NRVCM

Analyse von Immunfluoreszenz-Bildern von NRVCs, in denen entweder LacZ (AdLacZ) oder MST4 (AdMST4) adenoviral überexprimiert wurde und die teilweise zusätzlich mit Phenylephrin (+PE) behandelt wurden. Zur Bestimmung der Zellgröße wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen den Zytoskelett-Bestandteil α -Actinin und einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Zellen wurden anschließend auf Aufnahmen eines Fluoreszenz-Mikroskop Software-gestützt vermessen. Es wurden nur mononukleäre Zellen mit einer Größe zwischen 150 und 3.000 μm^2 eingeschlossen. Die unter dem Graph notierte Gesamtzahl der vermessenen Zellen pro Gruppe stammt aus 3 unabhängigen Versuchen. Gezeigt werden rechts jeweils repräsentative Bilder.

3.6.8 Auswirkungen auf die Expression fetaler Gene

Im Kontext der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie werden einige Gene re-exprimiert, die eigentlich v.a. während der Herzentwicklung eine Rolle spielen. Wichtige Vertreter sind die Gene NPPA, NPPB und RCAN1.4. Die beiden erstgenannten kodieren für die natriuretischen Peptide A und B. RT-Pro-BNP, das Produkt von NPPB, wird auch in der klinischen Routinediagnostik der Herzinsuffizienz als Biomarker verwendet. RCAN1.4 ist ein Surrogatparameter für die Aktivität der Phosphatase Calcineurin, einer zentralen Vermittlerin des pathologischen Remodelings.

Durch die Überexpression von MST4 ist die Expression dieser Gene auf mRNA-Ebene allerdings nicht statistisch signifikant verändert (Abbildung 3-20), sodass es keine Hinweise darauf gibt, dass die durch MST4 ausgelöste Hypertrophie (Abbildung 3-19) über diese Signalwege vermittelt wird.

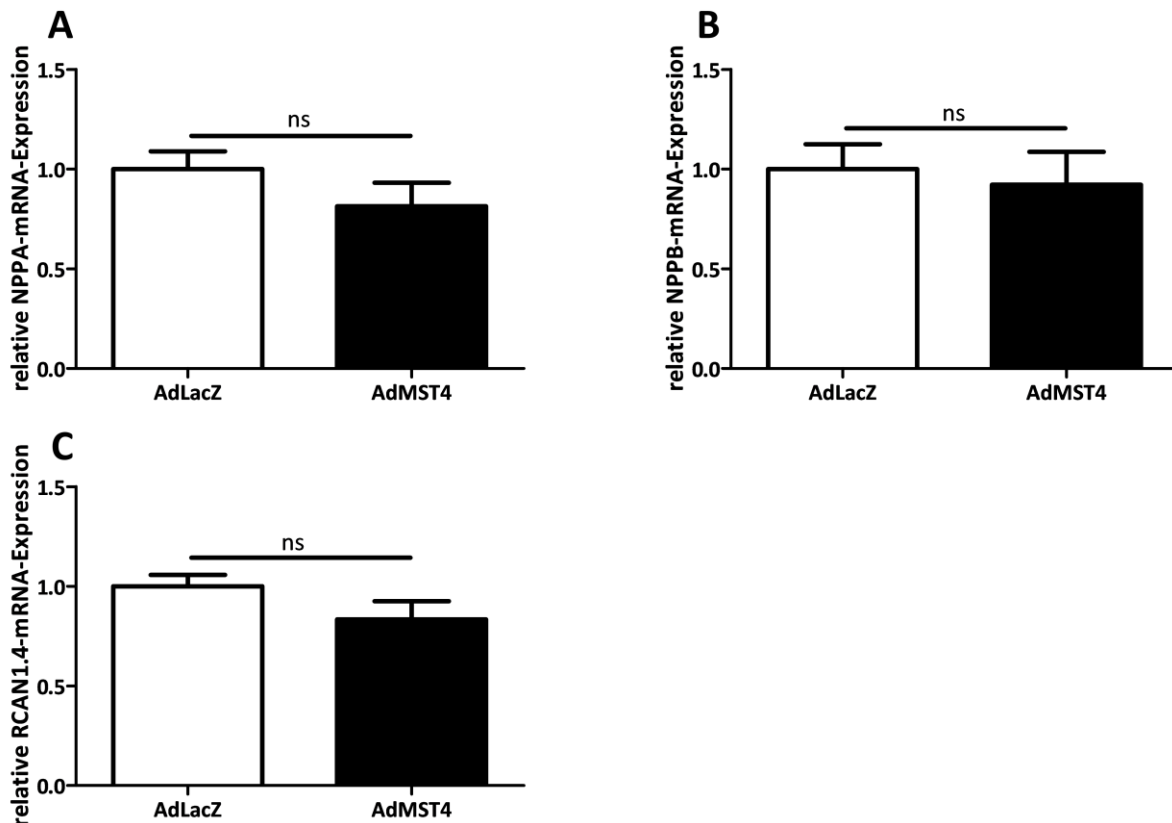


Abbildung 3-20: MST4-Überexpression hat keine Auswirkung auf die mRNA-Expression der fetale Gene NPPA, NPPB und RCAN1.4

Analyse von qPCR-Daten von NRVCMs, die einen Tag nach der Aussaat von je 750.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte mit 50 moi eines MST4-Adenovirus (AdMST4) oder eines Kontrollvirus (AdLacZ) infiziert wurden. In einer Multiplex-qRT-PCR wurde die mRNA-Expression der fetalen Gene NPPA, NPPB und RCAN1.4 ermittelt. Diese ist nicht statistisch signifikant reguliert. Die Daten stammen von 3 unabhängigen Versuchen mit je 3 Replikaten pro Gruppe.

3.6.9 Auswirkungen auf Kontraktilität und Calciumhaushalt

Isolierte Kardiomyozyten von adulten Ratten lassen sich mithilfe des Ionoptix-Systems elektrisch stimulieren und dabei auf das Kontraktionsverhalten auf Zell- und Sarkomer-Ebene sowie zelluläre Calciumströme untersuchen (Abbildung 3-21). Ebenso wie in den vorangegangenen Versuchen wurde MST4 bzw. das Kontrollprotein LacZ mithilfe eines adenoviralen Vektors überexprimiert (Abbildung 3-21 A), um die Auswirkungen auf verschiedene Parameter der Kontraktion und Calciumströme zu ermitteln. In einigen Versuchen wurde außerdem der Inhibitor Hesperadin hinzugegeben.

Bei einer Überexpression von MST4 konnten Verbesserungen von mehreren Parametern des Kontraktionszyklus gezeigt werden. Die relative Verkürzung der Sarkomere bzw. der einzelnen Zelle stellt auf Organebene die Inotropie der kardialen Kontraktion dar. Bei einer Überexpression von MST4 ist diese auf Zell-Ebene um etwa 23 % (Abbildung 3-22 A) und auf Sarkomer-Ebene um etwa 29 % erhöht (Abbildung 3-22 B).

Auch die Zeit bis zur maximalen Kontraktion des Herzens trägt bei konstanter Frequenz zur Inotropie bei. Auf Zell-Ebene konnte das Kontraktionsmaximum bei MST4-Überexpression ca. 20 ms bzw. 10 % eher erreicht werden (Abbildung 3-22 C), auf Sarkomer-Ebene trat dieses ca. 23 ms bzw. 12 % früher ein (Abbildung 3-22 D).

Ebenso konnte bei der diastolischen Funktion ein Trend zu einer Verbesserung, d.h. zu einer rascheren Relaxation der Zelle gesehen werden. Signifikante Veränderungen gab es bei der Zeit bis zur maximalen Relaxationsgeschwindigkeit der Zelle, die bei MST4-Überexpression etwa 40 ms bzw. 13 % eher erreicht wurde (Abbildung 3-22 E). Auf Sarkomer-Ebene war diese Veränderung nicht statistisch signifikant (Abbildung 3-22 F).

Die Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin führte zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Kontraktilität.

Die alleinige MST4-Überexpression konnte im Vergleich zur LacZ-Kontrolle keine statistisch signifikanten Veränderungen der Parameter Calciumströme hervorrufen (Abbildung 3-23). Lediglich in Kombination mit Hesperadin fanden sich hier statistisch signifikante Veränderungen: Die Calciumkonzentrationen sowohl in der Diastole (Abbildung 3-23 A) als auch in der Systole (Abbildung 3-23 B) sowie deren Differenz (Abbildung 3-23 C) waren gegenüber der alleinigen MST4-Expression leicht erhöht. Die Geschwindigkeit des Calcium-Einstroms war erhöht (Abbildung 3-23 E), des Ausstroms hingegen vermindert (Abbildung 3-23 G). Dafür wurde die höchste Geschwindigkeit des Calcium-Ausstroms signifikant eher erreicht (Abbildung 3-23 H).

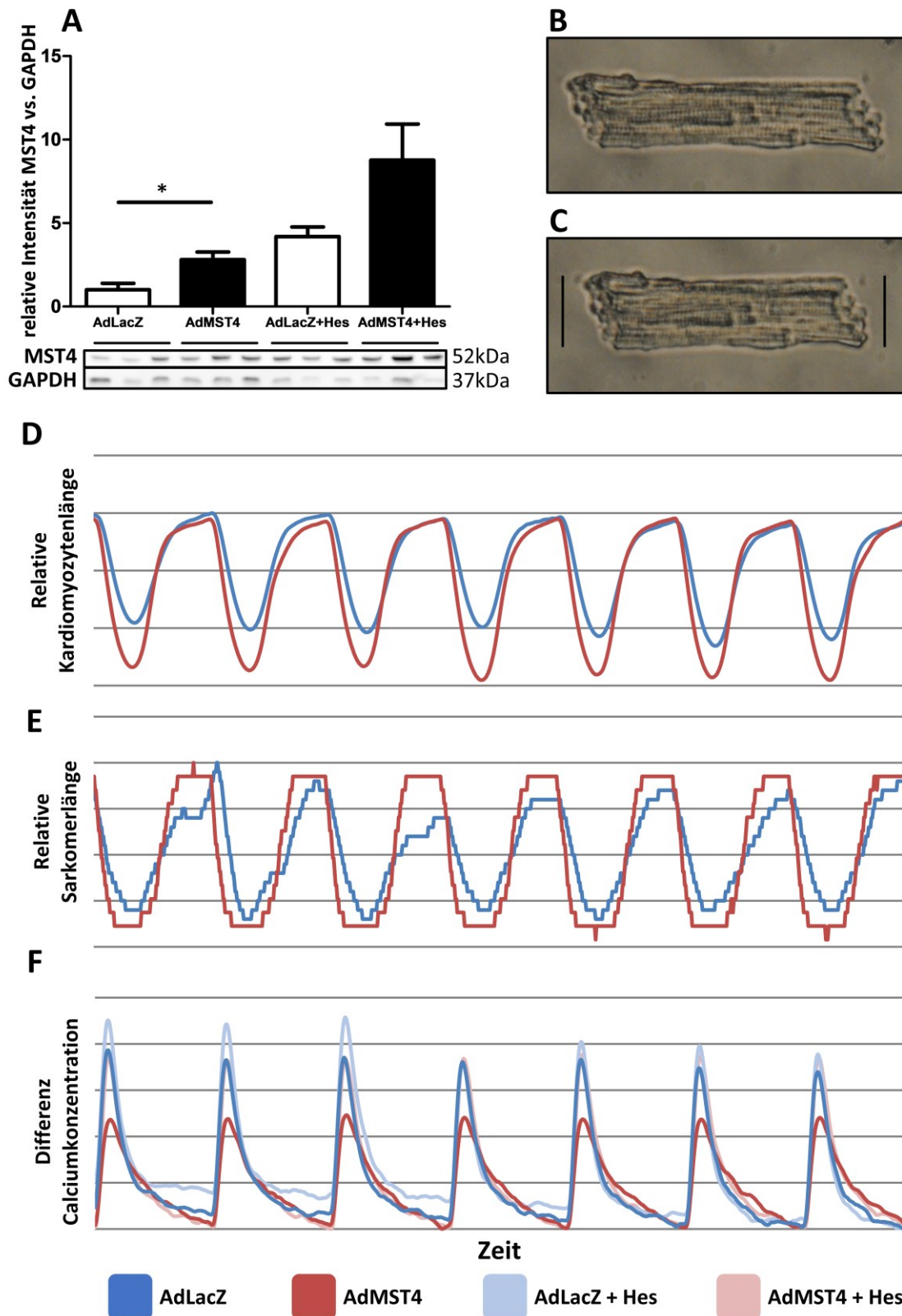


Abbildung 3-21: Überexpression von MST4 in ARVCM und elektrische Stimulation

A zeigt exemplarisch den Effekt der adenoviralen Überexpression mit 500 moi von MST4 in ARVCM anhand eines Western Blots. B und C zeigen eine isolierte Kardiomyozyte aus einer adulten Ratte im relaxierten (B) und kontrahierten Zustand (C). Die schwarzen Striche in C zeigen zum Vergleich die Länge der Zelle im relaxierten Zustand. D-F zeigen exemplarische Kurven der Länge der gesamten Zelle (D), des Sarkomers (E) und der Calciumkonzentration (F) bei einer Stimulation von 2 Hz.

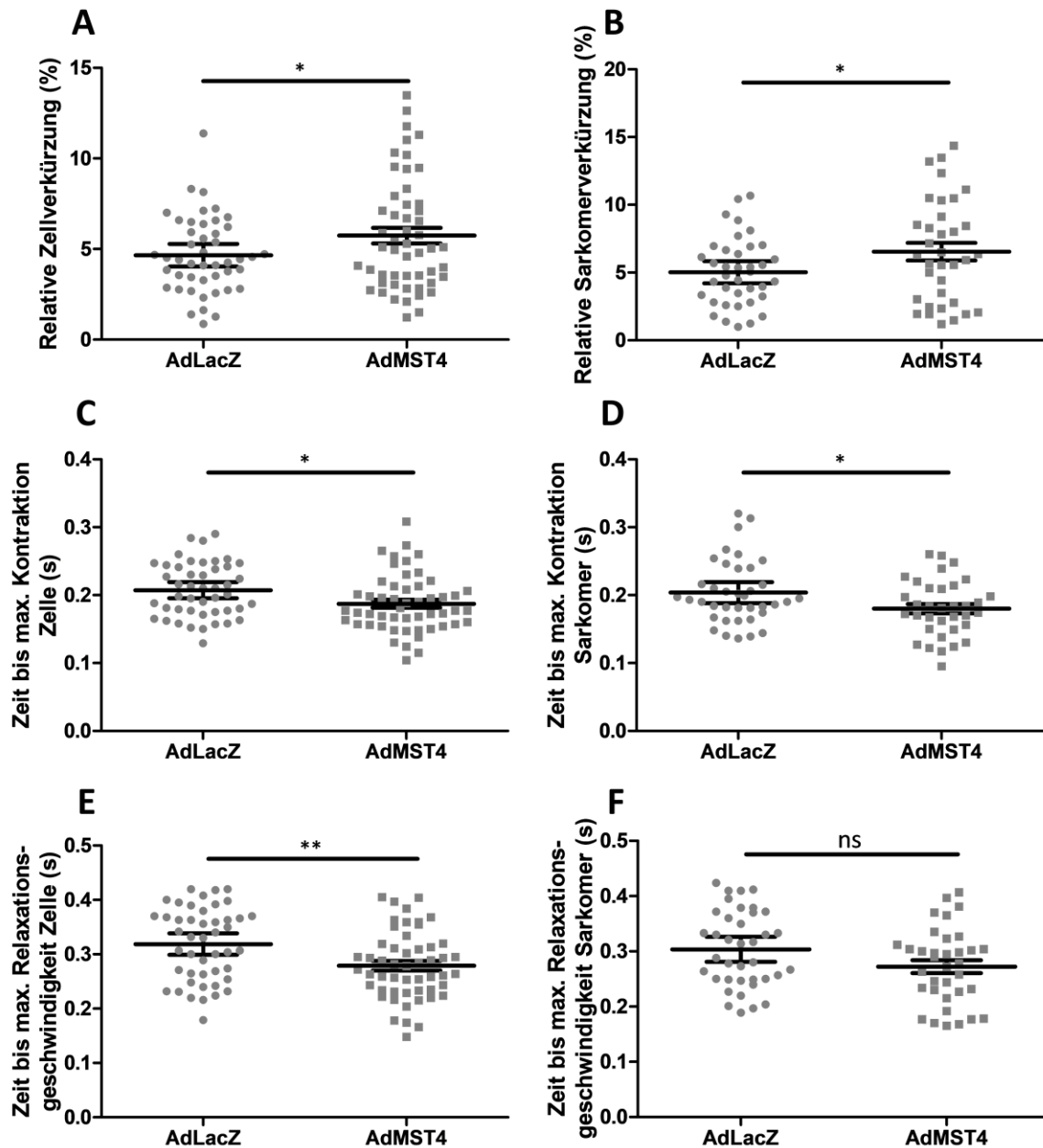


Abbildung 3-22: MST4-Überexpression verbessert Parameter der Kontraktion von Kardiomyozyten

Kontraktionsanalysen mithilfe des IonOptix-Systems von isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten, in denen entweder das Kontrollgen LacZ (AdLacZ) oder MST4 (AdMST4) mit 500 moi adenoviral überexprimiert wurde. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 2 Hz und einer biphasischen Spannung von 10 V elektrisch stimuliert. Für die Abbildungen auf der linken Seite (A,C,E) wurde jeweils die ganze Zelle analysiert, für die auf der rechten Seite (B,D,F) wurden vom System jeweils wenige Sarkomere einer Zelle erfasst und gemittelt. Jeder Datenpunkt stammt von einer vermessenen Zelle, bei der jeweils ca. 20-50 Kontraktionen gemittelt wurden. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils ca. 10-20 Zellen pro Gruppe vermessen.

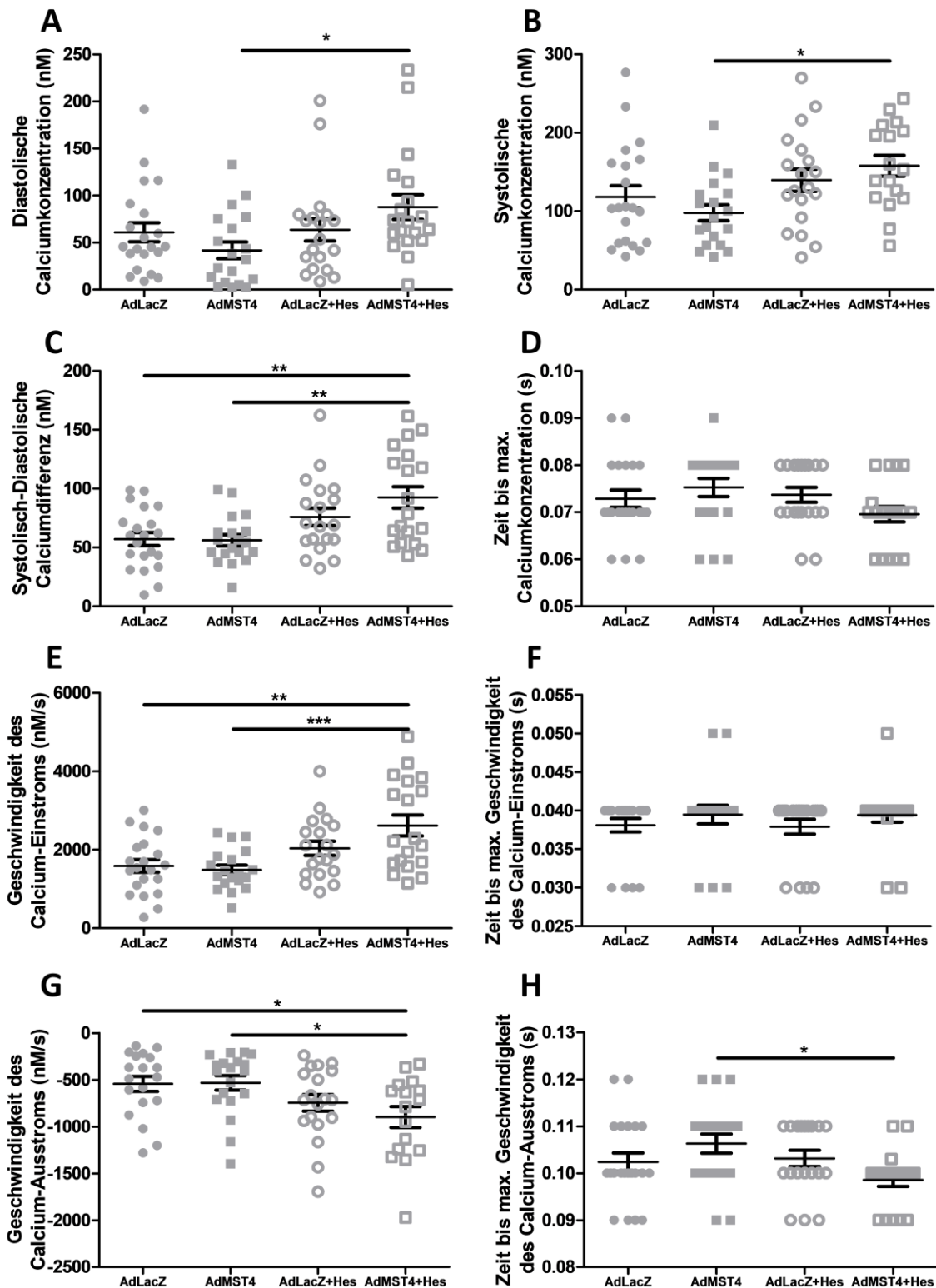


Abbildung 3-23: Die Behandlung von MST4-überexprimierenden Zellen mit Hesperadin führt zu veränderten Calciumströmen und -konzentrationen

Analyse von Calciumströmen mithilfe des IonOptix-Systems in Verbindung mit dem Farbstoff Fura-2AM von isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten, in denen entweder das Kontrollgen LacZ (AdLacZ) oder MST4 (AdMST4) mit 500 moi adenoviral überexprimiert wurde. Zusätzlich wurde entweder 100 nM Hesperadin (+Hes) oder nur dessen Lösungsmittel DMSO hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 2 Hz und einer biphasischen Spannung von 10 V elektrisch stimuliert. Jeder

Datenpunkt stammt von einer vermessenen Zelle, bei der jeweils ca. 20-50 Kontraktionen gemittelt wurden. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils ca. 10-20 Zellen pro Gruppe vermessen.

3.7 Auswirkungen der Überexpression von MST4 und der Hemmung durch Hesperadin auf das Phosphoproteom in NRVCN

MST4 ist eine Kinase, zu der insgesamt sehr wenig bekannt ist und die in Kardiomyozyten bisher noch gar nicht charakterisiert wurde. Nach Gewinnung der in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Erkenntnisse gibt es daher eine Vielzahl an möglichen mechanistischen Erklärungen zur Rolle von MST4. Um diese weiter einzugrenzen und insbesondere Ergebnisse zu möglichen Kinasesubstraten zu generieren, eignet sich die Untersuchung des Phosphoproteoms – also der Gesamtheit an Peptiden, Proteinen und Phosphorylierungsstellen.

3.7.1 Massenspektrometrie und explorative Datenanalyse

Die an die Firma Proteome Sciences, London, übersandten Proteinlysate aus NRVCN wurden dort erneut auf ihre Konzentration und Qualität überprüft. Die festgestellten Proteinkonzentrationen lagen zwischen 1,5 und 2,9 µg/µl. Somit standen 1.078-1.865 µg Protein für die weitere Analyse zur Verfügung. Auch die folgende Gelelektrophorese mit einer geringen Menge aus jeder Probe zeigte sehr homogene Banden, die Indikator für eine gute Probenqualität sind.

Die Proben wurden markiert und mithilfe der Massenspektrometrie analysiert. Es wurden insgesamt 74.721 Peptidsequenzen, 20.973 Phosphopeptide und 4.708 Proteingruppen identifiziert. Davon wurden in allen Gruppen 39.715 Peptidsequenzen, 8.661 Phosphopeptide und 2.753 Proteingruppen identifiziert und konnten für die Quantifizierung herangezogen werden.

Die Qualität der Rohdaten wurde anhand der Standardabweichungen, Interquartilabstände, Anteile an fehlenden Peptid-Werten sowie der Korrelation innerhalb der jeweiligen Replikate beurteilt. Dabei konnte eine hohe Qualität der Rohdaten festgestellt werden und keine Probe musste als Ausreißer von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden.

Die explorative Datenanalyse mithilfe der Hauptkomponentenanalyse wurde auf allen drei betrachteten Ebenen – Peptide, Phosphopeptide und Proteine – durchgeführt. Dadurch konnten Effekte des Messverfahrens korrigiert werden. Anschließend konnte festgestellt werden, dass die Varianz innerhalb der Replikate der einzelnen Versuchsgruppen sehr gering ist. Eine erneute Hauptkomponentenanalyse zeigte deutliche Cluster der einzelnen Versuchsgruppen auf allen drei betrachteten Ebenen.

Für die statistische Analyse wurden für die verschiedenen Kontraste Grenzen für Signifikanzwerte (p-Werte) und Veränderung (FC-Wert) festgelegt (Tabelle 3-1).

Verglichene Gruppen (Kontrast)		p-Wert			FC-Wert		
		Peptide	Phospho-peptide	Proteine	Peptide	Phospho-peptide	Proteine
1	MST4 48 h vs. LacZ 48 h	< 0,01	< 0,01	< 0,05	> 1,4	> 1,4	> 1,3
2	MST4 72 h vs. LacZ 72 h	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 1,8	> 1,7	> 1,3
3	MST4 + Hes 72 h vs. LacZ 72 h	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 1,8	> 1,7	> 1,3
4	MST4 + Hes 72 h vs. MST4 72 h	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 1,8	> 1,7	> 1,3
5	(MST4 48 h vs. LacZ 48 h) vs. (MST4 72 h vs. LacZ 72 h)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 1,8	> 1,7	> 1,3
6	Unbehandelt 72 h vs. LacZ 72 h	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 1,8	> 1,7	> 1,3

Tabelle 3-1: Definierte Kontraste sowie Grenzwerte von p-Wert und FC-Wert für die explorative Datenanalyse

Anhand der signifikant regulierten Peptide, Phosphopeptide und Proteine wurden Cluster-Heatmaps erstellt, die sehr gut die einzelnen Versuchsgruppen gegeneinander abgrenzen und die Replikate zusammen gruppieren (Abbildung 3-24). Auf allen drei Ebenen kann gesehen werden, dass die Zusammensetzung der Regulation beinahe gegenteilig ist zwischen der Gruppe „MST4 72 h“ und „MST4 + Hes 72 h“. Das spricht für die Annahme, dass die Überexpression von MST4 und die Inhibition der Kinase gegenteilige Effekte haben. Weiterhin werden die frühe und die späte MST4-Gruppe auf allen drei Ebenen nah beieinander gruppiert. In diesem Cluster befindet sich allerdings außerdem noch die frühe LacZ-Kontrollgruppe. Die Dauer der Kultivierung der NRVCN scheint einen großen Einfluss auf diese zu haben, wie man an der größeren Distanz der beiden LacZ-Kontrollgruppen zueinander sieht. Der Effekt ist deutlich größer als die reine Virusinfektion, da die nach 72 h geerntete LacZ-Gruppe auf allen drei Ebenen stark der komplett unbehandelten Gruppe, die ebenfalls nach 72 h geerntet wurde, ähnelt. Die Gruppe mit Hesperadin ähnelt zwar diesen beiden Kontrollgruppen mehr als den MST4-Gruppen. Allerdings sind die Unterschiede dennoch relativ groß, was dafür spricht, dass die eingesetzte Konzentration des Inhibitors nicht exakt den Effekt der gleichzeitigen MST4-Überexpression ausgleicht, sondern noch weitere Effekte darüber hinaus hat. Diese beziehen sich entweder auf das endogene MST4, das in den Kontrollgruppen unbeeinflusst ist, oder auch auf andere Kinasen.

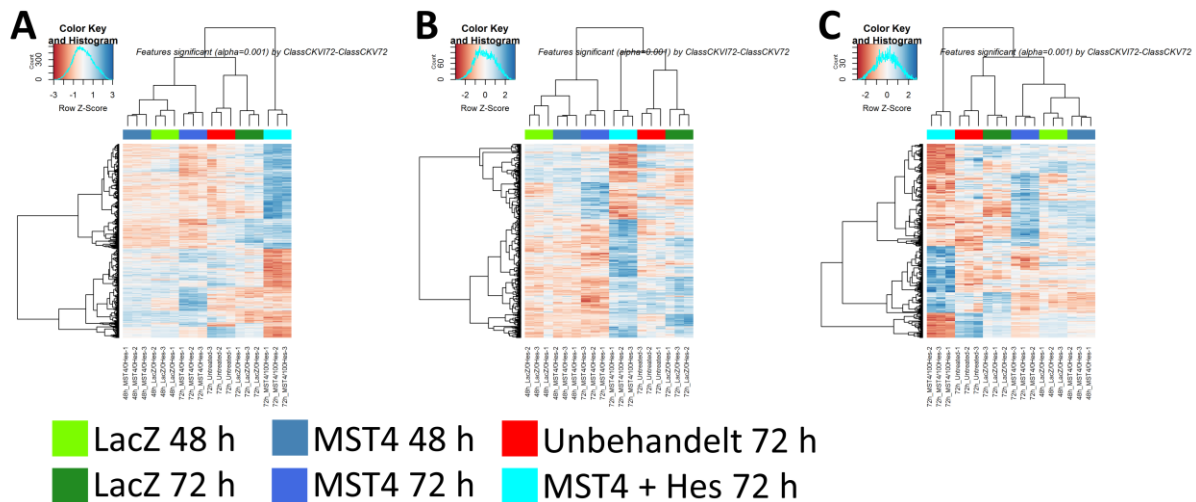


Abbildung 3-24 Cluster-Heatmaps anhand der signifikant regulierten Peptide (A), Phosphopeptide (B) und Proteine (C)

Die Cluster-Heatmaps auf der Basis der im Kontrast 4 (MST4 + Hes 72 h vs. MST4 72 h) signifikant regulierten Peptide, Phosphopeptide und Proteine zeigen sehr gut den Effekt der Behandlung der jeweiligen Versuchsgruppen. Die Replikate gruppieren jeweils dicht zusammen. Außerdem werden die Effekte der Dauer der Kultivierung der NRVCN, der Überexpression von MST4 und des Inhibitors Hesperadin sichtbar.

3.7.2 Funktionelle Analyse

Mithilfe eines biostatistischen Tools zur funktionellen Analyse der Firma Proteome Sciences, London, wurden die generierten Daten weiter untersucht. Dazu wurde die Datenbank Gene Ontology genutzt. Es wurden biologische Prozesse (GO_BP), zelluläre Komponenten (GO_CC), molekulare Funktionen (GO_MF), Signalwege und Kinasesubstrate untersucht. In jeder dieser Gruppen gibt es Untergruppen, in denen hinterlegt ist, welche Gene bzw. Genprodukte jeweils eine Rolle spielen (Annotations). Beispielsweise gibt es in der Gruppe der biologischen Prozesse die Untergruppe „cardiac muscle contraction“, der insgesamt 132 Gene zugeordnet sind. Dazu gehören z.B. ADRA1A (adrenergic receptor, alpha 1a), MYH7 (myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta), RYR2 (ryanodine receptor 2, cardiac) und TNNT2 (troponin T2, cardiac). Finden sich in einem der Kontraste signifikant mehr regulierte Elemente (entsprechend der oben definierten Grenzen für p-Wert und FC-Wert), wird die jeweilige Untergruppe als signifikant reguliert ausgegeben. Dazu wird die Gesamtheit aller nicht-regulierten Elemente als Hintergrund zur Signifikanzbestimmung genutzt.

Es wurden also anhand der sechs Kontraste, der drei Ebenen (Peptide, Phosphopeptide, Proteine) und der fünf GO-Gruppen 90 Analysen durchgeführt, in denen eine Vielzahl an regulierten Untergruppen identifiziert wurden. Grundsätzlich sind Proteinsynthese-assoziierte Untergruppen in allen Kontrasten und auf allen Ebenen häufig reguliert. Die Aufzählung aller Ergebnisse würde den Umfang dieser Arbeit sprengen und daher werden im Folgenden einige ausgewählte Untergruppen aufgeführt. Tabellen mit bis zu 20 der am stärksten veränderten Untergruppen pro Analyse sind im Anhang unter 13.1 zu finden.

3.7.2.1 Kontrast 1: MST4 48 h vs. LacZ 48 h

In diesem Kontrast lassen sich frühe MST4-Effekte beobachten. Auf allen Ebenen stechen besonders Untergruppen heraus, die etwas mit dem Zytoskelett und der Plasmamembran zu tun haben. Weiterhin sind Untergruppen reguliert, die mit der Zell-Zell-Interaktion in Zusammenhang stehen. Das dritte größere Cluster, das auffällt, sind Untergruppen die mit Kinaseaktivität verbunden werden können. Außerdem finden sich viele Untergruppen, die im Kontext der Proteinsynthese reguliert sind (siehe Anhang 13.1.1).

	Peptide	Phosphopeptide	Proteine
Zytoskelett/ Membran	Microtubule, cytoskeleton organization, cardiac muscle contraction, regulation of cell shape, Z disc, actin filament, cytoskeleton, sarcolemma, myofibril, stress fiber, actin filament binding, microtubule binding, structural constituent of cytoskeleton, laminin binding, muscle contraction, striated muscle contraction, cellular response to stress	Z disc, actin cytoskeleton, sarcoplasmic reticulum, actin filament, myofibril, intermediate filament, plasma membrane, actin binding, actin filament binding	muscle contraction, cytoskeleton organization, actin filament organization, regulation of cell shape, actin filament, muscle myosin complex, actin filament binding, myosin binding
Zell-Zell- Interaktion	cell-cell adherens junction, intercalated disc, gap junction assembly, gap junction trafficking	cell junction, intercalated disc, adherens junction, focal adhesion, bicellular tight junction	cell adhesion, adherens junction, cell-cell junction, c-src mediated regulation of Cx43 function and closure of gap junctions, regulation of gap junction activity
Kinase	protein serine/threonine kinase activity, protein C kinase binding, protein kinase binding, ATP binding	Protein phosphorylation, protein serine/threonine kinase activity, protein kinase C binding, CDC2	protein phosphorylation,

Tabelle 3-2: Ausgewählte regulierte Untergruppen Kontrast 1

3.7.2.2 Kontrast 2: MST4 72 h vs. LacZ 72 h

Nach 72 Stunden in Zellkultur finden sich erheblich weniger signifikant regulierte Untergruppen wenn man die LacZ-Kontrollgruppe mit der MST4-Gruppe vergleicht. Auf Peptid-Ebene spielen erneut das Zytoskelett und die Plasmamembran eine besondere Rolle.

Auf Phospho-Ebene zeigen sich ebenfalls Regulationen im Zytoskelett. Bei den molekularen Funktionen gibt es zwar nur eine signifikant regulierte Untergruppe, diese ist jedoch im kardialen Kontext besonders spannend: „ion channel binding“. Gleiches gilt für die einzige signifikant regulierte Untergruppe in der Gruppe der Kinasesubstrate: „PKC“.

Auf Protein-Ebene ist neben den in der Tabelle gezeigten Untergruppen „apoptotic process“ vor dem Hintergrund der in den Abschnitten 3.6.3 und 3.6.4 beschriebenen Daten besonders spannend.

	Peptide	Phosphopeptide	Proteine
Zytoskelett/ Membran	Regulation of cell shape, integral component of membrane, actin filament, stress fiber, microtubule, Z disc, integral component of plasma membrane, cytoskeletal protein binding	Z disc, stress fiber, actin cytoskeleton, ion channel binding	Actin filament bundle assembly, T-tubule, A band, integrin cell surface interactions,
Zell-Zell- Interaktion	focal adhesion,		cell junction organization,
Kinase		PKC	

Tabelle 3-3: Ausgewählte regulierte Untergruppen Kontrast 2

3.7.2.3 Kontrast 3: MST4 + Hes 72 h vs. LacZ 72 h

In diesem Vergleich finden sich insgesamt sehr wenig regulierte Untergruppen, was für eine Aufhebung des Effektes der MST4-Überexpression durch den Inhibitor Hesperadin spricht. Auf Peptid- und Protein-Ebene fallen hauptsächlich Proteinsynthese-assoziierte Untergruppen auf. Aber auch einige Zytoskelett-assoziierte Gruppen sind signifikant reguliert, wie „actin filament“, „focal adhesion“ und „microtubule“, „myofibril“, „actin filament binding“.

Auf Phosphopeptid-Ebene gibt es überhaupt keine signifikant regulierten Gruppen, was sehr für eine Aufhebung der Kinase-Effekte durch Hesperadin spricht.

3.7.2.4 Kontrast 4: MST4 + Hes 72 h vs. MST4 72 h

Dieser Kontrast zeigt mögliche MST4-Effekte im Vergleich zur Hemmung der MST4-Aktivität durch Hesperadin. Hier findet sich eine Vielzahl an regulierten Untergruppen. Erwähnenswert ist, dass PKC nicht unter den regulierten Untergruppen auftaucht.

	Peptide	Phosphopeptide	Proteine
Zytoskelett/ Membran	Integral component of membrane, actin filament, microtubule, protein binding, actin filament binding, ATPase activity coupled to transmembrane movement of substances, Muscle contraction, Cellular responses to stress	Z disc, actin filament binding,	Cardiac muscle contraction, cellular response to mechanical stimulus, actin cytoskeleton, caveola, integral component of membrane, A band, actin filament, anchored component of membrane, actin filament binding,
Zell-Zell- Interaktion	bicellular tight junction, focal adhesion,		
Kinase	protein kinase binding		

Tabelle 3-4: Ausgewählte regulierte Untergruppen Kontrast 4

3.7.2.5 Kontrast 5: (MST4 48 h vs. LacZ 48 h) vs. (MST4 72 h vs. LacZ 72 h)

In diesem Kontrast werden möglicherweise Effekte der MST4-Überexpression im Zeitverlauf sichtbar. Allerdings muss bedacht werden, dass sich primäre Kardiomyozyten in Kultur stark verändern (Ravi et al., 2021), sodass möglicherweise diese Veränderungen MST4-Effekte überlagern bzw. hinzukommen. Zu diesen gehören u.a. Proteinsynthese-assoziierte Untergruppen. Außerdem ist auf Protein-Ebene „apoptotic process“ reguliert.

	Peptide	Phosphopeptide	Proteine
Zytoskelett/ Membran	Microtubule cytoskeleton organization, caveola, microtubule, Z disc, stress fiber, actin filament, cytoskeleton, sarcolemma, extracellular response, integral component of plasma membrane, integrin binding, protein binding, actin filament binding,		sarcolemma, caveola, integral component of membrane, intermediate filament, sodium-potassium-exchanging ATPase complex, Z disc
Zell-Zell- Interaktion	intercalated disc, cell-cell adherens junction, focal adhesion, Gap junction trafficking and regulation	cell-cell adherens junction, intercalated disc	cell adhesion
Kinase		PKC	

Tabelle 3-5: Ausgewählte regulierte Untergruppen Kontrast 5

3.7.2.6 Kontrast 6: Unbehandelt 72 h vs. LacZ 72 h

Die komplett unbehandelten Zellen wurden in diesem Versuch – anders als in den meisten anderen Versuchen – mit untersucht, weil dadurch in der Datenanalyse die reinen Effekte der Behandlung mit einem Adenovirus besser „herausgefiltert“ werden konnten. Dieser letzte Kontrast ist daher im zwar MST4-Kontext uninteressant, zeigt jedoch noch einmal die Relevanz einer Negativkontrolle mit Adenovirus. Es kommt nämlich bereits durch die Virusinfektion zu einer starken zellulären Reaktion, die in der Regulation einer Vielzahl von Untergruppen mündet. Diese Regulationen können unter 13.1.6 eingesehen werden, sollen aber an dieser Stelle nicht weiter vertieft werden.

3.7.3 Mögliche Kinasesubstrate von MST4

Es gibt bisher noch keine publizierten Untersuchungen zu MST4 im kardialen Kontext, daher gibt es auch noch keine Erkenntnisse zu möglichen Kinasesubstraten von MST4 in Kardiomyozyten, die in diesem Versuch überprüft werden konnten.

Die Kinase MST4 selbst besitzt einige Aminosäuren, die phosphoryliert werden können. Bei einigen ist auch eine Autophosphorylierung beschrieben. Die Gesamtphosphorylierung von MST4 nahm durch deren Überexpression zu und durch den Inhibitor Hesperadin deutlich ab. Allerdings galt dies nicht für Threonin an Position 178 (T178), das in zwei Peptiden identifiziert werden konnte: Nach 48 h war diese Position in der MST4-Gruppe etwa 4,14- bzw. 13,74-fach stärker phosphoryliert im Vergleich zur LacZ-

Gruppe (Kontrast 1). Diese vermehrte Phosphorylierung blieb im Zeitverlauf einigermaßen stabil. Nach 72 h war T178 3,1- bzw. 8,1-fach stärker phosphoryliert (Kontrast 2). Im Zeitverlauf handelt es sich um keine statistisch signifikante Veränderung (Kontrast 5). In Anwesenheit des Inhibitors Hesperadin war diese Position jedoch in einem der beiden Peptide statistisch signifikant vermehrt phosphoryliert, sowohl im Vergleich zur LacZ-Gruppe (3,03-fach, Kontrast 3) als auch im Vergleich zur MST4-Gruppe (1,43-fach, Kontrast 4). Weitere in Kontrast 2 signifikant regulierte Phosphorylierungsstellen von MST4 sind in folgender Tabelle aufgeführt (der Übersichtlichkeit halber ist außer bei T178 nur das in Kontrast 2 jeweils am stärksten regulierte Peptid gezeigt):

Protein	Phosphorylierung	Log ₂ (FC) der Kontraste		
		1	2	4
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S304;S309	4,51	6,02	-0,40
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S300;S304	3,42	4,94	-0,35
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	<u>S246</u>	3,02	4,32	-0,78
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S304	2,28	3,90	-0,36
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S300;S304;S306	3,49	3,77	-0,54
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 3 4	<u>S34</u>	2,53	3,36	-1,29
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S300;S304;S309	2,01	3,18	-0,47
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	T178	3,78	3,01	0,57
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 3 4	<u>S282</u>	2,26	2,89	-0,89
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S300	2,33	2,66	-0,23
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S309	1,75	2,51	-0,18
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S304;S306;S309	2,27	2,50	-0,34
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	<u>S260</u>	1,77	2,44	-0,71
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	S300;S309	1,75	2,23	-0,18
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 3 4	<u>T172</u>	2,03	2,02	0,33
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	T178	2,05	1,63	0,65

Tabelle 3-6: Identifizierte Phosphorylierungsstellen von MST4

Fünf der hier aufgeführten Phosphorylierungsstellen sind bisher in der Datenbank UniProt nicht bekannt. Diese Positionen sind in der Tabelle unterstrichen. Lediglich für T178 (fett markiert) existieren Beschreibungen der funktionellen Bedeutung, die über die reine Identifizierung in Phosphoproteomics-Untersuchungen hinausgehen. Die Phosphorylierungsstellen S300, S3004, S306 und S309 sind so dicht zusammen, dass sie in verschiedenen Peptiden gemeinsam identifiziert wurden und daher in dieser Tabelle mehrfach genannt werden.

Um mögliche Kinasesubstrate zu identifizieren, wurden die Ergebnisse der Peptide nach folgenden Kriterien gefiltert: Die Peptide waren nach 48 h vermehrt phosphoryliert (Kontrast 1). Diese vermehrte Phosphorylierung war auch statistisch signifikant ($p < 0,01$) nach 72 h zu finden (Kontrast 2). Nach Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin war diese Phosphorylierungsstelle statistisch signifikant ($p < 0,01$) weniger phosphoryliert (Kontrast 4). Von den knapp 170 Peptiden, auf die diese Kriterien

zutrafen, sind die 50 Peptide in folgender Tabelle aufgeführt, die nach 72 h am stärksten signifikant vermehrt phosphoryliert waren:

Protein	Phosphorylierung	Log ₂ (FC) der Kontraste		
		1	2	4
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 3 4	<u>S34</u>	2,53	3,36	-1,29
Actin filament-associated protein 1-like 1	<u>S384</u>	2,51	2,97	-0,98
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	<u>S260</u>	1,77	2,44	-0,71
Mitochondrial fission 1 protein	<u>S29</u>	1,28	2,04	-0,73
Actin-binding Rho-activating protein	<u>S77</u>	0,15	1,39	-0,53
EH domain-containing protein 2	S468	0,86	1,30	-0,67
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	S263	0,83	1,27	-1,13
Low density lipoprotein receptor adapter protein 1	S14	0,36	1,23	-0,78
Eukaryotic translation initiation factor 5	<u>T178</u>	0,46	1,20	-0,41
WAS/WASL-interacting protein family member 3	<u>S348?;S350?</u>	0,04	1,17	-0,91
Prostaglandin E synthase 3	S85	0,65	1,17	-0,82
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	S53	0,77	1,15	-0,32
Palladin (Fragment)	S170	0,52	1,06	-1,46
Band 4.1-like protein 1	S639	0,35	1,05	-0,71
Desmin	S68	0,92	1,03	-0,56
Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	S209	0,60	1,01	-0,42
Band 4.1-like protein 1	S684?;T685?	0,37	1,00	-0,70
Phospholemman	S82?;S83?	0,27	0,97	-1,00
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	<u>S159</u>	0,88	0,97	-0,48
Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	S612	0,29	0,93	-0,99
Roundabout homolog 1	S1055	0,38	0,93	-0,75
ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3	<u>S312</u>	1,05	0,92	-0,38
Actin filament-associated protein 1-like 1	S328	0,06	0,88	-0,56
Gap junction alpha-1 protein	S262	0,02	0,88	-0,36
Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	S332	0,31	0,88	-0,32
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2	<u>S510</u>	0,34	0,85	-0,64
Elongation factor 2	T57	0,05	0,85	-0,72
Connector enhancer of kinase suppressor of ras 2	<u>S325</u>	0,26	0,85	-0,57
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial	S695	0,00	0,83	-0,62
UBX domain-containing protein 1	S200	0,12	0,82	-0,46
Rho GTPase-activating protein 7	S86;S89	0,29	0,81	-0,63
cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4A	S152	0,13	0,78	-0,75
A-kinase anchor protein 6	<u>S744?;S745?</u>	0,07	0,76	-0,67
Band 4.1-like protein 1	<u>S441?;S443?</u>	0,39	0,75	-0,54
Plectin	S4409	0,52	0,74	-0,83
Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	S655	0,15	0,73	-0,77
Proenkephalin-A	S251	0,46	0,72	-1,24
Band 4.1-like protein 1	S648	0,26	0,72	-0,45
Actin filament-associated protein 1-like 1	S97	0,23	0,70	-0,68
Muscarinic acetylcholine receptor M2	S232	0,11	0,69	-0,42

Protein	Phosphorylierung	Log ₂ (FC) der Kontraste		
		1	2	4
PDZ domain-containing protein 2	S1902	0,14	0,69	-0,75
Caveolae-associated protein 2	S287	0,04	0,69	-0,61
Serine/arginine-rich splicing factor 2	T25	0,16	0,68	-0,61
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	S234	0,40	0,68	-0,50
Junction plakoglobin	S665; <u>S671</u>	0,28	0,68	-0,50
E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	<u>S362</u>	0,62	0,68	-1,08
Band 4.1-like protein 1	S546	0,32	0,66	-0,43
Caveolae-associated protein 2	S202?;S203?	0,52	0,66	-0,62
Roundabout homolog 1	S940	0,41	0,65	-0,56
Sodium/hydrogen exchanger 1	S697	0,03	0,65	-0,78

Tabelle 3-7: Ausgewählte mögliche Kinasesubstrate von MST4

Fünfzehn der hier aufgeführten Phosphorylierungsstellen sind bisher in der Datenbank UniProt nicht bekannt. Diese Positionen sind in der Tabelle unterstrichen. Lediglich für vier Phosphorylierungsstellen existieren Veröffentlichungen zu funktionellen Bedeutungen, die über die reine Identifizierung in Phosphoproteomics-Untersuchungen hinausgehen. Diese sind in der Tabelle fett markiert. Besitzt ein Protein zwei phosphorylierbare Aminosäuren sehr nah beieinander, konnte aus technischen Gründen nicht immer festgestellt werden, welche Aminosäure ggf. tatsächlich phosphoryliert war. In diesem Fall ist diese Phosphorylierungsstelle mit einem Fragezeichen markiert. Einige Proteine tauchen unter diesen Top-50 mit mehreren Phosphorylierungsstellen auf: Band 4.1-like protein 1 (fünfmal), Actin filament-associated protein 1-like 1 (dreimal), MST4 (zweimal, wobei ein Peptid auch aus MST3 stammen könnte), Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein (zweimal), Roundabout homolog 1 (zweimal), Caveolae-associated protein 2 (zweimal).

Außerdem wurden die Ergebnisse direkt nach bereits bekannten Kinasesubstraten von MST4 durchsucht:

Protein	Phosphorylierung	Log ₂ (FC) der Kontraste		
		1	2	4
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14C	T72	1,71	1,97	-0,49 (ns)
Ezrin	S535	-0,20 (ns)	0,20 (ns)	-0,12 (ns)
Moesin	T526	-0,01 (ns)	-0,22 (ns)	-0,01 (ns)
Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	S729	-0,01 (ns)	-0,20 (ns)	-0,35
Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	S851;S855	-0,08 (ns)	-0,18 (ns)	-0,17 (ns)

Tabelle 3-8: Bekannte Kinasesubstrate von MST4 in der Untersuchung des Phosphoproteoms

Neben der in Tabelle 3-7 beschriebenen Autophosphorylierung ließ sich noch die Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14C (PPP1R14C) als vermehrt phosphoryliertes Substrat finden. Die Behandlung mit Hesperadin führt zwar zu einer verminderten Phosphorylierung, die jedoch nicht

statistisch signifikant ist (ns). Aus der Familie der Ezrin/Radixin/Moesin Proteine (ERM) ließ sich zwar zwei Phosphorylierungsstellen detektieren, jedoch keine statistisch signifikanten Veränderungen. ASAP1, das strukturell mit dem beschriebenen Kinasesubstrat ASAP3 verwandt ist, ist ebenfalls nicht statistisch signifikant reguliert. Phosphorylierungsstellen bei ASAP3 selbst sowie Radixin, ERK, TRAF6 und ATG4B wurden in der Untersuchung des Phosphoproteoms nicht gefunden.

3.7.4 Am stärksten regulierte Proteine

Neben dem Überblick über die Veränderungen des Phosphoproteoms, den funktionellen Analysen und der Identifizierung möglicher Kinasesubstrate wurden auch einige einzelne Proteine betrachtet, die durch die Überexpression von MST4 in Kardiomyozyten direkt oder indirekt reguliert wurden. Dazu wurde die Gesamtheit der identifizierten Proteine gefiltert nach den Proteinen, die durch die Überexpression von MST4 sowohl nach 48 h (Kontrast 1) als auch nach 72 h (Kontrast 2) in die gleiche Richtung reguliert waren. D.h. wenn nach 48 h eine vermehrte Expression zu beobachten war, musste dieses Protein auch nach 72 h vermehrt exprimiert werden. Nach 72 h musste diese Regulation statistisch signifikant ($p < 0,01$) sein. Um auch Kinase-unabhängige Effekte nicht zu verpassen, wurde die Hesperadin-Gruppe (Kontrast 4) nicht in das Auswahlverfahren mit einbezogen. Folgende Tabellen zeigen die 25 am stärksten vermehrt und die 25 am stärksten vermindert exprimierten Proteine.

Vermehrt exprimierte Proteine	Log ₂ (FC) der Kontraste	
	1	2
Mammalian Ste20-Like Protein Kinase 4	1,92	2,57
Regenerating islet-derived protein 3-beta	1,14	1,72
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	0,29	1,13
Metallothionein-2	0,48	1,09
Cystatin-C	0,32	0,87
Inositol-3-phosphate synthase 1	0,09	0,85
Creatine kinase S-type, mitochondrial	0,15	0,78
Interleukin-6 receptor subunit beta	0,51	0,76
Histone H2A type 1-C	0,05	0,68
Ral GTPase-activating protein subunit beta	0,48	0,67
Stanniocalcin-1	0,28	0,65
Atypical kinase COQ8A, mitochondrial	0,10	0,64
Excitatory amino acid transporter 1	0,15	0,62
RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain	0,59	0,61
Transmembrane protein 106B	0,08	0,59
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	0,05	0,58
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4	0,04	0,58
Mothers against decapentaplegic homolog 3	0,11	0,56
Frizzled-1	0,07	0,56
Pirin	0,18	0,55
Laminin subunit beta-2	0,18	0,55
Galectin-3-binding protein	0,29	0,54

Vermehrt exprimierte Proteine	Log ₂ (FC) der Kontraste	
	1	2
Beta-2-microglobulin	0,45	0,54
2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein 1	0,85	0,54
Ketimine reductase mu-crystallin	0,31	0,53

Tabelle 3-9: Auswahl von durch MST4-Überexpression vermehrt exprimierten Proteinen

Vermindert exprimierte Proteine	Log ₂ (FC) der Kontraste	
	1	2
Xin actin-binding repeat-containing protein 2	-0,47	-2,10
Calmodulin regulator protein PCP4	-0,03	-1,18
Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	-0,15	-0,98
Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	-0,97	-0,97
Low-density lipoprotein receptor	-0,18	-0,96
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	-0,07	-0,94
Calponin-1	-0,04	-0,93
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	-0,11	-0,91
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	-0,23	-0,86
Connective tissue growth factor	-0,25	-0,81
Rho GTPase-activating protein 24	-0,41	-0,81
Microtubule-associated protein 1B	-0,20	-0,78
Leiomodin-2	-0,24	-0,78
Farnesyl pyrophosphate synthase	-0,04	-0,77
Transmembrane 9 superfamily member 1	-0,18	-0,77
Cell surface glycoprotein MUC18	-0,22	-0,75
Filamin-A-interacting protein 1	-0,26	-0,73
CD44 antigen	-0,23	-0,72
Collagen alpha-1(XI) chain	-0,19	-0,71
Astrocytic phosphoprotein PEA-15	-0,10	-0,69
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCA-MC-2	-0,17	-0,68
PDZ and LIM domain protein 3	-0,09	-0,67
Transgelin	-0,18	-0,65
Retinol-binding protein 1	-0,08	-0,65
Natriuretic peptides A	-0,13	-0,64

Tabelle 3-10: Auswahl von durch MST4-Überexpression vermindert exprimierten Proteinen

4 Diskussion

Weltweit gehören kardiovaskuläre Erkrankungen zu den wichtigsten Gründen für Todesfälle und Verlust von Lebensqualität (Roser & Ritchie, 2016). Eine Herzinsuffizienz ist in Deutschland die häufigste Ursache für eine Krankenhauseinweisung und oft in ihrer Prognose mit malignen onkologischen Erkrankungen vergleichbar. Während die Forschung der letzten Jahre zu deutlichen Verbesserungen im Verständnis und der Therapie der Erkrankung geführt hat, steigt die Hospitalisationsrate in der Bevölkerung, u.a. aufgrund des demographischen Wandels (Birner et al., 2021). Trotz dieser enormen Belastung für Patientinnen und Patienten sowie die Gesellschaft insgesamt, ist das Verständnis der Herzinsuffizienz, insbesondere auf molekularer Ebene, noch immer sehr begrenzt. Das führt dazu, dass mit den vorhandenen Therapieoptionen sehr spät und undifferenziert in die Pathophysiologie eingegriffen wird.

In vielen Fällen kommt es bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz zu Hypertrophie der Kardiomyozyten. Gleichzeitig ist das Vorhandensein von Hypertrophie mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Eine Reihe von komplexen Signalwegen wurde im Zusammenhang mit der Entstehung der Hypertrophie identifiziert. Dabei handelt es sich meist um Anpassungsprozesse als Reaktion auf vermehrten biomechanischen Stress am Herzen, die außer Kontrolle geraten und die Funktion der Kardiomyozyten beeinträchtigen.

Die Arbeitsgruppe von Norbert Frey und Matthias Eden konnte zeigen, dass das Protein STRIP2 eine Rolle in diesem Kontext spielt. In Kardiomyozyten interagiert STRIP2 direkt mit dem Calciumkanal vom L-Typ und beeinflusst Calciumströme sowie die kardiale Kontraktilität positiv (Eden et al., 2016). STRIP2 ist Teil von sogenannten Striatin interagierenden Phosphatase und Kinase Komplexen (STRIPAK-Komplexe), die in den letzten Jahren mit mehr und mehr zellulären Prozessen in Verbindung gebracht werden. Diese Komplexe können u.a. über die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) sowie verschiedene Kinasen die Phosphorylierung verschiedener Proteine regulieren und so an der Integration von Signalwegen mitwirken (Huang et al., 2021; Hwang & Pallas, 2014; Shi et al., 2016). Eine dieser Kinasen heißt Mammalian STE20-like Kinase 4 (MST4), die insbesondere in onkologischen Zusammenhängen untersucht ist und beispielsweise im Kontext der Apoptose, dem Hippo-Signalweg oder dem Zytoskelett diskutiert wird (Chen et al., 2020; Xiong et al., 2016). Die vorliegende Dissertation beschreibt die ersten Untersuchungen von MST4 am Herzen, deren Ergebnisse im Folgenden vor dem Hintergrund der existierenden Literatur diskutiert werden sollen.

4.1 MST4 ist eine kardiale STRIPAK-Kinase mit unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen

4.1.1 MST4 wird im Herzen exprimiert

Es konnte gezeigt werden, dass MST4 sowohl in humanen als auch in Herzen von Mäusen und Ratten exprimiert wird (Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). Das widerspricht einem Halbsatz in der Publikation von Zhang und Kollegen aus der renommierten Zeitschrift „Circulation“. Die Autoren untersuchen Hesperadin als Inhibitor der Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II δ (CaMKII- δ) im kardialen Kontext. Als Argument für die CaMKII- δ -spezifischen Effekte von Hesperadin wird angeführt, dass MST4 im Herzen kaum vorkomme und daher dort kein Ziel von Hesperadin sein könne. Versuche in dieser Hinsicht sind allerdings nicht Teil der Publikation (Zhang et al., 2022). Tatsächlich führt der in der Arbeit zitierte „Human Protein Atlas“ bei MST4 auf, dieses sei am Herzen nicht detektiert. Diese Aussage beruht allerdings auf immunhistochemischer Anfärbung mit einem einzigen Antikörper, der auch bisher in keiner anderen Publikation angegeben wurde. MST4-mRNA wurde hingegen im Herzen detektiert (Fagerberg et al., 2014; Uhlén et al., 2015). Möglicherweise handelt es sich bei der fehlenden Protein-Detektion also um eine technische Ursache. Dafür spricht auch die Detektion von MST4 im Herzen im Rahmen der Erstellung der „Human Heart Map“. Diese Untersuchung basiert auf massenspektrometrischen Methoden und ist daher deutlich sensitiver als die Immunhistochemie (Doll et al., 2017). Auch in der Datenbank „Cardiacproteomics“, die ebenfalls auf der Analyse des gesamten Proteoms basiert, konnte MST4 detektiert werden (Linscheid et al., 2021).

Insgesamt ist MST4 sicherlich weniger stark exprimiert als z.B. Proteine des kontraktilen Apparates. Dies würde man bei einer Kinase auch nicht erwarten, da ihre Wirkung über die katalytische Aktivität zustande kommt. Die vorliegende Arbeit beschreibt die ersten Untersuchungen zu MST4 am Herzen. Daher fehlt es in dieser Hinsicht an weiterer Literatur. Hier konnte aber endogenes MST4 in diversen Modellen, Spezies und mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Die Publikation von Zhang und Kollegen muss aber selbstverständlich bei der Betrachtung von Effekten des Inhibitors Hesperadin berücksichtigt werden.

4.1.2 Verschiedene subzelluläre Lokalisationen von MST4 in Kardiomyozyten

Erkenntnisse zur subzellulären Lokalisation von MST4 in Kardiomyozyten existierten bisher ebenfalls nicht. In anderen Zellen sind unterschiedliche Orte für MST4 beschrieben: In HeLa-Zellen ist MST4 mit PDCD10 im Zytoplasma lokalisiert, aber auch am Golgi-Apparat – mit GM130 – zu finden (Ma et al., 2007; Mardakheh et al., 2016; Preisinger et al., 2004). Abbildung 3-3 zeigt zwei unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen von MST4 in Kardiomyozyten. In isolierten Kardiomyozyten von Ratten ist das Verteilungsmuster eher longitudinal mit einer besonderen Anreicherung zwischen den beiden Kernen. Das entspricht z.B. dem Verteilungsmuster von Mitochondrien in Kardiomyozyten, die

zwischen den longitudinalen Myofilamenten und den transversalen T-Tubuli liegen (Hollander et al., 2014; Lee et al., 2020; Lüllmann-Rauch, 2012). Auch das Muster von Mikrotubuli ist ähnlich (Cheng et al., 2010; Yang et al., 2020). Die perinukleäre Anfärbung würde zwar zum Golgi-Apparat passen. Allerdings sind diese Organellen ansonsten nicht so regelmäßig in der Zelle verteilt, wie MST4 in den vorliegenden Abbildungen dargestellt ist (Yang et al., 2015). Außerdem ist MST4 in den isolierten Kardiomyozyten im Nukleus anfärbbar. Im humanen Herzgewebe hingegen lässt sich MST4 hauptsächlich an den Glanzstreifen anfärben, die die Zell-Zell-Kontakte der Kardiomyozyten ausmachen (Lüllmann-Rauch, 2012; Smyth et al., 2010). Das longitudinale Muster ist ebenfalls erkennbar, jedoch deutlich schwächer. Diese unterschiedlichen Schwerpunkte bei den Lokalisationen deuten auf verschiedene Rollen von MST4 hin. In der funktionellen Analyse des Proteoms (3.7.2) fallen eine Reihe Untergruppen auf, die mit Glanzstreifen, Mikrotubuli aber auch Mitochondrien assoziiert sind.

Glanzstreifen spielen eine wichtige Rolle bei der elektro- und Mechanotransduktion im Herzen. Beispielsweise führt eine Störung von Bestandteilen wie Desmosomen zur arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC), bei der im Verlauf Kardiomyozyten durch Fettgewebe ersetzt werden. Aber auch Herzen mit DCM zeigen veränderte Glanzstreifen (Bennett, 2018).

Zur weiteren Erforschung der subzellulären Lokalisation von MST4 sollte auch tierisches Myokard untersucht werden. Dadurch könnte man herauszufinden, ob Isolationsprozess oder Spezies verantwortlich dafür sind, dass bei den isolierten Kardiomyozyten keine eindeutige Anfärbung der Glanzstreifen erfolgt. Das schwächere longitudinale Muster im humanen Myokard könnte möglicherweise mit dem Zustand der humanen Probe, die in einem klinischen Kontext gewonnen wurde, zusammenhängen. Auch könnte die MST4-Konzentration an den Zell-Zell-Kontakten erheblich größer sein, sodass dies die stärkere Anfärbbarkeit dort erklären könnte. Um die subzelluläre Lokalisation von MST4 weiter einzugrenzen, wären auch Co-Lokalisierungs-Färbungen mit einschlägigen Proteinen sinnvoll.

4.1.3 MST4 als Mitglied von STRIPAK-Komplexen in Kardiomyozyten

Die subzelluläre Lokalisation von MST4 ist auch im STRIPAK-Zusammenhang interessant. MST4 ist in verschiedenen Zellsystemen wiederkehrend als Mitglied von STRIPAK-Komplexen identifiziert (Hwang & Pallas, 2014; Tang et al., 2019). In Abbildung 3-4 konnten direkte Interaktionen zwischen MST4 und den STRIPAK-Proteinen SLMAP und STRIP2 demonstriert werden, die die Existenz von STRIPAK-Komplexen mit MST4 in Kardiomyozyten nahe legt.

Mit einem MST4-ähnlichen, eher longitudinal ausgerichteten Muster, stellt sich SLMAP dar, zumeist mit Membran-Assoziation. Allerdings existieren auch andere subzelluläre Lokalisationen in Kardiomyozyten sowie eine Assoziation mit Proteinen aus verschiedenen zellulären Kompartimenten.

SLMAP scheint bei der Organisation der elektromechanischen Kopplung eine Rolle zu spielen. Ein möglicher Mechanismus wäre die Verbindung zwischen sarkoplasmatischem Retikulum und Myofibrillen sowie am Sarkolemm. Es werden verschiedene SLMAP-Isoformen in Kardiomyozyten exprimiert, die über ihren C-Terminus die subzelluläre Lokalisation zu steuern scheinen. Eine direkte Interaktion mit dem kontraktilen Apparat ist wahrscheinlich über den N-Terminus möglich. (Guzzo et al., 2005). Folgende Proteine sind bereits beschriebene Interaktionspartner von MST4: Myosin als Teil des kontraktilen Apparates; die Proteinen des T-Tubulus Caveolin 3 (CAV3) und spannungsabhängige Calcium-Kanäle vom L-Typ (LTCC); Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums wie die Ca^{2+} -ATPase und der für die Calcium-abhängige Calcium-Ausschüttung verantwortliche Ryanodinrezeptor 2 (RYR2) (Hwang & Pallas, 2014; Nader, 2019). Möglicherweise spielt SLMAP dadurch eine Rolle bei der subzellulären Lokalisation von MST4.

Es gibt auch Anfärbungen der STRIPAK-Phosphatase PP2A in isolierten Kardiomyozyten, die der von MST4 in isolierten Kardiomyozyten ähneln (Cheng et al., 2010). Die Interaktion zwischen der Phosphatase PP2A und der Kinase MST4 ist besonders spannend und sollte weiter untersucht werden. Es ist beschrieben, dass PP2A die Aktivität von MST3, die MST4 sehr ähnlich ist, kontrolliert (Gordon et al., 2011). In der Untersuchung des Phosphoproteoms ist PP2A nicht aufgefallen.

Für STRIP2 hingegen ist in isolierten Kardiomyozyten eher ein transversales Muster beschrieben, das besser zu Z-Scheiben und T-Tubuli passt (Eden et al., 2016). Die Co-Immunpräzipitation von MST4 und STRIP2 in Abbildung 3-4 fand in MST4-überexprimierenden Zellen statt. Wahrscheinlich existieren von STRIPAK-Proteinen verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Lokalisationen und Funktionen in der Zelle. Es wäre denkbar, dass in Kardiomyozyten nur vergleichsweise kleine Subpopulationen von STRIP2 und MST4 in gemeinsamen STRIPAK-Komplexen organisiert sind.

Die Zusammensetzung von STRIPAK ist hoch komplex und von bisher noch kaum verstandenen Signalwegen abhängig. Interaktionen zwischen STRIPAK-Proteinen und mit der Umgebung sollten bei der Untersuchung einzelner STRIPAK-Proteine mitbedacht werden.

4.2 MST4-Expression wird unterschiedlich reguliert

	Veränderung von MST4	Veränderung von pMST4 (T178)
Humane DCM	5,71 ***	
Humane ICM	3,83 *	
MLP-KO	2,49 *	~
CS1-KO	2,49 *	~
CnA-TG	0,55 ***	
TAC	0,39 ***	
Stretch	mRNA: 1,24 *	
Hypoxie	Nach 48 h: 0,47 ***	
Geringe Zelldichte	26.000/cm²: 0,47 **	0,34 ** (bei sehr hoher Dichte)

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Protein-Regulation von MST4 und pMST4 unter den untersuchten Bedingungen

Der Zahlenwert beschreibt die Regulation von MST4 bzw. pMST4 in den gezeigten Versuchen, die Anzahl der Sterne das jeweilige Signifikanzniveau. Farblegende: rot – Heraufregulation, blau – Herabregulation, grau – keine statistisch signifikante Veränderung, weiß – keine Daten.

Wie Tabelle 4-1 zeigt, verändert sich die Expression von MST4 unterschiedlich in Abhängigkeit von den untersuchten Bedingungen. In explantierten Herzen von Patientinnen und Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) – also im absoluten Endstadium der Herzinsuffizienz – findet sich eine Überexpression von MST4 im Myokard (Abbildung 3-2). Diese Überexpression konnte auch in verschiedenen Modellen beobachtet werden: MLP-KO-Mäuse (Abbildung 3-5) entwickeln ebenfalls den Phänotyp einer DCM mit Herzinsuffizienz (Arber et al., 1997). Bei Mäusen, die kein Calsarcin 1 exprimieren (CS1-KO, Abbildung 3-6), ist zwar ohne Nachlasterhöhung keine kardiale Hypertrophie sichtbar, Hypertrophie-assoziierte Signalwege sind aber dennoch bereits aktiv (Frey et al., 2004). Diese Signalwege sind ebenfalls in vitro nach biomechanischer Dehnung aktiv (Frank et al., 2008).

Andererseits kommt es in untersuchten Modellen auch zu einer verminderten Expression von MST4: Transgene Mäuse mit dauerhaft aktiver Calcineurin-Untereinheit entwickeln kardiale Hypertrophie und Dysfunktion (Molkentin et al., 1998). Ebenso war MST4 in Herzen von Mäusen mit Konstriktion der Aorta transversa vermindert exprimiert (Abbildung 3-8). Die operative Nachlasterhöhung führt plötzlich zu einer deutlich vermehrten Wandspannung der Ventrikel und biomechanischem Stress der Kardiomyozyten. Diese reagieren mit pathologischem kardialen Remodeling und Herzinsuffizienz (Böttner et al., 2021).

Es wirkt vordergründig widersprüchlich, dass MST4 in diesen verschiedenen Modellen, die in ähnlichen Kontexten untersucht werden, unterschiedlich reguliert wird. Insbesondere die Herabregulation von

MST4 bei den CnA-TG-Tieren und nach TAC fällt aus dem Rahmen. In den anderen Modellen scheint es auch vor dem Hintergrund der weiteren Ergebnisse plausibel, dass MST4 als protektiver Faktor vermehrt exprimiert wird, um den Anpassungsprozess der Kardiomyozyten zu unterstützen. Man könnte spekulieren, dass bei CnA-TG-Tieren und nach TAC andere Signalwege eine größere Rolle spielen. Vor allem bei der TAC-Prozedur kommt es zu einer plötzlichen Erhöhung des biomechanischen Stresses. Andererseits sollte die Aktivität von MST4 in diesen Modellen noch stärker in den Fokus genommen werden. Bei MLP-KO- und CS1-KO-Tieren kommt es zwar zu einer vermehrten Expression von MST4. Die Aktivität – gemessen an Phosphorylierung von T178 – ist jedoch im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert (Abbildung 3-5 C und Abbildung 3-6 C). Dieses sollte auch in den anderen Tiermodellen und insbesondere in humanen Proben untersucht werden. Interessant wäre beispielsweise der Vergleich von dilatativer (DCM) mit hypertrophischer Kardiomyopathie (HCM).

Insgesamt wäre es auch sinnvoll, eine größere Anzahl von humanen Proben zu untersuchen, um größere Rücksicht auf die hohe interindividuelle Variabilität nehmen zu können. Außerdem könnten dadurch verschiedene Phänotypen, die relativ grob in DCM, ICM etc. eingeteilt werden, differenzierter betrachtet werden. Das könnte auch bei der weiteren Charakterisierung von MST4 dazu beitragen, relevante Signalwege besser zu identifizieren und therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Werden NRVCN Hypoxie ausgesetzt, ist MST4 ebenfalls vermindert exprimiert (Abbildung 3-10). Zwar ist Hypoxie kein klassisches Modell für Herzinsuffizienz. Im Kontext der ischämischen Kardiomyopathie (ICM), die zu einer erhöhten MST4-Expression führt (Abbildung 3-2), sowie im Kontext des akuten Myokardinfarktes, spielt Hypoxie eine wichtige Rolle (Sharma et al., 2021). Außerdem wurde ein protektiver Effekt von MST4 bei Hypoxie in Hypophysentumorzellen, die vermehrt MST4 exprimieren, beschrieben (Xiong et al., 2015). Die beobachtete Herabregulation liefert keinen Hinweis darauf, dass MST4 bei Hypoxie von 1 % Sauerstoff diesen Effekt auch in Kardiomyozyten zeigt. Allerdings hemmt MST4 Apoptose in Normoxie (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-16), sodass diese Facette nicht als abschließend erforscht gelten kann. Es sollten Myokardinfarkt-Proben von Patientinnen und Patienten sowie aus Tiermodellen auf die MST4-Expression und -Aktivität untersucht werden. In-vitro ist möglicherweise der Grad der Hypoxie zu ausgeprägt und auch die kardiale Reperfusion, die bei ICM dank moderner Herzkatheterlabore häufiger stattfindet, wird in diesem Modell nicht abgebildet.

Die MST4-Expression nimmt auch bei geringer Zelldichte ab (Abbildung 3-11). Die üblicherweise ausgesäte NRVCN-Dichte beträgt ca. 78.000-104.000 Zellen/cm². Bei dieser Dichte haben die meisten Zellen Kontakte zu benachbarten Zellen (Abbildung 3-11 G). Wird die Dichte jedoch auf ca. 26.000 Zellen/cm² reduziert, nehmen die interzellulären Kontakte sehr stark ab. Die reduzierte Expression von MST4 auf ca. 47 % und von pMST4 auf ca. 34 % hat wahrscheinlich etwas mit diesen Kontakten zu tun. Im humanen Myokard lässt sich MST4 dort anfärben (Abbildung 3-3) und auch die Analyse des

Phosphoproteoms gibt einige Hinweise auf den Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakten. Möglicherweise spielt dabei auch die Zusammensetzung von STRIPAK-Komplexen eine wichtige Rolle. In anderen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Zelldichte zur Dissoziation von STRIPAK-Komplexen führt (Tang et al., 2019). Dies könnte zum vermehrten Abbau von freiem MST4 führen und dadurch zu einer Reduktion der messbaren Menge und Aktivität.

Vor diesem Hintergrund wäre auch die Untersuchung der oben genannten Tiermodelle auf Fibrose interessant. Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es zum Absterben von Kardiomyozyten und diese werden durch Fibroblasten ersetzt, sodass die verbliebenen Kardiomyozyten weniger Kontakte zu anderen Kardiomyozyten haben. Unterschiedlich stark ausgeprägte Fibrose bei den verschiedenen Tiermodellen wäre möglicherweise ein Erklärungsansatz für die gegensätzliche Regulation von MST4. Zwar zeigen auch MLP-KO-Mäuse (Heineke et al., 2010) und CS1-KO-Mäuse (Rangrez, Hoppe, et al., 2017) vermehrt Fibrose. Dieser Effekt scheint jedoch bei Calcineurin-transgenen Tieren (Molkentin et al., 1998) und nach TAC (Bacmeister et al., 2019) deutlich ausgeprägter zu sein.

Wird die Zelldichte weiter erhöht, nimmt die Menge und Aktivität von MST4 wieder ab. Das liegt wahrscheinlich daran, dass es zu keiner weiteren Erhöhung der Zell-Zell-Kontakte führt sondern eher zu zellulärem Stress, weil sich die Zellen gegenseitig den Platz wegnehmen. In Abbildung 3-11 G ist die erhöhte Menge an Zelldebris gut zu erkennen. Der genaue Mechanismus dahinter bleibt aber noch zu ergründen.

4.3 Biologische Effekte durch MST4 in Kardiomyozyten

Die veränderte Expression und Aktivität von MST4 durch Adenoviren, den Inhibitor Hesperadin und spezifische siRNA führt zu Veränderungen relevanter biologischer Parameter, die in Tabelle 4-2 zusammengefasst sind.

	Apoptose	Viabilität in Hypoxie	TAZ- Expression		Zellgröße	Fetale Gene	Kontrak- tilität	Calcium- Ströme	
MST4-ÜE	-	~	~	+	+	~	+	~	
MST4-KD	(+)		~	-					
Hesperadin		-	+				~	~	(+)

Tabelle 4-2 Zusammenfassung der biologischen Effekte durch adenovirale MST4-Überexpression (MST4-ÜE), MST4-Knockdown mit siRNA (MST4-KD) und Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin
Farblegende: rot – Heraufregulation, blau – Herabregulation, grau – keine statistisch signifikante Veränderung, weiß – keine Daten, geteilte Zelle – Trend in die jeweilige Richtung.

4.3.1 Experimentelle Veränderung der MST4-Expression und Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin

Zur Untersuchung der Funktion eines Proteins ist es sinnvoll, dessen Expression experimentell zu verändern und die Auswirkung auf verschiedene biologische Effekte zu beobachten.

Ein etablierter Mechanismus dazu ist der Einsatz eines humanen Adenovirus 5, in den DNA integriert werden kann, die für das Zielprotein codiert. Hier wurde DNA für MST4 in den Virus integriert, mit dem anschließend NRVCN oder ARVCN infiziert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von MST4 auf diesem Wege sehr stabil funktioniert (Abbildung 3-12 und Abbildung 3-21 A), sodass anschließend biologische Effekte untersucht werden konnten. Auch konnte gezeigt werden, dass das überexprimierte MST4 katalytisch aktiv ist, z.B. anhand der starken Veränderung des Phosphoproteoms (Abbildung 3-24 B) und der vermehrten Phosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle T178 (Abbildung 3-14 F). In Zukunft wäre es sicherlich sinnvoll, noch weitere Kinasesubstrate zur Bestimmung der MST4-Aktivität zu nutzen.

Zur Reduktion der Menge eines Proteins wurde im Rahmen dieser Arbeit sogenannte short/small interfering RNA (siRNA) genutzt. Diese gelangt über Liposomen in die Zellen und lagert sich an eine spezifische mRNA an – in diesem Fall an MST4-mRNA – und verhindert mithilfe des RNA-induced silencing complex (RISC) die Translation. Stattdessen wird die mRNA abgebaut, sodass weniger vom Zielprotein hergestellt wird. Der Grad des Knockdowns ist daher hauptsächlich vom Umsatz des Proteins abhängig, da nicht der Abbau des Proteins gefördert wird. Die zwei verwendeten kommerziell erworbenen siRNA-Konstrukte konnten beide die Proteinmenge von MST4 innerhalb von 4 Tagen stark reduzieren (Abbildung 3-13 A). Allerdings führt das nicht dazu, dass auch die Aktivität von MST4 – gemessen an der Phosphorylierung an T178 – entsprechend abnimmt (Abbildung 3-15 F). Offenbar bestehen also endogene Mechanismen, die dafür sorgen, dass die MST4-Aktivität auch bei Reduktion der Proteinmenge konstant gehalten wird. Der Anteil an T178-phosphoryliertem MST4 steigt also. Es ist unklar, ob MST4 zu vermehrter Autophosphorylierung angeregt wird oder ob andere Kinasen T178 direkt phosphorylieren können. Naheliegend wäre z.B. eine Phosphorylierung durch MST3, das strukturell sehr ähnlich ist und ebenfalls Homodimere bildet (Sugden et al., 2013). Eine direkte Interaktion oder Heterodimere aus MST3 und MST4 sind allerdings in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Möglicherweise spielt auch die Lokalisation eine Rolle, sodass die Regulation durch die siRNA hauptsächlich in einer Subpopulation stattfindet, während andere Subpopulationen konstant bleiben. Die vorhandenen Regulationsmechanismen sind ein starker Hinweis auf die Relevanz von MST4 in der Zelle.

Um die Kinase-Effekte von MST4 weiter aufzuschlüsseln wäre es wichtig, auch die Aktivität reduzieren zu können. Dies könnte zwar mit einer längeren Wirkzeit der siRNA gelingen, ist aber bei NRVCN, die sich mit zunehmender Zeit in Zellkultur stark verändern, eher unpraktisch. Eine Möglichkeit wäre die Überexpression von verändertem MST4, sodass beispielsweise T178 durch eine nicht-phosphorylierbare Aminosäure ausgetauscht wird. Das würde allerdings auch die Produktion von endogenem funktionsfähigem MST4 nicht verhindern. Dies ließe sich z.B. durch die Veränderung des MST4-Gens im Erbgut von Zelllinien oder Versuchstieren verhindern.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Kinasefunktion ist der Einsatz eines Inhibitors. Der einzige bisher einigermaßen selektive beschriebene Inhibitor ist Hesperadin, der in einem onkologischen Kontext in nanomolaren Konzentrationen zu einer Hemmung von MST4-Effekten führt (Xiong et al., 2016). Allerdings ist Hesperadin nach Durchführung der Versuche, die Grundlage dieser Arbeit sind, als Inhibitor von CaMKII- δ in Kardiomyozyten identifiziert worden. Die eingesetzte Konzentration in den Experimenten von Zhang et al. war zwar etwa doppelt so hoch, wie die hier eingesetzte Konzentration (Zhang et al., 2022). Dabei handelt es sich aber um keinen Unterschied der Größenordnung, sodass Hesperadin weder als selektiver MST4- noch als selektiver CaMKII- δ -Inhibitor am Herzen betrachtet werden kann. Dennoch führt die Behandlung mit Hesperadin zu einem zur MST4-Überexpression komplementären Cluster des Phosphoproteoms (Abbildung 3-24). Dabei handelt es sich um einen starken Hinweis darauf, dass Hesperadin auf MST4 wirkt. Das Phosphoproteom der Hesperadin-Gruppe ähnelt dem der Kontrollgruppe, die kein MST4 überexprimiert, deutlich stärker als der MST4-Gruppe. Dennoch sind die Unterschiede größer als zwischen der LacZ-Gruppe und der komplett unbehandelten Gruppe. Das ist ein Hinweis darauf, dass Hesperadin nicht nur exakt den Effekt der gleichzeitigen MST4-Überexpression ausgleicht, sondern noch weitere Effekte darüber hinaus hat. Diese beziehen sich entweder auf das endogene MST4, das in den Kontrollgruppen unbeeinflusst ist, oder auf andere Kinasen, beispielsweise CaMKII- δ .

Das Zusammenspiel von CaMKII- δ und MST4 in Kardiomyozyten sollte weiter untersucht werden, so wie auch die Auswirkungen von Hesperadin.

4.3.2 MST4 hemmt Apoptose

Apoptose ist der Caspase-vermittelte genetisch-kontrollierte Zelltod, der energieabhängig und ohne Aktivierung von Inflammation abläuft. Im Herzen findet Apoptose physiologischerweise hauptsächlich während der Embryonalentwicklung statt. Postnatal ist ein Absterben der größtenteils postmitotischen Zellen mit weitestgehend irreversiblen Gewebeverlust vergesellschaftet. Dieses kommt beispielsweise bei kardialer Ischämie oder bei der Entwicklung der DCM und Herzinsuffizienz vor (Rodríguez et al., 2002). Allerdings sei darauf hingewiesen, dass die oftmals aus neonatalen Kardiomyozyten stammenden Erkenntnisse zur Apoptose nicht uneingeschränkt auf die Prozesse, die bei Menschen zumeist im höheren Lebensalter auftreten, übertragbar seien (Corbalan et al., 2016).

MST4 hemmt in neonatalen Kardiomyozyten zentrale Mechanismen der Apoptose. Die verschiedenen Aktivierungsmöglichkeiten der Apoptose enden u.a. in der Spaltung der Caspasen 3 und 7, die wiederum z.B. das DNA-Reparatur-Enzym (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) spalten. Die Spaltung der Caspasen führt zu deren Aktivierung, die Spaltung von PARP1 zu dessen Inaktivierung, sodass die Menge der Spaltprodukte mit der Aktivität der Apoptose korreliert (Rodríguez et al., 2002).

MST4-Überexpression in NRVCN führt zu einer deutlichen Abnahme der Spaltprodukte von PARP1 sowie der Effektor-Caspasen 3 und 7 (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-16). Auch bei der funktionellen Analyse des Proteoms von MST4-überexprimierenden Zellen ist die Untergruppe „apoptotic process“ stark reguliert (Abschnitt 3.7.2.2).

Der Knockdown von MST4 mittels siRNA auf unter 50 % der Proteinmenge hingegen führt nicht zu einer statistisch signifikanten Aktivierung der Apoptose. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Aktivität von MST4, gemessen anhand der Phosphorylierung an Position T178, nicht entsprechend abnimmt (Abbildung 3-15). Durch Überexpression nimmt diese Aktivität allerdings deutlich zu. Offenbar existieren also zelluläre Mechanismen, die die Aktivität von MST4 auch bei einer starken Abnahme des produzierten Proteins stabil halten. Dies ist zum einen ein weiterer Hinweis für die Relevanz von MST4 in der Homöostase der Zelle, andererseits für die Relevanz der Phosphorylierung an T178.

Um diese Relevanz noch weiter zu erhärten, wäre es interessant, ob die Effekte der MST4-Überexpression auch mit einer an Position T178 nicht-phosphorylierbaren MST4-Variante reproduzierbar wären. Auch eine Reduktion der MST4-Aktivität wäre sinnvoll, beispielsweise mit gentechnischen Methoden in induzierten Stammzellen oder in KO-Tieren. Eine Hemmung mittels Hesperadin scheint in diesem Zusammenhang eher nicht angebracht, weil in der Untersuchung des Phosphoproteoms aufgefallen ist, dass Hesperadin sogar zu einer Zunahme der Phosphorylierung führt (siehe Abschnitt 3.7.3). Hier wäre eher die Bedeutung der Phosphorylierungsstellen S34 oder S260 untersuchenswert.

Weiterhin wäre es wichtig, zu verstehen, über welchen Signalweg MST4 die Apoptose hemmt. Ein möglicher Kandidat wäre die Proteinkinase C, die bei der Untersuchung des Phosphoproteoms aufgefallen ist (siehe Abschnitt 3.7.2.2) und zu der es Literatur im kardialen Kontext gibt. PKC- ϵ schützt vor Apoptose. PKC- δ scheint zumindest bei kardialer Ischämie pro-apoptotische Effekte zu haben (Singh et al., 2017). Die Details sind allerdings noch nicht verstanden. Es wäre auch möglich, dass der Effekt nicht über PKC vermittelt wird sondern über die gleichen Kinasesubstrate von PKC und MST4, da Hinweise auf eine direkte PKC-Aktivierung fehlen.

Auch die Phosphorylierung von GJA1 an Position S262, die durch MST4-Überexpression vermehrt und durch Hesperadin-Behandlung vermindert stattfindet (Tabelle 3-7), sollte in diesem Kontext weiter untersucht werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die vermehrte Phosphorylierung durch PKC die Bildung der mitochondrial permeability transition pore (MPTP) verhindert und so Apoptose hemmt (Srisakuldee et al., 2014).

Die Hemmung der Apoptose führt allerdings nicht zu einer verstärkten Viabilität im MTT-Assay von Kardiomyozyten, weder in Hypoxie noch in Normoxie (Abbildung 3-17). Andererseits reduziert bei

diesem Versuch zumindest die Behandlung mit Hesperadin die Viabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die sehr extreme Hypoxie von 1 % stellt allerdings kein gutes Modell zur Untersuchung von Apoptose dar, da es sich dabei um einen energieabhängigen Prozess handelt. Die Zellen in diesem Versuch sind wahrscheinlich eher durch andere Formen des Zelltodes untergegangen. Auch die Auswertung mittels MTT-Assay ist kritisch zu betrachten, da hiermit nicht tatsächlich lebende Zellen ermittelt werden sondern die Aktivität mitochondrialer Reduktasen (Kumar et al., 2018). Es sollten daher weitere Methoden verwendet werden, um die Auswirkungen von MST4 auf das Zellüberleben und damit verbundene Signalwege zu untersuchen.

4.3.3 MST4 verursacht Hypertrophie

Herzmuskelzellen besitzen im adulten Organismus größtenteils nicht mehr die Fähigkeit zur Zellteilung, weshalb sie auf vermehrten biomechanischen Stress nicht mit Hyperplasie reagieren können, sondern nur mit Hypertrophie. Dieser initiale Adaptationsprozess gerät rasch außer Kontrolle und entwickelt sich im Rahmen des kardialen Remodelings zu einer pathologischen Hypertrophie. Diese ist neben der Vergrößerung der Zelle gekennzeichnet durch verschiedene Prozesse, die in einer Herzinsuffizienz münden. Wie genau dieser Wechsel stattfindet und welche Signalwege besonders wichtig sind, bleibt Teil aktueller molekularkardiologischer Forschung (Frey & Olson, 2003).

Wird MST4 in isolierten Kardiomyozyten von neonatalen Ratten vermehrt exprimiert, erhöht sich die Zellgröße (Abbildung 3-19). Es kommt also zumindest zur Hypertrophie im eigentlichen Sinne. Bei der softwaregestützten Analyse von mehreren Tausend Zellen ist erwartbar, dass beinahe jede Änderung statistisch signifikant ist. Eine Zunahme der Zellgröße um ca. 13 % ist aber auch als relevant anzusehen. Diese Änderung ist nur wenig geringer als die, die durch den hochpotenten Adrenozeptoragonisten Phenylephrin ausgelöst wird. Wird zusätzlich zu der Behandlung mit Phenylephrin noch MST4 überexprimiert, ist die Größenzunahme von ca. 4 % gegenüber der LacZ-Gruppe zwar statistisch signifikant aber nicht mehr wirklich relevant.

Anhand dieser Größenzunahme ist allerdings nicht festzumachen, ob die MST4-Überexpression eher physiologische oder pathologische Hypertrophie verursacht, zumal die Übergänge fließend sind. MST4 ist bei Patientinnen und Patienten mit hochgradiger Herzinsuffizienz durch dilatative und ischämische Kardiomyopathie heraufreguliert (Abbildung 3-2). Herzinsuffizienz ist mit pathologischer Hypertrophie vergesellschaftet (Nakamura & Sadoshima, 2018), weshalb es naheliegend wäre, dass MST4 ebenfalls in diesem Kontext zu betrachten ist. Gegen diese Annahme spricht, dass MST4-Überexpression zu einer verbesserten Kontraktilität (Abbildung 3-22) und verminderter Apoptose (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-16) führt. Außerdem werden die Hypertrophie-assoziierten fetalen Gene NPPA, NPPB und RCAN1.4 nicht vermehrt exprimiert (Abbildung 3-20). Auf Protein-Ebene sind das natriuretische Peptid A und das ebenfalls mit pathologischer Hypertrophie assoziierte Transgelin (Kuwahara et al., 2012)

nach 72 h sogar auf ca. 64 % im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant herabreguliert (Tabelle 3-10). Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass MST4 aktivierend auf diese Signalwege wirkt – es ist eher ein hemmender Trend zu beobachten. Vor diesem Hintergrund ist MST4 wahrscheinlich eher ein protektiver Faktor, der eher physiologische Hypertrophie auslöst. Möglicherweise reicht der Effekt von MST4 beim Fortschreiten der Herzinsuffizienz irgendwann nicht mehr aus und es kommt trotzdem zu deren Progression. Andererseits ist es für Hypertrophie- und Herzinsuffizienz-assoziierte Signalwege auch typisch, dass die physiologische Breite relativ schmal ist. Das heißt, dass MST4 nur in einem gewissen Rahmen protektiv wirken kann. Außerhalb dieses Bereichs – wahrscheinlich im Zusammenspiel mit anderen Signalwegen – verstärkt MST4 dann pathologische Hypertrophie und Dysfunktion.

Für diese unterschiedlichen MST4-Effekte spricht auch, dass MST4 in den verschiedenen untersuchten Modellen unterschiedlich reguliert ist. Um hier ein besseres Bild zu erstellen, wäre es sinnvoll, verschiedene Expressionslevel, Zeitpunkte und die Kinaseaktivität sowie MST4 im STRIPAK-Kontext zu betrachten. Auch eine experimentelle Regulation von MST4 und MST4-Aktivität im Tiermodell ist notwendig, um die Rolle in Zusammenhang mit Hypertrophie und Herzinsuffizienz besser zu verstehen.

Ein zu untersuchender Mechanismus wäre auch hier die Proteinkinase C, deren Aktivierung zu kardialer Hypertrophie führen kann (Frey & Olson, 2003; Singh et al., 2017).

4.3.4 MST4 erhöht die Kontraktilität von Kardiomyozyten

Isolierte Kardiomyozyten von adulten Ratten, in denen nach adenoviraler Infektion MST4 überexprimiert wird (Abbildung 3-21), zeigen verbesserte Kontraktilitätsparameter im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 3-22). Werden die Zellen elektrisch stimuliert, kommt es in der MST4-Gruppe zu einer verbesserten systolischen Funktion, die sich in verstärkter relativer Zell- und Sarkomerverkürzung sowie verminderter Zeit bis zur maximalen Kontraktion darstellt. Außerdem ist auch die für die diastolische Funktion mitverantwortliche Zeit bis zur maximalen Relaxationsgeschwindigkeit vermindert.

Eine naheliegende Erklärung für diese Funktionsverbesserung wäre eine Verbesserung der Calciumströme am Herzen. Darüber verbessert das STRIPAK-Protein STRIP2 die Kontraktilität von Kardiomyozyten (Eden et al., 2016). Diese Regulation ließ sich allerdings nicht statistisch signifikant feststellen (Abbildung 3-23). Möglicherweise ist die Anzahl der untersuchten Zellen nicht ausreichend, um einen Effekt statistisch signifikant feststellen zu können oder MST4 verbessert auf einem anderen Weg die Kontraktilität der Kardiomyozyten.

In der Untersuchung des Phosphoproteoms konnte gezeigt werden, dass MST4 weitreichende Auswirkungen auf Bestandteile des Zytoskeletts hat (Abschnitt 3.7). Vor diesem Hintergrund wäre es also plausibel, dass die MST4-vermittelte Verbesserung der Kontraktilität über diesen Mechanismus

zustande kommt. Beispielsweise kann über Phosphorylierung die Calciumsensitivität des kontraktile Apparates verändert werden. Auch beziehen sich viele bekannte genetische Ursachen von Kardiomyopathien auf Bestandteile des Zytoskeletts (Sequeira et al., 2014).

Eine weitere Möglichkeit wäre über die Regulation der Natriumionen, die ebenfalls wichtig für die Kontraktion der Herzmuskelzellen sind. In diesen Mechanismus ist beispielsweise das durch MST4-Überexpression vermehrt phosphorylierte Phospholemma involviert (Abschnitt 4.4.2.1).

Um diese Mechanismen weiter im Detail zu verstehen, ist weitere Forschung notwendig. Im Modell der isolierten Kardiomyozyten können wichtige Elemente der kardialen Kontraktilität, wie der Frank-Starling-Mechanismus oder die Erregungsausbreitung, nicht untersucht werden. Daher stellen auch hier Tiermodelle einen nächsten Schritt dar.

4.3.5 Auswirkungen auf den Hippo-Signalweg

Der Hippo-Signalweg ist ein zentraler Mechanismus der Zelle, der grundsätzlich Zellproliferation und Überleben hemmt. Der Effekt wird über die Transkriptionsfaktoren YAP1 und TAZ vermittelt, die bei aktivem Hippo-Signalweg vermehrt phosphoryliert und dadurch abgebaut werden. Ist der Hippo-Signalweg inaktiv, wird die Expression von Genen gefördert, die zu erhöhtem Kardiomyozyten-Wachstum und -Überleben führen.

In anderen Zelltypen konnten Effekte von MST4 auf den Hippo-Signalweg gezeigt werden. Beispielsweise hemmt MST4 in Pankreastumorzellen zusammen mit MOB4 MST1, welches dadurch nicht aktivierend auf LATS1 wirken kann und YAP1 weniger phosphoryliert wird. Es kommt also zu einer Hemmung des Hippo-Signalweges (M. Chen et al., 2018). Andererseits kann MST4 in Magentumorzellen aber auch zu vermehrter YAP1-Phosphorylierung führen, was einer Aktivierung des Hippo-Signalweges entspricht (An et al., 2020). Eine Dissertation, deren Ergebnisse bisher allerdings nicht Peer-reviewed in einem wissenschaftlichen Journal veröffentlicht wurden, konnte zeigen, dass MST4 hauptsächlich in unpolaren Zellen auf den Hippo-Signalweg wirkt. Dort kommt es zu einer Hemmung des Hippo-Signalweges durch MST4. Ein MST4-Knockdown führt zu verstärkter Aktivität von YAP1 und TAZ (Mauricio, 2018). Insgesamt scheinen die Effekte von MST4 auf den Hippo-Signalweg also Zell- und Kontext-spezifisch zu sein.

Die beobachteten MST4-Effekte der Kardiomyozyten-Hypertrophie (Abbildung 3-19), Hemmung der Apoptose (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-16) und Verbesserung der Kontraktilität (Abbildung 3-22) könnten durch eine Hemmung des Hippo-Signalweges – also vermehrter YAP1/TAZ-Aktivität – erklärt werden (Wang et al., 2018).

Abbildung 3-18 zeigt, dass der Knockdown von MST4 die Expression von TAZ reduziert, zumindest bei einer von zwei verwendeten siRNA. Allerdings kommt es durch MST4-Überexpression nicht zu einer

statistisch signifikanten Erhöhung der TAZ-Expression. Stattdessen führt die Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin zu einer Heraufregulation.

In der Untersuchung des Phosphoproteoms ist YAP1 durch MST4-Überexpression (Kontrast 2) an zwei Phosphorylierungsstellen statistisch signifikant reguliert, diese sind allerdings bisher nicht beschrieben: S46 (ca. 15 % vermehrt phosphoryliert), S271 (ca. 18 % vermindert phosphoryliert). S46 ist durch Behandlung mit Hesperadin (Kontrast 4) im Vergleich zur MST4-Gruppe um ca. 40 % vermindert phosphoryliert. TAZ fällt in diesem Zusammenhang nicht auf. Auf Protein-Ebene sind beide in Kontrast 2 nicht statistisch signifikant reguliert. Nur in Kontrast 4 ist YAP1 statistisch signifikant reguliert. Die Hesperadin-Behandlung der MST4-überexprimierenden Zellen führt zu einer TAZ-Reduktion von ca. 10 % gegenüber der alleinigen MST4-Überexpression. Dieser Kontrast entspricht auch dem größten Unterschied in Abbildung 3-18 A.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich keine klare Schlussfolgerung ableiten, sodass das Zusammenspiel zwischen MST4 und dem Hippo-Signalweg in Kardiomyozyten weiter untersucht werden sollte.

4.4 Kinasesubstrate von MST4 in Kardiomyozyten

4.4.1 MST4 als Kinasesubstrat von MST4

Insgesamt ist sehr wenig zu Kinasesubstraten von MST4 veröffentlicht. Beschrieben ist eine Autophosphorylierung von T178. Bei der Untersuchung des Phosphoproteoms sowie mit dem im Western Blot verwendeten MST4-Phospho-Antikörper konnte eine vermehrte Phosphorylierung dieser Position nach MST4-Überexpression bestätigt werden (Abschnitt 3.7.3 und Abbildung 3-14 F). Allerdings führte eine Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin wider Erwarten nicht zu einer verminderten Phosphorylierung sondern zu einer vermehrten Phosphorylierung. Eine mögliche Erklärung wären MST4-unabhängige Mechanismen, die zur Phosphorylierung dieser Position führen. Wahrscheinlich hängt T178 mit der Aktivität von MST4 zusammen (Huang et al., 2017; Record et al., 2010), daher wäre eine möglichst differenzierte Regulierung zu erwarten. Dafür spricht auch, dass häufiger beobachtet werden konnte, dass die Gesamtmenge des phosphorylierten MST4 stabil bleibt, während sich die Expression von MST4 verändert (Abbildung 3-5 C, Abbildung 3-6 C, Abbildung 3-15 F). Diese endogenen Mechanismen könnten die Wirkung des Inhibitors an dieser Stelle aufheben, um wieder eine „normale“ Aktivität von MST4 zu erreichen. Die starken Veränderungen des Phosphoproteoms in Anwesenheit des Inhibitors sprechen allerdings dafür, dass nicht alleine die Phosphorylierung von T178 für die Effekte von MST4 entscheidend ist.

4.4.2 Weitere mögliche Kinasesubstrate von MST4

Die unter 3.7.3 aufgeführten Peptide sind die 50 am stärksten durch MST4-Überexpression vermehrt phosphorylierten Peptide, die außerdem bei Anwesenheit des Inhibitors Hesperadin vermindert

phosphoryliert sind. Es handelt sich bei ihnen daher um mögliche Kinasesubstrate von MST4 in Kardiomyozyten. Der Versuchsaufbau lässt allerdings keine Rückschlüsse zu, ob die vermehrte Phosphorylierung durch direkte Interaktion mit MST4 zustande kommt oder ob es sich um einen vermittelten Effekt handelt.

Die meisten Phosphorylierungsstellen sind bereits in anderen Phosphoproteomics-Untersuchungen identifiziert wurden und in der Datenbank UniProt aufgeführt. Bei 15 der aufgeführten Phosphorylierungsstellen ist in dieser Datenbank jedoch diese Eigenschaft nicht bekannt gewesen (The UniProt Consortium, 2021). Diese Zahl ist in der Gesamtheit der gefundenen Phosphorylierungsstellen sicherlich noch höher.

Um die Relevanz der Phosphorylierungsstellen weiter zu ermitteln, wäre es interessant, wenn man Zellen untersuchen könnte, in denen die jeweiligen Phosphorylierungsstellen durch unphosphorylierbare Aminosäuren ersetzt werden. Wird MST4 anschließend überexprimiert und es zeigen sich nicht die ansonsten beobachteten biologischen Effekte der MST4-Überexpression, wäre das ein Hinweis auf die Rolle der jeweiligen Phosphorylierungsstelle bei diesem Effekt.

Andererseits wäre es interessant, die Phosphorylierungsstellen in den verschiedenen Tiermodellen und in Proben von insuffizienten Herzen zu untersuchen. Leider existieren zu den meisten Phosphorylierungsstellen bisher keine Phospho-Antikörper und die massenspektroskopische Untersuchung des Phosphoproteoms ist sehr teuer und benötigt relativ große Proteinmengen. Das wäre bei der Untersuchung humaner Proben eine zusätzliche Herausforderung.

Unter den Top-50 Phosphorylierungsstellen finden sich vier, zu denen es Veröffentlichungen von funktionellen Untersuchungen gibt. Diese sollen im Folgenden ebenso diskutiert werden, wie die Proteine, die mehrfach unter den Top-50 zu finden sind.

4.4.2.1 Phospholemman

Das Serin an Position 83 (S83) von Phospholemman (PLM), das in der Phosphoproteomics-Untersuchung vermehrt phosphoryliert war, entspricht S63 in den meisten Publikationen, weil es sich bei den ersten 20 Aminosäuren um ein Signalpeptid handelt. Daher wird im Folgenden diese übliche Nomenklatur genutzt. PLM ist ein kardiales Transmembranprotein, das in Verbindung mit Ionenströmen steht und Kinasesubstrat verschiedener Kinasen ist. Bekannte Regulatoren sind Proteinkinase A (PKA) und C (PKC, hauptsächlich Isoformen α und ϵ). PKC phosphoryliert u.a. S63, bei PKA ist diese Phosphorylierungsstelle umstritten. Das STRIPAK-Protein Proteinphosphatase 2A (PP2A) wird als Hauptakteur der Dephosphorylierung von S63 beschrieben. Der relativ hohe Grad an Phosphorylierung von S63 im basalen Zustand legt nahe, dass das System in beide Richtungen reagieren kann. Im phosphorylierten Zustand erhöht PLM die Aktivität der kardialen Natrium-Kalium-ATPase, die zu einem Natriumaus- und KaliumEinstrom führt. Dies könnte einen Mechanismus zum

Ausgleich des Natriumeinstroms bei adrenerger Stimulation darstellen und so das Risiko für Arrhythmien senken sowie Inotropie fördern (Cheung et al., 2010; Fuller et al., 2009).

Neuere Untersuchungen geben allerdings Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von S63 dazu führen könnte, dass es weniger mit der Natrium-Kalium-ATPase interagiert und stattdessen PLM-Oligomere bildet (Wypijewski et al., 2013). Das könnte möglicherweise auch erklären, wieso einige Autoren eher einen hemmenden Effekt der direkten Interaktion von PLM mit der Natrium-Kalium-ATPase beschreiben. Dieser würde dann durch eine Phosphorylierung von PLM an S63 aufgehoben (Bossuyt et al., 2006). Neben der Natrium-Kalium-ATPase sind außerdem vereinzelt Interaktionen von PLM mit dem Natrium-Calcium-Austauscher (NCX1) sowie dem L-Typ-Calcium-Kanal beschrieben. Die Expression und das Phosphorylierungsmuster von PLM sind in verschiedenen Herzerkrankungen verändert, sodass hier unterschiedliche Rollen diskutiert werden (Cheung et al., 2010). Bei kardialer Ischämie, Hypertrophie und Herzinsuffizienz wurden erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentrationen festgestellt (Shattock, 2009). Es ist denkbar, dass MST4 über die – möglicherweise PKC-vermittelte – Phosphorylierung von Phospholemman einen Mechanismus zum Ausgleich der erhöhten Natriumkonzentration darstellt. Allerdings könnten die beobachteten Regulationen auch zur erhöhten Natriumkonzentration beitragen, indem die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase gehemmt wird.

Natriumströme und -konzentrationen spielen auch im Kontext der Kontraktilität eine wichtige Rolle (Hilgemann, 2020). Möglicherweise könnte das also zur beobachteten Verbesserung der Kontraktilität beitragen, ohne messbare Veränderungen der Calciumströme hervorzurufen. Eine Untersuchung der Natriumströme und -konzentrationen, der elektrischen Ladungen und Aktionspotentiale sowie der beteiligten Ionenkanäle und -transporter wäre also sinnvoll.

4.4.2.2 Gap junction alpha-1 protein

Gap Junction Protein Alpha 1 (GJA1, Connexin-43, Cx43) ist ubiquitär exprimiert und spielt insbesondere in der Kommunikation von ventrikulären Kardiomyozyten eine wichtige Rolle. Zwei Connexone, die jeweils aus sechs Gap Junction Proteinen (Connexine) bestehen, bilden Poren – die Gap Junctions – zwischen Zellen, durch die kleine Moleküle ausgetauscht werden können. Dazu gehören Ionen, cAMP und andere Signalmoleküle. In ventrikulären Kardiomyozyten werden Gap Junctions hauptsächlich durch GJA1 gebildet und sind u.a. essenziell für die kontrollierte Erregungsausbreitung. Es sind verschiedene Phosphorylierungsstellen bekannt, die mit einer Modulation der interzellulären Kommunikation assoziiert werden. GJA1 kann die DNA-Synthese hemmen und so das Zellwachstum beeinflussen sowie Zellproliferation verhindern. In Kardiomyozyten, die Zell-Zell-Kontakte bilden, wird diese Inhibition in vitro durch eine Phosphorylierung von Serin an Position 262 (S262) durch Proteinkinase C (PKC) aufgehoben. Eine mögliche mechanistische Erklärung wäre die geringere Permeabilität der Gap Junctions mit

phosphoryliertem als mit unphosphoryliertem S262. Während der Embryonalentwicklung und der frühen postnatalen Phase könnte das ein System zur Regulation des Herzwachstums sein (Doble et al., 2004).

GJA1 befindet sich auch in der mitochondrialen Membran in Kardiomyozyten. Insbesondere in den subsarkolemmalen Mitochondrien ist es Teil eines Signalweges, der die Bildung der mitochondrial permeability transition pore (MPTP) verhindert und so Apoptose als Folge von erhöhter Calciumkonzentration oder oxidativem Stress hemmt. Phosphorylierung von S262 scheint dies bei gestressten Kardiomyozyten zu fördern und wird als möglicher Mechanismus der Kardioprotektion gegenüber Ischämie-Reperfusionsschaden diskutiert. Verstärkte Phosphorylierung von S262 durch PKC führt zu einer erhöhten Calciumtoleranz der Kardiomyozyten (Srisakuldee et al., 2014).

In humanem Herzgewebe konnte MST4 an den Glanzstreifen – der Lokalisation der Gap Junctions – angefärbt werden. In isolierten Kardiomyozyten aus adulten Ratten, die keine Gap Junctions bilden können, war das Muster hingegen eher longitudinal. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob eine direkte Interaktion zwischen MST4 und GJA1 stattfindet, die zur Phosphorylierung von S262 führt.

Die vermehrte Phosphorylierung an S262 von GJA1 könnte eine Erklärung für die beobachtete verminderte Apoptoserate in NRVCN, die MST4 überexprimieren, darstellen. Eine Untersuchung der mitochondrialen GJA1-Population wäre in diesem Kontext anzustreben.

Auch GJA1 ist ein bekanntes Kinasesubstrat von der Proteinkinase C, die an mehreren Stellen in der Phosphoproteomics-Untersuchung auffällt.

4.4.2.3 Elongation factor 2

Elongation factor 2 (EF2) ist ein Kinasesubstrat der Calcium-Calmodulin-abhängigen eukaryotischen Elongation Factor 2 Kinase (EEF2K, CaMKIII) (Nairn & Palfrey, 1987). Eine bekannte Phosphorylierungsstelle ist Threonin an Position 57 (T57), das in der Literatur oft fälschlicherweise als T56 angegeben wird. An Position 56 der kanonischen Sequenz findet sich jedoch ein nicht-phosphorylierbares Phenylalanin. Phosphorylierung von T57 führt zu einer Inhibition der EF2-abhängigen Proteinsynthese sowie einer Induktion von Genen, die mit Zellüberleben assoziiert sind (Mateus-Seidl et al., 2019). Die Expression von EF2 ist auch in Kardiomyozyten beschrieben, sowie deren Abnahme mit dem Alter in Ratten (Jäger et al., 2002) und bei experimentell induziertem Diabetes (Vary et al., 1994). Im kardialen Ischämie-Modell und in hypoxischen Kardiomyozyten konnte eine erhöhte Phosphorylierung von EF2, u.a. an T57, beobachtet werden. Die damit verbundene Inhibition der Proteinsynthese scheint ein zellulärer Schutzmechanismus zu sein. Mechanischer Stress durch plötzliche Erhöhung der Nachlast reduziert hingegen die EF2-Phosphorylierung und erhöht dadurch die Proteinsynthese. Die Dephosphorylierung kann durch die Protein-Phosphatase 2A (PP2A), die STRIPAK-Bestandteil ist, vermittelt werden (Horman et al., 2003).

Hier sind weitere Untersuchungen zur Rolle von MST4 notwendig. Unter hypoxischen Bedingungen konnte eher eine verminderte MST4-Expression beobachtet werden. Würde diese zu einer verminderten EF2-Phosphorylierung führen, könnte dadurch die Proteinsynthese nicht inhibiert werden.

Im Kontext der Hypertrophie existieren sowohl Situationen, in denen MST4 eher positiv mit ihr assoziiert ist als aus negative Korrelationen. Zur Funktion der EF2-Phosphorylierung als Inhibitor der Proteinsynthese würden eher negative Korrelationen passen, da in der Hypertrophie vermehrt Proteine synthetisiert werden müssen. Diese konnten wir bei Calcineurin-transgenen Ratten und nach Konstriktion der transversen Aorta beobachten. In anderen in-vivo und in-vitro Modellen wäre sicherlich eine weitere Untersuchung der MST4-Phosphorylierung an Position T178 als Parameter der MST4-Aktivität interessant. Bei Tieren mit Calsarcin-1-Knockout und mit dauerhaft aktivem Calcineurin-Signalweg ist diese nämlich eher nicht reguliert, obwohl MST4 vermehrt exprimiert wird.

Bei zunehmender Zelldichte konnte eine zunehmende MST4-Expression und Phosphorylierung an T178 beobachtet werden. Möglicherweise führt das zu einer vermehrten EF2-Phosphorylierung, hierdurch zu einer Inhibition der Proteinsynthese und damit zu einem verminderten Zellwachstum bei begrenztem Platz. Eine Erklärung für die verminderte MST4-Phosphorylierung an T178 bei sehr hoher Zelldichte, bei der eigentlich eine Inhibition der Proteinsynthese sinnvoll wäre, bleibt zu finden.

4.4.2.4 UBX domain-containing protein 1

UBX domain-containing protein 1 (UBXN1, SAKS1) wird am Serin an Position 200 (S200) durch Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) phosphoryliert, z.B. SAPK3, SAPK4 und JNK. Zur Funktion von UBXN1 ist bisher noch wenig bekannt. Mit den UBX- und UBA-Domänen könnte es aber wohl an der Formation von Proteinkomplexen zum Abbau falsch-gefalteter Proteine beteiligt sein (McNeill et al., 2004). Bei Glioblastomen könnte der vermehrte Abbau von UBXN1-mRNA zur vermehrten NF- κ B-Aktivierung führen (Chai et al., 2021). UBXN1 ist im Herzen noch nicht untersucht und die Phosphorylierungsstelle bisher nur in der o.g. Arbeit. Eindeutige Hinweise zur Rolle in kardial-relevanten Signalwegen fehlen bisher auch, sodass der Hintergrund der vermehrten Phosphorylierung von UBXN1 an S200 unklar bleibt.

4.4.2.5 Band 4.1 like protein 1

Das Band 4.1 like protein 1 (E41L1, EPB41L1, 4.1N) ist ein Adapter-Protein des Zytoskeletts. Die Familie der Band 4.1 like Proteine wird mit der Kontrolle der Membranstabilität sowie verschiedener Transmembranproteine inklusive Bestandteilen des Calcium-Homöostase-Systems assoziiert. E41L1 befindet sich in Kardiomyozyten u.a. an den Glanzstreifen und nahe der Z-Scheibe – möglicherweise also an den T-Tubuli (Pinder et al., 2012). Zu Phosphorylierungen von E41L1 ist allerdings bisher noch nichts bekannt. In den Top 50 der möglichen MST4-Kinasesubstrate tauchen allerdings fünf

verschiedene Phosphorylierungsstellen von E41L1 auf, die nach 72 h MST4-Überexpression 1,58-fach bis 2,07-fach häufiger phosphoryliert sind. Vor dem Hintergrund der bekannten Lokalisation von E41L1 an den kardialen Glanzstreifen und den verschiedenen beschriebenen Assoziationen von MST4 mit diesen, wäre eine weitere Untersuchung von E41L1 in diesem Kontext sehr spannend.

4.4.2.6 Actin filament-associated protein 1 like 1

Im Herzen ist Actin filament-associated protein 1 like 1 (AFAP1L1) bisher noch nicht untersucht. In onkologischen Kontexten wurde AFAP1L1 als Regulator des Zytoskeletts identifiziert. Es scheint eine Rolle bei der Veränderung der Zellmorphologie, Zellmigration und Invasion zu spielen. Eine Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) wird anhand der Homologie innerhalb der AFAP1-Gruppe diskutiert, genaue Phosphorylierungsstellen sind aber bisher nicht beschrieben (Tie et al., 2016). In der Untersuchung des Phosphoproteoms fand sich in der MST4-72h-Gruppe das Serin an Position 384 (S384) 7,83-fach vermehrt phosphoryliert. Das ist, abgesehen von den Phosphorylierungen an MST4 selber, die stärkste signifikante Regulation der Phosphorylierungsstellen in der Auswahl. Außerdem finden sich noch zwei weitere Phosphorylierungsstellen in dieser Auswahl. Eine weitere Ergründung dieser Zusammenhänge erscheint erstrebenswert.

4.4.2.7 Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein

Das Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein (RERE) steht vor allem in Zusammenhang mit seltenen schwerwiegenden neurologischen Entwicklungsstörungen, die durch RERE-Mutationen auftreten können. Beschrieben sind dabei auch angeborene Herzerkrankungen, hauptsächlich Septumdefekte. Es handelt sich bei RERE um ein Protein der Atrophin-Familie, das während der Embryonalentwicklung als Co-Faktor eines Transkriptionsfaktors wichtig ist. Die Überexpression von RERE verursacht Apoptose (Jordan et al., 2018; Scott & Sherr, 1993). Im adulten Organismus wird RERE im Kontext der venösen Thrombose diskutiert (Zhou et al., 2015). Zu Phosphorylierungen gibt es bisher noch keine Veröffentlichungen. In der Untersuchung des Phosphoproteoms fanden sich in den Top 50 der möglichen MST4-Kinasesubstrate zwei Phosphorylierungsstellen von RERE. Das sehr begrenzte Wissen zu RERE lässt bisher nur Spekulationen zu, aber es wäre denkbar, dass diese Stellen zu einer Inaktivierung von RERE führen und dadurch zu einer Hemmung der Apoptose.

4.4.2.8 Roundabout homolog 1

Mäuse mit einem Knockout von Roundabout homolog 1 (ROBO1) entwickeln angeborene Herzfehler, möglicherweise über einen weniger aktiven Notch-Signalweg. ROBO1 ist ein Transmembranprotein, das ansonsten hauptsächlich in der Embryonalentwicklung des Nervensystems untersucht wird (Mommersteeg et al., 2015; Zhao & Mommersteeg, 2018). Im Rahmen des kardialen Remodelings werden oft Signalwege aktiv, die eigentlich in der Embryonalentwicklung ihre Hauptrolle spielen. Zu Phosphorylierungen fehlen bisher Veröffentlichungen, sodass die Relevanz der beiden

Phosphorylierungsstellen von ROBO1 in der Auswahl in Bezug auf die beobachteten Effekte von MST4 offen bleibt.

4.4.2.9 Caveolae-associated protein 2

Caveolae sind Einstülpungen der zellulären Plasmamembran, die in Mechanismen des Molekül- und Vesikeltransport, der Zusammensetzung der Plasmamembran sowie der Signal- und Mechanotransduktion involviert sind. In Kardiomyozyten befinden sich verschiedene Ionenkanäle in den Caveolae. Defekte Caveolae scheinen zu Arrhythmien, zu einer geringeren Ischämietoleranz, zu kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu führen. Allerdings wurden bisher hauptsächlich die Caveoline am Herzen untersucht (Panneerselvam et al., 2012). Caveolae-associated protein 2 (CAVIN2) wurde im onkologischen Kontext als Interaktionspartner der Proteinkinase C (PKC) identifiziert. Dies ist möglicherweise ein Mechanismus, um PKC an den Caveolae zu rekrutieren (Gustincich et al., 1999). Die Assoziation mit PKC scheint interessant, allerdings existieren keine Veröffentlichungen zu Phosphorylierungen, die die beiden beobachteten Phosphorylierungsstellen in einen größeren Zusammenhang bringen könnten.

4.4.2.10 Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14C

Die Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14C (PPP1R14C, PP14C, KEPI) ist bereits als Kinasesubstrat von MST4 beschrieben. In Krebszellen spielt MST4 (und auch MST3) eine Rolle in der Regulation des Zytoskeletts. Ein möglicher Mechanismus ist die Phosphorylierung von PPP1R14C an Position T73. Diese Phosphorylierung führt zu einer verstärkten Hemmung der Protein Phosphatase 1, die u.a. eine Rolle bei der Dephosphorylierung von Myosin spielt (Madsen et al., 2015). In der Untersuchung des Phosphoproteoms ist PPP1R14C an T72, das äquivalent zu T73 im humanen Protein ist, nach 48 h 3,3-fach und nach 72 h 3,92-fach vermehrt phosphoryliert. Dieses Ergebnis macht es sehr plausibel, dass PPP1R14C auch in Kardiomyozyten ein Kinasesubstrat von MST4 darstellt. Die Herabregulation durch Hesperadin auf ca. 70 % ist allerdings nicht statistisch signifikant, weshalb es in der in Tabelle 3-7 definierten Auswahl auch nicht auftaucht. Möglicherweise ist der Effekt nicht ausreichend groß oder es gibt andere Mechanismen, die den Hesperadin-Effekt vermindern. Es ist außerdem beschrieben, dass PPP1R14C durch PKC vermehrt phosphoryliert wird (Liu et al., 2002). Zur Funktion von PPP1R14C im Herzen ist bisher nichts bekannt. Von der Protein Phosphatase 1 (PP1), die von ihr gehemmt wird, sind allerdings über 120 Interaktionspartner im Herzen beschrieben, sodass sie als ein Schlüsselenzym im Herzen angesehen werden kann. Dazu gehören der LTCC, RYR2, Phospholamban (PLN), Troponin I (TnI), Myosin binding protein C und Titin. In insuffizienten Herzen ist die Aktivität von PP1 erhöht und die Hemmung von PP1 wird als therapeutische Option untersucht. Hier werde aber u.a. noch ein besseres Verständnis der verschiedenen Isoformen benötigt (Liu, 2021). Die vermehrte Phosphorylierung von PPP1R14C durch MST4 könnte also auch am Herzen die Aktivität von PP1 hemmen und so protektiv wirken.

4.4.3 Vermehrte Phosphorylierung von PKC Kinasesubstraten

Proteinkinase C (PKC) ist eine ubiquitär exprimierte Kinase, die an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist. Es existieren mehrere Isoformen, die im kardialen Kontext beschrieben sind. Interessanterweise fällt bei der funktionellen Analyse des Phosphoproteoms von MST4-überexprimierenden Zellen auf, dass in diesen PKC-assoziierte Untergruppen vermehrt reguliert sind (Abschnitte 3.7.2.1 und 3.7.2.2). Auch bei den zuvor besprochenen möglichen Kinasesubstraten taucht PKC immer wieder als bekannte Kinase auf: PLM, GJA1, AFAP1L1 und PPP1R14C werden von PKC phosphoryliert, CAVIN2 ist ein Interaktionspartner von PKC.

Auch sind die beobachteten biologischen Effekte von MST4 zum Teil auch bereits als Effekte von PKC in Kardiomyozyten beschrieben. PKC- ϵ verhindert wie MST4 Apoptose während PKC- δ allerdings eher pro-apoptotisch wirkt (Singh et al., 2017). Ebenfalls analog zu MST4 führt eine Aktivierung von PKC, durch z.B. PMA sowie eine Überexpression von PKC- α , - β und - ϵ , zu hypertrophen Phänotypen. Teilweise existieren hier allerdings auch widersprüchliche Ergebnisse (Frey & Olson, 2003; Singh et al., 2017).

Möglicherweise aktiviert MST4 also PKC oder erhöht deren Expression und vermittelt so diese Phosphorylierungen indirekt. Tatsächlich ist die Expression von PKC- δ in MST4-überexprimierenden Kardiomyozyten nach 72 h statistisch signifikant um ca. 27 % im Vergleich zur LacZ-Gruppe heraufreguliert (Kontrast 2). Wird Hesperadin hinzugegeben, steigt die Expression um weitere 11% (Kontrast 4).

PKC- α -Expression hingegen wird durch MST4-Überexpression auf ca. 78 % herabreguliert ($p = 0,002$; Kontrast 2), durch Hesperadin um ca. 15 % heraufreguliert ($p=0,03$, Kontrast 4). Dies ist insbesondere interessant, weil erhöhte PKC- α -Aktivität mit der Entwicklung von Herzinsuffizienz assoziiert ist. Besonders die Aktivität von PKC- α an den Glanzstreifen – wo auch MST4 lokalisiert ist – wird dafür verantwortlich gemacht. Diese lässt sich z.B. in den Herzen von MLP-KO-Mäusen beobachten (Lange et al., 2016), in denen gleichzeitig eine erhöhte MST4-Expression bei unveränderter MST4-Aktivität herrscht (Abbildung 3-5).

Es fehlen auch Hinweise auf eine direkte PKC-Aktivierung. Stattdessen sind zwei Phosphorylierungsstellen von PKC-Isoformen in der MST4-Gruppe (Kontrast 2) sogar statistisch signifikant vermindert phosphoryliert: PKC α -S226 (ca. 72 %) und PKC ϵ -T564 (ca. 65 %). Beide Positionen sind als Phosphorylierungsstelle bekannt aber eine Funktion ist nicht erforscht.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass MST4 ähnliche Substrate phosphoryliert wie PKC. Eine vermehrte Phosphorylierung von PPP1R14C, wie sie in der Untersuchung des Phosphoproteoms beobachtet wurde (Tabelle 3-8), ist in der Literatur sowohl durch MST4 (Madsen et al., 2015) als auch durch PKC (Liu et al., 2002) beschrieben. In beiden Fällen wurde allerdings der Effekt der jeweils anderen Kinase

nicht untersucht, sodass nicht sicher gesagt werden kann, ob beide unabhängig voneinander wirken. Ezrin ist außerdem als Substrat von MST4 (ten Klooster et al., 2009) und von PKC beschrieben (Ren et al., 2009). In der Untersuchung des Phosphoproteoms lässt sich allerdings dieser Effekt nicht beobachten. Es kommt lediglich im Zeitverlauf (Kontrast 5) zu einer statistisch signifikant zunehmenden Phosphorylierung an Position S535. Diese ist zwar bekannt aber nicht funktionell beschrieben (The UniProt Consortium, 2021). Anscheinend findet diese Regulation in NRVCN nicht statt. Auch andere in der Literatur beschriebene MST4-Substrate konnten in der Untersuchung des Phosphoproteoms in NRVCN nicht bestätigt werden und sind auch nicht als PKC-Substrate beschrieben.

Das weitere Verständnis der Interaktion von MST4 und PKC, deren Substraten und biologischen Effekten ist sicherlich ein wichtiger Meilenstein in der Charakterisierung von MST4 im Herzen.

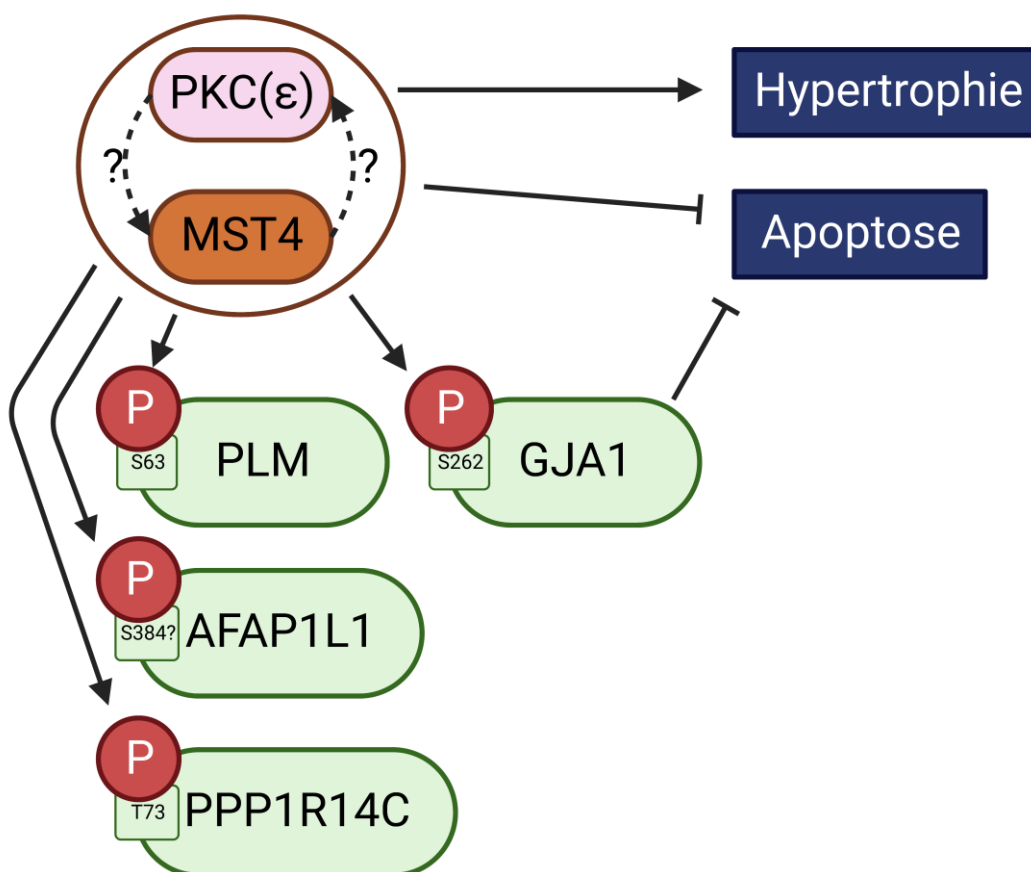


Abbildung 4-1: PKC-assoziierte Effekte von MST4

In dieser Arbeit konnten einige Effekte von MST4 beobachtet werden, die in der Literatur bereits als Effekte der Proteinkinase C (PKC) beschrieben wurden. Dazu gehören einerseits biologische Effekte wie die Induktion von Hypertrophie bei Kardiomyozyten sowie die Hemmung der Apoptose. Andererseits gibt es einige Proteine, deren Phosphorylierung durch PKC beschrieben ist und die auch durch MST4-Überexpression an den gleichen Positionen vermehrt phosphoryliert wurden: Phospholemman (PLM; S63), Gap junction alpha-1 protein (GJA1; S262), Actin filament-associated protein 1 like 1 (AFAP1L1; S384), Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14C (PPP1R14C; T73). Letzteres hemmt die Protein Phosphatase 1 (PP1), die am Herzen wichtige Proteine dephosphorylieren kann. Die angegebenen Phosphorylierungsstellen beziehen sich jeweils auf humane Homologe.

4.5 Durch MST4-Überexpression regulierte Proteine

Die adenovirale Überexpression von MST4 führt zu einer charakteristischen Regulation des Phosphoproteoms. Dazu gehören neben den regulierten Phosphorylierungsstellen, die im vorherigen Abschnitt diskutiert wurden, auch Veränderungen auf Protein-Ebene. Im Folgenden sollen jeweils die 25 am stärksten vermehrt (Tabelle 3-9) und vermindert (Tabelle 3-10) exprimierten Proteine diskutiert werden. Der Bereich der signifikant vermehrten Expression nach 72 h reicht dabei von 5,94-fach bis 1,44-fach und der signifikant verminderten Expression nach 72 h von 23 % bis 64 %. Diese Proteine bieten sehr viele neue Ansätze für weitere Untersuchungen der Kinase MST4 in Kardiomyozyten.

4.5.1 Durch MST4-Überexpression vermehrt exprimierte Proteine

Es fällt schwer, die Auswahl an vermehrt exprimierten Proteinen bestimmten Bereichen zuzuordnen. Zu einigen liegen noch gar keine Erkenntnisse am Herzen vor. Die häufigsten aus der Literatur – die zum Teil sehr begrenzt ist – bekannten Assoziationen beziehen sich auf die Gebiete Inflammation (Reg3 β , MT2A, GP130, STC1, SMAD3, PIR, B2M), Myokardinfarkt/KHK (Reg3 β , GP130, STC1, TMEM106B, SMAD3, FZD1, B2M) sowie Hypertrophie (PGC1, CST3, GP130, EAAT1, SMAD3, FZD1). Teilweise sind die Assoziationen jedoch gegensätzlich, sodass weitere Forschung notwendig ist, um die Zusammenhänge besser zu verstehen.

4.5.1.1 Mammalian Ste-20-Like Protein Kinase 4

Erwartungsgemäß ist das am stärksten überexprimierte Protein MST4. 48 h nach adenoviraler Infektion der Zellen konnte eine 3,78-fache Proteinmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden. Nach 72 h stieg die Menge auf das 5,94-fache der LacZ-Gruppe an. Auch wenn es sich um eine andere Methode der Detektion handelt, entspricht das in etwa der MST4-Menge im Myokard von Patientinnen und Patienten mit DCM (Abbildung 3-2). Damit konnte erneut gezeigt werden, dass die adenovirale Überexpression von MST4 gut funktioniert und dass auch in den Kontrollzellen endogenes MST4 vorkommt.

4.5.1.2 Regenerating islet-derived protein 3 beta

Regenerating islet-derived protein 3 beta (Reg3 β) ist ein Chemokin, das nach einem Myokardinfarkt von Kardiomyozyten sezerniert wird und Makrophagen anzieht. Die Serumkonzentration konnte als eigenständiger Prognosefaktor nach einem Myokardinfarkt identifiziert werden (Lörchner et al., 2018). Eine direkte Regulation durch MST4 scheint vor dem Hintergrund der verminderten Expression von MST4 in Hypoxie (Abbildung 3-10) eher unwahrscheinlich. Reg3 β könnte aber insgesamt bei zellulärem Stress exprimiert und sezerniert werden, der möglicherweise durch MST4 ausgelöst wird. Die Tatsache, dass die MST4-Überexpression zu einer Heraufregulation von Reg3 β um den Faktor 3,29 führt, legt eine weitere Beschäftigung mit deren Zusammenspiel nahe.

4.5.1.3 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PPARGC1A, PRGC1, PGC1) spielt eine Rolle in der Steuerung des kardialen Metabolismus sowie in der Reifung der Kardiomyozyten. PGC1-Defizienz führt zu postnatalen kardialen Entwicklungsstörungen. Eine Überexpression führt zu YAP1-abhängiger Hypertrophie von Kardiomyozyten. Auch eine Verbesserung von Calciumströmen sowie Kontraktilität kann durch PGC1-Aktivierung beobachtet werden (Murphy et al., 2021). Die vermehrte PGC1-Expression könnte also ein Faktor sein, der die verbesserte Kontraktilität von Kardiomyozyten nach MST4-Überexpression erklärt (Abbildung 3-22).

4.5.1.4 Metallothionein-2

Metallothionein-2 (MT2A) ist als protektiver Faktor von altersassoziierter Myokardhypertrophie beschrieben. Möglicher Mechanismus dafür ist eine Hemmung des durch Inflammation aktivierten NF- κ B-Signalweges (Cong et al., 2016). Im Zusammenhang mit Subarachnoidalblutungen gibt es auch eine Veröffentlichung, die beschreibt, dass MST4 den NF- κ B-Signalweg hemmen kann (Peng et al., 2020). Eine Untersuchung der Effekte von MST4 auf Inflammation insgesamt scheint sinnvoll.

4.5.1.5 Cystatin C

Cystatin C (CST3) wird bei Druckbelastung von Kardiomyozyten sezerniert und führt außerdem zu kardialer Hypertrophie über den MAPK-Signalweg (Shen et al., 2020). Zwar führt die vermehrte Druckbelastung durch TAC zu einer verminderten MST4-Expression (Abbildung 3-8), sodass der erste Teil wahrscheinlich eher nicht MST4-vermittelt ist. Andererseits könnte die vermehrte Hypertrophie durch MST4-Überexpression (Abbildung 3-19) durch Cystatin C und den MAPK-Signalweg vermittelt stattfinden.

4.5.1.6 Inositol-3-phosphate synthase 1

Inositol-3-phosphate synthase 1 (ISYNA1, INO1) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Synthese aller Inositol-Verbindungen. Es ist zwar bekannt, dass es im Herzen exprimiert wird, aber weitergehende Untersuchungen wurden bisher nicht veröffentlicht (Guan et al., 2003).

4.5.1.7 Creatine kinase S-type, mitochondrial

Creatine kinase S-type, mitochondrial (CKMT2, KCRS) spielt eine Rolle im Energiehaushalt von Zellen mit hohem Energiebedarf. In kardialen HL-1 Zellen führt eine Überexpression von CKMT2 zu einem Schutz vor Zelltod durch Hypoxie und Reoxygenierung. In anderen Zellen konnte gezeigt werden, dass eine verminderte CKMT2-Aktivität zur Permeabilität der mitochondrialen Membran und dadurch zu Apoptose führt (Zervou et al., 2017). Würde im Umkehrschluss eine vermehrte CKMT2-Expression zu einer verminderten Apoptoserate führen, könnte dies einen Mechanismus der MST4-Effekte auf die Apoptose (Abbildung 3-14) darstellen.

4.5.1.8 Interleukin-6 receptor subunit beta

Interleukin-6 receptor subunit beta (IL6ST, GP130) spielt eine Rolle in der kardialen Entwicklung, Hypertrophie und scheint einen protektiven Effekt auf Kardiomyozyten zu haben. Auf der anderen Seite sind erhöhte Serumkonzentrationen von GP130 oder den IL6-Liganden prognostische Marker bei Patientinnen und Patienten mit Herzinsuffizienz (Fischer & Hilfiker-Kleiner, 2008). GP130-Aktivierung in Kardiomyozyten führt über YAP1-Aktivierung zu einer Proliferation von Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt und dadurch zu einer verbesserten Regeneration (Yandong Li et al., 2020).

4.5.1.9 Histone H2A type 1-C

Über Histone H2A type 1-C (H2AC6) ist am Herzen bisher nichts bekannt. Es wird vermutet, dass dieses Histon eine Rolle spielt bei der Erhaltung der Telomerintegrität (Su et al., 2016). Telomere, die die Chromosomen schützen, sind in verschiedenen myokardialen Erkrankungen verkürzt. Die genaue Rolle in postmitotischen Kardiomyozyten bleibt jedoch unklar (Booth & Charchar, 2017).

4.5.1.10 Ral GTPase-activating protein subunit beta

Auch zur Ral GTPase-activating protein subunit beta (RALGAPB, RLGPB) ist am Herzen bisher nichts bekannt. Anders, als der Namen vermuten lässt, führt RLGPB zu einer Hemmung der GTPase Ral (Yoshimachi et al., 2021). Ral als Ziel von Ras wiederum ist in den Prozess der kardialen Hypertrophie involviert (Kawai et al., 2003).

4.5.1.11 Stanniocalcin-1

Stanniocalcin-1 (STC1) ist ein Glykoprotein, das durch Hypoxie im Herzen IL-6-abhängig hochreguliert wird und die ischämische Toleranz der Kardiomyozyten erhöht (Westberg et al., 2007). Auch in humanen insuffizienten Herzen wird STC1 überexprimiert und nimmt nach Versorgung mit einem LVAD deutlich ab. In vitro gibt es Hinweise, dass STC1 über bisher unbekannte Signalwege Calciumkanäle von L-Typ hemmt, die Herzfrequenz senkt und die Kontraktilität vermindert – im Gegensatz zur MST4-Überexpression (Abbildung 3-22). Dadurch könnte es initial kardioprotektiv wirken, indem die ventrikuläre Arbeit reduziert würde. Im Verlauf wäre aber die Ejektionsfraktion vermindert, sodass STC1 zum Progress der Herzinsuffizienz beitragen würde (Sheikh-Hamad et al., 2003).

4.5.1.12 Atypical kinase COQ8A, mitochondrial

Atypical kinase COQ8A, mitochondrial (COQ8A) ist ein Elektrontransporter, der bei der Synthese von Ubichinon (Coenzym Q10) eine Rolle spielt. Bei der Analyse des Proteoms von Mäusen mit diabetischer Kardiomyopathie kommt es zu einer Herabregulation von COQ8A (Gomes et al., 2022). Ubichinon wiederum spielt eine wichtige Rolle bei der ATP-Produktion in Mitochondrien. Die Einnahme von Ubichinon scheint einen positiven Effekt bei Patientinnen und Patienten mit Herzinsuffizienz zu haben (Claxton et al., 2022; Sharma et al., 2016).

4.5.1.13 Excitatory amino acid transporter 1

Excitatory amino acid transporter 1 (SLC1A3, EAAT1) ist ein Glutamat-Transporter, der bei Ratten durch erhöhte Schilddrüsenhormone im Herzen überexprimiert wird. Dadurch wird die mitochondriale Energieproduktion gesteigert, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Hypertrophie spielt (Ralphe et al., 2005). Möglicherweise wird über diesen Weg die vermehrte Energie, die die MST4-vermittelte Hypertrophie benötigt, zur Verfügung gestellt.

4.5.1.14 RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain

RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain (HA12) ist ein ausschließlich bei der Ratte vorkommendes Protein, das in die Antigenpräsentation involviert ist. Die ähnlichen humanen HLA-A-Proteine spielen zwar eine Rolle bei bestimmten Formen von kardiovaskulären Erkrankungen. In diesem Fall ist die Ursache der vermehrten Expression aber wahrscheinlich die Virusinfektion.

4.5.1.15 Transmembrane protein 106B

Transmembrane protein 106B (TMEM106B, T106B) ist in Kardiomyozyten noch nicht untersucht. Bisher ist im kardialen Kontext nur eine Assoziation mit der koronaren Herzerkrankung (KHK) in Endothelzellen beschrieben (Yabo Li et al., 2020). TMEM106B spielt als lysosomales Protein außerdem eine Rolle bei der Infektion mit SARS-CoV-2 (Baggen et al., 2021) und bei neurodegenerativen Erkrankungen (Nicholson & Rademakers, 2016).

4.5.1.16 Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3

Mutationen im Gen für Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 (ATP1A3, AT1A3) verursachen die alternierende Hemiplegie des Kindesalters. Im Herzen sind genetische Varianten assoziiert mit verkürzten QT-Zeiten und erhöhtem Risiko für plötzlichen Herztod (Moya-Mendez et al., 2021). Im gesunden Organismus wird postnatal hauptsächlich ATP1A2 exprimiert. Die ATP1A3-Expression beschränkt sich hauptsächlich auf das Erregungsleitungssystem (Zahler et al., 1996).

4.5.1.17 Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4

Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4 (SLC2A4, GLUT4) kontrolliert die kardiale Glukose-Aufnahme. Hauptmechanismus dafür ist die Translokation von intrazellulären Vesikeln an das Sarkolemm. Die vermehrte GLUT4-Aktivität führt zu einer verstärkten Aufnahme von Glukose in Kardiomyozyten und verbessert so deren Energiehaushalt (Giannocco et al., 2013). Dies könnte ebenfalls einen Mechanismus zur Kompensation des vermehrten Energiebedarfs bei Hypertrophie spielen.

4.5.1.18 Mothers against decapentaplegic homolog 3

Mothers against decapentaplegic homolog 3 (SMAD3) spielt eine Rolle in kardialer Inflammation und Fibrose, allerdings wohl eher in Fibroblasten und Makrophagen (Meng et al., 2020). SMAD3-Defizienz in Kardiomyozyten führt in vivo nach Myokardinfarkt zu verminderter Apoptoserate, verminderter

pathologischer Hypertrophie und verbesserter Kontraktilität (Kong et al., 2018). Die durch MST4-Überexpression verminderte Apoptoserate (Abbildung 3-14) ist daher wohl eher nicht SMAD3-vermittelt. Die verbesserte Kontraktilität (Abbildung 3-22) hingegen könnte mit der vermehrten Expression von SMAD3 zu tun haben, wobei unklar ist, ob es für den SMAD3-Effekt den Myokardinfarkt braucht.

4.5.1.19 Frizzled-1

Frizzled-1 (FZD1) ist ein Rezeptor für Wnt-Proteine. Nach einem Myokardinfarkt steigt die ventrikuläre FZD1-Expression in vivo. Eine Hemmung von FZD1 durch eine Immunisierung dagegen vermindert die post-Infarkt-Hypertrophie und verbessert die kardiale Funktion (Fan et al., 2018).

4.5.1.20 Pirin

Pirin (PIR) ist ein Co-Faktor von NF- κ B, der bei oxidativem Stress aktiv wird (Perez-Dominguez et al., 2021). Bei Kardiomyozyten liegen noch keine Erkenntnisse dazu vor.

4.5.1.21 Laminin subunit beta-2

Laminin subunit beta-2 (LAMB2) ist Teil der Laminin-Familie, deren Mitglieder den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ausmachen und Zell-Zell-Interaktionen vermitteln können. Im Herzen spielen sie eine Rolle bei der Kraftübertragung (Hochman-Mendez et al., 2020). Zu LAMB2 existieren allerdings bisher keine Erkenntnisse am Herzen.

4.5.1.22 Galectin-3-binding protein

Galectin-3-binding protein (LGALS3BP, LG3BP, M2BP) ist bisher am Herzen nicht untersucht. Es ist als Interaktionspartner des Spike-Proteins von SARS-CoV-2 identifiziert worden (Gutmann et al., 2021). Im Kontext des Kolonkarzinoms scheint es den NF- κ B-Signalweg – und so Inflammation und Tumorentwicklung – zu hemmen. Es aktiviert allerdings auch antivirale Reaktionen (Cho et al., 2021), die in diesem Kontext die Ursache für die vermehrte Expression von LGALS3BP sein könnten.

4.5.1.23 Beta-2-microglobulin

Beta-2-microglobulin (B2M) ist Teil des Klasse I MHC. Nach ischämischem Myokardschaden wird B2M von Kardiomyozyten verstärkt exprimiert und sezerniert. Wahrscheinlich wird dadurch die Reparatur des Myokards eingeleitet, indem Fibroblasten angezogen werden (Molenaar et al., 2021).

4.5.1.24 2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein 1

2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein 1 (OASL) kann doppelsträngige RNA binden und spielt so eine Rolle bei der antiviralen Antwort (Kang et al., 2018). Die beobachtete Überexpression ist am ehesten darauf zurückzuführen. Spezielle Funktionen am Herzen sind nicht bekannt.

4.5.1.25 Ketimine reductase mu-crystallin

Ketimine reductase mu-crystallin (CRYM) spielt eine Rolle beim Transport von Schilddrüsenhormonen in den Nukleus (Suzuki et al., 2007). Im insuffizienten Herzen konnte festgestellt werden, dass CRYM

im rechten Ventrikel weniger stark exprimiert wird als im linken Ventrikel. Die Ursache und Relevanz sind allerdings noch unklar (Su et al., 2015).

4.5.2 Durch MST4-Überexpression vermindert exprimierte Proteine

Auch die 25 durch MST4-Überexpression am stärksten vermindert exprimierten Proteine besitzen nicht alle einen gemeinsamen Nenner. Die häufigsten in der Literatur gefundenen Assoziationen – die ebenfalls zum Teil widersprüchlich erscheinen – beziehen sich auf das Zytoskelett (XIRP2, MAGI1, CNN1, MARCKS, MAP1B, LMOD2, FILIP1, CD44, COL11A1, PDLIM3, TAGLN, NPPA) und kardiale Hypertrophie (XIRP2, PCP4, CNN1, MARCKS, CCN2, LMOD2, PDLIM3, RBP1, NPPA). Die Herabregulation der mit pathologischer Hypertrophie assoziierten Proteine Transgelin und NPPA scheint einen weiteren Hinweis darauf zu liefern, dass MST4 eher ein protektiver Faktor ist. Die Zusammenhänge sollten daher weiter untersucht werden.

4.5.2.1 Xin actin-binding repeat-containing protein 2

Xin actin-binding repeat-containing protein 2 (XIRP2, CMYA3) ist ein kardial stark exprimiertes Protein, das bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz eine Rolle spielt. Xin ist das chinesische Wort für Herz. XIRP2 bindet in quergestreifter Muskulatur an Actin, α -Actinin, N-Cadherin und β -Catenin im Bereich der Z-Scheibe, der Costamere sowie der Glanzstreifen. Stimulation mit Hypertrophie-induzierendem Angiotensin-II, Phenylephrin oder Serum führt zu einer vermehrten Expression. Andererseits entwickeln Mäuse mit genetisch verringerten XIRP2-Leveln kardiale Hypertrophie – ohne signifikante Veränderung der fetalen Gene ANP und BNP – und exprimieren vermehrt Hypertrophie-assoziierte β MHC. Gleichzeitig kommt es zu einer Herunterregulation von RCAN1. Dies könnte zu einer vermehrten Aktivität des Calcineurin-Signalweges führen und die Hypertrophie erklären. Werden diese Mäuse mit Angiotensin-II stimuliert, fällt die Hypertrophie des Herzens jedoch geringer aus als bei Kontrolltieren. Außerdem kommt es zu weniger Fibrose und Apoptose (McCalmon et al., 2010). XIRP2 wird auch als negativer Modulator des Hippo-Signalweges beschrieben. Mäuse mit einem kompletten Knockout von XIRP2 haben einen aktiveren Hippo-Signalweg, der zu einem verminderten YAP1-Level führt (Guo et al., 2020).

In der Untersuchung des Phosphoproteoms betrug die Expression von XIRP2 in der MST4-Gruppe nach 72 h ca. 23 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das entspricht in etwa der Expression der XIRP2-defizienten Mäuse in der zitierten Arbeit. Möglicherweise spielt XIRP2 also eine Rolle in der Vermittlung der MST4-Effekte. MST4-Überexpression und XIRP2-Defizienz führen beide zu Hypertrophie ohne Stimulation (Abbildung 3-19) und verringerter Apoptose (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-16). Allerdings schützt MST4-Überexpression nicht vor Hypertrophie durch Stimulation (Abbildung 3-19). Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich die MST4-Effekte sowie die Regulation von XIRP2 auch in vivo zeigen.

4.5.2.2 Calmodulin regulator protein PCP4

Calmodulin regulator protein PCP4 (PCP4, PEP19) ist in die kardiale Rhythmik involviert. PCP4-Defizienz führt zu erhöhter CaMKII-Aktivität und vermehrten Arrhythmien (Kim et al., 2014). Die Konstriktion der Aorta transversalis (TAC) in vivo und Angiotensin-II-Stimulation in vitro führen zu erhöhter PCP4-Expression. Experimentelle Überexpression von PCP4 schützt vor Angiotensin-II-vermittelter kardialer Hypertrophie, indem CaMKII und der Calcineurin-Signalweg gehemmt werden (Xie et al., 2014). Die deutlich verminderte Expression von PCP4 auf ca. 44 % durch MST4-Überexpression könnte im Umkehrschluss dazu führen, dass die Herabregulation von MST4 nach TAC (Abbildung 3-8) die Heraufregulation von PCP4 nach dieser Intervention erklärt. Da Signalwege jedoch meist zu Komplex für solch vereinfachte Schlüsse sind, ist weitere Forschung notwendig.

4.5.2.3 Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2

Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 (RRM2, RIR2) wird in vivo nach einem Myokardinfarkt vermindert exprimiert. RRM2-Überexpression verbessert kardiale Kontraktilität und Regeneration nach einem Myokardinfarkt, möglicherweise durch vermehrte YAP1-Expression (Yu et al., 2021).

4.5.2.4 Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1

Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1 (MAGI1, BAP1) ist in Kardiomyozyten noch nicht untersucht. In anderen Zellen ist es als Gerüstprotein an Zell-Zell-Kontakten beteiligt und wirkt als Tumorsuppressor. Es reduziert die Expression der Hippo-Moleküle LATS1 und 2 und führt so zu einer vermehrten YAP1-Aktivität (Wörthmüller & Rüegg, 2021).

4.5.2.5 Low-density lipoprotein receptor

Low-density lipoprotein receptor (LDLR) ist zwar in kardiovaskulären Erkrankungen vielfach untersucht, allerdings liegt der Fokus dabei meist auf anderen Zelltypen als Kardiomyozyten. Der LDLR spielt eine wichtige Rolle im Kontext der Dyslipidämie, die einen wichtigen kardiovaskulären Risikofaktor ausmacht. LDLR vermittelt die Endozytose von Lipoproteinen und kontrolliert so die zelluläre Cholesterol-Homöostase (Go & Mani, 2012).

4.5.2.6 Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic

Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic (HMGCS1) spielt eine Rolle in der Synthese von HMG-CoA, einem Vorläuferprodukt von Cholesterin. In Kardiomyozyten ist sie bisher noch nicht untersucht (Zhou et al., 2021).

4.5.2.7 Calponin-1

Calponin-1 (CNN1) ist ein Troponin-ähnliches Molekül, das an Actin, Tropomyosin und Calmodulin binden kann. Außerdem ist es in den PKC-Signalweg involviert. Es ist deutlich vermindert exprimiert in Tiermodellen der DCM (cTnT^{R141W}). Wird CNN1 in diesem Tiermodell experimentell verstärkt

exprimiert, verbessert sich dadurch der kardiale Phänotyp. Ein möglicher Mechanismus könnte eine Aktivierung der PKC ϵ sein, deren Aktivität in diesem Tiermodell ebenfalls vermindert ist und durch CNN1-Expression verstärkt wird (Lu et al., 2014). MST4 ist in DCM-Herzen vermehrt exprimiert (Abbildung 3-2), sodass eine Beeinflussung von oder durch CNN1 möglich erscheint.

4.5.2.8 Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate

Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS, MACS) ist ein Protein des Zytoskeletts und in Kardiomyozyten ein Substrat der PKC ϵ . Unphosphoryliert ist es an der Plasmamembran lokalisiert. Nach Phosphorylierung verbindet es Actin-Filamente im Zytosol. Eine Überexpression von MARCKS führt zu Hypertrophie von Kardiomyozyten (Heidkamp et al., 2007). Da die Überexpression von MST4 zu einer Herabregulation von MARCKS führt, ist die MST4-vermittelte Hypertrophie wahrscheinlich eher nicht durch MARCKS verursacht.

4.5.2.9 Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic

Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic (BCAT1) ist wichtig für die Synthese von nicht-essentiellen Aminosäuren sowie weitere Homöostase-Funktionen. BCAT1-Überexpression vermindert den Myokardschaden im Infarkt-Modell (Lai et al., 2021). BCAT1-Knockdown führt zu vermehrtem Zelltod durch Ferroptose (Fu et al., 2022).

4.5.2.10 Connective tissue growth factor

Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) wird in der Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert und fungiert als kardioprotektiver Faktor im Kontext des Myokardinfarktes. Es schützt vor Druck-induzierter kardialer Hypertrophie, indem u.a. die NFAT-Aktivität gehemmt wird (Gravning et al., 2013). Andere Studien konnten allerdings zeigen, dass ein Tamoxifen-vermittelter CCN2-Knockout in adulten Ratten keine Auswirkungen auf kardiale Hypertrophie und Fibrose nach Druckbelastung hat (Fontes et al., 2015).

4.5.2.11 Rho GTPase-activating protein 24

Rho GTPase-activating protein 24 (ARHGAP24, RHG24) katalysiert die Hydrolyse von GTP zu inaktivem GDP und kann GTPasen wie RhoA und Rac1 negativ regulieren. Im Herzen ist dieses Enzym bisher nur durch Assoziationen von Genvarianten mit dem PR-Intervall im EKG aufgefallen (Holm et al., 2010). Im onkologischen Kontext scheint ARHGAP24 Apoptose zu induzieren und ist mit Tumorwachstum und -progression assoziiert. Ein möglicher Mechanismus ist der STAT6-Signalweg (Wang et al., 2020).

4.5.2.12 Microtubule-associated protein 1B

Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) ist hauptsächlich in Neuronen untersucht, wo es in die Regulation von Mikrotubuli und Actinfilamenten involviert ist. MAP1B-Defizienz führt zu verminderter Rac1- und Cdc42-Aktivität sowie erhöhter RhoA-Aktivität (Heinzen et al., 2018). Im Herzen ist es reguliert bei Menschen mit dekompenzierter Mitralklappeninsuffizienz und korreliert negativ mit der

Ejektionsfraktion. In der gleichen Untersuchung wurde übrigens auch CTGF (siehe 4.5.2.10) als ebenfalls reguliertes Protein identifiziert (Tsai et al., 2021).

4.5.2.13 Leiomodlin-2

Leiomodlin-2 (LMD2) reguliert in Kardiomyozyten die Entstehung von Actinfilamenten und interagiert mit Tropomyosin. Mäuse mit LMD2-KO entwickeln einen ausgeprägten DCM-Phänotyp mit verkürzten Actinfilamenten (Ly et al., 2016). Allerdings führen auch die durch erhöhte LMD2-Level induzierten verlängerten Actinfilamente in vivo zu erheblicher Einschränkung der kardialen Kontraktilität (Mi-Mi et al., 2020).

4.5.2.14 Farnesyl pyrophosphate synthase

Farnesyl pyrophosphate synthase (FDPS, FPS) ist das Schlüsselenzym des Mevalonatweges, der wichtig für die Cholesterin- und Steroidbiosynthese ist. Menschen mit Kardiomyopathien zeigen verminderte FDPS-Level im Herzen. Mäuse mit kardiospezifischem FDPS-KO entwickeln im Herzen pathologisches Remodeling und Dysfunktion. Eine mögliche Erklärung ist die Akkumulation von Geranylpyrophosphat, die zu erhöhter Aktivität von Ras und Rheb führt. Diese aktiviert wiederum mTOR und ERK. Allerdings führt auch die erhöhte FDPS-Expression zu pathologischem Remodeling. FDPS spielt daher wahrscheinlich eine Rolle bei der kardialen Homöostase. (Wang et al., 2021). Es ist unklar, ob die Regulation im Rahmen der MST4-Überexpression dazu führt, dass die FDPS-Aktivität an die veränderten Bedürfnisse der Kardiomyozyten angepasst wird oder ob die FDPS-Aktivität aus dem Gleichgewicht gerät und so an pathologischen Prozessen beteiligt ist.

4.5.2.15 Transmembrane 9 superfamily member 1

Transmembrane 9 superfamily member 1 (TM9SF1, MP70) induziert die Formation von Autophagosomen in HeLa-Zellen. Dort lässt es sich hauptsächlich mit lysosomalen Markern co-lokalisieren (He et al., 2009). Außerdem ist es als Teil von Gap junctions beschrieben (Gourdie et al., 1992).

4.5.2.16 Cell surface glycoprotein MUC18

Cell surface glycoprotein MUC18 (MUC18, MCAM, CD146) ist bisher hauptsächlich als Onkogen im Kontext von malignen Melanomen beschrieben, wo es u.a. als Oberflächenrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie an Zell-Zell-Verbindungen beteiligt ist (Rapanotti et al., 2021). Im kardialen Kontext ist es als Biomarker für erhöhte Vorlast bei Herzinsuffizienz beschrieben. Die lösliche Form wird bei erhöhter venöser Dehnung vom Endothel sezerniert (Simonavičius et al., 2021). In Kardiomyozyten wird es in vivo durch experimentelle Nachlasterhöhung und in vitro durch dynamischen Dehnungsstress vermehrt exprimiert (Obara et al., 2021). Dies würde zu der verminderten MST4-Expression nach TAC (Abbildung 3-8) passen, nicht jedoch zur erhöhten Expression nach dynamischer Dehnung in vitro (Abbildung 3-9).

4.5.2.17 Filamin-A-interacting protein 1

Filamin-A-interacting protein 1 (FILIP1, FLIP1) ist bisher hauptsächlich in Neuronen untersucht. Dort induziert es den Abbau von Filamin A, einem Interaktionspartner von Actinfilamenten (Sato & Nagano, 2005). Filamin A (FLNA) spielt eine Rolle bei der Stabilisierung von Actinfilamenten und deren Verbindung zur Zellmembran. Eine Defizienz führt u.a. zu angeborenen Herzfehlern (Chen & Walsh, 2002). In Kardiomyozyten ist allerdings bisher hauptsächlich Filamin C als Z-Scheiben-Protein untersucht (Mao & Nakamura, 2020).

4.5.2.18 CD44 antigen

CD44 antigen (CD44) ist ein Oberflächenprotein, das u.a. als Hyaluronan-Rezeptor eine Rolle bei der Interaktion mit der extrazellulären Matrix spielt. Es ist im Kontext der kardialen Fibrose untersucht, allerdings hauptsächlich in Bezug auf Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen (Yang et al., 2019). Bei der Entwicklung von Vorhofflimmern scheint CD44 außerdem wichtig für die Calciumströme und oxidativen Stress in atrialen Kardiomyozyten zu sein (Chen et al., 2019).

4.5.2.19 Collagen alpha-1(XI) chain

Collagen alpha-1(XI) chain (COL11A1) kommt hauptsächlich in der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe vor, wird aber auch in verschiedenen Tumoren überexprimiert (Nallanthighal et al., 2021). Im Rahmen einer Transkriptomanalyse stenosierter Aortenklappen fiel COL11A1 als heraufreguliertes Gen auf (Greene et al., 2020). In kardialen Myofibroblasten kommt es zu einer Herabregulation von COL11A1 bei erhöhter Aktivität von Proteinkinase C und Calcineurin. COL11A1 wird hier als Fibrosemarker klassifiziert (Mesquita et al., 2014). In der zitierten Untersuchung wird auch CTGF als Fibrosemarker beschrieben, der wie auch in den MST4-überexprimierenden Kardiomyozyten herabreguliert ist (siehe 4.5.2.10). COL11A1 ist in Kardiomyozyten allerdings noch nicht untersucht.

4.5.2.20 Astrocytic phosphoprotein PEA-15

Astrocytic phosphoprotein PEA-15 (PEA15) kann Tumorwachstum und -metastasierung hemmen, möglicherweise durch Inhibition des ERK-Signalweges (Park et al., 2021). Außerdem hemmt es Inflammation, u.a. durch Hemmung von MAP-Kinasen (Yong et al., 2018), sowie Apoptose durch Interaktion mit FADD (Greig & Nixon, 2014). Die Herabregulation von PEA15 in Kardiomyozyten von neonatalen Ratten, die Hypoxie ausgesetzt waren, ist das bisher einzige Ergebnis zu PEA15 am Herzen (Duca et al., 2009). Dies scheint der Herabregulation von MST4 in Hypoxie zu widersprechen (Abbildung 3-10).

4.5.2.21 Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2

Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2 (SLC25A25, SCMC2, APC3) ist ein Transportprotein der inneren Mitochondrienmembran, das an der ATP-Produktion beteiligt ist. Ein Knockout verringert die Effizienz in der Energieverwertung bei Mäusen und beeinträchtigt die

Skelettmuskelfunktion. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine Beeinflussung der Calciumströme und eine verringerte ATP-Produktion (Anunciado-Koza et al., 2011). Zur Funktion im Herzmuskel liegen noch keine Erkenntnisse vor.

4.5.2.22 PDZ and LIM domain protein 3

PDZ and LIM domain protein 3 (PDLIM3, ALP) bindet in Kardiomyozyten mit der PDZ-Domäne an α -Actinin im Bereich der Z-Scheibe und an andere Proteine mit der LIM-Domäne. Es spielt eine Rolle bei der Stabilität von Myozyten, Krafterzeugung und -übertragung sowie Signaltransduktion. Ein Knockout von PDLIM3 führt zum Phänotyp einer DCM im Mausmodell. Polymorphismen im dazugehörigen Gen sind assoziiert mit DCM in Patientinnen und Patienten (Wang et al., 2019).

4.5.2.23 Transgelin

Transgelin (TAGLN, SM22- α) ist als Teil der Calponin-Proteinfamilie ein Protein im Zytoskelett von Myozyten, hauptsächlich glatten Muskelzellen. Es ist u.a. an der Organisation von Actinfilamenten beteiligt. Ein Knockdown von Transgelin führt dort zu Apoptose und verminderter Zellproliferation (Huang et al., 2018). Im Rahmen der Re-Induktion fetaler Gene kann es auch zu einer erhöhten Expression von Transgelin in Kardiomyozyten kommen (Kuwahara et al., 2012). Die Herabregulation des fetalen Gens Transgelin durch MST4-Überexpression passt gut zu der (nur teilweise signifikanten) Herabregulation von NPPA (Abschnitt 4.5.2.25 und Abbildung 3-20). Bei der MST4-vermittelten Hypertrophie könnte es sich daher um einen protektiven Effekt handeln, der über Signalwege abläuft, die Kardiomyozyten eher stärken als schwächen.

4.5.2.24 Retinol-binding protein 1

Retinol-binding protein 1 (RET1, RBP1) spielt eine wichtige Rolle im Vitamin-A-Haushalt, indem es im Zytosol Vitamin A an Enzyme vermittelt, die die Umwandlung in den aktiven Metaboliten Retinol katalysieren. Ein Knockout von RBP1 führt zu einem Retinol-Mangel sowie Veränderungen in verschiedenen Stoffwechselwegen im Myokard (Zalesak-Kravec et al., 2022). Ein Retinol-Mangel wiederum u.a. am Herzen führt zu Entwicklungsstörungen (Nakajima, 2019). Das eng verwandte RBP4 ist an der Entwicklung von Myokardschäden nach Infarkt beteiligt (K.-Z. Zhang et al., 2021) sowie an der Entstehung von kardialer Hypertrophie (Gao et al., 2016).

4.5.2.25 Natriuretic peptides A

Natriuretic peptides A (NPPA, ANP, ANF) ist eines der im kardialen Kontext am intensivsten untersuchten Proteine. Wie auch das verwandte BNP wird ANP bei Herzinsuffizienz von Kardiomyozyten sezerniert. In der klinischen Routine hat sich allerdings BNP bzw. NT-Pro-BNP als Biomarker verbreitet. Intrazellulär wirken sie über die Erhöhung des cGMP-Spiegels. ANP spielt eine wichtige Rolle in der Herzentwicklung und wird als fetales Gen im Rahmen der pathologischen Hypertrophie re-induziert. Einzug in die klinische Praxis hat auch der Wirkstoff Sacubitril gefunden, der

den Neprylin-abhängigen Abbau von natriuretischen Peptiden hemmt. Es wird im eingesetzten Präparat mit dem ACE-Hemmer Valsartan kombiniert (Goetze et al., 2020). Im Western Blot konnte ebenfalls eine verminderte NPPA-Expression durch MST4-Überexpression festgestellt werden, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 3-20). Da NPPA meist mit pathologischer Hypertrophie assoziiert wird, gibt die bei der Untersuchung des Phosphoproteoms beobachtete Herabregulation von NPPA auf ca. 64 % eher einen Hinweis darauf, dass es sich bei der MST4-vermittelten Hypertrophie (Abbildung 3-19) nicht um pathologische Hypertrophie handelt.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebene erste Charakterisierung der Kinase MST4 liefert eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, wie vielfältig die Bereiche sind, in denen MST4 im Kontext der Entwicklung und Progression der humanen Herzinsuffizienz eine mögliche Rolle spielt.

Die subzelluläre Lokalisation von MST4 ist zum Verständnis möglicher Effekte wichtig. Die vorliegenden Daten suggerieren, dass die Lokalisation kontextspezifisch ist. Daher sollte die subzelluläre Lokalisation sowohl in Myokard als auch in isolierten Kardiomyozyten untersucht werden, beispielsweise durch Co-Lokalisierungs-Färbungen. Möglicherweise wären hier auch computergestützte Methoden hilfreich, die Vorhersagen zur Lokalisation von MST4 in subzellulären Mikrodomänen wie T-Tubuli oder Zell-Zell-Kontakte treffen können (Loucks et al., 2018).

Zum Verständnis von MST4 ist es nicht ausreichend, das Protein isoliert zu untersuchen. MST4 kann Bestandteil von makromolekularen STRIPAK-Komplexen sein – auch in Kardiomyozyten. Es sollten z.B. weitere Co-Immunpräzipitationen durchgeführt werden, um die genaue Zusammensetzung von STRIPAK-Komplexen in Kardiomyozyten zu ermitteln. Seit kurzer Zeit existieren auch Methoden, die diese Komplexe noch genauer bestimmen können und einen höheren Durchsatz erlauben. Diese auf nativer Gelelektrophorese und Massenspektroskopie basierten Verfahren (Gorka et al., 2019; Wittig & Malacarne, 2021) würden eine umfassende Charakterisierung von kardialen STRIPAK-Komplexen ermöglichen, die es erlauben würde, die Erkenntnisse zu den einzelnen Bestandteilen besser zu verknüpfen.

Die Regulation von MST4 geschieht u.a. durch Phosphorylierung. Es sollte in Zukunft nicht nur die Veränderung der Expression betrachtet werden, sondern auch die Phosphorylierung von MST4. Außerdem sollten die Mechanismen, die für diese sehr feine Steuerung verantwortlich sind, untersucht werden. Naheliegender wäre hier beispielsweise die Dephosphorylierung durch die STRIPAK-Phosphatase PP2A oder eine Autophosphorylierung.

In Herzen mit hochgradiger Herzinsuffizienz konnte eine vermehrte Expression von MST4 festgestellt werden. Interessant wäre es, insbesondere vor dem Hintergrund der Herabregulation in CnA-transgenen Tieren sowie nach TAC, die Expression und Aktivität von MST4 im Verlauf der Progression der Herzinsuffizienz genauer zu betrachten. Optimal wären dafür humane Proben, die allerdings nicht problemlos verfügbar sind. Eine Bestimmung von sezerniertem MST4 aus dem peripheren Blut ist bei einer ubiquitär vorkommenden Kinase vermutlich auch wenig sinnvoll. Der nächste Schritt in dieser Richtung wäre daher die weitere Untersuchung verschiedener Tiermodelle zu verschiedenen Zeitpunkten.

Die experimentelle Veränderung der MST4-Expression und Aktivität ist ebenfalls Bestandteil der weiteren Charakterisierung. Es wurden mit dem eingesetzten Adenovirus und der siRNA zwei Werkzeuge etabliert, die dieses in Bezug auf die Expression in vitro gut reproduzierbar erreichen. Zur Reduktion der Aktivität scheint die siRNA nicht ausreichend zu sein. Auch der Inhibitor Hesperadin hat dahingehend gewisse Limitationen, da er anscheinend nicht komplett MST4-spezifisch wirkt. Eine Möglichkeit wäre daher die Etablierung eines kardiospezifischen MST4-Knockouts in Mäusen. Auch die gentechnische Veränderung von induzierten humanen Stammzellen wäre ein sinnvolles Modell. Zudem sollte die kardiale Überexpression von MST4 in vivo untersucht werden. Dazu eignen sich z.B. Adeno-assoziierte Viren (AAV) oder die Nutzung von transgenen Tieren, die ein dauerhaft aktives MST4 exprimieren. Neben einer Basischarakterisierung dieser Tiere wäre es auch interessant, wie sich Parameter der Herzinsuffizienz und Hypertrophie durch Belastung, z.B. TAC, verändern. Auf diese Weise ließen sich weitere Rückschlüsse darauf ziehen, ob MST4 eher protektiv wirkt oder eher in die Entwicklung der Herzinsuffizienz involviert ist.

Um die Rolle von MST4 am Herzen besser zu verstehen ist außerdem Verständnis der Beziehung zu verschiedenen Signalwegen wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass MST4 zwar zentrale Effektoren der Apoptose hemmt, allerdings keine klaren Effekte auf das gesamte Überleben. Hier sind weitere Viabilitäts- und Zelltod-Assays notwendig.

Es konnten außerdem Effekte auf Hypertrophie und Kontraktilität gezeigt werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen ergeben sich allerdings bisher noch nicht.

In der Liste der möglichen Kinasesubstrate finden sich einige sehr interessante Kandidaten, die die beobachteten Effekte vermitteln könnten. Bei der Untersuchung einer Kinase ist eine Herausforderung die Auswahl der zu beobachtenden Zeitpunkte. Mit einer Vergrößerung der zeitlichen Auflösung ließen sich wahrscheinlich noch weitere potentielle MST4-Kinasesubstrate identifizieren. Gleichzeitig würde sich das Bild der hier identifizierten Kandidaten verfeinern. Insgesamt wäre es auch wichtig herauszufinden, welche dieser Proteine direkt durch MST4 phosphoryliert werden und welche Effekte

indirekt vermittelt werden. Hervorzuheben wäre auch die immer wiederkehrende Verbindung zur Proteinkinase C, die weiter untersucht werden sollte.

Anhand der Ergebnisse der Untersuchung des Phosphoproteoms ergibt sich auch eine Reihe an regulierten Proteinen, die weiter untersucht werden sollte. Insbesondere die besonders stark regulierten Proteine, zu denen bereits Erkenntnisse am Herzen vorliegen, sollten weiter unter die Lupe genommen werden, um so einer mechanistischen Erklärung für die beobachteten MST4-Effekte näher zu kommen.

Eine möglichst detaillierte Charakterisierung von MST4 am Herzen und im Kontext der humanen Herzinsuffizienz sowie anderer kardiovaskulärer Erkrankungen ist wichtig, um die iatrogene Regulation dieser Kinase als therapeutische Option zu prüfen.

5 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die wichtigsten Gründe für Tod und Verlust von Lebensqualität. Einen großen Anteil daran hat die Herzinsuffizienz, die in Deutschland derzeit die häufigste Ursache für eine Krankenhausbehandlung darstellt. Trotz großer Fortschritte beim Verständnis der Erkrankung und ihrer Therapie ist die Belastung für Patientinnen und Patienten sowie die Gesellschaft insgesamt sehr hoch und wird vermutlich in den nächsten Jahren weiter zunehmen. Der Bedarf an Forschung auf diesem Gebiet ist daher enorm.

Die Mammalian STE20-like Kinase 4 (MST4) ist Bestandteil sogenannter Striatin interagierender Phosphatasen und Kinasen Komplexe (STRIPAK-Komplexe), von denen andere Bestandteile, wie z.B. Myoscape/STRIP2, eine wichtige Rolle im Kontext der Herzinsuffizienz sowie anderer Erkrankungen und Prozesse spielen. MST4 ist bisher vor allem in onkologischen Fragestellungen untersucht worden. Die vorliegende Arbeit ist die erste Charakterisierung von MST4 im Herzen. Dazu wurden humane Myokardproben sowie verschiedene Kardiomyopathie-Modelle *in vivo* und *in vitro* untersucht. Mithilfe von Adenoviren und siRNA wurde die MST4-Expression in isolierten Kardiomyozyten von Ratten experimentell reguliert und die Effekte analysiert.

MST4 wird in Herzen von Patientinnen und Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium vermehrt exprimiert, sowohl bei einer zugrundeliegenden dilatativen als auch bei einer ischämischen Kardiomyopathie. In der Immunchemischen Anfärbung zeigt sich MST4 im intakten humanen Myokard an den Zell-Zell-Kontakten. In isolierten Rattenkardiomyozyten zeigt sich stattdessen eher ein longitudinales Muster. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MST4 auch in Kardiomyozyten direkt mit den STRIPAK-Proteinen Myoscape/STRIP2 und SLMAP interagiert.

Ebenso wie in der humanen Erkrankung zeigt sich auch eine Überexpression von MST4 in den entsprechenden genetischen Mausmodellen MLP-KO und CS1-KO sowie nach zyklischer biaxialer Dehnung von isolierten Kardiomyozyten. Mäuse mit konsekutiv aktivem kardialen Calcineurin und Mäuse mit chirurgisch verengter Aorta, die ebenfalls einen Phänotyp der Herzinsuffizienz entwickeln, zeigen hingegen verminderte Expression von MST4. Diese kann auch beobachtet werden, wenn isolierte Zellen in Hypoxie inkubiert werden und wenn die Zellen so ausgesät werden, dass kaum Zell-Zell-Kontakte bestehen.

Wird MST4 adenoviral überexprimiert, wird dadurch Apoptose gehemmt, die Zellen hypertrophieren und die Kontraktilität adulter Zellen verbessert sich. Eine gegensätzliche Regulation durch Knockdown mittels siRNA oder Inhibitor Hesperadin konnten nicht wirklich robust demonstriert werden. Mögliche Erklärungen sind die ausbleibende Reduzierung der MST4-Aktivität – gemessen an der Phosphorylierung an Position T178 – durch die siRNA bzw. die möglichen Effekte des Inhibitors auf andere wichtige Kinasen. Mechanistisch ließen sich keine klaren Hinweise finden, dass die Effekte

durch klassische Signalwege, wie die Hypertrophiegene NPPA, NPPB und RCAN1.4 oder den Hippo-Signalweg, vermittelt werden.

Um mögliche Kinasesubstrate zu identifizieren und die Effekte von MST4 möglichst breit zu beschreiben, wurde eine komplexe Untersuchung des Phosphoproteoms von MST4-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen an zwei Zeitpunkten durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 74.721 Peptidsequenzen, 20.973 Phosphopeptide und 4.708 Proteingruppen identifiziert. Mittels bioinformatischer Analysen konnte ein robuster Effekt der MST4-Überexpression in Kardiomyozyten demonstriert werden. In funktionellen Analysen auf verschiedenen Ebenen ist MST4 insbesondere mit dem Zytoskelett, der Plasmamembran, Zell-Zell-Kontakten, Ionenkanälen, Apoptose und der Proteinkinase C assoziiert.

Es wurde eine Reihe möglicher Kinasesubstrate identifiziert. Dazu gehört neben der bereits bekannten Autophosphorylierung von MST4 eine große Anzahl in der Literatur bisher nicht mit MST4 assoziierter Phosphorylierungsstellen oder bisher gänzlich unbekannter Phosphorylierungsstellen. Besonders interessante Proteine, zu denen es bereits Erkenntnisse bezüglich der Phosphorylierung gibt, sind beispielsweise Phospholemman und Gap junction alpha-1 protein (auch Connexin-43). Diese beiden Proteine, wie auch einige weitere der möglichen Kinasesubstrate, sind außerdem als Substrate der Proteinkinase C bekannt, weshalb eine weitere Untersuchung dieser Zusammenhänge wichtig erscheint.

Auf Ebene des Proteoms zeigt sich durch MST4-Überexpression ein charakteristisches Muster mit einer Vielzahl an differentiell regulierten Proteinen aus verschiedensten Bereichen, die eine einzigartige Grundlage für weitere Untersuchungen zu MST4 schaffen. Zu den am stärksten vermehrt exprimierten Proteinen gehören z.B. PGC1 und Cystatin C und zu den am stärksten vermindert exprimierten XIRP2, Calponin-1 und NPPA.

In dieser erstmaligen kardialen Charakterisierung der STRIPAK-Kinase MST4 konnte gezeigt werden, dass diese in der Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert wird und Hypertrophie und Apoptose reguliert. Aufgrund der charakteristischen Regulation des Phosphoproteoms von Kardiomyozyten bietet sie ein großes Spektrum von Ansätzen für zukünftige Forschung zum Verständnis der Herzinsuffizienz.

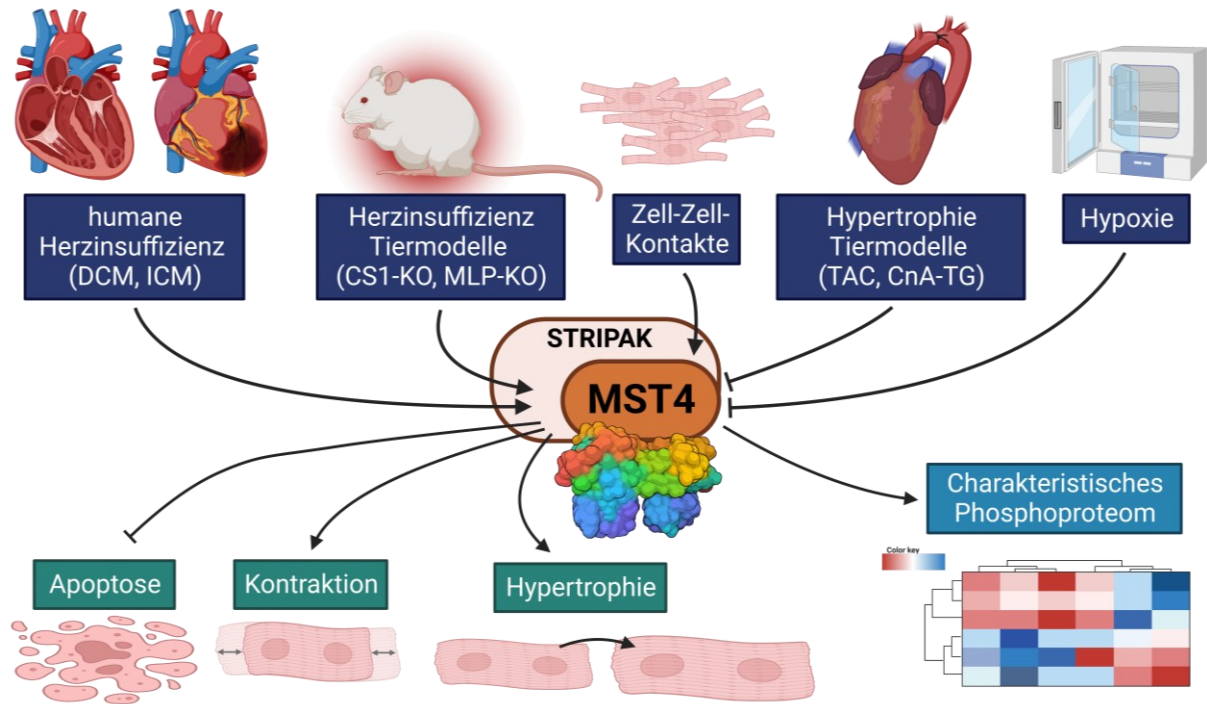


Abbildung 5-1: Grafische Zusammenfassung

Die STE20-Kinase MST4 – ein Bestandteil von STRIPAK-Komplexen – wird in humanen insuffizienten Herzen vermehrt exprimiert sowie in Tieren mit kardialen Calsarcin-1-Knockout (CS1-KO), Muscle-Lim-Protein-Knockout (MLP-KO) und bei vielen Zell-Zell-Kontakten. In Tieren mit Konstriktion der Aorta (TAC) und in Hypoxie wird MST4 hingegen vermindert exprimiert. MST4 hemmt Apoptose in Kardiomyozyten, verbessert die Kontraktion und verursacht Hypertrophie. Außerdem führt die adenovirale Überexpression von MST4 zu einem charakteristischen Phosphoproteom.

6 Abstract

Cardiovascular diseases are the most important causes of death and loss of quality of life worldwide. Heart failure, which is the most frequent cause of hospitalisation in Germany, plays a major role in this. Despite great efforts and progress in understanding the disease and in its therapy, the burden on patients and society as a whole is enormous and will most likely continue to increase in the coming years. Thus, the need for research in this area remains high.

Mammalian STE20-like kinase 4 (MST4) is a member of so-called striatin interacting phosphatases and kinases complexes (STRIPAK complexes), of which other components, such as Myoscape/STRIP2, play an important role in the context of heart failure as well as other diseases and processes. MST4 has so far been studied mainly in oncological settings. The presented work is the first characterisation of MST4 in the heart. Human myocardium samples as well as different cardiomyopathy models were examined *in vivo* and *in vitro*. Using adenoviruses and siRNA, MST4 expression was experimentally regulated in isolated rat cardiomyocytes and the effects analysed.

It was shown that MST4 is increasingly expressed in hearts of patients with end-stage heart failure, both in underlying dilated and ischaemic cardiomyopathy. In immunochemical staining, MST4 is evident in intact human myocardium at the cell-cell contacts. In isolated rat cardiomyocytes, instead, it shows more of a longitudinal pattern. Furthermore, MST4 was also demonstrated to interact directly with the STRIPAK proteins Myoscape/STRIP2 and SLMAP in cardiomyocytes.

As in human disease, overexpression of MST4 was also found in the corresponding genetic mouse models MLP-KO and CS1-KO as well as after cyclic biaxial stretch of isolated cardiomyocytes. In contrast, mice with consecutive active cardiac calcineurin and mice with surgically constricted aorta, which also develop a phenotype of heart failure, show decreased expression of MST4. This could also be observed when isolated cells are incubated in hypoxia and when the cells are seeded so that there is little cell-cell contact.

When MST4 is overexpressed adenovirally, apoptosis is inhibited, cellular hypertrophy is induced and adult cell contractility improves. Opposing regulation by knockdown using siRNA or inhibitor hesperadin could not really be robustly demonstrated. Possible explanations are the lack of reduction of MST4 activity - measured by phosphorylation at position T178 - by siRNA or the possible effects of the inhibitor on other important kinases. Mechanistically, no clear evidence could be found that the effects are mediated by classical signalling pathways such as the hypertrophic genes NPPA, NPPB and RCAN1.4 or the Hippo pathway.

In order to identify possible kinase substrates and to describe the effects of MST4 as broadly as possible, a complex investigation of the phosphoproteome of MST4-overexpressing cells was performed in comparison to control cells at two time points. A total of 74,721 peptide sequences,

20,973 phosphopeptides and 4,708 protein groups were identified. Bioinformatic analyses demonstrated a robust effect of MST4 overexpression in cardiomyocytes. In functional analyses at different levels, MST4 was associated mainly with the cytoskeleton, the plasma membrane, cell-cell contacts, ion channels, apoptosis and protein kinase C.

A number of possible kinase substrates have been identified. In addition to the already known autophosphorylation of MST4, these include a large number of phosphorylation sites not previously associated with MST4 in the literature, or phosphorylation sites that were previously completely unknown. Particularly interesting proteins for which there are already findings regarding phosphorylation are, for example, phospholemman and gap junction alpha-1 protein (also known as connexin-43). These two proteins, as well as some other possible kinase substrates, are also known to be substrates of protein kinase C, which is why further investigation of these relations seems important.

At the level of the proteome, MST4 revealed a characteristic pattern with a large number of differentially regulated proteins from a wide variety of areas, providing a unique basis for further investigations on MST4. For example, among the most highly upregulated proteins are PGC1 and cystatin C, and among the most downregulated are XIRP2, calponin-1 and NPPA.

In this first-ever cardiac characterisation of the STRIPAK kinase MST4, it was shown that it is upregulated in heart failure, regulates hypertrophy and apoptosis and, due to its characteristic regulation of the phosphoproteome of cardiomyocytes, offers a wide range of approaches for future research to understand heart failure.

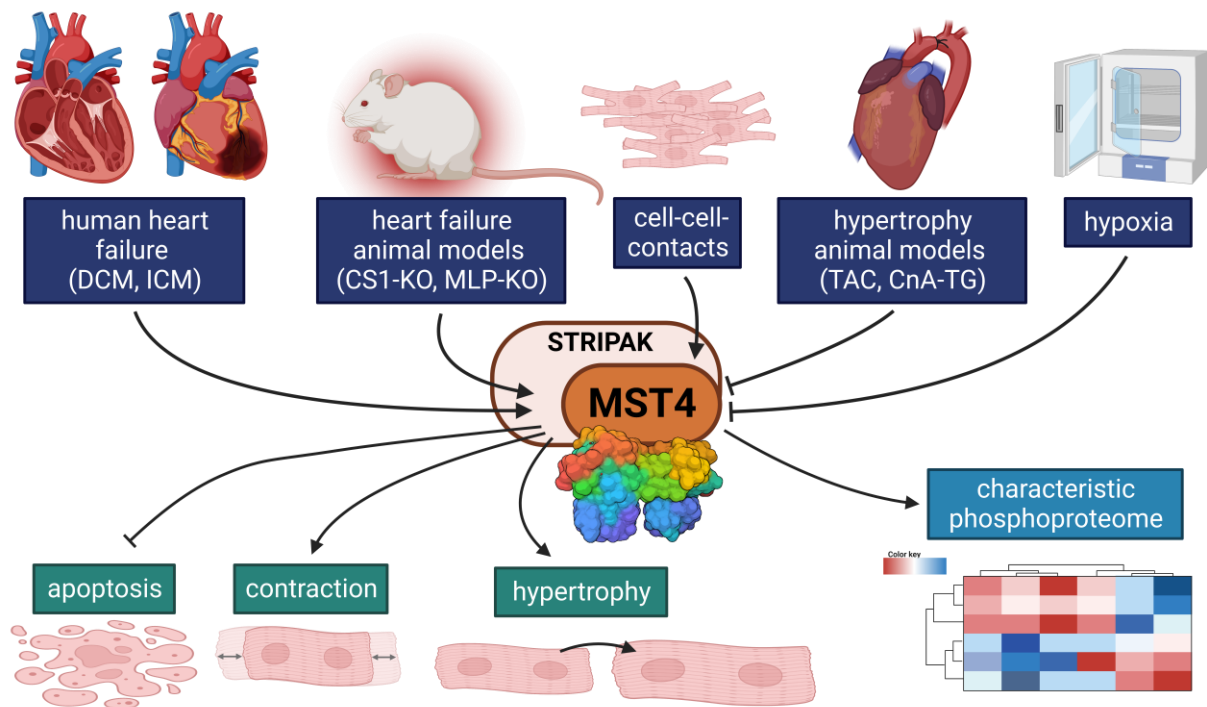


Abbildung 6-1: Graphical abstract

The STE20 kinase MST4 - a component of STRIPAK complexes - is expressed more abundantly in human failing hearts, as well as in animals with cardiac calstarcin-1 knockout (CS1-KO), muscle lim protein knockout (MLP-KO) and in high levels of cell-cell contacts. In contrast, MST4 levels are decreased in animals with transverse aortic constriction (TAC) and in hypoxia. MST4 inhibits apoptosis in cardiomyocytes, enhances contraction and causes hypertrophy. In addition, adenoviral overexpression of MST4 leads to a characteristic phosphoproteome.

7 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind Bestandteile folgender wissenschaftlicher Veröffentlichungen bzw. zur wissenschaftlichen Veröffentlichung eingereicht.

Veröffentlicht

Matthias Eden, Norbert Frey, Christin Tannert, **Marius Leye**. „V259 - A novel STRIPAK associated cardiac Kinase is upregulated in human cardiomyopathy and controls cardiomyocytes hypertrophy and apoptosis“. In: Clin Res Cardiol 109, Suppl 1, April 2020 - Beitrag V259 (86. Jahrestagung und Herztage 2020 der DGK). DOI: 10.1007/s00392-020-01621-0

Matthias Eden, **Marius Leye**, Christin Tannert, Norbert Frey. „Abstract 15577: Mst 4, a Novel Stripak Associated Kinase is Upregulated in Human Cardiomyopathy and Regulates Cardiomyocyte Hypertrophy, Contractility and Apoptosis“ In: Circulation. 2020;142:A15577 (AHA Scientific Sessions 2020) DOI: 10.1161/circ.142.suppl_3.15577

Ben Völschow, Asalbono Farahvashi, **Marius Leye**, Christin Tannert, Philipp Doldi, Norbert Frey, Matthias Eden. „P176 - A novel "loss of function" Myoscape mutation derived from patients with Dilated Cardiomyopathy and Short-QT syndrome affects cardiac output in zebrafish in vivo and hypertrophic gene program in vitro“. In: Clin Res Cardiol (2021) (87. Jahrestagung der DGK 2021). DOI: 10.1007/s00392-021-01843-w

Marius Leye, Christin Tannert, Ben Völschow, Norbert Frey, Simone Martini, Samuel T. Sossalla, Matthias Eden. „V455 - MST4, a novel STRIPAK associated kinase is upregulated in human cardiomyopathy and regulates cardiomyocyte hypertrophy, cardiac contractility and apoptosis“. In: Clin Res Cardiol (2021) (87. Jahrestagung der DGK 2021). DOI: 10.1007/s00392-021-01843-w

Eingereicht

Marius Leye, Christin Tannert, Ben Völschow, Simone Martini, Samuel Sossalla, Norbert Frey, Matthias Eden. „Characterisation of MST4, a novel cardiac STRIPAK associated kinase involved in heart failure and its targets in cardiomyocytes“. Eingereicht für die 89. Jahrestagung der DGK 2023.

8 Literaturverzeichnis

- Ahlberg, E., Jenmalm, M. C. & Tingö, L. (2021). Evaluation of five column-based isolation kits and their ability to extract miRNA from human milk. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25 (16), 7973–7979. doi:10.1111/jcmm.16726
- Ali, H., Braga, L. & Giacca, M. (2020). Cardiac regeneration and remodelling of the cardiomyocyte cytoarchitecture. *The FEBS Journal*, 287 (3), 417–438. doi:10.1111/febs.15146
- An, L., Nie, P., Chen, M., Tang, Y., Zhang, H., Guan, J., Cao, Z., Hou, C., Wang, W., Zhao, Y., Xu, H., Jiao, S. & Zhou, Z. (2020). MST4 kinase suppresses gastric tumorigenesis by limiting YAP activation via a non-canonical pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, 217 (6), e20191817. doi:10.1084/jem.20191817
- Anunciado-Koza, R. P., Zhang, J., Ukropec, J., Bajpeyi, S., Koza, R. A., Rogers, R. C., Cefalu, W. T., Mynatt, R. L. & Kozak, L. P. (2011). Inactivation of the Mitochondrial Carrier SLC25A25 (ATP-Mg²⁺/Pi Transporter) Reduces Physical Endurance and Metabolic Efficiency in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (13), 11659–11671. doi:10.1074/jbc.M110.203000
- Arber, S., Hunter, J. J., Ross, J., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J. C., Chien, K. R. & Caroni, P. (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, 88 (3), 393–403. doi:10.1016/s0092-8674(00)81878-4
- Bacmeister, L., Schwarzl, M., Warnke, S., Stoffers, B., Blankenberg, S., Westermann, D. & Lindner, D. (2019). Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure. *Basic Research in Cardiology*, 114 (3), 19. doi:10.1007/s00395-019-0722-5
- Baggen, J., Persoons, L., Vanstreels, E., Jansen, S., Van Looveren, D., Boeckx, B., Geudens, V., De Man, J., Jochmans, D., Wauters, J., Wauters, E., Vanaudenaerde, B. M., Lambrechts, D., Neyts, J., Dallmeier, K., Thibaut, H. J., Jacquemyn, M., Maes, P. & Daelemans, D. (2021). Genome-wide CRISPR screening identifies TMEM106B as a proviral host factor for SARS-CoV-2. *Nature Genetics*, 53 (4), 435–444. doi:10.1038/s41588-021-00805-2
- Bastug-Özel, Z., Wright, P. T., Kraft, A. E., Pavlovic, D., Howie, J., Froese, A., Fuller, W., Gorelik, J., Shattock, M. J. & Nikolaev, V. O. (2019). Heart failure leads to altered β 2-adrenoceptor/cyclic adenosine monophosphate dynamics in the sarcolemmal phospholemman/Na,K ATPase microdomain. *Cardiovascular Research*, 115 (3), 546. Oxford University Press. doi:10.1093/cvr/cvy221
- Bennett, P. M. (2018). Riding the waves of the intercalated disc of the heart. *Biophysical Reviews*, 10 (4), 955–959. doi:10.1007/s12551-018-0438-z
- Birner, C., Frey, N., Laufs, U., Sperzel, J., Gummert, J. & Markewitz, A. (2021). 5. Herzinsuffizienz. (Deutsche Herzstiftung e.V., Hrsg.) *Deutscher Herzbericht 2020*, 105–120.
- Booth, S. A. & Charchar, F. J. (2017). Cardiac telomere length in heart development, function, and disease. *Physiological Genomics*, 49 (7), 368–384. doi:10.1152/physiolgenomics.00024.2017
- Borlepawar, A., Rangrez, A. Y., Bernt, A., Christen, L., Sossalla, S., Frank, D. & Frey, N. (2017). TRIM24 protein promotes and TRIM32 protein inhibits cardiomyocyte hypertrophy via regulation of dysbindin protein levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 292 (24), 10180–10196. doi:10.1074/jbc.M116.752543

- Bossuyt, J., Despa, S., Martin, J. L. & Bers, D. M. (2006). Phospholemman Phosphorylation Alters Its Fluorescence Resonance Energy Transfer with the Na/K-ATPase Pump *. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (43), 32765–32773. Elsevier. doi:10.1074/jbc.M606254200
- Böttner, J., Werner, S., Adams, V., Knauth, S., Kricke, A., Thiele, H. & Büttner, P. (2021). Structural and functional alterations in heart and skeletal muscle following severe TAC in mice: impact of moderate exercise training. *Biological Research*, 54 (1), 31. doi:10.1186/s40659-021-00354-2
- Britton, D., Zen, Y., Quaglia, A., Selzer, S., Mitra, V., Lößner, C., Jung, S., Böhm, G., Schmid, P., Prefot, P., Hoehle, C., Koncarevic, S., Gee, J., Nicholson, R., Ward, M., Castellano, L., Stebbing, J., Zucht, H. D., Sarker, D., Heaton, N. & Pike, I. (2014). Quantification of pancreatic cancer proteome and phosphorylome: indicates molecular events likely contributing to cancer and activity of drug targets. *PloS One*, 9 (3), e90948. doi:10.1371/journal.pone.0090948
- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). (2019). *NVL Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 3. Auflage*. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). doi:10.6101/AZQ/000482
- Chai, R.-C., Chang, Y.-Z., Chang, X., Pang, B., An, S. Y., Zhang, K.-N., Chang, Y.-H., Jiang, T. & Wang, Y.-Z. (2021). YTHDF2 facilitates UBXN1 mRNA decay by recognizing METTL3-mediated m6A modification to activate NF-κB and promote the malignant progression of glioma. *Journal of Hematology & Oncology*, 14 (1), 109. doi:10.1186/s13045-021-01124-z
- Chaklader, M. & Rothermel, B. A. (2021). Calcineurin in the heart: New horizons for an old friend. *Cellular Signalling*, 87, 110134. doi:10.1016/j.cellsig.2021.110134
- Chen, M. H. & Walsh, C. A. (2002). FLNA Deficiency. In M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K.W. Gripp, G.M. Mirzaa & A. Amemiya (Hrsg.), *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Zugriff am 15.4.2022. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1213/>
- Chen, M., Zhang, H., Shi, Z., Li, Y., Zhang, X., Gao, Z., Zhou, L., Ma, J., Xu, Q., Guan, J., Cheng, Y., Jiao, S. & Zhou, Z. (2018). The MST4–MOB4 complex disrupts the MST1–MOB1 complex in the Hippo–YAP pathway and plays a pro-oncogenic role in pancreatic cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (37), 14455–14469. doi:10.1074/jbc.RA118.003279
- Chen, S., Fang, Y., Xu, S., Reis, C. & Zhang, J. (2018). Mammalian Sterile20-like Kinases: Signalings and Roles in Central Nervous System. *Aging and disease*, 9 (3), 537. doi:10.14336/AD.2017.0702
- Chen, W.-J., Chang, S.-H., Chan, Y.-H., Lee, J.-L., Lai, Y.-J., Chang, G.-J., Tsai, F.-C. & Yeh, Y.-H. (2019). Tachycardia-induced CD44/NOX4 signaling is involved in the development of atrial remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 135, 67–78. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.08.006
- Chen, X., Yuan, W., Li, Y., Luo, J. & Hou, N. (2020). Role of Hippo-YAP1/TAZ pathway and its crosstalk in cardiac biology. *International Journal of Biological Sciences*, 16 (13), 2454–2463. doi:10.7150/ijbs.47142
- Cheng, G., Takahashi, M., Shunmugavel, A., Wallenborn, J. G., DePaoli-Roach, A. A., Gergs, U., Neumann, J., Kuppuswamy, D., Menick, D. R. & Cooper, G. (2010). Basis for MAP4 Dephosphorylation-related Microtubule Network Densification in Pressure Overload Cardiac Hypertrophy. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (49), 38125–38140. doi:10.1074/jbc.M110.148650

- Cheung, J. Y., Zhang, X.-Q., Song, J., Gao, E., Rabinowitz, J. E., Chan, T. O. & Wang, J. (2010). Phospholemman: a novel cardiac stress protein. *Clinical and Translational Science*, 3 (4), 189–196. doi:10.1111/j.1752-8062.2010.00213.x
- Cho, S.-H., Shim, H.-J., Park, M.-R., Choi, J.-N., Akanda, M. R., Hwang, J.-E., Bae, W.-K., Lee, K.-H., Sun, E.-G. & Chung, I.-J. (2021). Lgals3bp suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the downregulation of TAK1-NF- κ B signaling. *Cell Death Discovery*, 7 (1), 65. doi:10.1038/s41420-021-00447-7
- Claxton, L., Simmonds, M., Beresford, L., Cubbon, R., Dayer, M., Gottlieb, S. S., Hartshorne-Evans, N., Kilroy, B., Llewellyn, A., Rothery, C., Sharif, S., Tierney, J. F., Witte, K. K., Wright, K. & Stewart, L. A. (2022). Coenzyme Q10 to manage chronic heart failure with a reduced ejection fraction: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*, 26 (4), 1–128. doi:10.3310/KVOU6959
- Cong, W., Niu, C., Lv, L., Ni, M., Ruan, D., Chi, L., Wang, Yang, Yu, Q., Zhan, K., Xuan, Y., Wang, Yuehui, Tan, Y., Wei, T., Cai, L. & Jin, L. (2016). Metallothionein Prevents Age-Associated Cardiomyopathy via Inhibiting NF- κ B Pathway Activation and Associated Nitritative Damage to 2-OGD. *Antioxidants & Redox Signaling*, 25 (17), 936–952. doi:10.1089/ars.2016.6648
- Corbalan, J. J., Vatner, D. E. & Vatner, S. F. (2016). Myocardial apoptosis in heart disease: does the emperor have clothes? *Basic Research in Cardiology*, 111 (3), 31. doi:10.1007/s00395-016-0549-2
- Dadson, K., Hauck, L. & Billia, F. (2017). Molecular mechanisms in cardiomyopathy. *Clinical Science*, 131 (13), 1375–1392. doi:10.1042/CS20160170
- Doble, B. W., Dang, X., Ping, P., Fandrich, R. R., Nickel, B. E., Jin, Y., Cattini, P. A. & Kardami, E. (2004). Phosphorylation of serine 262 in the gap junction protein connexin-43 regulates DNA synthesis in cell-cell contact forming cardiomyocytes. *Journal of Cell Science*, 117 (3), 507–514. doi:10.1242/jcs.00889
- Doll, S., Dreßen, M., Geyer, P. E., Itzhak, D. N., Braun, C., Doppler, S. A., Meier, F., Deutsch, M.-A., Lahm, H., Lange, R., Krane, M. & Mann, M. (2017). Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. *Nature Communications*, 8 (1), 1469. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41467-017-01747-2
- Duca, D. D., Wong, G., Trieu, P., Rodaros, D., Kouremenos, A., Tadevosyan, A., Vaniotis, G., Villeneuve, L. R., Tchervenkov, C. I., Nattel, S., Allen, B. G., Hébert, T. E. & Rohlicek, C. V. (2009). Association of neonatal hypoxia with lasting changes in left ventricular gene expression: An animal model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 138 (3), 538-546.e1. Elsevier. doi:10.1016/j.jtcvs.2009.04.042
- Eden, M., Meder, B., Völkers, M., Poomvanicha, M., Domes, K., Branchereau, M., Marck, P., Will, R., Bernt, A., Rangrez, A., Busch, M., German Mouse Clinic Consortium, Hrabě de Angelis, M., Heymes, C., Rottbauer, W., Most, P., Hofmann, F. & Frey, N. (2016). Myoscape controls cardiac calcium cycling and contractility via regulation of L-type calcium channel surface expression. *Nature Communications*, 7, 11317. doi:10.1038/ncomms11317
- Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjöstedt, E., Lundberg, E., Szigartyo, C. A.-K., Skogs, M., Takanen, J. O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Lindskog, C., Danielsson, F., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Olsson, I., Navani, S., Huss, M., Nielsen, J., Ponten, F. & Uhlén, M. (2014). Analysis

- of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13 (2), 397–406. doi:10.1074/mcp.M113.035600
- Fan, J., Qiu, L., Shu, H., Ma, B., Hagenmueller, M., Riffel, J. H., Meryer, S., Zhang, M., Hardt, S. E., Wang, L., Wang, D. W., Qiu, H. & Zhou, N. (2018). Recombinant frizzled1 protein attenuated cardiac hypertrophy after myocardial infarction via the canonical Wnt signaling pathway. *Oncotarget*, 9 (3), 3069–3080. doi:10.18632/oncotarget.23149
- Fischer, P. & Hilfiker-Kleiner, D. (2008). Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl 1, S414–427. doi:10.1038/bjp.2008.1
- Fontes, M. S. C., Kessler, E. L., van Stuijvenberg, L., Brans, M. A., Falke, L. L., Kok, B., Leask, A., van Rijen, H. V. M., Vos, M. A., Goldschmeding, R. & van Veen, T. A. B. (2015). CTGF knockout does not affect cardiac hypertrophy and fibrosis formation upon chronic pressure overload. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 88, 82–90. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.09.015
- Frank, D., Kuhn, C., Brors, B., Hanselmann, C., Lüdde, M., Katus, H. A. & Frey, N. (2008). Gene Expression Pattern in Biomechanically Stretched Cardiomyocytes. *Hypertension*, 51 (2), 309–318. American Heart Association. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.098046
- Frey, N., Barrientos, T., Shelton, J. M., Frank, D., Rütten, H., Gehring, D., Kuhn, C., Lutz, M., Rothermel, B., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Katus, H. A., Hill, J. A. & Olson, E. N. (2004). Mice lacking calstabin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nature Medicine*, 10 (12), 1336–1343. doi:10.1038/nm1132
- Frey, N. & Olson, E. N. (2003). Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annual Review of Physiology*, 65 (1), 45–79. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243
- Fu, F., Lai, Q., Hu, J., Zhang, L., Zhu, X., Kou, J., Yu, B. & Li, F. (2022). Ruscogenin Alleviates Myocardial Ischemia-Induced Ferroptosis through the Activation of BCAT1/BCAT2. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11 (3), 583. doi:10.3390/antiox11030583
- Fuller, W., Howie, J., McLatchie, L. M., Weber, R. J., Hastie, C. J., Burness, K., Pavlovic, D. & Shattock, M. J. (2009). FXR1 phosphorylation in vitro and in adult rat cardiac myocytes: threonine 69 is a novel substrate for protein kinase C. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 296 (6), C1346–C1355. doi:10.1152/ajpcell.00523.2008
- Gao, W., Wang, H., Zhang, L., Cao, Y., Bao, J.-Z., Liu, Z.-X., Wang, L.-S., Yang, Q. & Lu, X. (2016). Retinol-Binding Protein 4 Induces Cardiomyocyte Hypertrophy by Activating TLR4/MyD88 Pathway. *Endocrinology*, 157 (6), 2282–2293. doi:10.1210/en.2015-2022
- Giannocco, G., Oliveira, K. C., Crajoinas, R. O., Venturini, G., Salles, T. A., Fonseca-Alaniz, M. H., Maciel, R. M. B. & Girardi, A. C. C. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibition upregulates GLUT4 translocation and expression in heart and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 698 (1–3), 74–86. doi:10.1016/j.ejphar.2012.09.043
- Go, G.-W. & Mani, A. (2012). Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 85 (1), 19–28.
- Goetze, J. P., Bruneau, B. G., Ramos, H. R., Ogawa, T., de Bold, M. K. & de Bold, A. J. (2020). Cardiac natriuretic peptides. *Nature Reviews. Cardiology*, 17 (11), 698–717. doi:10.1038/s41569-020-0381-0

- Gomes, K. P., Jadli, A. S., de Almeida, L. G. N., Ballasy, N. N., Edalat, P., Shandilya, R., Young, D., Belke, D., Shearer, J., Dufour, A. & Patel, V. B. (2022). Proteomic Analysis Suggests Altered Mitochondrial Metabolic Profile Associated With Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 791700. doi:10.3389/fcvm.2022.791700
- Gordon, J., Hwang, J., Carrier, K. J., Jones, C. A., Kern, Q. L., Moreno, C. S., Karas, R. H. & Pallas, D. C. (2011). Protein phosphatase 2a (PP2A) binds within the oligomerization domain of striatin and regulates the phosphorylation and activation of the mammalian Ste20-Like kinase Mst3. *BMC biochemistry*, 12, 54. doi:10.1186/1471-2091-12-54
- Gorka, M., Swart, C., Siemiatkowska, B., Martínez-Jaime, S., Skirycz, A., Streb, S. & Graf, A. (2019). Protein Complex Identification and quantitative complexome by CN-PAGE. *Scientific Reports*, 9 (1), 11523. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41598-019-47829-7
- Gourdie, R. G., Green, C. R., Severs, N. J. & Thompson, R. P. (1992). Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart. *Anatomy and Embryology*, 185 (4), 363–378. doi:10.1007/BF00188548
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36 (1), 59–74. doi:10.1099/0022-1317-36-1-59
- Gravning, J., Ahmed, M. S., von Lueder, T. G., Edvardsen, T. & Attramadal, H. (2013). CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload. *International Journal of Cardiology*, 168 (3), 2049–2056. doi:10.1016/j.ijcard.2013.01.165
- Greene, C. L., Jaatinen, K. J., Wang, H., Koyano, T. K., Bilbao, M. S. & Woo, Y. J. (2020). Transcriptional Profiling of Normal, Stenotic, and Regurgitant Human Aortic Valves. *Genes*, 11 (7), E789. doi:10.3390/genes11070789
- Greig, F. H. & Nixon, G. F. (2014). Phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA)-15: a potential therapeutic target in multiple disease states. *Pharmacology & Therapeutics*, 143 (3), 265–274. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.03.006
- Guan, G., Dai, P. & Shechter, I. (2003). cDNA cloning and gene expression analysis of human myo-inositol 1-phosphate synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417 (2), 251–259. doi:10.1016/S0003-9861(03)00388-6
- Guo, H., Lu, Y. W., Lin, Z., Huang, Z.-P., Liu, J., Wang, Y., Seok, H. Y., Hu, X., Ma, Q., Li, K., Kyselovic, J., Wang, Q., Lin, J. L.-C., Lin, J. J.-C., Cowan, D. B., Naya, F., Chen, Y., Pu, W. T. & Wang, D.-Z. (2020). Intercalated disc protein Xinβ is required for Hippo-YAP signaling in the heart. *Nature Communications*, 11 (1), 4666. doi:10.1038/s41467-020-18379-8
- Gustincich, S., Vatta, P., Goruppi, S., Wolf, M., Saccone, S., Della Valle, G., Baggiolini, M. & Schneider, C. (1999). The human serum deprivation response gene (SDPR) maps to 2q32-q33 and codes for a phosphatidylserine-binding protein. *Genomics*, 57 (1), 120–129. doi:10.1006/geno.1998.5733
- Gutmann, C., Takov, K., Burnap, S. A., Singh, B., Ali, H., Theofilatos, K., Reed, E., Hasman, M., Nabeebaccus, A., Fish, M., McPhail, M. J., O’Gallagher, K., Schmidt, L. E., Cassel, C., Rienks, M., Yin, X., Auzinger, G., Napoli, S., Mujib, S. F., Trovato, F., Sanderson, B., Merrick, B., Niazi, U., Saqi, M., Dimitrakopoulou, K., Fernández-Leiro, R., Braun, S., Kronstein-Wiedemann, R., Doores, K. J., Edgeworth, J. D., Shah, A. M., Bornstein, S. R., Tonn, T., Hayday, A. C., Giacca, M., Shankar-Hari, M. & Mayr, M. (2021). SARS-CoV-2 RNAemia and proteomic trajectories inform

- prognostication in COVID-19 patients admitted to intensive care. *Nature Communications*, 12 (1), 3406. doi:10.1038/s41467-021-23494-1
- Guzzo, R. M., Salih, M., Moore, E. D. & Tuana, B. S. (2005). Molecular properties of cardiac tail-anchored membrane protein SLMAP are consistent with structural role in arrangement of excitation-contraction coupling apparatus. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288 (4), H1810–H1819. American Physiological Society. doi:10.1152/ajpheart.01015.2004
- He, P., Peng, Z., Luo, Y., Wang, L., Yu, P., Deng, W., An, Y., Shi, T. & Ma, D. (2009). High-throughput functional screening for autophagy-related genes and identification of TM9SF1 as an autophagosome-inducing gene. *Autophagy*, 5 (1), 52–60. doi:10.4161/auto.5.1.7247
- Heidkamp, M. C., Iyengar, R., Szotek, E. L., Cribbs, L. L. & Samarel, A. M. (2007). Protein kinase Cepsilon-dependent MARCKS phosphorylation in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42 (2), 422–431. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.10.017
- Heineke, J., Wollert, K. C., Osinska, H., Sargent, M. A., York, A. J., Robbins, J. & Molkenstein, J. D. (2010). Calcineurin Protects the Heart in a Murine Model of Dilated Cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48 (6), 1080–1087. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.10.012
- Heinzen, E. L., O'Neill, A. C., Zhu, X., Allen, A. S., Bahlo, M., Chelly, J., Chen, M. H., Dobyns, W. B., Freytag, S., Guerrini, R., Leventer, R. J., Poduri, A., Robertson, S. P., Walsh, C. A., Zhang, M., Epi4K Consortium, & Epilepsy Phenome/Genome Project. (2018). De novo and inherited private variants in MAP1B in periventricular nodular heterotopia. *PLoS genetics*, 14 (5), e1007281. doi:10.1371/journal.pgen.1007281
- Hilgemann, D. W. (2020). Control of Cardiac Contraction by Sodium: Promises, Reckonings, and New Beginnings. *Cell calcium*, 85, 102129. doi:10.1016/j.ceca.2019.102129
- Hochman-Mendez, C., Curty, E. & Taylor, D. A. (2020). Change the Laminin, Change the Cardiomyocyte: Improve Untreatable Heart Failure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (17), 6013. doi:10.3390/ijms21176013
- Hollander, J. M., Thapa, D. & Shepherd, D. L. (2014). Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 307 (1), H1–H14. doi:10.1152/ajpheart.00747.2013
- Holm, H., Gudbjartsson, D. F., Arnar, D. O., Thorleifsson, G., Thorgeirsson, G., Stefansdottir, H., Gudjonsson, S. A., Jonasdottir, A., Mathiesen, E. B., Njølstad, I., Nyrnes, A., Wilsgaard, T., Hald, E. M., Hveem, K., Stoltenberg, C., Løchen, M.-L., Kong, A., Thorsteinsdottir, U. & Stefansson, K. (2010). Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nature Genetics*, 42 (2), 117–122. doi:10.1038/ng.511
- Horman, S., Beauloye, C., Vertommen, D., Vanoverschelde, J.-L., Hue, L. & Rider, M. H. (2003). Myocardial Ischemia and Increased Heart Work Modulate the Phosphorylation State of Eukaryotic Elongation Factor-2 *. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (43), 41970–41976. Elsevier. doi:10.1074/jbc.M302403200
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y. & Liang, X.-J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5 (1), 1–25. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41392-020-0207-x
- Huang, L., Li, L., Yang, T., Li, W., Song, L., Meng, X., Gu, Q., Xiong, C. & He, J. (2018). Transgelin as a potential target in the reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital

- heart disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22 (12), 6249–6261. doi:10.1111/jcmm.13912
- Huang, T., Kim, C. K., Alvarez, A. A., Pangen, R. P., Wan, X., Song, X., Shi, T., Yang, Y., Sastry, N., Horbinski, C. M., Lu, S., Stupp, R., Kessler, J. A., Nishikawa, R., Nakano, I., Sulman, E. P., Lu, X., James, C. D., Yin, X.-M., Hu, B. & Cheng, S.-Y. (2017). MST4 Phosphorylation of ATG4B Regulates Autophagic Activity, Tumorigenicity, and Radioresistance in Glioblastoma. *Cancer Cell*, 32 (6), 840. Elsevier. doi:10.1016/j.ccell.2017.11.005
- Huang, W., Leonard, D. & Taylor, D. J. (2021). Pack a STRIPAK with hubs inside a hub. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28 (3), 232–233. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41594-021-00571-z
- Hwang, J. & Pallas, D. C. (2014). STRIPAK Complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 47, 118. NIH Public Access. doi:10.1016/j.biocel.2013.11.021
- Jäger, D., Holtz, J., Redpath, N. T., Müller, S. P., Pönicke, K., Heinroth-Hoffmann, I., Werdan, K. & Müller-Werdan, U. (2002). The ageing heart: influence of cellular and tissue ageing on total content and distribution of the variants of elongation factor-2. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123 (10), 1305–1319. doi:10.1016/s0047-6374(02)00040-4
- Jordan, V. K., Fregeau, B., Ge, X., Giordano, J., Wapner, R. J., Balci, T. B., Carter, M. T., Bernat, J. A., Moccia, A. N., Srivastava, A., Martin, D. M., Bielas, S. L., Pappas, J., Svoboda, M. D., Rio, M., Boddaert, N., Cantagrel, V., Lewis, A. M., Scaglia, F., Undiagnosed Diseases Network, Kohler, J. N., Bernstein, J. A., Dries, A. M., Rosenfeld, J. A., DeFilippo, C., Thorson, W., Yang, Y., Sherr, E. H., Bi, W. & Scott, D. A. (2018). Genotype-phenotype correlations in individuals with pathogenic RERE variants. *Human Mutation*, 39 (5), 666–675. doi:10.1002/humu.23400
- Kang, J.-S., Hwang, Y.-S., Kim, L. K., Lee, S., Lee, W.-B., Kim-Ha, J. & Kim, Y.-J. (2018). OASL1 Traps Viral RNAs in Stress Granules to Promote Antiviral Responses. *Molecules and Cells*, 41 (3), 214–223. doi:10.14348/molcells.2018.2293
- Kawai, M., Kawashima, S., Sakoda, T., Toh, R., Kikuchi, A., Yamauchi-Takahara, K., Kunisada, K. & Yokoyama, M. (2003). Ral GDP dissociation stimulator and Ral GTPase are involved in myocardial hypertrophy. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 41 (4), 956–962. doi:10.1161/01.HYP.0000063884.36641.63
- Kikkawa, U., Matsuzaki, H. & Yamamoto, T. (2002). Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *Journal of Biochemistry*, 132 (6), 831–839. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003294
- Kim, E. E., Shekhar, A., Lu, J., Lin, X., Liu, F.-Y., Zhang, J., Delmar, M. & Fishman, G. I. (2014). PCP4 regulates Purkinje cell excitability and cardiac rhythmicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 124 (11), 5027–5036. doi:10.1172/JCI77495
- ten Klooster, J. P., Jansen, M., Yuan, J., Oorschot, V., Begthel, H., Di Giacomo, V., Colland, F., de Koning, J., Maurice, M. M., Hornbeck, P. & Clevers, H. (2009). Mst4 and Ezrin induce brush borders downstream of the Lkb1/Strad/Mo25 polarization complex. *Developmental Cell*, 16 (4), 551–562. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.016
- Kluge, A., Rangrez, A. Y., Kilian, L. S., Pott, J., Bernt, A., Frauen, R., Rohrbeck, A., Frey, N. & Frank, D. (2019). Rho-family GTPase 1 (Rnd1) is a biomechanical stress-sensitive activator of cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 129, 130–143. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.01.028

- Kong, P., Shinde, A. V., Su, Y., Russo, I., Chen, B., Saxena, A., Conway, S. J., Graff, J. M. & Frangogiannis, N. G. (2018). Opposing Actions of Fibroblast and Cardiomyocyte Smad3 Signaling in the Infarcted Myocardium. *Circulation*, 137 (7), 707–724. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029622
- Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018 (6). doi:10.1101/pdb.prot095505
- Kuwahara, K., Nishikimi, T. & Nakao, K. (2012). Transcriptional Regulation of the Fetal Cardiac Gene Program. *Journal of Pharmacological Sciences*, 119 (3), 198–203. doi:10.1254/jphs.12R04CP
- Lai, Q., Yuan, G., Shen, L., Zhang, L., Fu, F., Liu, Z., Zhang, Y., Kou, J., Liu, S., Yu, B. & Li, F. (2021). Oxoeicosanoid receptor inhibition alleviates acute myocardial infarction through activation of BCAT1. *Basic Research in Cardiology*, 116 (1), 3. doi:10.1007/s00395-021-00844-0
- Lange, S., Gehmlich, K., Lun, A. S., Blondelle, J., Hooper, C., Dalton, N. D., Alvarez, E. A., Zhang, X., Bang, M.-L., Abassi, Y. A., dos Remedios, C. G., Peterson, K. L., Chen, J. & Ehler, E. (2016). MLP and CARP are linked to chronic PKC α signalling in dilated cardiomyopathy. *Nature Communications*, 7, 12120. doi:10.1038/ncomms12120
- Lee, S.-H., Hadipour-Lakmehsari, S., Kim, D. H., Di Paola, M., Kuzmanov, U., Shah, S., Lee, J. J.-H., Kislinger, T., Sharma, P., Oudit, G. Y. & Gramolini, A. O. (2020). Bioinformatic analysis of membrane and associated proteins in murine cardiomyocytes and human myocardium. *Scientific Data*, 7, 425. doi:10.1038/s41597-020-00762-1
- Li, T., Deng, L., He, X., Jiang, G., Hu, F., Ye, S., You, Y., Duanmu, J., Dai, H., Huang, G., Tang, C. & Lei, X. (2019). MST4 Predicts Poor Prognosis And Promotes Metastasis By Facilitating Epithelial-Mesenchymal Transition In Gastric Cancer. *Cancer Management and Research*, 11, 9353–9369. doi:10.2147/CMAR.S219689
- Li, Yabo, Cho, H., Wang, F., Canela-Xandri, O., Luo, C., Rawlik, K., Archacki, S., Xu, C., Tenesa, A., Chen, Q. & Wang, Q. K. (2020). Statistical and Functional Studies Identify Epistasis of Cardiovascular Risk Genomic Variants From Genome-Wide Association Studies. *Journal of the American Heart Association*, 9 (7), e014146. doi:10.1161/JAHA.119.014146
- Li, Yandong, Feng, J., Song, S., Li, H., Yang, H., Zhou, B., Li, Yan, Yue, Z., Lian, H., Liu, L., Hu, S. & Nie, Y. (2020). gp130 Controls Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Circulation*, 142 (10), 967–982. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044484
- Lin, J.-L., Chen, H.-C., Fang, H.-I., Robinson, D., Kung, H.-J. & Shih, H.-M. (2001). MST4, a new Ste20-related kinase that mediates cell growth and transformation via modulating ERK pathway. *Oncogene*, 20 (45), 6559–6569. Nature Publishing Group. doi:10.1038/sj.onc.1204818
- Linscheid, N., Santos, A., Poulsen, P. C., Mills, R. W., Calloe, K., Leurs, U., Ye, J. Z., Stolte, C., Thomsen, M. B., Bentzen, B. H., Lundegaard, P. R., Olesen, M. S., Jensen, L. J., Olsen, J. V. & Lundby, A. (2021). Quantitative proteome comparison of human hearts with those of model organisms. *PLOS Biology*, 19 (4), e3001144. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pbio.3001144
- Liu, Q.-R., Zhang, P.-W., Zhen, Q., Walther, D., Wang, X.-B. & Uhl, G. R. (2002). KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (15), 13312–13320. doi:10.1074/jbc.M107558200
- Liu, R. (2021). Complex functionality of protein phosphatase 1 isoforms in the heart. *Cellular Signalling*, 85, 110059. doi:10.1016/j.cellsig.2021.110059

- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25 (4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lörchner, H., Widera, C., Hou, Y., Elsässer, A., Warnecke, H., Giannitsis, E., Hulot, J.-S., Braun, T., Wollert, K. C. & Pöling, J. (2018). Reg3 β is associated with cardiac inflammation and provides prognostic information in patients with acute coronary syndrome. *International Journal of Cardiology*, 258, 7–13. doi:10.1016/j.ijcard.2018.01.043
- Loucks, A. D., O'Hara, T. & Trayanova, N. A. (2018). Degradation of T-Tubular Microdomains and Altered cAMP Compartmentation Lead to Emergence of Arrhythmogenic Triggers in Heart Failure Myocytes: An in silico Study. *Frontiers in Physiology*, 9, 1737. doi:10.3389/fphys.2018.01737
- Lu, D., Zhang, Li, Bao, D., Lu, Y., Zhang, X., Liu, N., Ge, W., Gao, X., Li, H. & Zhang, Lianfeng. (2014). Calponin1 inhibits dilated cardiomyopathy development in mice through the ϵ PKC pathway. *International Journal of Cardiology*, 173 (2), 146–153. Elsevier. doi:10.1016/j.ijcard.2014.02.032
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. Stuttgart: Thieme.
- Ly, T., Moroz, N., Pappas, C. T., Novak, S. M., Tolkatchev, D., Wooldridge, D., Mayfield, R. M., Helms, G., Gregorio, C. C. & Kostyukova, A. S. (2016). The N-terminal tropomyosin- and actin-binding sites are important for leiomodin 2's function. *Molecular Biology of the Cell*, 27 (16), 2565–2575. doi:10.1091/mbc.E16-03-0200
- Ma, X., Zhao, H., Shan, J., Long, F., Chen, Yaoyao, Chen, Yingyu, Zhang, Y., Han, X. & Ma, D. (2007). PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 18 (6), 1965–1978. doi:10.1091/mbc.e06-07-0608
- Madsen, C. D., Hooper, S., Tozluoglu, M., Bruckbauer, A., Fletcher, G., Erler, J. T., Bates, P. A., Thompson, B. & Sahai, E. (2015). STRIPAK components determine mode of cancer cell migration and metastasis. *Nature cell biology*, 17 (1), 68–80. doi:10.1038/ncb3083
- Mao, Z. & Nakamura, F. (2020). Structure and Function of Filamin C in the Muscle Z-Disc. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (8), E2696. doi:10.3390/ijms21082696
- Mardakheh, F. K., Self, A. & Marshall, C. J. (2016). RHO binding to FAM65A regulates Golgi reorientation during cell migration. *Journal of Cell Science*, 129 (24), 4466–4479. doi:10.1242/jcs.198614
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A. J., Seidman, C. E. & Young, J. B. (2006). Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. *Circulation*, 113 (14), 1807–1816. American Heart Association. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287
- Mateus-Seidl, R., Stahl, S., Dengl, S., Birzele, F., Herrmuth, H., Mayer, K., Niederfellner, G., Liu, X.-F., Pastan, I. & Brinkmann, U. (2019). Interplay between reversible phosphorylation and irreversible ADP-ribosylation of eukaryotic translation elongation factor 2. *Biological chemistry*, 400 (4), 501–512. doi:10.1515/hsz-2018-0280
- Mauricio, I. P. M. (2018). Defining the role of the kinase MST4 in the context of the Hippo tumor suppressor pathway.
- McCalmon, S. A., Desjardins, D. M., Ahmad, S., Davidoff, K. S., Snyder, C. M., Sato, K., Ohashi, K., Kielbasa, O. M., Mathew, M., Ewen, E. P., Walsh, K., Gavras, H. & Naya, F. J. (2010). Modulation

- of angiotensin II-mediated cardiac remodeling by the MEF2A target gene Xirp2. *Circulation Research*, 106 (5), 952–960. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209007
- McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M. et al. (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, 42 (36), 3599–3726. doi:10.1093/eurheartj/ehab368
- McHugh, M. L. (2011). Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochemia Medica*, 21 (3), 203–209. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. doi:10.11613/BM.2011.029
- McKenna, W. J., Maron, B. J. & Thiene, G. (2017). Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation Research*, 121 (7), 722–730. American Heart Association. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309711
- McNeill, H., Knebel, A., Arthur, J. S. C., Cuenda, A. & Cohen, P. (2004). A novel UBA and UBX domain protein that binds polyubiquitin and VCP and is a substrate for SAPKs. *Biochemical Journal*, 384 (Pt 2), 391–400. doi:10.1042/BJ20041498
- Meng, J., Qin, Y., Chen, J., Wei, L., Huang, X.-R., Yu, X. & Lan, H.-Y. (2020). Treatment of Hypertensive Heart Disease by Targeting Smad3 Signaling in Mice. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 18, 791–802. doi:10.1016/j.omtm.2020.08.003
- Mesquita, R. F. D. S., Paul, M. A., Valmaseda, A., Francois, A., Jabr, R., Anjum, S., Marber, M. S., Budhram-Mahadeo, V. & Heads, R. J. (2014). Protein kinase C ϵ -calcineurin cosignaling downstream of toll-like receptor 4 downregulates fibrosis and induces wound healing gene expression in cardiac myofibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 34 (4), 574–594. doi:10.1128/MCB.01098-13
- Mi-Mi, L., Farman, G. P., Mayfield, R. M., Strom, J., Chu, M., Pappas, C. T. & Gregorio, C. C. (2020). In vivo elongation of thin filaments results in heart failure. *PloS One*, 15 (1), e0226138. doi:10.1371/journal.pone.0226138
- Molenaar, B., Timmer, L. T., Droog, M., Perini, I., Versteeg, D., Kooijman, L., Monshouwer-Kloots, J., de Ruiter, H., Gladka, M. M. & van Rooij, E. (2021). Single-cell transcriptomics following ischemic injury identifies a role for B2M in cardiac repair. *Communications Biology*, 4 (1), 146. doi:10.1038/s42003-020-01636-3
- 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), 215–228. doi:10.1016/s0092-8674(00)81573-1
- Mommersteeg, M. T. M., Yeh, M. L., Parnavelas, J. G. & Andrews, W. D. (2015). Disrupted Slit-Robo signalling results in membranous ventricular septum defects and bicuspid aortic valves. *Cardiovascular Research*, 106 (1), 55–66. doi:10.1093/cvr/cvv040
- Moya-Mendez, M. E., Ogbonna, C., Ezekian, J. E., Rosamilia, M. B., Prange, L., de la Uz, C., Kim, J. J., Howard, T., Garcia, J., Nussbaum, R., Truty, R., Callis, T. E., Funk, E., Heyes, M., Dear, G. de L., Carboni, M. P., Idriss, S. F., Mikati, M. A. & Landstrom, A. P. (2021). ATP1A3-Encoded Sodium-Potassium ATPase Subunit Alpha 3 D801N Variant Is Associated With Shortened QT Interval and Predisposition to Ventricular Fibrillation Preceded by Bradycardia. *Journal of the American Heart Association*, 10 (17), e019887. doi:10.1161/JAHA.120.019887
- Murphy, S. A., Miyamoto, M., Kervadec, A., Kannan, S., Tampakakis, E., Kambhampati, S., Lin, B. L., Paek, S., Andersen, P., Lee, D.-I., Zhu, R., An, S. S., Kass, D. A., Uosaki, H., Colas, A. R. & Kwon,

- C. (2021). PGC1/PPAR drive cardiomyocyte maturation at single cell level via YAP1 and SF3B2. *Nature Communications*, 12 (1), 1648. doi:10.1038/s41467-021-21957-z
- Nader, M. (2019). The SLMAP/Striatin complex: An emerging regulator of normal and abnormal cardiac excitation-contraction coupling. *European Journal of Pharmacology*, 858, 172491. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172491
- Nairn, A. C. & Palfrey, H. C. (1987). Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 262 (36), 17299–17303.
- Nakajima, Y. (2019). Retinoic acid signaling in heart development. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 57 (7–8), e23300. doi:10.1002/dvg.23300
- Nakamura, M. & Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews. Cardiology*, 15 (7), 387–407. doi:10.1038/s41569-018-0007-y
- Nallanthighal, S., Heiserman, J. P. & Cheon, D.-J. (2021). Collagen Type XI Alpha 1 (COL11A1): A Novel Biomarker and a Key Player in Cancer. *Cancers*, 13 (5), 935. doi:10.3390/cancers13050935
- Nicholson, A. M. & Rademakers, R. (2016). What we know about TMEM106B in neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, 132 (5), 639–651. doi:10.1007/s00401-016-1610-9
- Obara, M., Sato, S., Takahashi, K., Kondo, Y., Hirose, M., Nata, K. & Taira, E. (2021). Expression of cell adhesion molecule, Gicerin/CD146 during the formation of heart and in the cardiac hypertrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476 (5), 2021–2028. doi:10.1007/s11010-021-04068-7
- Panneerselvam, M., Patel, H. H. & Roth, D. M. (2012). Caveolins and Heart Diseases. In J.-F. Jasmin, P.G. Frank & M.P. Lisanti (Hrsg.), *Caveolins and Caveolae: Roles in Signaling and Disease Mechanisms* (S. 145–156). New York, NY: Springer US. doi:10.1007/978-1-4614-1222-9_10
- Park, J., Tacam, M. J., Chauhan, G., Cohen, E. N., Gagliardi, M., Iles, L. R., Ueno, N. T., Battula, V. L., Sohn, Y.-K., Wang, X., Kim, H.-S., Krishnamurthy, S., Fowlkes, N. W., Green, M. M., Bartholomeusz, G. A., Tripathy, D., Reuben, J. M. & Bartholomeusz, C. (2021). Nonphosphorylatable PEA15 mutant inhibits epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer partly through the regulation of IL-8 expression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 189 (2), 333–345. doi:10.1007/s10549-021-06316-2
- Peng, W., Wu, X., Feng, D., Zhang, Y., Chen, X., Ma, C., Shen, H., Li, X., Li, H., Zhang, J. & Chen, G. (2020). Cerebral cavernous malformation 3 relieves subarachnoid hemorrhage-induced neuroinflammation in rats through inhibiting NF-κB signaling pathway. *Brain Research Bulletin*. doi:10.1016/j.brainresbull.2020.04.003
- Perez-Dominguez, F., Carrillo-Beltrán, D., Blanco, R., Muñoz, J. P., León-Cruz, G., Corvalan, A. H., Urzúa, U., Calaf, G. M. & Aguayo, F. (2021). Role of Pirin, an Oxidative Stress Sensor Protein, in Epithelial Carcinogenesis. *Biology*, 10 (2), 116. doi:10.3390/biology10020116
- Pinder, J. C., Taylor-Harris, P. M., Bennett, P. M., Carter, E., Hayes, N. V. L., King, M. D. A., Holt, M. R., Maggs, A. M., Gascard, P. & Baines, A. J. (2012). Isoforms of protein 4.1 are differentially distributed in heart muscle cells: relation of 4.1R and 4.1G to components of the Ca²⁺ homeostasis system. *Experimental Cell Research*, 318 (13), 1467–1479. doi:10.1016/j.yexcr.2012.03.003
- Preisinger, C., Short, B., De Corte, V., Bruyneel, E., Haas, A., Kopajtich, R., Gettemans, J. & Barr, F. A. (2004). YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration

- through its substrate 14-3-3zeta. *The Journal of Cell Biology*, 164 (7), 1009–1020. doi:10.1083/jcb.200310061
- Qian, Z., Lin, C., Espinosa, R., LeBeau, M. & Rosner, M. R. (2001). Cloning and characterization of MST4, a novel Ste20-like kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (25), 22439–22445. doi:10.1074/jbc.M009323200
- Ralphe, J. C., Bedell, K., Segar, J. L. & Scholz, T. D. (2005). Correlation between myocardial malate/aspartate shuttle activity and EAAT1 protein expression in hyper- and hypothyroidism. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 288 (5), H2521–2526. doi:10.1152/ajpheart.00991.2004
- Rangrez, A. Y., Hoppe, P., Kuhn, C., Zille, E., Frank, J., Frey, N. & Frank, D. (2017). MicroRNA miR-301a is a novel cardiac regulator of Cofilin-2. *PLoS ONE*, 12 (9), e0183901. doi:10.1371/journal.pone.0183901
- Rangrez, A. Y., Pott, J., Kluge, A., Frauen, R., Stiebeling, K., Hoppe, P., Sossalla, S., Frey, N. & Frank, D. (2017). Myeloid leukemia factor-1 is a novel modulator of neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864 (4), 634–644. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.01.004
- Rapanotti, M. C., Cugini, E., Nuccetelli, M., Terrinoni, A., Di Raimondo, C., Lombardo, P., Costanza, G., Cosio, T., Rossi, P., Orlandi, A., Campione, E., Bernardini, S., Blot-Chabaud, M. & Bianchi, L. (2021). MCAM/MUC18/CD146 as a Multifaceted Warning Marker of Melanoma Progression in Liquid Biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (22), 12416. doi:10.3390/ijms222212416
- Ravi, V., Jain, A., Taneja, A., Chatterjee, K. & Sundaresan, N. R. (2021). Isolation and Culture of Neonatal Murine Primary Cardiomyocytes. *Current Protocols*, 1 (7), e196. doi:10.1002/cpz1.196
- Record, C. J., Chaikuad, A., Rellos, P., Das, S., Pike, A. C. W., Fedorov, O., Marsden, B. D., Knapp, S. & Lee, W. H. (2010). Structural Comparison of Human Mammalian Ste20-Like Kinases. *PLoS ONE*, 5 (8). Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pone.0011905
- Ren, L., Hong, S. H., Cassavaugh, J., Osborne, T., Chou, A. J., Kim, S. Y., Gorlick, R., Hewitt, S. M. & Khanna, C. (2009). The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC. *Oncogene*, 28 (6), 792–802. doi:10.1038/onc.2008.437
- Ritchie, H. & Roser, M. (2018). Causes of Death. *Our World in Data*.
- Rodríguez, M., Lucchesi, B. R. & Schaper, J. (2002). Apoptosis in myocardial infarction. *Annals of Medicine*, 34 (6), 470–479. Taylor & Francis. doi:10.1080/078538902321012414
- Roser, M. & Ritchie, H. (2016). Burden of Disease. *Our World in Data*.
- Sato, M. & Nagano, T. (2005). Involvement of filamin A and filamin A-interacting protein (FILIP) in controlling the start and cell shape of radially migrating cortical neurons. *Anatomical Science International*, 80 (1), 19–29. doi:10.1111/j.1447-073x.2005.00101.x
- Scott, D. A. & Sherr, E. H. (1993). RERE-Related Disorders. In M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K.W. Gripp, G.M. Mirzaa & A. Amemiya (Hrsg.), *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Zugriff am 1.4.2022. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538938/>
- Sequeira, V., Nijenkamp, L. L. A. M., Regan, J. A. & van der Velden, J. (2014). The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1838 (2), 700–722. doi:10.1016/j.bbamem.2013.07.011

- Sharma, A., Fonarow, G. C., Butler, J., Ezekowitz, J. A. & Felker, G. M. (2016). Coenzyme Q10 and Heart Failure: A State-of-the-Art Review. *Circulation. Heart Failure*, 9 (4), e002639. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002639
- Sharma, P., Wang, X., Ming, C. L. C., Vettori, L., Figtree, G., Boyle, A. & Gentile, C. (2021). Considerations for the Bioengineering of Advanced Cardiac In Vitro Models of Myocardial Infarction. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 17 (15), e2003765. doi:10.1002/smll.202003765
- Shattock, M. J. (2009). Phospholemman: its role in normal cardiac physiology and potential as a drugable target in disease (Cardiovascular and renal). *Current Opinion in Pharmacology*, 9 (2), 160–166. doi:10.1016/j.coph.2008.12.015
- Sheikh-Hamad, D., Bick, R., Wu, G.-Y., Christensen, B. M., Razeghi, P., Poindexter, B., Taegtmeyer, H., Wamsley, A., Padda, R., Entman, M., Nielsen, S. & Youker, K. (2003). Stanniocalcin-1 is a naturally occurring L-channel inhibitor in cardiomyocytes: relevance to human heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285 (1), H442-448. doi:10.1152/ajpheart.01071.2002
- Shen, Y., Zhang, X., Li, C., Wang, X., Ye, Y., Yuan, J., Gong, H., Zou, Y. & Ge, J. (2020). Pressure overload promotes cystatin C secretion of cardiomyocytes to regulate the MAPK signaling pathway and mediate cardiac hypertrophy. *Annals of Translational Medicine*, 8 (22), 1514. doi:10.21037/atm-20-7041
- Shi, Z., Jiao, S., Zhang, Zhen, Ma, M., Zhang, Zhao, Chen, C., Wang, K., Wang, H., Wang, W., Zhang, L., Zhao, Y. & Zhou, Z. (2013). Structure of the MST4 in Complex with MO25 Provides Insights into Its Activation Mechanism. *Structure*, 21 (3), 449–461. doi:10.1016/j.str.2013.01.007
- Shi, Z., Jiao, S. & Zhou, Z. (2016). STRIPAK complexes in cell signaling and cancer. *Oncogene*, 35 (35), 4549–4557. doi:10.1038/onc.2016.9
- Simonavičius, J., Mikalauskas, A. & Brunner-La Rocca, H.-P. (2021). Soluble CD146-an underreported novel biomarker of congestion: a comment on a review concerning congestion assessment and evaluation in acute heart failure. *Heart Failure Reviews*, 26 (3), 731–732. doi:10.1007/s10741-020-09950-y
- Singh, R. M., Cummings, E., Pantos, C. & Singh, J. (2017). Protein kinase C and cardiac dysfunction: a review. *Heart Failure Reviews*, 22 (6), 843–859. doi:10.1007/s10741-017-9634-3
- Smyth, J. W., Hong, T.-T., Gao, D., Vogan, J. M., Jensen, B. C., Fong, T. S., Simpson, P. C., Stainier, D. Y. R., Chi, N. C. & Shaw, R. M. (2010). Limited forward trafficking of connexin 43 reduces cell-cell coupling in stressed human and mouse myocardium. *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (1), 266–279. doi:10.1172/JCI39740
- Srisakuldee, W., Makazan, Z., Nickel, B. E., Zhang, F., Thliveris, J. A., Pasumarthi, K. B. S. & Kardami, E. (2014). The FGF-2-triggered protection of cardiac subsarcolemmal mitochondria from calcium overload is mitochondrial connexin 43-dependent. *Cardiovascular Research*, 103 (1), 72–80. doi:10.1093/cvr/cvu066
- Statistisches Bundesamt (Destatis). (2021, Februar 18). Tiefgegliederte Diagnosedaten der Krankenhauspatientinnen und -patienten 2019. Zugriff am 26.1.2021. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Publikationen/Downloads-Krankenhaeuser/tiefgegliederte-diagnosedaten-5231301177015.html>

- Su, C.-H., Cheng, C., Tzeng, T.-Y., Lin, I.-H. & Hsu, M.-T. (2016). An H2A Histone Isoform, H2ac, Associates with Telomere and Maintains Telomere Integrity. *PloS One*, 11 (5), e0156378. doi:10.1371/journal.pone.0156378
- Su, Y. R., Chiusa, M., Brittain, E., Hemnes, A. R., Absi, T. S., Lim, C. C. & Di Salvo, T. G. (2015). Right ventricular protein expression profile in end-stage heart failure. *Pulmonary Circulation*, 5 (3), 481–497. doi:10.1086/682219
- Sugden, P. H., McGuffin, L. J. & Clerk, A. (2013). SOCK, MiSTs, MASK and STICKs: the GCKIII (germline centre kinase III) kinases and their heterologous protein-protein interactions. *The Biochemical Journal*, 454 (1), 13–30. doi:10.1042/BJ20130219
- Suzuki, S., Suzuki, N., Mori, J.-I., Oshima, A., Usami, S. & Hashizume, K. (2007). micro-Crystallin as an intracellular 3,5,3'-triiodothyronine holder in vivo. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21 (4), 885–894. doi:10.1210/me.2006-0403
- Tang, Y., Chen, M., Zhou, L., Ma, J., Li, Y., Zhang, H., Shi, Z., Xu, Q., Zhang, X., Gao, Z., Zhao, Y., Cheng, Y., Jiao, S. & Zhou, Z. (2019). Architecture, substructures, and dynamic assembly of STRIPAK complexes in Hippo signaling. *Cell Discovery*, 5 (1), 3. doi:10.1038/s41421-018-0077-3
- The UniProt Consortium. (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49 (D1), D480–D489. doi:10.1093/nar/gkaa1100
- Tie, S. R., McCarthy, D. J., Kendrick, T. S., Louw, A., Le, C., Satiaputra, J., Kucera, N., Phillips, M. & Ingley, E. (2016). Regulation of sarcoma cell migration, invasion and invadopodia formation by AFAP1L1 through a phosphotyrosine-dependent pathway. *Oncogene*, 35 (16), 2098–2111. doi:10.1038/onc.2015.272
- Tsai, F.-C., Chen, Y.-L., Yen, K.-C., Chiu, C.-H., Chen, J.-H., Yeh, Y.-H. & Tsai, P.-C. (2021). Gene Expression Changes of Humans with Primary Mitral Regurgitation and Reduced Left Ventricular Ejection Fraction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (7), 3454. doi:10.3390/ijms22073454
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C. A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.-H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. & Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347 (6220), 1260419. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/science.1260419
- Vary, T. C., Nairn, A. & Lynch, C. J. (1994). Role of elongation factor 2 in regulating peptide-chain elongation in the heart. *The American Journal of Physiology*, 266 (4 Pt 1), E628-634. doi:10.1152/ajpendo.1994.266.4.E628
- Wang, D., Fang, J., Lv, J., Pan, Z., Yin, X., Cheng, H. & Guo, X. (2019). Novel polymorphisms in PDLIM3 and PDLIM5 gene encoding Z-line proteins increase risk of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23 (10), 7054–7062. doi:10.1111/jcmm.14607
- Wang, J., Liu, S., Heallen, T. & Martin, J. F. (2018). The Hippo pathway in the heart: pivotal roles in development, disease, and regeneration. *Nature Reviews. Cardiology*, 15 (11), 672–684. doi:10.1038/s41569-018-0063-3
- Wang, L., Shen, S., Xiao, H., Ding, F., Wang, M., Li, G. & Hu, F. (2020). ARHGAP24 inhibits cell proliferation and cell cycle progression and induces apoptosis of lung cancer via a STAT6-WWP2-p27 axis. *Carcinogenesis*, 41 (5), 711–721. doi:10.1093/carcin/bgz144

- Wang, X., Zhang, X., Chen, Y., Zhao, C., Zhou, W., Chen, W., Zhang, C., Ding, K., Li, W., Xu, H., Lou, L., Chu, Z., Hu, S. & Yang, J. (2021). Cardiac-specific deletion of FDPS induces cardiac remodeling and dysfunction by enhancing the activity of small GTP-binding proteins. *The Journal of Pathology*, 255 (4), 438–450. doi:10.1002/path.5789
- Westberg, J. A., Serlachius, M., Lankila, P. & Andersson, L. C. (2007). Hypoxic preconditioning induces elevated expression of stanniocalcin-1 in the heart. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293 (3), H1766-1771. doi:10.1152/ajpheart.00017.2007
- Will, R. D., Eden, M., Just, S., Hansen, A., Eder, A., Frank, D., Kuhn, C., Seeger, T. S., Oehl, U., Wiemann, S., Korn, B., Koegl, M., Rottbauer, W., Eschenhagen, T., Katus, H. A. & Frey, N. (2010). Myomasp/LRRC39, a heart- and muscle-specific protein, is a novel component of the sarcomeric M-band and is involved in stretch sensing. *Circulation Research*, 107 (10), 1253–1264. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.222372
- Wittig, I. & Malacarne, P. F. (2021). Complexome Profiling: Assembly and Remodeling of Protein Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (15), 7809. doi:10.3390/ijms22157809
- Wörthmüller, J. & Rüegg, C. (2021). MAGI1, a Scaffold Protein with Tumor Suppressive and Vascular Functions. *Cells*, 10 (6), 1494. doi:10.3390/cells10061494
- Wu, X., Wu, J., Hu, W., Wang, Q., Liu, H., Chu, Z., Lv, K. & Xu, Y. (2020). MST4 Kinase Inhibitor Hesperadin Attenuates Autophagy and Behavioral Disorder via the MST4/AKT Pathway in Intracerebral Hemorrhage Mice. *Behavioural Neurology*, 2020. Hindawi Limited. doi:10.1155/2020/2476861
- Wypijewski, K. J., Howie, J., Reilly, L., Tulloch, L. B., Aughton, K. L., McLatchie, L. M., Shattock, M. J., Calaghan, S. C. & Fuller, W. (2013). A Separate Pool of Cardiac Phospholemman That Does Not Regulate or Associate with the Sodium Pump. *The Journal of Biological Chemistry*, 288 (19), 13808–13820. doi:10.1074/jbc.M113.460956
- Xia, P., Liu, Y. & Cheng, Z. (2016). Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis. *BioMed Research International*, 2016, 9583268. doi:10.1155/2016/9583268
- Xie, Y., Sun, M., Lou, X., Zhang, C., Han, F., Zhang, B., Wang, P. & Lu, Y. (2014). Overexpression of PEP-19 suppresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Pharmacological Sciences*, 125 (3), 274–282. doi:10.1254/jphs.13208fp
- Xiong, W., Knox, A. J., Xu, M., Kiseljak-Vassiliades, K., Colgan, S. P., Brodsky, K. S., Kleinschmidt-Demasters, B. K., Lillehei, K. O. & Wierman, M. E. (2015). Mammalian Ste20-like kinase 4 promotes pituitary cell proliferation and survival under hypoxia. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 29 (3), 460–472. doi:10.1210/me.2014-1332
- Xiong, W., Matheson, C. J., Xu, M., Backos, D. S., Mills, T. S., Salian-Mehta, S., Kiseljak-Vassiliades, K., Reigan, P. & Wierman, M. E. (2016). Structure-Based Screen Identification of a Mammalian Ste20-like Kinase 4 (MST4) Inhibitor with Therapeutic Potential for Pituitary Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15 (3), 412–420. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0703
- Yang, L.-W., Qin, D.-Z., James, E., McKallip, R. J., Wang, N.-P., Zhang, W.-W., Zheng, R.-H., Han, Q.-H. & Zhao, Z.-Q. (2019). CD44 Deficiency in Mice Protects the Heart Against Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 51 (3), 372–380. doi:10.1097/SHK.0000000000001132
- Yang, Z., Kirton, H. M., MacDougall, D. A., Boyle, J. P., Deuchars, J., Frater, B., Ponnambalam, S., Hardy, M. E., White, E., Calaghan, S. C., Peers, C. & Steele, D. S. (2015). The Golgi apparatus is a functionally distinct Ca²⁺ store regulated by the PKA and Epac branches of the β 1-adrenergic

- signaling pathway. *Science Signaling*, 8 (398), ra101–ra101. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/scisignal.aaa7677
- Yang, Z., Li, L., Ling, J., Liu, T., Huang, X., Ying, Y., Zhao, Yun, Zhao, Yan, Lei, K., Chen, L. & Chen, Z. (2020). Cyclooctatetraene-conjugated cyanine mitochondrial probes minimize phototoxicity in fluorescence and nanoscopic imaging. *Chemical Science*, 11 (32), 8506–8516. doi:10.1039/d0sc02837a
- Yong, J. I., Kim, D. W., Shin, M. J., Jo, H. S., Park, J. H., Cho, S. B., Lee, C. H., Yeo, H. J., Yeo, E. J., Choi, Y. J., Kim, J. A., Hwang, J. S., Kim, D.-S., Kim, H. A., Cho, Y.-J., Lee, K. W., Han, K. H., Park, J., Eum, W. S. & Choi, S. Y. (2018). PEP-1-PEA15 suppresses inflammatory responses by regulation of MAPK in macrophages and animal models. *Immunobiology*, 223 (11), 709–717. doi:10.1016/j.imbio.2018.07.019
- Yoshimachi, S., Shirakawa, R., Cao, M., Trinh, D. A., Gao, P., Sakata, N., Miyazaki, K., Goto, K., Miura, T., Ariake, K., Maeda, S., Masuda, K., Ishida, M., Ohtsuka, H., Unno, M. & Horiuchi, H. (2021). Ral GTPase-activating protein regulates the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Science*, 112 (8), 3064–3073. doi:10.1111/cas.14970
- Yu, H., Tang, H., Deng, C., Lin, Q., Yu, P., Chen, S. & Ruan, J. (2021). RRM2 Improves Cardiomyocyte Proliferation after Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through the Hippo-YAP Pathway. *Disease Markers*, 2021, 5089872. doi:10.1155/2021/5089872
- Yuan, X., Yao, P. Y., Jiang, J., Zhang, Y., Su, Z., Yao, W., Wang, X., Gui, P., Mullen, M., Henry, C., Ward, T., Wang, W., Brako, L., Tian, R., Zhao, X., Wang, F., Cao, X., Wang, D., Liu, X., Ding, X. & Yao, X. (2017). MST4 kinase phosphorylates ACAP4 protein to orchestrate apical membrane remodeling during gastric acid secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 292 (39), 16174–16187. doi:10.1074/jbc.M117.808212
- Zahler, R., Sun, W., Ardito, T. & Kashgarian, M. (1996). Na-K-ATPase alpha-isoform expression in heart and vascular endothelia: cellular and developmental regulation. *The American Journal of Physiology*, 270 (1 Pt 1), C361–371. doi:10.1152/ajpcell.1996.270.1.C361
- Zalesak-Kravec, S., Huang, W., Jones, J. W., Yu, J., Alloush, J., Defnet, A. E., Moise, A. R. & Kane, M. A. (2022). Role of cellular retinol-binding protein, type 1 and retinoid homeostasis in the adult mouse heart: A multi-omic approach. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36 (4), e22242. doi:10.1096/fj.202100901RRR
- Zervou, S., Whittington, H. J., Ostrowski, P. J., Cao, F., Tyler, J., Lake, H. A., Neubauer, S. & Lygate, C. A. (2017). Increasing creatine kinase activity protects against hypoxia / reoxygenation injury but not against anthracycline toxicity in vitro. *PloS One*, 12 (8), e0182994. doi:10.1371/journal.pone.0182994
- Zhang, H., Lin, M., Dong, C., Tang, Y., An, L., Ju, J., Wen, F., Chen, F., Wang, M., Wang, W., Chen, M., Zhao, Y., Li, J., Hou, S. X., Lin, X., Hu, L., Bu, W., Wu, D., Li, L., Jiao, S. & Zhou, Z. (2021). An MST4-p β -CateninThr40 Signaling Axis Controls Intestinal Stem Cell and Tumorigenesis. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 8 (17), e2004850. doi:10.1002/advs.202004850
- Zhang, J., Liang, R., Wang, K., Zhang, W., Zhang, M., Jin, L., Xie, P., Zheng, W., Shang, H., Hu, Q., Li, J., Chen, G., Wu, F., Lan, F., Wang, L., Wang, S.-Q., Li, Y., Zhang, Yong, Liu, J., Lv, F., Hu, X., Xiao, R.-P., Lei, X. & Zhang, Yan. (2022). Novel CaMKII- δ Inhibitor Hesperadin Exerts Dual Functions to Ameliorate Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury and Inhibit Tumor Growth. *Circulation*. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055920

- Zhang, K.-Z., Shen, X.-Y., Wang, M., Wang, L., Sun, H.-X., Li, X.-Z., Huang, J.-J., Li, X.-Q., Wu, C., Zhao, C., Liu, J.-L., Lu, X. & Gao, W. (2021). Retinol-Binding Protein 4 Promotes Cardiac Injury After Myocardial Infarction Via Inducing Cardiomyocyte Pyroptosis Through an Interaction With NLRP3. *Journal of the American Heart Association*, 10 (22), e022011. doi:10.1161/JAHA.121.022011
- Zhao, J. & Mommersteeg, M. T. M. (2018). Slit-Robo signalling in heart development. *Cardiovascular Research*, 114 (6), 794–804. doi:10.1093/cvr/cvy061
- Zhou, C., Li, J., Du, J., Jiang, X., Xu, X., Liu, Y., He, Q., Liang, H., Fang, P., Zhan, H. & Zeng, H. (2021). HMGCS1 drives drug-resistance in acute myeloid leukemia through endoplasmic reticulum-UPR-mitochondria axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 137, 111378. doi:10.1016/j.biopha.2021.111378
- Zhou, T., Zhang, Y., Wu, P., Sun, Q. & Guo, Y. (2015). Screening Feature Genes of Venous Thromboembolism with DNA Microarray. *Chemical Biology & Drug Design*, 86 (4), 821–828. doi:10.1111/cbdd.12557

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Kardiovaskuläre Erkrankungen haben den größten Anteil an der weltweiten Krankheitslast (adaptiert nach Roser & Ritchie, 2016)	1
Abbildung 1-2: Signalwege der pathologischen Hypertrophie (Nakamura & Sadoshima, 2018)	6
Abbildung 1-3: Schematischer Aufbau eines STRIPAK-Komplexes (adaptiert nach Hwang & Pallas, 2014; Tang et al., 2019)	12
Abbildung 1-4: Struktur von MST4 (Record et al., 2010 (A); Shi et al., 2013 (B))	15
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der adenoviralen Überexpression	45
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Funktionsweise von siRNA	47
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Kultivierung von NRVC in Hypoxie	50
Abbildung 3-1: MST4 wird im Herzen stark exprimiert	70
Abbildung 3-2: MST4 wird in Herzen von Patienten mit dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie vermehrt exprimiert	71
Abbildung 3-3: MST4 scheint unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen zu haben	72
Abbildung 3-4: MST4 interagiert direkt mit den STRIPAK-Proteinen Myoscape/STRIP2 (A) und Sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP, B) in NRVC	73
Abbildung 3-5: MST4 wird in Herzen von Mäusen ohne funktionsfähiges MLP-Gen (MLP-KO) im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermehrt exprimiert, während die Menge an phosphoryliertem MST4 stabil bleibt	74
Abbildung 3-6: MST4 wird in Herzen von Mäusen ohne funktionsfähiges Calsarcin-1-Gen (CS1-KO) im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermehrt exprimiert, während die Menge an phosphoryliertem MST4 stabil bleibt	75
Abbildung 3-7: MST4 wird in Herzen von transgenen Mäusen mit dauerhafter Aktivierung der Calcineurin Untereinheit A (CnA-TG) im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermindert exprimiert	76
Abbildung 3-8: MST4 wird in Herzen von Mäusen mit verengter transverser Aorta vermindert exprimiert	77
Abbildung 3-9: Stretch führt zu vermehrter MST4-Expression	77
Abbildung 3-10: Unter Hypoxie-Bedingungen wird MST4 vermindert exprimiert	78
Abbildung 3-11: Die Expression von MST4 (A-B), sowie die Gesamtmenge an phosphoryliertem MST4 (pMST4, C-D) ist bei geringer Zelldichte vermindert und scheint bei sehr hoher Zelldichte ebenfalls wieder abzunehmen. Die relative Phosphorylierung pro MST4 bleibt stabil (E-F)	81
Abbildung 3-12: Adenovirale Überexpression von MST4 in Abhängigkeit von Infektionsdosis und Infektionszeit	82
Abbildung 3-13: Bereits vier Tage nach der Transfektion mit siRNA gegen MST4-mRNA wird ein deutlicher Knockdown auf Protein-Ebene erreicht	83

Abbildung 3-14: Die adenovirale Überexpression von MST4 in NRVCN hemmt zentrale Vorgänge der Apoptose	85
Abbildung 3-15: Der Knockdown von MST4 mithilfe von siRNA führt zu keiner signifikanten Regulation der Apoptose	86
Abbildung 3-16: MST4-Überexpression führt zu verminderter Anfärbung von gespaltenen Caspase 3	87
Abbildung 3-17: Hesperadin reduziert die Viabilität von NRVCN	88
Abbildung 3-18: Der Knockdown von MST4 reduziert die Expression von TAZ	89
Abbildung 3-19: MST4-Überexpression führt zu Hypertrophie in NRVCN	90
Abbildung 3-20: MST4-Überexpression hat keine Auswirkung auf die mRNA-Expression der fetalen Gene NPPA, NPPB und RCAN1.4	91
Abbildung 3-21: Überexpression von MST4 in ARVCN und elektrische Stimulation	93
Abbildung 3-22: MST4-Überexpression verbessert Parameter der Kontraktion von Kardiomyozyten	94
Abbildung 3-23: Die Behandlung von MST4-überexprimierenden Zellen mit Hesperadin führt zu veränderten Calciumströmen und -konzentrationen	95
Abbildung 3-24 Cluster-Heatmaps anhand der signifikant regulierten Peptide (A), Phosphopeptide (B) und Proteine (C)	98
Abbildung 4-1: PKC-assoziierte Effekte von MST4	128
Abbildung 5-1: Grafische Zusammenfassung	145
Abbildung 6-1: Graphical abstract	148

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Eingesetzte Primärantikörper.....	31
Tabelle 2-2: Eingesetzte Sekundärantikörper	31
Tabelle 2-3: Eingesetzte Primer für Sybr-Green qRT-PCR	32
Tabelle 2-4: Eingesetzte Primer für Multiplex-qRT-PCR.....	33
Tabelle 2-5: Eingesetzte Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren.....	33
Tabelle 2-6: Eingesetzte siRNA	34
Tabelle 2-7: Eingesetzte adenovirale Konstrukte.....	34
Tabelle 2-8: Eingesetzte Zellzahl in Abhängigkeit von der Zellkulturplatte	38
Tabelle 2-9: Versuchsgruppen des Phosphoproteomics-Versuchs	67
Tabelle 2-10: Kontraste des Phosphoproteomics-Versuchs	69
Tabelle 3-1: Definierte Kontraste sowie Grenzwerte von p-Wert und FC-Wert für die explorative Datenanalyse	97
Tabelle 3-2: Ausgewählte regulierte Untergruppen Kontrast 1.....	99
Tabelle 3-3: Ausgewählte regulierte Untergruppen Kontrast 2.....	100
Tabelle 3-4: Ausgewählte regulierte Untergruppen Kontrast 4.....	100
Tabelle 3-5: Ausgewählte regulierte Untergruppen Kontrast 5.....	101
Tabelle 3-6: Identifizierte Phosphorylierungsstellen von MST4	102
Tabelle 3-7: Ausgewählte mögliche Kinasesubstrate von MST4.....	104
Tabelle 3-8: Bekannte Kinasesubstrate von MST4 in der Untersuchung des Phosphoproteoms.....	104
Tabelle 3-9: Auswahl von durch MST4-Überexpression vermehrt exprimierten Proteinen.....	106
Tabelle 3-10: Auswahl von durch MST4-Überexpression vermindert exprimierten Proteinen	106
Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Protein-Regulation von MST4 und pMST4 unter den untersuchten Bedingungen.....	111
Tabelle 4-2 Zusammenfassung der biologischen Effekte durch adenovirale MST4-Überexpression (MST4-ÜE), MST4-Knockdown mit siRNA (MST4-KD) und Behandlung mit dem Inhibitor Hesperadin	113

11 Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre ohne die großartige Unterstützung einer Vielzahl von Menschen nicht möglich gewesen. Dafür bin ich dankbar. Wissenschaft funktioniert nur in einem guten Team – das ist die wahrscheinlich robusteste Erkenntnis meiner Forschung (bisher). Vielleicht neben der Tatsache, dass die meisten Dinge erst einmal nicht klappen. Aber das ist Thema eines anderen Kapitels.

Ich danke Norbert Frey für die Überlassung des Themas und seine uneingeschränkte Unterstützung vom ersten Gespräch an. Er hat mich nicht nur nachhaltig beeindruckt sondern auch mit seiner Begeisterung für die Wissenschaft anstecken können.

Matthias Eden danke ich für seine enge Betreuung, die weit über das Übliche hinausging. Er war jederzeit für mich ansprechbar, hat Probleme auf jeder Ebene gelöst und hat mir gleichzeitig ein sehr eigenverantwortliches Arbeiten ermöglicht. In seiner souveränen und wertschätzenden Art ist er ein großes Vorbild.

Ich hätte mir keine bessere Unterstützung als Christin wünschen können. Sie hat mich mehr als einmal vor dem Verzweifeln bewahrt und nicht zuletzt viele Ergebnisse in dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht.

Ich danke Ben, dass er sich von mir mit ins (vermeintliche) Verderben hat ziehen lassen ohne die Freundschaft zu kündigen und so manchen Tag im Labor mit gemeinsamem Galgenhumor erträglicher gemacht hat.

Als Medizinstudent war ich auf molekularbiologische Forschung in keinsten Weise vorbereitet und danke daher Linda dafür, dass sie ihren großen Erfahrungsschatz mit mir geteilt hat.

Mein Highlight im Labor waren stets die Menschen, die dort ihre Zeit (mehr oder weniger freiwillig) mit mir verbracht haben. Ich bin dankbar für den Austausch, der mir wissenschaftlich und persönlich sehr geholfen hat und für die Freundschaften, die im Labor entstanden sind.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihre unschätzbare Unterstützung und den wertvollen Ausgleich, den sie mir ermöglichen.

12 Anhang

12.1 Funktionelle Analyse

12.1.1 Kontrast 1 MST4 48 h vs. LacZ 48 h

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0000226:microtubule cytoskeleton organization	27	3.5E-03
GO:0051017:actin filament bundle assembly	15	4.5E-02
GO:0000278:mitotic cell cycle	24	6.3E-02
GO:0006457:protein folding	23	8.3E-02
GO:0060048:cardiac muscle contraction	12	8.3E-02
GO:1900026:positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	9	8.6E-02
GO:0008360:regulation of cell shape	22	8.8E-02
GO:0035023:regulation of Rho protein signal transduction	15	1.6E-01
GO:1990090:cellular response to nerve growth factor stimulus	20	1.6E-01
GO:0048812:neuron projection morphogenesis	16	2.2E-01
GO:0051301:cell division	41	2.2E-01
GO:0007017:microtubule-based process	11	2.2E-01
GO:0005975:carbohydrate metabolic process	16	2.3E-01
GO:0016021:integral component of membrane	76	4.1E-05
GO:0005737:cytoplasm	452	6.2E-05
GO:0005874:microtubule	60	1.2E-03
GO:0005884:actin filament	27	1.5E-02
GO:0030018:Z disc	31	1.5E-02
GO:0005856:cytoskeleton	46	2.1E-02
GO:0016363:nuclear matrix	24	2.5E-02
GO:0005575:cellular_component	88	3.6E-02
GO:0005913:cell-cell adherens junction	14	4.2E-02
GO:0014704:intercalated disc	17	4.2E-02
GO:0042383:sarcolemma	32	4.2E-02
GO:0044295:axonal growth cone	9	4.6E-02
GO:0030016:myofibril	14	6.2E-02
GO:0042470:melanosome	30	6.6E-02
GO:0005743:mitochondrial inner membrane	15	7.0E-02
GO:0005789:endoplasmic reticulum membrane	29	7.0E-02
GO:0032991:macromolecular complex	90	9.2E-02
GO:0001725:stress fiber	16	1.3E-01
GO:0005925:focal adhesion	29	1.3E-01
GO:0016327:apicolateral plasma membrane	6	1.3E-01
GO:0051015:actin filament binding	42	5.3E-03
GO:0005515:protein binding	344	7.1E-03
GO:0003779:actin binding	42	1.7E-02
GO:0005198:structural molecule activity	24	1.7E-02
GO:0008017:microtubule binding	39	1.7E-02
GO:0051082:unfolded protein binding	28	1.7E-02
GO:0042802:identical protein binding	81	3.4E-02
GO:0003700:DNA binding transcription factor activity	11	9.3E-02
GO:0005080:protein kinase C binding	14	1.2E-01
GO:0003674:molecular_function	124	1.2E-01
GO:0005201:extracellular matrix structural constituent	7	1.2E-01
GO:0019901:protein kinase binding	63	1.6E-01
GO:0005178:integrin binding	16	2.3E-01
GO:0005200:structural constituent of cytoskeleton	13	2.3E-01
GO:0043236:laminin binding	6	2.3E-01
GO:0004674:protein serine/threonine kinase activity	46	2.3E-01
GO:0005504:fatty acid binding	7	2.3E-01
GO:0005524:ATP binding	176	2.3E-01
GO:0030674:protein binding, bridging	13	2.3E-01

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
Axon guidance [Reactome]	40	1.9E-03
Semaphorin interactions [Reactome]	13	1.9E-03
HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR) [Reactome]	17	6.4E-03
Muscle contraction [Reactome]	27	6.7E-03
L1CAM interactions [Reactome]	20	1.2E-02
Recycling pathway of L1 [Reactome]	14	1.3E-02
Striated Muscle Contraction [Reactome]	10	1.3E-02
MHC class II antigen presentation [Reactome]	22	2.3E-02
Cellular responses to stress [Reactome]	44	3.0E-02
Developmental Biology [Reactome]	43	3.0E-02
Recruitment of NuMA to mitotic centrosomes [Reactome]	15	3.0E-02
Rho GTPase cycle [Reactome]	15	3.0E-02
RHO GTPases activate IQGAPs [Reactome]	11	3.4E-02
Factors involved in megakaryocyte development and platelet production [Reactome]	20	3.9E-02
Gap junction assembly [Reactome]	8	3.9E-02
Mitotic Prometaphase [Reactome]	25	3.9E-02
M Phase [Reactome]	35	4.4E-02
Gap junction trafficking [Reactome]	11	5.6E-02
HSF1-dependent transactivation [Reactome]	10	5.6E-02
Kinesins [Reactome]	11	5.6E-02

Reguliert auf Phosphopeptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0006468:protein phosphorylation	39	1.7E-01
GO:0030018:Z disc	21	6.0E-02
GO:0005840:ribosome	6	1.2E-01
GO:0014069:postsynaptic density	32	1.2E-01
GO:0015629:actin cytoskeleton	13	1.2E-01
GO:0030054:cell junction	29	1.2E-01
GO:0043025:neuronal cell body	38	1.2E-01
GO:0045211:postsynaptic membrane	17	1.2E-01
GO:0016529:sarcoplasmic reticulum	7	1.2E-01
GO:0044295:axonal growth cone	6	1.3E-01
GO:0005884:actin filament	14	1.3E-01
GO:0014704:intercalated disc	11	1.3E-01
GO:0030016:myofibril	8	1.3E-01
GO:0030425:dendrite	35	1.3E-01
GO:0005882:intermediate filament	7	1.4E-01
GO:0005912:adherens junction	7	1.4E-01
GO:0005925:focal adhesion	20	1.4E-01
GO:0000932:P-body	8	1.5E-01
GO:0005575:cellular_component	25	1.5E-01
GO:0005886:plasma membrane	97	1.5E-01
GO:0005923:bicellular tight junction	11	1.6E-01
GO:0004674:protein serine/threonine kinase activity	36	4.3E-02
GO:0005198:structural molecule activity	12	8.8E-02
GO:0003779:actin binding	25	1.7E-01
GO:0051015:actin filament binding	21	1.7E-01
GO:0005080:protein kinase C binding	10	2.0E-01
GO:0003674:molecular_function	34	2.4E-01
Kinase Substrates: CDC2	5	4.5E-02

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0009615:response to virus	6	7,91E-02
GO:0043434:response to peptide hormone	10	7,91E-02
GO:0006936:muscle contraction	5	1,26E-01
GO:0007010:cytoskeleton organization	6	1,26E-01
GO:0007015:actin filament organization	6	1,26E-01

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0007155:cell adhesion	10	1,26E-01
GO:0007175:negative regulation of epidermal growth factor-activated receptor activity	2	1,26E-01
GO:0007193:adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled receptor signaling pathway	3	1,26E-01
GO:0008333:endosome to lysosome transport	5	1,26E-01
GO:0008360:regulation of cell shape	7	1,26E-01
GO:0010628:positive regulation of gene expression	11	1,26E-01
GO:0010801:negative regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	2	1,26E-01
GO:0010951:negative regulation of endopeptidase activity	5	1,26E-01
GO:0010977:negative regulation of neuron projection development	5	1,26E-01
GO:0016042:lipid catabolic process	5	1,26E-01
GO:0019953:sexual reproduction	2	1,26E-01
GO:0030198:extracellular matrix organization	4	1,26E-01
GO:0030336:negative regulation of cell migration	5	1,26E-01
GO:0030595:leukocyte chemotaxis	2	1,26E-01
GO:0030900:forebrain development	4	1,26E-01
GO:0005884:actin filament	12	1,67E-03
GO:0005764:lysosome	14	2,48E-02
GO:0005912:adherens junction	5	2,48E-02
GO:0009897:external side of plasma membrane	7	2,48E-02
GO:0005771:multivesicular body	4	2,84E-02
GO:0030670:phagocytic vesicle membrane	5	3,28E-02
GO:0042588:zymogen granule	3	3,52E-02
GO:0005911:cell-cell junction	7	8,63E-02
GO:0030426:growth cone	10	1,02E-01
GO:0000137:Golgi cis cisterna	2	1,91E-01
GO:0005859:muscle myosin complex	2	1,91E-01
GO:0016459:myosin complex	4	1,91E-01
GO:0001891:phagocytic cup	3	2,42E-01
GO:0005925:focal adhesion	8	2,42E-01
GO:0030141:secretory granule	6	2,42E-01
GO:0030864:cortical actin cytoskeleton	4	2,42E-01
GO:0034362:low-density lipoprotein particle	2	2,42E-01
GO:0034364:high-density lipoprotein particle	2	2,42E-01
GO:0097208:alveolar lamellar body	2	2,42E-01
GO:0000932:P-body	4	2,43E-01
GO:0016810:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	2	1,83E-01
GO:0030674:protein binding, bridging	4	2,26E-01
GO:0004715:non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity	3	1,83E-01
GO:0004867:serine-type endopeptidase inhibitor activity	3	1,83E-01
GO:0005089:Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	4	1,83E-01
GO:0005201:extracellular matrix structural constituent	3	1,83E-01
GO:0019834:phospholipase A2 inhibitor activity	2	1,83E-01
GO:0043995:histone acetyltransferase activity (H4-K5 specific)	2	1,83E-01
GO:0043996:histone acetyltransferase activity (H4-K8 specific)	2	1,83E-01
GO:0046972:histone acetyltransferase activity (H4-K16 specific)	2	1,83E-01
GO:0051015:actin filament binding	12	1,83E-01
GO:0097322:7SK snRNA binding	2	1,83E-01
GO:0004180:carboxypeptidase activity	2	2,11E-01
GO:0004888:transmembrane signaling receptor activity	2	2,11E-01
GO:0008201:heparin binding	6	2,11E-01
GO:0017022:myosin binding	3	2,11E-01
GO:0019212:phosphatase inhibitor activity	2	2,11E-01
GO:0019706:protein-cysteine S-palmitoyltransferase activity	2	2,11E-01
GO:0044877:macromolecular complex binding	5	2,11E-01
GO:0048029:monosaccharide binding	3	2,11E-01
Platelet activation, signaling and aggregation [Reactome]	10	7,55E-03
Post-translational protein phosphorylation [Reactome]	6	1,68E-02
Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs) [Reactome]	6	1,68E-02
Chylomicron assembly [Reactome]	3	1,39E-01

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes [Reactome]	4	1,53E-01
Cytokine Signaling in Immune system [Reactome]	9	1,53E-01
Interleukin-1 family signaling [Reactome]	4	1,53E-01
Plasma lipoprotein assembly [Reactome]	3	1,53E-01
c-src mediated regulation of Cx43 function and closure of gap junctions [Reactome]	2	1,53E-01
Chylomicron clearance [Reactome]	2	1,53E-01
Chylomicron remodeling [Reactome]	2	1,53E-01
CRMPs in Sema3A signaling [Reactome]	2	1,53E-01
ECM proteoglycans [Reactome]	3	1,53E-01
G alpha (i) signalling events [Reactome]	7	1,53E-01
Interferon Signaling [Reactome]	4	1,53E-01
Kinesins [Reactome]	4	1,53E-01
Mitotic G1-G1/S phases [Reactome]	4	1,53E-01
Platelet Adhesion to exposed collagen [Reactome]	2	1,53E-01
Platelet degranulation [Reactome]	5	1,53E-01
Regulation of gap junction activity [Reactome]	2	1,53E-01

12.1.2 Kontrast 2: MST4 72 h vs. LacZ 72 h

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0006412:translation	70	7.6E-03
GO:0000045:autophagosome assembly	4	1.3E-01
GO:0008360:regulation of cell shape	33	2.0E-01
GO:0016021:integral component of membrane	197	1.9E-06
GO:0005739:mitochondrion	313	2.0E-04
GO:0005759:mitochondrial matrix	84	2.9E-03
GO:0005789:endoplasmic reticulum membrane	70	2.9E-03
GO:0022625:cytosolic large ribosomal subunit	44	7.3E-03
GO:0005884:actin filament	41	1.5E-02
GO:0005575:cellular_component	210	2.1E-02
GO:0022627:cytosolic small ribosomal subunit	34	2.1E-02
GO:0001725:stress fiber	26	5.5E-02
GO:0005925:focal adhesion	50	5.7E-02
GO:0005777:peroxisome	44	1.2E-01
GO:0005874:microtubule	91	1.3E-01
GO:0030018:Z disc	46	1.3E-01
GO:0030176:integral component of endoplasmic reticulum membrane	4	1.3E-01
GO:0031090:organelle membrane	3	1.3E-01
GO:0045177:apical part of cell	11	1.3E-01
GO:0098978:glutamatergic synapse	125	1.3E-01
GO:0031902:late endosome membrane	15	1.6E-01
GO:0005829:cytosol	620	2.0E-01
GO:0005887:integral component of plasma membrane	49	2.0E-01
GO:0003735:structural constituent of ribosome	93	3.2E-08
GO:0005515:protein binding	643	6.4E-02
GO:0001227:transcriptional repressor activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	11	9.9E-02
GO:0003700:DNA binding transcription factor activity	34	9.9E-02
GO:0005178:integrin binding	26	1.2E-01
GO:0005102:receptor binding	54	1.6E-01
GO:0000978:RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	27	1.7E-01
GO:0051287:NAD binding	29	1.7E-01
GO:0051082:unfolded protein binding	41	1.8E-01
GO:0008092:cytoskeletal protein binding	21	2.4E-01
Translation [Reactome]	56	2.1E-02
Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S [Reactome]	28	8.9E-02
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit [Reactome]	27	8.9E-02

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression [Reactome]	27	8.9E-02
Protein modification [Uniprot]	45	8.9E-02
RHO GTPase Effectors [Reactome]	73	8.9E-02
Ribosomal scanning and start codon recognition [Reactome]	27	8.9E-02
Signaling by Rho GTPases [Reactome]	86	8.9E-02
The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport [Reactome]	48	8.9E-02
Translation initiation complex formation [Reactome]	27	8.9E-02
MHC class II antigen presentation [Reactome]	32	1.1E-01
Axon guidance [Reactome]	58	1.1E-01
Cap-dependent Translation Initiation [Reactome]	31	1.3E-01
Eukaryotic Translation Initiation [Reactome]	31	1.3E-01
Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins. [Reactome]	29	1.9E-01
Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex [Reactome]	23	2.2E-01
L1CAM interactions [Reactome]	27	2.6E-01

Reguliert auf Phosphopeptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0030018:Z disc	36	4.7E-03
GO:0001725:stress fiber	19	1.2E-01
GO:0015629:actin cytoskeleton	22	1.2E-01
GO:0043197:dendritic spine	45	1.5E-01
GO:0044325:ion channel binding	20	1.6E-01
PKC	12	1.5E-01

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0016567:protein ubiquitination	5	1,80E-03
GO:0002181:cytoplasmic translation	21	2,46E-03
GO:0006099:tricarboxylic acid cycle	19	2,46E-03
GO:0006635:fatty acid beta-oxidation	21	2,46E-03
GO:0006511:ubiquitin-dependent protein catabolic process	4	5,34E-03
GO:0051028:mRNA transport	2	2,05E-02
GO:0042594:response to starvation	16	4,38E-02
GO:0043161:proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	7	4,38E-02
GO:0001889:liver development	26	7,21E-02
GO:0006103:2-oxoglutarate metabolic process	10	7,21E-02
GO:0007030:Golgi organization	3	7,21E-02
GO:0120162:NA	15	7,21E-02
GO:0042542:response to hydrogen peroxide	23	7,48E-02
GO:0032355:response to estradiol	36	1,47E-01
GO:0006888:ER to Golgi vesicle-mediated transport	6	1,54E-01
GO:0051017:actin filament bundle assembly	14	2,54E-01
GO:0000027:ribosomal large subunit assembly	11	2,92E-01
GO:0006915:apoptotic process	42	1,00E+00
GO:0016607:nuclear speck	11	3,65E-04
GO:0042788:polysomal ribosome	11	1,26E-01
GO:0030315:T-tubule	13	1,62E-01
GO:0005643:nuclear pore	2	1,62E-01
GO:0000922:spindle pole	3	1,67E-01
GO:0030496:midbody	8	2,04E-01
GO:0005790:smooth endoplasmic reticulum	2	2,10E-01
GO:0005667:transcription factor complex	3	2,39E-01
GO:0005793:endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment	5	2,39E-01
GO:0005802:trans-Golgi network	10	2,39E-01
GO:0031201:SNARE complex	3	2,39E-01
GO:0031672:A band	8	2,39E-01
GO:0031901:early endosome membrane	4	2,39E-01
GO:0009897:external side of plasma membrane	14	2,55E-01

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0004842:ubiquitin-protein transferase activity	3	2,32E-01
GO:0019843:rRNA binding	12	2,51E-01
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA [Reactome]	11	4,83E-04
Protein modification [Uniprot]	11	9,36E-04
protein ubiquitination [Uniprot]	6	3,91E-03
DNA Repair [Reactome]	4	6,46E-03
Carbohydrate metabolism [Uniprot]	11	1,20E-02
mRNA Splicing - Major Pathway [Reactome]	10	1,78E-02
mRNA Splicing [Reactome]	10	1,78E-02
Neddylation [Reactome]	7	1,78E-02
Class I MHC mediated antigen processing & presentation [Reactome]	8	2,82E-02
Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation [Reactome]	5	3,16E-02
Branched-chain amino acid catabolism [Reactome]	9	3,17E-02
fatty acid beta-oxidation [Uniprot]	8	5,92E-02
Integrin cell surface interactions [Reactome]	8	5,92E-02
Cell Cycle Checkpoints [Reactome]	7	1,03E-01
Amino-acid degradation [Uniprot]	9	1,06E-01
Cell junction organization [Reactome]	7	1,06E-01
Glyoxylate metabolism and glycine degradation [Reactome]	7	1,06E-01
Deubiquitination [Reactome]	11	1,08E-01
Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic [Reactome]	13	1,08E-01
Ub-specific processing proteases [Reactome]	7	1,29E-01

12.1.3 Kontrast 3: MST4 + Hes 72 h vs. LacZ 72 h

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0006412:translation	71	1.1E-03
GO:0005884:actin filament	42	5.3E-03
GO:0016021:integral component of membrane	208	6.7E-03
GO:0022625:cytosolic large ribosomal subunit	44	6.7E-03
GO:0005575:cellular_component	203	9.7E-03
GO:0022627:cytosolic small ribosomal subunit	34	1.8E-02
GO:0005739:mitochondrion	298	3.7E-02
GO:0005925:focal adhesion	50	5.1E-02
GO:0005905:clathrin-coated pit	25	5.5E-02
GO:0001726:ruffle	31	1.2E-01
GO:0005874:microtubule	90	1.5E-01
GO:0042470:melanosome	48	1.5E-01
GO:0005840:ribosome	19	2.3E-01
GO:0030017:sarcomere	19	2.3E-01
GO:0016363:nuclear matrix	34	2.7E-01
GO:0005759:mitochondrial matrix	77	2.9E-01
GO:0005929:cilium	7	3.0E-01
GO:0003735:structural constituent of ribosome	92	1.2E-07
GO:0003700:DNA binding transcription factor activity	33	1.2E-01
GO:0051015:actin filament binding	61	1.9E-01
GO:0000978:RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	26	2.0E-01
GO:0051082:unfolded protein binding	41	2.0E-01
MHC class II antigen presentation [Reactome]	33	1.1E-01

Keine Regulation auf Phosphopeptid-Ebene

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0002181:cytoplasmic translation	23	2,22E-04

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0006096:glycolytic process	19	5,07E-04
GO:0006511:ubiquitin-dependent protein catabolic process	5	7,11E-03
GO:0046034:ATP metabolic process	21	1,08E-02
GO:0120162:NA	17	1,15E-02
GO:0006099:tricarboxylic acid cycle	18	3,87E-02
GO:0006635:fatty acid beta-oxidation	20	3,87E-02
GO:0045471:response to ethanol	39	3,87E-02
GO:0015031:protein transport	22	4,70E-02
GO:0006103:2-oxoglutarate metabolic process	10	1,38E-01
GO:0000027:ribosomal large subunit assembly	12	1,39E-01
GO:0000398:mRNA splicing, via spliceosome	3	1,39E-01
GO:0000028:ribosomal small subunit assembly	11	2,05E-01
GO:0007166:cell surface receptor signaling pathway	11	2,05E-01
GO:0009060:aerobic respiration	11	2,05E-01
GO:0044344:cellular response to fibroblast growth factor stimulus	9	2,05E-01
GO:0051289:protein homotetramerization	22	2,05E-01
GO:0032355:response to estradiol	37	2,14E-01
GO:0007030:Golgi organization	5	2,40E-01
GO:0009725:response to hormone	25	2,65E-01
GO:0005840:ribosome	17	6,14E-03
GO:0016607:nuclear speck	15	6,14E-03
GO:0042788:polysomal ribosome	13	6,14E-03
GO:0005743:mitochondrial inner membrane	49	3,25E-02
GO:0005751:mitochondrial respiratory chain complex IV	10	4,83E-02
GO:0005747:mitochondrial respiratory chain complex I	14	9,04E-02
GO:0030016:myofibril	14	9,04E-02
GO:0005777:peroxisome	30	1,07E-01
GO:1904115:axon cytoplasm	3	1,07E-01
GO:0005782:peroxisomal matrix	10	1,22E-01
GO:0005852:eukaryotic translation initiation factor 3 complex	8	1,22E-01
GO:0016282:eukaryotic 43S preinitiation complex	8	1,22E-01
GO:0055037:recycling endosome	5	1,26E-01
GO:0070062:extracellular exosome	16	1,91E-01
GO:0031526:brush border membrane	9	1,94E-01
GO:0071013:catalytic step 2 spliceosome	3	1,94E-01
GO:0005762:mitochondrial large ribosomal subunit	13	2,35E-01
GO:0003746:translation elongation factor activity	11	7,12E-02
GO:0019843:rRNA binding	13	7,12E-02
GO:0051287:NAD binding	22	7,12E-02
GO:0004842:ubiquitin-protein transferase activity	4	1,50E-01
GO:0004129:cytochrome-c oxidase activity	11	1,68E-01
GO:0051082:unfolded protein binding	30	1,68E-01
GO:0005096:GTPase activator activity	8	2,69E-01
GO:0051015:actin filament binding	39	2,69E-01
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA [Reactome]	11	1,12E-04
The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport [Reactome]	40	2,13E-04
mRNA Splicing - Major Pathway [Reactome]	8	1,46E-03
mRNA Splicing [Reactome]	8	1,46E-03
Formation of a pool of free 40S subunits [Reactome]	19	8,32E-03
Neuronal System [Reactome]	6	8,92E-03
Protein modification [Uniprot]	15	8,92E-03
glycolysis [Uniprot]	13	1,06E-02
Respiratory electron transport ATP synthesis by chemiosmotic coupling and heat production by uncoupling proteins. [Reactome]	24	1,06E-02
RNA Polymerase II Transcription [Reactome]	27	1,56E-02
Metabolism of amino acids and derivatives [Reactome]	31	2,11E-02
Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript [Reactome]	4	2,11E-02
Transport of Mature Transcript to Cytoplasm [Reactome]	4	2,11E-02
Formation of the ternary complex and subsequently the 43S complex [Reactome]	19	2,19E-02
protein ubiquitination [Uniprot]	9	2,19E-02

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
Respiratory electron transport [Reactome]	17	2,19E-02
Glucose metabolism [Reactome]	15	3,41E-02
Transmission across Chemical Synapses [Reactome]	5	3,88E-02
Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation [Reactome]	6	5,18E-02
Carbohydrate degradation [Uniprot]	14	5,18E-02

12.1.4 Kontrast 4: MST4 + Hes 72 h vs. MST4 72 h

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0045727:positive regulation of translation	33	1.5E-01
GO:0016021:integral component of membrane	198	1.9E-07
GO:0005575:cellular_component	205	8.5E-04
GO:0005737:cytoplasm	862	1.6E-03
GO:0042470:melanosome	52	4.9E-03
GO:0022627:cytosolic small ribosomal subunit	35	5.5E-03
GO:0043005:neuron projection	136	1.1E-02
GO:0005759:mitochondrial matrix	83	1.3E-02
GO:0005762:mitochondrial large ribosomal subunit	5	1.3E-02
GO:0022625:cytosolic large ribosomal subunit	43	2.8E-02
GO:0005923:bicellular tight junction	28	3.1E-02
GO:0005789:endoplasmic reticulum membrane	77	4.0E-02
GO:0005925:focal adhesion	50	7.3E-02
GO:0009986:cell surface	86	1.0E-01
GO:0005930:axoneme	5	1.1E-01
GO:0005829:cytosol	632	1.1E-01
GO:0031090:organelle membrane	3	1.1E-01
GO:0005884:actin filament	39	1.2E-01
GO:0005874:microtubule	91	1.8E-01
GO:0032991:macromolecular complex	164	1.8E-01
GO:0012507:ER to Golgi transport vesicle membrane	2	2.2E-01
GO:0005515:protein binding	664	3.8E-03
GO:0003674:molecular_function	280	1.5E-02
GO:0003700:DNA binding transcription factor activity	34	5.7E-02
GO:0019901:protein kinase binding	115	8.9E-02
GO:0003729:mRNA binding	50	1.3E-01
GO:0051015:actin filament binding	62	1.3E-01
GO:0042626:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	2	2.1E-01
GO:0044877:macromolecular complex binding	139	2.1E-01
GO:0051082:unfolded protein binding	41	2.6E-01
GO:0005096:GTPase activator activity	52	2.9E-01
Nonsense-Mediated Decay (NMD) [Reactome]	38	1.5E-02
Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC) [Reactome]	38	1.5E-02
Signaling by Rho GTPases [Reactome]	87	2.5E-02
Cap-dependent Translation Initiation [Reactome]	32	2.9E-02
Eukaryotic Translation Initiation [Reactome]	32	2.9E-02
MHC class II antigen presentation [Reactome]	33	2.9E-02
Protein modification [Uniprot]	44	2.9E-02
RHO GTPase Effectors [Reactome]	73	8.6E-02
Macroautophagy [Reactome]	7	9.6E-02
Muscle contraction [Reactome]	39	9.6E-02
Immune System [Reactome]	228	1.4E-01
Neutrophil degranulation [Reactome]	97	1.4E-01
RNA polymerase II transcribes snRNA genes [Reactome]	4	1.4E-01
Cellular responses to stress [Reactome]	73	2.1E-01
E3 ubiquitin ligases ubiquitinate target proteins [Reactome]	5	2.1E-01
Innate Immune System [Reactome]	149	2.1E-01
Asparagine N-linked glycosylation [Reactome]	52	2.5E-01
COPI-mediated anterograde transport [Reactome]	32	2.5E-01

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
Downstream signaling of activated FGFR1 [Reactome]	2	2.5E-01
PI Metabolism [Reactome]	8	2.5E-01

Reguliert auf Phosphopeptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0014069:postsynaptic density	61	2.1E-01
GO:0030018:Z disc	33	2.1E-01
GO:0005575:cellular_component	70	2.2E-01
GO:0043005:neuron projection	70	2.2E-01
GO:0005884:actin filament	24	2.8E-01
GO:0015629:actin cytoskeleton	21	2.8E-01
GO:0005515:protein binding	346	1.4E-01
GO:0051015:actin filament binding	38	1.4E-01
GO:0003674:molecular_function	93	2.0E-01

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0043171:peptide catabolic process	8	2,94E-01
GO:0045429:positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	12	1,52E-01
GO:0060048:cardiac muscle contraction	10	1,01E-01
GO:0071260:cellular response to mechanical stimulus	20	1,01E-01
GO:0071363:cellular response to growth factor stimulus	13	2,97E-01
GO:0005575:cellular_component	77	6,09E-02
GO:0022625:cytosolic large ribosomal subunit	31	6,74E-03
GO:0005615:extracellular space	82	2,66E-06
GO:0005764:lysosome	40	1,37E-02
GO:0015629:actin cytoskeleton	22	1,77E-02
GO:0005901:caveola	21	2,62E-02
GO:0005576:extracellular region	32	4,53E-02
GO:0009986:cell surface	50	1,37E-02
GO:0031526:brush border membrane	9	8,74E-02
GO:0016021:integral component of membrane	82	6,09E-02
GO:0005741:mitochondrial outer membrane	10	1,32E-01
GO:0055037:recycling endosome	3	1,32E-01
GO:0031672:A band	8	1,55E-01
GO:0005884:actin filament	21	1,92E-01
GO:0030864:cortical actin cytoskeleton	11	1,97E-01
GO:0031225:anchored component of membrane	7	2,68E-01
GO:0051015:actin filament binding	37	2,46E-01
Cell surface interactions at the vascular wall [Reactome]	13	2,68E-01
glycolysis [Uniprot]	11	2,23E-01
Neutrophil degranulation [Reactome]	57	1,01E-01
Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling and heat production by uncoupling proteins. [Reactome]	2	5,62E-02
The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport [Reactome]	5	1,08E-02

12.1.5 Kontrast 5: (MST4 48 h vs. LacZ 48 h) vs. (MST4 72 h vs. LacZ 72 h)

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0000226:microtubule cytoskeleton organization	33	1,91E-01
GO:0006412:translation	65	2,64E-03
GO:0006457:protein folding	31	2,20E-01
GO:0006635:fatty acid beta-oxidation	24	1,78E-01
GO:0006904:vesicle docking involved in exocytosis	2	2,41E-01
GO:0005759:mitochondrial matrix	80	3,68E-05
GO:0022625:cytosolic large ribosomal subunit	43	8,48E-05
GO:0014704:intercalated disc	25	2,19E-03
GO:0005829:cytosol	553	3,62E-03

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0005789:endoplasmic reticulum membrane	58	1,01E-02
GO:0005901:caveola	33	1,69E-02
GO:0005874:microtubule	84	1,72E-02
GO:0005913:cell-cell adherens junction	19	1,72E-02
GO:0030018:Z disc	43	2,20E-02
GO:0031902:late endosome membrane	10	3,46E-02
GO:0001725:stress fiber	24	3,55E-02
GO:0005925:focal adhesion	45	4,47E-02
GO:0005884:actin filament	36	4,48E-02
GO:0045121:membrane raft	73	6,02E-02
GO:0001726:ruffle	28	1,02E-01
GO:0000775:chromosome, centromeric region	2	1,10E-01
GO:0042470:melanosome	43	1,17E-01
GO:0005856:cytoskeleton	64	1,49E-01
GO:0005905:clathrin-coated pit	22	1,49E-01
GO:0098794:postsynapse	35	1,62E-01
GO:0022627:cytosolic small ribosomal subunit	29	1,63E-01
GO:0005777:peroxisome	38	2,19E-01
GO:0032580:Golgi cisterna membrane	4	2,32E-01
GO:0042383:sarcolemma	44	2,32E-01
GO:0005782:peroxisomal matrix	11	2,54E-01
GO:0008180:COP9 signalosome	11	2,54E-01
GO:0031901:early endosome membrane	12	2,54E-01
GO:0070062:extracellular exosome	19	2,54E-01
GO:0005887:integral component of plasma membrane	41	2,62E-01
GO:0031966:mitochondrial membrane	30	2,66E-01
GO:0043197:dendritic spine	59	2,80E-01
GO:0030027:lamellipodium	50	2,94E-01
GO:0005743:mitochondrial inner membrane	55	6,63E-01
GO:0000978:RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	22	2,91E-01
GO:0003700:DNA binding transcription factor activity	29	2,91E-01
GO:0003735:structural constituent of ribosome	85	7,48E-07
GO:0005102:receptor binding	49	1,64E-01
GO:0005178:integrin binding	24	1,64E-01
GO:0005515:protein binding	569	9,01E-03
GO:0051015:actin filament binding	54	2,91E-01
GO:0051082:unfolded protein binding	39	6,59E-02
GO:0051087:chaperone binding	29	2,91E-01
Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs and subsequent binding to 43S [Reactome]	27	3,58E-02
Cap-dependent Translation Initiation [Reactome]	29	1,09E-01
Eukaryotic Translation Initiation [Reactome]	29	1,09E-01
Formation of a pool of free 40S subunits [Reactome]	20	1,47E-01
Formation of the ternary complex and subsequently the 43S complex [Reactome]	22	1,14E-01
Gap junction trafficking and regulation [Reactome]	16	1,82E-01
Glucose metabolism [Reactome]	19	1,09E-01
glycolysis [Uniprot]	15	2,78E-01
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit [Reactome]	26	3,58E-02
HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR) [Reactome]	21	5,59E-02
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression [Reactome]	26	3,58E-02
MHC class II antigen presentation [Reactome]	30	9,02E-02
Nonsense-Mediated Decay (NMD) [Reactome]	33	1,14E-01
Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC) [Reactome]	33	1,14E-01
Protein modification [Uniprot]	38	1,14E-01
Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle [Reactome]	19	2,13E-01
Recycling pathway of L1 [Reactome]	17	1,22E-01
Ribosomal scanning and start codon recognition [Reactome]	26	3,58E-02
Translation [Reactome]	51	3,58E-02

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
Translation initiation complex formation [Reactome]	26	3,58E-02

Reguliert auf Phosphopeptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
PKC	12	1,24E-01
GO:0005829:cytosol	240	1,93E-01
GO:0005913:cell-cell adherens junction	15	3,37E-02
GO:0014704:intercalated disc	18	3,37E-02

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0000027:ribosomal large subunit assembly	9	2,58E-01
GO:0000122:negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	11	2,42E-01
GO:0001889:liver development	21	1,50E-01
GO:0002181:cytoplasmic translation	15	1,55E-01
GO:0006084:acetyl-CoA metabolic process	5	2,74E-01
GO:0006099:tricarboxylic acid cycle	17	8,50E-04
GO:0006103:2-oxoglutarate metabolic process	8	2,07E-01
GO:0006120:mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	5	2,74E-01
GO:0006412:translation	44	5,31E-05
GO:0006511:ubiquitin-dependent protein catabolic process	4	2,57E-01
GO:0006629:lipid metabolic process	8	2,07E-01
GO:0006633:fatty acid biosynthetic process	11	2,58E-01
GO:0006635:fatty acid beta-oxidation	21	1,02E-05
GO:0006695:cholesterol biosynthetic process	8	2,58E-01
GO:0006886:intracellular protein transport	12	2,42E-01
GO:0006915:apoptotic process	31	8,66E-01
GO:0007155:cell adhesion	21	2,58E-01
GO:0007339:binding of sperm to zona pellucida	6	2,07E-01
GO:0015031:protein transport	13	2,07E-01
GO:0022904:respiratory electron transport chain	7	1,50E-01
GO:0032212:positive regulation of telomere maintenance via telomerase	6	2,07E-01
GO:0042493:response to drug	62	1,50E-01
GO:0042594:response to starvation	12	2,42E-01
GO:0043161:proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	5	2,74E-01
GO:0045471:response to ethanol	27	2,07E-01
GO:0045944:positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	18	2,07E-01
GO:0046697:decidualization	6	2,74E-01
GO:0055114:oxidation-reduction process	57	2,58E-01
GO:0071320:cellular response to cAMP	14	2,58E-01
GO:0071404:cellular response to low-density lipoprotein particle stimulus	6	2,74E-01
GO:0005759:mitochondrial matrix	65	4,05E-14
GO:0022625:cytosolic large ribosomal subunit	29	2,07E-04
GO:0005743:mitochondrial inner membrane	41	1,68E-03
GO:0005634:nucleus	187	2,74E-03
GO:0016607:nuclear speck	7	7,63E-03
GO:0022627:cytosolic small ribosomal subunit	21	1,03E-02
GO:0009986:cell surface	41	1,94E-02
GO:0000275:mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex catalytic core F(1)	4	2,59E-02
GO:0045261:proton-transporting ATP synthase complex catalytic core F(1)	4	2,59E-02
GO:0005762:mitochondrial large ribosomal subunit	12	2,86E-02
GO:0042383:sarcolemma	25	3,29E-02
GO:0000139:Golgi membrane	14	6,15E-02
GO:0005763:mitochondrial small ribosomal subunit	6	7,04E-02
GO:0045121:membrane raft	33	7,82E-02
GO:0005747:mitochondrial respiratory chain complex I	11	1,21E-01
GO:0005777:peroxisome	22	1,42E-01
GO:0005901:caveola	16	1,42E-01
GO:0030061:mitochondrial crista	5	1,42E-01

Reguliert auf Protein-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0005840:ribosome	11	1,73E-01
GO:0016021:integral component of membrane	66	1,73E-01
GO:0042645:mitochondrial nucleoid	11	1,73E-01
GO:0048471:perinuclear region of cytoplasm	44	1,73E-01
GO:0005882:intermediate filament	7	2,10E-01
GO:0005794:Golgi apparatus	37	2,41E-01
GO:0005890:sodium:potassium-exchanging ATPase complex	4	2,60E-01
GO:0016528:sarcoplasm	4	2,60E-01
GO:0099061:integral component of postsynaptic density membrane	5	2,60E-01
GO:0030018:Z disc	19	2,66E-01
GO:0042788:polysomal ribosome	8	2,95E-01
GO:0045202:synapse	39	2,95E-01
GO:0000062:fatty-acyl-CoA binding	9	2,85E-01
GO:0003735:structural constituent of ribosome	61	1,08E-09
GO:0003746:translation elongation factor activity	8	2,85E-01
GO:0003924:GTPase activity	16	2,85E-01
GO:0003988:acetyl-CoA C-acyltransferase activity	6	2,52E-01
GO:0004842:ubiquitin-protein transferase activity	2	2,85E-01
GO:0008097:5S rRNA binding	6	2,85E-01
GO:0019843:rRNA binding	10	2,52E-01
GO:0031406:carboxylic acid binding	6	2,85E-01
GO:0047485:protein N-terminus binding	2	2,52E-01
GO:0051537:2 iron, 2 sulfur cluster binding	8	2,85E-01
Post-translational protein modification [Reactome]	32	3,70E-05
Cell Cycle, Mitotic [Reactome]	14	3,18E-02
Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs and subsequent binding to 43S [Reactome]	16	7,31E-02
Formation of the ternary complex and subsequently the 43S complex [Reactome]	13	1,66E-01
Respiratory electron transport ATP synthesis by chemiosmotic coupling and heat production by uncoupling proteins. [Reactome]	15	2,43E-01
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA [Reactome]	6	1,07E-03
The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport [Reactome]	29	6,79E-03
Translation [Reactome]	33	6,79E-03
Mitochondrial translation elongation [Reactome]	16	8,79E-03
Carbohydrate metabolism [Uniprot]	10	1,44E-02
Cell Cycle [Reactome]	15	1,44E-02
mRNA Splicing - Major Pathway [Reactome]	5	1,44E-02
mRNA Splicing [Reactome]	5	1,44E-02
Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle [Reactome]	14	1,44E-02
fatty acid beta-oxidation [Uniprot]	8	1,76E-02
Amino-acid degradation [Uniprot]	9	2,02E-02
Mitochondrial translation [Reactome]	16	2,02E-02
Protein modification [Uniprot]	9	2,86E-02
Asparagine N-linked glycosylation [Reactome]	7	3,04E-02
Adaptive Immune System [Reactome]	18	3,18E-02

12.1.6 Kontrast 6: Unbehandelt 72 h vs. LacZ 72 h

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0005789:endoplasmic reticulum membrane	57	1,77E-03
GO:0005884:actin filament	40	1,98E-03
GO:0042470:melanosome	48	5,57E-03
GO:1990904:ribonucleoprotein complex	52	6,80E-03
GO:0030018:Z disc	45	9,79E-03
GO:0022625:cytosolic large ribosomal subunit	40	2,06E-02
GO:0005925:focal adhesion	47	2,13E-02
GO:0031982:vesicle	28	2,13E-02
GO:0005874:microtubule	85	2,60E-02
GO:0022627:cytosolic small ribosomal subunit	31	4,79E-02

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0005901:caveola	32	6,31E-02
GO:0031966:mitochondrial membrane	33	6,31E-02
GO:0014704:intercalated disc	23	8,71E-02
GO:0043197:dendritic spine	63	9,33E-02
GO:0005911:cell-cell junction	33	9,45E-02
GO:0031090:organelle membrane	2	9,45E-02
GO:0005694:chromosome	21	1,08E-01
GO:0030315:T-tubule	22	1,08E-01
GO:0042383:sarcolemma	46	1,13E-01
GO:0001725:stress fiber	23	1,37E-01
GO:0051015:actin filament binding	64	2,43E-05
GO:0003735:structural constituent of ribosome	82	1,98E-04
GO:0001228:transcriptional activator activity RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	12	2,06E-03
GO:0003700:DNA binding transcription factor activity	25	3,12E-03
GO:0042277:peptide binding	29	1,17E-02
GO:0003729:mRNA binding	46	8,50E-02
GO:0003779:actin binding	61	8,50E-02
GO:0051082:unfolded protein binding	39	8,50E-02
GO:0005484:SNAP receptor activity	4	8,60E-02
GO:0071949:FAD binding	2	8,60E-02
GO:0004842:ubiquitin-protein transferase activity	14	1,37E-01
GO:0005516:calmodulin binding	56	1,64E-01
GO:0044877:macromolecular complex binding	124	1,64E-01
GO:0005102:receptor binding	49	1,72E-01
GO:0003674:molecular_function	250	1,79E-01
GO:0005080:protein kinase C binding	19	1,79E-01
GO:0001102:RNA polymerase II activating transcription factor binding	2	2,42E-01
GO:0005200:structural constituent of cytoskeleton	18	2,53E-01
Protein modification [Uniprot]	29	4,55E-04
MHC class II antigen presentation [Reactome]	32	6,49E-03
Signaling by Rho GTPases [Reactome]	79	1,47E-02
protein ubiquitination [Uniprot]	21	1,58E-02
Axon guidance [Reactome]	55	1,86E-02
RHO GTPase Effectors [Reactome]	67	3,41E-02
Nonsense-Mediated Decay (NMD) [Reactome]	34	5,52E-02
Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC) [Reactome]	34	5,52E-02
Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs and subsequent binding to 43S [Reactome]	26	6,17E-02
L1CAM interactions [Reactome]	26	6,17E-02
Formation of the ternary complex and subsequently the 43S complex [Reactome]	22	6,54E-02
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit [Reactome]	25	6,54E-02
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression [Reactome]	25	6,54E-02
Ribosomal scanning and start codon recognition [Reactome]	25	6,54E-02
Translation initiation complex formation [Reactome]	25	6,54E-02
Mitotic Prometaphase [Reactome]	36	9,23E-02
RHO GTPases activate PKNs [Reactome]	17	1,04E-01
Formation of a pool of free 40S subunits [Reactome]	20	1,21E-01
G2/M Transition [Reactome]	29	1,21E-01
Mitotic G2-G2/M phases [Reactome]	29	1,21E-01

Reguliert auf Phosphopeptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0030018:Z disc	32	8,42E-03
GO:0005923:bicellular tight junction	19	5,72E-02
GO:0005829:cytosol	241	1,04E-01
GO:0032991:macromolecular complex	79	1,04E-01
GO:0005884:actin filament	22	1,11E-01
GO:0005789:endoplasmic reticulum membrane	13	1,27E-01

Reguliert auf Phosphopeptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
GO:0015629:actin cytoskeleton	19	1,43E-01
GO:0001725:stress fiber	16	2,27E-01
GO:0003674:molecular_function	72	1,51E-01
GO:0003735:structural constituent of ribosome	6	1,51E-01
GO:0003779:actin binding	38	1,79E-01
GO:0005515:protein binding	286	1,06E-01
GO:0005516:calmodulin binding	34	1,06E-01
GO:0015631:tubulin binding	10	2,47E-01
GO:0051015:actin filament binding	35	3,36E-02

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
CK2	5	2,15E-01
PKA	9	1,47E-01
PKC	8	2,15E-01
GO:0006635:fatty acid beta-oxidation	19	3,22E-03
GO:0042493:response to drug	70	1,84E-02
GO:0030855:epithelial cell differentiation	13	2,30E-01
GO:0045944:positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	19	2,59E-01
GO:0006695:cholesterol biosynthetic process	9	2,77E-01
GO:0009725:response to hormone	21	2,77E-01
GO:0048545:response to steroid hormone	11	2,77E-01
GO:0005764:lysosome	37	1,28E-02
GO:0005765:lysosomal membrane	20	8,78E-02
GO:0000139:Golgi membrane	16	1,02E-01
GO:0005777:peroxisome	24	1,02E-01
GO:0005852:eukaryotic translation initiation factor 3 complex	7	1,02E-01
GO:0005882:intermediate filament	8	1,02E-01
GO:0005902:microvillus	10	1,02E-01
GO:0009897:external side of plasma membrane	13	1,02E-01
GO:0014704:intercalated disc	12	1,02E-01
GO:0016282:eukaryotic 43S preinitiation complex	7	1,02E-01
GO:0016607:nuclear speck	10	1,02E-01
GO:0022625:cytosolic large ribosomal subunit	25	1,02E-01
GO:0033290:eukaryotic 48S preinitiation complex	8	1,02E-01
GO:0044297:cell body	16	1,02E-01
GO:0005576:extracellular region	26	1,57E-01
GO:0045254:pyruvate dehydrogenase complex	5	2,25E-01
GO:0016021:integral component of membrane	71	2,25E-01
GO:0043197:dendritic spine	29	2,25E-01
GO:0009986:cell surface	38	2,38E-01
GO:0001725:stress fiber	14	2,38E-01
GO:0004364:glutathione transferase activity	9	2,38E-01
Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs and subsequent binding to 43S [Reactome]	19	1,33E-04
Formation of the ternary complex and subsequently the 43S complex [Reactome]	17	7,94E-03
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit [Reactome]	19	7,94E-03
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression [Reactome]	19	7,94E-03
Ribosomal scanning and start codon recognition [Reactome]	19	7,94E-03
Translation initiation complex formation [Reactome]	19	7,94E-03
Glycerophospholipid biosynthesis [Reactome]	11	2,23E-02
fatty acid beta-oxidation [Uniprot]	8	2,86E-02
Formation of a pool of free 40S subunits [Reactome]	15	2,86E-02
Protein modification [Uniprot]	9	2,97E-02
Post-translational protein modification [Reactome]	44	3,80E-02
Cap-dependent Translation Initiation [Reactome]	19	5,32E-02
Cell Cycle Checkpoints [Reactome]	3	5,32E-02
Eukaryotic Translation Initiation [Reactome]	19	5,32E-02
RNA Polymerase II Transcription [Reactome]	17	5,32E-02
Gene expression (Transcription) [Reactome]	21	1,28E-01

Reguliert auf Peptid-Ebene	Anzahl Gene	Adj. P-Wert
Muscle contraction [Reactome]	19	1,28E-01
Smooth Muscle Contraction [Reactome]	8	1,35E-01
Membrane Trafficking [Reactome]	29	1,45E-01
Metabolism of lipids [Reactome]	37	1,45E-01