

Charakterisierung der MuRF2/MuRF3-Doppelknockout-Mauslinie hinsichtlich ihres Herz- und Skelettmuskel-Phänotyps

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biochemikerin Dörte Lodka

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin: Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz
Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät: Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Sommer
2. Prof. Dr. Michael Bader
3. PD Dr. med. Jens Fielitz

Datum der Einreichung: 08.10.2014
Datum der Verteidigung: 17.03.2015

Der Weg zum Erfolg hat keine Abkürzung.

Masahika Tanaka

1. Zusammenfassung

E3-Ubiquitin-Ligasen übertragen Ubiquitin auf die von ihnen gebundenen Substratproteine. Durch diese Ubiquitinierung werden Proteine für den kontrollierten Abbau im Ubiquitin-Proteasom-System markiert. Dieser Prozess beeinflusst aber auch die Aktivität verschiedener Signalwege, die Lokalisation von Proteinen oder die strukturelle Integrität zellulärer Komponenten. MuRF1, MuRF2 und MuRF3 sind E3-Ubiquitin-Ligasen, die hauptsächlich in quergestreifter Muskulatur exprimiert werden. Von MuRF1 ist bereits bekannt, dass es unter anderem über die Markierung von Myosinen mit Ubiquitin und deren anschließender Degradation im Proteasom an der Entwicklung der kardialen und der Skelettmuskelatrophie beteiligt ist. Da die Kenntnisse über MuRF2 und MuRF3 in diesem Zusammenhang noch begrenzt sind, sollte die Auswirkung der kombinierten Keimbahndeletion von MuRF2 und MuRF3 in einem Mausmodell untersucht werden.

Der Doppelknockout (DKO) von MuRF2 und MuRF3 führte sowohl zu Veränderungen der Morphologie als auch der Funktionsfähigkeit der Skelett- und Herzmuskulatur. In Skelettmuskelfasern kam es zur Ablagerung myosinhaltiger Proteinaggregate, zu einer veränderten Fasertypzusammensetzung mit einer Zunahme der langsam kontrahierenden Muskelfasern sowie zum Auftreten von Myozyten mit zentral gelegenen Zellkernen als Anzeichen von Regenerationsprozessen. Die Messung der maximalen spezifischen Kraft isolierter Skelettmuskeln zeigte, dass der DKO von MuRF2 und MuRF3 in einer verringerten Kraftentwicklung resultierte. Die Herzen waren morphologisch unauffällig, es wurden keine Proteinaggregate und keine Fibrose detektiert. Dennoch war die Herzfunktion vermindert. So waren die Kontraktion des linken Ventrikels und das Schlagvolumen reduziert. Darüber hinaus zeigten isolierte Kardiomyozyten eine geringere Kontraktionsfähigkeit *in vitro*. Sie kontrahierten und relaxierten langsamer und zeigten Beeinträchtigungen der Kalziumströme. Die massenspektrometrische Analyse von Muskellysaten ergab, dass in den Muskeln der MuRF2/3-DKO-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen 12 Proteine in erhöhter Menge vorhanden waren. Eine Anreicherung von MAPKAP-K3, einem dieser Proteine, und von MAPKAP-K2 konnte im Western Blot von Proteinlysaten aus Skelettmuskeln und dem linken Ventrikel der MuRF2/3-DKO-Mäuse detektiert werden. Die Analyse von MAPKAP-K2- und MAPKAP-K3-Signalwegen in Bezug auf den MuRF2/3-DKO-Phänotyp sollen zukünftig Aufschluss über die molekularen Prozesse geben, die an dessen Entstehung beteiligt sind.

Schlagworte: MuRF2, MuRF3, E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, Proteinaggregate, spezifische Kraft

2. Summary

E3 ubiquitin ligases attach the small modifier ubiquitin to their substrate proteins. This ubiquitin-tag not only marks proteins for the proteasome dependent degradation, but also influences the activity of signalling pathways, the localisation of proteins or the structural integrity of cellular components. MuRF1, MuRF2, and MuRF3 are E3 ubiquitin ligases predominantly expressed in striated muscles. MuRF1 is involved in cardiac and skeletal muscle atrophy by mediating proteasome-dependent degradation of myosins. The knowledge about MuRF2 and MuRF3 in this context is limited. Therefore, a mouse model was used to analyse the impact of the combined deletion of MuRF2 and MuRF3.

The double knockout (DKO) of MuRF2 and MuRF3 influenced the structure and function of skeletal and cardiac muscle. Skeletal muscle fibres exhibited myosin-containing protein aggregates, a fibre-type shift towards slow fibres, and myocytes with central nuclei which is an indication of regeneration. Maximal force development was reduced in isolated hindlimb muscles *M. soleus* and *M. extensor digitorum longus* of MuRF2/3-DKO mice. Hearts were morphologically normal. No protein aggregates or signs of fibrosis were detected. However, heart performance was impaired. The contractibility of the left ventricle and the ejection fraction were reduced. Isolated cardiomyocytes showed a diminished contractibility. Furthermore, their speed of contraction and relaxation was reduced and they had impaired calcium transients. Mass spectrometric analysis of muscle lysates identified 12 enriched proteins in MuRF2/3-DKO muscles. Western Blot analysis confirmed that MAPKAP-K3, one of these proteins, and MAPKAP-K2 were enriched in lysates of skeletal muscles and left ventricles of MuRF2/3-DKO mice. Further investigations will show how MAPKAP-K2- and MAPKAP-K3-signalling pathways are involved in the development of the MuRF2/3-DKO-phenotype.

Keywords: MuRF2, MuRF3, E3 ubiquitin ligase, protein aggregates, specific force

3. Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	I
2. Summary	II
3. Inhaltsverzeichnis	III
4. Abkürzungsverzeichnis	VI
5. Einleitung	1
5.1 Quergestreifte Muskulatur	1
5.1.1 Skelettmuskulatur	5
5.1.2 Aufbau eines Skelettmuskels	5
5.1.3 Isoformen der schweren Myosinketten und verschiedene Muskelfasertypen	6
5.1.4 Skelettmuskelhypertrophie und -atrophie	10
5.2 Herzmuskulatur	10
5.2.1 Aufbau des Herzens	10
5.2.2 Kontraktionszyklus des Herzens	12
5.2.3 Kardiomyozyten	13
5.2.4 Myosinisoformen im Herzen	13
5.2.5 Kardiales Remodelling	14
5.2.6 Das fötale kardiale Genprogramm	18
5.3 Ubiquitin-Proteasom-System	20
5.3.1 Ubiquitinierung des Zielproteins	20
5.3.2 Degradation des Ubiquitin-markierten Proteins	22
5.4 MuRFs – RING-Finger E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen	24
5.4.1 Proteinstruktur der MuRFs	24
5.4.2 MuRF1	26
5.4.3 MuRF2	27
5.4.4 MuRF3	29
5.4.5 MuRF1/2-Doppelknockout	30
5.4.6 MuRF1/3-Doppelknockout	31
6. Zielstellung der Doktorarbeit	33
7. Material und Methoden	34
7.1 Material	34
7.1.1 Tiere	34
7.1.2 Zellen	34
7.1.3 Plasmide	34
7.1.4 Antikörper	35
7.1.5 Reagenzien, Geräte, Verbrauchsmaterial	36
7.2 Methoden	43
7.2.1 Generierung und Genotypisierung der MuRF2/3-DKO-Mäuse	43
7.2.2 Körperzusammensetzung	44
7.2.3 Muskel- und Organentnahme	45
7.2.4 Paraffineinbettung und -schnitte vom Herz	45
7.2.5 Proteinisolation aus Gewebe und Zellkultur	46

Inhaltsverzeichnis

7.2.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	47
7.2.7	Koimmunpräzipitation	48
7.2.8	Affinitätschromatographische Proteinanreicherung (Pulldown)	49
7.2.9	RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, real-time PCR	49
7.2.10	Histologische und immunhistochemische Färbungen.....	51
7.2.11	Elektronenmikroskopie.....	55
7.2.12	<i>Ex vivo</i> Mausmodell der Muskelkraftmessung	56
7.2.13	Echokardiographische Analysen.....	57
7.2.14	Herzperfusion nach Langendorff	58
7.2.15	Mausmodelle der kardialen Hypertrophie	60
7.2.16	Analyse von aus adulten Mäusen isolierten Kardiomyozyten.....	62
7.2.17	Massenspektrometrie.....	63
7.2.18	Molekularbiologische Methoden	64
7.2.19	Zellkultur	67
7.2.20	Statistik	68
8.	Ergebnisse	69
8.1	Allgemeine Merkmale der MuRF2- und MuRF3-DKO-Mäuse	69
8.1.1	Generierung der MuRF2/3-DKO-Mäuse	69
8.1.2	Makroskopische Auffälligkeiten und Analyse des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung	70
8.2	Charakteristika der Skelettmuskulatur von MuRF2/3-DKO-Mäusen	71
8.2.1	Western Blot Analyse der Skelettmuskulatur.....	72
8.2.2	Analyse der MuRF1-Expression in der Skelettmuskulatur	72
8.2.3	Gewichtsbestimmung der Skelettmuskeln.....	73
8.2.4	Histologische Analysen der Skelettmuskulatur	74
8.2.5	Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Skelettmuskulatur.....	79
8.2.6	Prozentuale Zusammensetzung der Muskelfasertypen der Skelettmuskeln	80
8.2.7	Genexpression der Myosinisoformen in der Skelettmuskulatur.....	83
8.2.8	Bestimmung der maximalen spezifischen Kraft des <i>M. soleus</i> und des <i>M. extensor digitorum longus ex vivo</i>	86
8.3	Herzmuskulatur	87
8.3.1	Western Blot Analyse des Herzens.....	87
8.3.2	Analyse der MuRF1-Expression im Herzen.....	88
8.3.3	Gewichtsbestimmung des Herzens, der Lunge und der Leber.....	89
8.3.4	Histologische Analysen des Herzens.....	89
8.3.5	Genexpression der Myosinisoformen und der Stressmarker ANF und BNP im Herzen.....	91
8.3.6	Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Herzmuskulatur.....	91
8.3.7	Echokardiographie.....	92
8.3.8	Langendorff-Analyse – Herzfunktionen <i>ex vivo</i>	93
8.3.9	Kardialer Stress – Herzfunktionen <i>in vivo</i>	94
8.3.10	Primäre Kardiomyozyten	96
8.4	Massenspektrometrische Analyse von Skelettmuskellysaten	98
8.4.1	Auswahl massenspektrometrisch identifizierter Proteine für die weitere Analyse.....	99
8.4.2	Genexpression der in der MS-Analyse angereicherten Proteine	101

Inhaltsverzeichnis

8.4.3	Expression und Lokalisation der ausgewählten Proteine	101
8.4.4	Koimmunpräzipitation der ausgewählten Proteine mit MuRF2 und MuRF3	106
8.4.5	MAPKAP-K3, MAPKAP-K2, p38 und SERCA2a	106
9.	Diskussion	110
9.1	Generelle Merkmale der MuRF2- und MuRF3-DKO-Mäuse	110
9.1.1	Normale Geburtenrate und Lebensfähigkeit	110
9.1.2	Geschlechtsspezifische Veränderungen des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung	111
9.1.3	Keine offensichtliche Beeinträchtigung der Mobilität	112
9.2	Skelettmuskulatur	112
9.2.1	Fehlen einer Skelettmuskelhypertrophie	112
9.2.2	Proteinaggregate in der Skelettmuskulatur	112
9.2.3	Fasertypzusammensetzung und Myosinisoformen – Verschiebung zum langsameren Phänotyp und Auftreten regenerativer Prozesse	114
9.2.4	Muskelspezifische Veränderungen der Faserquerschnittfläche	116
9.2.5	Verringerte maximale Kraftentwicklung	116
9.3	Herzmuskulatur	118
9.3.1	Unveränderte Morphologie des Herzens	118
9.3.2	Erhöhte <i>Myh7</i> -Expression, aber kein Anstieg der Stressmarker <i>Nppa</i> und <i>Nppb</i>	118
9.3.3	Echokardiographie – Verminderte Herzfunktion	119
9.3.4	Keine veränderte Reaktion auf kardialen Stress	119
9.3.5	Verringerte Kontraktionskraft und -geschwindigkeit der primären Kardiomyozyten	120
9.4	Massenspektrometrische Analyse von Skelettmuskellysaten	121
9.4.1	Erhöhter Gehalt an MAPKAP-K3 und MAPKAP-K2	121
9.4.2	SRA1 und DDX17	123
9.4.3	MLF2	124
9.4.4	SMYD2	125
9.5	Fazit	126
10.	Literaturverzeichnis	127
11.	Abbildungsverzeichnis	145
12.	Tabellenverzeichnis	147
13.	Danksagung	148
14.	Anhang	149
14.1	Echokardiographie	149
14.2	Herzperfusion nach Langendorff	150
14.3	Vektorkarten	151
15.	Publikationen, Konferenzbeiträge	154
16.	Selbständigkeitserklärung	156

4. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin (Albumin Fraktion V)
CARP	engl. <i>Cardiac ankyrin repeat protein</i>
CCN	Proteinfamilie, benannt nach den Mitgliedern: Cyr61, CTGF, Nov (Cyr61: <i>cysteine-rich 61</i> , CTGF: <i>connective tissue growth factor</i> , Nov: <i>nephroblastoma over-expressed</i>)
CTGF	Bindegewebswachstumsfaktor (engl. <i>connective tissue growth factor</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDX17	engl. <i>DEAD box helicase 17</i> , DEAD = Einbuchstabencode für die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Asparaginsäure)
DKO	Doppelknockout
DME-Medium	Eagle´s Medium modifiziert nach Dulbecco (engl. <i>Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein-Ligase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDL	lat. <i>Musculus extensor digitorum longus</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
FBS	Fötales bovines Serum
FHL	engl. <i>Four and a half LIM domains protein</i>
Fura-2	1-(2-(5'-Carboxyoxazol-2'yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(2'-amino-5'- methylphenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Fura-2-AM	Fura-2-acetoxymethylester
GATA	DNA-Sequenz: Guanin, Adenin, Thymin, Adenin; auch Bezeichnung für die Transkriptionsfaktorfamilie, die an diese Sequenz bindet
GFM1	mitochondrialer Elongationsfaktor G
GP	lat. <i>Musculus gastrocnemius-plantaris</i>
HECT	engl. <i>Homologous to E6AP Carboxyl Terminus</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschock-Protein
HspB3	Hitzeschock-Protein beta-3
ISO	Isoprenalin
KO	Deletion eines Gens (engl. <i>knockout</i> , deutsch Knockout)
LB	Kultivierungsmedium für Bakterien (engl. <i>lysogeny broth</i>)

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
LV	Linker Ventrikel, linksventrikulär
LVP	Linksventrikulärer Druck (engl. <i>left ventricular pressure</i>)
M.	Muskel (lat. <i>Musculus</i>)
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MAPKAP-K3	MAP-Kinase aktivierte Proteinkinase 3
MDC	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
MLF2	Myeloischer Leukämie-Faktor 2 (engl. <i>myeloid leukemia factor 2</i>)
MS	Massenspektrometrie, massenspektrometrisch
MUp48	Calpain 3-Isoform, aus Maus (= M), ubiquitär exprimiert (= U), Protein mit dem Molekulargewicht von 48 kD (= p48)
MuRF	engl. <i>Muscle-specific RING finger protein</i>
MyHC	Schwere Myosinkette (engl. <i>myosin heavy chain</i>)
MyoD	engl. <i>Myoblast determination protein 1</i> , auch Myod, MyoD1, Myod1
<i>Nppa</i>	Natriuretisches Peptid A, kodiert für den atrialen natriuretischen Faktor, ANF
<i>Nppb</i>	Natriuretisches Peptid B, kodiert für B-Typ natriuretisches Peptid, BNP
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit 0,1 % (v/v) Tween® 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RING	engl. <i>Really interesting new gene</i>
SCF	Multiproteinkomplex-E3-Ubiquitin-Ligase, benannt nach Skp1, Cullin 1 und F-box-Protein, Skp: S-Phase Kinase-assoziiertes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SMYD2	engl. <i>SET and MYND Domain Containing 2</i> , SET-Domäne identifiziert in und benannt nach <i>Su(var)3-9</i> , <i>Enhancer of zeste</i> , <i>Trithorax</i> , MYND-Domäne identifiziert in und benannt nach <i>myeloid</i> , <i>Nervy</i> und <i>DEAF-1</i>
SOC	SOB-Medium (engl. <i>Super Optimal Broth</i>) mit 20 mM Glukose
Sol	lat. <i>Musculus soleus</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SRA1	engl. <i>Steroid receptor RNA activator 1</i>
TA	lat. <i>Musculus tibialis anterior</i>
TAC	Verengung der <i>Aorta thoracalis ascendens</i> (engl. <i>thoracic aortic constriction</i>)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIM, <i>Trim</i>	Proteinbereich mit 3 verschiedenen Domänen (engl. <i>tripartite motif</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin B-isothiocyanat
UE	Untereinheit, Untereinheiten
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
YT	Hefeextrakt und Trypton (engl. <i>yeast extract and trypton</i>)

5. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der phänotypischen Charakterisierung einer Mauslinie mit einer Keimbahndeletion der E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF2 und MuRF3. Dabei werden speziell die Auswirkungen auf die Herz- und Skelettmuskulatur untersucht, da die MuRFs hauptsächlich in diesen Geweben exprimiert werden. In den folgenden Abschnitten werden deshalb einige grundlegende Merkmale der quergestreiften Muskulatur, der Mechanismus der Proteasom-abhängigen Proteindegradation und Angaben zu den verschiedenen MuRF-Proteinen und deren Knockout-Mauslinien dargestellt.

5.1 Quergestreifte Muskulatur

Die Gewebe fast aller tierischen Organismen lassen sich in vier Gruppen zusammenfassen, den Epithel- und Drüsengeweben, den Stütz- und Bindegeweben, dem Nervengewebe und dem Muskelgewebe. Letzteres wird aufgrund seiner lichtmikroskopischen Erscheinung weiter unterteilt in die glatte und die quergestreifte Muskulatur. Die spezifischen Zellen aller Muskelgewebe, die Myozyten, haben die Fähigkeit, sich zusammenzuziehen, d. h. zu kontrahieren, und wieder zu erschlaffen, zu relaxieren. Dadurch wird die willkürlich gesteuerte Bewegung von Körperteilen oder die Fortbewegung des gesamten Organismus, aber auch die unwillkürliche Bewegung der Eingeweide, Kontraktionen der Blutgefäße oder des Herzens ermöglicht.¹⁻³

Der Gegenstand dieser Arbeit ist die quergestreifte Muskulatur, aus diesem Grund wird auf die glatte Muskulatur nicht weiter eingegangen. Unter quergestreifter Muskulatur werden die Skelett- und die Herzmuskulatur zusammengefasst. Beide weisen ein lichtmikroskopisch sichtbares, regelmäßiges Streifenmuster auf, das auf die zelluläre Struktur der einzelnen Myozyten zurückzuführen und namensgebend ist.

Die Ursache für dieses Streifenmuster liegt in der regelmäßigen Anordnung von großen Proteinkomplexen innerhalb der Myozyten. Lange, aus unterschiedlichen Proteinen zusammengesetzte Filamente bilden das Sarkomer, das kontraktile Basiselement aller Muskelzellen. Die Sarkomere liegen hinter- und nebeneinander und formen so die Muskelfibrillen. Mehrere Muskelfibrillen bilden ein Muskelfibrillenbündel. Diese Bündel füllen fast den gesamten intrazellulären Raum der Myozyten aus. Ein Sarkomer wird jeweils von zwei Z-Scheiben begrenzt. Dazwischen befinden sich parallel angeordnete, filamentöse

Proteinkomplexe, welche für die Kontraktion verantwortlich sind. Die Hauptakteure dabei sind die Aktin- und die Myosinfilamente. Die Aktinfilamente sind an die Z-Scheiben gebunden und ragen links und rechts davon in das Sarkomer hinein. Die Myosinfilamente hingegen gehen von der Mitte des Sarkomers, der M-Linie, aus und überlappen mit den Aktinfilamenten innerhalb der A-Bande (anisotrop, doppelt lichtbrechend). An die Z-Scheiben sind sie indirekt über das Protein Titin gebunden. Im entspannten Zustand ist innerhalb der A-Bande ein hellerer Bereich, die H-Zone, sichtbar. Hier befinden sich keine Aktinfilamente. Die I-Bande (isotrop, einfach lichtbrechend) ist der Bereich links und rechts der Z-Scheiben, in die keine Myosinfilamente hineinreichen (Abbildung 1).

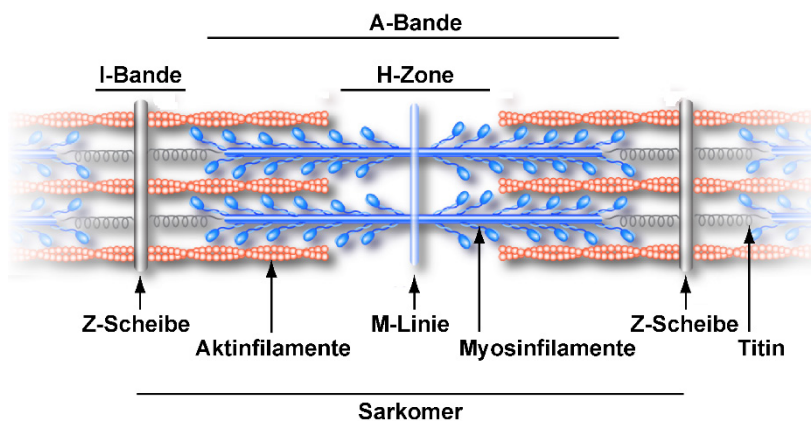


Abbildung 1: Sarkomerstruktur. Als Sarkomer wird der zwischen zwei benachbarten Z-Scheiben liegende Bereich einer Muskelfibrille bezeichnet. Aufgrund der unterschiedlich dunklen Erscheinung während der elektronenmikroskopischen Betrachtung wird es in verschiedene Bereiche eingeteilt. Diese Unterschiede in der Lichtbrechung sind auf die Anordnung der Filamente zurückzuführen. Im Bereich der I-Bande (isotrop) befinden sich nur Aktinfilamente, in der A-Bande (anisotrop) Aktin- und Myosinfilamente, in der H-Zone nur Myosinfilamente. Die Verankerung der Aktinfilamente erfolgt in der Z-Scheibe, die der Myosinfilamente in der M-Linie. Titin verbindet die Myosinfilamente mit der Z-Scheibe.verändert nach 4, ergänzt durch 5

Die Aktinfilamente sind aus globulären Aktinmolekülen, die sich zu langen, fadenförmigen Polymeren zusammengelagert haben, aufgebaut. Weitere Bestandteile der Aktinfilamente, auch dünne Filamente genannt, sind Tropomyosin und der Troponinkomplex, bestehend aus Troponin I, Troponin C und Troponin T, welche für die Regulation der Kontraktion bedeutend sind (Abbildung 2).

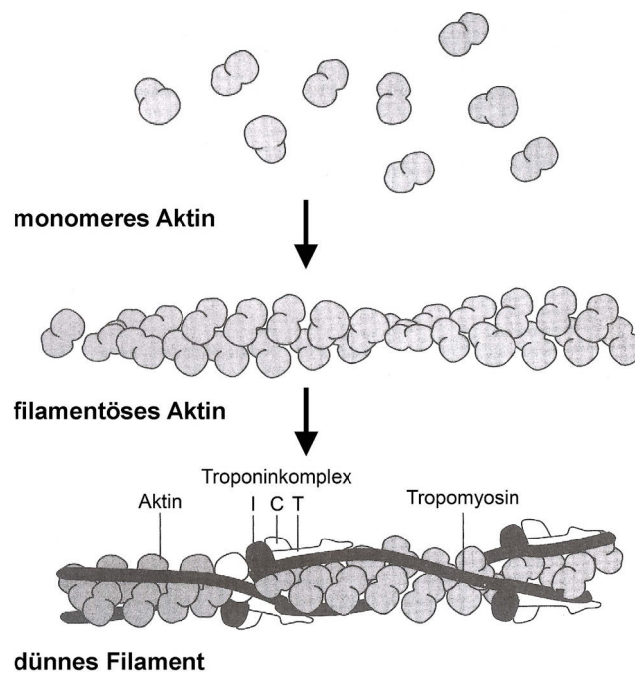


Abbildung 2: Aufbau des dünnen Filaments. Globuläre Aktinmoleküle polymerisieren zu filamentösem Aktin, das eine gewundene, fadenförmige Struktur aufweist und zusammen mit Tropomyosin und dem Troponinkomplex, bestehend aus Troponin I, Troponin C und Troponin T, das dünne Filament bildet. verändert nach 5

Die in den Sarkomeren vorliegenden Myosine bestehen aus einer schweren Kette, welche die ATPase-Aktivität aufweist und dadurch die Kontraktilität ermöglicht. Sie wird in eine Kopf-, Hals- und Schwanzdomäne unterteilt. An diese schwere Kette binden eine regulatorische sowie eine strukturelle leichte Kette.⁶⁻⁸ Zwei dieser aus je drei Ketten bestehenden Myosine lagern sich zusammen, indem sich die helikalen Schwanzdomänen der beiden schweren Ketten umeinanderwinden. Dieser Komplex aus sechs Ketten (zwei schwere und vier leichte) wird dann meist als Myosindimer oder einfach als Myosin bezeichnet. Ca. 150 dieser Dimere lagern sich zu bipolaren Myosinfilamenten zusammen. Die Bipolarität kommt dadurch zustande, dass in der einen Hälfte des Myosinfilaments alle Myosinköpfe in die eine Richtung zeigen und in der anderen Hälfte in die andere Richtung. Dabei ragen die Myosinköpfe aus dem Filament heraus und ermöglichen die Interaktion mit den Aktinmolekülen der dünnen Filamente (Abbildung 3).^{1-3,9}

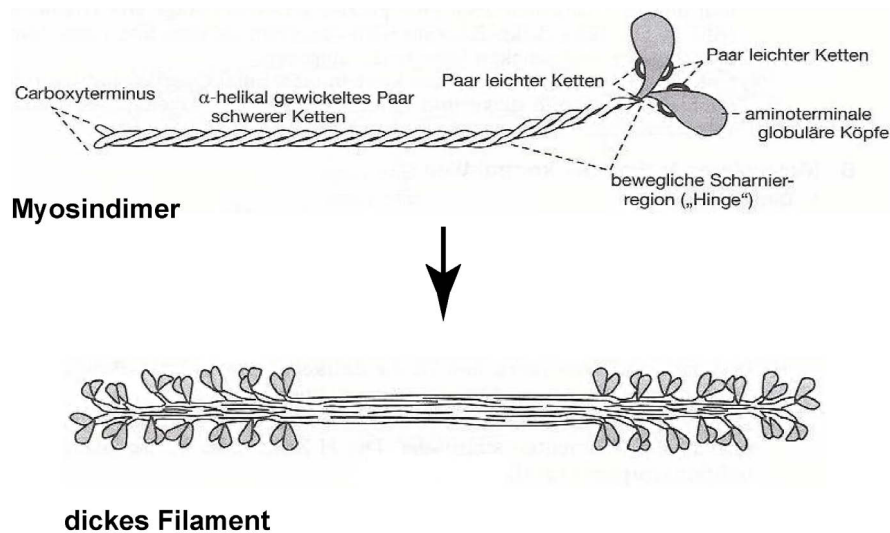


Abbildung 3: Aufbau des dicken Filaments. Ein Myosindimer besteht aus zwei identischen schweren Ketten, deren langgestreckte Carboxyenden umeinandergewunden sind, und vier leichten Ketten, von denen je zwei an der Hals- oder Scharnierregion einer schweren Kette gebunden sind. Davon übt je eine Kette eine strukturelle und die andere eine regulatorische Funktion aus. Die globulären Kopfdomänen der schweren Ketten beherbergen die ATPase-Aktivität und die Bindungsregion für Aktin.^{verändert nach 5}

Bei einer Muskelkontraktion kommt es zu einer ATP- und Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung des Myosins, die dazu führt, dass die Myosinfilamente die Aktinfilamente aufeinander zu bewegen. Dadurch wird das Sarkomer verkürzt und der Muskel wird angespannt, das heißt er kontrahiert (Abbildung 4).^{4,9-11}

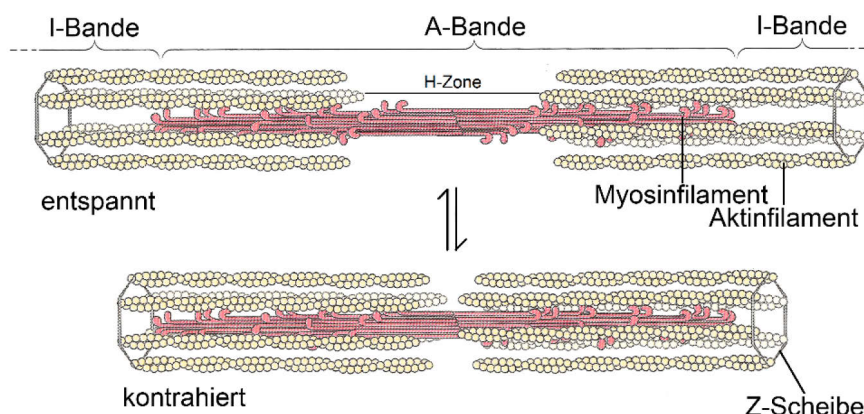


Abbildung 4: Die Kontraktion führt zur Verkürzung des Sarkomers. Im entspannten Zustand befinden sich im Bereich der H-Zone nur Myosinfilamente. Während der Muskelkontraktion gleiten die dicken an den dünnen Filamenten entlang und bewegen dadurch die Z-Scheiben aufeinander zu. Das Sarkomer wird verkürzt und die H-Zone ist nicht mehr vorhanden.^{verändert nach 9}

Skelett- und Herzmuskulatur haben viele Gemeinsamkeiten hinsichtlich des generellen Aufbaus ihres kontraktiven Apparates. Sie unterscheiden sich jedoch, abgesehen von ihren

verschiedenen Aufgaben, auch in ihrer zellulären Morphologie und in der Zusammensetzung der Myosin- und Aktinisoformen. Auf diese Unterschiede wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

5.1.1 Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur stellt 40 bis 50 % des menschlichen Körpergewichts dar und ist unter anderem verantwortlich für die Fortbewegung des Organismus, die Bewegung der Atemhilfsmuskulatur und die Stabilisierung der Körperhaltung. Außerdem spielt sie eine Rolle bei der Wärmeproduktion und als metabolisches Organ, da bis zu 80 % des Blutzuckers durch die Muskulatur aufgenommen werden können und die Muskelproteine als Aminosäurereserve dienen.^{2,12}

5.1.2 Aufbau eines Skelettmuskels

Die Myozyten entstehen aus Vorläuferzellen, den Myoblasten. Diese sind spindelförmig und haben einen zentral gelegenen Zellkern. Mehrere Myoblasten fusionieren und bilden dadurch eine Myozyte mit länglicher Form und mehreren Zellkernen, die in der ausgereiften Muskelzelle dann randständig liegen. Die Myozyten können zwischen wenigen Millimetern und 10 cm lang werden und heißen deshalb auch Muskelfasern. Sie werden durch eine Bindegewebsschicht, das Endomysium, umhüllt. Eine weitere Schicht Bindegewebe, das Perimysium, schließt mehrere Muskelfasern zu einem Bündel, dem Faszikel, zusammen. Mehrere dieser Bündel bilden dann den vollständigen Muskel, der durch das Epimysium nach außen abgegrenzt, von einer weiteren Bindegewebsschicht, der Faszie, umhüllt, und über eine Sehne mit einem Knochen verbunden ist (Abbildung 5).^{2,13,14}

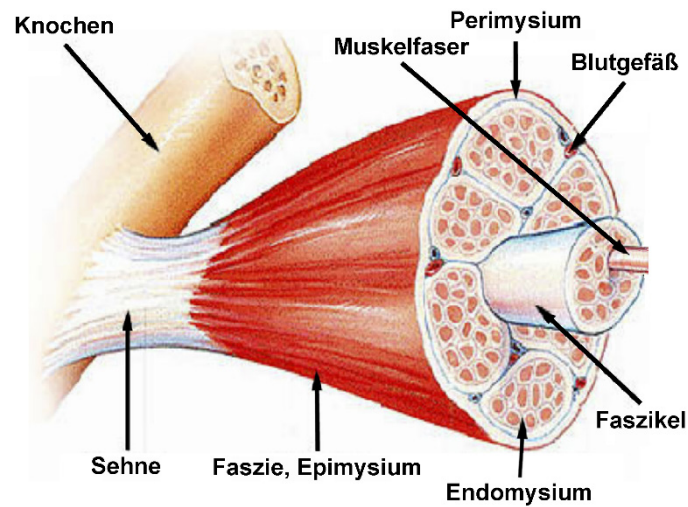


Abbildung 5: Anatomie eines Skelettmuskels. Einzelne Muskelfasern sind vom Endomysium umgeben. Mehrere Muskelfasern bilden ein Muskelfaserbündel, das Faszikel, und werden vom Perimysium umhüllt. Mehrere Faszikel wiederum werden vom Epimysium umschlossen, das über die Faszie in eine Sehne mündet und über diese mit einem Knochen verbunden wird.^{verändert nach 14}

5.1.3 Isoformen der schweren Myosinketten und verschiedene Muskelfasertypen

Die einzelnen Muskeln nehmen im Organismus sehr vielfältige Aufgaben wahr. Dementsprechend zeigen die verschiedenen Muskeln Unterschiede im Bezug auf die Stärke und Dauer ihrer Kontraktionen. Die Muskeln weisen metabolische und strukturelle Unterschiede auf, die maßgeblich durch die in ihnen enthaltenen Muskelfasertypen bestimmt werden. Die Eigenschaften der Muskelfasertypen wiederum sind abhängig von ihrer Myosinzusammensetzung. Die Variabilität der Myosine kommt dabei durch unterschiedliche Kombinationen aus leichten und schweren Myosinketten zustande. Weil die Kontraktilität eine Eigenschaft der schweren Myosinketten (MyHC, *myosin heavy chain*) ist, wird im folgenden Abschnitt nur auf deren Isoformen näher eingegangen. Die Isoformen der MyHCs in der Skelettmuskulatur werden durch mindestens acht Gene kodiert und die Sequenzübereinstimmung derselben Isoform zwischen den Spezies ist höher, als zwischen den verschiedenen Isoformen innerhalb einer Spezies.^{6,8,15-17} In Tabelle 1 sind die humanen und murinen Isoformen der in den Skelettmuskeln vorwiegend vorkommenden MyHCs aufgelistet.

Tabelle 1: Humane und murine Isoformen der schweren Myosinketten in der Skelettmuskulatur. MyHC-2d/x, MyHC-2a, MyHC-2b und MyHC-β/slow sind die am häufigsten in der erwachsenen Skelettmuskulatur auftretenden Isoformen. MyHC-emb ist die embryonale Isoform, welche bei regenerativen Prozessen auch in adulten Muskeln exprimiert wird. Nur in speziellen Muskeln, z. B. den Augen- oder den Kaumuskeln, vorkommende Myosinisoformen sind nicht erwähnt.^{6,15,18,19}

Genname human / murin	Proteinname
<i>MYH1 / Myh1</i>	MyHC-2d, auch MyHC-2x oder MyHC-2d/x genannt
<i>MYH2 / Myh2</i>	MyHC-2a
<i>MYH4 / Myh4</i>	MyHC-2b
<i>MYH7 / Myh7</i>	MyHC-β/slow
<i>MYH3 / Myh3</i>	MyHC-emb

Ein wichtiges Unterscheidungskriterium der MyHC-Isoformen ist ihre ATPase-Aktivität und die damit zusammenhängende Geschwindigkeit ihrer Kontraktion. Aufgrund dieser Eigenschaften werden Muskelfasern in langsam und schnell kontrahierende Fasern unterteilt. Langsam kontrahierende Fasern enthalten die Isoform MyHC-β/slow, welche eine geringe ATPase-Aktivität aufweist. Diese Fasern werden auch als Typ I-Fasern bezeichnet. Schnell kontrahierende Muskelfasern mit höheren ATPase-Aktivitäten enthalten entweder MyHC-2a und heißen dann Typ IIA-, oder MyHC-2b in den Typ IIB-Fasern oder MyHC-2d/x in den Typ IID/X-Fasern. Die Benennung humaner und muriner Isoformen und Fasertypen in der Literatur ist nicht einheitlich. Die beim Menschen als Typ IIB bezeichneten Fasern enthalten die Myosinisoform, die der MyHC-2d/x-Isoform der Nagetiere entspricht und sollten demzufolge Typ IID/X genannt werden,^{17,20–22} meist wird dennoch von Typ IIB-Fasern gesprochen. Des Weiteren gibt es verschiedene Hybridfasertypen, die aus einer unterschiedlichen Kombination von zwei MyHC-Isoformen bestehen können und nach diesen benannt werden, zum Beispiel Typ IIA/X-Fasern.^{2,12,17,18,22–24}

Das zweite wichtige Unterscheidungsmerkmal der Muskelfasertypen ist die Art ihrer Energiegewinnung. Typ I-Fasern heißen auch oxidative Fasern, da sie Energie hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien generieren. Aus diesem Grund enthalten sie deutlich mehr Mitochondrien als Typ II-Fasern. Die Energiebereitstellung in den schnell kontrahierenden Fasern der Typen IID/X und IIB erfolgt vorwiegend durch anaerobe Glykolyse, sie werden deshalb auch glykolytische Fasern genannt. In den Fasern vom Typ IIA erfolgt die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung und anaerobe Glykolyse, aus diesem Grund heißen sie auch oxidative/glykolytische Fasern.^{2,7,15,25} Das Vorkommen und die metabolischen Eigenschaften der verschiedenen Muskelfasertypen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Kontraktile und metabolische Eigenschaften der verschiedenen Muskelfasertypen.^{2,22,25-27}

Eigenschaft	Fasertyp			
	I	IIA	IID/X*	IIB*
Vorkommen	Mensch/Nagetier	Mensch/Nagetier	Mensch/Nagetier	Nagetier
vorherrschende MyHC-Isoform	MyHC-β/slow	MyHC-2a	MyHC-2d/x	MyHC-2b
Kontraktionstyp	langsam	schnell	schnell	sehr schnell
Ermüdbarkeit	niedrig	mittel	hoch	sehr hoch
Blutfluss	hoch	hoch	niedrig	niedrig
<u>Stoffwechsel</u>				
ATPase-Aktivität	niedrig	mittel	hoch	hoch
Mitochondrien	viele	viele	wenige	wenige
Glykogen	wenig	mittel	viel	viel
Gehalt energiereicher Phosphate	niedrig	mittel	hoch	hoch
glykolytische Kapazität	niedrig	mittel	hoch	hoch
oxidative Kapazität	hoch	hoch	mittel	niedrig
Fettstoffwechsel	hoch	mittel	niedrig	niedrig

*Humane Muskelfasern, die als Typ IIB bezeichnet werden, enthalten die dem Nagetier-MyHC-2d/x entsprechende Myosin-Isoform.^{28,29}

Verschiedene Muskeln haben eine unterschiedliche Zusammensetzung an Muskelfasertypen. So besteht zum Beispiel der *Musculus (M.) soleus* von C57/BL6J-Mäusen zu 37,4 % aus langsam kontrahierenden Typ I-Fasern und zu 38,6 %, 18,7 % und 5,7 % aus den schnell kontrahierenden Fasertypen IIA, IIAD und IID. Der *M. extensor digitorum longus* hingegen enthält fast gar keine langsam kontrahierenden Fasern und besteht zu fast zwei Dritteln aus IIB Fasern.²³ In unterschiedlichen Mausstämmen variieren die prozentualen Angaben etwas, aber die allgemeine Zusammensetzung ist ähnlich.^{23,30,31} In Tabelle 3 sind die Fasertypzusammensetzungen der vier Skelettmuskeln, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgelistet und in Abbildung 6 sind sie in einer anatomischen Zeichnung dargestellt.

Tabelle 3: Prozentualer Anteil der verschiedenen Fasertypen in 4 Skelettmuskeln von C57/BL6J-Mäusen.²³

Fasertyp	Sol	EDL	Ga	TA
I	37,4	0,4	0,2	5,7
IC/IIC	0	3,6	0,01	0
IIA	38,6	0,5	1,1	5,7
IIAD	18,7	7,6	3,4	12,4
IID	5,7	0,5	2,3	2,3
IIDB	0	21,5	33,8	19,4
IIB	0	66,0	59,7	54,4

Abkürzungen: Sol: *M. soleus*, EDL: *M. extensor digitorum longus*, Ga: *M. gastrocnemius*, TA: *M. tibialis anterior*, IC = Hybridfaser mit höherem Anteil an MyHC- β /slow als MyHC-2a, IIC= Hybridfaser mit höherem Anteil an MyHC-2a als MyHC- β /slow

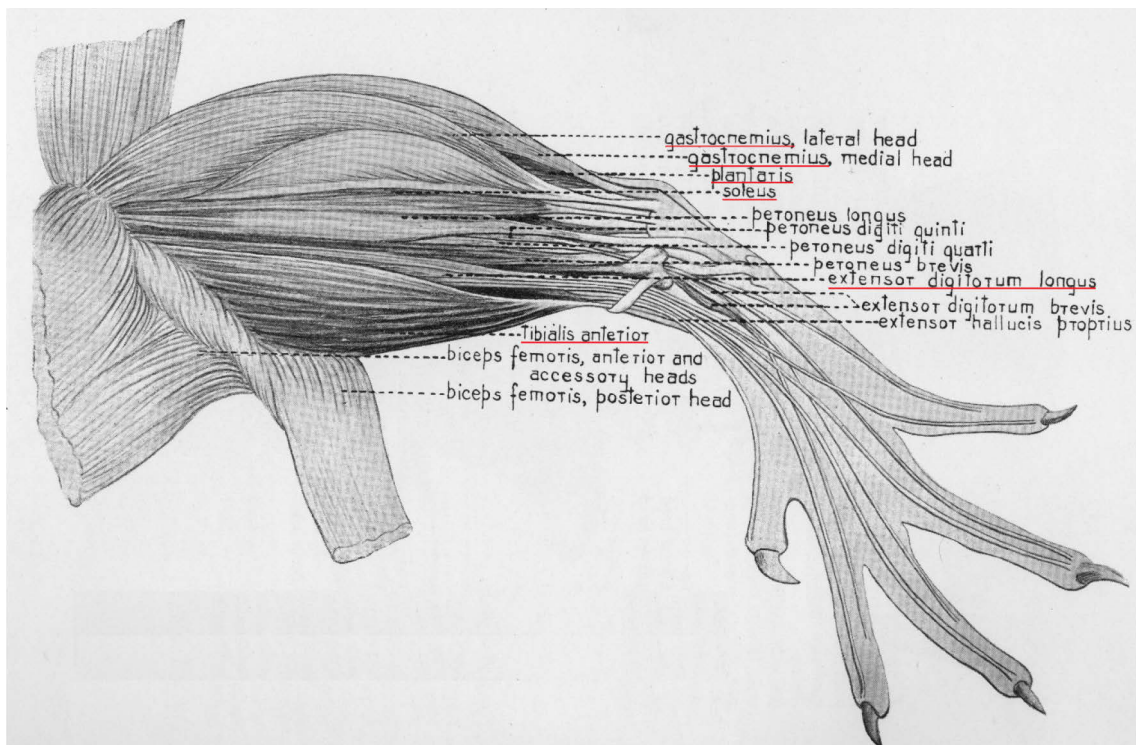


Abbildung 6: Anatomische Zeichnung der Skelettmuskulatur des Rattenhinterbeines. Die vier für die Analysen verwendeten Muskeln sind rot unterstrichen: *M. gastrocnemius-plantaris* (die verschiedenen Anteile wurden gemeinsam isoliert und verwendet), *M. soleus*, *M. extensor digitorum longus* und *M. tibialis anterior*.³²

Die Zusammensetzung der Muskeln ist plastisch, sie variiert während der Entwicklung, mit der Beanspruchung und aufgrund verschiedener anderer Faktoren, wie körperliche Aktivität,^{33,34} Alter³⁵ oder Krankheit.^{36–38} So werden zum Beispiel während der Embryogenese zuerst die embryonale MyHC-Isoform und MyHC- β /slow exprimiert, die dann später durch die schnelleren MyHC-2-Isoformen ersetzt werden.^{39,40} Ausdauertraining führt zu einer erhöhten Expression von MyHC- β /slow, Krafttraining jedoch steigert die Bildung von MyHC-2a.^{41,42}

5.1.4 Skelettmuskelhypertrophie und -atrophie

Eine weitere Möglichkeit der Anpassung an veränderte Beanspruchung ist neben der Fasertypveränderung eine Veränderung der Muskelmasse. Hierbei spricht man von Skelettmuskelhypertrophie, wenn sich die Muskelmasse aufgrund der Bildung zusätzlicher Sarkomere in den einzelnen Muskelfasern erhöht, ohne dass es zu einer Zunahme der Zellzahl kommt. Dies wird dadurch erreicht, dass die Proteinsynthese den Proteinabbau übersteigt. Bei einer Skelettmuskelatrophie hingegen übersteigt die Proteindegradation die Proteinsynthese, dadurch kommt es zu einer Abnahme des Muskelgewichts (Abbildung 7).^{12,43–46}

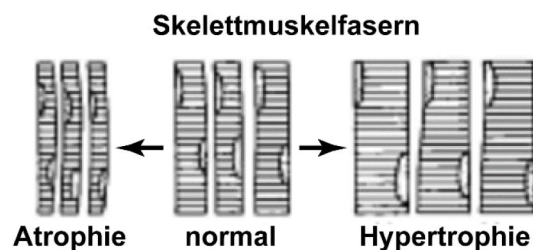


Abbildung 7: Skelettmuskelatrophie und -hypertrophie. Die Verringerung der Sarkomerenzahl führt zu kleineren Muskelfasern, die Zunahme von Sarkomeren zur Vergrößerung der Muskelfasern. Die Zellzahl selbst bleibt unverändert.^{verändert nach 47}

Neben physiologischen Veränderungen der Skelettmuskelmasse infolge der Anpassung an veränderte Bewegungsmuster kommt es auch während des Alterungsprozesses⁴⁸ und aufgrund von verschiedenen Krankheiten, wie Sepsis,⁴⁹ Diabetes⁵⁰ oder Schilddrüsenerkrankungen,^{51,52} zur Skelettmuskelatrophie oder -hypertrophie.

Da eine zur ursprünglichen Erkrankung hinzukommende Skelettmuskelatrophie die Genesungswahrscheinlichkeit verringert und den Gesundungsprozess verlangsamt,^{53–56} würde die Entwicklung eines Medikaments oder einer Therapiemethode zur Vermeidung oder schnelleren Bekämpfung der Atrophie zu einer bedeutenden Verbesserung des Heilungsprozesses der Patienten führen.

5.2 Herzmuskulatur

5.2.1 Aufbau des Herzens

Das Herz ist ein Hohlmuskel, der bei Säugetieren aus vier Bereichen besteht: zwei Vorhöfen, den Atria, und zwei Kammern, den Ventrikeln. Zwischen den Atria und den Ventrikeln befinden

sich die Segelklappen, die ein Zurückfließen des Blutes aus den Ventrikeln in die Atria verhindern. Das rechte Atrium wird durch die Trikuspidalklappe vom rechten Ventrikel getrennt, das linke Atrium durch die Mitralklappe vom linken Ventrikel. Die Herzscheidewand trennt die linke und die rechte Herzhälfte voneinander. Dabei spricht man bei dem Bereich, der die Atria trennt, vom Vorhofseptum und bei dem Bereich, der die Ventrikel trennt, vom Kammerseptum oder auch vom interventrikulären Septum. Die Aufteilung in zwei Herzhälften ermöglicht die Etablierung von zwei Blutkreisläufsystemen, dem Lungenkreislauf und dem Körperkreislauf. Beim Lungenkreislauf fließt das aus dem rechten Ventrikel herausgepumpte Blut durch die Lungenarterie zur Lunge, wird dort mit Sauerstoff angereichert und strömt durch die Lungenvenen in das linke Atrium. Von dort gelangt es durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel, der das Blut in die Aorta und den Körperkreislauf pumpt, bis es über die Hohlvenen in das rechte Atrium zurückkehrt und damit den Blutkreislauf abschließt. Durch dieses doppelte Kreislaufsystem wird der Organismus mit Sauerstoff versorgt, aber auch der Transport von Nährstoffen, Hormonen, Abfallprodukten und Wärme wird auf diese Weise ermöglicht.^{57,58}

Die wichtigste Aufgabe des Herzens besteht darin, durch seine regelmäßigen Kontraktionen für einen kontinuierlichen Blutfluss zu sorgen. Für diesen Pumpvorgang sorgen die Herzmuskelzellen, die Kardiomyozyten. Das Herz besteht jedoch nicht nur aus Muskelzellen. Der Innenraum ist mit Bindegewebe, dem Endokard, ausgekleidet. Danach folgt die Muskelschicht, das Myokard. Es ist im linken Ventrikel stärker ausgeprägt als im rechten, da von hier aus das Blut mit hohem Druck durch den gesamten Organismus gepumpt wird. Außerhalb der Muskelschicht liegt wieder eine Bindegewebsschicht, das Epikard. Dieses bildet zusammen mit dem das ganze Herz umschließenden Perikard den Herzbeutel. Zwischen Epi- und Perikard befindet sich die Perikardhöhle, ein mit seröser Flüssigkeit gefüllter Hohlraum, der für eine reibungslose Bewegung des Herzens während der Kontraktionen und Relaxationen notwendig ist (Abbildung 8).^{57,58}

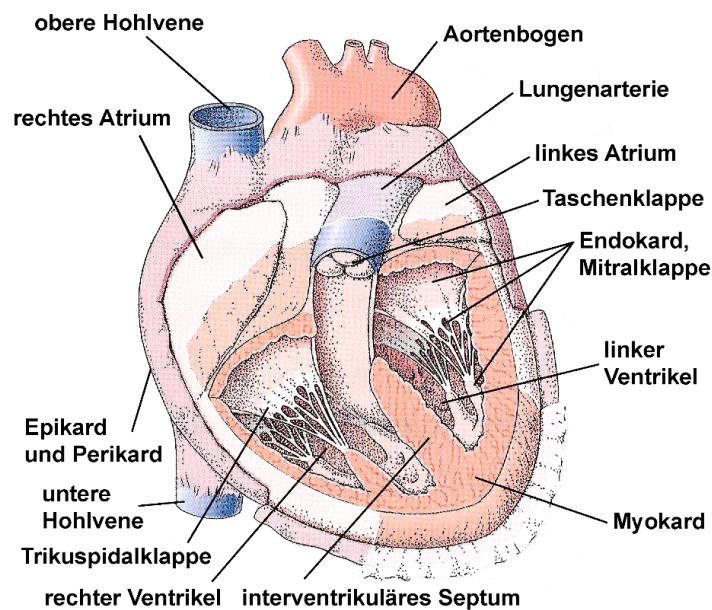


Abbildung 8: Längsschnitt durch das Herz. Darstellung der vier Herzbereiche rechtes und linkes Atrium und rechter und linker Ventrikel, sowie der dreischichtigen Wandstruktur des Herzens bestehend aus Endo-, Myo- und Epikard. Die Segelklappen zwischen Atria und Ventrikeln und die Taschenklappe in der Lungenarterie sind ebenfalls dargestellt. verändert nach 57 mit freundlicher Genehmigung von Springer Science+Business Media

5.2.2 Kontraktionszyklus des Herzens

Für eine effiziente Pumpleistung des Herzens ist ein koordinierter Zyklus aus Anspannung (Systole) und Erschlaffung (Diastole) der Vorhof- und Kammermuskulatur erforderlich. Während der Kammer systole kontrahiert das Myokard der Ventrikel und das Blut wird aus dem Herzen in die Arterien gepumpt. Man unterteilt die Kammer systole in die isovolumetrische Anspannungsphase, in der durch die Kontraktion Druck aufgebaut wird, ohne dass sich das Blutvolumen in der Kammer ändert. Wenn der Druck in der Kammer den Druck in der Aorta bzw. der Pulmonalarterie überschreitet, öffnen sich die Taschenklappen und die Austreibungsphase, in der das Blut hinausströmt, beginnt. In der anschließenden Kammerdiastole entspannt sich der Muskel und die Ventrikel füllen sich wieder mit Blut. Dies geschieht ebenfalls in zwei Phasen. In der Entspannungsphase erschlafft das Myokard, dadurch sinkt der Druck in den Kammern. Sobald der Druck in den Ventrikeln den in der Aorta bzw. der Pulmonalarterie unterschreitet, schließen die Taschenklappen und verhindern dadurch ein Zurückfließen des Blutes in die Ventrikel. In der Füllungsphase bewirkt die weitere Relaxation der Muskulatur ein Absinken des Kammerdruckes unter dem der Vorhöfe, die Segelklappen öffnen sich und Blut strömt aus den Vorhöfen in die Kammern. Dieser

Bluteinstrom wird am Ende der Diastole durch die Kontraktion der Vorhöfe unterstützt, danach beginnt der Herzzyklus erneut mit der Kammer systole.^{57,58}

Der beschriebene Herzaufbau und der Arbeitszyklus sind in allen Säugetieren vergleichbar. Unterschiede in den Herzfunktionen ergeben sich aufgrund der verschiedenen Bedürfnisse der Spezies. In Tabelle 4 sind einige Eigenschaften des humanen und des murinen Herzens gegenübergestellt.

Tabelle 4: Vergleich von humanen und murinen Herz- und Kreislaufeigenschaften in Ruhe. Die Werte sind bezogen auf einen 70 kg schweren Menschen und eine 30 g schwere Maus.^{57,59,60}

Eigenschaft	Mensch	Maus
Gewicht	300 g	180 mg
Herzfrequenz	70 min ⁻¹	600 min ⁻¹
Schlagvolumen	70 ml	18 µl
Herzminutenvolumen	5 l/min	11 ml/min
Blutdruck	120/80 mmHg	147/106 mmHg

5.2.3 Kardiomyozyten

Die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) weisen, wie die Skelettmuskelzellen, eine unter dem Mikroskop sichtbare Querstreifung auf. Sie unterscheiden sich jedoch von ihnen durch eine geringere Zelllänge, dem physiologischen Auftreten von Verzweigungen der Zellen und darin, dass sie nur einen zentral gelegenen Zellkern besitzen. Muskelfasern des Herzens bestehen aus mehreren hintereinanderliegenden Zellen, die durch sogenannte Glanzstreifen miteinander verbunden und elektrochemisch gekoppelt sind.^{2,57}

5.2.4 Myosinisoformen im Herzen

Für die Kontraktion der Herzmuskulatur sind die beiden Isoformen der schweren Myosinketten kardiales α -Myosin und MyHC- β /slow (auch kardiales β -Myosin genannt, obwohl es das gleiche Myosin wie in der Skelettmuskulatur ist) zuständig, die beim Menschen durch die Gene *MYH6* bzw. *MYH7* kodiert werden (*Myh6* bzw. *Myh7* bei der Maus). Die Proteine weisen eine Sequenzidentität von ca. 93 % auf, unterscheiden sich jedoch einerseits in ihrer ATPase-Aktivität und dadurch in ihrer Kontraktionsgeschwindigkeit und andererseits durch ihre Expression während der Entwicklung und in den verschiedenen Herzarealen. Außerdem wird

ihre Expression durch verschiedene Stimuli, wie Hormone oder das Altern, unterschiedlich beeinflusst (Tabelle 5).^{6,61}

Tabelle 5: Beeinflussung der Genexpression der schweren kardialen Myosinketten durch verschiedene Stimuli.⁶

Stimulus	<i>MYH6</i>	<i>MYH7</i>
+ Triiodthyronin	↑	↓
- Triiodthyronin	↓	↑
sportliche Betätigung	↑	↓
Bluthochdruck	↓	↑
Altern	↓	↑

Während der Embryonalentwicklung der Maus werden beide Myosinisoformen bereits im Herzschauch exprimiert. Das langsam kontrahierende MyHC- β /slow ist die vorherrschende Isoform. Im weiteren Verlauf der Entwicklung ist die Bildung von MyHC- β /slow hauptsächlich auf die Myozyten der Ventrikel und des Überganges zwischen den Vorhöfen und den Ventrikeln sowie auf den Ausflusstrakt begrenzt. Bis kurz vor der Geburt bleibt es jedoch die überwiegende Myosinisoform, danach wird es innerhalb weniger Tage durch das schneller kontrahierende α -Myosin ersetzt, das dann ca. 90 % der Myosine ausmacht.^{6,62} Beim Menschen findet dieser Austausch der Myosine in den Ventrikeln nicht statt, MyHC- β /slow bleibt mit ca. 93 % die dominierende Isoform, α -Myosin hingegen ist die häufigere Isoform in den Atria.^{6,61}

5.2.5 Kardiales Remodelling

Wie die Skelettmuskulatur, so kann sich auch die Herzmuskulatur an veränderte Bedürfnisse des Organismus anpassen. Diese Anpassung wird als Remodelling (Umgestaltung) bezeichnet, da es hierbei zu Umbauprozessen auf molekularer und zellulärer Ebene kommt. Durch regelmäßige sportliche Betätigung oder während einer Schwangerschaft kommt es zu einer Vergrößerung des Herzens, die vorwiegend auf einer Zunahme der Zellgröße beruht und weniger auf einer Zunahme der Zellzahl. Dieser Prozess heißt physiologische kardiale Hypertrophie und ist notwendig, um den gesteigerten Bedarf an Sauerstoff aufgrund der erhöhten Stoffwechsellleistung zu decken. Es kommt dabei zu einer gesteigerten Proteinsynthese, die die Proteindegradation überwiegt. Veränderungen der Herzstruktur und -funktion an sich treten nicht auf und nach dem Wegfall der Belastung verkleinert sich das Herz wieder auf die Ausgangsgröße.⁶³⁻⁷⁰

Im Gegensatz dazu steht die pathologische kardiale Hypertrophie. Ihr liegen verschiedene Beeinträchtigungen zugrunde, die wahrscheinlich durch eine Vergrößerung des Herzens kompensiert werden sollen. Es wird zwischen einer konzentrischen und einer exzentrischen pathologischen Herzhypertrophie unterschieden (Abbildung 9). Bei ersterer kommt es zu einer vermehrten Anlagerung von Sarkomeren parallel zu den existierenden, sodass die Zellen und dadurch auch das Myokard dicker werden. Ursachen hierfür sind hauptsächlich eine chronische Drucküberbelastung durch Bluthochdruck oder eine Aortenklappenstenose. Bei der exzentrischen Hypertrophie erfolgt die Anlagerung zusätzlicher Sarkomere hauptsächlich in Reihe, das heißt, die Zellen werden länger und das Lumen der Herzkammern dadurch größer, man spricht auch von einer dilatativen Herzhypertrophie. Ihr liegen erhöhte Volumenbelastungen, wie zum Beispiel bei einer Aortenklappen- oder Mitralklappeninsuffizienz, zugrunde. Beide Arten der pathologischen Herzhypertrophie beeinträchtigen die Herzfunktion. Bei der konzentrischen Hypertrophie kann es z. B. durch die dickere Herzwand zu einem verkleinerten Lumen der Ventrikel und dadurch zu einem zu geringen Blutvolumen kommen, das je Herzschlag in den Körper gepumpt wird. Bei der dilatativen Hypertrophie führt das vergrößerte Lumen dazu, dass die Kontraktionskraft des Myokards nicht mehr ausreicht, um die Herzkammern soweit zusammenzuziehen, dass genügend Blut herausgepumpt wird. Die Erweiterung der Herzhöhlen kann ebenfalls eine Erweiterung der Klappenringe nach sich ziehen, wodurch es zu einer Schlussunfähigkeit der Klappen, also einer Klappeninsuffizienz, kommen kann. In diesem Fall strömt Blut aus den Arterien zurück in die Ventrikel, dadurch sinkt das in den Körper gepumpte Blutvolumen zusätzlich.^{63,64,66,71,72}

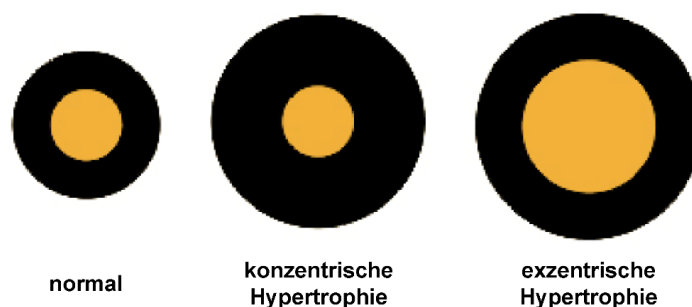


Abbildung 9: Schematischer Querschnitt durch den linken Ventrikel. Im Vergleich zum Herzen im Normalzustand steigt bei der konzentrischen Hypertrophie die Dicke des Myokards an, dadurch verringert sich das Lumen des Ventrikels. Bei der exzentrischen Hypertrophie bleibt die Dicke des Myokards erhalten oder sinkt, das Lumen nimmt jedoch zu.⁷³

Ein weiteres Merkmal der pathologischen Herzhypertrophie ist die verstärkte Bildung und Ablagerung von Kollagenen im Interstitium. Dieser Vorgang der Bindegewebsbildung innerhalb des Herzens wird als kardiale Fibrose bezeichnet. Sie bewirkt eine Versteifung des Gewebes,

führt dadurch zu einer Beeinträchtigung der Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit des Herzens und verringert die Pumpleistung des Organs.⁷⁴⁻⁷⁶ Im gesunden Nagetierherzen bestehen etwa 2-4 % des linken Ventrikels aus kollagenhaltigem Bindegewebe, bei verschiedenen *in vivo* Modellen der kardialen Hypertrophie erhöht sich dieser Anteil auf ca. 8-12 %.^{77,78} Im menschlichen Herzen erhöht sich aufgrund kardialer Hypertrophie der Bindegewebsanteil im linken Ventrikel von ca. 1 % auf etwa 10 %, im Falle einer dilatativen Kardiomyopathie kann er sogar auf etwa 30 % ansteigen.^{79,80} Im Herzen treten hauptsächlich die Kollagene der Typen I (50-85 %) und III (10-45 %) auf,^{78,81-83} sowie Typ IV, der vorwiegend für die Verankerung der Zellen in der Basallamina verantwortlich ist.⁸⁴ Bei verschiedenen pathologischen Herzhypertrophien kommt es zu einer Zunahme von Kollagen-Typ I und III sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene, die mit dem Auftreten einer Fibrose einhergeht.⁸⁵⁻⁸⁷ Auch in Tiermodellen der kardialen Hypertrophie wird vermehrt Kollagen gebildet.⁸⁸⁻⁹² Die erhöhte Kollageneinlagerung bewirkt anfangs eine Aufrechterhaltung der systolischen Herzfunktion bei schon beeinträchtigter diastolischer Funktion. Im weiteren Krankheitsverlauf führt die Zunahme an fibrotischem Gewebe zu einer Beeinträchtigung der Pumpfunktion aufgrund einer verringerten Elastizität des Herzens.^{74,75}

Die Entwicklung der kardialen Fibrose kann u. a. durch eine verstärkte Expression von CTGF (Bindegewebswachstumsfaktor, *connective tissue growth factor*) hervorgerufen werden. Dieses Protein gehört zur CCN-Familie (benannt nach den Familienmitgliedern Cyr61, CTGF, Nov), die beim Menschen aus 6 Mitgliedern besteht und an einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie Proliferation, Zell-Matrix-Adhäsion oder Zellmigration, beteiligt ist. CTGF wird sezerniert, kommt in verschiedenen posttranslational generierten Varianten vor, bindet an Integrine und wirkt wahrscheinlich sowohl para- als auch autokrin.⁹³⁻⁹⁶ Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des humanen⁹⁷ und murinen^{98,99} CTGF beträgt 91 %.⁹⁵ Bei verschiedenen Formen kardialer Myopathien wurde eine verstärkte Expression von CTGF bei gleichzeitiger Zunahme von fibrotischem Gewebe im Herzen nachgewiesen, zum Beispiel bei ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie,¹⁰⁰ in Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz¹⁰¹ oder nach einem Herzinfarkt.^{102,103} In verschiedenen Mausmodellen der kardialen Hypertrophie wurde ebenfalls eine Korrelation zwischen der CTGF-Expression und der vermehrten Produktion von Kollagenen sowie einer Zunahme des fibrotischen Gewebes gezeigt.^{91,92,104}

Neben den gerade beschriebenen Veränderungen der Herzstruktur kommt es auch zu einer veränderten Genexpression, die zur Aktivierung des fötalen Genprogramms führt, auf welche später noch näher eingegangen wird. Eine weitere Ursache für die Entwicklung einer

pathologischen kardialen Hypertrophie liegt in erblichen Mutationen in den Genen verschiedener Proteine des kontraktilen Apparates, wie von MyHC- β /slow oder der Troponin-Untereinheiten.^{6,8} Auf diese wird in der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingegangen.

Eine Gemeinsamkeit aller Arten der pathologischen Herzhypertrophie besteht darin, dass sie unbehandelt früher oder später zum Herzversagen und zu Herzrhythmusstörungen führen können, die das Überleben des Patienten gefährden.^{63,64,105–108}

Kardiales Remodelling wirkt jedoch nicht nur in die Richtung der Organvergrößerung, sondern kann auch zu einer Verkleinerung des Herzens, der kardialen Atrophie, führen. Dieser Fall tritt vor allem ein, wenn die Belastung des Herzens herabgesetzt wird, wie bei Bettlägerigkeit, der Verwendung eines Herzunterstützungssystems oder bei Schwerelosigkeit von Astronauten im Weltall. Eine weitere Ursache ist eine starke Abmagerung durch Hungern/Mangelernährung oder als Begleiterscheinung verschiedener Krankheiten wie Krebs oder AIDS.^{38,63,109–115} Bei der kardialen Atrophie überwiegt der Proteinabbau die Proteinsynthese, dadurch kommt es zur Verringerung des Proteingehalts und einer Verkleinerung der Zellen und schließlich des gesamten Organs.^{63,116–118} In Abbildung 10 sind die verschiedenen Prozesse des kardialen Remodellings und einige zugrundeliegende Ursachen zusammengefasst.

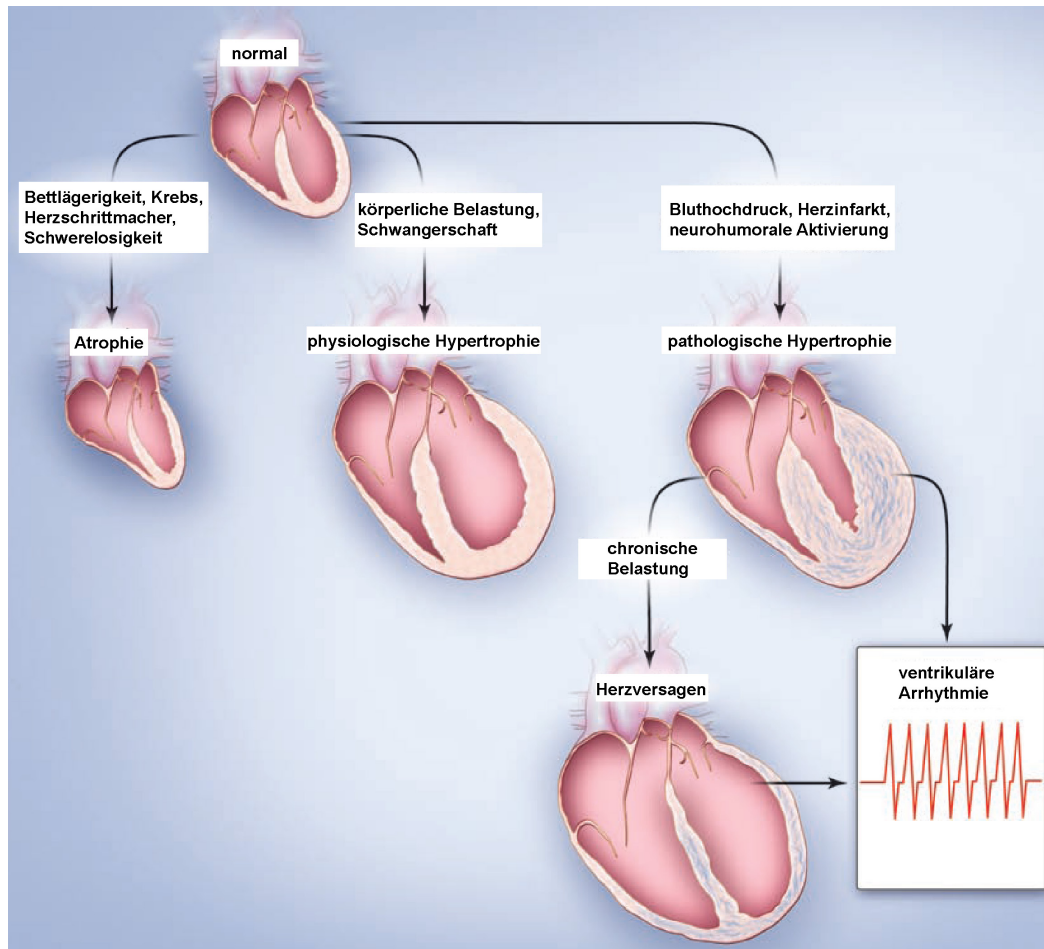


Abbildung 10: Überblick über die verschiedenen Arten des kardialen Remodellings. Darstellung einiger Ursachen sowie der maßgeblichen Veränderungen des Herzens, wie Größenveränderung des Organs, Zu- oder Abnahme des Myokarddurchmessers oder Einlagerung von Kollagenen (blau dargestellt).^{verändert nach 63}

5.2.6 Das fötale kardiale Genprogramm

Im Zusammenhang mit der Entwicklung einer pathologischen Herzhypertrophie kommt es zur Aktivierung des fötalen kardialen Genprogramms. Unter diesem Begriff sind verschiedene Gene zusammengefasst, die während der embryonalen und fötalen Entwicklungsphase im Herzen exprimiert werden, jedoch nach der Geburt weniger aktiv oder inaktiv sind.^{63,119–121} Hierzu zählen u. a.

- *Nppa* (natriuretisches Peptid A, kodiert für den atrialen natriuretischen Faktor, ANF),¹²²
- *Nppb* (natriuretisches Peptid B, kodiert für B-Typ natriuretisches Peptid, BNP),¹²²
- *Myh7* (*myosin heavy chain 7*, kodiert für kardiales Myosin-Schwerekettenprotein beta, auch MyHC- β , MyHC-slow, MyHC- β /slow),^{123–125}
- *Acta1* (Aktin alpha 1, Skelettmuskel, kodiert für die Aktin alpha1-Isoform),^{123–127}

- *Acta2* (Aktin alpha 2, glatte Muskulatur, kodiert für die Aktin alpha2-Isoform),¹²⁷
- *SM22 α* (*smooth muscle protein 22-alpha*, kodiert für Transgelin, Zytoskelettprotein der glatten Muskulatur).¹²⁸

Für die Untersuchung der kardialen Hypertrophie wird häufig die Genexpression von *Nppa*, *Nppb* und *Myh7* analysiert, so auch in der vorliegenden Arbeit. Aus diesem Grund werden sie im Folgenden näher erläutert.

Die Gene *Nppa* und *Nppb* kodieren zusammen mit *Nppc* für die sogenannten natriuretischen Peptide. Es handelt sich dabei um Hormone, die sowohl das kardiovaskuläre als auch das endokrine System beeinflussen. Sie bewirken eine gesteigerte Ausscheidung von Natrium und Harn und senken dadurch den Blutdruck. Während der Embryonalentwicklung werden ANF und BNP im Myokard der Atria und Ventrikel exprimiert. In erwachsenen, gesunden Individuen ist ANF jedoch nur noch in den Atria nachweisbar und BNP vorwiegend in den Ventrikeln.^{120,121,129} Im Zuge einer pathologischen Herzhypertrophie kommt es zu einer Reaktivierung der ANF-Expression in den Ventrikeln und auch die BNP-Expression wird deutlich gesteigert.¹²²

Ein weiteres bedeutsames Merkmal während der kardialen Hypertrophie ist die Veränderung der Myosinisoform-Zusammensetzung im ventrikulären Myokard. Wie bereits erwähnt, kommt es bei den Nagetieren im Verlauf der Individualentwicklung zu einem fast vollständigen Austausch der im Embryo und bis zur Geburt vorherrschenden MyHC- β /slow-Isoform gegen die α -MyHC-Isoform.⁶ In adulten gesunden Mäusen enthalten lediglich ca. 3 % der Kardiomyozyten MyHC- β /slow.¹³⁰ Induziert man in diesen Tieren eine Herzhypertrophie, etwa durch eine Verengung der Aorta, kommt es zu einem deutlichen Anstieg sowohl der Gen- als auch der Proteinexpression von MyHC- β /slow.¹³¹⁻¹³⁵ In menschlichen Herzen überwiegt auch im Erwachsenenalter die MyHC- β /slow-Isoform. Sie macht auf Proteinebene ca. 93 % des gesamten Myosins aus,⁶¹ das heißt, ca. 7 % bestehen aus α -MyHC, auf RNA-Ebene sogar ca. 35 %.¹³⁶ Doch auch hier kommt es im Falle einer pathologischen Herzhypertrophie zur Verschiebung der exprimierten Myosinisoformen mit einem Anstieg von MyHC- β /slow und einem Absinken von α -MyHC auf etwa 2 % des mRNA- und unter 1 % des Proteinanteils, was zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion führen könnte.^{61,136,137} So resultierte die transgene Expression von MyHC- β /slow in Mausherzen in etwa 12 % der Kardiomyozyten bereits in einer um circa 23 % geringeren ATPase-Aktivität und 15 % reduzierten Kontraktilität des gesamten Herzens. Dadurch wird deutlich, dass bereits eine geringe Veränderung der Myosinisoformzusammensetzung zu Unterschieden der Herzfunktion führen kann.¹³⁸

5.3 Ubiquitin-Proteasom-System

Für das Überleben der Zelle sind die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase, die Entfernung defekter oder falsch-gefalteter Proteine und die Beseitigung nicht mehr benötigter Proteine essentiell. Aus diesen Gründen existieren intrazelluläre, regulierbare Proteinabbausysteme. Die bedeutendsten Abbauewege sind das Ubiquitin-Proteasom-System und die lysosomale Degradation.^{139,140} Auf letztere wird hier nicht näher eingegangen. Beim Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) arbeitet eine Vielzahl verschiedener Enzyme zusammen, die für zwei Teilprozesse benötigt werden. Zuerst erfolgt die Markierung des abzubauenen Proteins mit Ubiquitin, danach dessen Degradation durch das Proteasom.

5.3.1 Ubiquitinierung des Zielproteins

Ubiquitin ist ein globuläres Protein aus 76 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 8,5 kD. Es wurde erstmals aus bovinem Thymus isoliert, später in diversen Geweben nachgewiesen und deshalb als ubiquitär vorhandenes Protein, als Ubiquitin, bezeichnet.^{141,142} Die carboxyterminale Aminosäure Glycin des Ubiquitins wird mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins in dem zum Abbau vorgesehenen Protein, dem Substratprotein, verbunden. Für diesen Vorgang sind mehrere Zwischenschritte und drei verschiedene Enzyme erforderlich. Diese Enzymkaskade ermöglicht es, eine große Anzahl verschiedener Substratproteine unter Verwendung desselben Markierungsmoleküls für eine Vielzahl zellulärer Prozesse selektiv zu kennzeichnen. Die Kaskade beginnt stets mit einem der beiden Ubiquitin-aktivierenden Enzyme (E1), kodiert durch *UBA1* bzw. *UBA6*.¹⁴³ Danach erfolgt die Übertragung auf eines der bisher ca. 40 bekannten Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2).^{140,143–145} Die Substratspezifität wird jedoch durch die Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) erreicht, denn nur diese bindet das Substratprotein und bringt es in Kontakt mit dem E2, damit die Ubiquitinierung stattfinden kann. Die Anzahl der für E3s kodierenden Gene im menschlichen Genom wird auf 500 bis 1000 geschätzt. Eine Identifizierung neuer E3-Ligasen wird dadurch erschwert, dass sie sehr unterschiedliche Sequenzen und Strukturen haben können und auch haben müssen, da sie zum einen nur an bestimmte E2s und zum anderen selektiv an ihre Substratproteine binden (Abbildung 11).^{140,143,144,146–148}

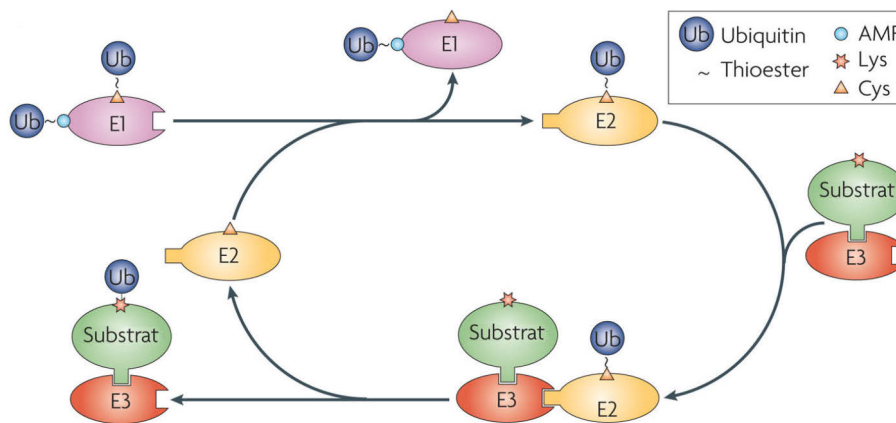


Abbildung 11: Ubiquitinierung des Substratproteins. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 bindet zwei Ubiquitinmoleküle (Ub), eins an seine Adenylierungsdomäne über AMP (Adenosinmonophosphat), das andere an ein Cystein (Cys) im Aktivitätszentrum als Thioester. Das aktivierte Ubiquitin wird auf ein Cystein des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 übertragen. Die Ubiquitin-Protein-Ligase E3 bindet sowohl das Substratprotein als auch das Ubiquitin-gekoppelte E2 und katalysiert die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen dem Glycin 76 des Ubiquitins und einem Lysin (Lys) im Substratprotein.¹⁴⁹

Um das Zielprotein für die Degradation im Proteasom zu markieren, ist die Bindung eines einzigen Ubiquitinmoleküls, eine Monoubiquitinierung, nicht ausreichend. In den meisten Fällen ist hierfür eine Kette von mindestens vier Ubiquitinmolekülen erforderlich.^{150,151} Das heißt, die gesamte Enzymkaskade wird mindestens vier Mal durchlaufen und ab dem zweiten Zyklus ist ein Lysin im bereits verknüpften Ubiquitin der Ansatzpunkt für das nächste Ubiquitin. Da im Ubiquitin sieben Lysine (an den Aminosäurepositionen 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) vorkommen, können verschiedene Verknüpfungsmöglichkeiten auftreten. Bisher geht man davon aus, dass hauptsächlich Ubiquitinketten mit der Verbindung über das Lysin 48 als Signal für den proteasomalen Abbau des Zielproteins dienen,^{140,152,153} aber zum Beispiel auch über Lysin 11 verbundene Ubiquitinketten können zur Degradation im Proteasom führen.¹⁵⁴ Werden alternative Lysine als Verknüpfungspunkt der Ubiquitine in der Kette verwendet, so hat dies meist eine andere Signalwirkung. Die Lysin 63-Polyubiquitinierung der Transkriptionsfaktoren Foxo1 und Foxo3a führt zum Beispiel zur verstärkten Expression ihrer Zielgene.¹⁵⁵ Auch für DNA-Reparaturmechanismen scheint diese Form der Ubiquitinkette eine wichtige Rolle zu spielen. Die Mutation von Lysin 63 zu Arginin macht Zellen empfindlich gegenüber DNA-Schädigung durch UV-Licht und Methylmethansulfonat aufgrund einer Beeinträchtigung des Rad6-abhängigen Reparaturmechanismus.¹⁵⁶ An der Regulation der Länge der Ubiquitinkette als auch an der Art der Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle sind die E2s maßgeblich beteiligt und sie bestimmen dadurch mit, welche Signalwirkung ausgelöst wird.^{146–149} Neben den beschriebenen Polyubiquitinketten gibt es noch weitere

Modifikationen wie Monoubiquitinierung, Multiubiquitinierung, Ubiquitinketten mit Verknüpfungen über verschiedene Lysine sowie verzweigte Ubiquitinketten, die an diversen zellulären Prozessen beteiligt sind.^{140,145,148,149}

Bisher entdeckte E3-Ligasen sind aufgrund übereinstimmender Domänen in verschiedene Gruppen eingeteilt worden. Die verwendeten Gruppierungen sind in der Literatur jedoch nicht immer übereinstimmend. Einheitlich ist die Unterteilung in E3-Ligasen mit einer HECT-Domäne (*Homologous to E6AP Carboxyl Terminus*) und in die mit einer RING-Domäne (*Really Interesting New Gene*). Sie unterscheiden sich im Mechanismus der Ubiquitinübertragung auf das Substratprotein. Bei HECT-E3s wird das Ubiquitin erst vom E2 auf das E3 und dann auf das Substratprotein übertragen, bei RING-E3s vermittelt die Ligase die Übertragung direkt vom E2 auf das Substratprotein.^{157–160} Als dritte Gruppe werden in einigen Veröffentlichungen die SCF-Komplexe (*Skp1-Cul1-F-box Protein*) genannt,^{158,161} andere Arbeiten führen Ligasen mit einer U-Box-Domäne (benannt nach *Ubiquitin Fusion Degradation Protein 2*) als dritte Gruppe auf.^{145,147,162,163} Die Ligasen mit der U-Box werden, in Analogie zu E1-E3, zum Teil auch als E4 (Ubiquitin-Konjugationsfaktor) bezeichnet.^{157,158,162,164} Diese Bezeichnung kommt dadurch zustande, dass einige von ihnen, zum Beispiel UFD2 aus Hefe, Ubiquitin auf Substrate mit kurzen Ubiquitinketten übertragen. Sie sind dadurch für die Entstehung von Multiubiquitinketten an diesen Proteinen verantwortlich. Für die initiale Ubiquitinierung des Substratproteins wird eine zusätzliche E3-Ligase benötigt, in diesem Beispiel UFD4.¹⁶⁵ Weiterhin werden Ligasen mit einer RING-Domäne häufig unterteilt in Enzyme, die aus einer einzigen Untereinheit bestehen und in solche, die aus Proteinkomplexen zusammengesetzt sind. Zu letzteren zählen dann auch die E3-Ligasen des SCF-Komplex-Typs.^{145,157,163,164,166} Für die vorliegende Arbeit ist nur die Gruppe der monomeren RING-Finger E3-Ligasen von Bedeutung, auf sie wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen.

5.3.2 Degradation des Ubiquitin-markierten Proteins

Der Abbau des markierten Proteins zu Peptiden erfolgt durch das Proteasom. Das Proteasom ist ein regelmäßig aufgebauter Komplex aus über 60 Untereinheiten.¹⁶⁷ Er besteht aus vier übereinander liegenden Proteinringen, die jeweils aus 7 Untereinheiten zusammengesetzt sind.^{168–170} Dabei werden die innenliegenden Ringe mit β und bei Säugetieren die Untereinheiten entsprechend als $\beta 1$ bis $\beta 7$ und die äußeren Ringe mit α und die Untereinheiten als $\alpha 1$ bis $\alpha 7$ bezeichnet.^{167,171,172} Zusammen bilden diese Ringe eine fassähnliche Struktur und werden aufgrund ihres Sedimentationsverhaltens bei der

Dichtegradientenzentrifugation als 20S-Untereinheit zusammengefasst. Drei der β -Untereinheiten besitzen proteolytische Aktivität.¹⁷³ $\beta 1$ spaltet Proteine nach sauren Aminosäuren und wirkt deshalb Caspase-ähnlich, $\beta 2$ spaltet nach basischen Aminosäuren und besitzt damit Trypsin-ähnliche Aktivität und $\beta 5$ spaltet nach hydrophoben Aminosäuren und weist dadurch Chymotrypsin-Ähnlichkeit auf.¹⁷¹ Die α -Untereinheiten bilden einen tunnelförmigen Zugang zu den katalytisch aktiven Untereinheiten, durch den nur entfaltete Proteine gelangen können. Außerdem fungieren sie als Verbindung zwischen den innenliegenden β -Ringen und dem sich an einer oder an beiden Außenseiten anlagernden regulatorischen 19S-Komplex.^{174–176} Dieser verschließt den Eingang zur 20S-Untereinheit und ist für die Erkennung und Bindung Ubiquitin-markierter Substratproteine zuständig.^{177,178} Dadurch wird reguliert, welche Proteine im Proteasom abgebaut werden können. Außerdem sorgen die enthaltenen ATPasen für die Entfaltung der Substratproteine und das Öffnen des Zugangs zum Lumen der 20S-Untereinheit.^{179–181} Die 20S-Einheit zusammen mit den 19S-Komplexen bilden dann das 26S-Proteasom (Abbildung 12).^{174,176,177,182}

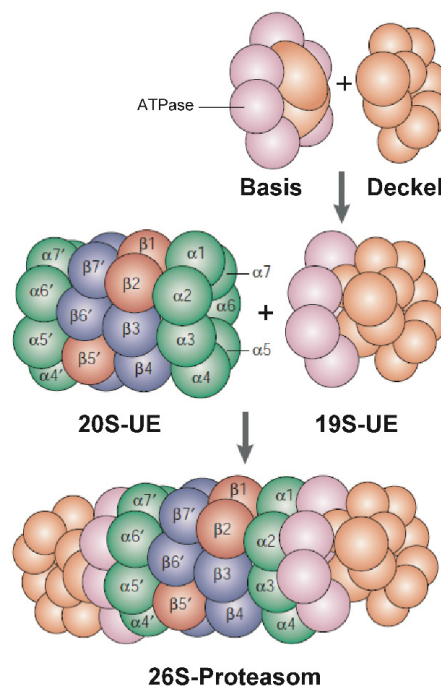


Abbildung 12: Aufbau des 26S-Proteasoms. Das 26S-Proteasom besteht aus einer 20S-Untereinheit (UE) und zwei 19S-UE. Die 19S-UE wird weiter unterteilt in eine Basis, die aus 6 ATPasen (lila) und 2 weiteren Proteinen (orange) zusammengesetzt ist, und in einen Deckel (orange), der aus bis zu 10 Proteinen besteht. Die 20S-UE wird aus 4 übereinander liegenden Ringen gebildet, die jeweils 7 UE enthalten. Die äußeren Ringe werden mit α bezeichnet (grün), die inneren mit β . Die Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ sind katalytisch aktiv (rot), die anderen nicht (blau).^{verändert nach 167}

5.4 MuRFs – RING-Finger E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen

Die RING-Domänen-Proteine stellen eine Gruppe der E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen dar. Zu dieser Gruppe von Enzymen zählen die Muskel-spezifischen RING-Finger Proteine (MuRF) 1, 2 und 3, die nach bisherigem Kenntnisstand Einzeluntereinheiten-E3-Ligasen sind.^{158,160,183} Im Folgenden wird zuerst auf ihre Proteinstruktur und dann auf die Funktionen der einzelnen Familienmitglieder sowie die Auswirkungen des jeweiligen Proteinverlusts in *in vivo*- und *in vitro*-Modellen der Herz- und Skelettmuskelhypertrophie und -atrophie eingegangen.

5.4.1 Proteinstruktur der MuRFs

Die drei Mitglieder der MuRF-Familie weisen eine hohe Homologie der Aminosäuresequenz auf (MuRF1 und MuRF2 = 62 %, MuRF1 und MuRF3 = 77 %, MuRF2 und MuRF3 = 65 %), die sich auch in der übereinstimmenden Zusammensetzung ihrer Proteindomänen widerspiegelt.¹⁸⁴ Sie alle haben die folgenden Domänen: RING Finger, MuRF *family conserved domain* (MFC), B-Box Typ 2, zwei *Coiled coil*, COS-Box und eine C-terminale Region reich an sauren Aminosäuren (*acidic rich region, AR*). Aufgrund der drei Domänen RING Finger, B-Box und *Coiled coil* werden sie zu den RBCC-Proteinen oder auch den TRIM-Proteinen (*tripartite motif*) gezählt (Abbildung 13).^{184,185}

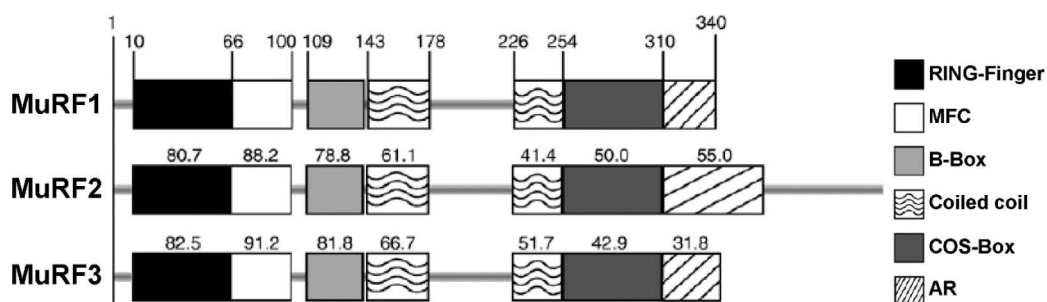


Abbildung 13: Domänenstruktur der MuRF-Familie. Die Zahlen an MuRF1 entsprechen den Aminosäurepositionen, an denen die Domänen beginnen/enden, Zahlenwerte über den Domänen von MuRF2 und MuRF3 entsprechen der Sequenzübereinstimmung mit MuRF1 in %. Abkürzungen der Domänen: siehe Text.^{verändert nach 186}

Die RING-Finger-Domäne der MuRFs bindet über sieben Cysteinreste und einen Histidinrest zwei Zinkionen und stellt damit einen Zinkfinger des Typs C3HC4 dar (Abbildung 14). Diese Domäne ist für die Ubiquitin-Ligase-Aktivität der MuRFs verantwortlich^{161,186,187} und verstärkt die Bindung an Mikrotubuli.¹⁸⁸

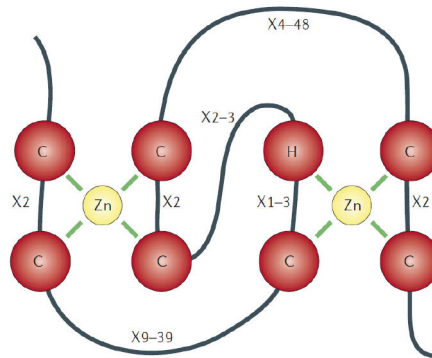


Abbildung 14: RING-Finger Domäne der MuRFs. Die RING-Finger Domäne des Typs C3HC4 bindet in einer Doppelklammer-ähnlichen Struktur über sieben Cystein (C)- und einen Histidinrest (H) zwei Zinkionen (Zn). Zwischen den Cystein- und Histidinresten befinden sich andere, variable Aminosäurereste (X) in jeweils angegebener Anzahl.¹⁴⁵

Die sich an den RING-Finger anschließende Domäne stellt den Bereich der höchsten Sequenzübereinstimmung zwischen den MuRF-Proteinen dar und erhielt deshalb die Bezeichnung *MuRF family conserved domain*. Sie ist an der Bindung verschiedener Proteine beteiligt, z. B. Troponin I und Titin.¹⁸⁹ Weiterhin enthalten die MuRFs eine der beiden für RBCC-Proteine typischen B-Box-Domänen und zwar die des Typs zwei mit der Konsensussequenz $CxxHx(7-9)Cxx(C/D/E/H)xxxxCxxCx(3-6)Hx(2-4)(H/C)$, hierbei steht C für einen Cysteinrest, H für einen Histidinrest, D für einen Asparaginsäurerest, E für einen Glutaminsäurerest und x für einen beliebigen Aminosäurerest. Aminosäurereste in Klammern bedeuten die möglichen Alternativen an der jeweiligen Position.^{184,190} Bei der B-Box handelt es sich ebenfalls um einen Zinkfinger, der für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen von Bedeutung ist, wie zum Beispiel für die Bindung an die Kreatinkinase.¹⁸⁶ Die beiden sich anschließenden *Coiled coil* Domänen sind für die Homo- und Heterooligomerisierung der MuRFs verantwortlich.¹⁹¹ Außerdem vermitteln sie beispielsweise die Bindung an Mikrotubuli,^{185,188,190} Troponin I, Titin,¹⁸⁹ γ -Filamin, *Four and a half LIM domains 2* (FHL2),¹⁹² *Cardiac Ankyrin Repeat Protein* (CARP), an den mitochondrialen Elongationsfaktor G (GFM1) und an weitere Proteine.¹⁹¹ Über die COS-Box (*C-terminal subgroup one signature*) ist bisher nur bekannt, dass sie auch an der Mikrotubulibindung beteiligt ist.¹⁸⁵ Von der C-terminal gelegenen säurereichen Region sind bisher keine Funktionen beschrieben.

5.4.2 MuRF1

MuRF1 wurde erstmals im Jahr 2001 von zwei verschiedenen Gruppen beschrieben. Dai *et al.*¹⁹³ analysierten das Herz auf RING-Finger enthaltende Proteine. Dazu führten sie eine Datenbanksuche durch, bei der Übereinstimmungen der DNA-Sequenzen dazu verwendet wurden, Proteine mit gewünschten Eigenschaften zu identifizieren. Sie nannten das gefundene Protein *striated muscle RING zinc finger protein* (SMRZ), da es einen Zinkfinger vom RING-Typ enthielt und nur in quergestreifter Muskulatur auftrat. Sie führten weiterhin Hefe-Zwei-Hybrid-System- und *in vitro*-Interaktionsanalysen durch und fanden dadurch heraus, dass SMRZ mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SMT3b (*small ubiquitin-related modifier 3*) interagiert. Zeitgleich wurde MuRF1 (mRNA 1,9 kb, Protein 38 kD) von Centner *et al.*^{184,194} als Bindungspartner von Titin identifiziert. In diesem Zusammenhang vorgenommene Untersuchungen führten zur Entdeckung von MuRF2 als potentielltem Bindungspartner von MuRF1, gezeigt in einer Hefe-Zwei-Hybrid-System-Analyse, sowie von MuRF1 und MuRF3 als Bindungspartner von MuRF2. Die Bildung von MuRF1-MuRF3-Heterodimeren konnte mittels *in vitro*-Interaktionsanalysen bestätigt werden. MuRF1 wurde in adultem Herz- und Skelettmuskelgewebe und in fötalem Herzgewebe nachgewiesen. Innerhalb der Zelle zeigte es verschiedene Lokalisationen, wie zum Beispiel an der M-Linie des Sarkomers, dies entspricht der Position der Titinbindungsregion. Weiterhin war MuRF1 in der Peripherie der Z-Scheiben und im Zytoplasma nachweisbar sowie in einigen Myozyten auch im Nukleus.

Für MuRF1 wurde eine Beteiligung an der Regulation der Zellgröße in Zellkultur- und Tierversuchen gezeigt. So verringerte die Überexpression von MuRF1 in neonatalen Rattenkardiomyozyten die durch die hypertrophieauslösenden Substanzen Phenylephrin und Phorbolmyristatacetat hervorgerufene Zunahme der Zellgröße. Bei einer durch siRNA bedingten reduzierten Expression von MuRF1 nahm die Zellgröße bereits ohne die hypertrophieauslösenden Substanzen zu.¹⁹⁵ Zur Identifikation Skelettmuskelatrophievermittelnder Faktoren wurden drei verschiedenen Atrophie-Modelle (Immobilisierung, Denervation, Entlastung) in Ratten durchgeführt und dabei MuRF1 als eines der Proteine identifiziert, das in allen drei Modellen verstärkt exprimiert wurde.¹⁹⁶ Die meisten Erkenntnisse wurden jedoch mit Hilfe von MuRF1-KO-Mäusen erlangt. Sie sind lebensfähig, fruchtbar, von unauffälliger Erscheinung und weisen eine normale Wachstumskurve auf. Allerdings bewirkt die Induktion von kardialer Hypertrophie durch Einengung der Thoraxaorta (TAC, *thoracic aortic constriction*) in den MuRF1-KO-Mäusen eine stärkere Herzhypertrophie als in den Wildtypieren.^{197,198} Die Entfernung der Einengung führt bei den Wildtypieren innerhalb von vier Tagen zur Reduktion des Herzgewichts bis zum Ausgangsniveau, in den

MuRF1-KO-Mäusen ist das Herzgewicht hingegen auch noch nach vier Wochen erhöht.¹⁹⁸ Des Weiteren sind die MuRF1-KO-Tiere resistent gegen die Entwicklung einer Dexamethason-vermittelten kardialen Atrophie. MuRF1 ist also für die Reversion der kardialen Hypertrophie und die Entwicklung einer Herzatrophie erforderlich.¹⁹⁸ Auch in der Skelettmuskulatur ist MuRF1 an der Reaktion auf Atrophiestimuli beteiligt. In Denervationsexperimenten wiesen die MuRF1-KO-Mäuse eine deutlich geringere Atrophie auf als die Wildtypiere.¹⁹⁶ Ein wichtiger Mechanismus, über den MuRF1 Atrophie vermittelt, ist seine Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Insbesondere die Ubiquitinierung von leichten und schweren Myosinketten und deren nachfolgende Degradation im Proteasom führt zur Verringerung des Gesamtproteingehalts in den Myozyten und dadurch zur Reduktion der Muskelmasse.^{161,199,200} Da MuRF1 in diversen atrophieauslösenden Prozessen (z. B. Entlastung, Denervation, Glukokortikoidgabe, Mangelernährung) verstärkt im Muskel exprimiert wird, kann es als ein Atrophiemarker verwendet werden.^{201–204} Aber auch andere Funktionen, wie die Beeinflussung der Titin-Kinase-Aktivität^{184,194} oder die Regulation der Transkription oder Translation^{191,194} sowie die Beeinflussung der Kontraktilität von Muskelzellen,^{161,187} werden diskutiert. Außerdem scheint MuRF1 an der Regulation des energiebereitstellenden Stoffwechsels beteiligt zu sein. Studien an MuRF1-transgenen und MuRF1-KO Mäusen zeigten einen Einfluss von MuRF1 auf die Verfügbarkeit freier Aminosäuren. MuRF1 vermittelt den proteasomalen Abbau der muskulären Kreatinkinase,¹⁸⁶ reguliert den Kohlenhydratmetabolismus (u. a. durch die Ubiquitinierung von Pyruvatdehydrogenase)²⁰⁵ und könnte ebenfalls den Lipidmetabolismus beeinflussen (z. B. über die Ubiquitinierung von Enoyl-Koenzym Hydratase I).¹⁹¹

5.4.3 MuRF2

MuRF2 wurde in einer Hefe-Zwei-Hybrid-System-Analyse als möglicher Bindungspartner von MuRF1 identifiziert.¹⁸⁴ Es gibt mindestens vier verschiedene MuRF2-Isoformen. Dabei werden drei Isoformen durch alternatives Spleißen generiert (p50, p60, p27) und die vierte durch eine Leserasterverschiebung, die in einem alternativen C-Terminus resultiert (p60B, Abbildung 15). Die kürzeste Isoform (p27) kommt nur im Herzen vor und kann, im Gegensatz zu den anderen Isoformen, aufgrund der fehlenden *Coiled coil* Domänen keine Dimere bilden.²⁰⁶ Die Expression von MuRF2 ist am stärksten im fötalen Herz, aber auch in der fötalen Skelettmuskulatur konnte es nachgewiesen werden. In adulten Mäusen wurde es im Herzen und der Skelettmuskulatur sowie, in geringen Mengen, in der Leber detektiert.¹⁸⁴ MuRF2 ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, kommt aber auch an den Mikrotubuli, an der M-Linie des Sarkomers und im Nukleus vor.^{206,207} Die Expression von MuRF2 variiert während der Differenzierung von Myoblasten zu

Myotuben in Zellkulturversuchen mit murinen Skelettmuskelzellen. So ist MuRF2 in proliferierenden Myoblasten nicht nachweisbar, wird im Verlauf der Differenzierung aber zunehmend exprimiert und hat nach 48 h seine maximale Expression erreicht, welche dann wieder sinkt.²⁰⁶ Immunzytochemische Färbungen zeigten, dass MuRF2 mit stabilisierten polyglutamierten oder acetylierten Mikrotubuli kolokalisiert, jedoch nicht mit dynamischen tyrosinierten Mikrotubuli. Da diese stabilisierten Mikrotubuli besonders während der Myofibrillogenese gebildet werden und MuRF2 an Titin und wahrscheinlich an Myosin (kosedimentiert und kolokalisiert mit Myosin) bindet, ist es vermutlich an der Differenzierung von Myozyten, speziell an der Myofibrillenbildung, beteiligt.^{206,207} Unterstützt wird diese Vermutung durch Knockdown-Experimente in embryonalen Hühnermyozyten. Die Zellen ohne MuRF2 zeigten Störungen der Sarkomerstruktur im M-Linien-Bereich, in dem sich die Titinbindungsstelle von MuRF2 befindet. Außerdem waren die Anteile an polyglutamierten und acetylierten Mikrotubuli sowie die der Intermediärfilamentproteine Vimentin und Desmin kleiner. Ebenso war der Prozentsatz an kontrahierenden Kardiomyozyten herabgesetzt und die Fusion von differenzierenden Skelettmuskelformen verzögert und verringert.^{206,207} Eine Beteiligung an der Regulation der Zellgröße als Reaktion auf Hypertrophie- oder Atrophiestimuli, wie sie für MuRF1 gezeigt wurde, konnte für MuRF2 nicht festgestellt werden. Auch die MuRF2-KO-Mäuse wiesen weder unter Normalbedingungen noch nach Induktion einer kardialen Hypertrophie durch Verengung der Thoraxaorta einen Unterschied zu Wildtyptieren auf.¹⁹⁷ Die gerade erwähnten möglichen Interaktionspartner von MuRF2 wurden vorwiegend in Hefe-Zwei-Hybrid-System-Analysen, Kolokalisations- und Kosedimentationsstudien sowie bei *in vitro*-Interaktionsversuchen identifiziert. Es wurden jedoch noch keine Ubiquitinierungsexperimente publiziert, in denen MuRF2 zusammen mit einem E2 die Ubiquitinierung eines Substratproteins katalysiert.

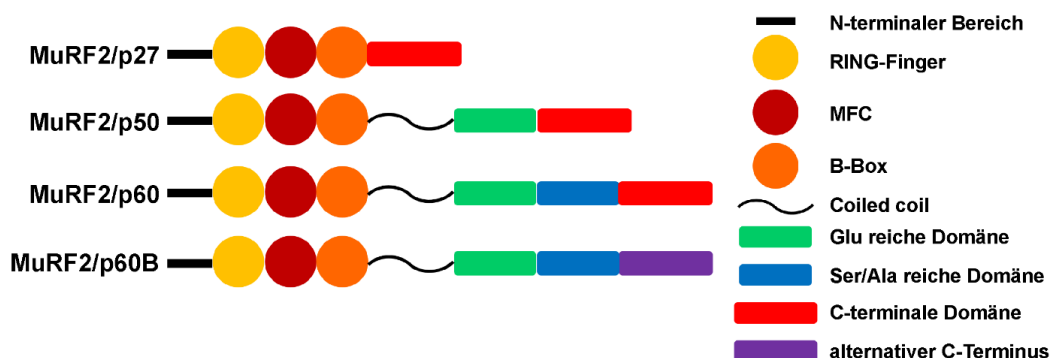


Abbildung 15: Domänenzusammensetzung der MuRF2-Isoformen. Durch alternatives Spleißen und Leserasterverschiebung entstehen vier MuRF2-Isoformen mit identischem N-Terminus und verschiedenen C-Termini.^{verändert nach 206}

5.4.4 MuRF3

MuRF3 ist das erste identifizierte Mitglied der Familie, es wurde im Jahr 2000 bei einer Hefe-Zwei-Hybrid-System-Analyse als Bindungspartner von SRF (*serum response factor*) entdeckt und als *Muscle-specific RING-finger protein* (MuRF) bezeichnet.¹⁸⁸ Die Nummerierung der MuRF-Proteine erfolgte nach der Entdeckung der anderen beiden Familienmitglieder im darauffolgenden Jahr.¹⁸⁴ MuRF3 wird hauptsächlich im Herz und in der Skelettmuskulatur sowie in geringem Maß in der Lunge und im Gehirn exprimiert. Während der Differenzierung kultivierter Myoblasten zu Myotuben nimmt die Expression des Proteins zu. MuRF3 kolokalisiert und kosedimentiert mit Mikrotubuli und die Bindung an polyglutamierte Mikrotubuli konnte nachgewiesen werden. Es hat eine stabilisierende Wirkung auf Mikrotubuli und die RING-Domäne ist für diesen Effekt notwendig. Neben dieser zytoskelettären Lokalisation ist es auch an den Z-Scheiben des Sarkomers zu finden.¹⁸⁸ Des Weiteren bindet es an die schweren Myosinketten und führt über deren Ubiquitinierung zu ihrem Abbau durch das Proteasom.¹⁶¹

Weitere Erkenntnisse über die MuRF3-Funktionen wurden mit Hilfe von MuRF3-KO-Mäusen erlangt. Sie sind lebensfähig und fruchtbar, haben eine normale Lebensdauer und keine offensichtlichen Veränderungen im Vergleich zu Kontrolltieren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten jedoch einen vergrößerten Abstand zwischen den Z-Scheiben und damit eine Störung der Sarkomerstruktur. Echokardiographische Analysen ergaben, dass MuRF3-KO-Mäuse eine leicht verringerte Herzfrequenz aufwiesen, die restlichen untersuchten Parameter waren unverändert im Vergleich zu Wildtyptieren. Die Reaktionen von MuRF3-KO-Mäusen auf kardialen Stress wurden mit zwei Methoden näher untersucht. Zum einen wurde durch das Abbinden der linken Herzkranzgefäßarterie ein Infarkt der vorderen Herzwand ausgelöst. Sowohl die Größe des vom Infarkt betroffenen Gebietes als auch das Ausmaß der kompensatorischen kardialen Hypertrophie waren vergleichbar zu dem der Wildtypiere. MuRF3-KO-Mäuse wiesen jedoch einen größeren Durchmesser des linken Ventrikels am Endpunkt der Systole und Diastole sowie eine dünnere posteriore Wandstärke auf als die Kontrolltiere und zeigten damit einen Phänotyp der dilatativen Kardiomyopathie. Noch bedeutender ist allerdings der Unterschied in der Überlebensrate und dessen Ursache – von den Wildtypmäusen starben 16 % nach dem Herzinfarkt, von den MuRF3-KO-Mäusen hingegen 50 % und von diesen 50 % hatten 77 % einen Riss in der Herzwand an der Grenze des Infarktgebietes zum ungeschädigten Gebiet. Keines der Wildtypiere mit einem Infarkt hatte einen solchen Riss. Die MuRF3-KO-Mäuse zeigten in diesem Bereich einen erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen und degenerativ veränderten Muskelfasern, wodurch die Integrität des

Herzgewebes verringert war. Es ist bisher noch ungeklärt, auf welchem Weg MuRF3 die Funktionsfähigkeit des Herzens positiv beeinflusst und dadurch die Entstehung eines Herzwandrisses in den Wildtyptieren verhindert. Als zweite Methode, die Reaktion von MuRF3-KO-Mäusen auf kardialen Stress zu untersuchen, diente die chronische Gabe der prohypertrophen Substanz Isoprenalin, ein Agonist der kardialen β 1-Adrenorezeptoren. Die MuRF3-KO-Mäuse zeigten eine geringere Zunahme des Herzgewichts als die Wildtyptiere. MuRF3 spielt also auch eine Rolle bei der Größenanpassung des Herzens aufgrund veränderter Belastungen. In dieser Studie wurden FHL2 und γ -Filamin als Bindungspartner von MuRF3 identifiziert. Beide Proteine akkumulierten in den MuRF3-KO-Mäusen, und eine Koexpression mit MuRF3 führte zur Verringerung des Gehalts an FHL2 und γ -Filamin, es könnte sich also um Substrate der E3-Ligase handeln. Da die Akkumulation von γ -Filamin im Zusammenhang mit Myopathien steht, vermuten die Autoren, dass die durch den MuRF3-Verlust ausgelöste Anreicherung des Proteins eine der Ursachen für die verringerte Gewebeintegrität und den Herzwandriss in den MuRF3-KO-Mäusen darstellen könnte.¹⁹² Weitere Substrate von MuRF3 sind MyHC-2a und MyHC- β /slow. Zusammen mit dem E2 UbcH5a, -b oder -c sowie mit UbcH2 ubiquitiniert MuRF3 diese Myosinisoformen und könnte so über die Vermittlung des Myosinabbaus an der Regulation der Struktur und Funktionsfähigkeit des Muskelgewebes beteiligt sein.¹⁶¹

5.4.5 MuRF1/2-Doppelknockout

Die Untersuchung von Mäusen mit einer Keimbahndeletion von MuRF1 und MuRF2 sollte weiteren Aufschluss über die Aufgaben der beiden E3-Ligasen in der quergestreiften Muskulatur bringen. Da sie einige gemeinsame Bindungspartner/Substratproteine haben (zum Beispiel CARP, EEF1G (eukaryotischer Translationselongationsfaktor gamma 1), GFM1, Titin, MuRF3^{186,189,191,194}) und die Einzelknockout-Tiere keinen basalen Phänotyp aufweisen, wird von einer zumindest teilweisen Redundanz ihrer Funktionen ausgegangen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Abwesenheit von drei der vier für MuRF1 und MuRF2 kodierenden Allele keinen signifikanten Effekt auf die Herz- und Skelettmuskulatur unter Normalbedingungen hervorruft. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn alle vier Allele fehlen. Es werden etwa zwei Drittel weniger MuRF1/2-Doppelknockout (DKO)-Mäuse geboren, als es laut den Mendelschen Regeln der Fall sein müsste und von den geborenen Mäusen sterben wiederum circa drei Viertel innerhalb der ersten 23 Tage nach der Geburt. Diese Tiere haben eine ausgeprägte Herzhypertrophie mit Fibrose, Lungenödeme und weisen in den Kardiomyozyten eine Anreicherung an Mitochondrien sowie gestörte Sarkomerstrukturen mit

Defekten in den Z-Scheiben und an der M-Linie auf. Dieser starke kardiale Phänotyp ist vermutlich verantwortlich für den Tod der meisten MuRF1/2-DKO Mäuse *in utero*. Die überlebenden Tiere weisen eine starke Herzhypertrophie jedoch ohne Fibrose auf und haben eine den Kontrolltieren vergleichbare Lebenserwartung. Ihre Herzfunktion ist beeinträchtigt, denn die Ejektionsfraktion (Anteil des Blutvolumens aus dem linken Ventrikel, der pro Kontraktion herausgepumpt wird) und die Verkürzungsfraktion (Angabe darüber, wie weit sich der linke Ventrikel während der Systole zusammenziehen kann als Maß für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens) sind verringert, was zur Folge hat, dass weniger Blut je Kontraktion aus dem Herzen gepumpt wird. Die Vergrößerung des Herzens geht mit einer Hypertrophie der einzelnen Kardiomyozyten einher, die Querschnittfläche der Zellen ist in den Herzen der MuRF1/2-DKO-Mäuse etwa 60 % größer.^{191,208}

Die Auswirkungen auf die Skelettmuskulatur fallen geringer aus. So zeigen die Myozyten keine defekten Sarkomere und keine starke Anreicherung an Mitochondrien wie die Kardiomyozyten.²⁰⁸ Aber auch sie sind hypertroph und das resultiert in einem Anstieg des Skelettmuskelgewichts.¹⁹¹ Ein weiteres phänotypisches Merkmal der MuRF1/2-DKO-Mäuse ist ihre verringerte Gewichtszunahme mit dem Altern. Eine Ursache dafür liegt in der geringeren Bildung von weißem Fettgewebe. Wie es dazu kommt, ist noch ungeklärt. Diskutiert wird ein Einfluss von MuRF1 und/oder MuRF2 auf den Fettstoffwechsel und ein verstärkter Energiebedarf aufgrund des in den MuRF1/2-DKO-Mäusen gesteigerten Proteinumsatzes.¹⁹¹ Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der DKO von MuRF1 und MuRF2 einen stärkeren kardialen als Skelettmuskel-Phänotyp hervorruft. Die E3-Ligasen werden also vermutlich in den beiden Geweben unterschiedlich reguliert und üben dort zumindest teilweise andere Funktionen aus.

5.4.6 MuRF1/3-Doppelknockout

MuRF1- und MuRF3-DKO-Mäuse zeigen einen stärkeren Phänotyp des Skelettmuskels als die MuRF1/2-DKO-Tiere. Sie sind weniger mobil als Wildtyptiere, haben Schwierigkeiten beim Klettern und Laufen sowie eine kürzere Schrittlänge. Ihr Körpergewicht ist geringer als das der Kontrolltiere, es ist jedoch kein Unterschied im Fettanteil beschrieben. Die Skelettmuskelfasern haben eine größere Variabilität der Querschnittfläche, zum Teil zentral gelegene Zellkerne und es gibt geteilte Muskelfasern.¹⁶¹ Das alles sind unspezifische Kennzeichen verschiedener Myopathien.^{209–213} Außerdem ist das Gewicht der Skelettmuskeln erhöht. Neben der Skelettmuskelhypertrophie weisen die Tiere noch eine weitere auffällige

Veränderung auf: innerhalb der Myozyten befinden sich amorphe Ablagerungen von Proteinen, die zu einem großen Anteil aus Myosinen bestehen. Das Auftreten der Ablagerungen ist unabhängig vom Fasertyp. Dieses Material lagert sich um einen intakt aussehenden zentralen Bereich der Muskelfaser ab und enthält unvollständig assoziierte Filamente und Fragmente von Sarkomeren. Die MuRF1/3-DKO-Mäuse zeigen einen erhöhten Anteil an MyHC- β /slow und MyHC-2a in Skelettmuskellysaten. Alle diese Veränderungen führen, in jeweils noch ungeklärtem Ausmaß, dazu, dass die maximale Kraftentwicklung in den Skelettmuskeln der MuRF1/3-DKO-Mäuse herabgesetzt ist.¹⁶¹

Der DKO von MuRF1 und MuRF3 beeinflusst jedoch nicht nur die Skelettmuskulatur, sondern auch das Herz. Es zeigt ebenfalls eine Hypertrophie, allerdings in geringerem Ausmaß als bei den MuRF1/2-DKO-Mäusen. Die Verkürzungsfraction ist herabgesetzt und die Ausdehnung des linken Ventrikels am Endpunkt der Systole ist erhöht im Vergleich zu Wildtyp- und Einzelknockout-Tieren, das heißt, die Herzfunktion in den MuRF1/3-DKO-Mäusen ist beeinträchtigt.¹⁶¹

6. Zielstellung der Doktorarbeit

Die drei Mitglieder der MuRF-Familie sind E3-Ubiquitin-Ligasen, die vor allem im Herzen und im Skelettmuskel exprimiert werden. Diese Enzyme sind für die Markierung von Substratproteinen mit Ubiquitin verantwortlich und können dadurch deren proteasomalen Abbau, die Aktivität verschiedener Signalwege oder auch die intrazelluläre Lokalisation beeinflussen. Die meisten Erkenntnisse wurden bisher zu MuRF1 gewonnen. Seine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Herz- und Skelettmuskelatrophie unterscheidet es von MuRF2 und MuRF3. Obwohl MuRF3, genau wie MuRF1, Myosine für den proteasomalen Abbau markiert, scheint es keine zentrale Bedeutung für die Entwicklung einer Atrophie zu haben. Die physiologischen Aufgaben von MuRF2 sind bisher noch völlig unbekannt. Das Ausbleiben eines deutlichen Phänotyps in den jeweiligen MuRF-Einzelknockout-Mäusen, ebenso wie das Auftreten eines solchen bei den MuRF1/3- und MuRF1/2-DKO-Mäusen spricht für eine teilweise redundante Funktion der Familienmitglieder. Die Unterschiede der Phänotypen, insbesondere die Schwere der kardialen Beeinträchtigung bei den MuRF1/2- und die Auswirkungen auf die Skelettmuskelstruktur und -funktion bei den MuRF1/3-DKO-Tieren, deuten jedoch auch auf nicht-redundante Aufgaben der E3-Ligasen hin.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der MuRF2- und MuRF3-DKO-Mauslinie. Bei der phänotypischen Beschreibung der Mäuse lag der Schwerpunkt auf den Auswirkungen der MuRF2- und MuRF3-Deletion auf die Skelett- und Herzmuskulatur. Es sollten Veränderungen sowohl der Morphologie als auch der Funktion analysiert und, soweit möglich, Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen gesammelt werden. Mithilfe dieser Erkenntnisse können die Funktionen der einzelnen MuRFs genauer beschrieben und voneinander abgegrenzt werden.

Histologische und immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten dienen der Detektion morphologischer Unterschiede. Genexpressionsanalysen wurden eingesetzt, um einen möglichen Einfluss des MuRF2/3-DKO auf die Transkription aufzudecken. Die Bestimmung der Muskelkraft isolierter Skelettmuskeln und die echokardiographische Untersuchung der Herzen *in vivo* und von isolierten perfundierten Herzen sollten Aufschluss über die Funktionsfähigkeit der jeweiligen Muskeln geben. In zwei Tiermodellen sollte die Reaktion auf kardialen Stress ermittelt werden. Messungen an isolierten Kardiomyozyten sollten zeigen, ob sich veränderte Herzfunktionen bereits auf zellulärer Ebene offenbaren und wie die Kalziumhandhabung in diesen Zellen verläuft. Schließlich wurden massenspektrometrische Analysen von Muskellysaten durchgeführt, um die Auswirkungen des MuRF2/3-Verlustes auf zellulärer und molekularer Ebene zu verstehen.

7. Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Tiere

Für die Generierung der MuRF2- und MuRF3-DKO-Mäuse wurden MuRF2-KO-Mäuse (David J. Glass, Fa. Regeneron, 129S / C57BL/6)¹⁹⁷ mit den MuRF3-KO-Mäusen von Eric N. Olsons Gruppe (129S / C57BL/6)¹⁹² verpaart. Die Nachkommen wurden zur Züchtung der DKO-Mäuse verwendet. Sie wurden mindestens 8 Generationen in den C57BL/6-Stamm zurückgekreuzt, um einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu erhalten, bevor sie für die Analysen verwendet wurden.

7.1.2 Zellen

Tabelle 6: Eukaryotische und prokaryotische Zellen.

Zellen	Organismus	Gewebe	Zellart	Firma
C2C12	<i>Mus musculus</i>	Muskel	Myoblast	ATCC®, CRL1772
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Niere	Fibroblast	ATCC®, CRL1651
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue (elektroporationskompetent)				Stratagene, 200228

7.1.3 Plasmide

Tabelle 7: Expressionsplasmide. Die Vektorkarten (ohne Inserts) befinden sich im Anhang (Abschnitt 14.3).

Plasmid mit Insert	Markierung	Resistenz	Firma
pmCherry-N1_MuRF2	C-terminal	Kanamycin	Clontech
pmCherry-N1_MuRF3	C-terminal	Kanamycin	Clontech
pcDNA™3.1/myc-His(-)_MuRF2	C-terminal	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA™3.1/myc-His(-)_MuRF3	C-terminal	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA™3.1(+)/FLAG_MuRF1	N-terminal	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA™3.1(+)/FLAG_HspB3	N-terminal	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA™3.1(+)/FLAG_MAPKAP-K3	N-terminal	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA™3.1(+)/FLAG_MLF2	N-terminal	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA™3.1(+)/FLAG_SMYD2	N-terminal	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA™3.1(+)/FLAG_SRA1	N-terminal	Ampicillin	Invitrogen

7.1.4 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper.

Antikörper	Wirtsspezies, Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung	
			WB	IHC, ICC
Primär				
anti-MuRF1	Huhn, polyklonal	AG S. Labeit, Universitätsmedizin Mannheim, Mannheim, Deutschland	1:300	
anti-MuRF2	Kaninchen, polyklonal	AG Fielitz, ECRC, Charité, Berlin, Deutschland	1:300	
anti-MuRF3	Kaninchen, polyklonal	AG Fielitz, ECRC, Charité, Berlin, Deutschland	1:300	
anti-Aktin	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	1:2000	
anti-Gapdh	Maus, monoklonal	Millipore GmbH, Schwallbach/Ts., Deutschland	1:50000	
anti-Laminin	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland		1:200
anti-panMyHC-2 (Klon MY- 32, detektiert alle schnellen Myosinisoformen)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	1:1000	1:100
anti-β/slow MyHC (Klon NOQ7)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	1:1000	1:100
anti-MyH3 (detektiert die embryonale MyHC-Isoform)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:500	1:100
anti-DYKDDDDK (bindet FLAG-Markierung)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA	1:1000	1:200
anti-MAPKAP-K2	Kaninchen, polyklonal	Cell SignalingTechnology Inc., Danvers, USA (AG Scheibe)	1:1000	
anti-MAPKAP-K3	Kaninchen polyklonal	N. Rokina, AG Gaestel, Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover ²¹⁴	1:1000	
anti-p38 MAPK	Kaninchen, polyklonal	Cell SignalingTechnology Inc., Danvers, USA (AG Scheibe)	1:1000	
anti-SERCA2a	Kaninchen polyklonal	Affinity Bioreagents, Rockford, IL, USA (AG Scheibe)	1:1000	
anti-Gapdh	Maus, monoklonal	Biotrend Chemicals, LLC, Destin, FL, USA (AG Scheibe)	1:1000	
anti-α-Tubulin (TU-02)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA (AG Scheibe)	1:1000	
sekundär				
anti-Maus-IgG-HRP	Pferd	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA	1:2000	
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA	1:2000	
anti-Ziege-IgG-HRP	Kaninchen	abcam®, Cambridge, UK	1:5000	
anti-Huhn-IgY-HRP	Kaninchen	abcam®, Cambridge, UK	1:3000	
anti-Maus-IgG-Alexa Fluor® 488	Ziege	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA		1:500

Material und Methoden

Antikörper	Wirtsspezies, Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung	
			WB	IHC, ICC
sekundär				
anti-Kaninchen-IgG-Alexa Fluor® 488	Ziege	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA		1:500
anti-Kaninchen-IgG-Alexa Fluor® 555	Ziege	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA		1:500
anti-Maus-IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA (AG Scheibe)	1:5000	
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA (AG Scheibe)	1:5000	

Abkürzungen: WB = Western Blot, ICC = Immunocytochemie, IHC = Immunhistochemie, HRP = *horseradish peroxidase*, IgG = Immunglobulin G, IgY = Immunglobulin Y

7.1.5 Reagenzien, Geräte, Verbrauchsmaterial

Tabelle 9: Reagenzien.

Reagenz	Firma
1-β-D-Arabinofuranosylcytosin	Sigma, Buchs, Schweiz
1 kb-DNA-Leiter	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
100 bp-DNA-Leiter	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Chloracetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
2-Mercaptoethanol	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
ACCT-Medium MEM199	Amimed, BioConcept, Allschwil, Schweiz
Acrylamid, 30 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Advantage® HD Polymerase	Clontech, Mountain View, CA, USA
Agarose	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA; Blocken)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Standard (Proteinbestimmung)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Aluminiumoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Aminohexansäure	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
ANTI-FLAG® M2 Affinitätsgel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
β-Glycerophosphat-Dinatriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Benzamidin-Hydrochlorid Monohydrat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Blei (II)-Citrat-Trihydrat, tribasisch	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Carnitin (L-)	Sigma, Buchs, Schweiz

Material und Methoden

Reagenz	Firma
Carprofen	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Chloroform	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chromotrope 2R	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (D-, L-)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
dNTP-Set peqGOLD	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose (1 g/l), mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca & Mg (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Eindeckmedium Vitro-Clud	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Eindeckmedium mit Ausbleichschutz ProLong®	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Gold antifade reagent mit DAPI	
Entwicklerlösung G153	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Eosin Y, 1 %	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Essigsäure, 99,9 %	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, 99 %	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid, 1 %	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Fast Green FCF	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
FastStart Universal SYBR® Green Master (ROX)	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Forene®, 100 % (Isofluran)	Abbott Laboratories, Green Oaks, IL, USA
Fixiererlösung G354	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Formalin (Roti®-Histofix), 10 %, phosphatgepuffert	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fötales bovines Serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FuGENE® 6 Transfektionsreagenz	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Fura-2-AM	Invitrogen, LuBioScience, Lucerne, Schweiz
Glukose (D-)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glutamin (L-), 200 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gum Tragacanth	SYNOPHARM GmbH Pharmazeutische Feinchemikalien, Brunsbüttel, Deutschland
Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill II	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HEPES	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hybond ECL Nitrozellulosemembran	GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland

Material und Methoden

Reagenz	Firma
Isoprenalin-Hydrochlorid (D-, L-)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumacetat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid-dihydrat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ketamin Hydrochlorid (+-)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kreatin	Sigma, Buchs, Schweiz
Kunstharz Poly/Bed® 812	Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA
LB-Agar (Lennox)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Lennox)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin-Hemisulfat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
LiChrosolv Wasser für die Chromatographie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine® Transfektionsreagenz	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Lithiumcarbonat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luminol-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Lysyl Endopeptidase® (LysC)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan
Magnesiumchlorid	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methylbutan	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcacodylat-Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat Pellets	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumethyldiamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoBond® Xtra Maxi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Paraffin Surgipath Paraplast®	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (Kardiomyozyten, Hannover)	Invitrogen, LuBioScience, Lucerne, Schweiz
Pentobarbital	Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz
Phalloidin-Tetramethylrhodamin B-isothiocyanat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Material und Methoden

Reagenz	Firma
Phenylmethylsulfoxid	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphorwolframsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PLUS™ Reagenz	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, cOmplete, ohne EDTA	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Probenecid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Protein-Marker PageRuler prestained	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Puffer P1, P2, P3 (Plasmidpräparation)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random Primer	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Restriktionsenzyme (ApaI, EcoRI, XbaI, XhoI)	New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, USA
Restriktionspuffer, BSA	New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, USA
Ribonukleaseinhibitor RNaseOUT, rekombinant	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Saccharose (D, +)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serumalbumin, bovin, fettsäurefrei	Sigma, Buchs, Schweiz
Stickstoff, flüssig	Linde AG, Pullach, Deutschland
Sudan Black B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenzsubstrat	Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, MA, USA
T4 DNA Ligase + Puffer	New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, USA
Taq-DNA-Polymerase (EURx) + Puffer C	Roboklon GmbH, Berlin, Deutschland
Taurin	Sigma, Buchs, Schweiz
Tetracyclin	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Thiourea	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Thymol, kristallin	SYNOPHARM GmbH Pharmazeutische Feinchemikalien, Brunsbüttel, Deutschland
Tissue-Tek®	Sakura® Finetek Europe, B. V. KvK, Leiden, Niederlande
Toluidinblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Triiodthyronin	Sigma, Buchs, Schweiz
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
TRIZOL® Reagenz	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA, 1x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypton	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat-Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Urea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Material und Methoden

Reagenz	Firma
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Xylazin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Xylol	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
YT-Medium, 2x	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 10: Geräte und Verbrauchsmaterial.

Gerät	Firma
-80°C Tiefkühler ultra low	Sanyo, München, Deutschland
6-Well-Platten Zellkultur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
24-Well-Platten Zellkultur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Reaktionsplatte MicroAmp® Fast Optical	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Ableitungskatheter SPR 838 Aria	Millar Instruments, Houston, TX, USA
Absaugsystem Vacusafe comfort	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Agarosegelkammer BlueMarine™ 200	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
ALZET® osmotische Pumpen 2001	DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA
Anästhesieanlage Univentor 400 mit Betäubungskammer 1,4 l, Gasumschalter, Pumpe Sera air 110	Univentor Limited, Zejtun, Malta
Bakterienwerkbank BDK	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland
CCD Kamera Morada G2 (Elektronenmikroskop)	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Digitalkamera DFC 360 FX	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Digitalkamera DFC 425	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Digitaler Messschieber	Tchibo direct GmbH, Hamburg, Deutschland
Druckaufnehmer APT300	Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Echokardiographie: Vevo 770 High-Resolution <i>in vivo</i> Micro-Imaging System	Fujifilm VisualSonics Inc., Tokyo, Japan
Einbettautomat Histostar	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Einbettkassetten Rotilabo	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Elektronenmikroskop FEI™ Morgagni	FEI™, Eindhoven, Niederlande
Elektroporationsküvetten Gene Pulser 0,1 cm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
FastPrep®-24 Homogenisierer	MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA
Feinwaage FA-210-4i	Faust Laborbedarf AG, Schaffhausen, Schweiz
Filme: Amersham Hyperfilm™ECL	GE Healthcare Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich von Großbritannien und Nordirland
Filterpapier von Whatman	VWR, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Gerät	Firma
Fluoreszenzmikroskop CTR 6500 HS	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzplattenleser FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland
Flüssigchromatographie-Anlage Proxeon nLC-II System mit revers-Phasen-Säule C18, 3 µm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland
Geldokumentationsgerät LAS-3000 (AG Scheibe)	FujiFilm, Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan
Geldokumentationsgerät UV-Transilluminator	Phase, Lübeck, Deutschland
Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Inkubationsschüttler KS 4000i	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Inverses Mikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Kanülen Sterican 100	Almo-Erzeugnisse Erwin Busch GmbH, Bad Arolsen, Deutschland
Kardiomyozytenanalyse-System (Kalzium- und Kontraktilitätsmessungen)	IonOptix LLC, Milton, MA, USA
Kraftmessungs-System 1200A für die Maus, <i>in vitro</i> (300C Dual-Mode Muscle Lever, 800A <i>in vitro</i> Test-Apparat, 701C High-Power, Bi-Phase Stimulator, Series 604A Signal Interface, DMC/DMA Dynamic Muscle Control and Analysis Software, Windows Computer mit Windows 7)	Aurora Scientific Inc., Ontario, Kanada
Keramikkugeln Precellys, 2,8 mm Durchmesser	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland
Kryostat Leica CM 3050 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
Langendorff-Anlage	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte IKA-COMBIMAG RCO	Kurt Migge Laboratoriumsbedarf, Heidelberg, Deutschland
Massenspektrometer QExactive Orbitrap	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikrotom Microm HM340E	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikrowelle	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Minizentrifuge	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Myopacer	IonOptix, Milton, MA, USA
Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NMR analyzer LF90 II time domain, 6,5 mHz	Bruker Optics, Billerica, MA, USA
Objekträger Superfrost	Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
PCR-Gerät peqSTAR 96 Universal Gradient	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland
PCR-Pipettiergehäuse DNA/RNA UV-Cleaner UVT-S-AR	biolabo scientific instruments, châtél-St-Denis, Schweiz
PCR-Platten, -Streifen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Photometer Gene quant	GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland
Pipetten, einweg, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipetten, Research© plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, einweg, 10 µl, 200 µl, 1 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Material und Methoden

Gerät	Firma
Rollenmischer RM5	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Rotator M2000	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Rotlichtlampe IR808 efeb	Efeb Elektrogeräte GmbH, Bad Blankenburg, Deutschland
Sanyo CO ₂ Inkubator	Cotech Vertriebs GmbH, Berlin, Deutschland
Perma-Hand Seide Seta (3-0 mit 22 mm Haken)	Ethicon Products, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland
Sezierbesteck (Pinzetten, Gefäßklemmen, Lanzetten, Scheren)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Skalpell, einweg, #21	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Spritzen, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 30 ml	Almo-Erzeugnisse Erwin Busch GmbH, Bad Arolsen, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Stromversorgungsgerät EPS 301	GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland
Stromversorgungsgerät PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultramikrotom E	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Vortex-Genie 2	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Waage	FAUST GmbH, Meckenheim, Deutschland
Wärmeplatte HP-1M	PHYSITEMP INSTRUMENTS INC, Clifton, NJ, USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland
Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturwerkbank FAZ3	Waldner Electronics GmbH & Co., Gräfelfing, Deutschland
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge 1K15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Zentrifuge 3K10	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Zentrifuge CT15RE	VWR, Darmstadt, Deutschland

7.2 Methoden

7.2.1 Generierung und Genotypisierung der MuRF2/3-DKO-Mäuse

Die bereits charakterisierten MuRF2- (Deletion von Exon eins und zwei und eines Teils von Exon drei)¹⁹⁷ und MuRF3- (Deletion des vierten Exons)¹⁹² KO-Mäuse wurden verpaart. Die daraus hervorgegangenen heterozygoten Mäuse wurden untereinander gekreuzt, um MuRF2- und MuRF3-DKO-Mäuse, Einzelknockout- und doppelt-heterozygote Kontrolltiere zu züchten. Die Tiere wurden entsprechend der Richtlinien der Charité Universitätsmedizin Berlin und des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin gehalten. Dabei hatten sie ständig freien Zugang zu Futter und Wasser und lebten unter standardisierten Bedingungen bei 22°C und einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus. Die Versuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer G 0129/12) und wurden entsprechend der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes ausgeführt.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte anhand von Ohrbiopsien. Diese wurden zur Zersetzung des Gewebes über Nacht bei 55°C schüttelnd in 500 µl Lysepuffer (50 mM TRIS pH 8, 100 mM Na₂-EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 1 % (w/v) SDS, 50 mg/ml Proteinase K) inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, kräftigem Durchmischen und anschließender Zentrifugation bei 12000 × g und 4°C für 10 min wurde die wässrige, DNA-enhaltende Phase abgenommen, mit 500 µl 2-Propanol zur Fällung der DNA versetzt und bei 12000 × g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser aufgenommen. Anschließend wurden von jeder Probe vier verschiedene Ansätze (MuRF2-Wildtyp (WT), MuRF2-KO, MuRF3-WT, MuRF3-KO) für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) zur Bestimmung des Genotyps durchgeführt und die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Dazu wurden die PCR-Produkte mit 6x-DNA-Ladepuffer (12 % (v/v) Glycerol, 0,06 mM Na₂-EDTA, 0,6 % (w/v) SDS, 0,003 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, in einem Gel aus 1,5 % (w/v) Agarose und 4 µl Ethidiumbromid/100 ml Gel in TAE-Puffer (40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM Na₂-EDTA) aufgetrennt und im Geldokumentationsgerät UV-Transilluminator (Phase) unter UV-Licht ausgewertet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 11, die Reaktionsansätze in Tabelle 12 und die Temperaturprogramme in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 11: Genotypisierungsprimer.

PCR	Länge des PCR-Produkts	Vorwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
MuRF2-WT	410 bp	AGAATCCATCTGCCTGTAC	CCTGGAAGATGTCACTGGCAC
MuRF2-KO	250 bp	CACCTGATCATAACAGTCCTTG	CTAGTCTGTTAGCTGTGTAC
MuRF3-WT	350 bp	CTCAATGCTCTGGCACACCT	GACAGAAGCAGTGTTGTCTGAG
MuRF3-KO	480 bp	GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG	GCTTTGAGGAGCCCTCCAAGTGGT

Tabelle 12: Reaktionsansatz für Genotypisierungs-PCRs.

Reagenz	Volumen in µl			
	MuRF2-WT	MuRF2-KO	MuRF3-WT	MuRF3-KO
Wasser	17,5	16,75	17,75	15,25
Puffer C, 10x, EURx	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (25 mM)	0,25	1	0	0,5
Vorwärtsprimer (5 µM)	1	1	1	2
Rückwärtsprimer (5 µM)	1	1	1	2
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25	0,25	0,25	0,25
DNA	2	2	2	2

Tabelle 13: Temperaturprogramme für Genotypisierungs-PCRs.

Schritt	Zeit		Temperatur in °C
	MuRF2-WT	MuRF2-KO, MuRF3-WT MuRF3-KO	
1 Denaturierung	5 min	5 min	95
2 Denaturierung	15 s	30 s	94
3 Primeranlagerung	1 min	1 min	60
4 Elongation	30 s	30 s	72
5 Wiederholung		40x Schritte 2 bis 4	
6 abschließende Elongation	10 min	10 min	72

7.2.2 Körperzusammensetzung

Die Körperzusammensetzung von 21 Wochen alten männlichen und weiblichen Kontroll- und DKO-Mäusen wurde von Arnd Heuser und Kollegen mittels Kernspinresonanzspektroskopie im

LF90 II time domain NMR analyzer (6,5 mHz, Bruker Optics) wie bereits publiziert²¹⁵ bestimmt. Die Mäuse wurden im Halterungsrohr justiert, um eine Bewegung während der Messung zu verhindern. Der Gehalt an Fett, Muskelmasse und Flüssigkeit wurde jeweils im Triplikat gemessen.

7.2.3 Muskel- und Organentnahme

Heterozygote Kontrolltiere und DKO Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Danach erfolgte die Entnahme des Herzens und der Skelettmuskeln *Musculus (M.) soleus*, *M. extensor digitorum longus*, *M. gastrocnemius-plantaris* und *M. tibialis anterior* von beiden Unterschenkeln. Nach dem Wiegen wurde das Herz in die fünf Bereiche rechtes Atrium, linkes Atrium, rechter Ventrikel, linker Ventrikel und interventrikuläres Septum unterteilt, erst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Skelettmuskeln des rechten Beines wurden ebenfalls erst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Skelettmuskeln des linken Beines wurden in Einbettmedium (10,5 g Gum Tragacanth, 4,2 ml Glycerol, 105 ml destilliertes Wasser, einige Kristalle Thymol, am Abend vor der Verwendung frisch hergestellt, über Nacht bei 4°C gelagert) platziert, in Stickstoff-gekühltem Methylbutan vorgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren, um sie für Kryoschnitte mit nachfolgenden histologischen oder immunhistochemischen Analysen zu verwenden. Die Lunge und die Leber wurden entnommen, gewogen und eingefroren. Der Unterschenkel des linken Beines wurde abgetrennt, über Nacht bei 55°C in Lysepuffer (50 mM TRIS pH 8, 100 mM Na₂-EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 1 % (w/v) SDS, 50 mg/ml Proteinase K) inkubiert, um anhaftendes Gewebe zu entfernen und die Länge des Schienbeins (Tibia) wurde mit dem Messschieber vermessen. Die Tibialänge diente zur Normalisierung der Körper-, Organ- und Muskelgewichte; der Bezug auf das Körpergewicht allein könnte Veränderungen der Muskel- und Organgewichte verfälschen, da ein Einfluss des KO auf den Metabolismus und damit das Körpergewicht nicht ausgeschlossen werden kann.²¹⁶

7.2.4 Paraffineinbettung und -schnitte vom Herz

Die Herzen von Kontroll- und DKO-Mäusen wurden direkt nach der Entnahme gewogen, für 30 min bei Raumtemperatur drehend in Relaxationspuffer (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM Glukose) inkubiert und für 24 bis 48 h bei

4°C drehend in 4 % Formalin (Roti®-Histofix, CARL ROTH GMBH + CO. KG) fixiert. Danach wurden sie in Einbettkassetten (CARL ROTH GMBH + CO. KG) überführt und bis zur Einbettung in PBS gelagert. Vor dem Einbetten wurden die Herzen in aufsteigender Ethanolreihe entwässert (Inkubation für je 30 min in zweifach destilliertem Wasser, dann in 70 %, 90 %, 96 %, 3x 100 % Ethanol, 100 % Xylol), dann über Nacht bei 60°C in flüssigem Paraffin (Surgipath Paraplast®, Leica Biosystems Nussloch GmbH) inkubiert und im Einbettautomat Histostar (Thermo Fisher Scientific Inc.) in Paraffin eingebettet. 2 µm Schnitte wurden mit dem Mikrotom Microm HM340E (Thermo Fisher Scientific Inc.) angefertigt. Vor der Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Präparate wurden sie in absteigender Ethanolreihe (jeweils 2x für 5 min in 100 % Xylol, 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol, zweifach destilliertes Wasser) gewässert.

7.2.5 Proteinisolation aus Gewebe und Zellkultur

Muskelgewebe wurde mit 700 µl Protein-Lysepuffer (50 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton™ X-100, 10 % (v/v) Glycerol, cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics)) im FastPrep®-24 Homogenisierer (MP Biomedicals GmbH) mittels Keramikugeln homogenisiert, Proteine wurden durch Zentrifugation bei 16000 × g für 20 min bei 4°C von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt und die Proteinkonzentration mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) entsprechend den Herstellerangaben im FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech GmbH) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

Zur Isolation von Proteinen aus kultivierten Zellen wurden 200 µl Protein-Lysepuffer pro Vertiefung einer 6-Well-Platte auf die Zellen gegeben und diese dann bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Zellen von der Gefäßoberfläche abgeschabt, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zur vollständigen Lyse 30 min bei 4°C drehend inkubiert. Die weitere Proteinisolation erfolgte entsprechend der aus Gewebe.

Die Proteinisolation aus Muskelgewebe für die Detektion von endogenem MAPKAP-K3, MAPKAP-K2, p38 und SERCA2a wurde von Dorothee Krone (AG Renate Scheibe, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt. Der linke Ventrikel, der *M. gastrocnemius-plantaris* und eineinhalb *M. soleus* von sechs Kontroll- und sechs MuRF2/3-DKO-Mäusen wurden jeweils in kleine Stücke geschnitten, mit 150 µl Kinase-Assay Lysepuffer (20 mM TRIS-Acetat pH 7, 0,1 M EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β-Glycerophosphat, 50 mM NaF, 5 mM Na-Pyrophosphat, 1 % (v/v) Triton™ X-100, 1 mM Benzamidin, 2 µg/ml Leupeptin, 0,1 % (v/v)

2-Mercaptoethanol, 0,27 M Saccharose, 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, cComplete Protease-Inhibitor Cocktail) und einer Spatelspitze Aluminiumoxid gemischt und mit einem Pistill in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß homogenisiert. Der proteinhaltige Überstand wurde nach dem Zentrifugieren bei $15000 \times g$ für 20 min bei 4°C abgenommen und der Proteingehalt mittels Bradford-Assay entsprechend der Herstellerangaben bestimmt.

7.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Aus Herz- und Skelettmuskelgewebe isolierte Proteine (30 μg) wurden zur Denaturierung mit 6x-Lämmli-Probenpuffer (300 mM TRIS-HCl pH 6,8, 12 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerol²¹⁷ und 2-Mercaptoethanol (15 % (v/v))) für 5 min auf 95°C erhitzt und dann durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung 5%iger Sammel- (2,75 ml Wasser, 0,65 ml 30 % Acrylamid, 0,5 ml 1 M TRIS pH 6,8, 40 μl 10 % (w/v) APS, 4 μl TEMED) und 10%iger Trenngele (4 ml Wasser, 3,3 ml 30 % Acrylamid, 2,5 ml 1,5 M TRIS pH 8,8, 100 μl 10 % (w/v) SDS, 100 μl 10 % (w/v) APS, 4 μl TEMED) bei 100 V und konstanter Stromstärke von 50 mA aufgetrennt (Laufpuffer: 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % (v/v) SDS). Anschließend wurden sie mittels Tank-Blot-Verfahren bei 100 V und konstanter Stromstärke von 390 mA auf Nitrozellulosemembranen (GE Healthcare GmbH) transferiert (Transferpuffer: 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol). Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verringern, wurden die Membranen 30 min bei Raumtemperatur antikörperabhängig entweder mit 5 % Magermilchpulver in TBST (20 mM TRIS, 150 mM NaCl pH 7,6, 0,1 % (v/v) Tween[®] 20) oder mit 5 % BSA in TBST auf dem Rollenmischer RM5 (NeoLab) inkubiert. Die Bindung der primären Antikörper zum Nachweis spezifischer Proteine erfolgte bei 4°C über Nacht auf dem Rollenmischer. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurden die Membranen mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur für 1 bis 3 h inkubiert. Danach wurde erneut drei Mal mit TBST gewaschen. Die Bindung der Antikörper an die spezifischen Proteine wurde mittels eines Chemilumineszenz-Systems (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific Inc.), Amersham Hyperfilm[™] ECL-Filmen (GE Healthcare Limited) und der Entwicklermaschine Curix 60 (Agfa-Gevaert N.V.) detektiert und dokumentiert.

Die Western Blot Analysen in der AG Scheibe wurden mit der Semi-Dry Methode durchgeführt. Dazu wurden Nitrozellulosemembranen (GE Healthcare GmbH), der Elektrobloetter SEDEC M (Peqlab), das Stromversorgungsgerät High Voltage Power Pack 30 (Biometra), Anodenpuffer (300 mM TRIS-HCl pH 10,4, 10 % (v/v) Methanol) und Kathodenpuffer (25 mM TRIS-HCl pH 9,4,

40 mM Amino-hexansäure, 20 % (v/v) Methanol) verwendet. Der Proteintransfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² für 1,5 h. Die Membranen wurden mit 5 % Magermilchpulver oder mit 5 % BSA in PBST für 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Mit den primären Antikörpern erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen wurde mit den Sekundärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde ein Gemisch aus 1 ml Lösung A (0,1 M TRIS-HCl pH 8,6, 0,25 mg/ml Luminol), 100 µl Lösung B (1,1 mg para-Hydroxycoumarinsäure in Dimethylsulfoxid) und 0,5 µl 35 % H₂O₂ auf die Membran gegeben und die Chemilumineszenzsignale mittels LAS-3000 Dokumentationsystem (Fujifilm) detektiert und aufgezeichnet. Falls mehrere Proteine nacheinander auf derselben Membran nachgewiesen werden sollten, wurde die Membran nach der Signaldetektion in Strip-Puffer (62,5 mM TRIS-HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol) für 30 min bei 50°C rotierend inkubiert, mehrfach mit PBST gewaschen, geblockt und mit dem weiteren primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

7.2.7 Koimmunpräzipitation

COS-7-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit kaltem PBS auf Eis gewaschen, in 200 µl Lysepuffer (Natriumchlorid-Phosphatpuffer (150 mM NaCl, 50 mM Phosphatpuffer aus 1 M Stammlösung (KH₂PO₄ (pH 4) und K₂HPO₄ (pH 9,3) miteinander mischen, bis pH 7,4 erreicht ist), 0,5 % Triton™ X-100, cComplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics), frisch angesetzt) abgeschabt, durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt und durch anschließende Inkubation für 30 min bei 4°C auf dem Rotator M2000 (Sarstedt AG und Co.) lysiert. Das Lysat wurde bei 16000 × g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 40 µl als Kontrolle der Einsatzmenge (= Input) verwendet, der restliche Überstand wurde mit 810 µl Lysepuffer aufgefüllt und mit 30 µl gewaschenem ANTI-FLAG® M2 Affinitätsgel (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) ergänzt. Die Mischung wurde bei 4°C auf dem Rotator für 3 h inkubiert. Danach wurde die Agarose durch Zentrifugation für 5 min bei 800 × g und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit Natriumchlorid-Phosphatpuffer drei Mal gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 40 µl 2x-Lämmli-Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol (6x-Lämmli-Probenpuffer siehe 7.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot, mit destilliertem Wasser 1:3 verdünnt) und Erhitzen auf 95°C für 3 min. Das Eluat wurde in ein neues Gefäß überführt, zur Denaturierung mit 4 µl 2-Mercaptoethanol versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Bis zur Analyse mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western Blot erfolgte die Lagerung bei -20°C.

7.2.8 Affinitätschromatographische Proteinanreicherung (Pulldown)

Die Detektion von endogenem MAPKAP-K3 in Muskellysatproben war wegen einer Kreuzreaktion des Antikörpers nicht möglich. Deshalb war eine Anreicherung des spezifischen Proteins notwendig. Zu den Muskellysaten (jeweils 1 mg Protein) wurde 0,1 nM p38 α -Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein und 25 μ l Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare, vorher gewaschen in IP-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM TRIS-HCl pH 7,4, 50 mM NaF, 1 % (v/v) Triton™ X-100) gegeben, es wurde mit IP-Puffer auf 500 μ l aufgefüllt und für 12 bis 16 h bei 4°C über Kopf schüttelnd inkubiert. Dann wurde die Sepharose vier Mal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und dabei zum Pelletieren der Sepharose jeweils bei 400 \times g und 4°C für 2 min zentrifugiert. Die gebundenen Proteine wurden durch Erhitzen auf 95°C für 5 min in 20 μ l 2x SDS-Probenpuffer (200 mM TRIS-HCl pH 6,8, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,08 % (w/v) Bromphenolblau) eluiert. Die Experimente wurden von Dorothee Krone (AG Scheibe, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

7.2.9 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, real-time PCR

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Herz- und Skelettmuskulatur wurden Gewebestücke in 700 μ l TRIzol® Reagent (Life Technologies) im FastPrep®-24 Homogenisierer zerkleinert, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 12000 \times g für 15 min bei 4°C abgetrennt und der Überstand für die weitere RNA-Isolation entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden bis zur cDNA-Synthese bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Jeweils 1 μ g RNA wurde laut Herstellerprotokoll mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) und der SuperScript™ II Reversen Transkriptase und Random Primern (Life Technologies) revers transkribiert.

Die real-time PCR erfolgte mit dem FastStart Universal SYBR® Green Master (ROX, Roche) im StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation). Der Reaktionsansatz für eine Probe ist in Tabelle 14 aufgelistet, die verwendeten Primer (Thermo Fisher Scientific Inc.) in Tabelle 15 und das Temperaturprogramm der real-time PCR in Tabelle 16. Schmelzkurven im Temperaturbereich von 60°C bis 95°C dienten zur Überprüfung der Spezifität. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Normalisierung der in den verschiedenen Proben vorhandenen cDNA-Menge wurde die Genexpression von Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*Hprt*) analysiert.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für eine real-time PCR.

Reagenz	Volumen in μl
Nuclease-freies Wasser	6
FastStart Universal SYBR® Green Master	10
Vorwärtsprimer (5 μM)	1
Rückwärtsprimer (5 μM)	1
5 ng/ μl cDNA in Nuclease-freiem Wasser	2

Tabelle 15: Primer für die real-time-PCR.

Gen	Protein	Vorwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
<i>Col1a1</i>	Col1a1	TGTAACACCCCAGCGAAGAA	CTGAGTTGCCATTTCTTGGA
<i>Col3a1</i>	Col3a1	CTCACCTTCTTCATCCCCTCTTA	ACATGGTCTGGCTTCCAGACAT
<i>Ctgf</i>	Ctgf	TTCCCGAGAAGGGTCAAGCT	TTGGGTCTGGCCAAATGT
<i>Hprt</i>	Hprt	GCTTTCCTGGTTAAGCAGTACA	ACACTTCGAGAGGTCCTTTTCAC
<i>Nppa</i>	ANF	GGGGGTAGGATTGACAGGAT	ACACACCACAAGGGCTTAGG
<i>Nppb</i>	BNP	GCACAAGATAGACCGGATCG	CTTCAAAGGTGGTCCCAGAG
<i>Myh1</i>	MyHC-2x	AATCAAAGGTCAAGGCCTACAA	GAATTTGGCCAGGTTGACAT
<i>Myh2</i>	MyHC-2a	AACTCCAGGCAAAAGTGAAATC	TGGATAGATTTGTGTTGGATTGTT
<i>Myh3</i>	MyHC-emb	AGAGGGTTTCTCATGCGTGT	TGTTGTACTGGATGCAGAAGATG
<i>Myh4</i>	MyHC-2b	TGGCCGAGCAAGAGCTAC	TTGATGAGGCTGGTGTCTG
<i>Myh6</i>	kardiales α MyHC	GCCAAGACTGTCCGGAATGA	TGGAAGATCACCCGGGACTT
<i>Myh7</i>	MyHC- β /slow	CGCATCAAGGAGCTCACC	CTGCAGCCGCAGTAGGTT
<i>Trim63</i>	MuRF1	CCTGCAGAGTGACCAAGGA	GGCGTAGAGGGTGTCAAAC

Col1a1: Kollagen Typ I, alpha 1; *Col3a1*: Kollagen Typ III, alpha 1; *Ctgf*: *connective tissue growth factor*, *Hprt*: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase; *Nppa*: natriuretisches Peptid A; ANF: atrialer natriuretischer Faktor; *Nppb*: natriuretisches Peptid B; BNP: B-Typ natriuretisches Peptid; *Trim*: *tripartite motif*; MuRF: *muscle-specific RING-finger*; *Myh*: *myosin heavy chain* (Gen); MyHC: *myosin heavy chain* (Protein); emb: embryonale Isoform

Tabelle 16: Temperaturprogramm für die real-time PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$
1 Denaturierung	10 min	95
2 Denaturierung	15 s	95
3 Primeranlagerung + Elongation	1 min	60
4 Wiederholung		40x Schritte 2 und 3
5 Schmelzkurve		0,3 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ansteigend von 60 $^{\circ}\text{C}$ bis 95 $^{\circ}\text{C}$

7.2.10 Histologische und immunhistochemische Färbungen

Tiefgekühlte Gewebestücke wurden mit dem Einfriermedium Tissue-Tek® (Sakura® Finetek Europe) auf den Probenhaltern befestigt und Schnitte von 6 µm Dicke vom Herzen und den Skelettmuskeln *M. soleus*, *M. extensor digitorum longus*, *M. gastrocnemius-plantaris* und *M. tibialis anterior* mit dem Kryostat Leica CM 3050s (Leica Microsystems GmbH) angefertigt, auf Super Frost Objektträger (Gerhard Menzel GmbH) aufgezogen, luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Anwendung kamen drei verschiedene histologische Färbemethoden, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden. Aufnahmen der histologisch gefärbten Schnitte wurden mit dem Leica CTR 6500 HS Mikroskop und der Leica Digitalkamera DFC 425 angefertigt und mit dem Programm ImageJ Software 1.42c analysiert.

7.2.10.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Übersichtsfärbung zur Beurteilung der Morphologie in den Gewebeschnitten wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung angewendet. Hierbei bindet der positiv geladene Farbstoff Hämatoxylin negativ geladene Zellbestandteile wie die DNA und färbt sie blau, das negativ geladene Eosin bindet positiv geladene Zellbestandteile, zum Beispiel das glatte endoplasmatische Retikulum und Myoglobin, und stellt sie rot dar.

Tabelle 17: Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Lösung	Zeit
10 % (v/v) gepuffertes Formalin in PBS	1 min
Leitungswasser	kurz spülen
Hämatoxylinlösung, modifiziert nach Gill II (gefiltert)	1 min
Fließendes Leitungswasser	4 min
Saurer Alkohol (0,8 % (v/v) Essigsäure in 80 % (v/v) Methanol)	2x 30 s
Leitungswasser	kurz spülen
2,5 % (w/v) gesättigtes Lithiumcarbonat	10 s
80 % (v/v) Methanol	10x eintauchen
100 % Methanol	10x eintauchen
0,5 % (w/v) Eosin Y in 100 % Ethanol	3 min
100 % Ethanol	3x je 10x eintauchen
Xylol	2x 5 min
Vitro-Clud Eindeckmedium	eindecken

7.2.10.2 Gomori-Trichrom-Färbung

Die modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung (Gill II; 0,6 g Chromotrope 2R, 0,3 g Fast Green FCF, 0,6 g Phosphorwolframsäure, 1 ml Essigsäure (99,9 %) ad 100 ml destilliertes Wasser, pH 3,4 (mit NaOH), frisch gefiltert)²¹⁸ wurde verwendet, um zu erkennen, ob in der Muskulatur ein erhöhter Bindegewebsanteil (Kollagene) oder Bereiche mit Entzündungen oder Nekrosen vorhanden waren. Das Zytoplasma wird hierbei blau angefärbt, die Zellkerne violett, die Zellmembran rötlich und Kollagen türkis-grün.

Tabelle 18: Protokoll für die Trichrom-Färbung nach Gomori.

Lösung	Zeit
Hämatoxylinlösung, modifiziert nach Gill II	5 min
Fließendes Leitungswasser	4 min
Gomori Trichrom pH 3,4	10 min
0,2 % (v/v) Essigsäure	3x waschen
100 % Ethanol	3x je 10x eintauchen
Xylol	2x 5 min
Vitro-Clud Eindeckmedium	Eindecken

7.2.10.3 ATPase-Färbung

Die ATPase-Färbung erlaubt die Unterscheidung der verschiedenen Muskelfasertypen aufgrund der unterschiedlichen ATPase-Aktivität der in den Fasern enthaltenen Myosinisoformen. In der in dieser Arbeit angewandten Färbemethode wird die Säurelabilität der Myosin-ATPase-Aktivität der MyHC-2-Isoformen ausgenutzt. Nach einer Inkubation bei pH 4,3 verlieren MyHC-2-Isoformen ihre ATPase-Aktivität und Fasern, die diese Myosinisoformen enthalten, werden am Ende der Färbung hellblau dargestellt. Die ATPase-Aktivität von MyHC- β /slow bleibt erhalten und Fasern mit dieser Myosinisoform erscheinen nach der Färbung dunkelblau. Die Färbung wurde angewandt um die Frage zu klären, ob es durch den MuRF2/3-DKO zu einer veränderten Zusammensetzung der Muskelfasertypen in den verschiedenen Muskeln kam. Folgende Lösungen wurden für die Färbung jeweils frisch hergestellt: saures Differenzierungsmedium (50 mM Kaliumacetat, 20 mM Kalziumchlorid-dihydrat, pH 4,4), TRIS-Waschpuffer (100 mM TRIS, 20 mM Kalziumchlorid-dihydrat, pH 7,8), ATP-Inkubationsmedium (52,62 mM Glycin, 28,57 mM Kalziumchlorid-dihydrat, 65,02 mM Natriumchlorid, 47,5 mM Natriumhydroxid, 3,94 mM ATP [direkt vor Verwendung hinzufügen],

pH 9,4), Kalziumchlorid-Entwicklerlösung (1 % (w/v) Kalziumchlorid in destilliertem Wasser) und Toluidinblau (0,2 % (w/v) in destilliertem Wasser, gefiltert).

Tabelle 19: Protokoll für die ATPase-Färbung.

Lösung	Zeit
Saures Differenzierungsmedium	8 min
TRIS-Waschpuffer	3x 2 min
ATP-Inkubationsmedium	25 min
1 % (w/v) CaCl ₂ -Entwicklungslösung	3x je 4x eintauchen
0,1 % (w/v) Toluidinblau	1 min
Destilliertes Wasser	2x kurz spülen
100 % Ethanol	3x je 10x eintauchen
Xylol	2x 5 min
Vitro-Clud Eindeckmedium	eindecken

7.2.10.4 Bestimmung der Muskelfaserquerschnittfläche

Es wurde untersucht, ob der Verlust von MuRF2 und MuRF3 zu einer Veränderung der Myozytenquerschnittfläche und dadurch zu einer Hypertrophie (bei einer Zunahme) bzw. Atrophie (bei einer Abnahme) in den Skelettmuskeln führte. Dazu wurden die Querschnittflächen von mindestens 100 Muskelfasern je Muskel und Genotyp von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gefrierschnitten des *M. soleus* und des *M. extensor digitorum longus* mit dem Programm ImageJ Software 1.42c ausgemessen.

7.2.10.5 Analyse der Zellkernlokalisation

Ein Merkmal für das Auftreten regenerativer Prozesse nach einer Muskelschädigung ist das Vorhandensein zentraler Zellkerne in den Skelettmuskelzellen.²¹¹⁻²¹³ Aus diesem Grund wurde die Lokalisation des Zellkerns von mindestens 60 Zellen je Muskel und Genotyp vom *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* bestimmt und der Anteil zentraler und randständiger Nuclei prozentual ausgewertet.

7.2.10.6 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten des *M. soleus* und des *M. extensor digitorum longus* dienten der Analyse

1. der prozentualen Zusammensetzung der Muskelfasertypen
2. der Lokalisation von Aggregaten (inner- oder außerhalb der Muskelfasern)
3. des Myosingehalts der Aggregate.

Gefrierschnitte wurden für 15 min in 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, zweimal für 20 min mit 0,2 % Triton™ X-100 in PBS permeabilisiert, unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation in 3 % BSA in PBST (PBS mit 0,1 % (v/v) Tween® 20) für 1 h blockiert. Zur Detektion von MyHC- β /slow, panMyHC-2 oder der embryonalen Myosinisoform wurden die Präparate mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert.

Ob sich die bereits histologisch sichtbaren Aggregate außer- oder innerhalb der Muskelfasern befinden, wurde durch eine Kofärbung mit je einem Myosin-spezifischen Antikörper und einem gegen das extrazelluläre Matrixprotein Laminin gerichteten Antikörper getestet.

Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBST der sekundäre Antikörper Ziege-anti-Maus IgG-Alexa Fluor® 488 bzw. Ziege-anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) für 1 h bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Unspezifische Fluoreszenzsignale wurden durch Inkubation mit 5 % gefiltertem Sudan Black (w/v) in 70 % Ethanol verringert. Nach fünfmaligem Waschen in PBST wurden die Schnitte in Prolong® Gold antifade mit DAPI eingedeckt und bei 4°C bis zur Analyse aufbewahrt. Aufnahmen wurden am Leica CTR 6500 HS Mikroskop mit der Leica Digitalkamera DFC 360 FX gemacht und mithilfe der Leica Application Suite 2.5.0.6735 Software analysiert.

Eine Affinitätsfärbung mit Phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde durchgeführt, um filamentöses Aktin darzustellen. Dazu wurde eine 0,5 mg/ml Stammlösung (in Dimethylsulfoxid) 1:200 in der Sekundärantikörperlösung eingesetzt (Endkonzentration 2,5 μ g/100 μ l).

Die verwendeten Antikörper und eingesetzten Verdünnungen sind in Tabelle 8 im Abschnitt 7.1.4 aufgeführt.

7.2.10.7 Prozentuale Zusammensetzung der Muskelfasertypen der Skelettmuskeln

Ob die kombinierte Keimbahndeletion von MuRF2 und MuRF3 zu einer veränderten Zusammensetzung der Muskelfasertypen im *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* führte, wurde mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert. Dazu wurde die Anzahl an Muskelfasern ermittelt, die sich mit dem MyHC- β /slow- bzw. mit dem panMyHC-2-Antikörper anfärben ließen, ebenso wie die Anzahl der Zellen, die sich mit dem jeweiligen Antikörper nicht anfärben ließen. Der Anteil an Muskelfasern, die beide Isoformen enthielt und sich deshalb mit beiden Antikörpern anfärbte, stellt die sogenannten intermediären Fasern dar. Diese wurden ermittelt, indem die Anzahl der Muskelfasern, die sich mit dem einen Antikörper nicht anfärbten von der Anzahl der Muskelfasern, die sich mit dem anderen Antikörper anfärbten, subtrahiert wurde.

7.2.11 Elektronenmikroskopie

Um einen genaueren Einblick in die Struktur und Lokalisation der Aggregate zu erhalten und um beurteilen zu können, ob es in den DKO-Mäusen zu Veränderungen in der Sarkomerstruktur kommt, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen vom *M. soleus*, *M. extensor digitorum longus*, dem rechten Ventrikel und vom interventrikulären Septum angefertigt. Dazu wurden vier bis sechs Monate alte Mäuse durch Isofluranbeatmung (2 %, Flussrate 250-280 ml/min) betäubt, die Gewebe der Tiere mittels Fixierungspuffer (4 % Formaldehyd, 1,25 % Glutaraldehyd in 0,08 M Phosphatpuffer (0,2 M KH_2PO_4 , 0,2 M Na_2HPO_4)) perfusionsfixiert und danach die Skelettmuskeln und das Herz entnommen. Die Gewebeproben wurden zur vollständigen Fixierung über Nacht bei 4°C im Fixierungspuffer inkubiert und am nächsten Tag durch die Elektronenmikroskopie-Abteilung des Max-Delbrück-Centrums (MDC, Bettina Purfürst und Mitarbeiter) prozessiert. Dort wurden die Proben für drei Tage bei 4°C in 0,1 M Phosphatpuffer mit 2,5 % Glutaraldehyd nachfixiert, danach gewaschen und in 0,1 M Cacodylatpuffer transferiert. Nach einer Osmierung mit 1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer wurden die Gewebestückchen in Kunstharz (Poly/Bed® 812, Polysciences, Inc.) eingebettet. Ultradünnschnitte (60 nm) wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Leica Microsystems GmbH) angefertigt und anschließend mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Aufnahmen wurden mittels FEI™ Morgagni Elektronenmikroskop, der Morada CCD Kamera und dem iTEM Programm (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) angefertigt.

7.2.12 *Ex vivo* Mausmodell der Muskelkraftmessung

Die Skelettmuskeln *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* von Kontroll- und DKO-Mäusen wurden verwendet, um den Einfluss der Abwesenheit von MuRF2 und MuRF3 auf die Muskelfunktion zu analysieren. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Muskeln freigelegt, an den Sehnenansätzen der Muskeln Seidenfäden (Perma Hand Seide SETA, Ethicon Products) angebunden, die Muskeln an den Fäden, ohne Berührung des Gewebes, herausgenommen und zwischen zwei Stahlelektroden des 800A *in vitro* Testapparates (Aurora Scientific Inc.) mit dem proximalen Ende an einen beweglichen Hebel sowie mit dem distalen Ende an einen festen Haken gebunden, der auf einer bewegliche Plattform befestigt war. Der Muskel und die Elektroden wurden von einem doppelwandigen, auf 25°C temperierten Glasgefäß umgeben, das mit Krebs-Henseleit-Puffer (112 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 11 mM Glukose)²¹⁹ gefüllt war, der ständig durch Begasung mit 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid auf konstantem Sauerstoffgehalt und pH 7,4 gehalten wurde (Abbildung 16). Der biphasische Stimulator 701C High-Power wurde für die Stimulation der Muskeln bei konstanter Spannung von 40 V und mit Spannungsimpulsen verschiedener Frequenzen eingesetzt und das 300C Dual-Mode Muscle Lever System wurde für die Messung der Muskelfunktionen (beide Aurora Scientific Inc.) verwendet.

Der Muskel wurde zwischen dem Haken und dem Hebel in leicht gespanntem Zustand für 15 min im Puffer äquilibriert und dann auf die Länge gespannt, bei der er eine maximale Kontraktionskraft unter den Parametern 75 Hz Pulsfrequenz, 0,2 s initiale Verzögerung, 0,2 ms Pulsweite, 37 Pulse pro repetitiver Pulsfolge (Pulse per Train), 0,1 Hz Trainfrequenz und 0,01 s Laufzeit aufwies. Mit einem digitalen Messschieber wurde diese Länge des Muskels bestimmt und als optimale Länge L_0 bezeichnet. Danach erfolgte eine weitere Äquilibration des Muskels für 10 min, um eine Erholung von den Kontraktionen zu gewährleisten, die für die Längeneinstellung notwendig waren. Die Messung der Kontraktionskraft wurde bei steigenden Stimulationsfrequenzen von 2, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 125, und 150 Hz für den *M. soleus* und einer zusätzlichen Frequenz von 175 Hz für den *M. extensor digitorum longus* bei einer Spannung von 40 V mit einer Pulsweite von 0,2 ms für 500 ms durchgeführt. Zwischen den verschiedenen Frequenzen gab es Erholungszeiten von je 1,5 min, um einen Einfluss der vorherigen Stimulation auf die Kontraktionskraft zu vermeiden. Das Messprotokoll wurde anhand verschiedener Veröffentlichungen mit ähnlicher Fragestellung zusammengestellt.^{220–223} Die Aufzeichnung der Messwerte erfolgte mit dem Programm ASI Dynamic Muscle Control –

DMC v5.3000, die Auswertung mit ASI 611A Dynamic Muscle Analysis – DMA v5.010 (beide Aurora Scientific Inc.). Nach der Messung wurde der Muskel auf einer Feinwaage gewogen.

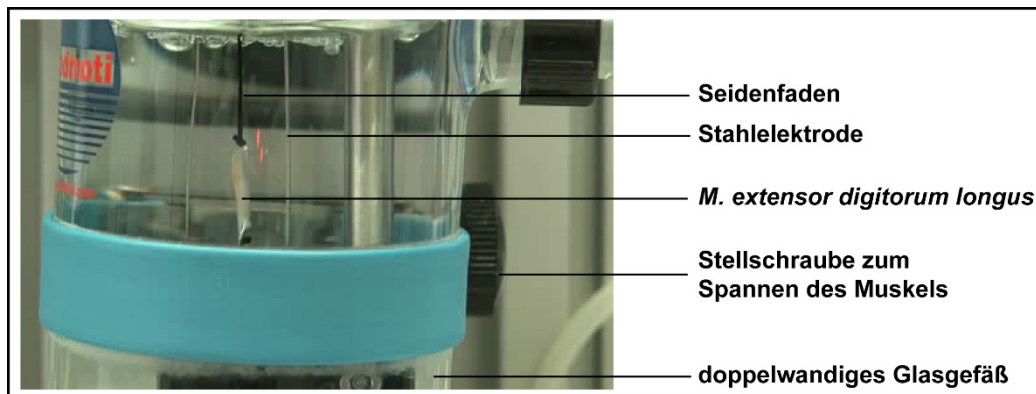


Abbildung 16: Muskelkraftmessung. Ein doppelwandiges Glasgefäß wird mit Wasser durchströmt und dadurch auf konstant 25°C gehalten. Im Gefäß befindet sich Krebs-Henseleit-Puffer, der mit einem Gemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid begast wird. In diesem Puffer ist der Muskel mit Hilfe von Seidenfäden zwischen zwei Elektroden befestigt, mit der distalen Seite an einem fixierten Haken und mit der proximalen Seite am beweglichen Hebel zur Kraftübertragung.

Die Muskelkraft wurde normalisiert, um einen Einfluss der unterschiedlichen Muskelgrößen und -längen auf die Kraft auszuschließen. Dazu wurde die gemessene Kraft durch einen berechneten Muskelquerschnitt geteilt. Diese Querschnittsfläche (A) ergibt sich aus der Muskelmasse (m), geteilt durch die optimale Länge des Muskels L_0 , die durchschnittliche Dichte von Skelettmuskelgewebe von Säugetieren (ρ , 1,06 g/cm³) und dem durchschnittlichen Verhältnis von Muskelfaserlänge zu Muskellänge (R), welches für den Soleus 0,71 und für den EDL 0,45 beträgt (Formel 1).²²⁴

$$A = \frac{m}{L_0 \cdot R \cdot \rho}$$

Formel 1: Berechnung der Muskelquerschnittsfläche zur Normalisierung der gemessenen Muskelkraft. Formelzeichen siehe Text.

7.2.13 Echokardiographische Analysen

Für die Analyse der Herzstruktur und -funktion *in vivo* wurden männliche, acht Wochen alte Mäuse einer Echokardiographie (Arnd Heuser und Mitarbeiter, MDC) unterzogen. Sie wurden mit 2 % Isofluran betäubt und auf einer Wärmeplatte (PHYSITEMP INSTRUMENTS INC) vor Auskühlung geschützt. Die Temperatur und das Elektrokardiogramm (EKG) wurden kontinuierlich kontrolliert und aufgezeichnet. Die Echokardiographie wurde mit dem Vevo 770

High-Resolution Imaging System (Fujiifilm VisualSonics) unter Verwendung eines hochauflösenden Messfühlers (37,5 MHz) durchgeführt.

Es wurden folgende Parameter bestimmt:

- Durchmesser des linken Ventrikels am Endpunkt der Systole und Diastole
- Dicke des interventrikulären Septums (IVS) am Endpunkt der Systole und Diastole
- Dicke der linksventrikulären posterioren Wand am Endpunkt der Systole und Diastole
- Verkürzungsfraction (beschreibt, wie weit sich das Herz während der Systole kontrahiert; gibt Auskunft über die Kontraktionsfähigkeit des Herzens)
- Ejektionsfraction (gibt an, wieviel Prozent des Blutvolumens, welches am Ende der Diastole im linken Ventrikel ist, mit einem Schlag herausgepumpt wird; ist ein Maß für die systolische Pumpfunktion des Herzens)
- Herzminutenvolumen (das Volumen, welches je Minute vom Herzen gepumpt wird)
- Herzschlagvolumen
- Herzfrequenz
- Gewicht des linken Ventrikels
- Körpergewicht
- Verhältnis vom Herzgewicht zum Körpergewicht
- E (Geschwindigkeit des passiven frühdiastolischen Bluteinstroms in den linken Ventrikel aus dem linken Vorhof)
- A (Geschwindigkeit des aktiven spätdiastolischen Bluteinstroms aus dem linken Vorhof in den linken Ventrikel aufgrund der Kontraktion des linken Vorhofs)
- E/A (Verhältnis von E zu A als Maß für eine diastolische Funktionsstörung des linken Ventrikels)

7.2.14 Herzperfusion nach Langendorff

Die Methode der Herzperfusion nach Langendorff wurde verwendet, um am isolierten Herzen die Stärke und Geschwindigkeit der Kontraktion und die Herzschlagfrequenz unter dem Einfluss pharmakologischer Substanzen zu untersuchen.²²⁵

Für die Analyse der Herzfunktionen nach Langendorff (Clemens Köhncke, AG Morano, MDC/Charité, durchgeführt wie publiziert²²⁶) wurden männliche, 15 Wochen alte DKO- und Kontrollmäuse durch intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin betäubt. Einer Thrombusbildung wurde durch die Gabe von 250 I.E. Heparin vorgebeugt. Die Herzen wurden entnommen und sofort in eiskalten, modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (118,0 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2,1 mM MgSO₄, 24,7 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄,

0,06 mM Na₂-EDTA, 11 mM Glukose) transferiert. Eine 21 Gauge Kanüle wurde in die Aorta eingeführt und dort fixiert und das Herz dann an der Langendorff-Anlage (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH) befestigt. Die Perfusion erfolgte retrograd mit dem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer bei einem Druck von 60 mmHg, 37°C und pH 7,4, der durch kontinuierliches Einströmen von 5 % CO₂ und 95 % O₂ in den Puffer konstant gehalten wurde. Nach einer Ruhephase von 20 min zur Erholung der Herzen begannen die Messungen. Es wurden nur die Herzen für die Analysen verwendet, die einen Druckanstieg von mehr als 40 mmHg entwickelten. Die elektrische Stimulation erfolgte mit einer koaxialen Elektrode bei 8 Hz. Die korrekte Position der Elektrode am Sinusknoten wurde durch die Aufzeichnung eines EKGs mittels zweier Oberflächenelektroden und einer Standard Null-Elektrode überwacht. Um den linksventrikulären Druck (LVP) zu bestimmen, wurde ein selbst hergestellter Ballon durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt und über einen flüssigkeitsgefüllten Schlauch mit einem kalibrierten Druckaufnehmer (APT300, Hugo Sachs Elektronik) verbunden. Der maximale Druckanstieg, der maximale Druckabfall ($+dLVP/dt_{max}$, $-dLVP/dt_{max}$) und das Verhältnis ($-dp/dt_{max}:+dp/dt_{max}$) daraus wurden anhand des LVP berechnet. Eine weitere Bestimmung dieser Parameter erfolgte nach Zugabe von 50 nM Isoprenalin in den Puffer. Dieses aktiviert β -Adrenozeptoren und führt dadurch zu einer Steigerung der Kontraktionskraft des linken Ventrikels und der Schlagfrequenz des Herzens.^{227–229} Es sollte festgestellt werden, ob der DKO von MuRF2 und MuRF3 die Reaktion des Herzens auf die β -adrenerge Stimulation verändert. Die Datenaufzeichnung und -auswertung erfolgte mit der Isoheart Software (Hugo Sachs Elektronik).

Es wurden folgende Parameter ermittelt:

- Herzfrequenz
- linksventrikulärer Druck während der Systole und Diastole
- Entwicklungsdruck (LVP_{dev} , vom linken Ventrikel während der Kammerystole aufgebauter Druck ohne den während der Vorhofsystole erzeugten Druck)
- Druckänderung über die Zeit bis zum Erreichen des maximalen ($dLVP/dt_{max}$) und des minimalen Drucks ($dLVP/dt_{min}$) im linken Ventrikel (entspricht der Kontraktions- bzw. der Relaxationsgeschwindigkeit)
- Quotient aus der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit Q (erleichtert das Erkennen von Geschwindigkeitsunterschieden)
- Herzindex (Verhältnis aus Herzminutenvolumen zu Körperoberfläche, dient der Beurteilung der Herzleistung)
- mittlerer Perfusionsdruck
- mittlerer Blutfluss durch die Koronararterien

7.2.15 Mausmodelle der kardialen Hypertrophie

Es wurde untersucht, ob der DKO von MuRF2 und MuRF3 die Anpassung der Herzmuskulatur an erhöhten kardialen Stress verändert. Zwei Modelle kamen zum Einsatz, die unterschiedliche Krankheitsbilder darstellen. Zum einen wurde die Kontraktionskraft und die Schlagfrequenz des Herzens durch permanente Anregung der β 1-Adrenozeptoren aufgrund von kontinuierlicher Isoprenalinzufuhr erhöht und dadurch eine kardiale Hypertrophie induziert. Zum anderen wurde durch eine Verengung der thorakalen Aorta ein erhöhter Druck auf die linke Herzkammer ausgeübt und dadurch eine linksventrikuläre Herzhypertrophie erzeugt.

7.2.15.1 Kontinuierliche Isoprenaliningabe

Isoprenalin ist eine Katecholamin-Verbindung, die β 1-adrenerge Rezeptoren aktiviert und dadurch zu einer Steigerung der Kontraktionskraft und Schlagfrequenz des Herzens führt. Eine kontinuierliche Gabe resultiert aufgrund der verstärkten Beanspruchung in der Zunahme des Herzmuskelgewebes und dient dadurch als Modell für eine Herzhypertrophie, die anfangs konzentrisch und später exzentrisch verläuft.^{227,229,230} Osmotische Pumpen (Model 2001, ALZET®, Abbildung 17) wurden mit Isoprenalin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), das in 150 mM NaCl und 1 mM Essigsäure gelöst war, gefüllt und in je drei sieben bis neun Wochen alte, männliche Kontroll- und DKO-Mäuse dorsal subkutan implantiert. Dazu wurden die Mäuse mit 2 % Isofluran (Flussrate 250-280 ml/min) anästhesiert, das Fell über den Schultern mittig eingeschnitten, mit einer Gefäßklemme eine Unterhauttasche stumpf präpariert, diese mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült und die Pumpen mit dem Abflussregler voran in die Tasche geschoben. Die Haut wurde mit einem 6-0 Mersilene-Faden (Ethicon) genäht. Die Pumpen gaben kontinuierlich 8,7 mg/kg/d Isoprenalin ab. Vier Kontroll- und zwei DKO-Mäuse erhielten Pumpen, die nur mit dem Puffer gefüllt waren, um auszuschließen, dass die Behandlung an sich schon einen Einfluss auf das Herz ausübte (sham-Operation). Nach sieben Tagen wurden die Herzen isoliert, gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Lungen-, Leber- und Körpergewicht wurden ebenfalls bestimmt, außerdem wurde die Tibialänge gemessen und zur Normalisierung der Gewichte verwendet.

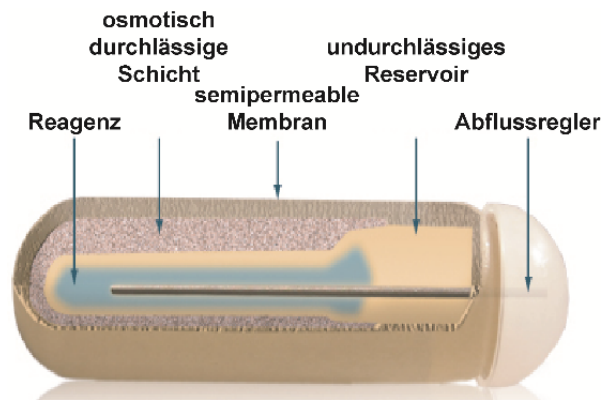


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer Alzet® osmotischen Pumpe. Durch Osmose gelangt interstitielle Flüssigkeit durch die semipermeable Membran in die durchlässige Schicht. Diese quillt auf, drückt dadurch das undurchlässige Reservoir zusammen und führt so zur Abgabe des eingefüllten Reagenz' durch den Abflussregler. verändert nach Alzet®, DURECT Corporation

7.2.15.2 Thoraxaorta-Konstriktion

Je sechs 9 bis 17 Wochen alte männliche Kontroll- und DKO-Mäuse wurden endotracheal intubiert und mit 2 % Isofluran (Flussrate 250-280 ml/min) betäubt. Die Operationen wurden auf einer Wärmeplatte (PHYSITEMP INSTRUMENTS INC) durchgeführt, um das Auskühlen der Tiere zu verhindern. Der Brustkorb wurde bis zur zweiten Rippe geöffnet und der Aortenbogen freigelegt. Die Thoraxaorta wurde zwischen den Karotiden auf einen definierten Durchmesser verengt, indem eine 26 Gauge-Kanüle an die Aorta gelegt und um beide ein steriler Faden (6-0, Perma Hand Seide, Ethicon Products) geknotet wurde. Nach dem Entfernen der Kanüle konnte die Aorta nur noch den durch den Durchmesser der Kanüle vorgegebenen Umfang annehmen (Abbildung 18). Der Brustkorb und das Fell wurden vernäht (6-0, Mersilene, Ethicon Products) und die Tiere zur Erholung von der Operation unter eine Rotlichtlampe (Efbe Elektrogeräte GmbH) gelegt. Das Analgetikum Carprofen (Pfizer Deutschland GmbH) wurde einmalig vorbeugend vor der Operation subkutan injiziert (5 mg/kg). Die Operationen wurden von Astrid Schiche (AG Luft, Charité, ECRC) durchgeführt. 21 Tage nach der Konstriktion wurden die Herzen entnommen und gewogen. Das Lungen-, Leber- und Körpergewicht wurde ermittelt. Die Länge der Tibia diente zur Normalisierung der Gewichte.

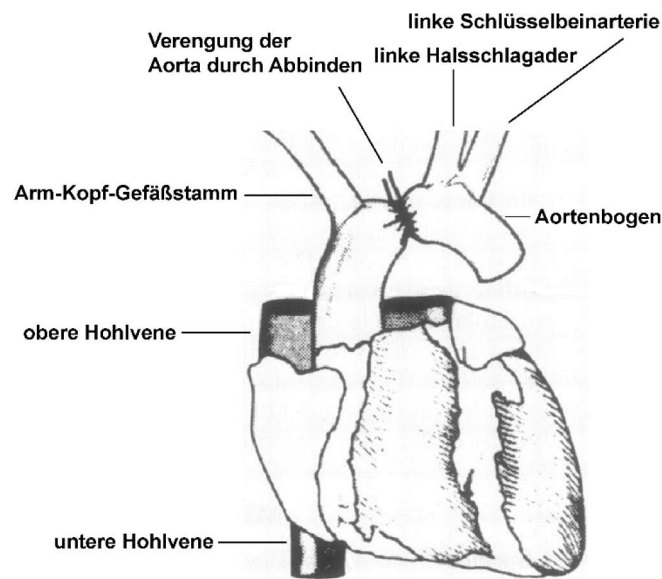


Abbildung 18: Darstellung der Thoraxaortenkonstriktion (TAC). Der Durchmesser der Aorta wird durch das Abbinden reduziert. Dadurch erhöht sich der Druck zwischen dem linken Ventrikel und der Verengung. Um das Blut durch den Engpass zu pumpen, muss der linke Ventrikel stärker kontrahieren, dies führt zur Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie.^{verändert nach 231}

7.2.16 Analyse von aus adulten Mäusen isolierten Kardiomyozyten

Männliche, 15 Wochen alte DKO- und Kontrollmäuse wurden zur kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Theresia Kraft (Medizinische Hochschule Hannover) versendet und dort von Aanchal Pahuja und Cornelia Geers-Knörr für Untersuchungen an primären Kardiomyozyten verwendet.

7.2.16.1 Isolierung und Kultivierung

Die Mäuse wurden durch Injektion von Pentobarbital (Streuli Pharma AG) abgetötet. Die Isolierung Kalzium-toleranter linksventrikulärer Kardiomyozyten erfolgte wie von Kondo *et al.* publiziert.²³² Die für die Kontraktilitätsmessung verwendeten Kardiomyozyten wurden in ACCT-Medium MEM199 (Amimed, BioConcept) mit 2 mg/ml fettsäurefreiem, bovinem Serumalbumin, 2 mM L-Carnitin, 5 mM Kreatin, 5 mM Taurin, 10 nM Triiodthyronin (alle von Sigma), 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (Invitrogen) kultiviert und nahmen eine stabähnliche Form innerhalb von 18 h nach der Isolierung an.

7.2.16.2 Kontraktilität und Kalziumströme

Fura-2 ist eine Ca^{2+} -abhängige, fluoreszierende Substanz, die durch die Bindung von Acetoxymethylester (Fura-2-AM) membrandurchgängig wird. Intrazelluläre Esterasen spalten AM ab, dadurch wird ein Austreten von Fura-2 aus der Zelle verhindert. Die Bindung von Ca^{2+} an Fura-2 führt zu einer Verschiebung des Fluoreszenzspektrums. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei 340 nm (Ca^{2+} -gesättigtes Fura-2) und 380 nm (freies Fura-2) wird bestimmt und gilt als Maß für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration.^{233,234}

Auf Glas-Deckgläschen kultivierte Kardiomyozyten wurden für 15 min bei 37°C in Tyrode Puffer (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, pH 7,4) inkubiert, der 1 mM Fura-2-AM (Invitrogen) enthielt. Danach wurden sie mit Tyrode Puffer mit 500 mM Probenecid gespült, um zu verhindern, dass Fura-2 aus den Zellen austritt. Die Zellen wurden bei einer Frequenz von 5 Hz stimuliert (Myopacer, IonOptix). Für die Analyse des Transienten wurden Mittelwerte von 15 bis 25 Kontraktionen verwendet. Außerdem wurden die Sarkomerlängen gemessen. Alle Daten wurden mit einem lowpass Butterworth Algorithmus mit der IonWizard Software (IonOptix) gefiltert. Die Analyse der kontraktile Eigenschaften und der Kalziumtransienten erfolgten wie von Timolati *et al.* beschrieben.²³⁵

7.2.17 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische (MS) Analysen wurden angewandt, um herauszufinden, welche Proteine aufgrund des DKO von MuRF2 und MuRF3 vermehrt in den Skelettmuskeln vorhanden waren und die deshalb möglicherweise Substrate der beiden E3-Ligasen darstellen. Der *M. soleus* von drei Kontroll- und drei MuRF2/3-DKO-Mäusen wurde für die Analysen verwendet. Pro Tier wurden eineinhalb Muskeln in Denaturierungspuffer (6 M Urea, 2 M Thiourea, 10 mM HEPES, 2 % (w/v) SDS) im FastPrep®-24 Homogenisierer zerkleinert, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 20 min bei 16000 × g und 4°C abgetrennt und der Überstand zur weiteren Bearbeitung in die MS-Abteilung des MDC (Gunnar Dittmar und Mitarbeiter) gegeben. Dort wurden die Proben mit 8 M Urea mit 10 mM Dithiothreitol behandelt, um Disulfidbrücken zu reduzieren. Anschließend wurden sie mit 55 mM 2-Chloracetamid alkyliert. Die Proteine wurden mit der Endopeptidase LysC (Wako, 1 µg/50 µg Protein) vorverdaut, dann verdünnt auf 2 M Urea und weiter verdaut mit Trypsin (Promega, 1 µg/50 µg Protein). Die erhaltenen Peptide wurden mittels Flüssigchromatographie (Proxeon nLC-II System, Thermo Fisher Scientific Inc., revers-Phasen-Säule C18, 3 µm, Dr. Maisch HPLC

GmbH) aufgetrennt und MS und MS/MS-Spektren mit dem QExactive Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) im datenabhängigen Akquisitionsmodus aufgezeichnet. Dazu wurde die Top 10 höhere-Energie-Kollisionsdissoziationsmethode verwendet. Das heißt, nach jedem MS Scan folgten 10 MS/MS Scans zur Messung der Fragmente der zehn MS-Peaks mit den jeweils höchsten Intensitäten. Die Datenbearbeitung erfolgte mit dem MaxQuant-Programm Version 1.2.2.5 und die Peptide und Proteine wurden durch einen Abgleich mit der Maus IPI (*International Protein Index*) Datenbank identifiziert.

7.2.18 Molekularbiologische Methoden

7.2.18.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* XL1-blue

Es wurden 5 ml 2x-YT-Medium (16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 3 g NaCl, ad 1 l Wasser, autoklaviert, Tetracyclin 12 µg/ml) mit *Escherichia (E.) coli* XL1-blue-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd (250 rpm) inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml 2x-YT-Medium inokuliert und bei 37°C schüttelnd so lange inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,9 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht war. Nach schnellem Abkühlen der Kultur auf Eis wurde bei 4500 × g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in autoklaviertem Wasser resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 10%igem, autoklaviertem Glycerol resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Pellet in ca. 5 ml 10%igem Glycerol resuspendiert und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

7.2.18.2 Klonierung

Proteine, die in der MS-Analyse der *M. soleus*-Proben der DKO-Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren angereichert waren, wurden durch Generierung entsprechender heterologer Expressionsplasmide weitergehend untersucht. Dazu wurden die jeweiligen kodierenden Sequenzen der Gene kloniert. Zur Amplifikation dieser Sequenzen wurden die in Tabelle 20 aufgelisteten Primer und ein muriner cDNA-Pool verwendet. Die Reagenzien und Volumina für einen PCR-Reaktionsansatz sind in Tabelle 21 dargestellt. Das Temperaturprogramm für die Klonierungs-PCRs richtete sich nach der Advantage® HD Polymerase (Clontech) und wurde laut

Herstellerangaben zusammengestellt (Tabelle 22). Die Annealingtemperaturen für die PCR (Tabelle 20) wurden entsprechend der Schmelztemperaturen der jeweiligen Primer gewählt.

Tabelle 20: Klonierungsprimer für die Amplifikation muriner cDNA mittels PCR und jeweilige Annealingtemperatur (T). Die Primer wurden bei Thermo Fisher Scientific Inc. geordert.

Gen	Protein (Abkürzung)	Vorwärtsprimer 5' → 3' Rückwärtsprimer 5' → 3'	T in °C
<i>Capn3</i>	Calpain 3-Variante (MUp48)	CGGAATTCGTAGAGCTCAGCCTGCAGCTT GCCTCGAGCTAGGAGGCAGCCTCCTTC	60
<i>Ddx17</i>	DEAD box protein 17 (DDX17)	CGGAATTCCTGGAGGCGGCTTTG GCTCTAGATCATTGCGAGATGGAGGAGGG	60
<i>Hspb3</i>	Heat shock protein beta-3 (HspB3)	CGGAATTCGAAAAATCATTTTGAGG GCTCTAGATCACTTGGTCCCTAGTGAATC	55
<i>Mapkapk3</i>	MAP kinase-activated protein kinase 3 (MAPKAP-K3)	CGGAATTCGATGGCGAGACAGCAG GCTCTAGATTACTGGTTGTTGCATCCTTGTGAGG	60
<i>Mlf2</i>	Myeloid leukemia factor 2 (MLF2)	CGGAATTCCTCCGCTTCATGAGGGACGTG CCGCTCGAGTCACCAGTCATAACGACGGGAC	65
<i>Palld</i>	Palladin	GCGGGCCCTTAATGTCGGGAAATGTAGAC CCGCTCGAGTCAGAGACTTCTCCAC	60
<i>Smyd2</i>	N-Lysin Methyltrans-ferase SMYD2 (SMYD2)	GCGGGCCCTCAGTGGCTCTCAATCTCTGCT CCGCTCGAGCGCGCCGAGGCC	60
<i>Sra1</i>	Steroid receptor RNA activator 1	CGGAATTCATGCGCTGCCCG GCTCTAGATTATGATGGCTGTTGGAAGCCTGG	60

Tabelle 21: PCR-Ansatz für Amplifikation der zu klonierenden murinen cDNAs.

Reagenz	Volumen in µl
Wasser	25,5
5x HD-Puffer	10
dNTPs (1 mM)	1
Vorwärtsprimer (5 µM)	4
Rückwärtsprimer (5 µM)	4
cDNA (10 ng/µl)	5
HD-Polymerase	0,5

Tabelle 22: Temperaturprogramm für Klonierungs-PCRs.

Schritt	Zeit	Temperatur in °C
1 Denaturierung	5 min	95
2 Denaturierung	30 s	94
3 Primeranlagerung	30 s	siehe Tabelle 20
4 Elongation	2 min	72
5 Wiederholung	30x Schritte 2 bis 4	
6 abschließende Elongation	10 min	72

Tabelle 23: Restriktionsenzyme für die Insertion der PCR-Produkte in den Expressionsvektor.

Gen	Restriktionsenzyme
<i>Capn3</i>	EcoRI, XhoI
<i>Ddx17</i>	EcoRI, XbaI
<i>Hspb3</i>	EcoRI, XbaI
<i>Mapkapk3</i>	EcoRI, XbaI
<i>Mlf2</i>	EcoRI, XhoI
<i>Palld</i>	EcoRI, XbaI
<i>Smyd2</i>	XhoI, ApaI
<i>Sra1</i>	EcoRI, XbaI

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, Banden der entsprechenden Größen unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA aus den Gelstücken laut Herstellerangaben des Säulenaufreinigungskits (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel) isoliert.

Die aufgereinigten PCR-Produkte und der Expressionsvektor pcDNA3.1(+)/FLAG wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (siehe Tabelle 23) unter Verwendung von Puffern und BSA (New England Biolabs® Inc.) laut den Firmenangaben geschnitten und nach einer Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Säulenaufreinigung über Nacht bei 14°C mit der T4 DNA Ligase und dem dazugehörigen Puffer entsprechend der Herstellerangaben (New England Biolabs® Inc.) ligiert. Die Plasmide wurden in *E. coli* XL1-blue elektrisch transformiert (siehe folgenden Abschnitt 7.2.18.3) und die DNA nach Vermehrung der Zellen mittels einer Maxi- oder Mini-DNA-Präparation isoliert. Die Plasmide wurden zur Sequenzierung an die Eurofins MWG GmbH geschickt und die erhaltenen Sequenzen wurden auf Vollständigkeit und Richtigkeit überprüft. Die Vektorkarte für den Expressionsvektor pcDNA3.1(+)/FLAG befindet sich im Anhang (Abschnitt 14.3).

7.2.18.3 Transformation

Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation in elektrokompetente *E. coli* XL1-blue transformiert. Die Transformation von 50 µl Bakterien mit circa 100 ng DNA erfolgte durch einen elektrischen Stromimpuls im Elektroporator MicroPulser (Bio-Rad Laboratories GmbH). Nach der Transformation wurden die Zellen zur Regeneration in 500 µl SOC-Medium (10 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) aufgenommen, für 1 h bei 37°C schüttelnd (250 rpm) inkubiert, dann auf LB-Platten

mit Ampicillin (100 µg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ampicillin-enthaltendes LB-Medium wurde mit einzelnen Kolonien (ein Klon je Probe) zur Vermehrung der Bakterien inokuliert. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C schüttelnd (250 rpm) inkubiert und am nächsten Tag wurden die Plasmide aus den Bakterienzellen isoliert.

7.2.18.4 Plasmid-DNA-Präparation

Die DNA-Präparation erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Isolierungssystem von Macherey-Nagel für große DNA-Mengen (0,5 – 3 ml mit 1-5 µg DNA/µl) und mit den Puffern P1, P2 und P3 und dem dazugehörigen Protokoll von Qiagen für kleinere DNA-Mengen (30-50 µl mit 1-5 µg DNA/µl).

7.2.19 Zellkultur

7.2.19.1 Kultivierung, Passagieren und Aussaat

C2C12- oder COS-7-Zellen wurden im DME-Medium mit 1 g/l Glukose, 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin (100 I.U./0,1 mg/ml) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Inkubator (Thermo Fisher Scientific Inc.) kultiviert. Zum Passagieren oder für die Aussaat für Versuche wurden sie bei einer Konfluenz von circa 80 % mit PBS gewaschen, mit 1,5 ml Trypsin/EDTA je T75-Flasche bei 37°C für 3 bis 5 min inkubiert und dadurch vom Untergrund abgelöst, die Zellsuspension dann für 3 min bei 300 × g bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Zellpellet in DME-Medium resuspendiert und entweder ein Anteil für die weitere Kultivierung in eine frische T75-Flasche gegeben oder 80000 Zellen/Well in 6-Well-Platten für Versuche ausgesät. Für immunzytochemische Färbungen wurden die Zellen auf Glas-Deckgläschen in 6-Well-Platten ausgesät.

7.2.19.2 Transfektion

COS-7-Zellen wurden mit FuGENE® 6 (Verhältnis DNA zu FuGENE® 6 1:3) und C2C12 mit Lipofectamine® und PLUS™ Reagenz entsprechend der Herstellerangaben transfiziert.

7.2.19.3 Immunzytochemische Färbung

Auf Deckgläschen gewachsene und transfizierte Zellen wurden für 15 min in 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, zwei Mal für 20 min mit 0,2 % Triton™ X-100 in PBS permeabilisiert, unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in 3 % BSA in PBST für 1 h blockiert und die Zellen dann mit dem die FLAG-Markierung bindenden Antikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden ungebundene primäre Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBST entfernt. Der Fluorochrom-markierte sekundäre Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 488 wurde für 1 h auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden die Zellen mit ProLong® Gold antifade reagent (mit DAPI zur Anfärbung der Nuclei) eingedeckt. Aufnahmen der gefärbten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop CTR 6500 HS und der Digitalkamera DFC 360 FX angefertigt und mit dem Programm Leica Application Suite 2.5.0.6735 Software analysiert.

7.2.20 Statistik

Alle Messwerte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler in den Diagrammen dargestellt. Die Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel 2003. Morphologische, physiologische und biochemische Unterschiede zwischen DKO- und Kontrollmäusen wurden mit dem zweiseitigen Student *t*-Test oder dem Mann-Whitney-*U*-Test (falls die Werte nicht normal verteilt oder die Varianzen in den zu vergleichenden Gruppen unterschiedlich groß sind) auf signifikante Unterschiede mittels SigmaPlot 11.0 analysiert. Ein *p*-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. In den Abbildungen ist $p < 0,05$ mit einem Stern, $p < 0,01$ mit zwei Sternen und $p < 0,001$ mit drei Sternen gekennzeichnet.

8. Ergebnisse

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die phänotypische Beschreibung der MuRF2/3-DKO-Mäuse. Hierzu wurden zuerst allgemeine Merkmale, wie das Verhalten, das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung untersucht. Danach erfolgte eine genauere Analyse der Skelettmuskulatur und des Herzens im Hinblick auf morphologische und funktionelle Veränderungen. Anschließend wurden Muskellysate massenspektrometrisch analysiert und die zelluläre Lokalisation der als angereichert identifizierten Proteine sowie deren mögliche Interaktion mit MuRF2 oder MuRF3 in Zellkulturversuchen ermittelt.

8.1 Allgemeine Merkmale der MuRF2- und MuRF3-DKO-Mäuse

8.1.1 Generierung der MuRF2/3-DKO-Mäuse

Die Kreuzung der MuRF2- mit den MuRF3-KO-Mäusen ergab die heterozygote erste Filialgeneration. Diese wurde zur Züchtung der MuRF2- und MuRF3-DKO-Mäuse und deren Geschwistern, die als Kontrolltiere dienen, eingesetzt (Abbildung 19).

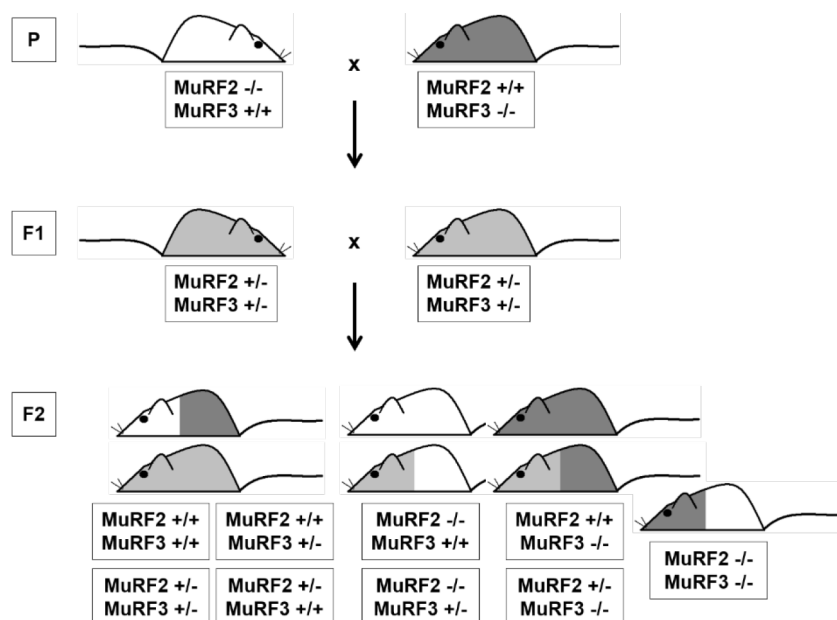


Abbildung 19: Kreuzungsschema. Die Kreuzung der Einzelknockout-Mäuse (Parentalgeneration, P) für MuRF2 (MuRF2^{-/-}, MuRF3^{+/+}) und MuRF3 (MuRF2^{+/+}, MuRF3^{-/-}) ergab die MuRF2/MuRF3-heterozygote (+/-, +/-) erste Tochtergeneration (Filialgeneration, F1). Die Verpaarung der F1-Tiere lieferte entsprechend der 3. Mendelschen Regel sämtliche möglichen Genotypen in der zweiten Filialgeneration (F2).

Im Anschluss an die Zucht der Tiere erfolgte die Geno- und Phänotypisierung. Der Genotyp wurde durch die PCR und anschließende Auftrennung der spezifischen PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Dazu wurden die vier verschiedenen PCR-Ansätze unter Verwendung spezifischer Primer für MuRF2-Wildtyp (WT), MuRF2-KO, MuRF3-WT oder MuRF3-KO analysiert. Heterozygote Kontrolltiere zeigten ein PCR-Produkt in der WT- und KO-PCR, Einzel- und DKO-Tiere hingegen nur das Produkt der jeweiligen KO-PCR (Abbildung 20). Die verschiedenen Genotypen traten den Mendelschen Regeln entsprechend auf (Daten nicht gezeigt).

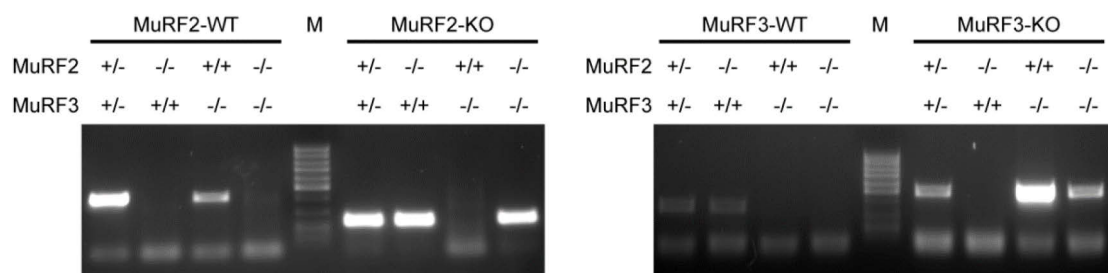


Abbildung 20: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zur Bestimmung des Genotyps. Die vier verschiedenen PCR-Ansätze MuRF2-Wildtyp (WT, 410 bp), MuRF2-Knockout (KO, 250 bp), MuRF3-WT (350 bp) und MuRF3-KO (480 bp) wurden zur Bestimmung des Genotyps analysiert. Repräsentative Analyse von je einem heterozygoten, einem MuRF2-KO-, einem MuRF3-KO- und einem DKO-Tier. Der 100 bp DNA-Marker (M) diente zur Abschätzung der Größe der PCR-Produkte. Primerdimere sind als Bande unterhalb der spezifischen Bande erkennbar.

8.1.2 Makroskopische Auffälligkeiten und Analyse des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung

Hinsichtlich des Phänotyps zeigten die DKO-Mäuse keine auffälligen äußeren Merkmale oder Verhaltensweisen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung wurden bestimmt, um herauszufinden, ob in den DKO-Mäusen den gesamten Organismus betreffende Veränderungen auftraten. Die Analyse des Körpergewichts von 7 bis 22 Wochen alten Mäusen ergab eine signifikante Reduktion des Gewichts um 11,9 % bei den DKO-Männchen im Vergleich zu den heterozygoten Kontrolltieren (25,2 g bzw. 28,6 g, $p < 0,001$). Die Weibchen hingegen wiesen kein unterschiedliches Körpergewicht auf (Kontrolltiere 20,8 g, DKO-Tieren 20,2 g, Abbildung 21 A-C). Mittels Kernspinresonanzspektroskopie wurde der prozentuale Anteil an Fett, freiem Wasser und fettfreier Muskelmasse von 21 Wochen alten Mäusen bestimmt. Bei den Männchen (8 Kontrolltiere, 4 DKO) verringerte sich der Fettanteil bei den DKO-Mäusen um 2,36 % (von 17,80 % auf 15,44 %, $p = 0,028$) und die fettfreie Muskelmasse stieg um 2,38 % (von 73,07 % auf 75,45 %, $p = 0,048$,

Abbildung 21 D). Der Wassergehalt blieb unverändert. Die Weibchen (3 Kontrolltiere, 4 DKO) zeigten keinen Unterschied der Körperzusammensetzung (Daten nicht gezeigt).

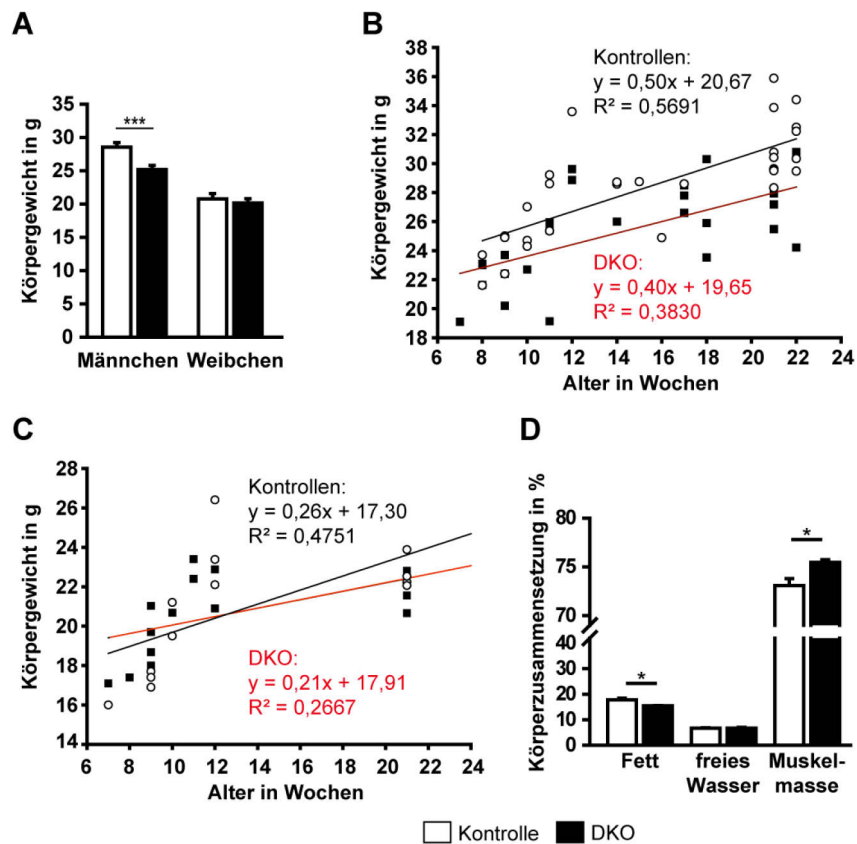


Abbildung 21: Analyse des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung. (A) Das Körpergewicht von 7 bis 21 Wochen alten Mäusen wurde bestimmt und die Mittelwerte berechnet. Männchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 30$, $n_{\text{DKO}} = 26$, Weibchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 14$, $n_{\text{DKO}} = 15$. **(B)** Einzelwerte der Körpergewichtsbestimmung der Männchen in Abhängigkeit vom Alter. $n_{\text{Kontrolle}} = 30$, $n_{\text{DKO}} = 26$. **(C)** Einzelwerte der Körpergewichtsbestimmung der Weibchen in Abhängigkeit vom Alter. $n_{\text{Kontrolle}} = 13$, $n_{\text{DKO}} = 14$. **(D)** Die Körperzusammensetzung von 21 Wochen alten männlichen Mäusen wurde analysiert (Kernspinresonanzspektroskopie-Plattform des MDC). $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{DKO}} = 4$.

8.2 Charakteristika der Skelettmuskulatur von MuRF2/3-DKO-Mäusen

Die Deletion der E3-Ligasen MuRF2 und MuRF3 könnte aufgrund fehlender Ubiquitinierung ihrer Substratproteine zu deren verringerter proteasomaler Degradation führen. Die Anreicherung dieser Proteine könnte wiederum eine Zunahme des Organgewichts bedingen. Aus diesem Grund haben wir in den MuRF2/3-DKO-Mäusen eine Hypertrophie der Herz- und Skelettmuskulatur erwartet, wie es bereits bei den MuRF1/2- und MuRF1/3-DKO-Mäusen gezeigt wurde.^{161,191,208}

8.2.1 Western Blot Analyse der Skelettmuskulatur

Die Auswirkungen des MuRF2/3-DKO auf die Skelettmuskulatur wurde anhand der vier Muskeln *M. soleus*, *M. extensor digitorum longus*, *M. gastrocnemius-plantaris* und *M. tibialis anterior* untersucht (siehe Einleitung Abbildung 5). Die Analyse aller vier Muskeln wurde durchgeführt, um Effekte, die nicht gleichermaßen in allen Muskeln auftreten, nachweisen zu können.

Western Blot-Analysen bestätigten, dass der KO des MuRF2- oder MuRF3-Gens zum Verlust des jeweiligen Proteins in allen vier untersuchten Skelettmuskeln führte. So konnte in den Muskellysaten heterozygoter Kontrolltiere beide Proteine, in denen von MuRF3-KO-Tieren nur MuRF2, bei MuRF2-KO-Tieren nur MuRF3 und bei DKO-Tieren keines der beiden Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 22).

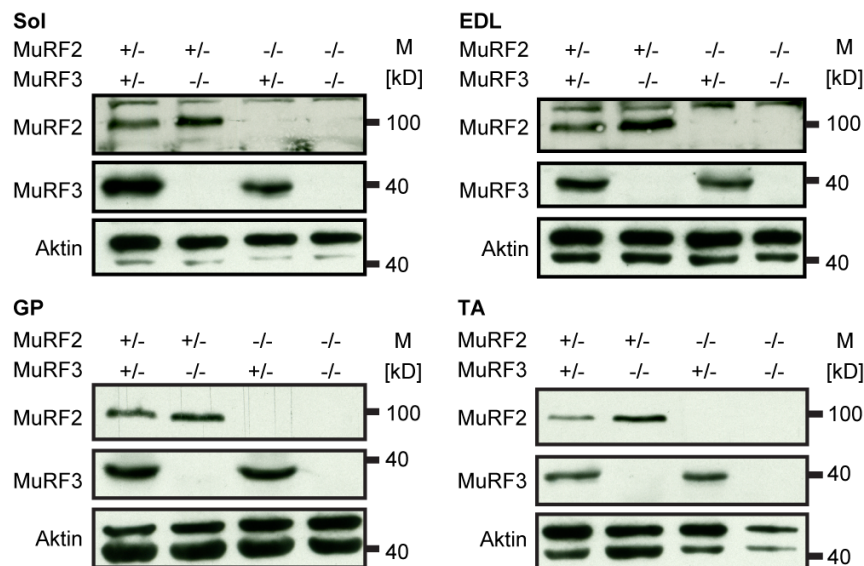


Abbildung 22: Western Blot Analyse zur Bestätigung des Knockouts. Proteine aus den vier Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol), *M. extensor digitorum longus* (EDL), *M. gastrocnemius-plantaris* (GP) und *M. tibialis anterior* (TA) wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit den spezifischen Antikörpern, wie angezeigt, detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Der Proteinmarker (M) PageRuler prestained diente zur Abschätzung der Proteingröße.

8.2.2 Analyse der MuRF1-Expression in der Skelettmuskulatur

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der MuRF-Proteine und der sich überschneidenden Substratspezifität ist von einer zumindest teilweisen Redundanz dieser E3-Ligasen auszugehen.^{186,189,191,194} Es wurde deshalb analysiert, ob MuRF1 in den DKO-Tieren

verstärkt exprimiert wurde, um dadurch den Verlust von MuRF2 und MuRF3 zu kompensieren. Die mRNA-Expression von *Trim63*, welches für MuRF1 kodiert, war sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen unverändert. Da nicht auszuschließen ist, dass es auch bei einer unveränderten Genexpression zu einer veränderten Proteinexpression kommen kann, wurden Muskellysate des *M. gastrocnemius-plantaris* stellvertretend für die Skelettmuskulatur auf den Gehalt von MuRF1 untersucht. Die MuRF1-Proteinexpression war weder in den Einzelknockout-Tieren noch in DKO-Mäusen verändert (Abbildung 23).

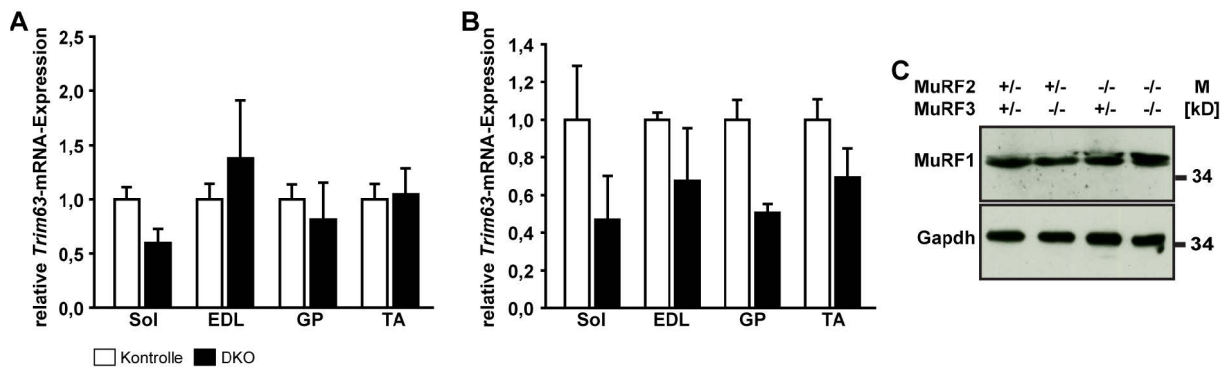


Abbildung 23: MuRF1 mRNA- und Proteinexpression. (A + B) Aus den vier Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol), *M. extensor digitorum longus* (EDL), *M. gastrocnemius-plantaris* (GP) und *M. tibialis anterior* (TA) wurde die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und der Gehalt an *Trim63*-mRNA (kodiert für MuRF1-Protein) mit spezifischen Primern in einer real-time PCR nach der SYBR® Green-Methode bestimmt. (A) Männchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 8 - 9$, $n_{\text{DKO}} = 4 - 6$, (B) Weibchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 4 - 5$, $n_{\text{DKO}} = 2 - 4$. (C) Western Blot Analyse der MuRF1-Proteinexpression in Gewebelysaten des *M. gastrocnemius-plantaris*. Die Proteine wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Gapdh diente als Ladekontrolle. Der Proteinmarker (M) PageRuler prestained diente zur Abschätzung der Proteingröße.

8.2.3 Gewichtsbestimmung der Skelettmuskeln

Die Bestimmung der Gewichte der einzelnen Skelettmuskeln sollte zeigen, ob es in den DKO-Mäusen zu einer Hypertrophie der Muskeln kam. Die Muskelgewichte von 7 bis 22 Wochen alten Mäusen (Männchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 30$, $n_{\text{DKO}} = 26$, Weibchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 14$, $n_{\text{DKO}} = 15$) wurden direkt nach der Entnahme bestimmt. Sie wurden auf die Länge der Tibia normalisiert. Die untersuchten Skelettmuskeln wiesen keine Gewichtsunterschiede auf, weder bei den Männchen noch bei den Weibchen (Abbildung 24).

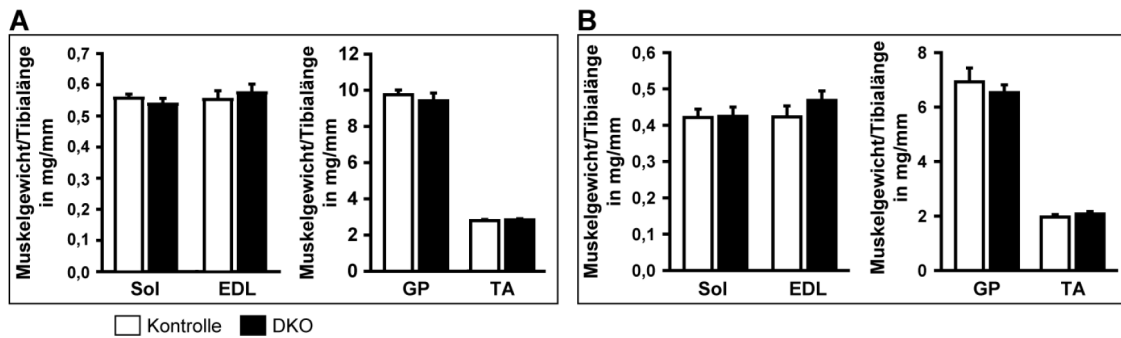


Abbildung 24: Analyse der Skelettmuskelgewichte. (A+B) Das Gewicht der vier Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol), *M. extensor digitorum longus* (EDL), *M. gastrocnemius-plantaris* (GP) und *M. tibialis anterior* (TA) von 7 bis 22 Wochen alten Mäusen wurde bestimmt. **(A)** Männchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 30$, $n_{\text{DKO}} = 26$, **(B)** Weibchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 14$, $n_{\text{DKO}} = 15$. Die Gewichte wurden auf die Länge der Tibia normalisiert.

8.2.4 Histologische Analysen der Skelettmuskulatur

Gefrierschnitte der Skelettmuskeln von Kontroll- und DKO-Mäusen wurden angefertigt und mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt, um einen allgemeinen Überblick über die Morphologie der Muskeln zu erhalten. Die histologische Analyse dieser Muskelpräparate zeigte für die Kontrolltiere eine typische Skelettmuskelmorphologie, das heißt, das Gewebe bestand aus Muskelfasern, die im Querschnitt die Myofibrillen als punktförmiges Muster (*M. soleus*, *M. extensor digitorum longus*, *M. gastrocnemius-plantaris*) und im Längsschnitt zum Teil ein Streifenmuster (*M. tibialis anterior*) erkennen ließen und randständige Zellkerne besaßen.²³⁶ In den histologischen Präparaten der DKO-Mäuse waren mehrere Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen zu verzeichnen. Am auffälligsten war, dass ein Teil der Muskelfasern Material enthielt, das eine vom normalen Gewebe abweichende Textur erkennen ließ und sich um einen zentralen Bereich der Zellen abgelagerte (Pfeile in Abbildung 25). Es traten Muskelfasern mit zentral gelegenen Zellkernen (Pfeilspitzen in Abbildung 25) auf. Zusätzlich wurde eine größere Variabilität der Querschnittsflächen der einzelnen Fasern innerhalb eines Muskels beobachtet (Abbildung 25). Das heißt, in den Muskeln der DKO-Mäuse gab es Muskelfasern mit größeren und mit kleineren Querschnittsflächen verglichen mit den Querschnittsflächen der Muskelfasern der Kontrollen.

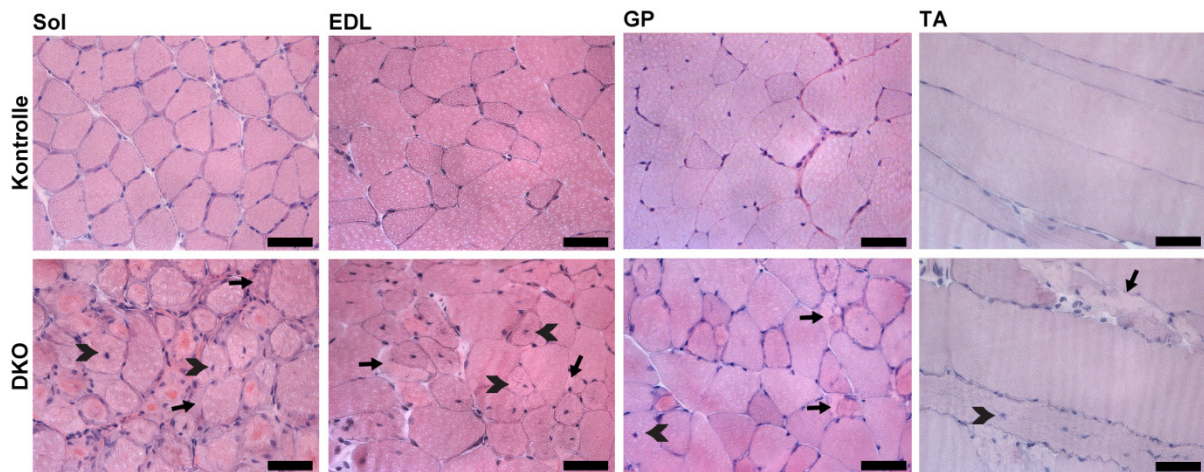


Abbildung 25: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Skelettmuskeln. Hämatoxylin-Eosin gefärbte Gefrierschnitte der vier Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol), *M. extensor digitorum longus* (EDL), *M. gastrocnemius-plantaris* (GP) und *M. tibialis anterior* (TA). Aggregate (Pfeile) und zentral gelegene Nuclei (Pfeilspitzen) wurden detektiert. Messbalken = 50 μ m.

Für die nähere Analyse dieser Beobachtungen wurden die beiden Muskeln *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* verwendet, da sie die stärksten Veränderungen zeigten. Es wurde analysiert, wie viele Muskelfasern zentral oder randständig gelegene Zellkerne aufwiesen und der prozentuale Anteil an Zellen mit zentralen Nuclei wurde berechnet. Dazu wurden für den *M. soleus* histologische Schnitte von 13 Kontroll- und 8 DKO-Tieren (80 - 230 Zellen/Tier) und für den *M. extensor digitorum longus* von 12 Kontroll- und 7 DKO-Tieren (75 - 270 Zellen/Tier) verwendet. Der Anteil an Fasern mit zentral gelegenen Zellkernen stieg im *M. soleus* von 2 % auf 10,4 % ($p = 0,003$) und im *M. extensor digitorum longus* von 0,8 % auf 18,6 % ($p < 0,001$, Abbildung 26).

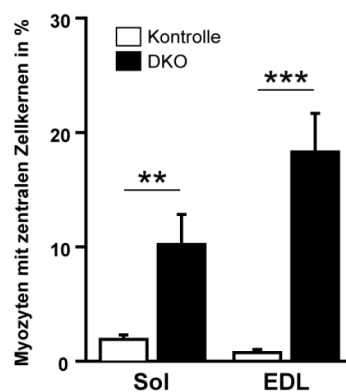


Abbildung 26: Bestimmung der Zellkernlokalisation. In den Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gefrierschnitten der Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) wurde analysiert, wie viele Muskelfasern randständig und wie viele zentral gelegene Nuclei aufwiesen. Der prozentuale Anteil der zentralisierten Kerne wurde berechnet. Sol: $n_{\text{Kontrolle}} = 13$, $n_{\text{DKO}} = 8$, EDL: $n_{\text{Kontrolle}} = 12$, $n_{\text{DKO}} = 7$.

Atrophie oder Hypertrophie der Skelettmuskeln wird unter anderem durch die Querschnittfläche der einzelnen Muskelfasern definiert. Um zu überprüfen, ob diese in den Muskelfasern der DKO-Mäusen verändert war, wurde sie in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gefrierschnitten vom *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* von je 7 Kontroll- und 7 DKO-Tieren (*M. soleus*: 120-500 Zellen/Tier, *M. extensor digitorum longus*: 100-450 Zellen/Tier) bestimmt. Der prozentuale Anteil der Muskelfasern einer definierten Größe wurde gegen die Querschnittfläche aufgetragen (in 400 μm^2 -Schritten). Im *M. soleus* der Kontrolltiere hatten 87,5 % der Fasern eine Querschnittfläche im Bereich von 800 bis 2399 μm^2 , nur 1,8 % waren kleiner und 10,7 % größer. Im *M. soleus* der DKO-Tiere verringerte sich der Anteil an Zellen mit einer Fläche von 1200 bis 1999 μm^2 , dafür erhöhte sich sowohl der Prozentsatz an Muskelfasern, die kleiner als 1200 μm^2 waren, als auch der Anteil mit einer Fläche von 2000 μm^2 und größer. Da es also mehr kleinere und größere Zellen gab, blieb der Mittelwert der Querschnittflächen aller Muskelfasern unverändert (Kontrollen: 1684 μm^2 , DKO: 1683 μm^2). Im *M. extensor digitorum longus* der Kontrollmäuse gab es nur sehr wenige Muskelfasern mit einer Querschnittfläche unter 400 μm^2 (1,6 %), dafür aber jeweils zwischen 13 und 17 % in den Größenbereichen 400-799 bis 2000-2399 μm^2 . Die Anzahl der Fasern in den höheren Größenbereichen lag zwischen 9,1 % und 0,2 % bis 4799 μm^2 . Bei den DKO-Tieren stieg der Anteil mit einer Fläche von unter 400 μm^2 auf 13,4 % und bei 400-799 μm^2 auf 24,3 %. Ab dem Bereich von 1600-1999 μm^2 lag der Prozentsatz der Muskelfasern immer unter dem der Kontrolltiere. Im *M. extensor digitorum longus* der DKO-Mäuse trat also eine Verschiebung der Querschnittfläche hin zu kleineren Flächen auf, dies spiegelte sich auch im Mittelwert der Querschnittflächen aller Muskelfasern wider, der signifikant von 1813 μm^2 auf 1280 μm^2 sank ($p = 0,039$, Abbildung 27).

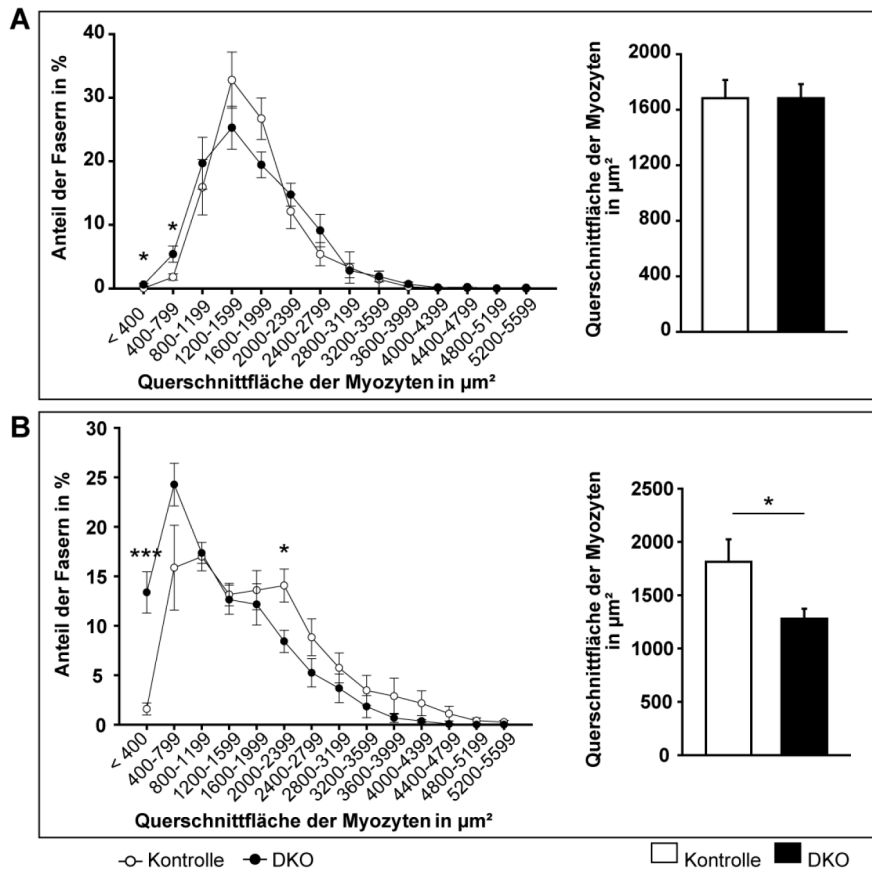


Abbildung 27: Analyse der Querschnittsflächen der Muskelfasern. (A+B) In Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gefrierschnitten der Skelettmuskeln *M. soleus* (A) und *M. extensor digitorum longus* (B) von je sieben Kontroll- und DKO-Mäusen wurden die Querschnittsflächen der einzelnen Myozyten bestimmt. Der prozentuale Anteil der Myozyten in einem Größenbereich von jeweils 400 μm^2 wurde dargestellt, ebenso der Mittelwert der Querschnittsflächen aller Myozyten.

Die Gomori-Trichrom-Färbung wurde angewandt, um zu detektieren, ob es in den Muskelfasern zur Einlagerung von Kollagen und damit zu einer Fibrose kam. Bei dieser Methode wird Kollagen türkis-grün angefärbt. In allen vier Muskeln war keine Fibrose nachweisbar. Auch mit dieser Färbung waren Ablagerungen (Pfeil in Abbildung 28) in den Muskeln der DKO-Mäuse erkennbar.

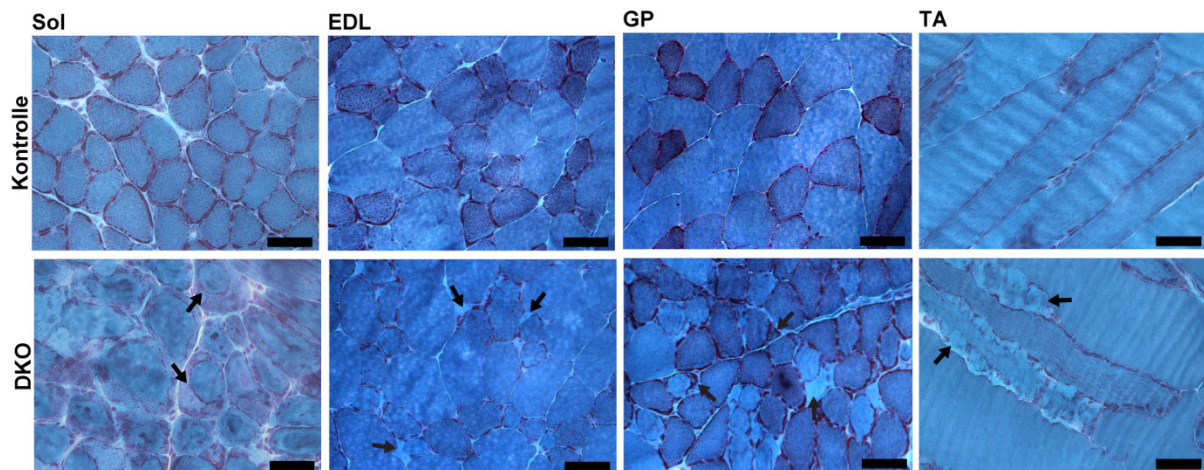


Abbildung 28: Gomori-Trichrom-Färbung. Gefrierschnitte der vier Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol), *M. extensor digitorum longus* (EDL), *M. gastrocnemius-plantaris* (GP) und *M. tibialis anterior* (TA) wurden mit der Gomori-Trichrom-Methode gefärbt. Aggregate (Pfeile) wurden in allen vier Muskeln detektiert. Messbalken = 50 μm .

Die Lokalisation der Ablagerungen sollte genauer charakterisiert werden. Dazu wurde immunhistochemisch analysiert, ob die Ablagerungen innerhalb der Muskelfasern oder im Interstitium, also im Zellzwischenraum, auftraten. Ein gegen das extrazelluläre Matrixprotein Laminin gerichteter Antikörper wurde für die Detektion der äußeren Zellbegrenzung verwendet. Das Zytoplasma wurde mittels TRITC-gekoppeltem Phalloidin, das an filamentöses Aktin bindet, sichtbar gemacht. Da die Myofibrillen fast das gesamte Zytoplasma ausfüllen und zu einem großen Anteil aus Aktinfilamenten bestehen, ist dadurch der gesamte Zellinnenraum anfärbbar. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt. In den Muskelquerschnitten der Kontrolltiere war das komplette Zytoplasma durch Phalloidin-TRITC rot eingefärbt, die Zellkerne befanden sich erwartungsgemäß an der Grenze zwischen dem Zytoplasma und der Laminin-positiven Zellbegrenzung. In den Proben der DKO-Mäuse wurde nicht in allen Myotuben der gesamte Zellinnenraum rot angefärbt, die Aggregate (Pfeile) waren ungefärbt, das heißt, filamentöses Aktin konnte dort nicht nachgewiesen werden. Außerdem konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich die Aggregate innerhalb der Muskelzellen befanden. Die meisten Zellkerne lagen an der Zellmembran, in einigen Myotuben waren jedoch auch mit dieser Methode zentral gelegene Nuclei nachweisbar. In den meisten Tieren traten im *M. soleus* deutlich mehr und größere Aggregate auf als im *M. extensor digitorum longus*, dafür waren in letzterem mehr Zellen mit zentral gelegenen Nuclei nachweisbar, die verschiedenen Muskeln reagierten also unterschiedlich auf den Verlust von MuRF2 und MuRF3 (Abbildung 29).

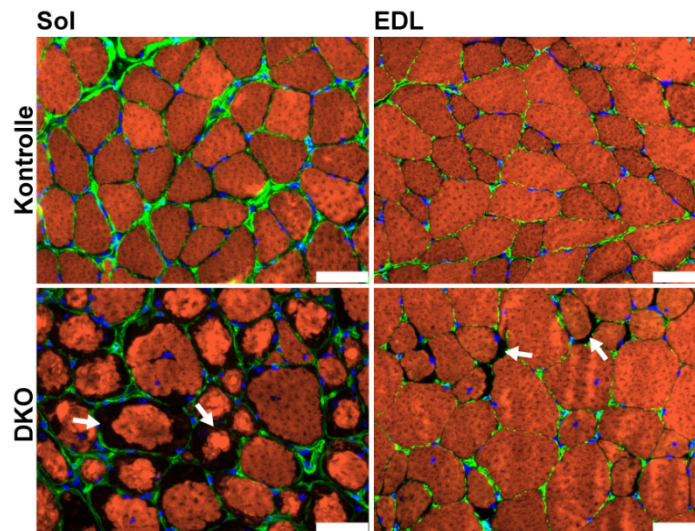


Abbildung 29: Immunhistochemische Analyse zur Bestimmung der Aggregatlokalisierung. Gefrierschnitte der Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) wurden mit einem gegen Laminin gerichteten Antikörper inkubiert. Zur Inkubationslösung mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor® 488 (grün) wurde TRITC-gekoppeltes Phalloidin (rot, bindet filamentöses Aktin) gegeben. Das Eindeckmedium ProLong® Gold antifade reagent enthielt DAPI zur Anfärbung der Zellkerne (blau). In den Präparaten der DKO-Mäuse wurden Phalloidin-TRITC-negative Bereiche (Pfeil) detektiert. Messbalken = 50 µm.

8.2.5 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Skelettmuskulatur

Muskelproben vom *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* wurden elektronenmikroskopisch analysiert (Bettina Purfürst und Mitarbeiter, Elektronenmikroskopie-Abteilung des MDC), um einen detaillierteren Einblick in die morphologischen Veränderungen zu erhalten. Die Längsschnitte der Kontrolltiere zeigten eine regelmäßige Anordnung der Sarkomere, die Z-Scheiben waren als dunkle Linien erkennbar, ebenso Mitochondrien in typischer, länglicher Gestalt (Abbildung 30 a, b). Die Muskelfasern der DKO-Tiere enthielten Bereiche, in denen ein ebenso regelmäßiges Sarkomermuster vorlag wie in denen der Kontrolltiere. Die in ihrer Morphologie normal erscheinenden Sarkomere waren von amorphen Ablagerungen umgeben (Stern). Im *M. soleus* traten auch Störungen der Z-Streifen (Pfeil) auf (Abbildung 30 c, d). Bei einigen Fasern waren die Ablagerungen nicht amorph, sondern eher filamentös. Sie umschlossen einen normal-strukturiert aussehenden Bereich und verliefen senkrecht zur Orientierung der Myofilamente der Muskelzelle (Abbildung 30 e). Einzelne Z-Scheiben mit davon ausgehenden Filamenten lagen losgelöst im amorphen Material (Abbildung 30 f). Außerdem zeigen die elektronenmikroskopischen Bilder, dass es sich bei den Aggregaten um Proteinablagerungen handelt. Dies wird verdeutlicht durch die körnige und zum Teil filamentöse Struktur der Aggregate. Lipide hingegen würden durch das Osmiumtetroxid schwarz angefärbt werden.

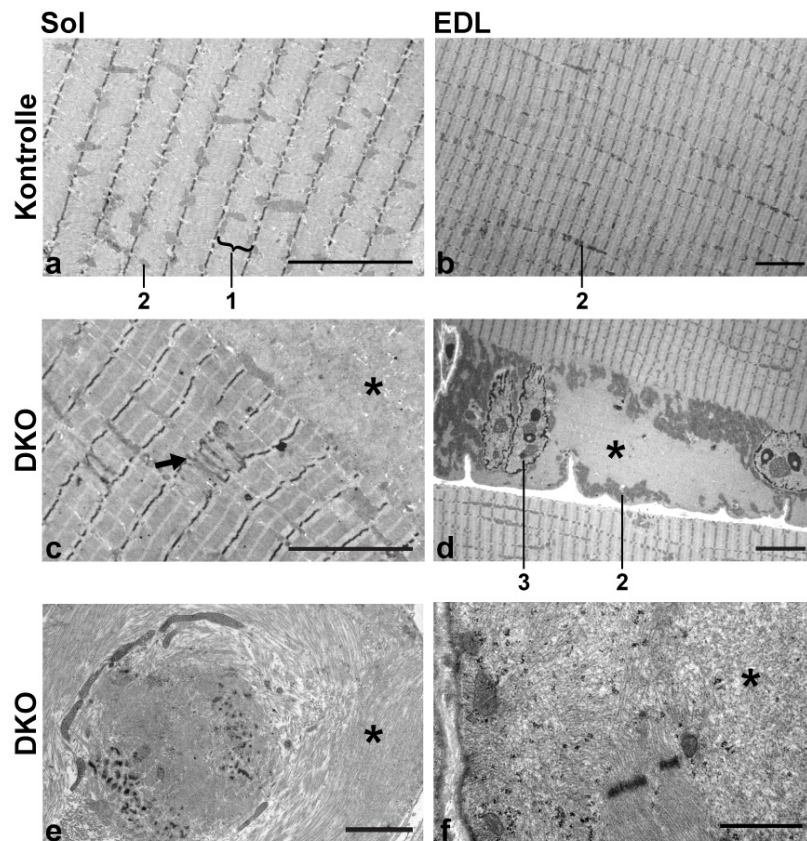


Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Skelettmuskulatur. Es wurden 60 nm dicke Schnitte der Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) angefertigt und auf morphologische Unterschiede zwischen Kontroll- (a, b) und DKO-Mäusen (c-f) analysiert. Sarkomere (1), Mitochondrien (2), Zellkerne (3), anormale Z-Streifen (Pfeil) und Aggregate (Stern) waren erkennbar. Messbalken = 5 μm (a-d), 2 μm (e, f). In Zusammenarbeit mit der Elektronenmikroskopie-Abteilung des MDC.

8.2.6 Prozentuale Zusammensetzung der Muskelfasertypen der Skelettmuskeln

Um weitere Hinweise auf die Zusammensetzung der Aggregate zu erhalten, wurde die ATPase-Färbung durchgeführt. Diese Methode nutzt die unterschiedliche ATPase-Aktivität der verschiedenen Myosinisoformen aus. Langsam kontrahierende Muskelfasern mit MyHC-β/slow werden dunkelblau eingefärbt. Schnell kontrahierende Fasern, die eine oder zwei MyHC-2-Isoformen enthalten können, werden hellblau angefärbt. Erwartungsgemäß waren in den Schnitten der Kontrolltiere im *M. soleus* Fasern mit unterschiedlicher ATPase-Aktivität nachweisbar und im *M. extensor digitorum longus* nur schnell kontrahierende Fasern mit hoher ATPase-Aktivität. Im *M. soleus* der DKO-Tiere zeigten sich Aggregate sowohl in den schnell (schwarze Pfeile in Abbildung 31 A) als auch in den langsam kontrahierenden Fasern (weiße Pfeile). Außerdem kam es bei den Präparaten vieler DKO-Tiere zu einem veränderten Färbeverhalten, der dunkelblaue Farbton sah leicht grünlich und der hellblaue etwas dunkler

aus als in den Schnitten der Kontrolltiere. Der *M. extensor digitorum longus* zeigte eine weitere Veränderung, hier traten langsam kontrahierende Fasern mit geringer ATPase-Aktivität auf (Pfeile in Abbildung 31 A), die in den Kontrolltieren nicht vorkamen.

Gewebelysate vom *M. extensor digitorum longus* wurden mittels Western Blot auf das Vorhandensein von MyHC- β /slow untersucht, um zu bestätigen, dass das Auftreten der dunkelblau gefärbten Fasern tatsächlich auf einem veränderten Myosin Gehalt beruht. Die Proteine der Muskellysate wurden in eine lösliche (Überstand) und eine unlösliche (Pellet) Fraktion getrennt. Beide wurden für die Western Blot Analyse eingesetzt, um sowohl das in noch nicht aufgelösten Myofibrillen befindliche (im Pellet), als auch das bereits herausgelöste MyHC- β /slow (im Überstand) nachweisen zu können. Sowohl im Überstand als auch im Pellet der Gewebelysate von DKO-Mäusen konnte MyHC- β /slow detektiert werden, in den Fraktionen der Kontrolltiere hingegen nicht. Eine veränderte Expression von Gesamt-MyHC-2 war in den Lysaten der DKO-Mäuse nicht nachweisbar (Abbildung 31 B). Die Abwesenheit von MuRF2 und MuRF3 führte folglich zur Expression von MyHC- β /slow im *M. extensor digitorum longus* und damit zu einer veränderten Fasertypzusammensetzung dieses Muskels.

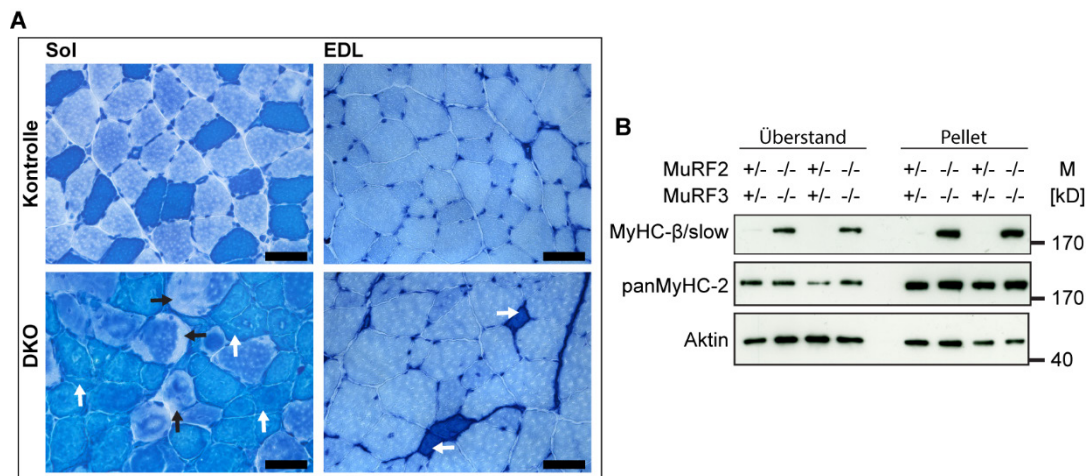


Abbildung 31: Analyse der Aggregatlokalisierung anhand der ATPase-Färbung und Detektion von MyHC- β /slow im *M. extensor digitorum longus*. (A) Die ATPase-Färbung wurde angewandt, um in Gefrierschnitten der Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) die verschiedenen Fasertypen anhand unterschiedlicher Blautöne zu erkennen. MyHC- β /slow enthaltende Fasern waren dunkelblau, die MyHC-2-Isoformen enthaltenden Fasern hellblau. Im *M. soleus* wurden Aggregate in langsam kontrahierenden (weiße Pfeile) und in schnell kontrahierenden (schwarze Pfeile) Muskelfasern nachgewiesen. Im *M. extensor digitorum longus* traten in den DKO-Mäusen dunkelblaue Fasern auf (Pfeile). Messbalken = 50 μ m. **(B)** Western Blot Analyse von Muskellysaten aus dem *M. extensor digitorum longus* von zwei Kontroll- und zwei DKO-Mäusen. Die lösliche (Überstand) und die unlösliche (Pellet) Fraktion der isolierten Proteine wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Der Proteinmarker (M) PageRuler prestained diente zur Abschätzung der Proteingröße.

Serielle Gewebeschnitte vom *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* wurden immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper gegen MyHC- β /slow bzw. einem gegen alle MyHC-2-Isoformen (panMyHC-2) gefärbt, um eine Veränderung der Fasertypzusammensetzung besser beurteilen zu können. Auch hier waren im *M. soleus* der Kontrollmäuse Fasern sichtbar, die MyHC- β /slow enthielten und Zellen, die MyHC-2 aufwiesen, im *M. extensor digitorum longus* hingegen traten erwartungsgemäß nur MyHC-2 enthaltende Fasern auf. In den *M. soleus*-Proben der DKO-Mäuse war auffällig, dass sich die Aggregate mit dem gleichen Antikörper anfärbten wie die jeweiligen Muskelzellen (Pfeil). In den Aggregaten befand sich also Myosin. Es handelte sich hierbei jeweils um dieselbe Myosinisoform, die auch in den Myofibrillen der entsprechenden Faser enthalten war. In den Querschnitten des *M. extensor digitorum longus* waren Muskelfasern nachweisbar, die sich nicht mit dem Antikörper gegen Gesamt-MyHC-2, aber mit dem gegen MyHC- β /slow anfärben ließen. Dies bestätigte die in der ATPase-Färbung und im Western Blot erhaltenen Ergebnisse einer Veränderung der Fasertypzusammensetzung in den Skelettmuskeln der DKO-Tiere (Abbildung 32).

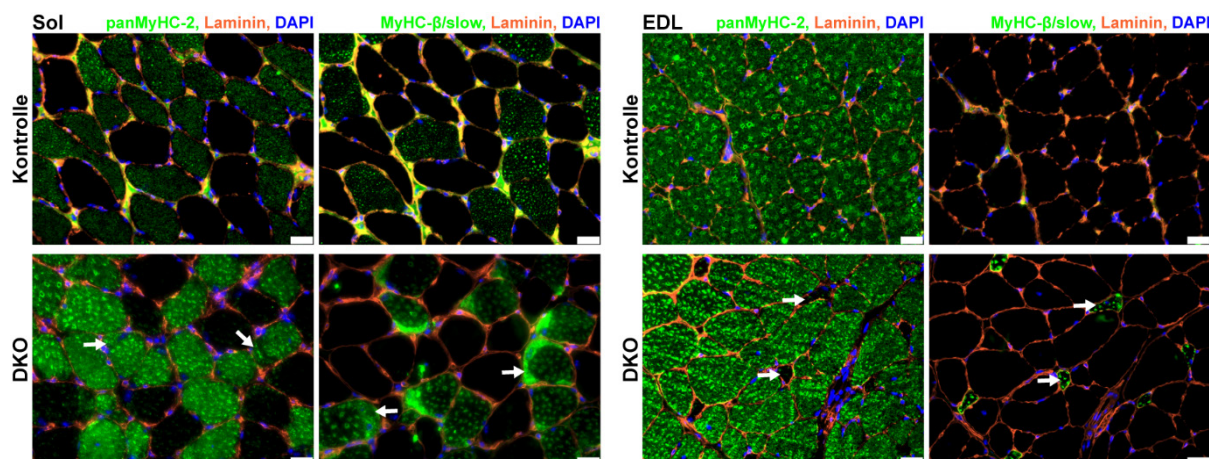


Abbildung 32: Immunhistochemische Analyse der Fasertypzusammensetzung in den Skelettmuskeln *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus*. Serielle Gefrierschnitte der Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) wurden mit Antikörpern gegen panMyHC-2 bzw. MyHC- β /slow und Laminin inkubiert. Die sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus IgG-Alexa Fluor® 488 (grün, MyHC) und Ziege-anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor® 555 (rot, Laminin) wurden zur Detektion der Primärantikörper eingesetzt. Das Eindeckmedium ProLong® Gold antifade reagent enthielt DAPI zur Anfärbung der Zellkerne (blau). Im *M. soleus* der DKO-Mäuse wurden Aggregate nachgewiesen, die das jeweils gleiche Myosin wie die dazugehörige Muskelfaser enthielten (Pfeil). Im *M. extensor digitorum longus* der DKO-Tiere traten panMyHC-2-negative, MyHC- β /slow-positive Fasern auf (Pfeil). Messbalken = 25 μ m.

Für die Quantifizierung dieser Veränderung wurden in beiden Färbungen vom *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* von 8 bzw. 10 Kontrolltieren und 7 bzw. 8 DKO-Tieren (160 - 940 Zellen/Tier) die Muskelfasern entsprechend ihrer immunhistochemischen Färbung ausgezählt. Anschließend wurde der Anteil an Zellen, die nur MyHC- β /slow, nur MyHC-2 oder MyHC-

β /slow und MyHC-2 (intermediäre Fasern) enthielten, berechnet. Im *M. soleus* blieb der Anteil der MyHC- β /slow enthaltenden Fasern unverändert (Kontrollen 30,4 %, DKO 35,2 %, $p = 0,232$), der Anteil an nur MyHC-2 enthaltenden Zellen sank von 67,5 auf 56,7 % ($p = 0,014$) und der Anteil an intermediären Fasern stieg von 2,2 auf 8,1 % ($p = 0,008$). Im *M. extensor digitorum longus* nahm der Anteil MyHC- β /slow enthaltender Muskelfasern von 0,7 auf 6,4 % zu ($p < 0,001$) und der MyHC-2 enthaltender von 99,3 auf 93,6 % ab ($p < 0,001$, Abbildung 33). Der Verlust von MuRF2 und MuRF3 führte demnach in beiden Muskeln zu einer veränderten Fasertypzusammensetzung, es traten mehr MyHC- β /slow enthaltende und weniger MyHC-2 enthaltende Muskelfasern auf.

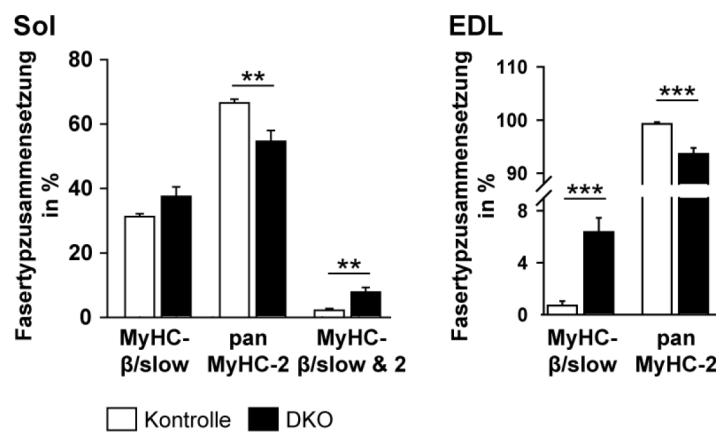


Abbildung 33: Quantifizierung der Fasertypzusammensetzung. Der Anteil der MyHC- β /slow, panMyHC-2 oder MyHC- β /slow und panMyHC-2 enthaltenden Muskelfasern im *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) wurde anhand der ATPase- und der immunhistochemischen Färbungen ermittelt. *M. soleus*: $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{DKO}} = 7$, *M. extensor digitorum longus*: $n_{\text{Kontrolle}} = 10$, $n_{\text{DKO}} = 8$.

8.2.7 Genexpression der Myosinisoformen in der Skelettmuskulatur

Die Untersuchung der mRNA-Expression der verschiedenen Myosinisoformen mittels real-time PCR sollte Aufschluss darüber geben, ob der veränderte Myosin-Proteingehalt auf Veränderungen der Myosin-Genexpression beruht. In allen vier Muskeln wurden die fünf Myosinisoformen MyHC- β /slow, kodiert durch *Myh7*, MyHC-2a, kodiert durch *Myh2*, MyHC-2b, kodiert durch *Myh4*, MyHC-2d/x, kodiert durch *Myh1* und embryonales MyHC, kodiert durch *Myh3*, analysiert.

Bei den DKO-Männchen war die mRNA-Expression von *Myh7* in allen vier untersuchten Muskeln im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (zwischen 1,3fach im *M. tibialis anterior*, $p = 0,029$ und 11,6fach im *M. extensor digitorum longus*, $p = 0,007$, Abbildung 34 A). Der erhöhte MyHC- β /slow-Proteingehalt wurde demnach wahrscheinlich bereits auf

transkriptioneller Ebene ausgelöst. Im *M. soleus* war die mRNA-Expression von *Myh2* und von *Myh1* in den DKO-Mäusen signifikant geringer (von 1 auf 0,46, $p = 0,015$ bzw. von 1 auf 0,27, $p = 0,018$), damit könnte der verringerte Proteingehalt der Gesamt-MyHC-2-Isoformen in diesem Muskel erklärt werden (siehe Fasertypzusammensetzung). Im Gegensatz dazu war die Genexpression von *Myh2* in den drei anderen Muskeln signifikant erhöht (*M. extensor digitorum longus*: 1,7fach, $p = 0,025$, *M. gastrocnemius-plantaris*: 2,8fach, $p = 0,016$, *M. tibialis anterior*: 2,5fach, $p = 0,027$) und von *Myh1* im *M. extensor digitorum longus* (1,4fach, $p = 0,025$) und im *M. gastrocnemius-plantaris* (2,3fach, $p = 0,016$), obwohl zumindest für den *M. extensor digitorum longus* auch hier ein verminderter Proteingehalt der Gesamt-MyHC-2-Isoformen bei der Fasertypzusammensetzung gezeigt wurde. Dies deutete darauf hin, dass die Veränderungen des Myosin-Proteingehalts nicht allein auf der Regulation der Myosin-mRNA-Expression beruhen. Die *Myh4*-Expression war in allen vier Muskeln unverändert. Die Expression von *Myh3* war hingegen in allen Muskeln der DKO-Mäuse deutlich höher als in den Kontrollen (zwischen 6,5fach im *M. tibialis anterior*, $p < 0,001$ und 29,1fach im *M. gastrocnemius-plantaris*, $p = 0,004$). Ein Nachweis des embryonalen Myosinproteins war jedoch weder im Western Blot noch in immunhistochemischen Färbungen möglich.

Bei den Weibchen waren *Myh7* und *Myh3* in den Muskeln der DKO-Tiere ebenfalls stärker exprimiert (*Myh7*: zwischen 1,6fach im *M. soleus* und 11,7fach im *M. extensor digitorum longus*, *Myh3*: 4,1fach im *M. tibialis anterior* und 14,4fach im *M. gastrocnemius-plantaris*), aufgrund der geringen Tieranzahl war dieser Anstieg jedoch nur für *Myh3* im *M. soleus* und *M. tibialis anterior* signifikant ($p = 0,010$ bzw. $p = 0,012$). Die Expression von *Myh1* war im *M. soleus* der DKO-Weibchen signifikant geringer als bei den Kontrollen (0,1fach, $p = 0,035$) und in den drei anderen Muskeln unverändert. Die *Myh2*-Expression war in allen vier Muskeln nicht signifikant verändert. Die Expression von *Myh4* war im *M. tibialis anterior* signifikant reduziert (0,7fach, $p = 0,037$) und in den anderen Muskeln unverändert (Abbildung 34 B).

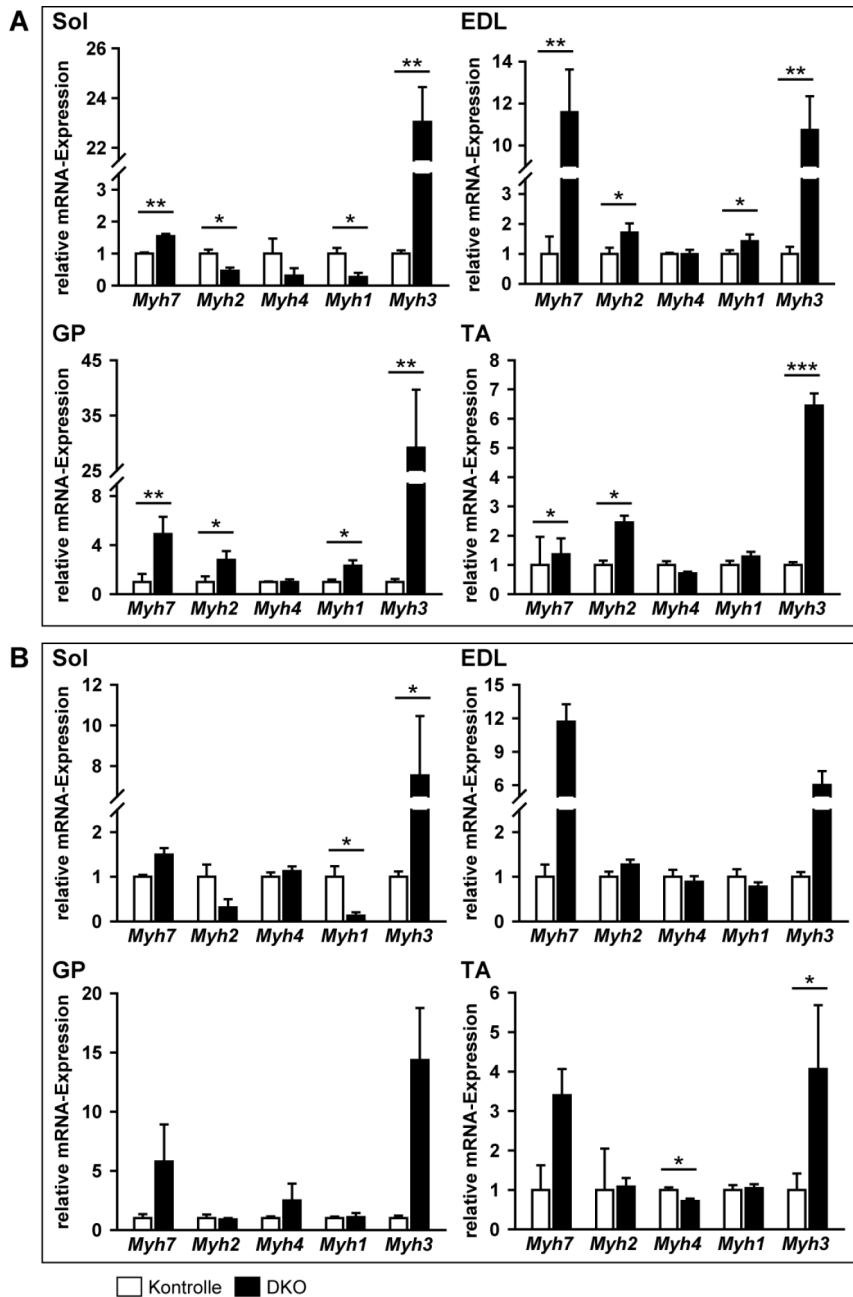


Abbildung 34: Real-time PCR-Analyse der Myosin-mRNA-Expression. (A + B) Aus den vier Skelettmuskeln *M. soleus* (Sol), *M. extensor digitorum longus* (EDL), *M. gastrocnemius-plantaris* (GP) und *M. tibialis anterior* (TA) wurde die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und der Gehalt an *Myh7*- (kodiert für MyHC- β /slow), *Myh2*- (MyHC-2a), *Myh4*- (MyHC-2b), *Myh1*- (MyHC-2d/x) und *Myh3*- (MyHC-emb) mRNA mit spezifischen Primern in einer real-time PCR nach der SYBR® Green-Methode bestimmt. **(A)** Männchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 8 - 9$, $n_{\text{DKO}} = 4 - 6$, **(B)** Weibchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 4 - 5$, $n_{\text{DKO}} = 2 - 4$.

8.2.8 Bestimmung der maximalen spezifischen Kraft des *M. soleus* und des *M. extensor digitorum longus ex vivo*

Als nächstes wurde untersucht, ob die durch die Abwesenheit von MuRF2 und MuRF3 ausgelösten strukturellen Veränderungen der Skelettmuskeln auch deren Funktion beeinträchtigen. Für die Messungen wurden die beiden Skelettmuskeln *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* verwendet. Die Kraftentwicklung der Muskeln der Kontrolltiere zeigte einen beinahe exponentiellen Kurvenverlauf, der beim *M. soleus* ab 80 Hz und beim *M. extensor digitorum longus* ab 125 Hz in eine Plateauphase überging. Die maximale spezifische Kraft betrug bei den männlichen Kontrolltieren im *M. soleus* 127,5 mN/mm² und im *M. extensor digitorum longus* 141,1 mN/mm², bei den Weibchen 148,7 mN/mm² bzw. 146,7 mN/mm². Die spezifische Kraft der DKO-Muskeln war bei fast allen Frequenzen signifikant geringer als die der Kontrolltiere. Die maximale spezifische Kraft betrug bei den Männchen 87,2 mN/mm² im *M. soleus* ($p < 0,001$) und 88,5 mN/mm² im *M. extensor digitorum longus* ($p < 0,01$) und bei den Weibchen 88,5 mN/mm² ($p < 0,001$) bzw. 104,8 mN/mm² ($p < 0,01$, Abbildung 35). Der DKO von MuRF2 und MuRF3 resultierte demnach nicht nur in strukturellen Veränderungen, sondern auch in einer um 30 bis 40 % verringerten spezifischen Kraftentwicklung.

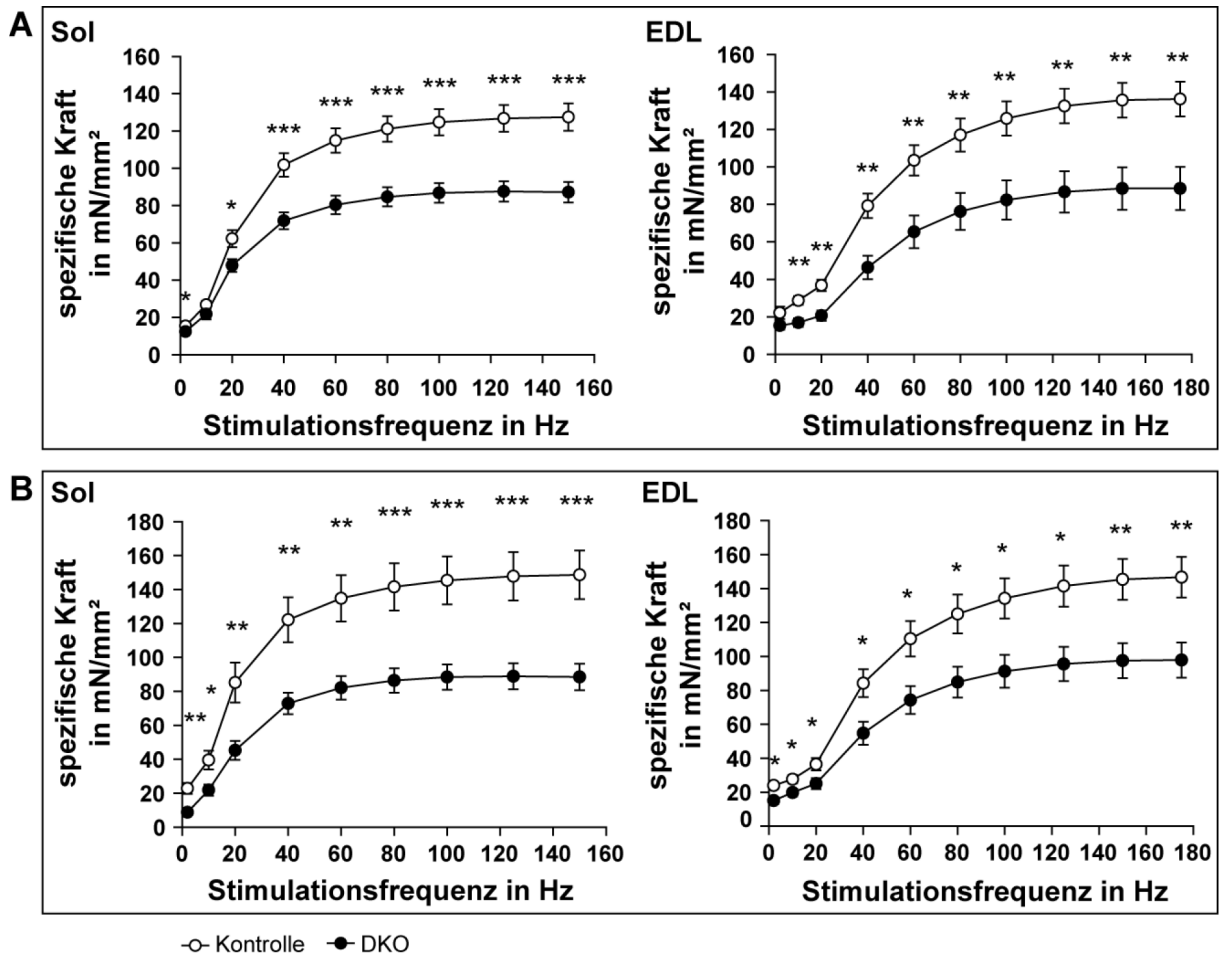


Abbildung 35: Bestimmung der spezifischen Kraft in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz. Die frisch isolierten Skelettmuskeln *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* wurden mit Stromimpulsen ansteigender Frequenz stimuliert und die Kraft der dadurch ausgelösten Kontraktionen gemessen. Die Normalisierung auf das Gewicht, die Länge und die Dichte des Muskels ergab die spezifische Kraft. **(A)** Männchen, *M. soleus* (Sol): $n_{\text{Kontrolle}} = 9$, $n_{\text{DKO}} = 12$, *M. extensor digitorum longus* (EDL): $n_{\text{Kontrolle}} = 9$, $n_{\text{DKO}} = 11$. **(B)** Weibchen, Sol: $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{DKO}} = 13$, EDL: $n_{\text{Kontrolle}} = 7$, $n_{\text{DKO}} = 11$.

8.3 Herzmuskulatur

Der Einfluss des MuRF2/MuRF3-DKOs auf die Herzstruktur und -funktionsfähigkeit wurde analysiert.

8.3.1 Western Blot Analyse des Herzens

Zunächst wurde untersucht, ob die Keimbahndeletion von *MuRF2* und/oder *MuRF3* zum Verlust des jeweiligen Proteins im Herzen führte. Erwartungsgemäß konnten in Western Blot

Analysen der Herzmuskellysate heterozygoter Kontrolltiere beide Proteine, in denen von MuRF3-KO-Tieren nur MuRF2, bei MuRF2-KO-Tieren nur MuRF3 und bei DKO-Mäusen keines der beiden Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 36).

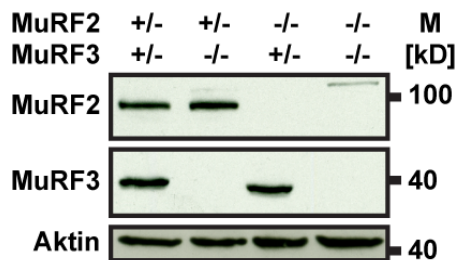


Abbildung 36: Western Blot Analyse der MuRF2- und MuRF3-Proteinexpression im Herzen. Proteine aus Herzmuskellysaten des linken Ventrikels wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit den spezifischen Antikörpern (wie angegeben) detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Der Proteinmarker (M) PageRuler prestained diente zur Abschätzung der Proteingröße.

8.3.2 Analyse der MuRF1-Expression im Herzen

Um festzustellen, ob der Verlust von MuRF2 und MuRF3 zu einer kompensatorischen Heraufregulation von MuRF1 im Herzen führt, wurde dessen mRNA-Expression analysiert. Die mRNA-Expression von *Trim63* war in den DKO-Tieren nicht signifikant verändert (Abbildung 37). Es kam demzufolge nicht zu einer kompensatorischen Steigerung der MuRF1-Genexpression im Herzen bei Abwesenheit von MuRF2 und MuRF3.

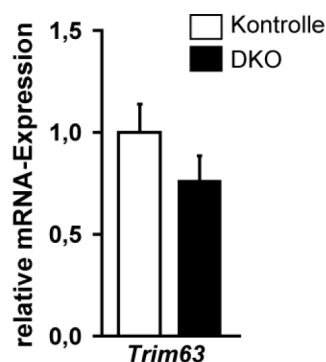


Abbildung 37: Analyse der *Trim63*-mRNA-Expression. Die RNA aus dem interventrikulären Septum des Herzens wurde isoliert, in cDNA transkribiert und der Gehalt an *Trim63*-mRNA (kodiert für MuRF1-Protein) mit spezifischen Primern in einer real-time PCR nach der SYBR® Green-Methode bestimmt. $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{DKO}} = 4$.

8.3.3 Gewichtsbestimmung des Herzens, der Lunge und der Leber

Das Herzgewicht wurde durch den Verlust von MuRF2 und MuRF3 bei beiden Geschlechtern nicht verändert. Das Lungengewicht wurde analysiert, da es bei systolischen und diastolischen Funktionsstörungen des Herzens zu einer Lungenstauung kommen kann,^{58,237} die sich in einem Anstieg des Feuchtgewichtes der Lunge äußern würde. Die männlichen Versuchstiere wiesen keinen Unterschied im Lungengewicht zwischen den verschiedenen Genotypen auf. Bei den Weibchen zeigte sich eine größere Variabilität des Lungengewichts bei den DKO-Tieren. Grobmorphologisch wurden bei einigen von ihnen eine starke Vergrößerung der Lunge und Einblutungen beobachtet, die zu einer Gewichtszunahme des Organs führten. Die Lungen der DKO-Mäuse, die diese pathologischen Veränderungen nicht aufwiesen, zeigten ein Gewicht vergleichbar dem der Kontrolltiere. Das Lebergewicht war unverändert (Abbildung 38).

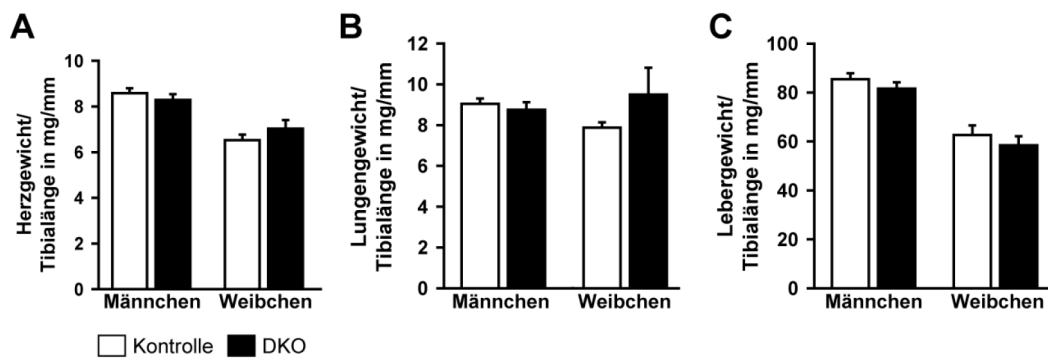


Abbildung 38: Organengewichte. Herz-, Lungen- und Lebergewicht wurden direkt nach der Entnahme bestimmt und auf die Tibialänge normalisiert. **(A)** Herzgewicht, Männchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 30$, $n_{\text{DKO}} = 26$, Weibchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 14$, $n_{\text{DKO}} = 15$. **(B)** Lungengewicht, Männchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 30$, $n_{\text{DKO}} = 26$, Weibchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 14$, $n_{\text{DKO}} = 15$. **(C)** Lebergewicht, Männchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 19$, $n_{\text{DKO}} = 19$, Weibchen: $n_{\text{Kontrolle}} = 9$, $n_{\text{DKO}} = 7$.

8.3.4 Histologische Analysen des Herzens

Längsschnitte der Herzen mit der Ansicht aller vier Kammern wurden angefertigt und mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt, um einen Überblick über die generelle Herzmorphologie zu erhalten. Es wurden keine morphologischen Unterschiede zwischen Kontroll- und DKO-Mäusen festgestellt. Auch im Querschnitt bei stärkerer Vergrößerung waren keine Veränderungen sichtbar (Abbildung 39).

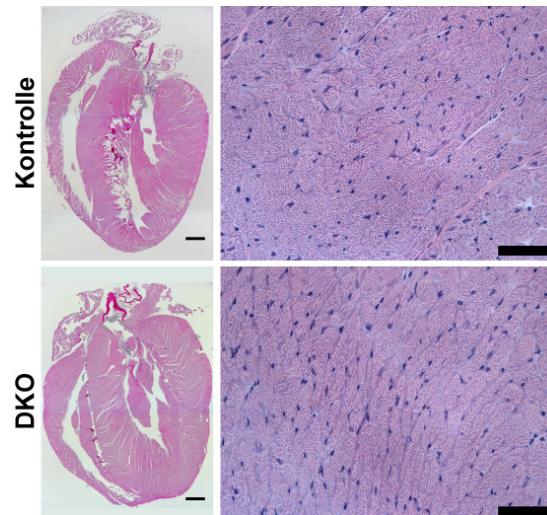


Abbildung 39: Vier-Kammer- und Detailansicht des Herzens. Vier-Kammer-Schnitte Paraffin-eingebetteter Herzen wurden nach der Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt (linke Seite der Abbildung, Messbalken = 300 μ m), ebenso Gefrierschnitte der Herzspitze (rechte Seite der Abbildung, Messbalken = 50 μ m).

Bei vielen pathologischen Umbauprozessen des Herzens kommt es u. a. zu einer interstitiellen Fibrose, das heißt, einer verstärkten Expression und Ablagerung von Kollagenen. Die mRNA-Expression von Kollagen Typ I und Typ III, welches die im Myokard vorwiegend exprimierten Kollagene sind, war in den Herzen der DKO-Mäuse unverändert. Auch die Expression des profibrotischen Faktors *Connective tissue growth factor* (*Ctgf*) war nicht signifikant verändert (Abbildung 40 A). Die Gomori-Trichrom-Färbung von Querschnitten der Herzspitze zeigte, dass es zu keiner Fibrose in den Herzen der DKO-Mäuse kam (Abbildung 40 B).

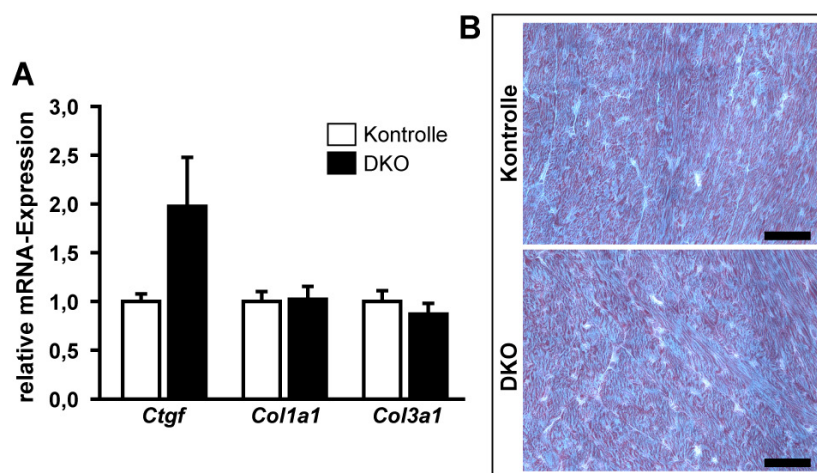


Abbildung 40: Analyse der mRNA-Expression profibrotischer Gene und Gomori-Trichrom-Färbung der Herzspitze. (A) Die RNA aus dem interventrikulären Septum des Herzens wurde isoliert, in cDNA transkribiert und der Gehalt an *Ctgf* (kodiert für *Connective tissue growth factor*), *Col1a1* (kodiert für Kollagen Typ I, alpha 1) und *Col3a1* (kodiert für Kollagen Typ III, alpha 1) mit spezifischen Primern in einer real-time PCR nach der SYBR[®] Green-Methode bestimmt. $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{DKO}} = 4$. (B) Gefrierschnitte der Herzspitze wurden nach der Gomori-Trichrom-Methode gefärbt. Messbalken = 50 μ m.

8.3.5 Genexpression der Myosinisoformen und der Stressmarker ANF und BNP im Herzen

Es wurde untersucht, ob es auch im Herzen zu einer veränderten Expression der Myosinisoformen kam. In den Herzen der DKO-Mäuse wurde eine 14,3fach ($p = 0,004$) gesteigerte Expression von *Myh7* festgestellt. Die Expression vom atrialen natriuretischen Faktor (ANF, kodiert durch *Nppa*) und vom B-Typ natriuretischen Peptid (BNP, kodiert durch *Nppb*) war hingegen nicht signifikant erhöht (Abbildung 41). Ob die gesteigerte *Myh7*-Genexpression auch zu einer vermehrten Proteinbildung, wie von MyHC- β /slow in den Skelettmuskeln, führte, ließ sich nicht nachweisen.

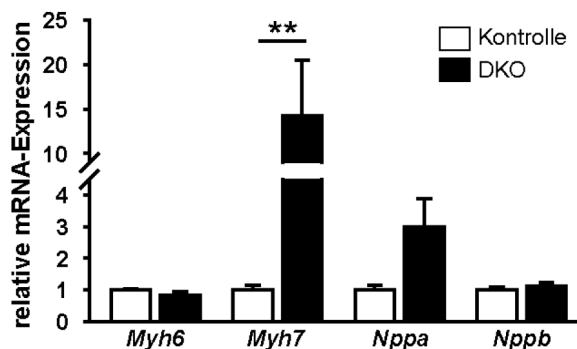


Abbildung 41: Real-time PCR-Analyse der Myosin- und Stressmarker-mRNA-Expression. Die RNA aus dem interventrikulären Septum des Herzens wurde isoliert, in cDNA transkribiert und der Gehalt an *Myh6*- (kodiert für kardiales α -Myosin), *Myh7*- (kodiert für MyHC- β /slow), *Nppa*- (kodiert für ANF) und *Nppb*- (kodiert für BNP) mRNA mit spezifischen Primern in einer real-time PCR nach der SYBR® Green-Methode bestimmt. $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{DKO}} = 4$.

8.3.6 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Herzmuskulatur

Vom interventrikulären Septum und vom rechten Ventrikel von Kontroll- und DKO-Mäusen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Bettina Purfürst und Mitarbeiter, Elektronenmikroskopie-Abteilung, MDC). Es waren in beiden Herzbereichen keine Unterschiede in der Sarkomerstruktur und der Mitochondrienmorphologie oder -anordnung zwischen den Kontroll- und den DKO-Tieren zu verzeichnen (Abbildung 42 zeigt das interventrikuläre Septum, der rechte Ventrikel wird nicht gezeigt).

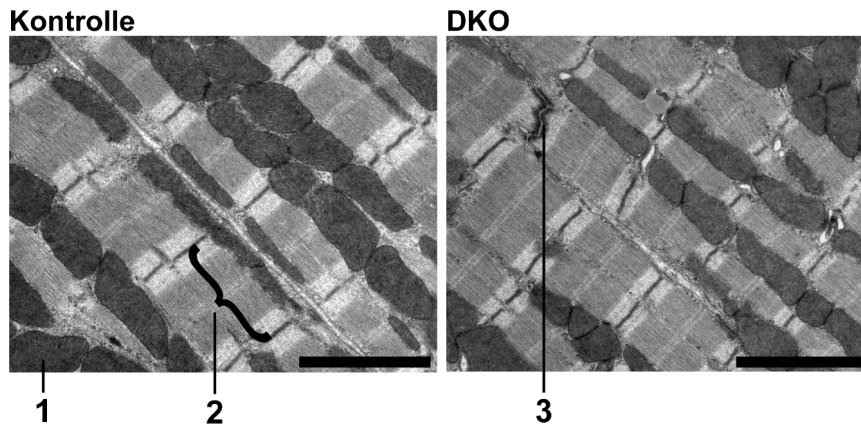


Abbildung 42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des interventrikulären Septums. Mitochondrien (1), regelmäßig strukturierte Sarkomere (2) und Glanzstreifen (3) sind in den Präparaten erkennbar. Messbalken = 2 μm . In Zusammenarbeit mit der elektronenmikroskopischen Einrichtung des MDC.

8.3.7 Echokardiographie

Die Struktur und Funktion der Herzen männlicher, acht Wochen alter Mäuse wurden echokardiographisch untersucht (Arnd Heuser und Mitarbeiter, MDC). Alle ermittelten Daten und die Signifikanzwerte sind in Tabelle 25 im Anhang aufgelistet, nur die signifikant unterschiedlichen Werte sind im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Der Durchmesser des linken Ventrikels am Endpunkt der Systole war in den DKO-Mäusen mit 3,38 mm signifikant größer als in den Kontrollen mit 2,92 mm ($p = 0,030$), die linke Herzkammer war demzufolge bei den DKO-Mäusen dilatiert. Die linksventrikuläre posteriore Wand maß in den DKO-Mäusen während der Diastole 0,61 mm und in den Kontrolltieren 0,70 mm, während der Systole 0,85 mm bzw. 1,01 mm ($p = 0,0016$ bzw. $p = 0,022$). Die verringerte Wanddicke könnte durch die Dilatation des linken Ventrikels verursacht worden sein. Die Verkürzungsfraction war in den DKO-Mäusen mit 21,74 % kleiner als in den Kontrollen mit 28,87 % ($p = 0,018$). Die DKO-Mäuse wiesen mit 45,38 % im Vergleich zu den Herzen der Kontrollmäuse mit 56,77 % eine signifikant verringerte Ejektionsfraction auf ($p = 0,033$). Ebenso war das Herzminutenvolumen bei den DKO-Mäusen signifikant herabgesetzt (DKO: 9,98 ml/min, Kontrollen: 11,52 ml/min, $p = 0,030$). Beide Parameter verdeutlichen, dass die systolische Herzleistung der DKO-Mäuse reduziert war (Abbildung 43).

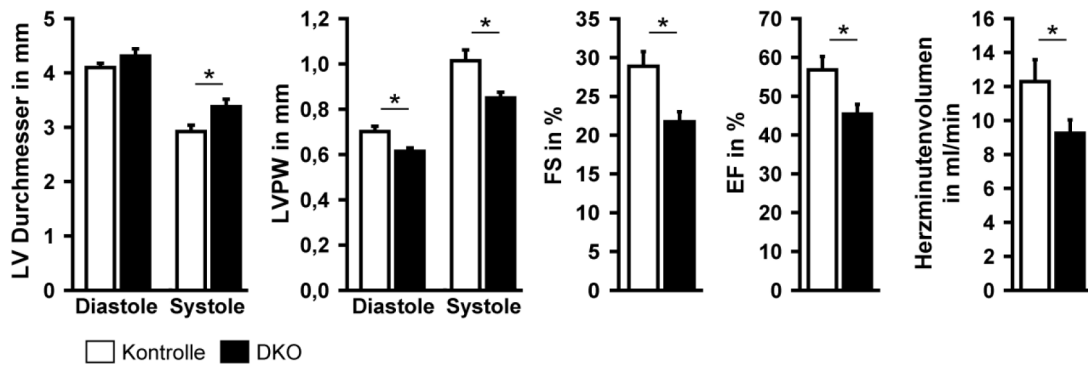


Abbildung 43: Echokardiographische Analyse der Herzstruktur und -funktion *in vivo*. Die Herzen von acht Wochen alten, männlichen Mäusen ($n_{\text{Kontrolle}} = 7$, $n_{\text{DKO}} = 5$) wurden einer Echokardiographie unterzogen. LV = linker Ventrikel, LVPW = linksventrikuläre posteriore Wand, FS = Verkürzungsfraktion (*fractional shortening*), EF = Ejektionsfraktion. In Zusammenarbeit mit Arnd Heuser und Mitarbeitern, MDC.

8.3.8 Langendorff-Analyse – Herzfunktionen *ex vivo*

Zusätzlich zu den *in vivo* Untersuchungen wurden *ex vivo* Analysen am isolierten Herzen mit Hilfe der Langendorff-Apparatur durchgeführt (Clemens Köhncke, AG Morano, MDC/Charité). Es wurde ermittelt, ob die Herzen der DKO-Mäuse unter Ruhebedingungen vergleichbare Drücke wie die Herzen der Kontrolltiere aufbauten und ob Unterschiede in der Reaktion auf β -adrenerge Stimulation auftraten. Isoprenalin (ISO, 50 nM) wurde eingesetzt, um die kardialen β 1-Adrenozeptoren zu aktivieren und dadurch die Kontraktionskraft des linken Ventrikels und die Schlagfrequenz des Herzens zu steigern.

Die Werte aller Messungen und die Signifikanzwerte befinden sich im Anhang in Tabelle 26 bzw. Tabelle 27, nur die zwischen den Herzen der Kontroll- und DKO-Mäuse signifikant unterschiedlichen Daten werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

Während der Systole entwickelten die Herzen der DKO-Tiere mit 68,34 mmHg einen signifikant geringeren linksventrikulären Druck als die der Kontrolltiere mit 99,08 mmHg ($p = 0,030$). Durch ISO kam es zu einem signifikanten Anstieg des linksventrikulären Drucks auf 199,2 mmHg bei den Herzen der Kontrolltiere bzw. 178,8 mmHg bei denen der DKO-Mäuse ($p = 0,029$ bzw. $p < 0,001$). Ebenso verhielt es sich mit dem Entwicklungsdruck, auch dieser war mit 58,3 mmHg in den Herzen der DKO-Tiere deutlich geringer als in den Herzen der Kontrollen, die 85,9 mmHg aufwiesen ($p = 0,031$). Der Entwicklungsdruck stieg durch ISO in beiden Gruppen vergleichbar an (Kontrollen: 192 mmHg, $p_{\text{Kontrolle basal vs. ISO}} < 0,001$, DKO: 173 mmHg, $p_{\text{DKO basal vs. ISO}} = 0,031$; $p_{\text{Kontrolle ISO vs. DKO ISO}} = 0,257$). Die Kontraktions- ($dLVP/dt_{\text{max}}$) und Relaxationsgeschwindigkeit ($dLVP/dt_{\text{min}}$) der Herzen der DKO-Mäuse war niedriger als die der

Kontrolltiere ($dLVP/dt_{max}$: Kontrollen = 5007 mmHg/s, DKO = 3149 mmHg/s, $p = 0,052$, $dLVP/dt_{min}$: Kontrollen = -3543 mmHg/s, DKO = -1824 mmHg/s, $p = 0,033$). Beide Messwerte erhöhten sich durch ISO in beiden Gruppen. Die Zunahme der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit durch ISO fiel in den DKO-Herzen jedoch geringer aus als in den Kontrollherzen ($dLVP/dt_{max}$: Kontrollen = 15667 mmHg/s, DKO = 11639 mmHg/s, $p < 0,001$, $dLVP/dt_{min}$: Kontrollen = -9938 mmHg/s, DKO = -6900 mmHg/s, $p < 0,001$, Abbildung 44). Die Abwesenheit von MuRF2 und MuRF3 führte zu einem geringeren Druckaufbau und einer niedrigeren Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit und damit zu einer verminderten systolischen und diastolischen Leistungsfähigkeit der Herzen der DKO-Tiere in Ruhe. Allerdings hatte der Verlust von MuRF2 und MuRF3 nur einen geringen Einfluss auf die Reaktion des Herzens auf β 1-adrenerge Stimulation.

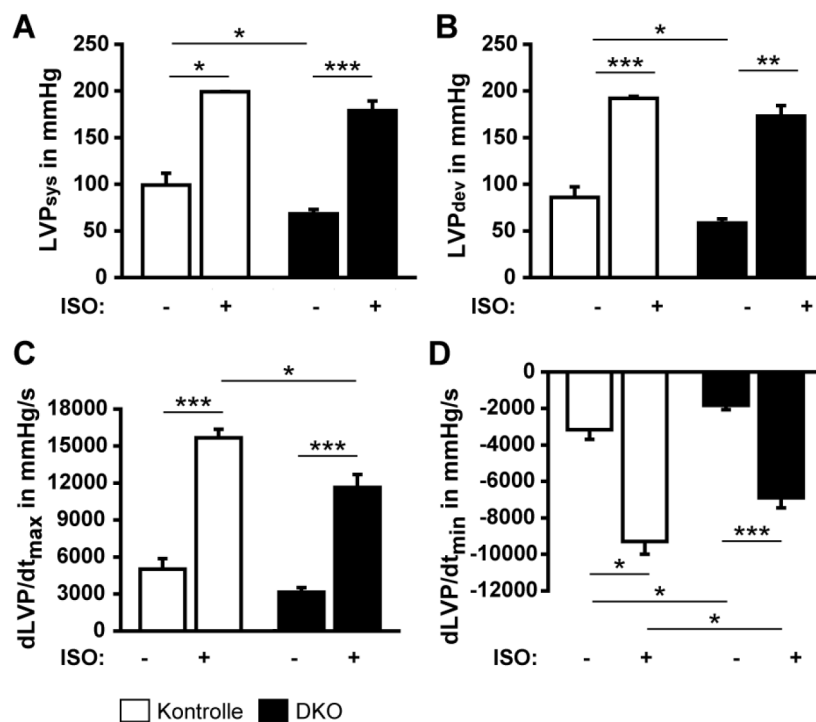


Abbildung 44: Analyse der Herzfunktionen *ex vivo*. Die Herzen von vier Kontroll- und sechs DKO-Mäusen (alle männlich, 15 Wochen alt) wurden isoliert und ihre Funktionsfähigkeit mit Hilfe der Langendorff-Apparatur vor und nach der Gabe von 50 nM Isoprenalin (ISO) analysiert. In Kooperation mit Clemens Köhncke, AG Morano, MDC/Charité.

8.3.9 Kardialer Stress – Herzfunktionen *in vivo*

Zwei etablierte Mausmodelle wurden angewandt, um zu untersuchen, ob der Verlust von MuRF2 und MuRF3 zu einer veränderten Reaktion auf kardialen Stress führte. Zum einen wurden dorsal subkutan osmotische Pumpen implantiert (ALZET®, DURECT Corporation), die

kontinuierlich über 7 Tage Isoprenalin (ISO) abgaben (8,7 mg/kg/d) und dadurch zu einer konzentrischen Herzhypertrophie führen sollten. Zum anderen wurde eine Ligation der Thoraxaorta (TAC, *thoracic aortic constriction*) durchgeführt, die über eine gesteigerte Druckbelastung des Herzens eine linksventrikuläre kardiale Hypertrophie auslösen sollte.

Die permanente β 1-adrenerge Stimulation durch ISO induzierte erwartungsgemäß eine kardiale Hypertrophie. Das Verhältnis aus Herzgewicht zu Tibialänge stieg bei den Kontrolltieren auf 141,8 % ($p < 0,001$), bei den DKO-Tieren auf 128,7 % ($p = 0,029$) des jeweiligen Ausgangswertes. Der Unterschied der Herzgewichtszunahme zwischen den Kontroll- und den DKO-Tieren war nicht signifikant. Die Lungengewichte (normalisiert auf die Tibialänge) der Kontrolltiere nahmen durch ISO zu (von 9,1 mg/mm auf 10,5 mg/mm, $p = 0,042$). Die DKO-Tiere zeigten keinen Unterschied beim Lungengewicht (Abbildung 45 A).

Im TAC-Versuch stieg das Herzgewicht der Kontrolltiere auf 142,9 % ($p = 0,006$) und das der DKO-Mäuse auf 140,2 % ($p = 0,026$) von den Ausgangswerten. Das Lungengewicht blieb in beiden Versuchsgruppen unverändert. Ein Tier in der DKO-TAC-Gruppe wies Einblutungen in der Lunge und ein deutlich erhöhtes Gewicht auf, die Lungen aller anderen Tiere waren unauffällig. Die Lebergewichte waren in beiden Tiermodellen unverändert, es kam folglich auch nicht zu einem Blutrückstau bis in die Leber aufgrund einer rechtsventrikulären Funktionsstörung (Abbildung 45 B). Wider Erwarten zeigten die DKO-Mäuse keinen Unterschied in der Reaktion auf kardiale Hypertrophiestimuli. Trotz der Abwesenheit von MuRF2 und MuRF3 war das Ausmaß der Herzhypertrophie dem der Kontrolltiere vergleichbar.

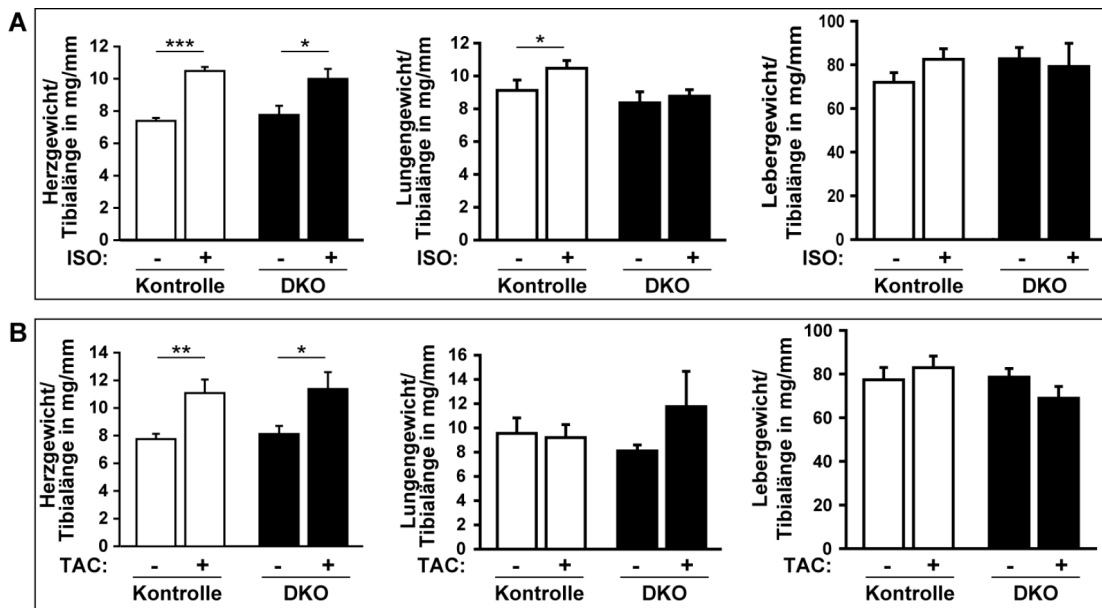


Abbildung 45: Herz-, Lungen- und Lebergewichte der *in vivo* Mausmodelle. (A) Neun Kontroll- und sechs DKO-Mäusen wurden osmotische Pumpen (ALZET®) implantiert, die über sieben Tage Isoprenalin (ISO, 8,7 mg/kg/d) abgaben. Die Kontrollgruppen, die kein ISO erhielten, bestanden aus neun Kontroll- und fünf DKO-Tieren. Herz-, Lungen- und Lebergewichte (normalisiert auf die Tibialänge) wurden direkt nach der Entnahme bestimmt. **(B)** An sechs Kontroll- und sechs DKO-Mäusen wurde die Thoraxaorta ligiert (TAC), sieben Kontroll- und sechs DKO-Tiere erhielten die sham-Operation. Herz-, Lungen- und Lebergewichte (normalisiert auf die Tibialänge) wurden direkt nach der Entnahme bestimmt. Die Implantation der osmotischen Pumpen erfolgte mit Unterstützung von Astrid Schiche, AG Luft, ECRC, die TAC-Operationen wurden alle von ihr durchgeführt.

8.3.10 Primäre Kardiomyozyten

Da die systolische und diastolische Herzfunktion in den DKO-Mäusen eingeschränkt war (Echokardiographie, Langendorff-Experiment), sollte untersucht werden, ob dies bereits auf einer reduzierten Funktion der einzelnen Herzmuskelzellen beruht. Aus diesem Grund wurden aus adulten, männlichen, 15 Wochen alten Mäusen Kardiomyozyten isoliert und auf ihre Morphologie und Funktionsfähigkeit getestet (Aanchal Pahuja, Cornelia Geers-Knörr, AG Kraft, Medizinische Hochschule Hannover). Für die Größenbestimmung der Kardiomyozyten wurden aus drei Kontroll- und drei DKO-Mäusen insgesamt jeweils 100 Zellen verwendet, für die weiteren Analysen aus je vier Tieren insgesamt 135 Zellen aus Kontrollmäusen und 130 Zellen aus DKO-Mäusen. Die Länge und Breite der isolierten Kardiomyozyten wurden gemessen und deren Fläche berechnet. Die Zellen aus den Herzen der Kontrollmäuse wiesen eine Länge von 103 μm auf, die aus den Herzen der DKO-Mäusen von 132 μm ($p < 0,01$), die Breite stieg von 21 auf 25 μm ($p < 0,01$) und damit betrug der Flächeninhalt der Kardiomyozyten 2129 μm^2 bei den Kontrollen und 3291 μm^2 bei den DKO-Mäusen ($p < 0,01$). Der DKO von MuRF2 und MuRF3 führte also zu einer Hypertrophie der isolierten Kardiomyozyten (Abbildung 46 A). Die

Differenz der Sarkomerlängen im relaxierten und im kontrahierten Zustand ergab das Ausmaß der Verkürzung während der Systole (systolische Kontraktionsamplitude). Die Amplitude betrug 0,055 μm bei den Kontrollzellen und 0,041 μm bei den DKO-Zellen ($p < 0,01$). Kardiomyozyten ohne MuRF2 und MuRF3 wiesen demzufolge eine schlechtere Kontraktionsfähigkeit auf als Kardiomyozyten mit den beiden Proteinen. Die Analyse der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit offenbarte, dass beide Parameter in den Kardiomyozyten aus den DKO-Tieren herabgesetzt waren (von 2,7 $\mu\text{m/s}$ auf 1,9 $\mu\text{m/s}$ bzw. von 1,7 $\mu\text{m/s}$ auf 1,1 $\mu\text{m/s}$, $p < 0,01$, Abbildung 46 B). Diese Verringerung der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in den Kardiomyozyten der DKO-Tiere könnte durch eine veränderte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem und Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) oder den Ca^{2+} -Export aus der Zelle verursacht werden. Intrazelluläre Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration wurden mit Hilfe des Ca^{2+} -Chelators Fura-2 ermittelt, dessen Fluoreszenzspektrum sich durch die Bindung von Ca^{2+} verändert. Das Ausmaß der Ca^{2+} -Freisetzung während der Kontraktion (Amplitude) war in den Kardiomyozyten der DKO-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollzellen um 54 % reduziert (Kontrollen: 0,041 μm , DKO: 0,019 μm , $p < 0,01$). Auch die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung und seines Exports aus dem Zytoplasma in das SR oder aus der Zelle waren um 56 % bzw. 62 % reduziert (von 2,2 $\mu\text{m/s}$ auf 1,0 $\mu\text{m/s}$ bzw. von 1,3 $\mu\text{m/s}$ auf 0,5 $\mu\text{m/s}$, $p < 0,01$, Abbildung 46 C). Die Abwesenheit von MuRF2 und MuRF3 führte zu einem geringeren und langsameren Ca^{2+} -Einstrom in und Ausstrom aus dem Zytoplasma der Kardiomyozyten.

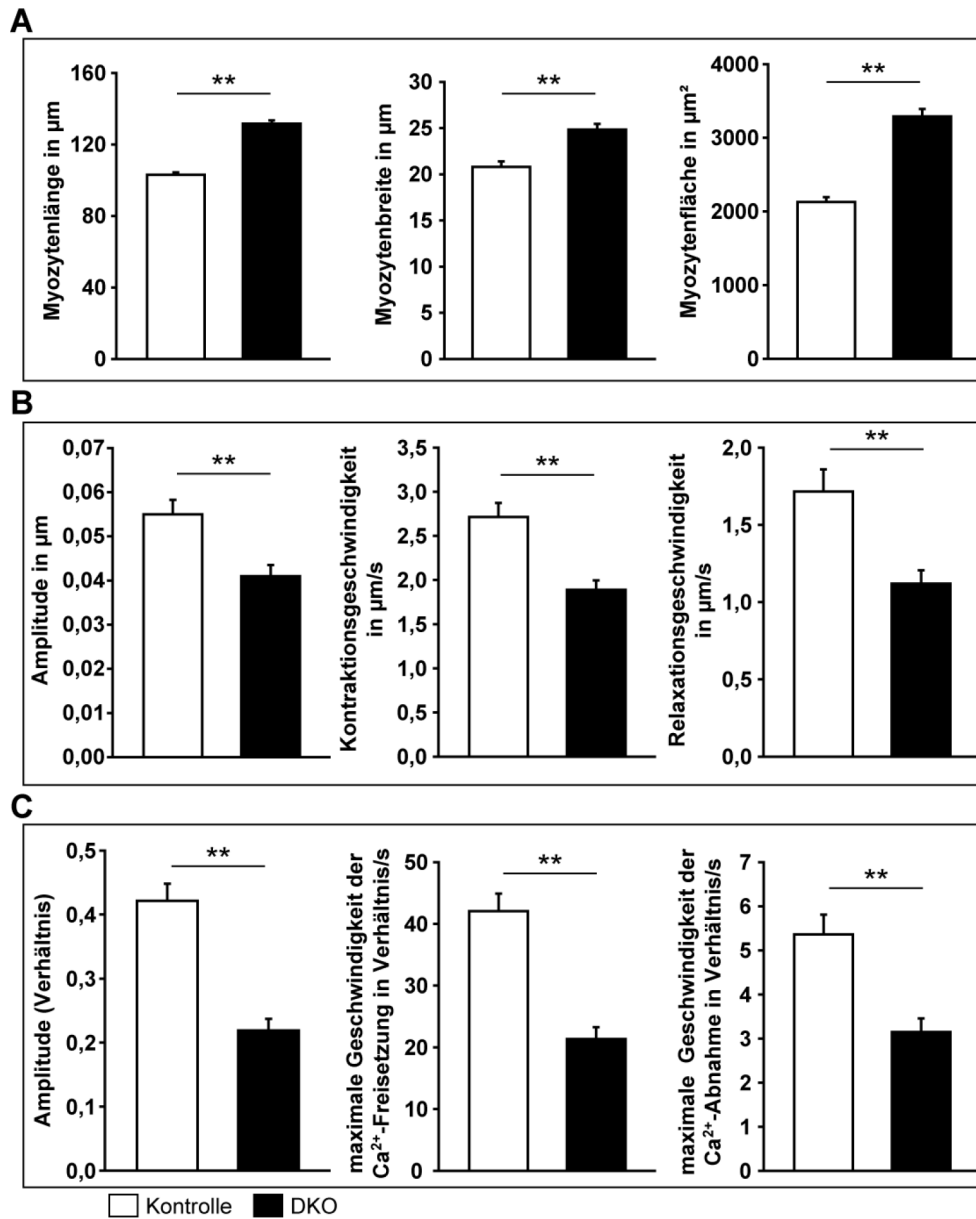


Abbildung 46: Analyse der Eigenschaften primärer Kardiomyozyten. (A) Aus drei Kontroll- und drei DKO-Mäusen wurden Kardiomyozyten isoliert (Zellzahl: $n_{\text{Kontrolle}} = 100$, $n_{\text{DKO}} = 100$) und deren Länge und Breite gemessen, sowie ihr Flächeninhalt berechnet. **(B)** Die Verkürzung der Sarkomerlänge während der Systole (Amplitude) und die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der isolierten Kardiomyozyten wurde ermittelt (je 4 Mäuse, Zellzahl: $n_{\text{Kontrolle}} = 135$, $n_{\text{DKO}} = 130$). **(C)** Das Ausmaß der Ca^{2+} -Freisetzung während der Systole (Amplitude [Verhältnis]) wurde mithilfe des Ca^{2+} -Chelators Fura-2 bestimmt. Ebenso die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung in das Zytoplasma und des Ca^{2+} -Exports aus dem Zytoplasma (Zellzahl: $n_{\text{Kontrolle}} = 76$, $n_{\text{DKO}} = 62$). In Kooperation mit Aanchal Pahuja, Cornelia Geers-Knörr, AG Theresia Kraft, Medizinische Hochschule Hannover.

8.4 Massenspektrometrische Analyse von Skelettmuskellysaten

Um Hinweise auf die Ursache der phänotypischen Veränderungen in den DKO-Skelettmuskeln zu erhalten, sollte herausgefunden werden, welche Proteine in den Muskelzellen der DKO

Tiere akkumulierten. Dazu wurden Gewebelysate des *M. soleus* von drei Kontroll- und drei DKO-Mäusen massenspektrometrisch analysiert (Massenspektrometrie-Plattform, Gunnar Dittmar und Mitarbeiter, MDC).

8.4.1 Auswahl massenspektrometrisch identifizierter Proteine für die weitere Analyse

Insgesamt wurden 37710 Peptide identifiziert, die zu 3565 Proteinen gehörten. 2024 davon wurden in allen sechs Proben gefunden, 1541 konnten nicht in allen Proben detektiert werden. Sechszehn der in allen sechs Proben gefundenen Proteine wurden in signifikant unterschiedlichen Mengen nachgewiesen, zwölf waren in den DKO-Proben angereichert, vier verringert. Von den zwölf angereicherten Proteinen wurden fünf zur weiteren Analyse ausgewählt. Zu vier von ihnen wurden bereits Daten im Zusammenhang mit der Muskulatur veröffentlicht (DDX17, SRA1, HspB3, SMYD2), zu einem ist dazu noch nichts bekannt (MLF2). Die RNA-Helikase DDX17 (auch p72 genannt) ist zusammen mit *Steroid receptor RNA activator 1* (SRA1) an der Regulation des Transkriptionsfaktors MyoD beteiligt und beeinflusst dadurch die Muskeldifferenzierung.²³⁸ Von SRA1 wurden zuerst nur Funktionen als nichtkodierende RNA in Protein-RNA-Komplexen beschrieben.^{239,240} Inzwischen sind aber auch Daten zum SRA1-Protein im Zusammenhang mit der Muskeldifferenzierung²⁴¹ und der Regulation der Steroidrezeptoraktivität veröffentlicht.^{242–244} Das kleine Hitzeschockprotein beta-3 (HspB3) wird vorwiegend in der quergestreiften Muskulatur exprimiert und während der Differenzierung von C2C12-Zellen unter der Kontrolle von MyoD induziert.²⁴⁵ Eine Mutation im *Hspb3*-Gen wurde bei einer Form der spinalen Muskelatrophie nachgewiesen.²⁴⁶ Die Lysin-Methyltransferase SMYD2 methyliert nicht nur Histone im Zellkern,²⁴⁷ sondern auch zytoplasmatische Proteine, zum Beispiel Hsp90. Hsp90 wiederum ist ein Chaperon für Myosin und befindet sich nach seiner Methylierung am Sarkomer an der I-Bande. Vermutet wird eine Ko-Chaperon-Funktion von SMYD2, die Hsp90 an das I-Banden-Titin rekrutiert und dadurch die Stabilität des Sarkomers fördert. Dementsprechend führt die Deletion von SMYD2 im Zebrafisch zu Missbildungen des Herzens und zu gestörten I-Banden in den Sarkomeren.^{248,249} Über das fünfte signifikant verstärkt nachgewiesene Protein *myeloid leukemia factor 2* (MLF2) wurde bisher nur wenig veröffentlicht. Die mRNA wird ubiquitär exprimiert,²⁵⁰ eine Korrelation mit BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*)- und BRCA2-verursachtem Brustkrebs wurde gezeigt²⁵¹ und ein Zusammenhang mit einer Kokzidienresistenz in Hühner, d. h. einem geringeren Gewichtsverlust nach der Infektion, wurde ebenfalls publiziert.^{252,253}

Zusätzlich wurden drei weitere Proteine ausgewählt, die in allen drei Proben der DKO-Tiere detektiert wurden, jedoch in keiner der Kontrolltiere. Die Mitogen aktivierte Protein-Kinase-aktivierte Protein-Kinase 3 (MAPKAP-K3) ist in den p38-Signalweg involviert.^{214,254} Die verschiedenen Isoformen der Proteinkinase p38 werden durch unterschiedliche Stressfaktoren aktiviert und sind an der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und von Herzversagen beteiligt.²⁵⁵ Die Isoform MUp48 der Cysteinprotease Calpain 3 (= p94) wurde ebenfalls in allen drei DKO-Proben gefunden. Calpain 3/p94 wird vorwiegend in der Muskulatur exprimiert, MUp48 wurde jedoch in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen und deshalb als ubiquitär vorkommend bezeichnet.²⁵⁶ Da eine Mutation im Calpain 3-Gen eine Form der Muskeldystrophie verursacht²⁵⁷ und die Proteaseaktivität von Calpain 3/p94 Muskelfasern vor belastungsinduzierter Degeneration bewahrt,²⁵⁸ könnte ein verstärktes Auftreten von MUp48 ein Hinweis auf eine gewebespezifische Funktion dieser Isoform darstellen. Palladin ist ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, das punktförmig entlang von Stressfasern, an Fokalkontakten und an Z-Scheiben von Sarkomeren nachgewiesen wurde.^{259,260} Es bindet α -Aktinin und filamentöses Aktin und ist dadurch sowohl für die Aufrechterhaltung der Aktinfilamentorganisation als auch für die Mobilität von Zellen mitverantwortlich.^{259,261} In glatten Muskelzellen ist es für die Expression kontraktile Proteine nötig und Palladin-KO-Zellen zeigen eine geringere Kontraktilität.²⁶² Die genauen Proteinbezeichnungen, die Gennamen (beides wie in UniProt) und der Nachweis in den Proben aus Kontroll- und DKO-Mäusen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Zur Klonierung ausgewählte Gene der in der MS-Analyse identifizierten Proteine. *M. soleus*-Lysate von je drei Kontroll- und drei DKO-Mäusen wurden analysiert. Es wurden Proteine ausgewählt, die entweder in allen sechs untersuchten Proben nachgewiesen wurden und dabei in den DKO-Proben in signifikant erhöhter Menge auftraten oder Proteine, die in keiner der Kontrollproben, aber in jeder der DKO-Proben detektiert wurden.

Protein (Abkürzung)	Gen	Kontrollen	DKO
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 (DDX17)	<i>Ddx17</i>	3	3
Heat shock protein beta-3 (HspB3)	<i>Hspb3</i>	3	3
Myeloid leukemia factor 2 (MLF2)	<i>Mlf2</i>	3	3
N-lysine methyltransferase SMYD2 (SMYD2)	<i>Smyd2</i>	3	3
Steroid receptor RNA activator 1 (SRA1, SRAP)	<i>Sra1</i>	3	3
MAP kinase-activated protein kinase 3 (MAPKAP-K3)	<i>Mapkapk3</i>	0	3
Calpain 3 Isoform MUp48 (MUp48)	<i>Capn3</i>	0	3
Palladin	<i>Palld</i>	0	3

8.4.2 Genexpression der in der MS-Analyse angereicherten Proteine

Die Analyse der mRNA-Expression der in der MS-Untersuchung als angereichert identifizierten Proteine sollte klären, ob diese Anreicherung auf eine erhöhte Genexpression zurückzuführen ist. Keines der untersuchten Gene wies eine veränderte mRNA-Expression in den DKO-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (Abbildung 47). Die Proteinanreicherung beruht folglich nicht auf einer erhöhten Genexpression.

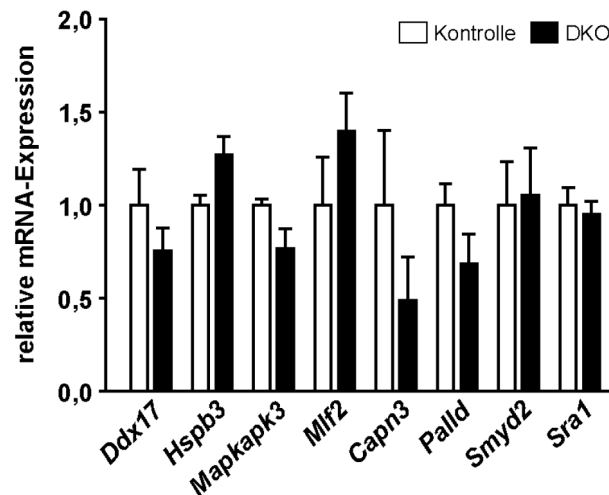


Abbildung 47: mRNA-Expression der MS-Kandidaten. Die RNA aus dem *M. soleus* von vier Kontroll- und vier DKO-Mäusen wurde isoliert, in cDNA transkribiert und der mRNA-Gehalt mit spezifischen Primern für die angegebenen Gene in einer real-time PCR nach der SYBR® Green-Methode bestimmt.

8.4.3 Expression und Lokalisation der ausgewählten Proteine

Die cDNA von fünf der acht ausgewählten Proteine konnte in den Expressionsvektor pcDNA™3.1(+)/FLAG kloniert werden (MAPKAP-K3, MLF2, SMYD2, SRA1 und HspB3). Bei Palladin lieferte die Klonierungs-PCR kein Produkt und bei DDX17 und MUp48 entsprachen die Sequenzen der PCR-Produkte nicht den gewünschten Genen. Die fünf mit der FLAG-Markierung fusionierten Proteine ließen sich transfizieren und im Western Blot nachweisen, dabei führte eine zunehmende DNA-Menge zu einer steigenden Proteinmenge (Abbildung 48).

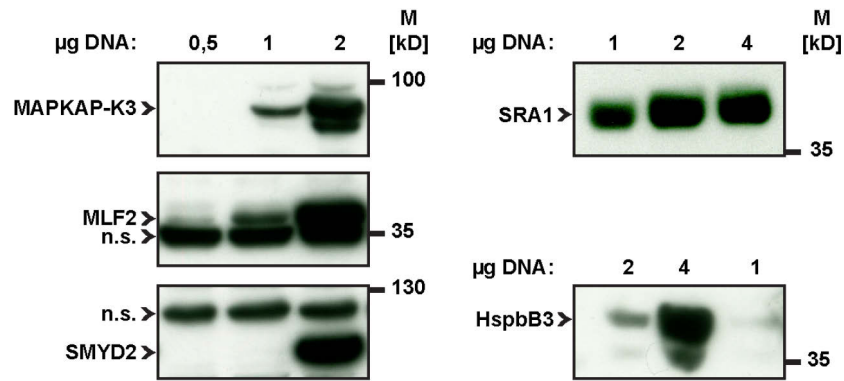


Abbildung 48: Expressionstest der fünf Fusionsproteine. COS-7-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an DNA (pcDNATM3.1(+)/FLAG-Vektor mit inserierten cDNAs der verschiedenen Gene) mittels FuGENE[®] 6 für 24 h transfiziert. Nach der Zelllyse wurden die Proteine durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit dem spezifischen Antikörper gegen die FLAG-Markierung detektiert. Der Proteinmarker (M) PageRuler prestained diente zur Abschätzung der Proteingröße, nicht spezifische (n.s.) Banden sind entsprechend markiert.

Immunzytochemische Färbungen wurden eingesetzt, um die zelluläre Lokalisation der Proteine zu bestimmen. HspbB3 befand sich, in Übereinstimmung mit bisherigen Veröffentlichungen,^{245,263} im Zytoplasma. Es wurden punktförmige Strukturen stärker angefärbt. MAPKAP-K3 wurde, ebenfalls entsprechend der Literatur,^{214,254} im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen. MLF2 war überwiegend im Zellkern, in einigen Zellen zusätzlich auch im Zytoplasma nachweisbar. Hierzu gibt es bislang keine Veröffentlichungen. SRA1 wurde im Zytoplasma nachgewiesen, eine Färbung des Zellkerns kann aufgrund der Stärke des Signals (keine Aussparung der Kerns) nicht ausgeschlossen werden. Borth *et al.*²⁶⁴ zeigten eine gleichmäßige Verteilung von SRA1 im Zytoplasma und im Zellkern, Chooniedass-Kothari *et al.*²⁴⁴ beschrieben eine vorwiegend nukleäre Lokalisation und eine dementsprechende Funktion von SRA1 als Transkriptionsregulator. SMYD2 wurde im Zytoplasma nachgewiesen. Auch in der Literatur ist eine hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisation beschrieben, nur in einigen Zellen wurde es im Nukleus detektiert.^{248,249} Die immunzytochemischen Färbungen zeigten keine Unterschiede in der zellulären Lokalisation in COS-7 und C2C12-Zellen, aus diesem Grund ist die Färbung nur in jeweils einer Zellart abgebildet (Abbildung 49: C2C12 für HspbB3, MAPKAP-K3, MLF2, SRA1 und Abbildung 50: COS-7 für SMYD2).

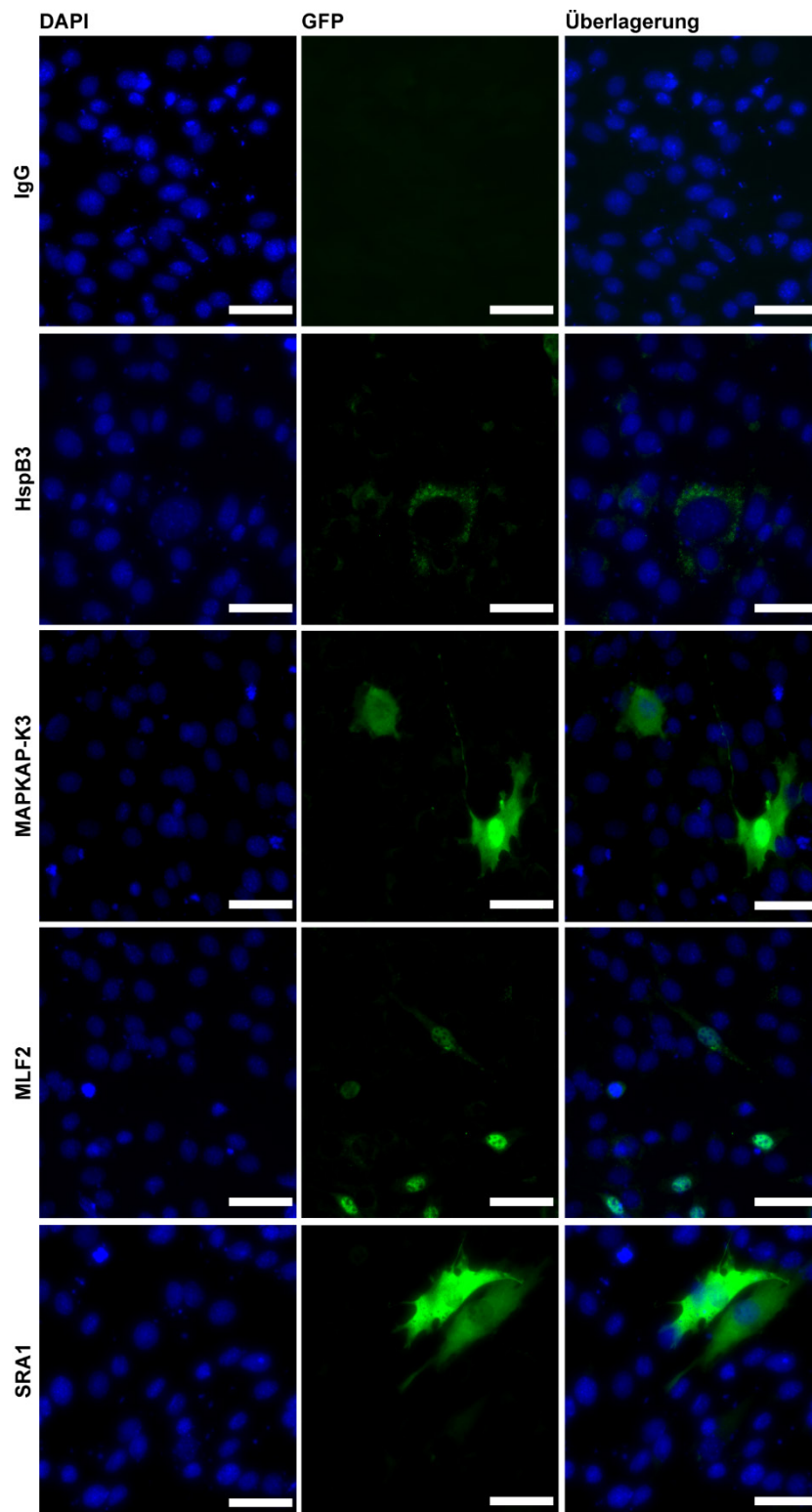


Abbildung 49: Immunzytochemische Färbung zur Bestimmung der zellulären Lokalisation der Fusionsproteine. C2C12-Zellen wurden mittels Lipofectamine® und PLUS™-Reagenz mit 2 µg der für die angegebenen Proteine kodierenden Plasmide (pcDNA™3.1(+)/FLAG-Vektor mit den verschiedenen inserierten kodierenden Sequenzen) für 24 h transfiziert. Fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit dem die FLAG-Markierung bindenden primären Antikörper und danach mit anti-Kaninchen-IgG-Alexa Fluor® 488 (grün) inkubiert. Das Eindeckmedium ProLong® Gold antifade reagent enthielt DAPI zur Anfärbung der Zellkerne (blau). Die IgG-Kontrolle wurde genauso behandelt wie die anderen Proben, lediglich der primäre Antikörper wurde nicht zum Inkubationsmedium dazugegeben. Messbalken = 50 µm.

Kotransfektionen der Fusionsproteine mit MuRF2 bzw. MuRF3 wurden vorgenommen, um zu analysieren, ob es zu einer Kolo­kalisierung der Proteine mit den MuRFs oder zu einer veränderten Lokalisation oder Expression kommt. Die Versuche wurden in COS-7-Zellen durchgeführt. Bei keinem der Proteine kam es durch die Kotransfektion mit MuRF2 bzw. MuRF3 zu einer veränderten Expression oder Lokalisation und es wurde keine Kolo­kalisierung mit MuRF2 oder MuRF3 nachgewiesen. Die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbungen sind exemplarisch für SMYD2 in Abbildung 50 gezeigt.

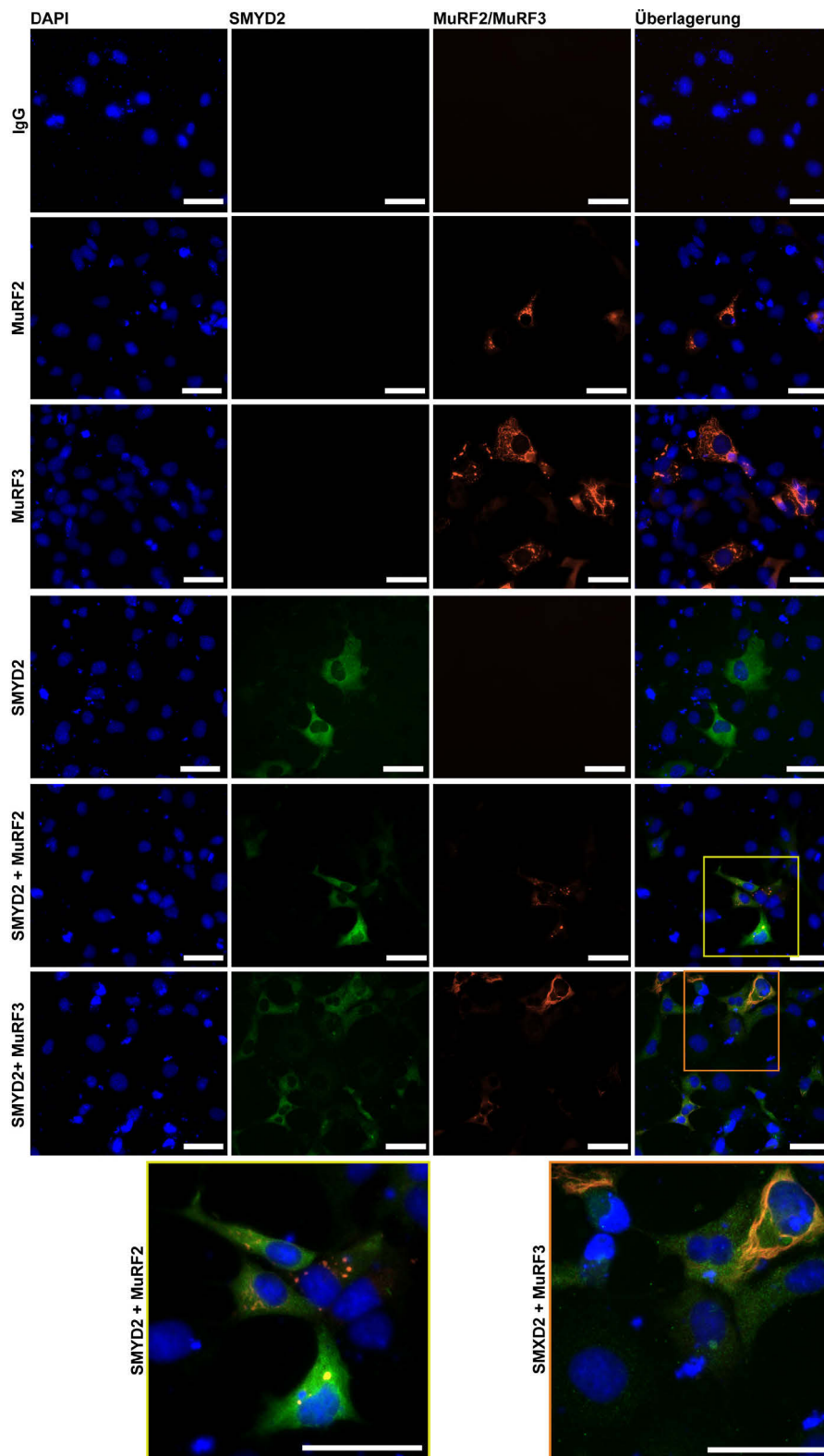


Abbildung 50: Immunzytochemische Färbungen zur Untersuchung der Kolo­kalisation von SMYD2-FLAG mit MuRF2 oder MuRF3. COS-7-Zellen wurden mittels FuGENE® 6 mit pcDNA™3.1(+)/FLAG_SMYD2 und pmCherry-N1_MuRF2 bzw. pmCherry-N1_MuRF3 (rot) für 24 h transfiziert. Fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit dem die FLAG-Markierung bindenden primären Antikörper und danach mit anti-Kaninchen-IgG-Alexa Fluor® 488 (grün) inkubiert. Das Eindeckmedium ProLong® Gold antifade reagent enthielt DAPI zur Anfärbung der Zellkerne (blau). Die IgG-Kontrolle wurde genauso behandelt wie die anderen Proben, lediglich der primäre Antikörper wurde nicht zum Inkubationsmedium dazugegeben. Messbalken = 50 µm.

8.4.4 Koimmunpräzipitation der ausgewählten Proteine mit MuRF2 und MuRF3

Mittels Koimmunpräzipitation wurde untersucht, ob es sich bei den in der MS-Analyse als angereichert identifizierten Proteine um Bindungspartner von MuRF2 oder MuRF3 handelt. Als Positivkontrolle wurde MuRF1-FLAG eingesetzt. MuRF1-FLAG kopräzipitierte sowohl MuRF2-His-myc als auch MuRF3-His-myc. Keines der anderen Proteine konnte jedoch MuRF2 oder MuRF3 kopräzipitieren. Ein Beispiel mit MLF2, MAPKAP-K3 und SMYD2 ist dargestellt (Abbildung 51), aber auch für SRA1 und HspB3 konnte keine Bindung an MuRF2 oder MuRF3 nachgewiesen werden.

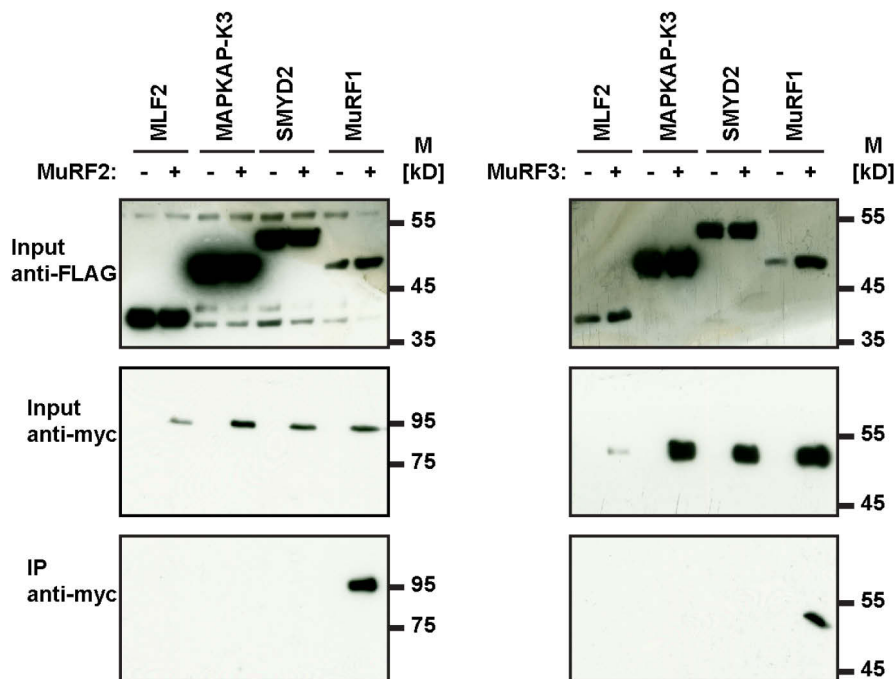


Abbildung 51: Untersuchung der Bindung der möglichen Interaktionspartner an MuRF2-His-myc bzw. an MuRF3-His-myc. COS-7-Zellen wurden kotransfiziert mit je einem der Insert-enthaltenden Plasmide (pcDNATM3.1(+)/FLAG-Vektor) und pcDNATM3.1/myc-His(-)_MuRF2 bzw. pcDNATM3.1/myc-His(-)_MuRF3. Nach der Zellyse erfolgte die Koimmunpräzipitation mit ANTI-FLAG[®] M2 Affinitätsgel, an das die FLAG-markierten Kandidatenproteine banden. Die anschließende Western Blot Analyse zeigte lediglich eine Bindung von MuRF2-His-myc und von MuRF3-His-myc an MuRF1-FLAG. Die Proteine wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit den spezifischen Antikörpern detektiert.

8.4.5 MAPKAP-K3, MAPKAP-K2, p38 und SERCA2a

Die Proteinexpression von MAPKAP-K3 wurde in Lysaten des *M. soleus*, des *M. gastrocnemius-plantaris* und der linken Herzkammer näher analysiert. Zusätzlich wurde die Expression des

nahe verwandten Proteines MAPKAP-K2 untersucht, da diese beiden Kinasen häufig überlappende Funktionen ausüben.^{214,265} In den Muskellysaten der DKO-Mäuse wurde mehr MAPKAP-K2 nachgewiesen als in den Lysaten der Kontrollen. Die Proteinexpression von MAPKAP-K3 war zu gering für einen Nachweis. Da MAPKAP-K2 und -K3 an p38 binden,^{214,266,267} wurde ein Pulldown-Assay mit p38 durchgeführt. Auf diesem Weg wurden die in den Muskellysaten enthaltenen Kinasen angereichert und dadurch (besser) detektierbar. Der Gehalt an p38 war in den DKO-Proben nicht verändert. Wie bereits in den Lysaten festgestellt, war auch nach dem Pulldown-Assay mehr MAPKAP-K2 in den Proben der DKO-Tiere als in den Kontrollen. Auch der MAPKAP-K3-Gehalt war in den DKO-Proben höher als in den Proben der Kontrolltiere (Abbildung 52). Die Lysate der drei DKO-Muskeln enthielten demzufolge mehr MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3.

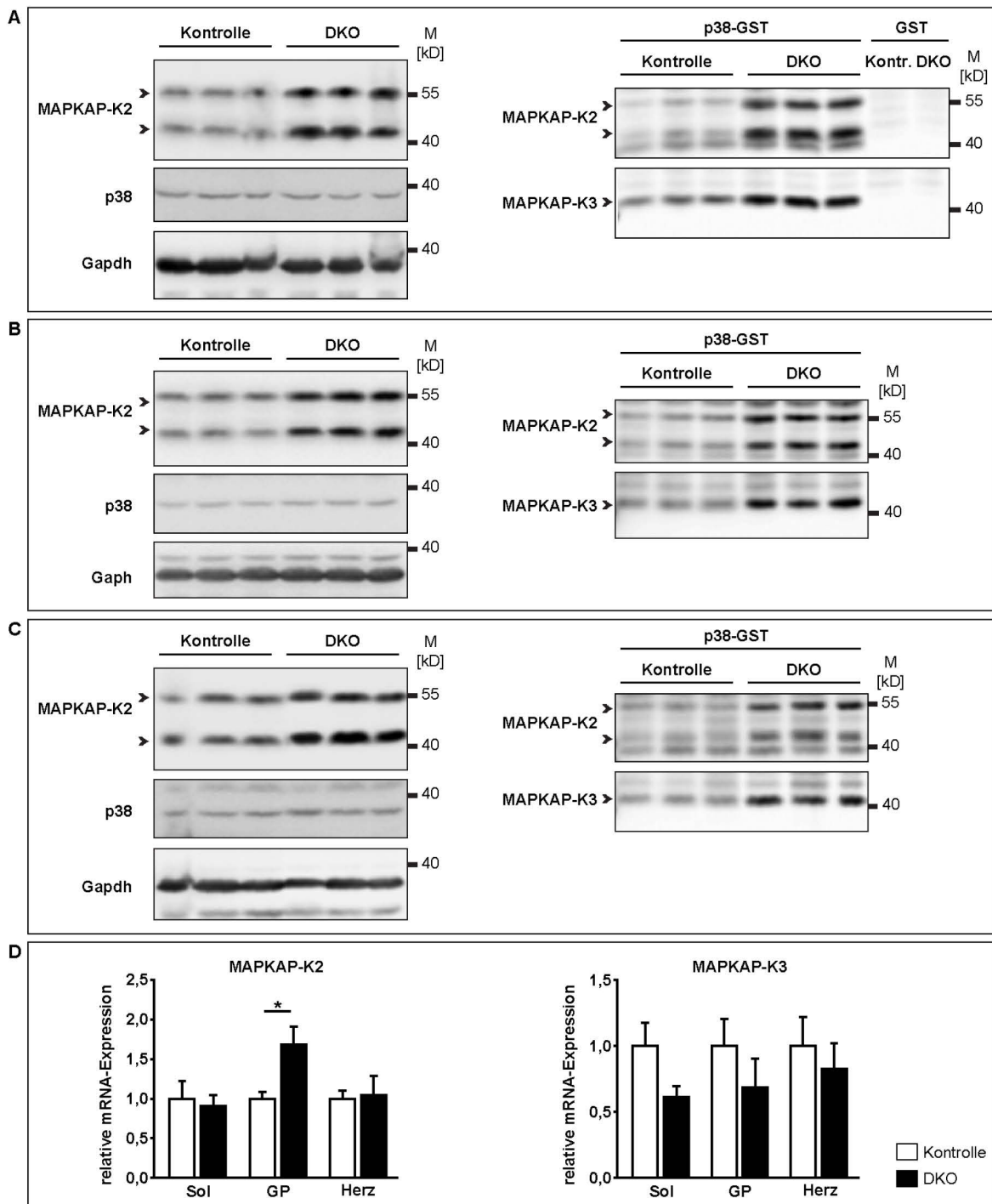


Abbildung 52: Endogene Protein- sowie mRNA-Expression von MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 in Skelettmuskel- und Herzwegebelysaten. (A-C) Die Western Blots auf der linken Seite zeigen jeweils die Ergebnisse von Muskellysaten, die auf der rechten Seite zeigen die Ergebnisse von Muskellysaten nach einem p38-Pulldown-Assay. (A) *M. gastrocnemius-plantaris*, (B) *M. soleus*, (C) linker Ventrikel, (D) Die mRNA-Expression von MAPKAP-K2 im *M. soleus* (Sol, $n_{\text{Kontrolle}} = 4$, $n_{\text{DKO}} = 5$), *M. gastrocnemius-plantaris* (GP) und im linken Ventrikel (Herz; beide: $n_{\text{Kontrolle}} = 5$, $n_{\text{DKO}} = 4$) und von MAPKAP-K3 im Sol ($n_{\text{Kontrolle}} = 6$, $n_{\text{DKO}} = 6$), GP und dem linken Ventrikel (beide: $n_{\text{Kontrolle}} = 5$, $n_{\text{DKO}} = 4$) wurde mittels real-time PCR nach der SYBR[®] Green-Methode bestimmt.

Scharf *et al.*²⁶⁸ zeigten in MAPKAP-K2/MAPKAP-K3-DKO-Mäusen eine Heraufregulation der für die langsamen Muskelfasern typischen SERCA (Sarkoplasmatisches/endoplasmatisches

Retikulum Calcium ATPase) 2a-Isoform und einen Anstieg der Kontraktionskraft im *M. soleus*. Meyer *et al.*²⁶⁹ diskutieren einen Zusammenhang zwischen reduziertem SERCA-Gehalt, gestörter Ca^{2+} -Handhabung und Herzversagen. Ein veränderter SERCA-Gehalt könnte auch in den MuRF2/3-DKO-Mäusen mitverantwortlich für die verringerte Kontraktionskraft der Myozyten sein. Aus diesem Grund wurden Muskellysate vom linken Ventrikel der MuRF2/3-DKO-Mäuse auf den Proteingehalt von SERCA2a untersucht. Der Proteingehalt von SERCA2a im linken Ventrikel war in den MuRF2/3-DKO-Tieren unverändert im Vergleich zu Proben von Kontrolltieren (Abbildung 53).

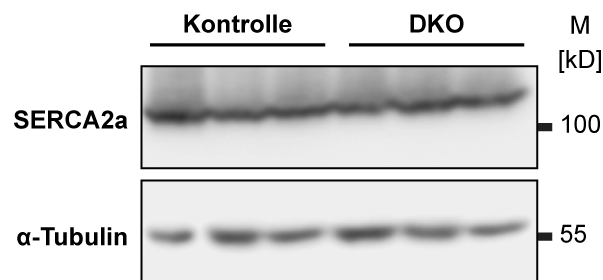


Abbildung 53: Western Blot-Analyse des SERCA2a-Gehalts im linken Ventrikel. Proteine aus Herzmuskellysaten des linken Ventrikels wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit den spezifischen Antikörpern (wie angegeben) detektiert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Der Proteinmarker (M) PageRuler prestained diente zur Abschätzung der Proteingröße.

9. Diskussion

9.1 Generelle Merkmale der MuRF2- und MuRF3-DKO-Mäuse

Die Züchtung und anschließende Charakterisierung der MuRF2/3-DKO-Maus sollte Einblicke in die Aufgaben der verschiedenen MuRFs und die Auswirkungen ihrer Abwesenheit auf den Organismus im Allgemeinen und auf die Skelett- und Herzmuskulatur im Besonderen liefern.

9.1.1 Normale Geburtenrate und Lebensfähigkeit

Die kombinierte Keimbahndeletion von MuRF2 und MuRF3 ist nicht lethal. Die Geburtenrate ist unbeeinflusst und die Tiere werden den Mendelschen Regeln entsprechend geboren (Daten nicht gezeigt). Dies trifft auch auf die MuRF1/3-DKO-Mäuse zu,¹⁶¹ steht jedoch im Gegensatz zu den MuRF1/2-DKO-Mäusen. Hier führt der Verlust der beiden E3-Ligasen zu einer vorgeburtlichen Lethalität von circa 67 %. Von den geborenen Mäusen sterben noch einmal etwa 75 % aufgrund von kardialer Hypertrophie und Herzversagen und den damit zusammenhängenden Effekten, wie Kompression benachbarter Organe und Lungenödeme.^{191,208} Der Unterschied in der vorgeburtlichen Lethalität der verschiedenen MuRF-DKO-Tiere zeigt, dass die Anwesenheit von MuRF1 (beim MuRF2/3-DKO) oder von MuRF2 (beim MuRF1/3-DKO) während dieser Entwicklungsphase ausreichend ist, um den Verlust der anderen beiden Familienmitglieder auszugleichen. Ist jedoch nur MuRF3 vorhanden, sterben 92 % der Tiere prä-, peri- oder postpartal. MuRF1 und MuRF2 haben daher höchstwahrscheinlich Funktionen, die nicht von MuRF3 übernommen werden können. Außerdem könnte der unterschiedliche Expressionsverlauf der MuRFs während der Entwicklung eine Rolle spielen. So zeigen Perera *et al.*,²⁷⁰ dass MuRF2 das während der Embryonalentwicklung vorherrschende MuRF-Familienmitglied im Herzen ist. MuRF1 und MuRF3 sind zu dieser Zeit nur in geringen Mengen nachweisbar, ihre Expression steigt erst nach der Geburt weiter an. Da MuRF3 vor der Geburt nicht oder nur in sehr geringem Maße vorhanden ist, kann es hier nicht oder nur geringfügig kompensatorisch eingreifen und die MuRF1/2-DKO-Tiere haben in diesem Entwicklungsstadium quasi einen funktionellen Trippleknockout der MuRFs. Sehr wahrscheinlich sind noch andere Faktoren für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich. Immerhin überlebten 8 % der MuRF1/2-DKO-Tiere und die verstorbenen Tiere wiesen neben der kardialen Hypertrophie, die auch die überlebenden Mäuse hatten, zusätzlich eine myokardiale Fibrose auf.^{191,208} Möglicherweise sind in diesen Tieren Signalwege, die die Kollagenbildung oder den Kollagenabbau betreffen,

verändert, wodurch die Entstehung einer kardialen Fibrose verhindert und das Überleben gefördert wird.

9.1.2 Geschlechtsspezifische Veränderungen des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung

Die Analyse des Körpergewichts zeigte, dass die MuRF2/3-DKO-Männchen leichter waren, als die Kontrolltiere (Abbildung 21). Auch die MuRF1/2-DKO-Mäuse wiesen ein geringeres Gewicht im Vergleich zu ihren Kontrollen auf. Im Gegensatz zu den MuRF2/3-DKO-Mäusen trat der Gewichtsunterschied bei den MuRF1/2-DKO-Mäusen jedoch erst mit zunehmendem Alter auf. Sie lagerten im Laufe der Zeit deutlich weniger weißes Fett ein als ihre Geschwistertiere.¹⁹¹ Bei den MuRF2/3-DKO-Mäusen kam es hingegen nur zu einem um 2,36 % geringeren Anteil an Fettgewebe. Die Ursache für die Verringerung des Körpergewichts um insgesamt 11,9 % ist noch ungeklärt, ebenso wie die Ursache des geschlechtsspezifischen Unterschieds. Die MuRF2/3-DKO-Weibchen wiesen keine Veränderungen des Körper-, Fett- und Muskelgewichts auf. Dies steht auch im Gegensatz zu den MuRF1/3-DKO-Mäusen, bei denen Männchen und Weibchen ein verringertes Körpergewicht hatten.¹⁶¹ Mögliche Gründe für die geschlechtsbezogenen Unterschiede des Körper-, Muskel- und Fettgewichts können unter anderem durch Steroidhormone regulierte Prozesse sein. Es ist für verschiedene Vorgänge gezeigt, dass Steroidhormone dazu führen, dass der Metabolismus oder der Krankheitsverlauf (zum Beispiel bei Diabetes^{271,272} oder Herzinfarkten^{273,274}) in den Geschlechtern unterschiedlich abläuft. Steroidhormone beeinflussen auch die Aufrechterhaltung der Skelettmuskelfunktion. Dies wirkt sich besonders bei Frauen in der Menopause aus. Hier kommt es durch den verringerten Östrogengehalt zu einer Abnahme der Muskelmasse und -kraft. Das kann zumindest teilweise durch eine Hormonersatztherapie verhindert werden.²⁷⁵⁻²⁷⁷ Möglicherweise beeinflusst der Verlust von MuRF2 und MuRF3 Steroidhormon-abhängige Signalwege, was dazu führt, dass das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung nur bei den DKO-Männchen, jedoch nicht bei den DKO-Weibchen verändert werden. Zumindes für MuRF1 wurde zum Beispiel die Bindung an den transkriptionellen Koaktivator GMEB1 (*glucocorticoid modulatory element binding protein 1*) gezeigt, welcher mit Glukokortikoidrezeptoren interagiert und dadurch die Expression Glukokortikoid-abhängiger Gene beeinflusst.^{194,278} Ob und wie MuRF1 an diesem Prozess beteiligt ist, und ob MuRF2 und MuRF3 ähnliche Funktionen ausüben, muss noch geklärt werden.

9.1.3 Keine offensichtliche Beeinträchtigung der Mobilität

Die MuRF2/3-DKO-Mäuse zeigten keine offensichtliche Beeinträchtigung beim Laufen oder Klettern. Von den MuRF1/2-DKO-Tieren ist darüber nichts veröffentlicht,^{191,208,279} MuRF1/3-DKO-Mäuse sind hingegen weniger mobil, sie haben verkürzte Schrittlängen, einen schwerfälligen Gang und Schwierigkeiten beim Klettern.¹⁶¹ Da die Auswirkungen des Verlustes von MuRF2 und MuRF3 auf die Mobilität weniger gravierend sind, als die von MuRF1 und MuRF3, scheint MuRF2 nicht alle Funktionen von MuRF1 ersetzen zu können.

9.2 Skelettmuskulatur

9.2.1 Fehlen einer Skelettmuskelhypertrophie

Die MuRF2/3-DKO-Tiere zeigten keine erhöhten Gewichte der vier untersuchten Skelettmuskeln im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 24). Im Gegensatz dazu wiesen sowohl die MuRF1/2- als auch die MuRF1/3-DKO-Mäuse eine Skelettmuskelhypertrophie auf.^{161,191} Dieser Unterschied legt nahe, dass der Verlust von MuRF1 ausschlaggebend für die Entwicklung einer Skelettmuskelhypertrophie ist. Jedoch müssen MuRF2 und MuRF3 zumindest zu einem gewissen Anteil an der Regulation der Hypertrophie beteiligt sein, da die MuRF1-Einzelknockout-Tiere keine Skelettmuskelhypertrophie unter Basalbedingungen zeigten.¹⁹⁶

9.2.2 Proteinaggregate in der Skelettmuskulatur

Das auffälligste Merkmal der MuRF2/3-DKO-Mäuse sind die innerhalb der Skelettmuskelfasern liegenden Ablagerungen (Abbildung 25). Immunhistochemische Färbungen zeigten die Anwesenheit von Myosin in den Ablagerungen. Ähnliche myosinhaltige Akkumulate wurden auch in den Muskeln der MuRF1/3-DKO-Tiere nachgewiesen,¹⁶¹ jedoch nicht in denen der MuRF1/2-DKO-Mäuse.^{191,208} Da sowohl MuRF1 als auch MuRF3 verschiedene Isoformen der schweren und leichten Myosinketten ubiquitinieren können,^{161,199,200} jedoch nur in den DKO-Mäusen mit der MuRF3-Deletion myosinhaltige Ablagerungen auftreten, scheint MuRF3 von besonderer Bedeutung für die Ubiquitinierung und den nachfolgenden Abbau von Myosin in den Skelettmuskeln zu sein. Der Verlust von MuRF3 ist demzufolge entscheidend für die Entstehung der Proteinaggregate in den MuRF2/3-DKO-Mäusen. Doch auch MuRF2 trägt

maßgebend zu diesem Phänotyp bei, da in den MuRF3-Einzelknockout-Mäusen keine Proteinaggregate in den Skelettmuskeln nachgewiesen wurden.¹⁹²

Eine Beeinträchtigung der Degradation ist nicht die einzige Möglichkeit, wie sich der DKO von MuRF2 und MuRF3 auf die Myosine auswirken könnte. Sowohl von MuRF2 als auch von MuRF3 wurde in Zellkulturversuchen gezeigt, dass sie über die Bindung und Stabilisierung von Mikrotubuli für die Assemblierung von Sarkomeren^{206,207} bzw. die Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben notwendig sind.¹⁸⁸ Die Abwesenheit der E3-Ligasen könnte also in den Skelettmuskeln der MuRF2/3-DKO-Mäuse zu Defiziten bei der korrekten Bildung von Sarkomeren und der Entwicklung reifer Myozyten führen. In diesem Fall handelt es sich bei den Ablagerungen um zumindest teilweise noch nicht in Sarkomere eingebaute Myosine.

Doch auch ohne MuRF2 und MuRF3 sind die Assemblierung von Filamenten und die Ausbildung von Sarkomeren in den Skelettmuskeln möglich. Die immunhistochemischen Färbungen und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass nicht alle Muskelfasern von Proteinaggregaten betroffen sind und dass selbst betroffene Fasern einen innenliegenden Bereich mit normaler Sarkomerstruktur aufweisen (Abbildung 30). Dies erklärt auch, warum die DKO-Mäuse keine offensichtliche Beeinträchtigung beim Klettern oder Laufen erkennen ließen. Es müssen also MuRF2- und MuRF3-unabhängige Prozesse der Sarkomerformierung vorhanden sein. Eine partielle Kompensation durch MuRF1 scheint unwahrscheinlich, da in den Skelettmuskeln der DKO-Mäuse weder seine Transkription noch Translation erhöht war.

Die Affinitätsfärbung mit Phalloidin zeigte, dass in den Ablagerungen kein filamentöses Aktin vorhanden war (Abbildung 29). Dieser Befund wurde auch durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt, die in der Mehrzahl der Muskelfasern amorphe Ablagerungen zeigten. Nur in einigen Myozyten waren faserhaltige Strukturen und vereinzelt sogar aus Z-Scheiben ausfasernde Filamente sichtbar. Aufgrund dieser Beobachtungen ist eine Beeinträchtigung der Degradation von Myosin und anderen Proteinen die wahrscheinlichere Erklärung als eine Störung der Filamentassemblierung. Dafür spricht auch, dass MuRF1 filamentöses Aktin polyubiquitinieren und dadurch für den Abbau durch das Proteasom markieren kann.²⁸⁰ Es ist also denkbar, dass MuRF1 beim normalen Sarkomerumsatz verschiedene Bestandteile der dünnen Filamente abbaut, wie Aktin, Troponin I, Troponin T und T-Cap (von den letztgenannten ist eine Interaktion zumindest im Hefe-2-Hybrid-System gezeigt²⁸¹), durch den Verlust von MuRF2 und MuRF3 jedoch die Komponenten der dicken Filamente, insbesondere Myosin, nicht abgebaut werden können. Außerdem spricht das Fehlen von Proteinaggregaten in den Skelettmuskeln der MuRF1/2-

DKO-Mäuse für nicht redundante Funktionen der MuRFs und verdeutlicht, dass sie *in vivo* höchstwahrscheinlich spezifische Substratproteine, Interaktionspartner und Aufgaben haben.

9.2.3 Fasertypzusammensetzung und Myosinisoformen – Verschiebung zum langsameren Phänotyp und Auftreten regenerativer Prozesse

Es zeigte sich, dass die Fasertypzusammensetzung, das heißt der Anteil an Typ I- und an Typ II-Fasern, im *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* der MuRF2/3-DKO-Mäuse verändert war (Abbildung 33). Im *M. soleus* der MuRF2/3-DKO-Mäuse wurden weniger schnell kontrahierende Typ II-Fasern und mehr intermediäre Fasern nachgewiesen als in den Muskeln der Kontrolltiere. Eine ähnliche Veränderung zeigten auch die MuRF1/2-DKO-Mäuse im *M. soleus*,²⁷⁹ bei den MuRF1/3-DKO-Tieren ist dazu nichts bekannt.¹⁶¹ Im *M. extensor digitorum longus* war die Fasertypverschiebung besonders auffällig. Hier wurden in den MuRF2/3-DKO-Mäuse etwa 7 % Typ I-Fasern detektiert, wohingegen diese im *M. extensor digitorum longus* der Kontrollmäuse fast gar nicht enthalten waren. Dieser Muskel wurde bei keiner der beiden anderen MuRF-DKO-Linien auf seine Fasertypzusammensetzung hin untersucht. Der DKO von MuRF1 und MuRF2 und der von MuRF2 und MuRF3 bewirken also eine Verschiebung der Fasertypzusammensetzung hin zu langsam kontrahierenden Muskelfasern (Typ I, MyHC- β /slow enthaltend).

Eine mögliche Ursache für die beobachtete Verschiebung zu mehr MyHC- β /slow enthaltenden Fasern liegt in der erhöhten Expression der *Myh7*-mRNA, die für MyHC- β /slow kodiert. In allen vier untersuchten Muskeln war die *Myh7*-Expression im MuRF2/3-DKO erhöht (Abbildung 34). Das verstärkte Auftreten von MyHC- β /slow wird demnach durch eine gesteigerte Transkription hervorgerufen. Weitere Faktoren, die zu einem erhöhten MyHC- β /slow-Gehalt führen, könnten ein verringerter Proteinabbau oder eine erhöhte Transkriptstabilität sein.

Eine Möglichkeit, wie die MuRFs an der verstärkten Transkription der *Myh7*-mRNA beteiligt sein könnten, ist die Beeinflussung der Aktivität und/oder Lokalisation von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Der Promotor von *Myh7* enthält Bindungsstellen für die E2F-Transkriptionsfaktorfamilie (siehe: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYH7&search=myh7>, abgerufen am 29.09.2014). Willis *et al.*²⁰⁸ zeigten, dass MuRF1 und MuRF2 die Bindung von E2F1 an E2F-regulierte Promotoren verschiedener Gene unterschiedlich beeinflussen. Der Proteingehalt von E2F1 war unverändert, demzufolge spielt der MuRF1- oder MuRF2-vermittelte Abbau dafür keine Rolle. Ein Einfluss auf die

zelluläre Lokalisation von E2F1 wird vermutet. Durch die Abwesenheit von MuRF2 in den MuRF2/3-DKO-Mäusen könnte die Bindung von E2F-Transkriptionsfaktoren an den *Myh7*-Promotor verstärkt und dadurch die Genexpression von *Myh7* erhöht werden.

Von den anderen untersuchten Myosinisoformen enthält nur der Promotor von *Myh1* Bindungsstellen für E2F-Transkriptionsfaktoren. Da die Regulation dieses Gens in den verschiedenen Muskeln unterschiedlich ausfällt, scheinen hier mehrere Transkriptionsfaktoren eine Rolle zu spielen. Alle fünf untersuchten Myosinisoformen haben zum Beispiel mindestens eine Bindungsstelle für GATA-Transkriptionsfaktoren in ihren Promotorregionen (siehe <http://www.genecards.org> und dortige Verknüpfung zu Chip-qPCR-Assays von Qiagen, beispielsweise für *Myh7*: http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?factor=Over+200+TF&species_id=0&ninfo=n&ngene=n&nfactor=y&gene=MYH7, abgerufen am 29.09.2014).²⁸² Eine verstärkte Expression von GATA-2 wurde bereits im Zusammenhang mit einer durch β 2-adrenerger Stimulation hervorgerufenen Skelettmuskelhypertrophie, einem erhöhten Verhältnis von langsam zu schnell kontrahierenden Fasern und einem gesteigerten Proteingehalt an MyHC- β /slow gezeigt.²⁸³ Eine Beteiligung dieser Transkriptionsfaktorfamilie an der veränderten Expression der Myosine in den MuRF2/3-DKO-Mäusen ist deshalb denkbar.

Im *M. tibialis anterior* und im *M. gastrocnemius-plantaris* ist die Expression von *Myh2* erhöht und im *M. gastrocnemius-plantaris* steigt auch die *Myh1*-Expression. Die Expression der im WT überwiegenden, sehr schnell kontrahierenden Myosinisoform MyHC-2b, kodiert von *Myh4*, ist unverändert. Eine erhöhte *Myh1*- und *Myh2*-Expression bei gleichbleibender *Myh4*-Expression könnte einen erhöhten Gehalt an Typ IIA- und Typ IID/X-Fasern und einen reduzierten Anteil an den sehr schnell kontrahierenden Typ IIB-Fasern bewirken. Dies könnte auch im *M. gastrocnemius-plantaris* und im *M. tibialis anterior* zu einem insgesamt langsameren Kontraktionsverhalten der Muskeln führen.

Weiterhin war die mRNA-Expression der embryonalen Myosinisoform (kodiert durch *Myh3*) in allen vier untersuchten Muskeln in den MuRF2/3-DKO-Mäusen erhöht. Das Auftreten von embryonalem Myosin im Muskelgewebe erwachsener Mäuse ist ein Anzeichen für regenerierende und differenzierende Muskelfasern.^{284–286} Ein Nachweis des Proteins war jedoch mit dem hier verwendeten Antikörper nicht möglich.

Die Auswertung gefärbter Gefrierschnitte der Skelettmuskeln *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* offenbarte ein weiteres Merkmal der Regeneration. Es zeigte sich, dass die

Muskeln der MuRF2/3-DKO-Tiere mehr Muskelfasern mit zentral gelegenen Nuclei enthielten (Abbildung 26). Diese treten als unspezifisches Merkmal bei verschiedenen Myopathien auf^{209,287} und kennzeichnen regenerierendes Muskelgewebe.^{211–213,288,289} Die gesteigerte *Myh3*-mRNA-Expression und das Auftreten zentral gelegener Nuclei legen nahe, dass der DKO von MuRF2 und MuRF3 die Aktivierung von regenerativen Prozessen bedingt.

9.2.4 Muskelspezifische Veränderungen der Faserquerschnittfläche

Die im *M. soleus* der MuRF2/3-DKO-Mäuse auftretende erhöhte Variabilität der Muskelfaserquerschnitte ist ein unspezifisches Merkmal für Muskelerkrankungen (Myopathien, Abbildung 27). Diese Veränderung wurde zum Beispiel bei der zentronukleären Myopathie,^{209,210,290} der Muskeldystrophie des Typs Duchenne,^{287,291} bei Filaminopathien^{292,293} und FHL1-assoziiertes Myopathie²⁹⁴ nachgewiesen.

Im *M. extensor digitorum longus* kam es zu einer Verschiebung zu kleineren Faserquerschnitten. Einerseits liegt das am verstärkten Auftreten von Typ I-Fasern, die, wie die immunhistochemischen Analysen und die ATPase-Färbung zeigen (Abbildung 29, Abbildung 31), im Vergleich zu den anderen Fasern sehr klein sind. Andererseits könnte auch die veränderte Expression der MyHC-2-Isoformen zu einem höheren Gehalt an Typ IIA-Fasern führen, was in einem durchschnittlich kleineren Faserquerschnitt resultiert. So analysierten Augusto *et al.*²³ die Querschnitte der Fasern in C57/BL6J-Mäusen und ermittelten für Typ IIB-Fasern einen Querschnitt von $1600 \pm 456 \mu\text{m}^2$ und für Typ IIA-Fasern von $207 \pm 265 \mu\text{m}^2$ im *M. extensor digitorum longus*. Itoh *et al.*²⁹⁵ zeigten, dass auch im *M. extensor digitorum longus* von Ratten eine Zunahme von Typ IIA-Fasern mit einem durchschnittlich kleineren Muskelfaserquerschnitt korrelierte. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die in den MuRF2/3-DKO-Muskeln beobachtete Reduktion der Faserquerschnittfläche eher durch die Veränderung der Fasertypzusammensetzung zu erklären ist als durch die Atrophie der Muskelfasern. Dafür spricht auch, dass das Gewicht der analysierten MuRF2/3-DKO-Muskeln nicht verringert war.

9.2.5 Verringerte maximale Kraftentwicklung

Die Messung der maximalen Muskelkraft vom *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* zeigte eine Reduktion in der Kraftentwicklung in den Muskeln der MuRF2/3-DKO-Mäuse um etwa ein Drittel im Vergleich zu den Muskeln der Kontrollen (Abbildung 35). Von den MuRF1/2-

DKO-Tieren sind keine Daten über ihre Skelettmuskelkraft veröffentlicht. Die MuRF1/3-DKO-Mäuse hatten eine um zwei Drittel verringerte Maximalkraft in den beiden Muskeln und damit eine stärkere Beeinträchtigung der Skelettmuskelfunktion.¹⁶¹ Diese starke Beeinträchtigung führt vermutlich zu der beobachteten geringeren Mobilität der MuRF1/3-DKO-Mäuse, die bei den MuRF2/3-DKO-Mäusen unter Normalbedingungen nicht zu erkennen ist. Die wahrscheinliche Hauptursache für die herabgesetzte maximale Kraftentwicklung in den MuRF2/3-DKO-Mäusen ist die verringerte Masse an funktionsfähiger Muskulatur. Da die Muskelmasse an sich unverändert ist, aber in beiden Muskeln funktionslose Bereiche, welche die Ablagerungen enthalten, vorhanden sind, ist der Anteil an krafterzeugender Muskelmasse geringer, wodurch wiederum die maximale Kraftentwicklung vermindert wird.

In den MuRF2/3-DKO-Mäusen ist der Anteil an Typ I-Fasern in beiden Muskeln erhöht. Diese relative Zunahme des langsam kontrahierenden Fasertyps kann maßgeblich zur Verringerung der maximalen Kraftentwicklung beitragen. Mäuse mit einem KO für den Protease-aktivierten Rezeptor 1 haben einen erhöhten Anteil an Typ I-Fasern sowie weniger Typ IIB- und IIX-Fasern im *M. soleus* im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren. Dies resultiert in längeren Kontraktions- und Relaxationszeiten, einer erhöhten spezifischen Kraft bei Stimulationsfrequenzen von 5 bis 20 Hz sowie einer geringeren Ermüdbarkeit und damit insgesamt einem langsamer kontrahierenden Phänotyp des Muskels.²⁹⁶ Dieser Effekt entspricht zumindest teilweise dem der MuRF2/3-DKO-Tiere. Umgekehrt führte der durch Clenbuterol (β 2-adrenerger Agonist) induzierte Anstieg an Typ II-Fasern im *M. soleus* zu einer Kraftentwicklung und einem Relaxationsverhalten vergleichbar mit schnell kontrahierenden Muskeln.²⁹⁷

Es ist zu vermuten, dass die Ablagerungen an sich bereits zu einer reduzierten Kontraktilität führen. Denkbar ist, dass die für die Kontraktionsauslösung wichtige Signalübermittlung von der Plasmamembran auf die sarkoplasmatische Membran, die normalerweise aneinander gekoppelt sind,² durch die Ablagerungen gestört ist. Die im Zellinneren der MuRF2/3-DKO-Muskeln akkumulierenden Proteine könnten außerdem den intrazellulären Proteinabbau insgesamt behindern (Proteasom und Autophagie), dadurch die Funktionsfähigkeit beeinträchtigen und zur Myopathie mit reduzierter Kraftentwicklung führen. So wird in Mäusen mit einem Atrogin-1-KO das Atrogin-1-Substrat *charged multivesicular body protein 2B* (CHMP2B), das für die Autophagie benötigt wird, nicht abgebaut. Dadurch ist der Proteinabbau über das Autophagie/Lysosom-System gestört, Proteinaggregate sammeln sich in den Kardiomyozyten an, führen zur Apoptose der Zellen und schließlich zur kardialen Myopathie.²⁹⁸ Auch eine Sepsis-induzierte Myopathie führte zu verringerter Kraftentwicklung sowohl in der Zwerchfell- als auch in der Beinmuskulatur in einem Hamstermodell²⁹⁹ und in

der Daumenmuskulatur (*M. adductor pollicis*) von kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation.³⁰⁰

9.3 Herzmuskulatur

9.3.1 Unveränderte Morphologie des Herzens

Im Gegensatz zu den MuRF1/2- und MuRF1/3-DKO-Mäusen führte der DKO von MuRF2 und MuRF3 nicht zu einer basalen kardialen Hypertrophie (Abbildung 38).^{161,191,208} Entsprechend der Bedeutung des MuRF3-KO für die Entwicklung einer Skelettmuskelmyopathie, scheint die Abwesenheit von MuRF1 für die Ausbildung der kardialen Hypertrophie ausschlaggebend zu sein.

In den histologischen Färbungen der Herzschnitte waren keine Unterschiede zwischen den Herzen der Kontroll- und der MuRF2/3-DKO-Tiere zu erkennen. Es wurde keine Fibrose festgestellt und es traten keine Ablagerungen innerhalb der Kardiomyozyten auf (Abbildung 39). Letzteres spricht für unterschiedliche Funktionen von MuRF2 und MuRF3 in Herz- und in Skelettmuskelzellen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen keine Veränderungen der Sarkomerstruktur in den Kardiomyozyten erkennen, wie es für die MuRF1/3-DKO- und die MuRF1/2-DKO-Tiere gezeigt wurde.^{161,191,208} Der Unterschied zu den beiden anderen MuRF-DKO-Linien verstärkt die Vermutung, dass MuRF1 für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion des Herzens das wichtigste MuRF-Familienmitglied ist. Leider ist nichts über die Sarkomerstruktur in den Herzen der MuRF1-KO-Mäuse veröffentlicht, sodass nichts darüber gesagt werden kann, ob die anderen beiden MuRFs das Fehlen von MuRF1 ausgleichen können. Über die Auswirkungen des MuRF2-KO auf die Ultrastruktur der Sarkomere ist ebenfalls nichts bekannt. In den MuRF3-KO-Tieren ist der Abstand zwischen den Z-Scheiben der Sarkomere in den Kardiomyozyten erhöht.¹⁹² Warum diese Veränderung in den Kardiomyozyten der MuRF2/3-DKO-Mäuse nicht auftritt, ist ungeklärt.

9.3.2 Erhöhte *Myh7*-Expression, aber kein Anstieg der Stressmarker *Nppa* und *Nppb*

In den Herzen der MuRF2/3-DKO-Mäuse wurde *Myh7* im Vergleich zu den Kontrolltieren verstärkt exprimiert (Abbildung 41). Auch in den MuRF1/2-DKO- und MuRF1/3-DKO-Mäusen wurde eine verstärkte *Myh7*-Expression im Herzen gemessen.^{161,208} Die gesteigerte Expression

von *Myh7* wurde als ein weiteres Merkmal der beobachteten kardialen Hypertrophie, nämlich der Induktion des fötalen, kardialen Genprogramms, gewertet.^{119,120,123} Dementsprechend stieg bei den MuRF1/2-DKO-Mäusen auch die Expression von *Nppa* (ANF), *Nppb* (BNP) und *Acta2* (Aktin alpha 2, glatte Muskulatur) und bei den MuRF1/3-DKOs die Expression von *Nppa*.^{161,208} Da in den MuRF2/3-DKO-Mäusen trotz fehlender kardialer Hypertrophie und keiner signifikanten Veränderung von *Nppa* und *Nppb* ein Anstieg der *Myh7*-Expression auftrat, lässt sich schlussfolgern, dass die MuRFs die Transkription der Myosine beeinflussen können, wie es schon für die Skelettmuskulatur diskutiert wurde. Ein Zusammenhang zwischen der kardialen Myosinexpression, dem Ca²⁺-Signaling und dem Transkriptionsfaktor GATA4 wurde bereits gezeigt.^{301,302} Eine weitere Erklärung wäre allerdings, dass die gesteigerte *Myh7*-Expression auch in den MuRF2/3-DKO-Mäusen ein Kennzeichen für Hypertrophie darstellt. Denn obwohl das Organ selbst nicht hypertrophiert war, waren die isolierten Kardiomyozyten größer als die aus den Herzen der Kontrolltiere.

9.3.3 Echokardiographie – Verminderte Herzfunktion

Die echokardiographische Analyse ergab eine verringerte Kontraktilität und eine herabgesetzte systolische Leistung der MuRF2/3-DKO-Hezen im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 43). Auch die MuRF1/2- und die MuRF1/3-DKO-Mäuse wiesen eine verringerte Herzfunktion auf.^{161,191,208} Dies bedeutet, dass MuRF2 und MuRF3 die Herzleistungen beeinflussen und dass der Verlust der beiden E3-Ligasen zu einer Verschlechterung der systolischen und diastolischen kardialen Funktion führt. Eine mögliche Ursache für die beeinträchtigte Herzfunktion kann in der schlechteren Kontraktilität der Kardiomyozyten liegen (siehe Abschnitt 9.3.5).

9.3.4 Keine veränderte Reaktion auf kardialen Stress

Die Untersuchung der Herzfunktionen *ex vivo* zeigte ebenfalls eine herabgesetzte Kontraktilität der MuRF2/3-DKO-Hezen (geringerer LVP_{sys} und LVP_{dev} unter Basalbedingungen) sowie eine langsamere Relaxation (dLVP/dt_{min}, Abbildung 44). Durch die β1-adrenerge Stimulation wurde der Druck in Kontroll- und DKO-Hezen gleichermaßen erhöht. Folglich wird dieser Signalweg nicht durch den Verlust von MuRF2 und MuRF3 beeinflusst. Allerdings zeigten die MuRF2/3-DKO-Hezen eine geringere Zunahme der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (dLVP/dt_{max}, dLVP/dt_{min}) als die Kontrollen. Dies ist möglicherweise auf gestörte Ca²⁺-Ströme

zurückzuführen. Dieser Punkt wird im Zusammenhang mit den isolierten Kardiomyozyten näher diskutiert (siehe 9.3.5).

Die *in vivo*-Modelle der kardialen Hypertrophieinduktion zeigten keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den MuRF2/3-DKO-Mäusen (Abbildung 45). Von den beiden anderen DKO-Linien ist dazu nichts veröffentlicht. Die MuRF3-KO-Mäuse zeigten unter Basalbedingungen keine Unterschiede zu ihren Kontrollen, Isoprenalin bewirkte jedoch eine reduzierte Kontraktilität, wie sie auch die MuRF2/3-DKO-Mäuse aufwiesen, sowie eine geringere Zunahme des Herzgewichts als in den Kontrolltieren (32 % statt 45 % Zunahme).¹⁹²

Zusammenfassend führte der DKO von MuRF2 und MuRF3 also zu einer verminderten Funktionsfähigkeit des Herzens, die beim Einzelknockout von MuRF3 erst durch kardialen Stress hervorgerufen wurde. Warum der Verlust von MuRF3 in einer geringeren Hypertrophie nach β 1-adrenerger Stimulation resultierte, die Abwesenheit von MuRF2 und MuRF3 jedoch keine Veränderung des Herzgewichts im Vergleich zu den Kontrollen bewirkte, ist ungeklärt. Dies könnte jedoch für die Regulation teilweise gegensätzlicher Prozesse durch die verschiedenen MuRFs in den Kardiomyozyten sprechen.

9.3.5 Verringerte Kontraktionskraft und -geschwindigkeit der primären Kardiomyozyten

Die aus den Herzen der MuRF2/3-DKO-Mäuse isolierten Kardiomyozyten waren größer als die aus den Herzen der Kontrolltiere, zeigten aber keine weiteren Unterschiede (Abbildung 46). Der Verlust von MuRF2 und MuRF3 führt folglich auf zellulärer Ebene zur Hypertrophie. Allerdings muss bedacht werden, dass der Prozess der Primärzellisolation mit einem Verlust von geschädigten Zellen einhergeht und dadurch die Methoden-bedingte Selektion vitaler Kardiomyozyten nicht ausgeschlossen ist. Die Kardiomyozyten der MuRF1/2-DKO-Tiere waren ebenfalls hypertroph. Ihre Größe wurde jedoch nicht direkt gemessen, sondern in Gewebeschnitten als Zellanzahl je Fläche bestimmt. Die Zunahme der Zellgröße wurde als eine Ursache für die kardiale Hypertrophie angesehen.¹⁹¹ Diese Zunahme der Herzgröße fehlt jedoch bei den MuRF2/3-DKO-Tieren. Möglicherweise wirken andere im Herzen vorkommende Zellen, wie Fibroblasten, Neuronen, Zellen der Blutgefäße etc., die etwa die Hälfte des murinen Herzens ausmachen,³⁰³ der Hypertrophie der Kardiomyozyten *in vivo* entgegen.

Die Kardiomyozyten aus den MuRF2/3-DKO-Hezen hatten kleinere Kontraktionsamplituden und geringere Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten. Dies deutet darauf hin, dass

die schlechteren Herzfunktionen der Mäuse auf Beeinträchtigungen der Funktion der einzelnen Myozyten basieren. Eine mögliche Ursache ist die herabgesetzte Ca^{2+} -Handhabung, die sich in geringeren Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Einstroms in das und Herauspumpen aus dem Zytoplasma äußert. Es wurde bereits publiziert, dass langsame Ca^{2+} -Ströme die Kontraktionsfähigkeit reduzieren und geringere Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten nach sich ziehen. Im Gegensatz dazu führte eine Verbesserung dieser Ca^{2+} -Ströme zu gesteigerten Kontraktionsamplituden und Kontraktions- sowie Relaxationsgeschwindigkeiten.^{304,305}

9.4 Massenspektrometrische Analyse von Skelettmuskellysaten

Die Proteine, die laut der MS-Analyse im *M. soleus* der DKO-Mäuse angereichert waren und deren cDNA in Expressionsplasmide kloniert wurden, kolokalisierten nicht mit MuRF2 oder MuRF3 und es konnte auch keine Interaktion festgestellt werden (Abbildung 50, Abbildung 51). Dies kann bedeuten, dass die angereicherten Proteine aufgrund sekundärer Effekte, wie zum Beispiel einer allgemein gestörten Proteindegradation, akkumulieren oder dass für eine Interaktion mit den MuRFs weitere Bindungspartner benötigt werden.

9.4.1 Erhöhter Gehalt an MAPKAP-K3 und MAPKAP-K2

Die Analyse von Muskellysaten aus dem *M. soleus*, *M. gastrocnemius-plantaris* und aus dem linken Ventrikel des Herzens bestätigte die massenspektrometrisch gemessene erhöhte Proteinexpression von MAPKAP-K3 in den MuRF2/3-DKO-Mäusen (Abbildung 52). Auch das nahe verwandte MAPKAP-K2 war angereichert. Scharf *et al.*²⁶⁸ zeigten, dass es in MAPKAP-K2/3-DKO-Mäusen zu einem erhöhten Anteil an langsam kontrahierenden Muskelfasern, zu einer verstärkten Proteinexpression von MyHC- β /slow und MyHC-2a und einer verringerten Proteinexpression von MyHC-2d/x sowie zu einer Zunahme von der in langsamen Muskelfasern vorherrschenden SERCA2a-Isoform kommt. Dies ging einher mit einer Zunahme der Muskelkraft im *M. soleus* und beschleunigten und verstärkten Ca^{2+} -Strömen in Kardiomyozyten. Die MuRF2/3-DKO-Mäuse zeigten ebenfalls eine Verschiebung zu langsamer kontrahierenden Myosinisformen, jedoch reduzierte Muskelkraft im *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* sowie verringerte und langsamere Ca^{2+} -Ströme in den Kardiomyozyten. Da die Veränderungen der Ca^{2+} -Ströme in den MAPKAP-K2/3-DKO-Mäusen auf die erhöhte Expression der SERCA2a-Isoform zurückgeführt wurde, wurde dessen Gehalt

in den MuRF2/3-DKO-Mäusen analysiert. Die Proteinexpression von SERCA2a war in den MuRF2/3-DKO-Mäusen unverändert im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 53). Die veränderten Ca^{2+} -Ströme und die dadurch verursachte langsamere und reduzierte Kontraktion der Kardiomyozyten aus den MuRF2/3-DKO-Mäusen beruht demzufolge nicht auf einem geringeren Gehalt an SERCA2a. Möglicherweise ist jedoch die Aktivität dieser Ca^{2+} -Pumpe herabgesetzt. Transgene Mäuse, die eine etwa zweifach erhöhte Expression des SERCA2a-Regulators Phospholamban aufwiesen, hatten eine kleinere Verkürzungsfraction und längere Kontraktionszeit des linken Ventrikels. Aus diesen Tieren isolierte Kardiomyozyten kontrahierten weniger und langsamer und die Ca^{2+} -Ströme fielen geringer und langlebiger aus, was im Zusammenhang mit einer reduzierten Ca^{2+} -Affinität von SERCA2a stand.³⁰⁶ Die Effekte durch die verstärkte Phospholambanexpression sind denen in den Kardiomyozyten der MuRF2/3-DKO-Mäuse sehr ähnlich. Möglicherweise ist in den MuRF2/3-DKO-Mäusen die Phospholambanexpression oder dessen Phosphorylierungsstatus verändert^{307,308} und dadurch kommt es zu den beobachteten Beeinträchtigungen.

MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 werden durch die verschiedenen Isoformen der MAP Kinase p38 phosphoryliert und dadurch aktiviert.^{214,254} p38 ist an der Differenzierung von Muskelzellen beteiligt.^{309–311} Eine verstärkte Aktivierung von p38 wurde sowohl bei kardialen Erkrankungen, wie Hypertrophie oder Herzversagen,^{312–314} als auch nach Verletzungen von Skelettmuskeln gezeigt.³¹⁵ Das erhöhte Vorkommen von MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 könnte deshalb im Zusammenhang mit der Aktivierung von p38-Signalwegen stehen. Die Bindung von p38 an MAPKAP-K2 oder MAPKAP-K3 führt zur Stabilisierung des Proteins und dadurch zu dessen Anreicherung.²¹⁴ Aus diesem Grund wurde der p38-Gehalt in den MuRF2/3-DKO-Mäusen untersucht. Entgegen den Erwartungen war p38 in den Muskeln der MuRF2/3-DKO-Tiere trotz des erhöhten Gehalts von MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 nicht angereichert (Abbildung 52). MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 können auch p38-unabhängig wirken. Die Untersuchung von vaskulären glatten Muskelzellen, die mit einem für MAPKAP-K3-kodierenden Plasmid transfiziert wurden, ergab, dass die MAPKAP-K3-Überexpression zur Aktivierung verschiedener Signalwege führte (AP-1 (*activator protein 1*), Myc, NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), CRE (*cyclic adenosine monophosphate response element*), SRE (*serum response element*)) und es dadurch eine Vielzahl von zellulären Prozessen beeinflusst.³¹⁶ Möglicherweise spielt einer dieser Signalwege eine Rolle bei der Ausprägung des MuRF2/3-DKO-Phänotyps.

Scharf *et al.*²⁶⁸ haben gezeigt, dass MAPKAP-K2 den MyHC-2d/x-Promotor aktiviert. Die Fasertypverschiebung zu langsamer kontrahierenden Muskelfasern und die Reduktion von

MyHC-2d/x wird in den MAPKAP-K2/3-DKO-Mäusen deshalb zumindest teilweise durch den Verlust dieser Kinase erklärt. In Übereinstimmung dazu kam es in den MuRF2/3-DKO-Mäusen im *M. extensor digitorum longus* und *M. gastrocnemius-plantaris* der Männchen zu einem Anstieg der *Myh1*-mRNA-Expression (kodiert für MyHC-2d/x). Im *M. soleus* jedoch ist trotz gesteigertem MAPKAP-K2-Gehalt eine geringere Expression der *Myh1*-mRNA festgestellt worden. Abgesehen davon, dass der *Myh1*-Promotor auch durch andere Proteine reguliert wird (zum Beispiel p38²⁶⁸), müssen im *M. soleus* Faktoren vorhanden sein, die dort die MAPKAP-K2-Aktivität hemmen. Wie bereits diskutiert, könnte die vermehrte Expression von MyHC-2d/x zu einem langsameren Phänotyp in den hauptsächlich aus schnell kontrahierenden Fasern bestehenden Muskeln *M. extensor digitorum longus* und *M. gastrocnemius-plantaris* führen. Im *M. soleus* ist jedoch vorwiegend die verstärkte Expression von MyHC-β/slow dafür verantwortlich und die reduzierte Expression von MyHC-2d/x steigert diesen Effekt. Die unterschiedliche Regulation vom MyHC-2d/x-Promotor und von MAPKAP-K2 in den verschiedenen Muskeln ist also Teil der Entwicklung eines gleichgerichteten Phänotyps (langsamer) in den unterschiedlichen Muskeln.

Bisher ungeklärt ist, ob und wie MuRF2 und MuRF3 mit MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 wechselwirken. Die Koexpression der MuRFs mit den Kinasen in COS-7- und C2C12-Zellen reduzierte den Gehalt an MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 nicht. Sie sind deshalb wahrscheinlich keine Substrate für diese Ubiquitin-Ligasen.

9.4.2 SRA1 und DDX17

Das SRA1-Protein hat eine die Transkription regulierende Funktion, denn es bindet an verschiedene Steroidrezeptoren, wie Androgen-, Glukokortikoid- und Östrogenrezeptoren und an diverse Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel HAND1, GATA1 und CREB1.^{242–244} Langsam kontrahierende Fasern, wie sie im *M. soleus* vorhanden sind, enthalten mehr Östrogen- und Glukokortikoidrezeptoren, als schnell kontrahierende Fasern und reagieren dadurch empfindlicher auf entsprechende Stimuli.^{317,318} Die in MuRF2/3-DKO-Muskeln gezeigte Verschiebung zu langsamer kontrahierenden Fasern könnte diesen Effekt verstärken. Es gibt diverse Veröffentlichungen, die die Wirkung verschiedener Steroide auf die Muskulatur beschreiben. Zum Beispiel führen die steroiden Geschlechtshormone Testosteron und Östrogen überwiegend zur Skelettmuskelhypertrophie bzw. -atrophie, ohne die Fasertypzusammensetzung zu verändern.^{319–322} Glukokortikoide hingegen können im *M. soleus* und im *M. extensor digitorum longus* die Verschiebung zu schneller kontrahierenden

Fasern bewirken,³²³ im *M. plantaris* wurde ein derartiger Effekt nicht beobachtet.³²⁴ Die zusammenfassende Beurteilung dieser Prozesse wird dadurch erschwert, dass in den verschiedenen Studien unterschiedliche Spezies, Geschlechter, Krankheitsmodelle, Substanzen, Verabreichungsformen, Zeiträume und Muskeln untersucht wurden und dass unterschiedliche Muskeln auf die gleichen Stimuli anders reagieren. Die weitere Analyse der SRA1-Funktion könnte dennoch lohnenswert sein, da es nicht nur in Skelettmuskel- und Satellitenzellen, sondern auch im Herzen eine Rolle spielt. So führte die Ausschaltung des Genprodukts im Zebrafisch mittels Morpholino-Nukleinsäure-Analogen zu einem Phänotyp mit herabgesetzter Kontraktilität der Herzkammer, also einer verringerten Herzfunktion, und mit perikardialen Ödemen.³²⁵ Möglicherweise trägt eine Störung der SRA1-Funktion zu der verringerten Kontraktilität der MuRF2/3-DKO-Herzen und -Kardiomyozyten bei. Weitere Analysen werden dadurch erschwert, dass SRA1 als RNA und als Protein wirkt und diese Wirkung nicht nur durch den Gehalt des jeweiligen Moleküls, sondern auch durch das Verhältnis der beiden bestimmt wird.²⁴¹

DDX17 ist neben seiner Funktion als Helikase auch als Transkriptionsregulator bekannt.³²⁶ Es beeinflusst verschiedene Steroidrezeptor-Signalwege, wie den des Östrogenrezeptors α ^{239,327} und des Androgenrezeptors³²⁸ und bindet an Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel MyoD²³⁸ und NFAT5.³²⁹ Abgesehen von der Bindung und dadurch Beeinflussung der Aktivität von MyoD ist wenig über die Funktion von DDX17 in der Muskulatur bekannt. Paul *et al.*³³⁰ berichten von einer DDX17-Anreicherung in Myoblastenzelllinien mit myotoner Dystrophie des Typs 1. DDX17 interagiert mit dem Spleißregulator *muscleblind1* und ist deshalb möglicherweise an der Entwicklung der RNA-Spleißdefekte beteiligt, die bei dieser Muskelerkrankung auftreten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass DDX17 die Transkription der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 fördert, indem es zusammen mit anderen Proteinen dessen Promotor aktiviert.³³¹ Ob eine dieser Funktionen auch im Zusammenhang mit MuRF2 oder MuRF3 auftreten und ob DDX17 dabei allein oder mit DDX5 und/oder SRA1 zusammenarbeitet, wie es bereits für die Regulation der MyoD-Aktivität gezeigt wurde,^{238,240} muss noch erforscht werden.

9.4.3 MLF2

MLF2 wird in Brustkrebsstammzellen, die aus Patienten mit Brustkrebs entnommen wurden, verstärkt exprimiert.^{251,332} MLF2 ist in den Stickstoffmonoxid-Signalweg involviert und seine Expression wird durch Hypoxie induziert.³³² Eine Anreicherung von MLF2 im *M. soleus* der DKO-Tiere könnte demzufolge auf eine verringerte Sauerstoffverfügbarkeit in den Muskeln

hindeuten. Möglicherweise behindern die unterhalb der Muskelzellmembran liegenden Aggregate in den MuRF2/3-DKO-Tieren die Sauerstoffübertragung in das Zellinnere, führen dadurch zu einem intrazellulären Sauerstoffmangel und dieser zur verstärkten MLF2-Expression. Eine weitere Ursache für die MLF2-Anreicherung legt die Veröffentlichung von Kim *et al.*³³³ nahe. Hier wird beschrieben, dass es in *Drosophila* ein MLF-Ortholog gibt (dMLF), welches die Toxizität von sich ablagernden, Polyglutaminsequenzen-enthaltenden Proteinen vermindert. Es befindet sich in diesen intrazellulären Einlagerungen (*inclusions, inclusion bodies*) und es wird vermutet, dass durch die Bindung an diese Proteine eine Zusammenlagerung der Polyglutaminsequenzen verhindert und dadurch die Toxizität herabgesetzt wird. Die Expression von dMLF, humanem MLF1 und humanem MLF2 in kultivierten Rattenneuronen verringerte jeweils das Ausmaß der Einlagerungen und die Toxizität. Es wäre denkbar, dass MLF2 nicht nur beim Auftreten von veränderten, Polyglutaminsequenzen-aufweisenden Proteinen verstärkt exprimiert wird, sondern auch bei anderen Proteinablagerungen, wie zum Beispiel bei denen in den Muskeln der MuRF2/3-DKO-Mäuse, und dadurch einer möglichen Zytotoxizität entgegenwirkt.

9.4.4 SMYD2

Die Lysin-Methyltransferase SMYD2 kann Methylgruppen auf nukleäre und auf zytoplasmatische Proteine übertragen.^{247–249,334–336} Die in dieser Arbeit gezeigte überwiegend zytoplasmatische Lokalisation von SMYD2 lässt vermuten, dass die Methylierung dortiger Proteine die hauptsächliche Funktion des Enzyms darstellt. Möglicherweise führt jedoch die Überexpression an sich oder die Markierung des Proteins mit dem FLAG-Peptid zu einer veränderten Lokalisation. Der Transfer in den Nukleus könnte auch erst durch verschiedene Signale ausgelöst werden bzw. die Interaktion mit weiteren Proteinen erfordern, da SMYD2 selbst keine Sequenz aufweist, die als nukleäres Lokalisationssignal dient.²⁴⁹ SMYD2 methyliert unter anderem Hsp90, welches eine Chaperonfunktion für naszierendes Myosin ausübt und dadurch die korrekte Assemblierung der Myosinfilamente und deren Einbau in gerade entstehende Sarkomere unterstützt.³³⁷ Zebrabärblinge mit reduziertem SMYD2-Gehalt wiesen dementsprechend Störungen der Sarkomere in den Bereichen der Z-Scheiben und I-Banden auf, sie waren weniger beweglich, hatten fehlgeformte Schwänze, niedrigere Herzfrequenzen und eine verminderte Herzfunktion.²⁴⁹ Im Gegensatz dazu beschreiben Diehl *et al.*,³³⁸ dass der KO von SMYD2 in Kardiomyozyten keinen Einfluss auf die Entwicklung des Herzens in der Maus hat. Es wird vermutet, dass andere Lysin-Methyltransferasen, wie SMYD1, den Verlust von SMYD2 kompensieren.

Da SMYD2 die Assemblierung und Stabilität von Myofilamenten fördert, könnte der erhöhte SMYD2-Gehalt in den MuRF2/3-DKO-Muskeln auf den erhöhten Anteil regenerierender Muskelfasern zurückzuführen sein. In diesen Fasern werden neue Sarkomere gebildet, dabei könnte die stabilisierende Funktion von SMYD2 mitwirken. Außerdem zeigten die MuRF2/3-DKO-Mäuse eine veränderte Fasertypzusammensetzung. Möglicherweise spielt SMYD2 auch beim Ersatz der Myosinisoformen in den Myofilamenten eine unterstützende Rolle.

9.5 Fazit

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der MuRF2/3-DKO die Morphologie und die Funktion der Skelett- und Herzmuskulatur beeinflusst. Die hier erzielten Erkenntnisse liefern einen entscheidenden Beitrag zum genaueren Verständnis der Aufgaben der verschiedenen MuRF-Familienmitglieder. Der Vergleich des MuRF2/3-DKO-Phänotyps mit den Phänotypen der MuRF1/2- und MuRF1/3-DKO-Mäuse ermöglicht es, die distinkten Funktionen der E3-Ligasen einzugrenzen. Hierbei wird deutlich, dass diese Funktionen zwar vorwiegend von einem MuRF-Familienmitglied übernommen werden, aber stets noch mindestens ein anderes MuRF vergleichbare Aufgaben übernehmen kann. Das Auftreten der Herz- und Skelettmuskelhypertrophie in den MuRF1/2- und MuRF1/3-DKO-Mäusen und dessen Fehlen in den MuRF2/3-DKO-Tieren zeigt zum Beispiel deutlich, dass hauptsächlich MuRF1 diese Prozesse vermittelt. Da die MuRF1-KO-Mäuse jedoch keine Hypertrophie aufweisen, müssen auch MuRF2 oder MuRF3 eine entscheidende Rolle übernehmen. MuRF3 hingegen ist der Hauptakteur bei der Aufrechterhaltung der funktionsfähigen Skelettmuskelstruktur. Die MuRF1/3- und MuRF2/3-DKO-Mäuse haben myosinhaltige Aggregate in ihren Skelettmuskeln und zeigen eine beeinträchtigte Muskelkraft. Für die Vermeidung dieses Phänotyps ist die Anwesenheit von MuRF3 ausreichend, denn die MuRF1/2-DKO-Mäuse weisen keine Aggregate auf. Für die Entstehung des Phänotyps hingegen muss auch MuRF1 oder MuRF2 fehlen, da der Einzelknockout von MuRF3 ebenfalls keine Aggregatbildung bewirkt. Dieses Resultat ist insoweit unerwartet, als dass auch für MuRF1 gezeigt wurde, dass es Myosine ubiquitinieren und dadurch für den proteasomalen Abbau markieren kann. *In vivo* scheint diese Funktion jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Eine weitere Erkenntnis ist, dass die MuRFs an der Regulation der Ca²⁺-Ströme in den Kardiomyozyten beteiligt sind. Dies verdeutlicht, dass die Funktionen dieser E3-Ligasen über die bloße Regulation der Muskelstruktur hinausgehen und macht sie als therapeutischen Ansatzpunkt für Erkrankungen, die mit einer kardialen Funktionsbeeinträchtigung einhergehen, interessant.

10. Literaturverzeichnis

- 1 Czihak G, Baron D. *Biologie: ein Lehrbuch*. Springer: Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Budapest; Hongkong; London; Mailand; Paris; Santa Clara; Singapur; Tokio, 1996, Kapitel 5.3 und 6.7.2.3.
- 2 Benninghoff A, Drenckhahn D. *Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen 1*. Urban & Schwarzenberg: München [u.a.], 2008, Kapitel 3.7.
- 3 Müller W, Frings S. *Tier- und Humanphysiologie: eine Einführung ; mit 14 Tabellen*. Springer: Berlin [u.a.], 2004, Kapitel 16, 3.1.
- 4 Günther S, Kruse K. Spontaneous waves in muscle fibres. *New Journal of Physics* 2007; **9**: 417.
- 5 Davidson VL, Sittman DB, Hyde RM, Grässel S. *Intensivkurs: Biochemie: mit 50 Tabellen*. Urban und Schwarzenberg: München; Wien; Baltimore, 1996, Kapitel 4 V, Abb. 4-12, 4-13.
- 6 Weiss A, Leinwand LA. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 417–439.
- 7 Chromiak JA. *Essentials of Sports Nutrition Study Guide*. Humana Press: Totowa, NJ, 2008 <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-59745-302-8> (accessed 17 Aug 2014).
- 8 Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; **76**: 371–423.
- 9 Nelson DL, Beginnen K, Cox MM, Lehninger AL, Nelson-Cox. *Lehninger Biochemie: mit 40 Tabellen*. Springer: Berlin [u.a.], 2005, Kapitel 7.3; Abb. 7-32 Mit freundlicher Genehmigung von Springer Science+Business Media
- 10 Lodish HF (ed.). *Molecular cell biology*. 4th ed. W.H. Freeman: New York, 2000, Kapitel 18.
- 11 Hanson J, Huxley HE. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* 1953; **172**: 530–532.
- 12 Karagounis LG, Hawley JA. Skeletal muscle: increasing the size of the locomotor cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; **42**: 1376–1379.
- 13 Korthuis RJ. *Skeletal muscle circulation*. Morgan & Claypool Life Sciences: San Rafael, Calif., 2011 <http://public.eblib.com/EBLPublic/PublicView.do?ptiID=881328> (accessed 17 Aug 2014).
- 14 Lauritzen HPMM, Schertzer JD. Measuring GLUT4 translocation in mature muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; **299**: E169–179.
- 15 Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 2011; **91**: 1447–1531.
- 16 Bárány M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 1967; **50**: Suppl:197–218.
- 17 Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 2000; **50**: 500–509.
- 18 Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; **45**: 2191–2199.
- 19 Weiss A, McDonough D, Wertman B, Acakpo-Satchivi L, Montgomery K, Kucherlapati R *et al*. Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 2958–2963.
- 20 Ennion S, Sant’ana Pereira J, Sargeant AJ, Young A, Goldspink G. Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *J Muscle Res Cell Motil* 1995; **16**: 35–43.

- 21 Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1994; **267**: C1723–1728.
- 22 Steinacker JM, Wang L, Lormes W, Reißnecker S, Liu Y. Strukturanpassung des Skelettmuskels auf Training. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 2002; **53**: 354–360.
- 23 Augusto V, Padovani CR, Rocha Campos GE. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 2004; **21**: 89–94.
- 24 Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1994; **77**: 493–501.
- 25 Childs SG. Muscle wasting. *Orthop Nurs* 2003; **22**: 251–257; quiz 258–259.
- 26 Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 1997; **170**: 143–223.
- 27 International Society of Sport Nutrition. *Essentials of sports nutrition and supplements*. Humana Press: Totowa, NJ, 2008.
- 28 Ennion S, Sant’ana Pereira J, Sargeant AJ, Young A, Goldspink G. Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *J Muscle Res Cell Motil* 1995; **16**: 35–43.
- 29 Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1994; **267**: C1723–1728.
- 30 Luedeke JD, McCall RD, Dillaman RM, Kinsey ST. Properties of slow- and fast-twitch skeletal muscle from mice with an inherited capacity for hypoxic exercise. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 2004; **138**: 373–382.
- 31 Asmussen G, Schmalbruch I, Soukup T, Pette D. Contractile properties, fiber types, and myosin isoforms in fast and slow muscles of hyperactive Japanese waltzing mice. *Exp Neurol* 2003; **184**: 758–766.
- 32 Greene EC. *Anatomy of the rat*. 3rd ed. Hafner Publishin Co. Inc.: New York, 1959, Der Urheber konnte mit vertretbaren Mitteln nicht ausfindig gemacht werden.
- 33 Bamman MM, Hunter GR, Stevens BR, Guilliams ME, Greenisen MC. Resistance exercise prevents plantar flexor deconditioning during bed rest. *Med Sci Sports Exerc* 1997; **29**: 1462–1468.
- 34 Borina E, Pellegrino MA, D’Antona G, Bottinelli R. Myosin and actin content of human skeletal muscle fibers following 35 days bed rest. *Scand J Med Sci Sports* 2010; **20**: 65–73.
- 35 Gannon J, Doran P, Kirwan A, Ohlendieck K. Drastic increase of myosin light chain MLC-2 in senescent skeletal muscle indicates fast-to-slow fibre transition in sarcopenia of old age. *Eur J Cell Biol* 2009; **88**: 685–700.
- 36 Snow LM, Sanchez OA, McLoon LK, Serfass RC, Thompson LV. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. *Am J Phys Med Rehabil* 2005; **84**: 770–779.
- 37 Levine S, Kaiser L, Leferovich J, Tikunov B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1997; **337**: 1799–1806.
- 38 Glover EI, Phillips SM. Resistance exercise and appropriate nutrition to counteract muscle wasting and promote muscle hypertrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; **13**: 630–634.
- 39 Agbulut O, Noirez P, Beaumont F, Butler-Browne G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol Cell* 2003; **95**: 399–406.
- 40 Allen DL, Leinwand LA. Postnatal myosin heavy chain isoform expression in normal mice and mice null for IIb or IId myosin heavy chains. *Dev Biol* 2001; **229**: 383–395.

- 41 Wilson JM, Loenneke JP, Jo E, Wilson GJ, Zourdos MC, Kim J-S. The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *J Strength Cond Res* 2012; **26**: 1724–1729.
- 42 Ferreira JCB, Bacurau AV, Bueno CR, Cunha TC, Tanaka LY, Jardim MA *et al.* Aerobic exercise training improves Ca²⁺ handling and redox status of skeletal muscle in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; **235**: 497–505.
- 43 Baehr LM, Tunzi M, Bodine SC. Muscle hypertrophy is associated with increases in proteasome activity that is independent of MuRF1 and MAFbx expression. *Front Physiol* 2014; **5**: 69.
- 44 Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 87–90.
- 45 Tawa NE, Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest* 1997; **100**: 197–203.
- 46 Goldspink DF, Garlick PJ, McNurlan MA. Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscles undergoing compensatory growth and subsequent denervation atrophy. *Biochem J* 1983; **210**: 89–98.
- 47 Schubert GE, Bethke BA. *Lehrbuch der Pathologie und Antwortkatalog zum GK2*. 2nd ed. De Gruyter: Berlin; New York, 1987.
- 48 Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM *et al.* Histochemical and enzymatic comparison of the gastrocnemius muscle of young and elderly men and women. *J Gerontol* 1992; **47**: B71–76.
- 49 Jung B, Nougaret S, Conseil M, Coisel Y, Futier E, Chanques G *et al.* Sepsis is associated with a preferential diaphragmatic atrophy: a critically ill patient study using tridimensional computed tomography. *Anesthesiology* 2014; **120**: 1182–1191.
- 50 Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatr Diabetes* 2011; **12**: 345–364.
- 51 Agrawal S, Thakur P. Kocher-Debre-Semelaigne syndrome. *BMJ Case Rep* 2010; **2010**. doi:10.1136/bcr.04.2010.2877.
- 52 Anderson JE, Liu L, Kardami E. The effects of hyperthyroidism on muscular dystrophy in the mdx mouse: greater dystrophy in cardiac and soleus muscle. *Muscle Nerve* 1994; **17**: 64–73.
- 53 Van Venrooij LMW, Verberne HJ, de Vos R, Borgmeijer-Hoelen MMMJ, van Leeuwen PAM, de Mol BAJM. Postoperative loss of skeletal muscle mass, complications and quality of life in patients undergoing cardiac surgery. *Nutrition* 2012; **28**: 40–45.
- 54 Pandit L, Agrawal A. Neuromuscular disorders in critical illness. *Clin Neurol Neurosurg* 2006; **108**: 621–627.
- 55 Stephens NA, Skipworth RJE, Fearon KCH. Cachexia, survival and the acute phase response. *Curr Opin Support Palliat Care* 2008; **2**: 267–274.
- 56 Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saidi F *et al.* One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2003; **348**: 683–693.
- 57 Schäffler A, Hartmann U. *Biologie, Anatomie, Physiologie: kompaktes Lehrbuch für die Pflegeberufe*. Urban und Fischer: München; Jena, 2000.
- 58 Lederhuber HC, Lange V. *Basics Kardiologie*. Elsevier, Urban & Fischer: München, 2010.
- 59 Dobson GP. On being the right size: heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; **30**: 590–597.
- 60 Penzlin H, Beinbrech G. *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg, 2009.
- 61 Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 2000; **86**: 386–390.

- 62 Lompre AM, Schwartz K, d'Albis A, Lacombe G, Van Thiem N, Swynghedauw B. Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 1979; **282**: 105–107.
- 63 Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1370–1380.
- 64 Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40**: 2023–2039.
- 65 Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 2000; **102**: 470–479.
- 66 Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 2004; **109**: 1580–1589.
- 67 Mesa A, Jessurun C, Hernandez A, Adam K, Brown D, Vaughn WK *et al.* Left ventricular diastolic function in normal human pregnancy. *Circulation* 1999; **99**: 511–517.
- 68 Hunter S, Robson SC. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *Br Heart J* 1992; **68**: 540–543.
- 69 Pluim BM, Lamb HJ, Kayser HW, Leujes F, Beyerbacht HP, Zwinderman AH *et al.* Functional and metabolic evaluation of the athlete's heart by magnetic resonance imaging and dobutamine stress magnetic resonance spectroscopy. *Circulation* 1998; **97**: 666–672.
- 70 Colan SD. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. *Cardiol Clin* 1997; **15**: 355–372.
- 71 Imamura T, McDermott PJ, Kent RL, Nagatsu M, Cooper G, Carabello BA. Acute changes in myosin heavy chain synthesis rate in pressure versus volume overload. *Circ Res* 1994; **75**: 418–425.
- 72 Kunkel B, Schneider M. Myocardial structure and left ventricular function in hypertrophic and dilative cardiomyopathy and aortic valve disease. *Z Kardiol* 1987; **76 Suppl 3**: 9–13.
- 73 Wess G, Killich M. Herzinsuffizienz: Definitionen und Pathophysiologie. .
- 74 Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991; **83**: 1849–1865.
- 75 Weber KT, Jalil JE, Janicki JS, Pick R. Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. A case for interstitial heart disease. *Am J Hypertens* 1989; **2**: 931–940.
- 76 Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 1995; **91**: 161–170.
- 77 Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990; **67**: 1355–1364.
- 78 Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989; **13**: 1637–1652.
- 79 Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Hamashima Y, Kawai C. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 1986; **55**: 575–581.
- 80 Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Matsuda M, Hamashima Y *et al.* Quantitative analysis of narrowings of intramyocardial small arteries in normal hearts, hypertensive hearts, and hearts with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1987; **75**: 1130–1139.
- 81 Medugorac I. Characterization of intramuscular collagen in mammalian left ventricle. *Basic Res Cardiol* 1982; **77**: 589–598.
- 82 Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res* 1988; **62**: 757–765.
- 83 Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, Yacoub M, Laurent GJ. Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol* 1990; **22**: 1157–1165.

- 84 Eghbali M, Blumenfeld OO, Seiffter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF *et al.* Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol* 1989; **21**: 103–113.
- 85 Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL *et al.* Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; **99**: 2750–2756.
- 86 Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S *et al.* Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int J Cardiol* 2011; **151**: 18–33.
- 87 Fielitz J, Hein S, Mitrovic V, Pregla R, Zurbrügg HR, Warnecke C *et al.* Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 2001; **37**: 1443–1449.
- 88 Eghbali M, Czaja MJ, Zeydel M, Weiner FR, Zern MA, Seiffter S *et al.* Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Mol Cell Cardiol* 1988; **20**: 267–276.
- 89 Medugorac I, Jacob R. Characterisation of left ventricular collagen in the rat. *Cardiovasc Res* 1983; **17**: 15–21.
- 90 Medugorac I. Myocardial collagen in different forms of heart hypertrophy in the rat. *Res Exp Med (Berl)* 1980; **177**: 201–211.
- 91 Tsoutsman T, Wang X, Garchow K, Riser B, Twigg S, Semsarian C. CCN2 plays a key role in extracellular matrix gene expression in severe hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2013; **62**: 164–178.
- 92 Rosin NL, Falkenham A, Sipel MJ, Lee TDG, Légaré J-F. Regulation and role of connective tissue growth factor in AngII-induced myocardial fibrosis. *Am J Pathol* 2013; **182**: 714–726.
- 93 Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 2000; **71**: 276–292.
- 94 Matsui Y, Sadoshima J. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2004; **37**: 477–481.
- 95 Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 1999; **20**: 189–206.
- 96 Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 2003; **178**: 169–175.
- 97 Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 1991; **114**: 1285–1294.
- 98 Brunner A, Chinn J, Neubauer M, Purchio AF. Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol* 1991; **10**: 293–300.
- 99 Almendral JM, Sommer D, Macdonald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 2140–2148.
- 100 Koshman YE, Patel N, Chu M, Iyengar R, Kim T, Ersahin C *et al.* Regulation of connective tissue growth factor gene expression and fibrosis in human heart failure. *J Card Fail* 2013; **19**: 283–294.
- 101 Wu C-K, Wang Y-C, Lee J-K, Chang S-N, Su M-Y, Yeh H-M *et al.* Connective tissue growth factor and cardiac diastolic dysfunction: human data from the Taiwan Diastolic Heart Failure Registry and molecular basis by cellular and animal models. *Eur J Heart Fail* 2014; **16**: 163–172.
- 102 Fliegner D, Westermann D, Riad A, Schubert C, Becher E, Fielitz J *et al.* Up-regulation of PPARgamma in myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2008; **10**: 30–38.
- 103 Stefanon I, Valero-Muñoz M, Fernandes AA, Ribeiro RF Jr, Rodríguez C, Miana M *et al.* Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. *PLoS ONE* 2013; **8**: e64986.

- 104 Yoon PO, Lee M-A, Cha H, Jeong MH, Kim J, Jang SP *et al.* The opposing effects of CCN2 and CCN5 on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **49**: 294–303.
- 105 Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991; **114**: 345–352.
- 106 Cleland JGF, Daubert J-C, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L *et al.* The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1539–1549.
- 107 Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK, Levy D. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol* 1999; **33**: 1948–1955.
- 108 Massie BM, Tubau JF, Szlachcic J, O’Kelly BF. Hypertensive heart disease: the critical role of left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; **13 Suppl 1**: S18–24.
- 109 Perhonen MA, Franco F, Lane LD, Buckey JC, Blomqvist CG, Zerwekh JE *et al.* Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. *J Appl Physiol* 2001; **91**: 645–653.
- 110 Shibata S, Perhonen M, Levine BD. Supine cycling plus volume loading prevent cardiovascular deconditioning during bed rest. *J Appl Physiol* 2010; **108**: 1177–1186.
- 111 Dorfman TA, Levine BD, Tillery T, Peshock RM, Hastings JL, Schneider SM *et al.* Cardiac atrophy in women following bed rest. *J Appl Physiol* 2007; **103**: 8–16.
- 112 De Groot PC, van Dijk A, Dijk E, Hopman MT. Preserved cardiac function after chronic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2006; **87**: 1195–1200.
- 113 Kazemi-Bajestani SMR, Becher H, Fassbender K, Chu Q, Baracos VE. Concurrent evolution of cancer cachexia and heart failure: bilateral effects exist. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2014. doi:10.1007/s13539-014-0137-y.
- 114 Borges FH, Marinello PC, Cecchini AL, Blegniski FP, Guarnier FA, Cecchini R. Oxidative and proteolytic profiles of the right and left heart in a model of cancer-induced cardiac cachexia. *Pathophysiology* 2014. doi:10.1016/j.pathophys.2014.05.003.
- 115 Lanjewar DN, Katdare GA, Jain PP, Hira SK. Pathology of the heart in acquired immunodeficiency syndrome. *Indian Heart J* 1998; **50**: 321–325.
- 116 Razeghi P, Taegtmeier H. Cardiac remodeling: UPS lost in transit. *Circ Res* 2005; **97**: 964–966.
- 117 Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012; **3**: 163–179.
- 118 Razeghi P, Sharma S, Ying J, Li Y-P, Stepkowski S, Reid MB *et al.* Atrophic remodeling of the heart in vivo simultaneously activates pathways of protein synthesis and degradation. *Circulation* 2003; **108**: 2536–2541.
- 119 Kuwahara K, Nishikimi T, Nakao K. Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program. *J Pharmacol Sci* 2012; **119**: 198–203.
- 120 Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40**: 2023–2039.
- 121 Kuwahara K, Nakao K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr J* 2010; **57**: 555–565.
- 122 Mizuno Y, Yoshimura M, Harada E, Nakayama M, Sakamoto T, Shimasaki Y *et al.* Plasma levels of A- and B-type natriuretic peptides in patients with hypertrophic cardiomyopathy or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2000; **86**: 1036–1040, A11.
- 123 Schiaffino S, Samuel JL, Sassoon D, Lompré AM, Garner I, Marotte F *et al.* Nonsynchronous accumulation of alpha-skeletal actin and beta-myosin heavy chain mRNAs during early stages of pressure-overload--induced cardiac hypertrophy demonstrated by in situ hybridization. *Circ Res* 1989; **64**: 937–948.

- 124 Parker TG, Packer SE, Schneider MD. Peptide growth factors can provoke 'fetal' contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1990; **85**: 507–514.
- 125 Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ Jr, Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 1995; **92**: 2385–2390.
- 126 Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 339–343.
- 127 Black FM, Packer SE, Parker TG, Michael LH, Roberts R, Schwartz RJ *et al*. The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1581–1588.
- 128 Branishte T, Minciuna V, Braniste A. Aspects of molecular mechanisms in myocardial hypertrophy, particular morphological changes and cell bioenergetic characteristics in patients with dilated cardiomyopathy. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2013; **117**: 851–856.
- 129 Houweling AC, van Borren MM, Moorman AFM, Christoffels VM. Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene *Nppa* during development and disease. *Cardiovasc Res* 2005; **67**: 583–593.
- 130 López JE, Myagmar B-E, Swigart PM, Montgomery MD, Haynam S, Bigos M *et al*. β -myosin heavy chain is induced by pressure overload in a minor subpopulation of smaller mouse cardiac myocytes. *Circ Res* 2011; **109**: 629–638.
- 131 Mahdavi V, Lompre AM, Chambers AP, Nadal-Ginard B. Cardiac myosin heavy chain isozymic transitions during development and under pathological conditions are regulated at the level of mRNA availability. *Eur Heart J* 1984; **5 Suppl F**: 181–191.
- 132 Izumo S, Lompré AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B *et al*. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* 1987; **79**: 970–977.
- 133 Schwartz K, Bouveret P, Bercovici J, Swynghedauw B. An immunochemical difference between myosins from normal and hypertrophied rat hearts. *FEBS Lett* 1978; **93**: 137–140.
- 134 Mercadier JJ, Lompré AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B *et al*. Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1981; **49**: 525–532.
- 135 Patrizio M, Musumeci M, Piccone A, Raggi C, Mattei E, Marano G. Hormonal regulation of β -myosin heavy chain expression in the mouse left ventricle. *J Endocrinol* 2013; **216**: 287–296.
- 136 Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA *et al*. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2315–2324.
- 137 Abraham WT, Gilbert EM, Lowes BD, Minobe WA, Larrabee P, Roden RL *et al*. Coordinate changes in Myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype. *Mol Med* 2002; **8**: 750–760.
- 138 Tardiff JC, Hewett TE, Factor SM, Vikstrom KL, Robbins J, Leinwand LA. Expression of the beta (slow)-isoform of MHC in the adult mouse heart causes dominant-negative functional effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**: H412–419.
- 139 Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* 1996; **335**: 1897–1905.
- 140 Willis MS, Townley-Tilson WHD, Kang EY, Homeister JW, Patterson C. Sent to Destroy: The Ubiquitin Proteasome System Regulates Cell Signaling and Protein Quality Control in Cardiovascular Development and Disease. *Circulation Research* 2010; **106**: 463–478.
- 141 Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 11–15.

- 142 Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 79–87.
- 143 Li W, Ye Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 2397–2406.
- 144 Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**: 12–17.
- 145 Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 596–613.
- 146 Wickliffe KE, Lorenz S, Wemmer DE, Kuriyan J, Rape M. The mechanism of linkage-specific ubiquitin chain elongation by a single-subunit E2. *Cell* 2011; **144**: 769–781.
- 147 Van Wijk SJL, de Vries SJ, Kemmeren P, Huang A, Boelens R, Bonvin AMJJ *et al.* A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system. *Mol Syst Biol* 2009; **5**: 295.
- 148 Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowyra D *et al.* Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* 2007; **282**: 17375–17386.
- 149 Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 755–764.
- 150 Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; **19**: 94–102.
- 151 Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 1783–1786.
- 152 Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK *et al.* A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 1989; **243**: 1576–1583.
- 153 Finley D, Sadis S, Monia BP, Boucher P, Ecker DJ, Crooke ST *et al.* Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5501–5509.
- 154 Rape M, Reddy SK, Kirschner MW. The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation. *Cell* 2006; **124**: 89–103.
- 155 Li H-H, Willis MS, Lockyer P, Miller N, McDonough H, Glass DJ *et al.* Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins. *J Clin Invest* 2007; **117**: 3211–3223.
- 156 Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 1265–1273.
- 157 Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; **82**: 373–428.
- 158 Powell SR. The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**: H1–H19.
- 159 Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK *et al.* The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 429–439.
- 160 Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 1807–1819.
- 161 Fielitz J, Kim M-S, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ *et al.* Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2486–2495.

- 162 Gao M, Karin M. Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol Cell* 2005; **19**: 581–593.
- 163 Wang X, Robbins J. Heart failure and protein quality control. *Circ Res* 2006; **99**: 1315–1328.
- 164 Hegde AN. The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learn Mem* 2010; **17**: 314–327.
- 165 Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999; **96**: 635–644.
- 166 Hegde AN, Upadhy SC. Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1809**: 128–140.
- 167 Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 179–187.
- 168 Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F, Kuehn L, Pfeifer G. Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett* 1988; **241**: 239–245.
- 169 Pühler G, Weinkauff S, Bachmann L, Müller S, Engel A, Hegerl R *et al.* Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *EMBO J* 1992; **11**: 1607–1616.
- 170 Tanaka K, Yoshimura T, Kumatori A, Ichihara A, Ikai A, Nishigai M *et al.* Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 16209–16217.
- 171 Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997; **386**: 463–471.
- 172 Drews O, Zong C, Ping P. Exploring proteasome complexes by proteomic approaches. *Proteomics* 2007; **7**: 1047–1058.
- 173 Wilk S, Orlowski M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* 1983; **40**: 842–849.
- 174 Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3149–3162.
- 175 Gray CW, Slaughter CA, DeMartino GN. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol* 1994; **236**: 7–15.
- 176 Zwickl P, Voges D, Baumeister W. The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 1999; **354**: 1501–1511.
- 177 Fu H, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, van Nocker S, Finley D *et al.* Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J Biol Chem* 1998; **273**: 1970–1981.
- 178 Van Nocker S, Deveraux Q, Rechsteiner M, Vierstra RD. Arabidopsis MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 856–860.
- 179 Rubin DM, Glickman MH, Larsen CN, Dhruvakumar S, Finley D. Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* 1998; **17**: 4909–4919.
- 180 Köhler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 2001; **7**: 1143–1152.
- 181 Erales J, Hoyt MA, Troll F, Coffino P. Functional asymmetries of proteasome translocase pore. *J Biol Chem* 2012; **287**: 18535–18543.
- 182 Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 1992; **61**: 761–807.

- 183 Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 2005; **27**: 1147–1157.
- 184 Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC *et al.* Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol* 2001; **306**: 717–726.
- 185 Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem* 2006; **281**: 8970–8980.
- 186 Koyama S, Hata S, Witt CC, Ono Y, Lerche S, Ojima K *et al.* Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J Mol Biol* 2008; **376**: 1224–1236.
- 187 Kedar V, McDonough H, Arya R, Li H-H, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 18135–18140.
- 188 Spencer JA, Eliazar S, Ilaria RL Jr, Richardson JA, Olson EN. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol* 2000; **150**: 771–784.
- 189 Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol* 2005; **350**: 713–722.
- 190 Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 2001; **20**: 2140–2151.
- 191 Witt CC, Witt SH, Lerche S, Labeit D, Back W, Labeit S. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J* 2008; **27**: 350–360.
- 192 Fielitz J, van Rooij E, Spencer JA, Shelton JM, Latif S, van der Nagel R *et al.* Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 4377–4382.
- 193 Dai KS, Liew CC. A novel human striated muscle RING zinc finger protein, SMRZ, interacts with SMT3b via its RING domain. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23992–23999.
- 194 McElhinny AS, Kakinuma K, Sorimachi H, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol* 2002; **157**: 125–136.
- 195 Arya R, Kedar V, Hwang JR, McDonough H, Li H-H, Taylor J *et al.* Muscle ring finger protein-1 inhibits PKC ϵ activation and prevents cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 2004; **167**: 1147–1159.
- 196 Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001; **294**: 1704–1708.
- 197 Willis MS, Ike C, Li L, Wang D-Z, Glass DJ, Patterson C. Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res* 2007; **100**: 456–459.
- 198 Willis MS, Rojas M, Li L, Selzman CH, Tang R-H, Stansfield WE *et al.* Muscle ring finger 1 mediates cardiac atrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; **296**: H997–H1006.
- 199 Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E *et al.* The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 2007; **6**: 376–385.
- 200 Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C *et al.* During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol* 2009; **185**: 1083–1095.
- 201 Glass DJ. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; **346**: 267–278.

- 202 Bodine SC, Baehr LM. Skeletal Muscle Atrophy and the E3 Ubiquitin Ligases, MuRF1 and MAFbx/Atrogin-1. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 2014. doi:10.1152/ajpendo.00204.2014.
- 203 Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 2004; **14**: 395–403.
- 204 Sacheck JM, Hyatt J-PK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR *et al.* Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J* 2007; **21**: 140–155.
- 205 Hirner S, Krohne C, Schuster A, Hoffmann S, Witt S, Erber R *et al.* MuRF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies. *J Mol Biol* 2008; **379**: 666–677.
- 206 Pizon V, Iakovenko A, Van Der Ven PFM, Kelly R, Fatu C, Fürst DO *et al.* Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci* 2002; **115**: 4469–4482.
- 207 McElhinny AS, Perry CN, Witt CC, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J Cell Sci* 2004; **117**: 3175–3188.
- 208 Willis MS, Wadosky KM, Rodríguez JE, Schisler JC, Lockyer P, Hilliard EG *et al.* Muscle ring finger 1 and muscle ring finger 2 are necessary but functionally redundant during developmental cardiac growth and regulate E2F1-mediated gene expression in vivo. *Cell Biochem Funct* 2014; **32**: 39–50.
- 209 Zanoteli E, Oliveira AS, Kiyomoto BH, Schmidt B, Gabbai AA. Centronuclear myopathy. Histopathological aspects in ten patients with childhood onset. *Arq Neuropsiquiatr* 1998; **56**: 1–8.
- 210 Serratrice G, Pellissier JF, Faugere MC, Gastaut JL. Centronuclear myopathy: possible central nervous system origin. *Muscle Nerve* 1978; **1**: 62–69.
- 211 Appell HJ, Forsberg S, Hollmann W. Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation. *Int J Sports Med* 1988; **9**: 297–299.
- 212 Maier A, Gambke B, Pette D. Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle. *Cell Tissue Res* 1986; **244**: 635–643.
- 213 Schmalbruch H. The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tissue Cell* 1976; **8**: 673–692.
- 214 Ronkina N, Kotlyarov A, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Hitti E, Milarski K *et al.* The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 170–181.
- 215 Primeaux SD, Tong M, Holmes GM. Effects of chronic spinal cord injury on body weight and body composition in rats fed a standard chow diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **293**: R1102–1109.
- 216 Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982; **243**: H941–947.
- 217 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685.
- 218 ENGEL WK, CUNNINGHAM GG. RAPID EXAMINATION OF MUSCLE TISSUE. AN IMPROVED TRICHROME METHOD FOR FRESH-FROZEN BIOPSY SECTIONS. *Neurology* 1963; **13**: 919–923.
- 219 Bailey LE, Ong SD. Krebs-Henseleit Solution as a Physiological Buffer in Perfused and Superfused Preparations. *Journal of Pharmacological Methods* 1978; **1**: 171–175.

- 220 Macpherson PCD, Wang X, Goldman D. Myogenin regulates denervation-dependent muscle atrophy in mouse soleus muscle. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 2149–2159.
- 221 Head SI, Greenaway B, Chan S. Incubating isolated mouse EDL muscles with creatine improves force production and twitch kinetics in fatigue due to reduction in ionic strength. *PLoS ONE* 2011; **6**: e22742.
- 222 Chan S, Seto JT, MacArthur DG, Yang N, North KN, Head SI. A gene for speed: contractile properties of isolated whole EDL muscle from an alpha-actinin-3 knockout mouse. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2008; **295**: C897–904.
- 223 Chan S, Head SI. Age- and gender-related changes in contractile properties of non-atrophied EDL muscle. *PLoS ONE* 2010; **5**: e12345.
- 224 Brooks SV, Faulkner JA. Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J Physiol (Lond)* 1988; **404**: 71–82.
- 225 Döring HJ. Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff—Geschichte und Gegenwart, Modifikationen und Applikationen. *Acta Chirurgica Austriaca* 1996; **28**: 328–333.
- 226 Pankonien I, Alvarez JL, Doller A, Köhncke C, Rotte D, Regitz-Zagrosek V *et al.* Ahnak1 is a tuneable modulator of cardiac Ca(v)1.2 calcium channel activity. *J Muscle Res Cell Motil* 2011; **32**: 281–290.
- 227 Whalen EJ, Lewis SJ. In vivo evidence that isoproterenol may increase heart rate in the rat by mechanisms in addition to activation of cardiac beta(1)- or beta(2)-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1999; **382**: 207–210.
- 228 Akhter SA, Milano CA, Shotwell KF, Cho MC, Rockman HA, Lefkowitz RJ *et al.* Transgenic mice with cardiac overexpression of alpha1B-adrenergic receptors. In vivo alpha1-adrenergic receptor-mediated regulation of beta-adrenergic signaling. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21253–21259.
- 229 Stanton HC, Brenner G, Mayfield ED. Studies on isoproterenol-induced cardiomegaly in rats. *Am Heart J* 1969; **77**: 72–80.
- 230 Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Uozumi H, Kadowaki T *et al.* Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1999; **274**: 9760–9770.
- 231 Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ *et al.* Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8277–8281.
- 232 Kondo RP, Apstein CS, Eberli FR, Tillotson DL, Suter TM. Increased calcium loading and inotropy without greater cell death in hypoxic rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1998; **275**: H2272–2282.
- 233 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; **260**: 3440–3450.
- 234 Bals S, Bechem M, Paffhausen W, Pott L. Spontaneous and experimentally evoked [Ca²⁺]_i-transients in cardiac myocytes measured by means of a fast Fura-2 technique. *Cell Calcium* 1990; **11**: 385–396.
- 235 Timolati F, Ott D, Pentassuglia L, Giraud M-N, Perriard J-C, Suter TM *et al.* Neuregulin-1 beta attenuates doxorubicin-induced alterations of excitation-contraction coupling and reduces oxidative stress in adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006; **41**: 845–854.
- 236 Bucher O, Wartenberg H. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Huber: Bern [u.a.], 1997.
- 237 Mutschler E, Schaible H-G, Vaupel P, Thews G. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 6th ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2007.
- 238 Caretti G, Schiltz RL, Dilworth FJ, Di Padova M, Zhao P, Ogryzko V *et al.* The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev Cell* 2006; **11**: 547–560.

- 239 Watanabe M, Yanagisawa J, Kitagawa H, Takeyama K, Ogawa S, Arao Y *et al.* A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J* 2001; **20**: 1341–1352.
- 240 Caretti G, Lei EP, Sartorelli V. The DEAD-box p68/p72 proteins and the noncoding RNA steroid receptor activator SRA: eclectic regulators of disparate biological functions. *Cell Cycle* 2007; **6**: 1172–1176.
- 241 Hubé F, Velasco G, Rollin J, Furling D, Francastel C. Steroid receptor RNA activator protein binds to and counteracts SRA RNA-mediated activation of MyoD and muscle differentiation. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 513–525.
- 242 Kawashima H, Takano H, Sugita S, Takahara Y, Sugimura K, Nakatani T. A novel steroid receptor co-activator protein (SRAP) as an alternative form of steroid receptor RNA-activator gene: expression in prostate cancer cells and enhancement of androgen receptor activity. *Biochem J* 2003; **369**: 163–171.
- 243 Chooniedass-Kothari S, Vincett D, Yan Y, Cooper C, Hamedani MK, Myal Y *et al.* The protein encoded by the functional steroid receptor RNA activator is a new modulator of ER alpha transcriptional activity. *FEBS Lett* 2010; **584**: 1174–1180.
- 244 Chooniedass-Kothari S, Hamedani MK, Auge C, Wang X, Carascossa S, Yan Y *et al.* The steroid receptor RNA activator protein is recruited to promoter regions and acts as a transcriptional repressor. *FEBS Lett* 2010; **584**: 2218–2224.
- 245 Sugiyama Y, Suzuki A, Kishikawa M, Akutsu R, Hirose T, Wayne MM *et al.* Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 1095–1104.
- 246 Wee CD, Kong L, Sumner CJ. The genetics of spinal muscular atrophies. *Curr Opin Neurol* 2010; **23**: 450–458.
- 247 Brown MA, Sims RJ 3rd, Gottlieb PD, Tucker PW. Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer* 2006; **5**: 26.
- 248 Voelkel T, Andresen C, Unger A, Just S, Rottbauer W, Linke WA. Lysine methyltransferase Smyd2 regulates Hsp90-mediated protection of the sarcomeric titin springs and cardiac function. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1833**: 812–822.
- 249 Donlin LT, Andresen C, Just S, Rudensky E, Pappas CT, Kruger M *et al.* Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization. *Genes Dev* 2012; **26**: 114–119.
- 250 Kuefer MU, Look AT, Williams DC, Valentine V, Naeve CW, Behm FG *et al.* cDNA cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of myelodysplasia/myeloid leukemia factor 2 (MLF2). *Genomics* 1996; **35**: 392–396.
- 251 Walker LC, Waddell N, Ten Haaf A, kConFab Investigators, Grimmond S, Spurdle AB. Use of expression data and the CGEMS genome-wide breast cancer association study to identify genes that may modify risk in BRCA1/2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 2008; **112**: 229–236.
- 252 Kim E-S, Hong YH, Lillehoj HS. Genetic effects analysis of myeloid leukemia factor 2 and T cell receptor-beta on resistance to coccidiosis in chickens. *Poult Sci* 2010; **89**: 20–27.
- 253 Hong YH, Kim E-S, Lillehoj HS. Identification of parental line specific effects of MLF2 on resistance to coccidiosis in chickens. *BMC Proc* 2011; **5 Suppl 4**: S21.
- 254 Moïse N, Dingar D, Mamarbachi AM, Villeneuve LR, Farhat N, Gaestel M *et al.* Characterization of a novel MK3 splice variant from murine ventricular myocardium. *Cell Signal* 2010; **22**: 1502–1512.
- 255 Marber MS, Rose B, Wang Y. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway--a potential target for intervention in infarction, hypertrophy, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **51**: 485–490.
- 256 Kawabata Y, Hata S, Ono Y, Ito Y, Suzuki K, Abe K *et al.* Newly identified exons encoding novel variants of p94/calpain 3 are expressed ubiquitously and overlap the alpha-glucosidase C gene. *FEBS Lett* 2003; **555**: 623–630.

- 257 Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N *et al.* Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995; **81**: 27–40.
- 258 Ojima K, Kawabata Y, Nakao H, Nakao K, Doi N, Kitamura F *et al.* Dynamic distribution of muscle-specific calpain in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy. *J Clin Invest* 2010; **120**: 2672–2683.
- 259 Parast MM, Otey CA. Characterization of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesions. *J Cell Biol* 2000; **150**: 643–656.
- 260 Boukhelifa M, Parast MM, Bear JE, Gertler FB, Otey CA. Palladin is a novel binding partner for Ena/VASP family members. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004; **58**: 17–29.
- 261 Dixon RDS, Arneman DK, Rachlin AS, Sundaresan NR, Costello MJ, Campbell SL *et al.* Palladin is an actin cross-linking protein that uses immunoglobulin-like domains to bind filamentous actin. *J Biol Chem* 2008; **283**: 6222–6231.
- 262 Jin L, Yoshida T, Ho R, Owens GK, Somlyo AV. The actin-associated protein Palladin is required for development of normal contractile properties of smooth muscle cells derived from embryoid bodies. *J Biol Chem* 2009; **284**: 2121–2130.
- 263 Verschuure P, Croes Y, van den IJssel PRLA, Quinlan RA, de Jong WW, Boelens WC. Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 2002; **34**: 117–128.
- 264 Borth N, Massier J, Franke C, Sachse K, Saluz H-P, Hänel F. Chlamydial protease CT441 interacts with SRAP1 co-activator of estrogen receptor alpha and partially alleviates its co-activation activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; **119**: 89–95.
- 265 Clifton AD, Young PR, Cohen P. A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett* 1996; **392**: 209–214.
- 266 White A, Pargellis CA, Studts JM, Werneburg BG, Farmer BT. Molecular basis of MAPK-activated protein kinase 2:p38 assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 6353–6358.
- 267 Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez J-B, Pitman D *et al.* Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 4827–4835.
- 268 Scharf M, Neef S, Freund R, Geers-Knörr C, Franz-Wachtel M, Brandis A *et al.* Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases 2 and 3 regulate SERCA2a expression and fiber type composition to modulate skeletal muscle and cardiomyocyte function. *Mol Cell Biol* 2013; **33**: 2586–2602.
- 269 Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H *et al.* Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995; **92**: 778–784.
- 270 Perera S, Holt MR, Mankoo BS, Gautel M. Developmental regulation of MURF ubiquitin ligases and autophagy proteins nbr1, p62/SQSTM1 and LC3 during cardiac myofibril assembly and turnover. *Dev Biol* 2011; **351**: 46–61.
- 271 Reichelt ME, Mellor KM, Bell JR, Chandramouli C, Headrick JP, Delbridge LMD. Sex, sex steroids, and diabetic cardiomyopathy: making the case for experimental focus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; **305**: H779–792.
- 272 Juutilainen A, Kortelainen S, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Gender difference in the impact of type 2 diabetes on coronary heart disease risk. *Diabetes Care* 2004; **27**: 2898–2904.
- 273 Le TYL, Ashton AW, Mardini M, Stanton PG, Funder JW, Handelsman DJ *et al.* Role of androgens in sex differences in cardiac damage during myocardial infarction. *Endocrinology* 2014; **155**: 568–575.
- 274 Huang C, Gu H, Zhang W, Herrmann JL, Wang M. Testosterone-down-regulated Akt pathway during cardiac ischemia/reperfusion: a mechanism involving BAD, Bcl-2 and FOXO3a. *J Surg Res* 2010; **164**: e1–11.

- 275 Qaisar R, Renaud G, Hedstrom Y, Pöllänen E, Ronkainen P, Kaprio J *et al.* Hormone replacement therapy improves contractile function and myonuclear organization of single muscle fibres from postmenopausal monozygotic female twin pairs. *J Physiol (Lond)* 2013; **591**: 2333–2344.
- 276 Skelton DA, Phillips SK, Bruce SA, Naylor CH, Woledge RC. Hormone replacement therapy increases isometric muscle strength of adductor pollicis in post-menopausal women. *Clin Sci* 1999; **96**: 357–364.
- 277 Yu F, Hedström M, Cristea A, Dalén N, Larsson L. Effects of ageing and gender on contractile properties in human skeletal muscle and single fibres. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; **190**: 229–241.
- 278 Kaul S, Blackford JA, Chen J, Ogryzko VV, Simons SS. Properties of the glucocorticoid modulatory element binding proteins GMEB-1 and -2: potential new modifiers of glucocorticoid receptor transactivation and members of the family of KDWK proteins. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 1010–1027.
- 279 Moriscot AS, Baptista IL, Bogomolovas J, Witt C, Hirner S, Granzier H *et al.* MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance. *J Struct Biol* 2010; **170**: 344–353.
- 280 Polge C, Heng A-E, Jarzaguat M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L *et al.* Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J* 2011; **25**: 3790–3802.
- 281 Gregorio CC, Perry CN, McElhinny AS. Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2005; **26**: 389–400.
- 282 Vyas DR, McCarthy JJ, Tsika RW. Nuclear protein binding at the beta-myosin heavy chain A/T-rich element is enriched following increased skeletal muscle activity. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30832–30842.
- 283 Downie D, Delday MI, Maltin CA, Sneddon AA. Clenbuterol increases muscle fiber size and GATA-2 protein in rat skeletal muscle in utero. *Mol Reprod Dev* 2008; **75**: 785–794.
- 284 D'Albis A, Couteaux R, Janmot C, Roulet A, Mira JC. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur J Biochem* 1988; **174**: 103–110.
- 285 Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Carli M. Embryonic myosin heavy chain as a differentiation marker of developing human skeletal muscle and rhabdomyosarcoma. A monoclonal antibody study. *Exp Cell Res* 1986; **163**: 211–220.
- 286 Nissar AA, Zemanek B, Labatia R, Atkinson DJ, van der Ven PFM, Fürst DO *et al.* Skeletal muscle regeneration is delayed by reduction in Xin expression: consequence of impaired satellite cell activation? *Am J Physiol, Cell Physiol* 2012; **302**: C220–227.
- 287 Afifi AK, Bergman RA, Zellweger H. A possible role for electron microscopy in detection of carriers of Duchenne type muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1973; **36**: 643–650.
- 288 Takeuchi K, Hatade T, Wakamiya S, Fujita N, Arakawa T, Miki A. Heat stress promotes skeletal muscle regeneration after crush injury in rats. *Acta Histochem* 2014; **116**: 327–334.
- 289 Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T. MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct* 2008; **33**: 163–169.
- 290 Na S-J, Kim T-S, Choi Y-C. A case of adult-onset centronuclear myopathy. *Yonsei Med J* 2004; **45**: 352–355.
- 291 Milhorat AT, Shafiq SA, Goldstone L. Changes in muscle structure in dystrophic patients, carriers and normal siblings seen by electron microscopy; correlation with levels of serum creatinephosphokinase (CPK). *Ann N Y Acad Sci* 1966; **138**: 246–292.
- 292 Fürst DO, Goldfarb LG, Kley RA, Vorgerd M, Olivé M, van der Ven PFM. Filamin C-related myopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 2013; **125**: 33–46.

- 293 Kley RA, Serdaroglu-Oflazer P, Leber Y, Odgerel Z, van der Ven PFM, Olivé M *et al.* Pathophysiology of protein aggregation and extended phenotyping in filaminopathy. *Brain* 2012; **135**: 2642–2660.
- 294 Feldkirchner S, Walter MC, Müller S, Kubny C, Krause S, Kress W *et al.* Proteomic characterization of aggregate components in an intrafamilial variable FHL1-associated myopathy. *Neuromuscul Disord* 2013; **23**: 418–426.
- 295 Itoh K, Moritani T, Ishida K, Hirofuji C, Taguchi S, Itoh M. Hypoxia-induced fibre type transformation in rat hindlimb muscles. Histochemical and electro-mechanical changes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1990; **60**: 331–336.
- 296 Sitparan PK, Pagel CN, Pinniger GJ, Yoo HJ, Mackie EJ, Bakker AJ. The contractile properties of slow and fast skeletal muscles from protease activated receptor-1 null mice. *Muscle Nerve* 2014. doi:10.1002/mus.24256.
- 297 Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD. Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2-receptor agonist. *Am J Physiol* 1988; **254**: E726–732.
- 298 Zaglia T, Milan G, Ruhs A, Franzoso M, Bertaggia E, Pianca N *et al.* Atrogin-1 deficiency promotes cardiomyopathy and premature death via impaired autophagy. *J Clin Invest* 2014; **124**: 2410–2424.
- 299 Supinski G, Nethery D, Stofan D, DiMarco A. Comparison of the effects of endotoxin on limb, respiratory, and cardiac muscles. *J Appl Physiol* 1996; **81**: 1370–1378.
- 300 Eikermann M, Koch G, Gerwig M, Ochterbeck C, Beiderlinden M, Koeppen S *et al.* Muscle force and fatigue in patients with sepsis and multiorgan failure. *Intensive Care Med* 2006; **32**: 251–259.
- 301 Molkentin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 4947–4957.
- 302 Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; **93**: 215–228.
- 303 Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **293**: H1883–1891.
- 304 Del Monte F. Targeting Phospholamban by Gene Transfer in Human Heart Failure. *Circulation* 2002; **105**: 904–907.
- 305 Tsang S, Wong SSC, Wu S, Kravtsov GM, Wong T-M. Testosterone-augmented contractile responses to alpha1- and beta1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2009; **296**: C766–782.
- 306 Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW, Walsh RA *et al.* Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996; **97**: 533–539.
- 307 Asahi M, Otsu K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Gramolini AO *et al.* Cardiac-specific overexpression of sarcolipin inhibits sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) activity and impairs cardiac function in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 9199–9204.
- 308 Babu GJ, Bhupathy P, Petrashevskaya NN, Wang H, Raman S, Wheeler D *et al.* Targeted overexpression of sarcolipin in the mouse heart decreases sarcoplasmic reticulum calcium transport and cardiac contractility. *J Biol Chem* 2006; **281**: 3972–3979.
- 309 Cuenda A, Cohen P. Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 4341–4346.
- 310 Perdiguer E, Ruiz-Bonilla V, Gresh L, Hui L, Ballestar E, Sousa-Victor P *et al.* Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *EMBO J* 2007; **26**: 1245–1256.
- 311 Wang H, Xu Q, Xiao F, Jiang Y, Wu Z. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, and gamma isoforms in myogenic differentiation. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 1519–1528.

- 312 Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Brown JH, Han J *et al.* Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2161–2168.
- 313 Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol* 1998; **142**: 523–535.
- 314 Fischer TA, Ludwig S, Flory E, Gambaryan S, Singh K, Finn P *et al.* Activation of cardiac c-Jun NH(2)-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases with abrupt changes in hemodynamic load. *Hypertension* 2001; **37**: 1222–1228.
- 315 Ruiz-Bonilla V, Perdiguero E, Gresh L, Serrano AL, Zamora M, Sousa-Victor P *et al.* Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases. *Cell Cycle* 2008; **7**: 2208–2214.
- 316 Nakanishi K, Saito Y, Azuma N, Sasajima T. Cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein activation by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 and four-and-a-half LIM domains 5 plays a key role for vein graft intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 2013; **57**: 182–193, 193.e1–10.
- 317 DuBois DC, Almon RR. Glucocorticoid sites in skeletal muscle: adrenalectomy, maturation, fiber type, and sex. *Am J Physiol* 1984; **247**: E118–125.
- 318 Gustafsson JA, Saartok T, Dahlberg E, Snochowski M, Häggmark T, Eriksson E. Studies on steroid receptors in human and rabbit skeletal muscle - clues to the understanding of the mechanism of action of anabolic steroids. *Prog Clin Biol Res* 1984; **142**: 261–290.
- 319 Romani WA, Russ DW. Acute effects of sex-specific sex hormones on heat shock proteins in fast muscle of male and female rats. *Eur J Appl Physiol* 2013; **113**: 2503–2510.
- 320 Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI *et al.* Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **283**: E154–164.
- 321 Storer TW, Magliano L, Woodhouse L, Lee ML, Dzekov C, Dzekov J *et al.* Testosterone dose-dependently increases maximal voluntary strength and leg power, but does not affect fatigability or specific tension. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 1478–1485.
- 322 Kobori M, Yamamuro T. Effects of gonadectomy and estrogen administration on rat skeletal muscle. *Clin Orthop Relat Res* 1989; : 306–311.
- 323 Nakago K, Senda M, Touno M, Takahara Y, Inoue H. Influence of exercise on muscle fibers in rats with steroid myopathy. *Acta Med Okayama* 1999; **53**: 265–270.
- 324 Falduto MT, Czerwinski SM, Hickson RC. Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers. *J Appl Physiol* 1990; **69**: 1058–1062.
- 325 Friedrichs F, Zugck C, Rauch G-J, Ivandic B, Weichenhan D, Müller-Bardorff M *et al.* HBEGF, SRA1, and IK: Three cosegregating genes as determinants of cardiomyopathy. *Genome Res* 2009; **19**: 395–403.
- 326 Fuller-Pace FV, Ali S. The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17): novel transcriptional co-regulators. *Biochem Soc Trans* 2008; **36**: 609–612.
- 327 Wortham NC, Ahamed E, Nicol SM, Thomas RS, Periyasamy M, Jiang J *et al.* The DEAD-box protein p72 regulates ERalpha-/oestrogen-dependent transcription and cell growth, and is associated with improved survival in ERalpha-positive breast cancer. *Oncogene* 2009; **28**: 4053–4064.
- 328 Samaan S, Tranchevent L-C, Dardenne E, Polay Espinoza M, Zonta E, Germann S *et al.* The Ddx5 and Ddx17 RNA helicases are cornerstones in the complex regulatory array of steroid hormone-signaling pathways. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: 2197–2207.
- 329 Germann S, Gratadou L, Zonta E, Dardenne E, Gaudineau B, Fougère M *et al.* Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. *Oncogene* 2012; **31**: 4536–4549.

- 330 Paul S, Dansithong W, Jog SP, Holt I, Mittal S, Brook JD *et al.* Expanded CUG repeats Dysregulate RNA splicing by altering the stoichiometry of the muscleblind 1 complex. *J Biol Chem* 2011; **286**: 38427–38438.
- 331 Shin S, Janknecht R. Concerted activation of the Mdm2 promoter by p72 RNA helicase and the coactivators p300 and P/CAF. *J Cell Biochem* 2007; **101**: 1252–1265.
- 332 Dave B, Granados-Principal S, Zhu R, Benz S, Rabizadeh S, Soon-Shiong P *et al.* Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: 8838–8843.
- 333 Kim W-Y, Fayazi Z, Bao X, Higgins D, Kazemi-Esfarjani P. Evidence for sequestration of polyglutamine inclusions by Drosophila myeloid leukemia factor. *Mol Cell Neurosci* 2005; **29**: 536–544.
- 334 Abu-Farha M, Lambert J-P, Al-Madhoun AS, Elisma F, Skerjanc IS, Figeys D. The tale of two domains: proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. *Mol Cell Proteomics* 2008; **7**: 560–572.
- 335 Wu J, Cheung T, Grande C, Ferguson AD, Zhu X, Theriault K *et al.* Biochemical characterization of human SET and MYND domain-containing protein 2 methyltransferase. *Biochemistry* 2011; **50**: 6488–6497.
- 336 Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA *et al.* Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 2006; **444**: 629–632.
- 337 Srikakulam R, Winkelmann DA. Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle. *J Cell Sci* 2004; **117**: 641–652.
- 338 Diehl F, Brown MA, van Amerongen MJ, Novoyatleva T, Wietelmann A, Harriss J *et al.* Cardiac deletion of Smyd2 is dispensable for mouse heart development. *PLoS ONE* 2010; **5**: e9748.

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sarkomerstruktur.....	2
Abbildung 2: Aufbau des dünnen Filaments.	3
Abbildung 3: Aufbau des dicken Filaments.	4
Abbildung 4: Die Kontraktion führt zur Verkürzung des Sarkomers.....	4
Abbildung 5: Anatomie eines Skelettmuskels.	6
Abbildung 6: Anatomische Zeichnung der Skelettmuskulatur des Rattenhinterbeines.....	9
Abbildung 7: Skelettmuskelatrophie und -hypertrophie.....	10
Abbildung 8: Längsschnitt durch das Herz.	12
Abbildung 9: Schematischer Querschnitt durch den linken Ventrikel.....	15
Abbildung 10: Überblick über die verschiedenen Arten des kardialen Remodellings.	18
Abbildung 11: Ubiquitinierung des Substratproteins.....	21
Abbildung 12: Aufbau des 26S-Proteasoms.	23
Abbildung 13: Domänenstruktur der MuRF-Familie.	24
Abbildung 14: RING-Finger Domäne der MuRFs.....	25
Abbildung 15: Domänenzusammensetzung der MuRF2-Isoformen.	28
Abbildung 16: Muskelkraftmessung.....	57
Abbildung 17: Schematische Darstellung einer Alzet® osmotischen Pumpe.....	61
Abbildung 18: Darstellung der Thoraxaortenkonstriktion (TAC).	62
Abbildung 19: Kreuzungsschema.	69
Abbildung 20: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zur Bestimmung des Genotyps.....	70
Abbildung 21: Analyse des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung.....	71
Abbildung 22: Western Blot Analyse zur Bestätigung des Knockouts.	72
Abbildung 23: MuRF1 mRNA- und Proteinexpression.	73
Abbildung 24: Analyse der Skelettmuskelgewichte.....	74
Abbildung 25: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Skelettmuskeln.	75
Abbildung 26: Bestimmung der Zellkernlokalisierung.....	75
Abbildung 27: Analyse der Querschnittflächen der Muskelfasern.....	77
Abbildung 28: Gomori-Trichrom-Färbung.	78
Abbildung 29: Immunhistochemische Analyse zur Bestimmung der Aggregatlokalisierung.	79
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Skelettmuskulatur.	80
Abbildung 31: Analyse der Aggregatlokalisierung anhand der ATPase-Färbung und Detektion von MyHC- β /slow im <i>M. extensor digitorum longus</i>	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 32: Immunhistochemische Analyse der Fasertypzusammensetzung in den Skelettmuskeln <i>M. soleus</i> und <i>M. extensor digitorum longus</i> .	82
Abbildung 33: Quantifizierung der Fasertypzusammensetzung.	83
Abbildung 34: Real-time PCR-Analyse der Myosin-mRNA-Expression.	85
Abbildung 35: Bestimmung der spezifischen Kraft in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz.	87
Abbildung 36: Western Blot Analyse der MuRF2- und MuRF3-Proteinexpression im Herzen.	88
Abbildung 37: Analyse der <i>Trim63</i> -mRNA-Expression.	88
Abbildung 38: Organgewichte.	89
Abbildung 39: Vier-Kammer- und Detailansicht des Herzens.	90
Abbildung 40: Analyse der mRNA-Expression profibrotischer Gene und Gomori-Trichrom-Färbung der Herzspitze.	90
Abbildung 41: Real-time PCR-Analyse der Myosin-mRNA-Expression.	91
Abbildung 42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des interventrikulären Septums.	92
Abbildung 43: Echokardiographische Analyse der Herzstruktur und -funktion <i>in vivo</i> .	93
Abbildung 44: Analyse der Herzfunktionen <i>ex vivo</i> .	94
Abbildung 45: Herz-, Lungen- und Lebergewichte der <i>in vivo</i> Mausmodelle.	96
Abbildung 46: Analyse der Eigenschaften primärer Kardiomyozyten.	98
Abbildung 47: mRNA-Expression der MS-Kandidaten.	101
Abbildung 48: Expressionstest der fünf Fusionsproteine.	102
Abbildung 49: Immunzytochemische Färbung zur Bestimmung der zellulären Lokalisation der Fusionsproteine.	103
Abbildung 50: Immunzytochemische Färbungen zur Untersuchung der Kollokalisierung von SMYD2-FLAG mit MuRF2 oder MuRF3.	105
Abbildung 51: Untersuchung der Bindung der möglichen Interaktionspartner an MuRF2-His-myc bzw. an MuRF3-His-myc.	106
Abbildung 52: Endogene Protein- sowie mRNA-Expression von MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 in Skelettmuskel- und Herzgewebelysaten.	108
Abbildung 53: Western Blot-Analyse des SERCA2a-Gehalts im linken Ventrikel.	109

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humane und murine Isoformen der schweren Myosinketten in der Skelettmuskulatur.....	7
Tabelle 2: Kontraktile und metabolische Eigenschaften der verschiedenen Muskelfasertypen.	8
Tabelle 3: Prozentualer Anteil der verschiedenen Fasertypen in 4 Skelettmuskeln von C57/BL6J-Mäusen.	9
Tabelle 4: Vergleich von humanen und murinen Herz- und Kreislaufeigenschaften in Ruhe.	13
Tabelle 5: Beeinflussung der Genexpression der schweren kardialen Myosinketten durch verschiedene Stimuli.	14
Tabelle 6: Eukaryotische und prokaryotische Zellen.	34
Tabelle 7: Expressionsplasmide.	34
Tabelle 8: Antikörper.	35
Tabelle 9: Reagenzien.	36
Tabelle 10: Geräte und Verbrauchsmaterial.	40
Tabelle 11: Genotypisierungsprimer.	44
Tabelle 12: Reaktionsansatz für Genotypisierungs-PCRs.	44
Tabelle 13: Temperaturprogramme für Genotypisierungs-PCRs.	44
Tabelle 14: Reaktionsansatz für eine real-time PCR.	50
Tabelle 15: Primer für die real-time-PCR.	50
Tabelle 16: Temperaturprogramm für die real-time PCR.	50
Tabelle 17: Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.	51
Tabelle 18: Protokoll für die Trichrom-Färbung nach Gomori.	52
Tabelle 19: Protokoll für die ATPase-Färbung.	53
Tabelle 20: Klonierungsprimer für die Amplifikation muriner cDNA mittels PCR und jeweilige Annealingtemperatur.	65
Tabelle 21: PCR-Ansatz für Amplifikation der zu klonierenden murinen cDNAs.	65
Tabelle 22: Temperaturprogramm für Klonierungs-PCRs.	65
Tabelle 23: Restriktionsenzyme für die Insertion der PCR-Produkte in den Expressionsvektor.	66
Tabelle 24: Zur Klonierung ausgewählte Gene der in der MS-Analyse identifizierten Proteine.	100
Tabelle 25: Mess- und Signifikanzwerte der Echokardiographie.	149
Tabelle 26: Messwerte der Herzfunktion des Langendorff-Experiments.	150
Tabelle 27: Signifikanzwerte des Langendorff-Experiments.	150

13. Danksagung

Ich bedanke mich bei PD Dr. Jens Fielitz für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, für die Betreuung und für die vielen ausführlichen Gespräche und Diskussionen.

Prof. Dr. Thomas Sommer danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit, jederzeit mit Fragen zu ihm kommen zu können.

Mein Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der AG Fielitz. Besonders bedanke ich mich bei Franziska Schmidt, Jida Hamati und Dr. Melanie Kny für die anregenden Diskussionen von Ergebnissen und Laboralltäglichkeiten und ihre Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei Sibylle Schmidt und Janine Woehlecke sowohl für ihre exzellente technische Assistenz als auch für fruchtbare berufliche und private Gespräche.

Außerdem danke ich allen Kooperationspartnern, die ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Astrid Schiche für ihre großartige Unterstützung bei den Operationen und den Mitarbeitern der AG Kraft und der AG Scheibe der Medizinischen Hochschule Hannover sowie den Mitarbeitern der verschiedenen Technologieplattformen des Max-Delbrück Centrums für molekulare Medizin. Dr. Michael Radke aus der AG Gotthardt danke ich für die Gespräche und Tipps rund um die Kraftmessungsanlage.

Meine Familie, vor allem meine Mutter und mein Freund, und meine Freunde haben mich stets unterstützt und motiviert. Sie haben zugehört, Ratschläge erteilt, gute Laune verbreitet und mich beim Kaffeeklatsch auch mal alles andere vergessen lassen. Ich danke euch dafür!

14. Anhang

14.1 Echokardiographie

Tabelle 25: Mess- und Signifikanzwerte der Echokardiographie. Die Messwerte sind \pm Standardabweichung angegeben.

Parameter	Kontrolle	DKO	p
Dicke des IVS _{sys} in mm	1,003 \pm 0,119	0,902 \pm 0,086	0,137
Dicke des IVS _{dia} in mm	0,676 \pm 0,063	0,602 \pm 0,071	0,087
Dicke der LVPW _{sys} in mm	1,014 \pm 0,126	0,850 \pm 0,055	0,022
Dicke der LVPW _{dia} in mm	0,701 \pm 0,061	0,614 \pm 0,032	0,016
Durchmesser des LV _{sys} in mm	2,92 \pm 0,312	3,38 \pm 0,305	0,030
Durchmesser des LV _{dia} in mm	4,10 \pm 0,214	4,31 \pm 0,289	0,170
Verkürzungsfraction in %	28,87 \pm 5,03	21,74 \pm 2,82	0,018
Ejektionsfraction in %	56,77 \pm 9,09	45,38 \pm 5,61	0,033
Herzschlagvolumen in μ l	29,38 \pm 6,28	23,23 \pm 3,90	0,106
Herzfrequenz in min ⁻¹	416,14 \pm 41,67	398,60 \pm 49,73	0,521
Herzminutenvolumen in ml/min	12,28 \pm 3,42	9,25 \pm 1,75	0,030
LV Gewicht in mg	100,39 \pm 15,97	94,02 \pm 17,14	0,505
Körpergewicht in g	25,60 \pm 2,12	23,26 \pm 2,67	0,121
Herzgewicht/Körpergewicht in mg/g	3,93 \pm 0,56	4,02 \pm 0,38	0,773
E in mm/s	662,82 \pm 105,98	729,00 \pm 85,54	0,277
A mm/s	380,89 \pm 55,52	322,18 \pm 84,29	0,174
E/A	1,78 \pm 0,40	2,36 \pm 0,52	0,051

Abkürzungen: IVS: interventrikuläres Septum, sys: am Endpunkt der Systole, dia: am Endpunkt der Diastole, LVPW: linksventrikuläre posteriore Wand, LV: linker Ventrikel, E: Geschwindigkeit des passiven frühdiastolischen Bluteinstroms in den linken Ventrikel aus dem linken Vorhof, A: Geschwindigkeit des aktiven spät-diastolischen Bluteinstroms in den linken Ventrikel aus dem linken Vorhof aufgrund der Kontraktion des linken Vorhofs, E/A: Verhältnis von E zu A als Maß für eine diastolische Funktionsstörung des linken Ventrikels

14.2 Herzperfusion nach Langendorff

Tabelle 26: Messwerte der Herzfunktion des Langendorff-Experiments. Die Messwerte sind \pm Standardabweichung angegeben.

Parameter	Kontrolle sham	Kontrolle ISO	DKO sham	DKO ISO
Herzfrequenz in min^{-1}	500 \pm 0	483,95 \pm 18,07	499,90 \pm 0,26	498,16 \pm 4,97
LVP _{sys} in mmHg	99,8 \pm 25,63	199,19 \pm 0,52	68,34 \pm 11,30	178,76 \pm 25,60
LVP _{dia} in mmHg	13,23 \pm 3,61	11,00 \pm 5,20	10,00 \pm 1,12	9,74 \pm 1,89
LVP _{dev} in mmHg	85,93 \pm 22,65	191,99 \pm 4,18	58,34 \pm 10,81	172,98 \pm 27,80
dLVP/dt _{max} in mmHg/s	5007 \pm 1713	15667 \pm 1371	3149 \pm 893	11639 \pm 2553
dLVP/dt _{min} in mmHg/s	-3162 \pm 1076	-9299 \pm 1381	-1824 \pm 592	-6900 \pm 1362
Q	0,635 \pm 0,055	0,595 \pm 0,063	0,575 \pm 0,036	0,597 \pm 0,039
Herzindex in $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	125,68 \pm 35,22	165,17 \pm 15,98	99,61 \pm 19,75	143,18 \pm 16,89
Mittlerer Perfusionsdruck in mmHg	60,81 \pm 0,60	60,37 \pm 0,77	60,30 \pm 0,74	59,05 \pm 2,85
Blutfluss durch die Koronararterien in ml/min	2,85 \pm 0,74	3,51 \pm 0,85	1,92 \pm 1,58	3,19 \pm 1,28

Abkürzungen: LVP: linksventrikulärer Druck; sys: am Endpunkt der Systole; dia: am Endpunkt der Diastole; LVP_{dev}: Entwicklungsdruck, vom linken Ventrikel aufgebauter Druck während der Kammer systole ohne den durch das linke Atrium während der Vorhof systole erzeugten Druck; dLVP/dt_{max}: Druckänderung über die Zeit bis zum Erreichen des maximalen Drucks im linken Ventrikel (Kontraktionsgeschwindigkeit), dLVP/dt_{min}: Druckänderung über die Zeit bis zum Erreichen des minimalen Drucks im linken Ventrikel (Relaxationsgeschwindigkeit), Q: Quotient aus dLVP/dt_{max} und dLVP/dt_{min}, dient dem Erkennen von Geschwindigkeitsunterschieden

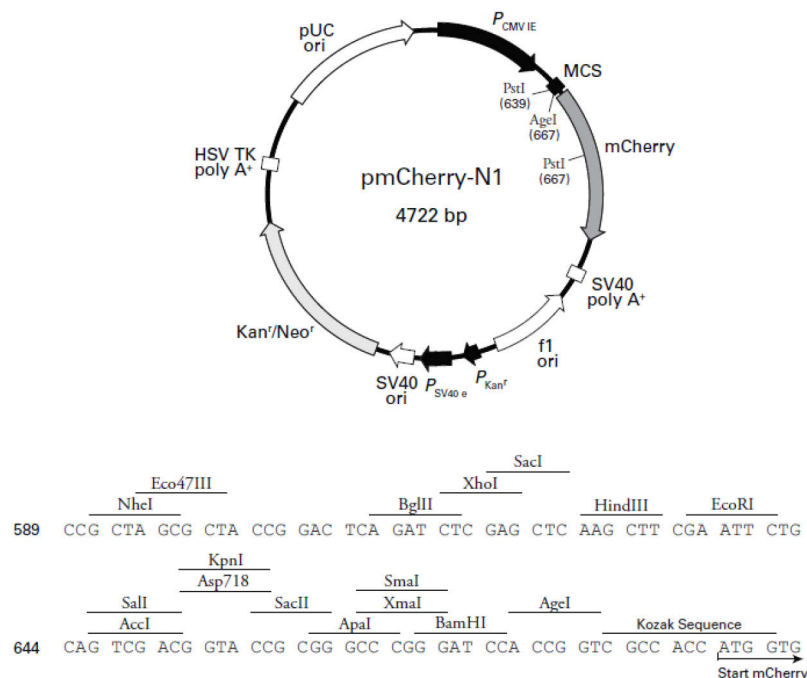
Tabelle 27: Signifikanzwerte des Langendorff-Experiments.

Parameter	Kontrolle Sham - ISO	DKO Sham - ISO	sham Kontrolle - DKO	ISO Kontrolle - DKO
Herzfrequenz in min^{-1}	0,343	0,818	0,762	0,257
LVP _{sys} in mmHg	0,029	< 0,001	0,030	0,067
LVP _{dia} in mmHg	0,506	0,780	0,257	0,914
LVP _{dev} in mmHg	< 0,001	0,002	0,031	0,257
dLVP/dt _{max} in mmHg/s	< 0,001	< 0,001	0,052	0,021
dLVP/dt _{min} in mmHg/s	0,029	< 0,001	0,033	0,026
Q	0,378	0,326	0,069	0,947
Herzindex in $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	0,087	0,009	0,168	0,074
Mittlerer Perfusionsdruck in mmHg	0,397	0,310	0,476	0,610
Blutfluss durch die Koronararterien in ml/min	0,286	0,041	0,114	0,680

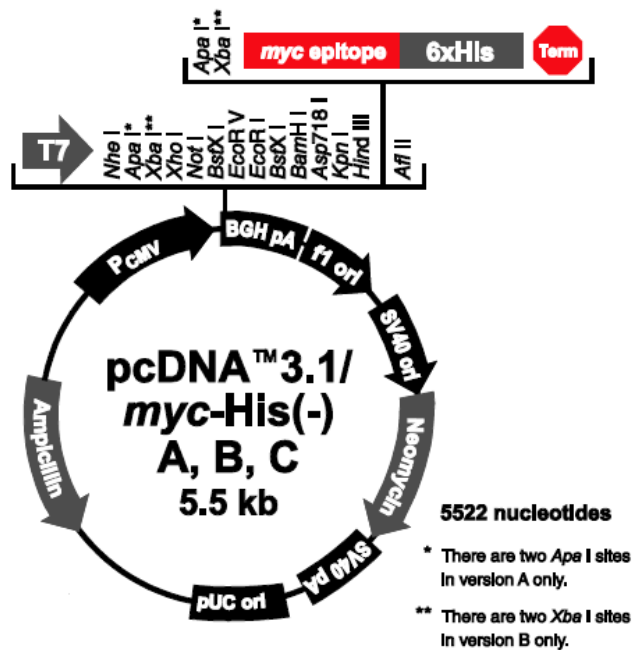
Abkürzungen: siehe Tabelle 26.

14.3 Vektorkarten

Der Säugetier-Expressionsvektor pmCherry-N1 (Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company, Mountain View, CA, USA) enthält die Sequenz für das mutierte Rot-fluoreszierende-Protein aus *Discosoma sp.* (DsRed). Das jeweils inserierte Gen befindet sich N-terminal vom DsRed, das exprimierte Protein erhält also eine C-terminale Markierung mit dem Rot-fluoreszierenden-Protein. Das Anregungs- und das Emissionsmaximum des DsRed sind 587 nm bzw. 610 nm. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) befindet sich zwischen dem Cytomegalovirus immediate early Promotor (PCMV IE) und der DsRed-kodierenden Sequenz. Direkt vor dem DsRed-Gen befindet sich eine Kozak-Konsensus-Sequenz, welche die Translationseffizienz in eukaryontischen Systemen verbessert. Die SV40 Polyadenylierungssignale sind hinter dem DsRed-Gen und unterstützen die ordnungsgemäße Verarbeitung des 3'-Endes der DsRed-mRNA. Der Vektor enthält einen SV40-Replikationsursprung für die Replikation in Säugetierzellen, ein pUC-Ursprung der Replikation zur Plasmid-Replikation in *E. coli* und einen f1-Ursprung für einzelsträngige DNA-Produktion. Eine Neomycin-Resistenz-Kassette (Neor) ermöglicht die Selektion stabil transfizierter eukaryotischer Zellen mit G418. Diese Kassette besteht aus dem SV40-Promotor (pSV40 e), dem Tn5 Neomycin / Kanamycin-Resistenz-Gen und Polyadenylierungssignale aus dem Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-TK)-Gen. Ein bakterieller Promotor (PKanr) stromaufwärts von der Kassette vermittelt eine Kanamycin-Resistenz in Bakterienzellen. Sequenzen für Restriktionsenzyme sind unterhalb des Vektors abgebildet.

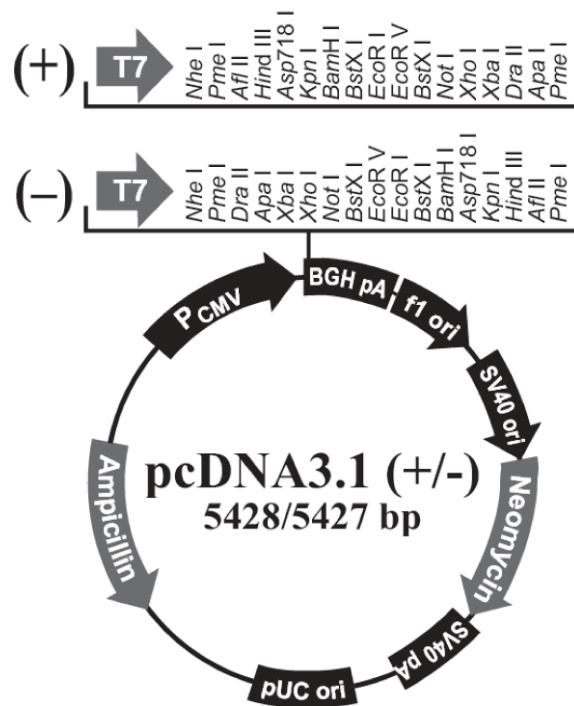


Der Säugetier-Expressionsvektor pcDNA™3.1/myc-His(-) (Invitrogen, life technologies™, Carlsbad, CA, USA) enthält die Sequenzen für das myc-Epitop und für das Epitop aus sechs Histidinresten. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) wird von einem Cytomegalovirus-Promotor reguliert, um eine hohe Expression des inserierten Gen-Transkripts in Säugetierzellen zu ermöglichen. Der Vektor enthält einen SV40-Replikationsursprung für die Replikation in Säugetierzellen, ein pUC-Ursprung der Replikation zur Vermehrung in *E. coli* und einen f1-Ursprung für einzelsträngige DNA-Produktion. Der Vektor enthält die kodierenden Sequenzen (CDS) für die Neomycinresistenz (für die Selektion in Säugetierzellen) und für die Ampicillinresistenz (für die Selektion in Bakterienzellen). Restriktionsenzyme, die für die Klonierung in diesen Vektor verwendet werden können, sind oberhalb des Vektors abgebildet.



Anhang

Der Säugetier-Expressionsvektor pcDNATM3.1/myc-His(+) (Invitrogen, life technologiesTM, Carlsbad, CA, USA) enthält die Sequenzen für die FLAG-Markierung. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) wird von einem Cytomegalovirus-Promotor reguliert, um eine hohe Expression des inserierten Gen-Transkript in Säugetierzellen zu ermöglichen. Der Vektor enthält einen SV40-Replikationsursprung für die Replikation in Säugetierzellen, ein pUC-Ursprung der Replikation zur Vermehrung in *E. coli* und einen f1-Ursprung für einzelsträngige DNA-Produktion. Der Vektor enthält die kodierenden Sequenzen (CDS) für die Neomycinresistenz (für die Selektion in Säugetierzellen) und für die Ampicillinresistenz (für die Selektion in Bakterienzellen). Restriktionsenzyme, die für die Klonierung in diesen Vektor verwendet werden können, sind oberhalb des Vektors abgebildet.



ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCC AAGCTT GGT ACC
 T7-Primer HindIII KpnI

M D Y K D D D D K
 GAG CTC GGA TCG CCC ACC ATG GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA
 FLAG-Tag

ATC GAT ATC GAA TTC TGC AGA TAT CCA TCA CAC TGG CGG CCG CTC GAG
 ClaI/EcoRV EcoRI EcoRV NotI XhoI

CAT GCA TCT AGA GGG CCC TAT TCT
 XbaI ApaI

15. Publikationen, Konferenzbeiträge

Veröffentlichte Artikel:

The E3 ubiquitin ligase TRIM62 and inflammation-induced skeletal muscle atrophy. Franziska Schmidt, Melanie Kny, Xiaoxi Zhu, Tobias Wollersheim, Kathleen Persicke, Claudia Langhans, **Doerte Lodka**, Christian Kleber, Steffen Weber-Carstens and Jens Fielitz, *Critical Care*. 09/2014; 18(5):545. doi: 10.1186/s13054-014-0545-6

Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy. Langhans C, Weber-Carstens S, Schmidt F, Hamati J, Kny M, Zhu X, Wollersheim T, Koch S, Krebs M, Schulz H, **Lodka D**, Saar K, Labeit S, Spies C, Hubner N, Spranger J, Spuler S, Boschmann M, Dittmar G, Butler-Browne G, Mouly V, Fielitz J., *PLoS One*. 2014 Mar 20;9(3):e92048. doi: 10.1371/journal.pone.0092048. eCollection 2014., PMID: 24651840

Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness. Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, **Lodka D**, Luther-Schroeder A, Langhans C, Haas K, Radtke T, Kleber C, Spies C, Labeit S, Schuelke M, Spuler S, Spranger J, Weber-Carstens S, Fielitz J., *Intensive Care Med*. 2014 Feb 15. [Epub ahead of print], PMID: 24531339

Early type II fiber atrophy in intensive care unit patients with nonexcitable muscle membrane. Bierbrauer J, Koch S, Olbricht C, Hamati J, **Lodka D**, Schneider J, Luther-Schröder A, Kleber C, Faust K, Wiesener S, Spies CD, Spranger J, Spuler S, Fielitz J, Weber-Carstens S., *Crit Care Med*. 2012 Feb;40(2):647-50. doi: 10.1097/CCM.0b013e31823295e6., PMID: 21963579

Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. John T, **Lodka D**, Kohl B, Ertel W, Jammrath J, Conrad C, Stoll C, Busch C, Schulze-Tanzil G., *J Orthop Res*. 2010 Aug;28(8):1071-7. doi: 10.1002/jor.21079., PMID: 20127972

Eingereichte Artikel:

Angiotensin II induced skeletal muscle atrophy is regulated via the PKD1/HDAC5/TFEB/ MuRF1 signaling pathway. Philipp Du Bois, Franziska Schmidt, **Doerte Lodka**, Melanie Kny, Ph.D., Kunhua Song, Ph.D., Rhonda Bassel-Duby, Ph.D., Eric N. Olson, Ph.D., Jens Fielitz, MD

Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. Dörte Lodka, Aanchal Pahuja, Cornelia Geers-Knörr, Marcel Nowak, Jida Hamati, Clemens Köhncke, Bettina Purfürst, Sibylle Schmidt, David J. Glass, Ingo Morano, Arnd Heuser, Theresia Kraft, Rhonda Bassel-Duby, Eric N. Olson, Thomas Sommer, Jens Fielitz

Konferenzbeiträge:

25th European Students' Conference "Rethinking Medical Research – how do we achieve innovation?", Berlin, 17 – 20.09.2014; Posterpräsentation und Vortrag

EMBO Konferenz "Ubiquitin & ubiquitin-like proteins: At the crossroads from chromatin to protein", Buenos Aires, 19. – 24.10.2014; Posterpräsentation

16. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben.

Ich erkläre, mich nicht anderwärtig um einen Doktorgrad beworben zu haben bzw. keinen entsprechenden Doktorgrad zu besitzen.

Ich habe die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zur Kenntnis genommen.

Dörte Lodka