

Molekulare Kardiologie

Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie,
Angiologie und internistische Intensivmedizin
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey

**Die Rolle des herzspezifischen Proteins CEFIP in der
kardialen Hypertrophie und Kardiomyopathie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von

Franziska Dierck

Kiel, 2018

Molekulare Kardiologie
Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und
internistische Intensivmedizin
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey

Die Rolle des herzspezifischen Proteins CEFIP in der kardialen Hypertrophie und Kardiomyopathie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von

Franziska Dierck

Kiel, 2018

Erster Gutachter: Prof. Dr. Norbert Frey

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Bernd Clement

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2018

Zum Druck genehmigt: 10.07.2018

gez.:

(Dekanin)

I Zusammenfassung

Die Z-Scheibe des Sarkomers ist ein subzellulärer Knotenpunkt in Kardiomyozyten, der sowohl für die Strukturhaltung als auch für die Signaltransduktion eine zentrale Rolle spielt. Viele Z-Scheibenproteine konnten bereits im Zusammenhang mit genetischen Kardiomyopathien und Muskelerkrankungen beschrieben werden. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. N. Frey konnten in systematischen *in silico* Screening-Experimenten neue, noch unbekannte Z-Scheibenproteine identifiziert werden, dabei auch das 230 kDa große Protein CEFIP (Cardiac Enriched FHL2 Interacting Protein). Seine herz- und skelettmuskelspezifische Expression konnten mittels quantitativer Real-Time PCR (163-fache Expression im Herzen; 384-fache Expression im Skelettmuskel) und Northern Blot bestätigt werden. Analysen in bekannten Modellen der Kardiomyopathie zeigten, dass *Cefip* auf mRNA-Ebene in Muscle-LIM-Protein-Knockout Mäusen (MLP-KO; $2,94 \pm 0,5$ -fach, $p < 0,05$) und in Calsarcin-1-Knockout Mäusen (CS1-KO; $1,93 \pm 0,4$ -fach, $p < 0,001$) signifikant hochreguliert ist. Ebenfalls in humanen Proben von dilatativen (DCM) und hypertrophen Kardiomyopathien (HCM) war *CEFIP* verstärkt exprimiert. Um CEFIP genauer zu charakterisieren, wurden adenovirale Konstrukte zur Überexpression und Herunterregulation von CEFIP generiert, wodurch Versuche in An- und Abwesenheit von CEFIP möglich waren. In neonatalen Kardiomyozyten führte eine Überexpression von CEFIP zu einer Induktion der hypertrophen Genmarker wie ANF (*Nppa*; 2,36-fach) und BNP (*Nppb*; 1,63-fach). Eine Herunterregulation der CEFIP-Expression um 80 % beeinflusst diese Marker nicht. Die Durchführung von Yeast 2-Hybrid Analysen konnte potentielle Bindungs- und Interaktionspartner von CEFIP entschlüsseln, wie das bereits charakterisierte Titin und Filamin-bindende Protein FHL2 (Four and a Half Lim domains Protein 2). Die Interaktion zwischen FHL2 und CEFIP konnte durch Co-Immunopräzipitation und Co-Lokalisation bestätigt werden. FHL2 spielt in der Calcineurin-abhängigen Myokardhypertrophie eine wichtige Rolle, in dem es durch Calcineurinbindung eine solche Hypertrophie reduzieren kann. Analysen von CEFIP im Calcineurin-NFAT Signalweg zeigen, dass eine Überexpression in Kardiomyozyten die NFAT-Luciferase-Reporteraktivität steigert und dieses Signal durch zugeführtes konstitutiv aktives Calcineurin noch weiter gesteigert werden kann, während eine Herunterregulation von CEFIP die Luciferase-Aktivität unterdrückt. Gleichzeitige Herunterregulation von FHL2 und Überexpression von CEFIP führte jedoch zu keinem additiven Effekt auf die NFAT-Luciferase-Reporteraktivität. Um die Rolle von CEFIP im gesamten Organismus zu bewerten, wurde eine CEFIP-Knockout Maus generiert, die sich bis zu einem Alter von über 20 Monaten normal entwickelte und keine kardialen Dysfunktionen aufzeigte. Nachdem die Auswirkungen des CEFIP-Knockouts in der Maus unter unterschiedlichen prohypertrophen Bedingungen getestet wurden, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die CEFIP-Deletion die Calcineurin-vermittelte Induktion

Zusammenfassung

der Hypertrophie verzögert. Zusammenfassend konnte CEFIP als neuer Modulator im Calcineurin-NFAT Signalweg identifiziert werden, was ein neuer Beitrag zum Verständnis der Myokardhypertrophie ist und einen möglichen neuen Ansatzpunkt für Therapien von Herzerkrankungen darstellt.

II Abstract

The sarcomeric z-disc has been recognized as a nodal point in cardiomyocyte function and signaling. Numerous z-disc proteins have been associated with cardiomyopathies and muscle diseases. Performing an „*in silico*“ screen for novel cardiac specific cDNAs many unknown heart and skeletal muscle specific proteins were discovered, like the 230 kDa protein CEFIP (Cardiac Enriched FHL2 Interacting protein). Via quantitative real-time PCR (163-fold enrichment in heart, 384-fold in skeletal muscle) and Northern blot the specific expression pattern was confirmed. First the differential expression of CEFIP in models of heart disease was examined. CEFIP mRNA was upregulated in cardiomyopathy, as observed in muscle-LIM-protein-knockout mice (MLP-KO, 2.94 ± 0.5 -fold, $p < 0.05$) and calsarcin1-KO animals (CS1-KO, 1.93 ± 0.4 -fold, $p < 0.001$). Consistently, the expression level of CEFIP mRNA was significantly higher in samples of myocardial tissue from human patients suffering from ischemic (ICM) or dilated (DCM) cardiomyopathy compared with non-failing controls. To further characterize the role of CEFIP in cardiomyocytes adenoviral constructs encoding for CEFIP and a synthetic miRNA targeting CEFIP to allow gain and loss of functions experiments were generated. Overexpression of CEFIP in cultivated neonatal rat cardiomyocytes led to induction of the hypertrophic gene markers such as ANF (*Nppa*, 2.36-fold) and BNP (*Nppb*, 1.63-fold). Conversely, miRNA-mediated 80 % downregulation of CEFIP did not modulate the expression pattern of these markers. In order to identify potential binding and interacting partners of CEFIP a yeast two-hybrid screen was performed. Several clones encoding FHL2 (Four and a Half Lim domains protein 2), a well-known titin and filamin binding protein, were identified. Co-immunoprecipitation and co-immunostaining confirmed the interaction between FHL2 and CEFIP. Of note, FHL2 has been found to repress pathological cardiac growth via calcineurin, a key phosphatase controlling cardiac hypertrophy. Therefore the effect by CEFIP in calcineurin signaling was further examined. Overexpression of CEFIP increased NFAT-luciferase-reporter activity with further signal enhancement in the presence of constitutively active calcineurin. Conversely, downregulation of CEFIP repressed NFAT-luciferase-reporter activity. Interestingly, simultaneous downregulation of the interacting partner FHL2 and overexpression of CEFIP at the same time did not show an additive increase of NFAT-luciferase-reporter activity. Given these *in vitro* data, a constitutive CEFIP-knockout mouse was generated. The knockout mice developed normally until the age of 20 months and did not show cardiac dysfunction as assessed by echocardiography. Inducing hypertrophic stimuli in CEFIP deficient mice revealed that the absence of CEFIP can blunt the calcineurin-induced hypertrophic response *in vivo*. To summarize, the previously uncharacterized protein CEFIP is introduced as a new modulator of the calcineurin-NFAT signaling and hypothesized to play a critical role in calcineurin-dependent hypertrophic signal transduction. These findings provide a novel

Abstract

insight into the pathogenesis of cardiac hypertrophy and could lead to new therapeutic approaches.

