

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

**Identifizierung und Charakterisierung von Maturin als neues Zielprotein in der  
Pathogenese der kardialen Hypertrophie aus Genexpressionsanalysen der  
Hypertrophen Kardiomyopathie**

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

vorgelegt von

**Matthias Gröger**  
aus **Füssen**

**Kiel, 2021**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Frey, Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie  
Medizinische Klinik / Innere Medizin III, Universitätsklinikum Heidelberg
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Valerius, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 30.11.2020

gez.: Prof. Dr. Hendrik Bonnemeier  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)





## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Kardiale Hypertrophie.....	1
1.1.1 Das fetale Genprogramm im Rahmen der kardialen Hypertrophie.....	2
1.1.2 Zelluläre Signalwege der kardialen Hypertrophie.....	4
1.1.2.1 Calcineurin/NFAT.....	4
1.1.2.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	4
1.1.2.3 Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK)-Signalweg.....	6
1.1.2.4 Phosphatidylinsoitol-3-Kinasen (PI3K).....	6
1.1.3 Kardiale Hypertrophie und Fibrose.....	7
1.1.4 Das endoplasmatische Retikulum und seine Rolle im kardialen Remodeling.....	8
1.2 Hypertrophe Kardiomyopathie.....	11
1.2.1 Pathophysiologie der Hypertrophen Kardiomyopathie.....	13
1.2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie und das Prinzip der „Modifier“-Gene.....	14
1.2.3 Therapie und Prognose der Hypertrophen Kardiomyopathie.....	15
1.3 Fragestellung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Geräte und Hilfsmittel.....	18
2.1.2 Chemikalien.....	20
2.1.3 Enzyme.....	21
2.1.4 Antikörper.....	22
2.1.4.1 Primäre Antikörper.....	22
2.1.4.2 Sekundäre Antikörper.....	22
2.1.5 Oligonukleotide und Primer.....	22
2.1.6 Plasmide.....	24
2.1.7 Viren.....	25
2.1.8 Kits.....	25
2.1.9 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.10 Medien.....	28

2.1.11 Bakterien .....	29
2.1.12 Zelllinien .....	29
2.1.13 Neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte (NRVCM).....	29
2.1.14 Tiere .....	30
2.2 Methoden .....	30
2.2.1 Systematische Auswertung einer Transkriptionsanalyse der HCM .....	30
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	30
2.2.2.1 Erzeugung elektrokompenter Bakterien.....	30
2.2.2.2 Elektroporation.....	31
2.2.2.3 Anfertigung von Agarplatten.....	31
2.2.2.4 Verteilung von Bakterienkulturen auf LB-Agar .....	32
2.2.2.5 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium .....	32
2.2.3 Zellkulturmethoden.....	32
2.2.3.1 Kultivierung von Zellen.....	32
2.2.3.2 Kollagenisierung von Zellkulturplatten mit bovinem Kollagen I .....	32
2.2.3.3 Herstellung einer primären Zellkultur von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten .....	33
2.2.3.4 Kultivierung von HEK293-A-Zellen.....	34
2.2.3.5 Behandlung von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten mit Phenylephrin.....	35
2.2.3.6 Mechanischer Stress von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten mittels Stretchmembran .....	35
2.2.3.7 Induktion von <i>Unfolded Protein Response</i> und Autophagie in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten .....	35
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.4.1 Extraktion von Plasmid-DNA – Mini-Präparation.....	36
2.2.4.2 Extraktion von Plasmid-DNA – Midi-Präparation.....	36
2.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	37
2.2.4.4 Open Reading Frame (ORF) PCR .....	38
2.2.4.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	38
2.2.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.4.7 Klonierung von Zielgenen .....	39
2.2.4.8 Klonierung von DNA-Sequenzen – die Gateway®-Technologie .....	39
2.2.4.9 Erzeugung von Adenoviren zur Expression rekombinanter Proteine in Zellkulturen .....	40

2.2.4.10 Titerbestimmung von Adenoviren.....	41
2.2.4.11 RNA-Extraktion aus <i>in-vitro</i> -Zellkulturen .....	42
2.2.4.12 cDNA-Synthese aus RNA-Proben .....	43
2.2.4.13 RNA-Isolation aus Gewebeproben.....	43
2.2.4.14 Quantitative Realtime-PCR.....	43
2.2.4.15 Proteinisolation aus Zellkulturen .....	44
2.2.4.16 Proteinisolation aus Gewebeproben .....	44
2.2.4.17 Messung von Proteinkonzentrationen mit dem DC™ Protein-Assay Kit .....	44
2.2.4.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.2.4.19 Western-Blotting .....	45
2.2.4.20 Spezifische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	46
2.2.4.21 Immunofluoreszenz.....	46
2.2.4.22 Bestimmung von Zellgrößen .....	47
2.2.4.23 Tierhaltung und Tierexperimente .....	47
2.2.5 Statistische Analyse.....	48
3 Ergebnisse.....	49
3.1 <i>In-silico</i> -Analyse von neuen Kandidatentranskripten aus humanen Microarray-Daten der Hypertrophen Kardiomyopathie.....	49
3.2 Kardiale Hypertrophie-Modelle und fetales Genprogramm .....	51
3.3 Validation neuer Transkripte in Hypertrophie-Modellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> mittels qRT-PCR .....	53
3.4 Expression von Maturin in adulten Mausgeweben .....	57
3.5 Die adenovirale Überexpression von Maturin induziert Hypertrophie <i>in vitro</i> ..	58
3.6 Maturin zeigt eine Ko-Lokalisation mit Markerproteinen des Endoplasmatischen Retikulums .....	62
3.7 Induktion von ER-Stress durch Behandlung von Rattenkardiomyozyten mit DTT führt zu verstärkter Expression von Maturin .....	64
3.8 Die Expression von Maturin wird im Hungermodell induziert.....	667
4 Diskussion .....	69
4.1 Identifikation neuer Transkripte <i>in silico</i> aus Transkriptionsanalysen der Hypertrophen Kardiomyopathie .....	69
4.2 Maturin als Protein des Endoplasmatischen Retikulums und als neuer Faktor in der Entstehung der kardialen Hypertrophie.....	72

4.3 Das Maturin-Protein besitzt trotz niedrigem Expressionsniveau funktionelle Relevanz.....	77
5 Zusammenfassung.....	79
6 Literaturverzeichnis.....	80
7 Abkürzungsverzeichnis.....	90
8 Eidesstattliche Erklärung.....	93
Anhang	



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Formen der physiologischen und pathologischen Hypertrophie.....	2
Abb. 2: Experimentelle Phänotypen der kardialen Hypertrophie .....	8
Abb. 3: Übersicht über die Signalwege der Unfolded Protein Response .....	10
Abb. 4: Proteine mit bekannten HCM-induzierenden Mutationen .....	12
Abb. 5: Heatmap des HCM-Microarray.....	50
Abb. 6: Induktion des Hypertrophen Genprogrammes in Modellen der pathologischen Hypertrophie .....	51
Abb. 7: qRT-PCR-Screening der im HCM-Array regulierten Gene in verschiedenen Hypertrophiemodellen .....	55
Abb. 8: Multi-Organ-qRT-PCR und organspezifische Expression des <i>Mturn</i> -Gens ...	59
Abb. 9: Überexpression von Maturin mittels Adenovirus.....	60
Abb. 10: Adenovirale Überexpression von Maturin induziert Hypertrophie <i>in vitro</i> ....	61
Abb. 11: Immunocytochemische Detektion von MTURN und Co-Lokalisation mit verschiedenen Strukturproteinen des ER .....	62
Abb. 12: Erhöhung der <i>Mturn</i> -Expression durch DTT-induzierten ER-Stress.....	64
Abb. 13: Maturin wird im Hungerzustand verstärkt exprimiert .....	68
Abb. 14: Aminosäuresequenz von Maturin .....	74

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste primärer Antikörper .....	22
Tabelle 2: Liste sekundärer Antikörper.....	22
Tabelle 3: Primer zur Quantifizierung der Expression von Maturin mittels RT-PCR...22	
Tabelle 4: Primer zur Genquantifizierung mittels Multiplex Realtime-PCR.....	23
Tabelle 5: Primer zur Amplifikation des offenen Leserasters (ORF) von Maturin.....	24
Tabelle 6: Verschiedene Dichten für die Aussaat von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten auf unterschiedliche Zellkulturplatten .....	34
Tabelle 7: Liste der differentiell exprimierten Kandidatengene aus der HCM- Transkriptomanalyse sowie der Zahl der zugehörigen wissenschaftlichen Publikationen (Stand 06/2014).....	49
Tabelle 8: Quantitative Realtime-PCR der HCM-Zielgene (Differentielle Expression vs. Haushaltsgen <i>Rp132</i> ) in Hypertrophiemodellen, jeweils vs. unbehandelter Kontrolle .....	54



# 1 Einleitung

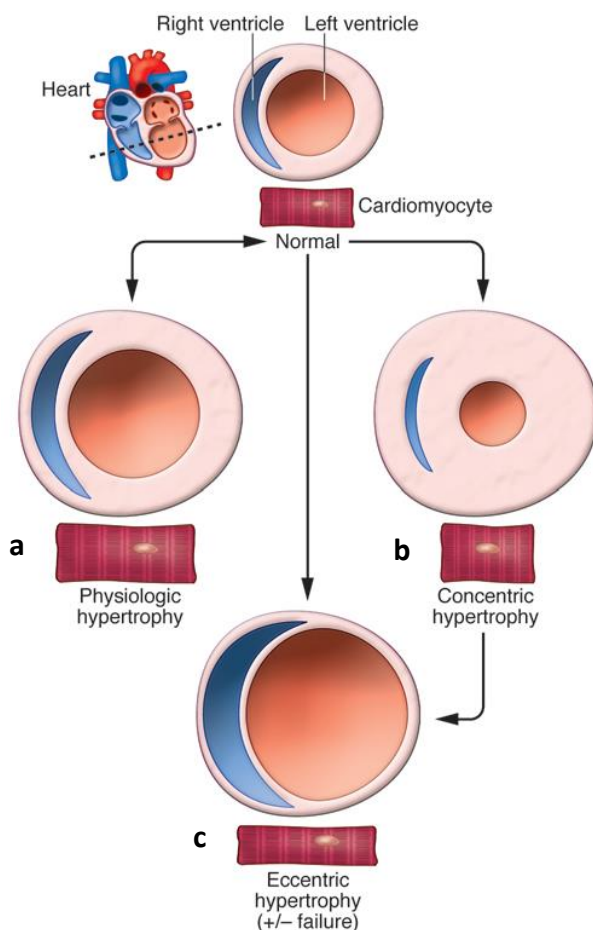
## 1.1 Kardiale Hypertrophie

Das Herz besitzt die Aufgabe, Blut und damit Sauerstoff, Nähr- und Botenstoffe durch das Kreislaufsystem in den Körper zu befördern und einen Abtransport von Stoffwechselendprodukten und Kohlenstoffdioxid zu gewährleisten. Der Kardiomyozyt als größte Funktionseinheit des Organs passt sich an gesteigerten biomechanischen Stress in Form kardialer Hypertrophie an. Hierbei wird phänotypisch eine konzentrische von einer exzentrischen Hypertrophie unterschieden. Beispielsweise führt langanhaltender arterieller Hypertonus über eine gesteigerte Nachlast zur Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie und begleitend im Verlauf auch einer diastolischen Dysfunktion. Eine Volumenbelastung des Herzens, zum Beispiel im Rahmen einer Klappeninsuffizienz, bewirkt langfristig eine exzentrische Hypertrophie und eine Dilatation des Ventrikels mit eingeschränkter systolischer Pumpfunktion (Mutlak & Kehat, 2015; You et al., 2017). Bei anhaltend erhöhter Nachlast im Rahmen der konzentrischen Hypertrophie kann es auch zur sekundären Dilatation mit begleitender systolischer Herzinsuffizienz kommen (Kong et al., 2014). Die Herzinsuffizienz ist in 70-90 % der Fälle durch die koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie und kardiale Hypertrophie verursacht (Lip, Gibbs & Beevers, 2000). Die Herzinsuffizienz war mit ca. 445.000 Fällen in Deutschland im Jahr 2015 die häufigste Ursache für eine Hospitalisierung (Edelmann et al., 2018) und wies 2013 eine Mortalitätsrate von 9,3 % im stationären Bereich. Sie stellt somit ein hochrelevantes Krankheitsbild im klinischen Alltag dar (Christ et al., 2016).

Kardiale Hypertrophie ist definiert als eine Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten, welche zur Vergrößerung des Gesamtorgans führt (Abb. 1). Eine Hyperplasie, also eine Zunahme der Zellzahl, ist für Kardiomyozyten aufgrund ihrer terminalen Differenzierung nur in äußerst geringem Ausmaß möglich (Maillet, van Berlo & Molkentin, 2013).

Hypertrophie wird unter anderem durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und des sympathischen Nervensystems im Rahmen von biomechanischer (Über-)Belastung induziert (Akers et al., 2000).

Die Hypertrophie führt zu einer Normalisierung der durch die verstärkte Druck- oder Volumenbelastung erhöhten Wandspannung des linken Ventrikels und kann so die Pumpfunktion aufrechterhalten. (Dorn, Robbins, & Sugden, 2003; Frey & Olson, 2003; Kehat & Molkenstin, 2010).



**Abbildung 1: Formen der physiologischen und pathologischen Hypertrophie.**

Schwangerschaft und körperliches Training führen zu einer balancierten exzentrischen Hypertrophie mit gleichmäßiger Längen- und Dickenzunahme der Kardiomyozyten (a).

Pathologische Druckbeanspruchung führt durch Aktivierung neurohumoraler Faktoren v.a. über ein Dickenwachstum der Muskelzellen zu einer konzentrischen Hypertrophie mit myokardialer Fibrose und Verringerung des ventrikulären Füllungsvolumens. Ähnliche Effekte, jedoch nicht durch Überbeanspruchung erklärbar, werden im Rahmen der Hypertrophen Kardiomyopathie beobachtet (b).

Langfristig kommt es zur exzessiven Dilatation der Herzhöhlen mit starker Vergrößerung der Wandspannung und Verlust der systolischen Funktion (c).

Manche Krankheitsbilder (z.B. Volumenbelastung, Dilatative Kardiomyopathie) führen direkt zur Dilatation des Herzens ohne vorheriges konzentrisches Remodeling.

(nach van Berlo et al. 2013)

### 1.1.1 Das fetale Genprogramm im Rahmen der kardialen Hypertrophie

Ein wichtiges Charakteristikum der kardialen Hypertrophie ist die erneute Expression des sogenannten fetalen Genprogrammes. Der pränatale Herzmuskel gewinnt vorwiegend Energie aus der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten. Postnatal findet rasch die Umstellung auf die im Wesentlichen ausschließliche Oxidation von langkettigen Fettsäuren statt, mit Umstellung der Gen- und Proteinexpression. Im hypertrophierten Kardiomyozyten wird dieser Metabolismus jedoch erneut verändert und die Energiegewinnung wieder vermehrt auf die Verwertung von Glukose

umgestellt (Rajabi et al., 2007). Die Expression der  $\alpha$ -Isoform des Transkriptionsfaktors PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*) als zentraler Regulator des Energiestoffwechsels und die Expression mit  $\beta$ -Oxidation assoziierter Gene ist unter erhöhter Nachlast zusammen mit anderen Schlüsselenzymen des Lipidstoffwechsels signifikant herabreguliert (Barger et al., 2000). Im Gegenzug führte eine verstärkte Aktivierung von PPAR $\alpha$  zum ventrikulären Pumpversagen in Ratten unter verstärkter Druckbelastung (Young, 2001). Als Ziel dieser Umstellung von Fett- auf Glukosestoffwechsel wird eine Ökonomisierung des kardialen Metabolismus vermutet, der als Folge vermehrter Glykolyse weniger Sauerstoff pro erzeugtem ATP-Molekül verbrauchen muss. (Frey & Olson, 2003).

Neben Genen für metabolische Enzyme setzt sich das fetale Genprogramm auch aus den Genen für die natriuretischen Peptide ANF (*atrial natriuretic factor*, Gen: *nppa*) und BNP (*brain natriuretic peptide*, Gen: *nppb*), sowie  $\alpha$ -Actin und die schwere Kette des  $\beta$ -Myosins ( $\beta$ -MHC/*myh7*) zusammen. Unter physiologischer kardialer Hypertrophie, z.B. im Rahmen von Adaptationsprozessen bei körperlichem Training oder während der Schwangerschaft, wird seine Induktion nicht beobachtet. Physiologische Hypertrophie wird insbesondere durch den Einfluss von *Insuline-like growth factor-1* (IGF-1) und Wachstumshormon (GH) auf die Phosphoinositid-3-Kinase und damit die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt induziert. Die vermehrte Aktivität der fetalen Gene lässt auch eine protektive Rolle unter pathologischer Hypertrophie vermuten. So können beispielsweise die natriuretischen Peptide ANF und BNP mittels einer Steigerung der Wasserausscheidung und Antagonisierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems nicht nur systemisch blutdrucksenkend wirken. Sie scheinen auch auf zellulärer Ebene die Entstehung der Hypertrophie zu antagonisieren (Maillet, van Berlo & Molkenin, 2013). Patienten weisen mit Fortschreiten der Erkrankung jedoch zunehmend Resistenzen gegen diese schützenden neurohumoralen Effekte auf (Díez, 2017).

Die medikamentöse Hemmung des Abbaus des natriuretischen Peptids BNP durch den Neprilysin-Inhibitor Sacubitril in der Kombination mit Valsartan (Handelsname: Entresto) konnte in der PARADIGM-HF-Studie signifikant die Morbidität und Mortalität von Patienten mit Herzinsuffizienz senken (McMurray et al., 2014).

## 1.1.2 Zelluläre Signalwege der kardialen Hypertrophie

### 1.1.2.1 Calcineurin/NFAT

Zu den am besten untersuchten molekularen Anpassungsmechanismen der kardialen Hypertrophie gehören die Signalwege der Phosphatase Calcineurin, die ursprünglich in T-Zellen beschrieben wurde. Transgene Mäuse mit konstitutiv aktivem Calcineurin entwickeln eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie (Abb. 2). Die calciumabhängige Phosphatase Calcineurin besteht aus einer katalytischen A- und einer regulatorischen B-Untereinheit und dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NF-AT3, welcher dadurch in den Zellkern gelangt und dort durch Interaktion mit dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor GATA4 die kardiale Genexpression – insbesondere das embryonale Genprogramm – induziert (Molkentin et al., 1998; Frank et al., 2007). Im Verlauf konnten zahlreiche Interaktionspartner von Calcineurin identifiziert werden, für die zum Teil auch eine große Rolle in kardialer Hypertrophie gezeigt werden konnte. Beispielsweise führt die adenovirale Überexpression des Z-Scheiben-Proteins Calsarcin-1 im Mausmodell mittels Hemmung von Calcineurin zu einer deutlichen Reduktion der Angiotensin-II-vermittelten Hypertrophie (Frey, Richardson & Olson, 2000; Frank et al., 2007). Die Calcineurin-Inhibitoren Ciclosporin A und FK506/Tacrolimus hemmen *in vitro* die Induktion einer Hypertrophie. *In-vivo*-Experimente mit einer pharmakologischen Calcineurin-Inhibition zeigten allerdings widersprüchliche Ergebnisse (Olson und Williams, 2000). Der endogene *regulator of calcineurin 1.4 (rcan1.4)* kontrolliert die Aktivität von Calcineurin nach Aktivierung durch die Proteinkinase A und kann somit die Beteiligung von Calcineurin an hypertrophischen Signalkaskaden belegen (Kim et al., 2015). Zusammenfassend ist das transgene Mausmodell der Calcineurin-vermittelten kardialen Hypertrophie ein etabliertes Modell in der experimentellen Forschung und findet auch im Rahmen dieser Dissertation Anwendung.

### 1.1.2.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die verschiedenen Isoformen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nehmen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von Kardiomyozyten ein. An der Entstehung der Hypertrophie sind insbesondere die myokardialen Isoformen  $G_s$ ,  $G_{q/11}$  sowie  $G_i$  beteiligt. Die Rezeptoren für Angiotensin II, Endothelin I oder das  $\alpha$ -adrenerge sympathische Nervensystem sind  $G_{q/11}$ -gekoppelt und aktivieren hierüber die

Phospholipase C. Diese bewirkt über eine Bildung von Diacylglycerin und Inositol-(1,4,5)triphosphat einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und damit eine Aktivierung von Calcineurin (Nicol, Frey & Olson, 2000). Eine Überexpression der Rezeptoren oder der an sie gekoppelten G-Proteine führte experimentell zur Entwicklung von Hypertrophie sowie zur Reduktion der kontraktilen Funktion *in vivo* (D'Angelo et al., 1997; Koch, Lefkowitz & Rockman, 2000). Der Verlust der G-Proteine  $\alpha_{11}$  und  $\alpha_q$  bewirkt eine kardiale Hypoplasie und führt zu einem frühzeitigen Fruchttod im Embryonalstadium, was die wichtige Rolle in der Organentwicklung zeigt (Offermanns et al., 1998).  $G_{11}$ -Knockoutmäuse sind lebensfähig und zeigen keine sichtbare Organdysfunktion. Die zusätzliche konditionelle kardiale Deletion von  $G_q$  verhindert die Aktivierung des fetalen Genprogrammes und die Entstehung einer Hypertrophie nach Aortenkonstriktion und legt eine essentielle Rolle dieser Proteinfamilie in der Entstehung der Hypertrophie nahe (Wettschureck et al., 2001).

Einer der wichtigsten  $G_s$ -Protein gekoppelten Rezeptoren im Myokard ist der  $\beta_1$ -Rezeptor. Über die Aktivierung der Adenylatcyclase und der Proteinkinase A wirkt dieser positiv chronotrop, inotrop und lusitrop. Eine Überexpression des Rezeptors bewirkte in jungen Mäusen zunächst eine Verbesserung der kontraktilen Funktion. Mit zunehmendem Alter der Tiere zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Hypertrophie mit kardialer Fibrose und Herzinsuffizienz (Bisognano et al., 2000). Interessant ist hierbei, dass eine Überexpression der Adenylatcyclase IV keine negativen Effekte auf die Herzfunktion bewirkt und in  $G_q$ -transgenen Mäusen den Hypertrophieeffekt sogar abschwächen konnte (Roth et al., 1999, 2002). Im Gegensatz dazu entwickeln Proteinkinase-A-transgene Mäuse eine zunehmende Kardiomyopathie mit Hypertrophie und Fibrose. Hieraus lässt sich folgern, dass der pro-hypertrophe Effekt vor allem von der Kinase ausgeht, während die sie aktivierende Adenylatcyclase kardioprotektive Wirkungen zu haben scheint (Antos et al., 2001).

Eine Dekompensation des hypertrophierten Herzens ist schließlich durch eine stark verminderte Zahl an  $\beta$ -Rezeptoren sowie deren funktionelle Entkopplung gekennzeichnet (Bristow et al., 1982).

$G_i$ -Proteine zuletzt werden durch  $\beta_2$ -adrenerge sowie muskarinerge ( $M_2$ -)Rezeptoren aktiviert, hemmen die Adenylatcyclase und antagonisieren die  $G_s$ -vermittelte Wirkung.

### 1.1.2.3 Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK)-Signalweg

Ein weiterer Signalweg, der im Rahmen der Entstehung von Hypertrophie eine tragende Rolle spielt, umfasst die Gruppe der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs). Die Aktivierung des G-Proteins Ras insbesondere durch neurohumorale Signale führt hierbei zur Rekrutierung der Kinase Raf-1. Diese induziert eine Kaskade mehrerer MAPKs, welche schließlich in der Aktivierung von ERK1 und 2 (*extracellular signal-regulated kinases*) endet. Beide haben unter anderem Einfluss auf Zellwachstum, Stoffwechsel und die Strukturierung des Zytoskeletts (Wellbrock, Karasarides & Marais, 2004; Heineke & Molkentin, 2006). Diesem Mechanismus scheint eine protektive Wirkung zuzukommen: transgene Mäuse, die eine aktive Kinase aus der MAPK-Reihe überexprimierten, zeigten zwar einen konzentrisch-hypertrophen Phänotyp (s. Abbildung 2). Sie entwickelten jedoch keine Fibrose und hatten kein gesteigertes Risiko für das Erleiden eines plötzlichen Herztodes (Bueno et al., 2000; Van Berlo, Maillet & Molkentin, 2013). Dies belegt erneut die komplexe Verknüpfung physiologischer und pathologischer Abläufe in der Herzmuskelzelle bei der Entstehung der pathologischen Hypertrophie als Maladaptationsprozess bei kontinuierlicher Überbeanspruchung.

### 1.1.2.4 Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K)

Die Isoform p110 $\alpha$  der Phosphatidylinositol-3-Kinase vermittelt nach Aktivierung durch IGF-1, Insulin und andere Wachstumsfaktoren die adaptive Hypertrophie (Oudit et al., 2004). PI3K aktiviert die Proteinkinase B (Akt), welche wiederum über mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und die Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) wirkt. Eine Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  führt zu ihrer Inaktivierung.

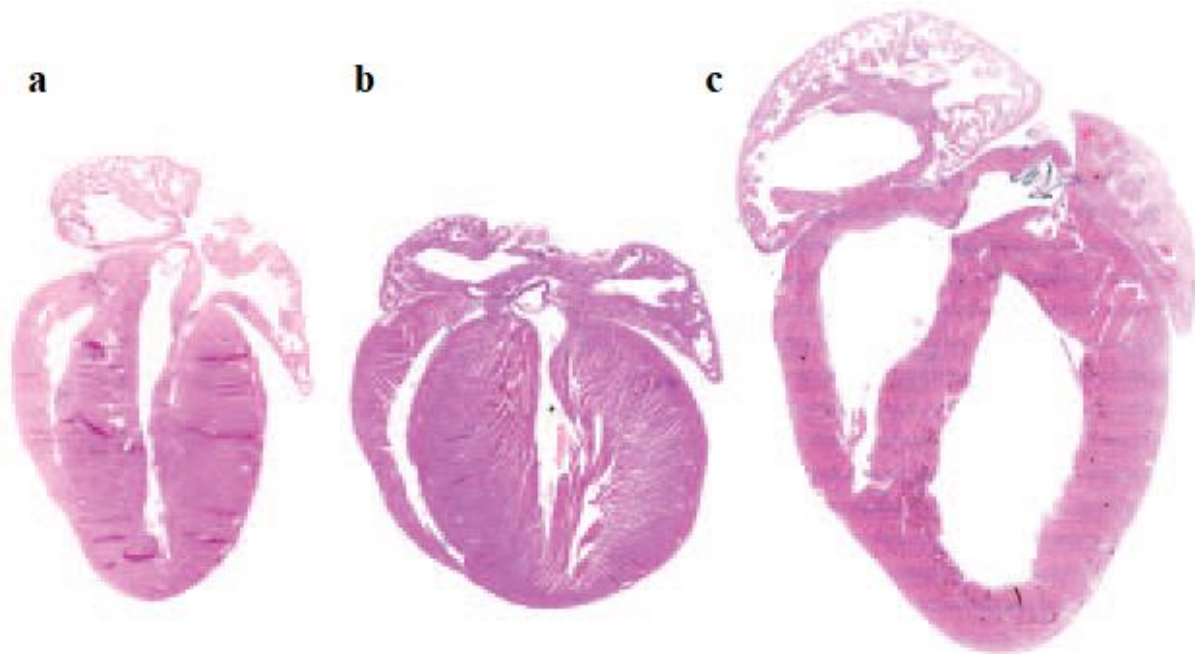
Die aktive Form phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren NFAT und GATA4 und bewirkt damit ihre Translokation aus dem Nukleus in das Zytosol, wo sie unwirksam sind. GSK3 $\beta$  ist ein negativer Regulator der Hypertrophie (Morisco, Seta, et al., 2000; Morisco, Zebrowski, et al., 2000). Die Überexpression von GSK3 $\beta$  attenuiert den über NFAT/GATA4 vermittelten hypertrophen Phänotyp in Calcineurin-transgenen Mäusen (Antos et al., 2002).



### 1.1.3 Kardiale Hypertrophie und Fibrose

Als wichtiges Kennzeichen nahezu jeder organischen Herzerkrankung kommt es auch im Rahmen der Hypertrophie zur einer Fibrosierung des Myokards. Während der physiologische Kollagenstoffwechsel vor allem durch kardiale Fibroblasten kontrolliert ist, kommt es unter Einwirkung bestimmter Reize zu einer Dysregulation und einer vermehrten Produktion und Ablagerung von Extrazellulärmatrix. Zu diesen Reizen gehören vor allem das Absterben von Kardiomyozyten, im Rahmen eines Myokardinfarktes aber auch durch starke Druck- oder Volumenbelastung, Entzündungsreaktionen sowie im Rahmen von Kardiomyopathien. Auch im physiologischen Alterungsprozess kommt es zum fibrotischen Umbau des Herzmuskels. Das gemeinsame Resultat ist die vermehrte Steifigkeit des Myokards mit systolischer und diastolischer Dysfunktion, die Störung der elektromechanischen Koppelung der Kardiomyozyten und Verletzung ihrer strukturellen Integrität sowie das arrhythmogene Potential durch die Zerstörung der intrakardialen Leitungsbahnen. Und auch eine direkte Einwirkung von Matrixproteinen wie Laminin und Kollagen auf die Homöostase der Herzmuskelzellen sind beschrieben. (Berk, Fujiwara & Lehoux, 2007; Kong, Christia & Frangogiannis, 2014). Im Zentrum dieser Umbauvorgänge steht die Entstehung und Entwicklung von Myofibroblasten, die neben der Produktion von Extrazellulärmatrix außerdem durch ihre Fähigkeit zur Kontraktion maßgeblich am kardialen Remodeling beteiligt sind. Die Aktivierung dieser speziellen Fibroblasten wird über mehrere - im Rahmen dieser Einleitung bereits angesprochene - Signalwege vermittelt, wie den MAPK- und den Calcineurin/NFAT-Pathway. Myofibroblasten können sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen differenzieren, darunter glatte Muskelzellen, Perizyten aber auch hämatopoetische Stammzellen und Epithelien (Davis & Molkenin, 2014).

Neben den genannten molekularen Anpassungsmechanismen existieren zahllose weitere, zum Teil auch makroskopisch sichtbare Effekte pathologischer Hypertrophie, wie die Rarefizierung von Kapillaren, Auslösung von Entzündungsreaktionen, abnormale Zell-Zell-Interaktion sowie epigenetische Effekte (Shimizu & Minamino, 2016).



**Abbildung 2: Experimentelle Phänotypen der kardialen Hypertrophie.** Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologischer Schnitte von Mauserzen aus **a** Wildtyp mit normalem Myokardgewebe, **b** Tier mit herzspezifischer Überexpression der aktivierten MAPK-Kinase 1 (MEK-1), sowie **c** Tier mit herzspezifischer Überexpression von aktiviertem Calcineurin.

Der MEK-1-transgene Phänotyp zeigt eine konzentrische Hypertrophie mit normaler LV-Funktion (kompensierte Hypertrophie). Das Calcineurin-transgene Herz weist eine ausgeprägte exzentrische Hypertrophie mit Dilatation und reduzierter Ventrikelfunktion auf. (nach Heineke & Molkentin, 2006)

#### 1.1.4 Das endoplasmatische Retikulum und seine Rolle im kardialen Remodeling

Das endoplasmatische Retikulum ist als dem Zellkern benachbartes Organell u.a. für die Faltung, die posttranslationale Modifikation sowie den Transport vor allem von sekretorischen und Membranproteinen verantwortlich (Liu et al., 2016). In der Muskelzelle bildet es als sarkoplasmatisches Retikulum den zentralen Calciumspeicher und ist ein wichtiger Bestandteil der elektromechanischen Koppelung und Voraussetzung für die Muskelkontraktion (Schwarz & Blower, 2016).

Die spezielle „Qualitätsüberwachung“ der Proteine im Inneren des ER ist von besonderer Bedeutung, welche durch das Zusammenwirken von Chaperonen, Foldasen und Lectinen für die korrekte Faltung und den Abbau fehlgefalteter Polypeptide sorgt. Ein erhöhtes Aufkommen fehlerhaft gefalteter Proteine, wie z.B. bei Hypoxie, oxidativem Stress oder gesteigerter Proteinsynthese, stellt einen Stressfaktor für das ER dar und löst ein evolutionär hochkonserviertes Genprogramm aus: die sogenannte unfolded protein response (UPR).

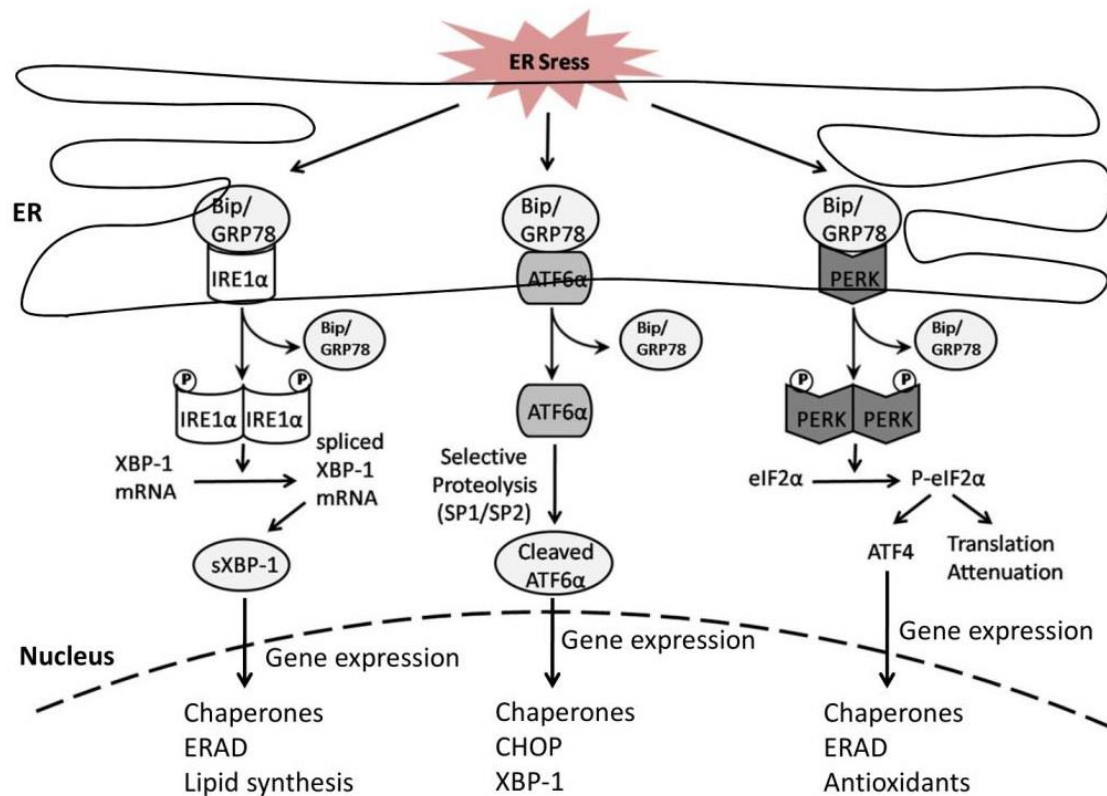
Die UPR hat die Aufgabe, über eine Reduktion der Proteinbiosynthese, die Induktion von Chaperon-Genen sowie der proteasomalen Proteindegradierung (ER-assoziierte Proteindegradierung = *ERAD*) die Konzentration unbrauchbarer Polypeptide zu reduzieren. Geschieht dies nicht, ist der ER-Stress tödlich für die Zelle: es kommt zur ERS-induzierten Apoptose (Man Liu & Dudley, 2016; Liu et al., 2016; Lenna & Trojanowska, 2012; Maron, Ferrans, & Roberts, 1975).

Eng mit dem ER-Stress verbunden ist der Mechanismus der Autophagie. Dies bezeichnet die kontrollierte Verdauung von zelleigenen Proteinen, Lipiden und Organellen. Dieser Prozess läuft kontinuierlich in geringem Maße ab, kann jedoch durch Stimuli wie Nährstoffmangel, oxidativen Stress oder ER-Stress erheblich gesteigert und auf spezifische Zielstrukturen gerichtet werden und so gemeinsam mit der UPR eine Wiederherstellung der Zellhomöostase bewirken (Li, Wang und Yang, 2015).

Als Sensor für fehlgefaltete Proteinstrukturen dient ein Komplex bestehend u.a. aus dem *binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein 78* (BIP/GRP78). Dieses ist im Ruhezustand an drei Transmembranproteine gebunden: *inositol requiring 1 $\alpha$*  (IRE1 $\alpha$ ), *PKR-like ER kinase* (PERK) und *activating transcription factor 6* (ATF6). Steigt im ER-Lumen die Konzentration fehlgefalteter Proteine, so dissoziiert GRP78 von diesen Sensoren und bewirkt dadurch deren Aktivierung (Malhi & Kaufman 2011; Bertolotti et al. 2000).

Aktiviertes IRE1 $\alpha$  vermittelt das Splicing der mRNA des *X-box binding protein 1* (XBP1), wodurch dieses Protein die Promotoren verschiedener UPR-Zielgene binden und diese dadurch induzieren kann. ATF6 transloziert in den Golgi-Apparat, wo es ebenfalls gespalten wird und danach im Zellkern die transkriptionelle Induktion einer Vielzahl weiterer UPR-Gene bewirkt, darunter GRP78 und XBP1 sowie das *CCAAT/enhancer-binding homologous protein* (CHOP).

PERK zuletzt bewirkt eine verminderte Proteintranslation, sowie über die Aktivierung von ATF4 ebenfalls eine Induktion von UPR-Zielgenen (Groenendyk et al., 2010). Abb. 3 gibt einen Überblick über die zellulären Signalwege im Rahmen der UPR.



**Abbildung 3: Übersicht über die Signalwege der Unfolded Protein Response.** BIP/GRP78 fungiert als zentraler Regulator, indem es IRE1 $\alpha$ , ATF6 $\alpha$  und PERK aktiviert. Die Effekte der entsprechenden Signalwege spiegeln sich v.a. auf Ebene der Transkription wieder, führen aber daneben auch zum selektiven Abbruch der Translation und zu verstärkter Proteolyse. (S. Wang et al., 2017)

Kann trotz dieser Maßnahmen keine Proteinhomöostase im ER-Lumen hergestellt werden, so leitet die Zelle den kontrollierten Zelltod, die Apoptose, ein. Beispielsweise führt IRE1 $\alpha$  indirekt über Aktivierung von *Jun-N-Terminal kinase* (JNK) und *p38* zur Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bax (Urano, 2000; Nishitoh et al., 2002; Kim, Ryu & Song, 2006). IRE1 $\alpha$  vermittelt daneben auch die Apoptose bei Störung der Calcium-Homöostase (Son et al., 2014). Weiterhin bewirkt CHOP zum einen über die Inhibition des antiapoptotischen Faktors Bcl-2, zum anderen über Verstärkung der Transkription von Bim die Induktion der Apoptose (Puthalakath et al. 2007; McCullough et al. 2001).

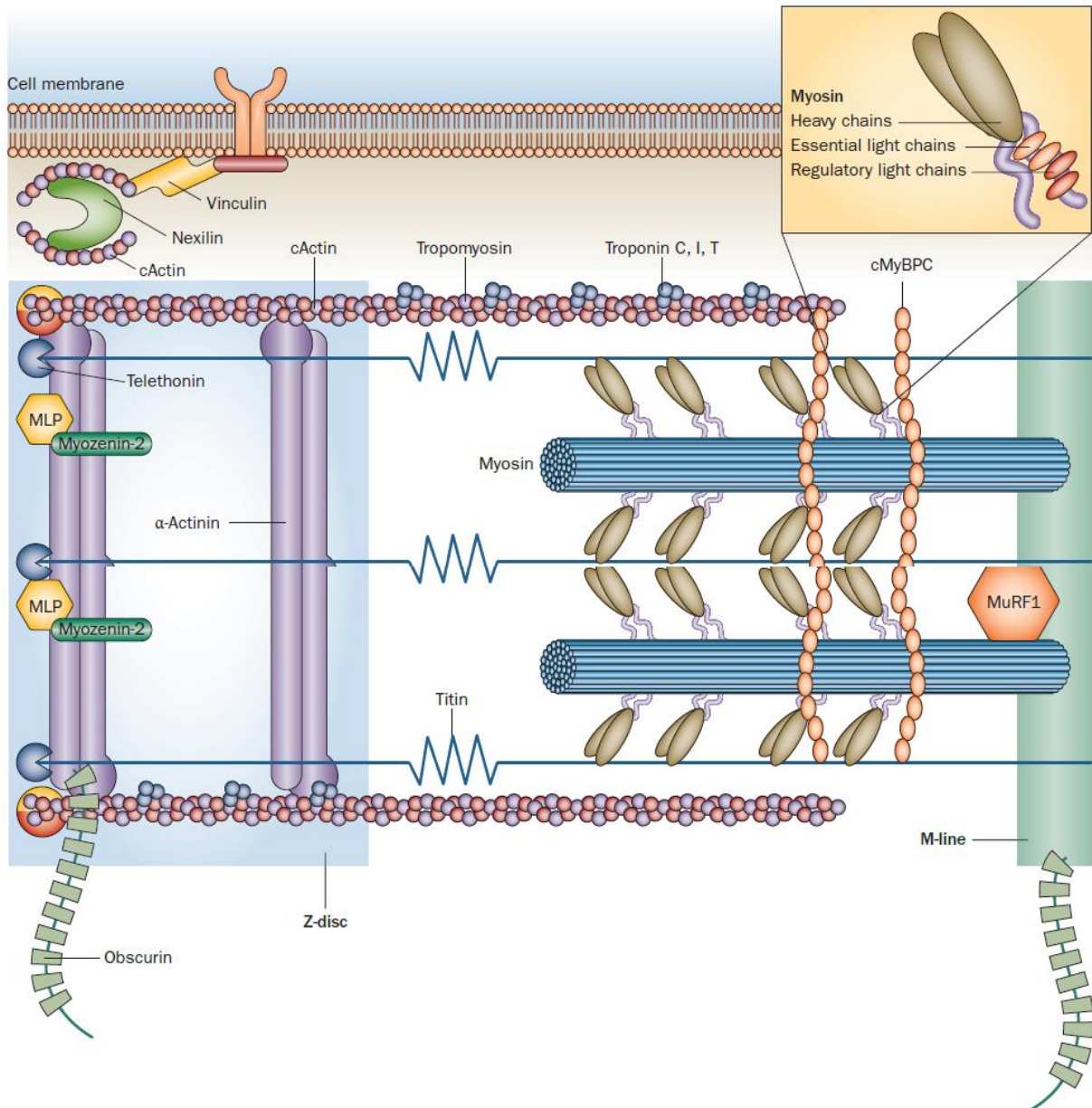
Die UPR bzw. ERS-induzierte Apoptose wurden inzwischen als Kofaktoren in der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen identifiziert, wie beispielsweise Morbus Alzheimer (Schwarz & Blower, 2016), Diabetes aber auch in der kardialen (Patho-)Physiologie, so der Hypertrophie, Ischämie und Herzinsuffizienz (Liu & Dudley, 2016).

Relevant ist ebenfalls der Einfluss dieser Erkrankungen auf die Autophagie. Die zuvor erwähnten Calcineurin- und MAPK-Signalwege beeinflussen diesen Mechanismus zum Teil direkt. Umgekehrt bewirkte die Inhibition von Autophagie in Experimenten die Entstehung von Hypertrophie, Dilatation und kontraktile Dysfunktion (Nakai et al., 2007; Rifki & Hill 2012). Erste Ansätze, sich diese Erkenntnisse therapeutisch zu Nutzen zu machen, z.B. durch medikamentöse Induktion von Autophagie oder den Einsatz spezifischer miRNAs, zeigten bereits Erfolge (Li, Wang & Yang, 2015). Zusammengefasst handelt es sich bei ER-Stress und Autophagie um komplex verknüpfte zelluläre Mechanismen, welche enormes Potential für das Verständnis und die Behandlung kardialer Pathologien bieten könnten.

## 1.2 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie definiert die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) als Vergrößerung der linksventrikulären Wanddicke auf über 15 mm, welche nicht allein durch erhöhte Druck- oder Volumenbelastung erklärbar ist. In bis zu 60 % der Fälle ist diese durch autosomal-dominant vererbte Mutationen in Genen kardialer Sarkomerproteine verursacht (v.a. *myh7*, *mybpc3*, *tnnt2*; siehe Abb. 4) und ist somit die häufigste hereditäre Herzerkrankung. *De-novo*-Mutationen treten jedoch ebenfalls auf. Die Daten zur Inzidenz der HCM schwanken regional übergreifend zwischen 0,02 und 0,23 % (Elliott et al., 2014). Ein Grund für diese Schwankungen ist die starke Altersabhängigkeit. Es wird geschätzt, dass die Hälfte der Patienten mit zugrundeliegenden HCM-typischen Mutationen in der 30. Lebensdekade eine relevante Hypertrophie aufweist. In der 60. Dekade sind es bereits drei Viertel (Marian & Braunwald, 2017).

Bis zu 10 % der Patienten entwickeln den Phänotyp einer hypertrophen Kardiomyopathie sekundär - als Folge von Speichererkrankungen, neuromuskulären Erkrankungen oder Amyloidosen. In bis zu 30 % der Fälle bleibt die Ursache gänzlich unbekannt (Frey, Luedde & Katus, 2012; Elliott et al., 2014).



**Abbildung 4: Proteine mit bekannten HCM-induzierenden Mutationen.** Die meisten der dargestellten Proteine sind Bestandteile des Sarkomers, wobei 2 Gene, *Myh7* und *Mybpc3* (codierend für Myosin-7 sowie cMyBPC) für bis zu 75% der nachgewiesenen genetisch bedingten Hypertrophen Kardiomyopathien verantwortlich sind. Zu den Nicht-Sarkomer-Proteinen, welche eine HCM auslösen können, zählt zum Beispiel Vinculin. (nach Frey, Luedde & Katus, 2012)

### 1.2.1 Pathophysiologie der Hypertrophen Kardiomyopathie

In der Pathogenese der hypertrophen Kardiomyopathie wird die Beteiligung unterschiedlicher Signalwege diskutiert: der Einbau mutierter Proteine in die Sarkomerstruktur führt zu einer verringerten Calciumsensitivität sowie zu einer gestörten Calcium-ATPase-Aktivität. Dies bedingt eine Störung der elektromechanischen Koppelung sowie der Kontraktionskraft der Myofibrillen, führt zu sowohl systolischer als auch diastolischer Dysfunktion und birgt ein erhöhtes arrhythmogenes Potential. Erhöhte Calciumspiegel können Calcium-abhängige Signalkaskaden, wie den Calcineurin/NFAT- oder den MAPK-Signalweg stimulieren und die Entstehung von Hypertrophie induzieren (Frey & Olson, 2003). Paradoxerweise führt die Gabe von Calcineurin-Antagonisten wie Ciclosporin A und FK506 in einem Mausmodell der familiären hypertrophen Kardiomyopathie mit einer  $\alpha$ MHC-Mutation nicht wie im Rahmen der adaptiven Hypertrophie zu einer Attenuierung des hypertrophen Phänotyps. Im Gegenteil wurde eine deutliche Zunahme der linksventrikulären Wanddicke sowie der Myokardfibrose mit Übersterblichkeit der behandelten Tiere beobachtet. Ein ähnlicher Effekt stellte sich unter Behandlung mit dem Kaliumkanal-Agonisten Minoxidil ein, sodass eine Wirkung auf transkriptioneller Ebene unwahrscheinlich ist. Während Wildtypmäuse auf die Gabe von Ciclosporin A oder Minoxidil mit einem für diese Wirkstoffe bekannten adäquaten Anstieg der diastolischen Calciumkonzentration reagierten, blieb dieser Effekt in transgenen Tieren aus. Hieraus lässt sich folgern, dass ein gestörter Calciumfluss des Kardiomyozyten durch eine Sarkomermutation einen maßgeblichen Anteil an der Entstehung der HCM hat (Fatkin et al., 2000).

Ein weiterer wichtiger Prozess ist die zunehmende kardiale Fibrose: es kommt zu einer verstärkten Produktion von Extrazellulärmatrix, bei gleichzeitig verminderter Degradierung mit zunehmender myokardialer Fibrose und vermehrter Steifigkeit des Ventrikels. Dies stellt zudem ein Substrat für Herzrhythmusstörungen dar.

Ein erhöhter Energiebedarf der Sarkomere mit gestörter ATP-Verwertung gehört ebenfalls zu den wesentlichen pathophysiologischen Charakteristika der HCM. Des Weiteren kommt es durch Intima- und Mediahyperplasie zu einer Lumeneinengung der myokardialen Arteriolen, was zusammen mit dem gesteigerten Energiebedarf eine relative Gewebeischämie bedingt, zu einer gestörten Wahrnehmung von

biomechanischem Stress mit reaktiver überschießender Hypertrophie sowie zu einer ungeordneteren Ausrichtung der Sarkomere. Maßgeblich sind viele Signalwege beteiligt, die auch im Rahmen der physiologischen Hypertrophie eine zentrale Rolle einnehmen (Frey, Luedde & Katus, 2012; Marian & Braunwald, 2017).

### 1.2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie und das Prinzip der „Modifier“-Gene

Das Ausmaß der Hypertrophie und der Symptomlast ist bei der HCM großen Schwankungen unterworfen und reicht von lebenslang asymptomatischen Patienten bis hin zur raschen Entwicklung einer terminalen Herzinsuffizienz und dem Erleiden eines plötzlichen Herztodes. Für Letzteren ist die HCM bei Patienten unter 35 Jahren die führende Ursache (Frey, Luedde, & Katus 2012; Prinz et al. 2011). Mutationen im *myh7*-Gen sind häufig mit einem frühzeitigen Beginn der Erkrankung mit stärkerer Hypertrophie und häufigerem Auftreten eines plötzlichen Herztodes assoziiert. *Mybpc3*-Mutationen zeigen hingegen häufig einen eher milden Phänotyp (Charron et al., 1998). Welche Faktoren dabei genau zu dieser Variabilität führen, ist derzeit jedoch noch unklar. Da ausgeprägte Formen der Erkrankung häufig bereits im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter auffallen, in welchem der kumulative Einfluss von Faktoren wie Bluthochdruck, Übergewicht oder anderen Grunderkrankungen noch gering ist, werden genetische Einflussfaktoren vermutet. Sogenannte Modifier-Proteine können variable Funktionen ausüben und determinieren die phänotypische Ausprägung der monogenetisch ausgelösten Erkrankung (Helms und Day, 2016). Insbesondere im Rahmen heutiger Hochdurchsatzverfahren wie der *Genome-Wide Association Study* (GWAS) oder dem *Exome Aggregation Consortium* (ExAc) konnten zahlreiche genetische Varianten identifiziert werden, die gehäuft mit einem hypertrophen Phänotyp einhergehen (Walsh et al., 2017). Diese Genomsequenzierungen und Assoziationsstudien können einen ersten Beitrag zur Identifikation möglicher Kandidatengene liefern.

Jedoch existiert nur eine geringe Zahl an Transkriptionsanalysen zum tatsächlichen Expressionsprofil im Kontext der HCM (Ivandic et al., 2012; Rajan et al., 2013; McDermott-Roe et al., 2017; Malgija, Kumar & Piramanayagam, 2018). Es verbleibt also eine enorme Anzahl bisher uncharakterisierter möglicher HCM-Modulatoren, welche ein hohes Potential für das genauere Verständnis der Erkrankung und die Entwicklung einer spezifischen Therapie bieten dürften.



### 1.2.3 Therapie und Prognose der Hypertrophen Kardiomyopathie

Das klinische Management der Hypertrophen Kardiomyopathie erfolgt anhand der Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) und verfolgt drei Ziele: Behandlung von Symptomen und Steigerung der Lebensqualität, Senkung von Mortalität und Morbidität sowie Verzögerung des Krankheitsprogresses.

HCM-Patienten werden unterteilt in Patienten mit und ohne Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts (LVOTO), die Erkrankung wird analog hierzu als hypertroph-obstruktive oder -nicht-obstruktive Kardiomyopathie bezeichnet. Bei Patienten ohne eine signifikante Obstruktion des LV-Ausflusstraktes steht eine klassische Herzinsuffizienztherapie im Vordergrund, vor allem die Anwendung von  $\beta$ -Blockern. Bei erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion sind auch Calcium-Antagonisten (Verapamil oder Diltiazem) zu erwägen. Beide Medikamentengruppen bewirken über eine Reduzierung der Herzfrequenz und ihre negativ inotrope Wirkung eine Verringerung der diastolischen LV-Drücke und damit eine Verbesserung der Kammerfüllung. Besteht zusätzlich eine Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion mit einer Ejektionsfraktion (EF) von  $< 50\%$ , so sollte eine Therapie mit ACE-Hemmern bzw. AT1-Antagonisten und Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten erfolgen.

Bei Patienten mit der hypertroph-obstruktiven Form stehen Verapamil und  $\beta$ -Blocker im Zentrum einer symptomatischen Therapie, die über eine negativ inotrope Wirkung den intrakavitären Gradienten reduzieren. Neben einer optimalen medikamentösen Therapie stehen mit interventionellen und chirurgischen Septumreduktionsverfahren (der Katheter-gestützten, transkoronaren Ablation der Septumhypertrophie (TASH) und der operativen Myektomie nach Morrow) wirksame therapeutische Verfahren zur Symptomkontrolle bei relevantem LVOT-Gradienten zur Verfügung.

Diese sollten jedoch erst bei fortgeschrittenen Symptomen der Herzinsuffizienz (NYHA III/IV) und/oder bei Versagen der konservativen Therapie in Betracht gezogen werden und ihre Durchführung bleibt erfahrenen Zentren vorbehalten.

Ultima Ratio bei allen HCM-Patienten mit therapierefraktärem Verlauf ist schließlich die orthotope Herztransplantation. Die aufgrund des geringen Organangebots oft lange

Wartezeit kann mithilfe von links- oder biventrikulären Assist-Systemen überbrückt werden.

Neben der Herzinsuffizienztherapie liegt bei der Behandlung der HCM ein besonderer Fokus auf der Prävention des plötzlichen Herztodes. Eine Risikostratifizierung sollte hierfür anhand bekannter prädisponierender Faktoren wie Alter, positiver Familienanamnese für den plötzlichen Herztod, Gradient des LVOT, stark hypertrophiertem linken Ventrikel oder bereits aufgetretenen Herzrhythmusstörungen vorgenommen werden. Zusätzlich sollten regelmäßig Kontrolluntersuchungen mittels EKG, Echokardiografie bzw. Kardio-MRT, sowie Belastungstests durchgeführt werden. Von der Ausübung von Leistungssport wird abgeraten.

Zur Sekundärprophylaxe bei überlebtem plötzlichen Herztod ist die Implantation eines Defibrillators empfohlen. Eine größere Herausforderung stellt die Auswahl von Patienten für die primärprophylaktische Versorgung mit einem solchen System dar. Empfohlen wird mit der Revision der Leitlinien die Verwendung eines HCM-Risk-SCD-Scores, welcher als Modell die 5-Jahres-Wahrscheinlichkeit für das Erleiden eines plötzlichen Herztodes errechnet. Seine Verwendung wird allerdings kontrovers diskutiert (Elliott et al. 2014; O'Mahony et al. 2014).

Wird die Diagnose HCM früh gestellt, ist die Erkrankung mit den beschriebenen Therapiestrategien in vielen Fällen gut behandelbar. So liegt die jährliche Mortalitätsrate bei lediglich 1 % (Spirito et al., 2014). Dennoch besteht aktuell keine kurative Behandlungsmöglichkeit und progrediente Verläufe mit z.T. letalen Komplikationen stellen nach wie vor ein großes Problem dar (Gersh et al., 2011; Frey, Luedde und Katus, 2012). Weitere Forschung ist daher notwendig, um das klinische Management der HCM langfristig weiter zu verbessern.

### **1.3 Fragestellung der Arbeit**

Viele der beteiligten Signalwege der kardialen Anpassungsvorgänge, die im Rahmen einer physiologischen und pathologischen kardialen Hypertrophie wirken, sind bekannt und zahlreiche beteiligte Gene und Proteine beschrieben. Kardiale Hypertrophie und hypertrophe Kardiomyopathie sind im klinischen Alltag hochrelevante Krankheitsbilder und betreffen eine Vielzahl von Patienten. Ausgehend von einer systematischen Analyse der kardialen Genexpression von Patienten mit HCM und gesunden

Kontrollpatienten, sollen differentiell regulierte Transkripte identifiziert werden, die potentiell modulierend auf die Entstehung einer kardialen Hypertrophie wirken. Zur Validierung dieser *in silico* generierten Ergebnisse verwenden wir einen „Bedside-to-Bench“-Ansatz, in dem die Expression von Kandidaten-Transkripten in verschiedenen Modellen der kardialen Hypertrophie *in vitro* (Stretch, Phenylephrin) und *in vivo* (TAC, Calcineurin) validiert werden. Das hierbei identifizierte Protein Maturin, für welches eine Beteiligung im Rahmen der Hypertrophie bislang nicht bekannt ist, soll im Weiteren auf seine Funktion untersucht werden. Mittels adenoviraler Überexpression von Maturin soll eine Beteiligung an kardialer Hypertrophie untersucht und erste Hinweise im Hinblick auf seine Rolle in Mechanismen des ER-Stresses, der UPR und der Autophagie weiter untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Amersham Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare
Axiovert 40 C Mikroskop BZ-9000 (BIOREVO)	Zeiss
Cellstar Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-Well-, 6cm-, 10cm-Platten	Greiner Bio One
CFX96 Realtime PCR Detection System	BioRad
Coverslips 18mm Durchmesser	Karl Hecht KG
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph
ECX-F26.M UV-Trans-Illuminator	PeqLab
Elektroporationsküvette	PeqLab
FluorChem Q Kamera	Alpha Innotech
Fluoreszenzmikroskop	Keyence
Galaxy Ministar Mikrozentrifuge	VWR
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Pico 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Infinite M200Pro Microplate Reader	Tecan
Mini Trans-Blot Zelle	BioRad
MyCycler Thermocycler	BioRad
Nanodrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	Assistent
Objektträger 76x26x1mm	Marienfeld
Olympus BX53 Mikroskop	Olympus
Olympus DP72 Kamera	Olympus
Parafilm	BEMIS
Pasteurpipetten (Glas)	Roth

Pipetten, diverse bis 1000 µL	Eppendorf
Pipetten 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt
Pipettenspitzen (Biosphere Filter)	Sarstedt
Pipettenspitzen (Filter)	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann
Power Pac HC	BioRad
PP-Mikroplatte, 96-Well	Greiner Bio One
Precellys® 24 Homogenizer	Peqlab
qRT-PCR-Platten, 96-Well	BioRad
RCT Magnetrührer	IKA
Seven Easy pH-Meter	Mettler-Toledo
Steri-Cult 200 Inkubator	Labotect
Sterilfilter (0,2µM Porengröße)	Nalgene Labware
SterilGARD Bench	The Baker Company
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Bench	Scanlaf
Tubes 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 5 mL	Sarstedt
Tubes 15 mL, 50 mL	Sarstedt
Vacunsafe Absaugpumpe	Integra Biosciences
Variomag Magnetrührer	Thermo Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zellschaber 16cm 2-Positionen-Klinge	Sarstedt
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zentrifuge 5180	Eppendorf

## 2.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific
Albumin (bovin)	Merck
Carbenicillin	Sigma-Aldrich
DAPI	Roche
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA Loading Dye 6x	Fermentas
DreamTaq 10x Green Buffer	Thermo Scientific
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS Gold	PAA Laboratories
GeneRuler UltraLow Range, 100 bp, 1 kb, 1 kb Plus DNA-Ladder	Fermentas
Hygromycin B	Invitrogen
iQ PowerMix Reagent (Multiplex-PCR)	BioRad
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kollagen I (Lösung, bovin)	BD Biosciences
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/GIBCO
Percoll	GE Healthcare

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Phenylephrin	Sigma-Aldrich
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
TEMED 99%, p.a., für Elektrophorese	ROTH
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X 100	Serva Electrophoresis
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

### 2.1.3 Enzyme

BP-Clonase® II	Invitrogen
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich
DreamTaq DNA-Polymerase (GreenTaq)	Thermo Scientific
LR-Clonase® II	Invitrogen
Pac I	BD Biosciences Clontech
Phosphataseinhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Phusion HotStart II® DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Proteinaseinhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics
Proteinase K	Invitrogen
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen/GIBCO

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1: Liste primärer Antikörper (Abkürzungen: IF = Immunofluoreszenz, WB = Western-Blot)

Antikörper anti-	Spezies	Klonalität	Hersteller	Beschreibung
$\alpha$ -Actinin	Maus	Mono	Sigma-Aldrich	IF
$\alpha$ -Tubulin	Maus	Mono	Sigma-Aldrich	WB
GAPDH	Maus	Mono	Sigma-Aldrich	WB
GRP78	Ziege	Poly	R&D Systems	WB / IF
Maturin	Kaninchen	Poly	Sigma-Aldrich	WB / IF
Maturin	Kaninchen	Poly	CreativeDiagnostics	WB

### 2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Liste sekundärer Antikörper (Abkürzungen: IF = Immunofluoreszenz, WB = Western-Blot, HRP = Horseradish Peroxidase, AF = AlexaFluor®)

Antikörper anti-	Spezies	Konjugat	Hersteller	Beschreibung
Kaninchen	Ziege	HRP	SantaCruz	WB
Maus	Ziege	HRP	SantaCruz	WB
Kaninchen	Ziege	AF488	Life Technologies	IF
Maus	Esel	AF546	Life Technologies	IF, WB
Ziege	Huhn	AF647	Life Technologies	IF

## 2.1.5 Oligonukleotide und Primer

Tabelle 3: Primer zur Quantifizierung der Expression von Maturin mittels RT-PCR. Die übrigen verwendeten Primersequenzen sind im Anhang dieser Arbeit aufgelistet.

Primername	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
R_Mturn_F	TCAAGTCCTTCAGACCTTTGCTG	<i>Forward</i> -Primer zur Amplifikation von <i>mtum</i> aus Ratten-RNA
R_Mturn_R	GAAGTTTACTGCTGGCTGACCC	<i>Reverse</i> -Primer zur Amplifikation von <i>mtum</i> aus Ratten-RNA



Primername	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
M_Mturn_F	ATCCTTCAGACCTTTGCTGGG	<i>Forward</i> -Primer zur Amplifikation von <i>mtum</i> aus Maus-RNA
M_Mturn_R	TACTGCTGACTGACCCCAT	<i>Reverse</i> -Primer zur Amplifikation von <i>mtum</i> aus Maus-RNA

Tabelle 4: Primer zur Genquantifizierung mittels Multiplex Realtime-PCR

Primername	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Nppa_F	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG	Multiplexprimer und Sonde (probe) mit Fluoreszenzfarbstoff und Quencher für <i>nppa</i>
Nppa_R	ACCTCATCTTCTACCGGCAT	
Nppa_probe	FAM-TGATGGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA-BHQ1	
Nppb_F	ACAAGATAGACCGGATCGGA	Multiplexprimer und Sonde (probe) mit Fluoreszenzfarbstoff und Quencher für <i>nppb</i>
Nppb_R	AGCCAGGAGGTCTTCCTACA	
Nppb_probe	HEX-TCAGTGC GTTACAGCCCAAACGA-BHQ1	
Rcan1_fw	TAGCTCCCTGATTGCTTGTG	Multiplexprimer und Sonde (probe) mit Fluoreszenzfarbstoff und Quencher für <i>rca1-4</i>
Rcan1_rev	GGATTCAAATTTGGCCCTGG	
Rcan1_probe	Cy5.5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-Eclipse	
Rpl32_F	CTGCTGATGTGCAACAAATCT	Multiplexprimer und Sonde (probe) mit Fluoreszenzfarbstoff und Quencher für <i>rp132</i> (Haushaltsgen/ Kontrolle)
Rpl32_R	GCTGTGCTGCTCTTTCTACAAT	
Rpl32_probe	Texas Red-ACTGTGCTGAGATTGCTCACAATGTGT-BHQ2	

Tabelle 5: Primer zur Amplifikation des offenen Leserasters (ORF) von Maturin. Die Primer sind von einem Teil der *attB1*- (Forward) und *attB2*-Adapter (Reverse) flankiert, welche in einer zweiten PCR mit spezifischen Adapterprimern komplettiert werden, um Gateway®-kompatible Konstrukte zu erhalten.

Primername	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
R_Mturn_attB_F	<u>GCTGGCACC</u> ATGGACTTCCAGCAGCTGGCAG	<i>Forward</i> - und <i>Reverse</i> -Primer zur spezifischen Amplifikation („ <i>Fishing</i> “) des ORFs von Maturin aus Ratten-cDNA. Die <i>attB</i> -Sites ( <u>unterstrichen</u> ) dienen in einer zweiten Reaktion dem Einbau der Sequenzen in den Donorvektor
R_Mturn_attB_R	GCTGGGTCGCCTTACTGCTGGCTGACCCCATTTG	
R_attB_gw_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA <u>GCTGGCACC</u>	<i>Forward</i> - und <i>Reverse</i> -Adapterprimer zum Einbau der von <i>attB</i> -Sites ( <u>unterstrichen</u> ) flankierten Zielsequenz in den Donorvektor pDonR221.
R_attB_gw_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAA <u>GCTGGGTCGCC</u>	

### 2.1.6 Plasmide

pDonR221	Invitrogen
pcDNA6.2/GW-miR	Invitrogen
pAd/CMV/V5-DEST	Invitrogen

**2.1.7 Viren**

AdMturn	adenovirales Überexpressionskonstrukt für Maturin
AdlacZ	Kontrollvirus, codierend für $\beta$ -Galactosidase

**2.1.8 Kits**

DC™ Protein Assay	BioRad
ECL-Select Detection System	GE Healthcare
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Qiagen PLUS Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Superscript III First Strand Kit	Invitrogen
SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal	Thermo Scientific
ViraPower™ Adenoviral Gateway® Expression Kit	Thermo Scientific

**2.1.9 Puffer und Lösungen**

ADS-Puffer 10x	
1,16 M	NaCl
197 mM	HEPES
94 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O
55,5 mM	Glukose
53,6 mM	KCl

ADS-Puffer 10x	
8,3 mM	MgSO <sub>4</sub> , pH 7,4
Laemmli-Puffer (4x)	
250 mM	Tris, pH 6,8
5% (w/v)	SDS
40% (v/v)	Glycerin
0,005% (w/v)	Bromphenolblau
10%	2-Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-PAGE	
250 mM	Tris
1,9 M	Glycin
1% (w/v)	SDS
PBS	
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,47 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4, autoklaviert
RIPA-Lysepuffer	
50 mM	Tris-HCl
pH 7,5	mit 1 M NaOH titriert
150 mM	NaCl

RIPA-Lysepuffer	
0,5 % (w/v)	Natriumdesoxycholat
1 % (w/v)	NP-40
0,20%	SDS
Zugabe von Inhibitoren vor der Zellernte auf 1 mL Lysepuffer:	
40 µl	25x Proteinaseinhibitor-Cocktail
10 µl	Phosphataseinhibitor 2
10 µl	Phosphataseinhibitor 3
1 µl	1 M DTT
Sammelgelpuffer	
0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
TBS	
100 mM	Tris-Cl, pH 7,5
0,9% (w/v)	NaCl
Transferpuffer	
20% (v/v)	Methanol
25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,037% (w/v)	SDS
Trenngelpuffer	
1,5 M	Tris, pH 8,8

Trypsin/EDTA-Lösung	
0,25 % (w/v)	Trypsin
0,53 mM	EDTA
in PBS	
Verdaupuffer (NRVCM)	
0,5 mg/μL	Kollagenase Typ II
0,6 mg/mL	Pankreatin
in ADS-Puffer	
vor Verwendung steril gefiltert und auf 37 °C erwärmt	

### 2.1.10 Medien

LB-Medium (Luria-Bertani)	
1 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1%	NaCl
titriert auf pH 7,0 mit NaOH	
Wachstumsmedium (HEK293-A)	
DMEM mit 4,5 g/L Glukose und 110 mg/L Natriumpyruvat	
4 % (v/v)	FCS Gold
100 U/L	Penicillin G
100 μg/ml	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin

Wachstumsmedium (NRVCM)	
DMEM mit 4,5 g/L Glukose und 110 mg/L Natriumpyruvat	
10 % (v/v)	FCS Gold
(nach 24h Kultivierung kein FCS mehr im Medium!)	
100 U/L	Penicillin G
100 µg/mL	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin

### 2.1.11 Bakterien

DH10B, elektrokompent	Life-Technologies
OneShot® TOP10, elektrokompent	Life-Technologies

### 2.1.12 Zelllinien

#### *HEK293-A*

„Human Embryonic Kidney“-Zellen sind ein Produkt adenoviraler Transformation menschlicher embryonaler Nierenzellen. Sie exprimieren u.a. die Gene E1 und E3 des Adenovirus Typ 5. Diese Variante der HEK-Zellen exprimiert zusätzlich das sogenannte „large T-Antigen“ des Polyomavirus SV40, wodurch die episomale Replikation von Plasmiden mit dem SV40-Promotor ermöglicht wird. HEK293-A eignen sich zur Vermehrung von Viren.

### 2.1.13 Neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte (NRVCM)

Neonatale ventrikuläre Ratten-Kardiomyozyten sind primäre Kardiomyozyten, die aus kardialen Ventrikeln 1-3 Tage alter Ratten isoliert werden. Die Kultivierung dieser Zellen wird detailliert im Kapitel „Methoden“ dargestellt.

### **2.1.14 Tiere**

Geschlechtsreife Wistar-Ratten sowie C57BL/N-Mäuse (beide Charles-River) wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Kiel, entsprechend den Vorgaben der Tierschutzbeauftragten der Universität Kiel, gezüchtet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Systematische Auswertung einer Transkriptionsanalyse der HCM**

Mittels systematischer Recherche in der Datenbank „NCBI Gene Expression Omnibus“ ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)) identifizierten wir alle veröffentlichten Transkriptionsdatensätze von Patientenproben der hypertrophen Kardiomyopathie. Nach Qualitätskontrolle und Sichtung der beteiligten Publikationen identifizierten wir einen Datensatz aus insgesamt 145 Microarray-Daten aus Patientenproben von chirurgischen Myektomien bei HCM im Vergleich zu gesunden Proben von Herztransplantations-Donor-Proben, welche mittels Illumina HumanHT-12 V3.0 expression beadchip generiert worden waren (GSE36961/E-GEOD-36961) (Mayo Clinic, Rochester, USA). Hieraus führten wir eine systematische Analyse der differentiellen Expression im Vergleich von HCM-Patienten und Kontrollen durch. Die Analyse der differentiellen Genexpression erfolgte durch Generierung eines linearen Modells mit der statistischen Programmiersprache R und dem Paket limma unter Kontrolle für multiples Testen nach Bonferroni-Holm (signifikante differentielle Genexpression: fold change > 1,5-fach,  $p < 0.05$ ). Die resultierende Liste differentiell regulierter Transkripte wurde durch manuelle Literatur-Recherche kuratiert.

### **2.2.2 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Erzeugung elektrokompetenter Bakterien**

Zunächst wurden 50 mL LB-Medium mit DH10B *E. coli* über Nacht bei 37 °C und 200 rpm präinkubiert. Am folgenden Tag wurde 1 L vorgewärmtes LB-Medium mit dieser Kultur vermischt, um eine optische Dichte von 0,1 bei einer Wellenlänge von 600 nm zu erhalten. Dies entspricht einer Zellzahl von etwa  $8 \times 10^7$  pro mL. Anschließend wurde diese Kultur so lange bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  zwischen 0,4



und 0,8 gemessen werden konnte (ca. 2 h). In einem eiskalten Wasserbad wurde die Kultur rasch abgekühlt und danach für 15 min bei 11.000 g und 4 °C zentrifugiert.

Das Pellet wurde zweimal in eiskaltem autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und jeweils erneut zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Pellet in 250 mL 10 % (v/v) Glycerin in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, auf 50 µL Aliquots in autoklavierten Tubes verteilt und sofort in Trockeneis auf -80 °C gefroren. Drei der so erzeugten Bakterienstocks wurden anschließend für einen Effizienztest verwendet. Dabei wurden diese in jeweils getrennten Reaktionen mit einem Kontrollplasmid transformiert und 1/100 des Reaktionsvolumens auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/mL) ausgesät. Durch Zählen der erzeugten Kolonien nach Kultivierung der Platten über Nacht bei 37 °C wurde die Effizienz bestimmt.

### **2.2.2.2 Elektroporation**

Elektrokompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 5 ng Plasmid hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF transformiert. Nach Auslösen des elektrischen Impulses wurde 1 mL LB-Medium in die Küvette gegeben und das Gemisch in ein neues autoklaviertes Tube überführt. Die Kultur wurde dann 1 h bei 37 °C und 500 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen der Suspension auf vorgewärmte LB-Agarplatten gegeben und verteilt. Durch Antibiotika-versetzte Agarplatten erfolgte die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien über die Plasmid-vermittelte Antibiotikaresistenz.

### **2.2.2.3 Anfertigung von Agarplatten**

1,5 % (w/v) Agar wurden zu LB-Medium gegeben und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 55 °C wurde die Lösung mit dem passenden Antibiotikum versetzt, um eine Degradierung zu vermeiden. Die Konzentrationen betragen: Carbenicillin 100 µg/mL, Kanamycin: 50 µg/mL, Spectinomycin: 50 µg/mL. Das noch warme Medium wurde unter sterilen Bedingungen in 10 cm Schalen gegossen und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### **2.2.2.4 Verteilung von Bakterienkulturen auf LB-Agar**

Zum Erreichen guter Wachstumsbedingungen wurden 50 bis 200  $\mu\text{L}$  der transformierten Bakterienkulturen auf jeweils eine Agarplatte pipettiert. Nach Zugabe von 4-6 sterilen Glasperlen, wurden die flüssigen Kulturen durch gründliches Schütteln gleichmäßig über den Nährboden verteilt. Agarplatten mit Bakterien wurden dann bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Kolonien wurden am Folgetag mit Pipettenspitzen geerntet.

#### **2.2.2.5 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium**

Zur gewünschten Menge LB-Medium wurde das entsprechende Antibiotikum in oben genannter Konzentration gegeben. Anschließend wurde das Medium mit Pipettenspitzen mit geernteten Kolonien oder kleinen Mengen flüssiger Bakterienkulturen angeimpft und über Nacht bei 37 °C und unter horizontalem Schütteln mit 200 rpm inkubiert.

### **2.2.3 Zellkulturmethoden**

#### **2.2.3.1 Kultivierung von Zellen**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Hauben durchgeführt. Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

#### **2.2.3.2 Kollagenisierung von Zellkulturplatten mit bovinem Kollagen I**

Zur Kollagenbeschichtung von Kulturplatten und -flaschen vor Aussaat der NRVCM wurde zunächst eine Kollagen-I-Stammlösung (3,1 mg/mL) auf eine Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt. Anschließend wurden die Kulturplatten und -flaschen mit 5-10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Kollagen-I-Lösung mindestens 1 h oder über Nacht bei Raumtemperatur bedeckt. Nach zwei Waschschrritten mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  wurden die Platten luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **2.2.3.3 Herstellung einer primären Zellkultur von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten**

Für die Herstellung der primären Zellkultur wurden etwa 40 Ratten pro Präparation benötigt. Die Tiere wurden dabei kurz in 75 % Ethanol getaucht und anschließend schnell durch Dekapitation getötet. Durch einen ca. 2 cm langen Einschnitt in den Thorax links parasternal wurde die Brusthöhle eröffnet. Das Herz wurde mit einer Schere von den großen Gefäßen abgetrennt und in eiskaltem ADS-Puffer aufbewahrt. Die Vorhöfe wurden entfernt und die Ventrikel in frischem eiskaltem ADS-Puffer gesammelt. Nach Absaugen des Puffers wurden die Ventrikel mit der Schere zerkleinert bis nur noch kleine Gewebestücke sichtbar waren. Die entstandene Masse wurde dann in Verdauerpuffer überführt und im Wasserbad bei

37 °C und horizontalem Schütteln mit 40 rpm verdaut. Nach 20 min wurde der Überstand entfernt und verworfen. Frischer Verdauerpuffer (1 mL pro Herz) wurde hinzugefügt und erneut für 20 min inkubiert. Der Überstand, welcher bereits lose Zellen enthielt, wurde weiterverarbeitet. Zu dem verbleibenden Gewebe wurde erneut frischer Verdauerpuffer gegeben und inkubiert bis eine vollständige Auflösung des Gewebes erreicht wurde. Die Überstände wurden durch ein Sieb in ein 50 mL Tube pipettiert und pro Tube wurden 8 mL fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt, um die Enzyme Kollagenase II und Pankreatin zu inaktivieren. Die Lösung wurde anschließend mit 1.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 mL FCS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt. Nach etwa vier bis fünf solcher Verdauerschritte wurden die gesammelten Zellen in FCS erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 mL frischem ADS-Puffer resuspendiert.

Eine Aufreinigung der Zellsuspension erfolgte über eine Auftrennung der Zellen nach ihrer Dichte in einer Percoll-Gradientensäule (Iwaki et al., 1990). Hierfür wurde zunächst eine Percoll-Stammlösung aus 27 mL Percoll und 3 mL 10x ADS-Puffer hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurde nun eine Lösung mit hoher sowie eine Lösung mit geringer Dichte hergestellt. Die Lösung mit niedriger Dichte enthielt 9 mL der Stammlösung und 11 mL ADS-Puffer. 4 mL dieser Lösung wurden in ein 15 mL Tube pipettiert. Die Lösung mit hoher Dichte enthielt hingegen 13 mL Stammlösung und 7 mL ADS-Puffer. Diese Lösung mit hoher Dichte wurde anschließend vorsichtig mit einer Pipette durch die Lösung mit niedriger Dichte geführt und auf den Boden

desselben 15 mL Tubes pipettiert. Die Zugabe von phenolrotem Farbstoff erlaubte in der Folge die Darstellung der Phasentrennung. Nun wurden 500 µL der Zellsuspension vorsichtig auf jeweils einen Gradienten pipettiert und bei 3.000 g und 4 °C für 30 min unterbrechungsfrei zentrifugiert. Hierbei wurde eine langsame Beschleunigung und Bremsung der Zentrifuge eingestellt. Die Zellen wurden nun nach ihrer jeweiligen Dichte aufgetrennt, wodurch drei Phasen in der Gradientensäule entstanden. Kardiomyozyten wanderten bis zur Grenze zwischen mittlerer und unterer Phase, wo sie durch eine Transferpipette isoliert werden konnten. Die weniger dichten kardialen Fibroblasten verblieben weiter oben, während

sich Erythrozyten am Boden des Tubes sammelten. Die Herzmuskelzellen wurden resuspendiert, sowie zweimal in 50 mL ADS gewaschen und bei 1.000 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 mL NRVCM Wachstumsmedium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau gezählt. Zuletzt wurden die Zellen in der für die jeweilige Kulturplatte spezifischen Dichte ausgesät. Die verschiedenen Dichten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verschiedene Dichten für die Aussaat von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten auf unterschiedliche Zellkulturplatten

Plattentyp	Experiment	Zellen / Well	Medium / Well
6-Well-Platte	Proteinisolation	$1 \cdot 10^6$	2 mL
6-Well-Platte	RNA-Isolation	$0,75 \cdot 10^6$	2 mL
12-Well-Platte mit Coverslips	Immuncytochemie	$1,8 \cdot 10^5$	1 mL

In den ersten 24 h nach Aussaat wurden die Kardiomyozyten in Wachstumsmedium mit 10 % FCS kultiviert. In sämtlichen Experimenten dieser Arbeit wurden die Zellen am Folgetag der Aussaat mit warmem PBS gewaschen und für die weitere Kultivierung mit Wachstumsmedium ohne FCS behandelt.

#### 2.2.3.4 Kultivierung von HEK293-A-Zellen

Da HEK293-A-Zellen einschichtig auch auf Plastikoberflächen wachsen, mussten die verwendeten Kulturplatten und -flaschen nicht mit Kollagen I vorbehandelt werden. Die Zellen wurden bei 70 – 80 % Konfluenz passagiert. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen mit warmem PBS gewaschen.

Nach Entfernung von PBS wurden die HEK293-A-Zellen durch Zugabe von 2 mL Trypsin-/EDTA-Lösung und Inkubation für 1 – 2 min bei 37 °C dissoziiert, bis einzelne Zellen unter dem Mikroskop sichtbar wurden. Zur Unterbrechung der Trypsinaktivität wurden 10 mL Wachstumsmedium hinzugefügt und die Zellen für 5 min bei 1.000 g und RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem warmem Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die jeweilige Kulturplatte oder –flasche ausgesät oder, ohne vorheriges Zählen, im Verhältnis 1:10 in neue T175-Flaschen gegeben, um die Zelllinie zu erhalten.

#### **2.2.3.5 Behandlung von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten mit Phenylephrin**

NRVCM wurden wie beschrieben in FCS-haltigem Wachstumsmedium 24 h kultiviert. Danach erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium. Nach weiteren 24 h wurde erneut ein Mediumwechsel mit Zugabe von 50 µM des pro-hypertrophischen selektiven  $\alpha$ 1-Agonisten Phenylephrin durchgeführt und die Zellen für 48 h inkubiert. Anschließend konnten die Zellen geerntet und weiteren Analysen zugeführt werden.

#### **2.2.3.6 Mechanischer Stress von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten mittels Stretchmembran**

NRVCM wurden zunächst für 48 h auf einer speziellen Stretchmembran inkubiert, wobei nach 24 h ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium erfolgte. Danach wurden die Zellen im Stretcher für 24 h dynamisch mit 1 Hz um etwa 20 % in die Länge gezogen. Im Anschluss konnten die Zellen wie beschrieben geerntet werden.

#### **2.2.3.7 Induktion von *Unfolded Protein Response* und Autophagie in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten**

NRVCM wurden in gewohnter Weise ausgesät und für 24 h inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel auf frisches serumhaltiges Medium, welches 1 mmol/l Dithiothreitol (DTT) enthielt.

Die Ernte der Kardiomyozyten erfolgte nach 6, 20 sowie 48 h Inkubationszeit im DTT-haltigen Medium. Als ER-Stress-Marker dienten die beiden zentralen UPR-Gene Grp78 und Atf6.

Zur Induktion autophagischer Prozesse wurden NRVCM 72 h lang in serumhaltigem Medium kultiviert, das täglich erneuert wurde. Anschließend folgte eine vierstündige Hungerperiode, in welcher die Zellen in glukose- und serumfreiem Medium gehalten wurden. Danach wurden sie geerntet und RNA gewonnen.

## **2.2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.4.1 Extraktion von Plasmid-DNA – Mini-Präparation**

Für die Extraktion kleiner Plasmidmengen aus Übernachtskulturen von *DH10B*- oder *TOP10 OneShot*® *E. coli* wurde das NucleoSpin® Mini-Preparation-Kit verwendet. Einzelne Klone aus Agarplatten oder 5 µL einer Flüssigkultur wurden wie oben beschrieben über Nacht in 5 mL LB-Medium mit Plasmid-spezifischem Antibiotikum inkubiert. Am Folgetag wurde die Kultur mit 11.000 g bei RT abzentrifugiert und das Pellet in 250 µL Puffer A1 (Resuspensionspuffer) resuspendiert. 250 µL Puffer A2 (Lysepuffer) wurden hinzugegeben, vermischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. 300 µL Puffer A3 (Neutralisationspuffer) wurden anschließend hinzugefügt und vermischt, um die Lysereaktion zu stoppen. Die Lösung wurde für 5 Minuten mit 11.000 g bei RT zentrifugiert, der Überstand auf eine vorbereitete Silica-Membransäule gegeben und erneut zentrifugiert. Hierbei bindet die gelöste Plasmid-DNA an die Membran. Im Folgenden wurden zunächst auf 55 °C vorgewärmter AW-Puffer und danach Ethanolhaltiger Puffer A4 (Waschpuffer) auf die Säule gegeben, jeweils zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachdem die Säule für 2 Minuten bei 11.000 g „trocken“ zentrifugiert wurde, wurden 22 µL 70 °C warmer EB-Puffer (Elution-Buffer) auf die Säule pipettiert, mindestens 1 Minute bei 70 °C inkubiert und anschließend für 1 Minute bei 11.000 g erneut zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun die vorher an die Membran gebundene Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur, deren Konzentration im letzten Schritt photometrisch gemessen wurde.

### **2.2.4.2 Extraktion von Plasmid-DNA – Midi-Präparation**

Zur Extraktion größerer DNA-Mengen aus 50 mL Übernachtskulturen von *DH10B*- oder *TOP10 OneShot*® *E. coli* wurde das Qiagen Plasmid Plus Purification Midi-Kit verwendet. 50 µL einer flüssigen Bakterienkultur wurden wie oben beschrieben über Nacht in 50 mL antibiotika-haltigem LB-Medium inkubiert. Am Folgetag wurde die

Kultur 20 Minuten mit 6.000 g und bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend zunächst in 2 mL Puffer P1 resuspendiert und danach mit 2 mL Puffer P2 für 3 Minuten bei RT lysiert. Zur Neutralisation der alkalischen Lysebedingungen wurden 2 mL Puffer P3 hinzugefügt und die Suspension in eine Filtersäule überführt. Nach zehnmütiger Inkubation wurde die Flüssigkeit mit einem Stempel durch den Filter gepresst, wobei der Zellschrott zurückgehalten wurde. Der Durchfluss wurde nun mit 2 mL BB-Puffer vermischt und in eine neue Membransäule gegeben, welche mit einer Vakuumröhre verbunden wurde. Durch einen Sog von etwa -300 mbar wurde die Lösung durch die Säule gesaugt, wobei DNA an der Membran festgehalten wurde. Durch Zugabe von 700 µL ETR-Puffer und anschließender Anwendung von Vakuum wurden Endotoxine entfernt, gefolgt von einem Waschschrift mit 700 µL Ethanolhaltigem PE-Puffer. Um alle ungewünschten Rückstände in der Säule möglichst vollständig zu entfernen, wurde diese anschließend 2 Minuten mit 11.000 g bei RT zentrifugiert. Nun wurden 200 µL

70 °C warmer EB-Puffer auf die Säule gegeben und die Plasmid-DNA nach mindestens einer Minute Inkubation durch Zentrifugation eluiert. Zuletzt erfolgte eine Konzentrationsmessung der gelösten DNA mittels Spektrophotometrie.

### **2.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Zunächst wurde 1 – 2 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt und mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid vermischt. Nun wurde die Suspension in eine Gelkammer gegossen und dort für 20 Minuten abgekühlt, wobei die Flüssigkeit zu einem festen Gel polymerisiert. Währenddessen wurde ein Kamm eingesetzt, um Taschen herzustellen, in welche später die DNA-Proben pipettiert werden sollten. Nach Polymerisation des Gels wurde dieses in eine Elektrophoresekammer überführt. Diese enthielt eine zum Bedecken des Gels ausreichende Menge an TAE-Puffer.

Die DNA-Proben wurden in die vorbereiteten Taschen pipettiert und zur Auftrennung der Fragmente eine elektrische Spannung von 100 V angelegt.

#### **2.2.4.4 Open Reading Frame (ORF) PCR**

Die selektive Amplifikation der Ziel-mRNA erfolgte mittels PCR. Hierfür wurde die DNA-Polymerase Phusion HotStart II® (Thermo Scientific) mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität („Proofreading“). Länge und Temperaturschritte der einzelnen PCR-Zyklen wurde je nach Herstellerprotokoll an die Länge und Zusammensetzung des zu amplifizierenden Gens, sowie die Bindungstemperaturen der Primer angepasst. Bei Bedarf wurde der Gehalt an MgSO<sub>4</sub> und/oder DMSO im Reaktionsansatz variiert.

#### **2.2.4.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Nach Amplifikation der Zielsequenz wurden 100 – 150 µL PCR-Ansatz wie beschrieben im Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Mit einem Skalpell wurden die Banden aus dem Gelblock herausgeschnitten und im Anschluss mithilfe des QIAQuick Gelextraktionskits aufgereinigt. Hierfür wurde das Gelfragment in ein 2 mL-Tube gegeben und gewogen. Anschließend wurde das Dreifache des ermittelten Gewichts an QG-Puffer hinzugegeben und das Gel für ca. 10 Minuten bei 55 °C gelöst. Danach wurde die Flüssigkeit in 750 µL-Schritten auf eine silicahaltige Membransäule gegeben und 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Zuletzt wurden weitere 500 µL QG-Puffer auf die Membran pipettiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen mit 600 µL ethanolhaltigem PE-Puffer per Zentrifugation gewaschen. Restliche Flüssigkeit wurde durch erneute Zentrifugation für 2 Minuten bei 11.000 g entfernt und die membrangebundene DNA mit 22 µL ddH<sub>2</sub>O in einem letzten Zentrifugationsschritt (1 Minute, 11.000 g) eluiert.

#### **2.2.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration aus Gewebeproben, Gelextraktion oder Plasmidisolierung gewonnener DNA und RNA erfolgte photometrisch mithilfe des Nanodrop™ 2000.

Nach Messung des jeweiligen Lösungsmittels als Blank wurde die optische Dichte der Nukleinsäuren bei 260 und 280 nm Wellenlänge ermittelt. Die Konzentration konnte danach automatisch durch ein Computerprogramm errechnet werden. Hierfür wurden jeweils Duplikate verwendet und der Mittelwert bestimmt, um eine ausreichende Genauigkeit der Messungen sicherzustellen.



### 2.2.4.7 Klonierung von Zielgenen

Aus kardialer cDNA der Ratte wurden die zu klonierenden Gene mit spezifischen „Fishing“-Primern mittels PCR vervielfältigt. Diese Primer, deren Sequenzen in Tabelle 3 aufgeführt sind, fügen an das 3'- und 5'-Ende der Zielsequenz einen Teil der sogenannten *attB*-Rekombinationsstellen an. Die *attB*-Sites bestehen aus 25 Basenpaaren und werden später von den an der Integration der Sequenz in einen Donorvektor beteiligten Enzymen erkannt. Durch eine „Adapter“-PCR mit den Primern attBFor und attBRev wurden die *attB*-Sites komplettiert und anschließend mithilfe der Gateway®-Technologie in das Plasmid pDonR221 rekombiniert. In weiteren Schritten erfolgte die Integration der Sequenz in den Expressionsvektor pAd/CMV/V5-DEST zur anschließenden Überexpression in NRVCMS.

### 2.2.4.8 Klonierung von DNA-Sequenzen – die Gateway®-Technologie

Das Gateway®-System nutzt das Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$ , um DNA-Abschnitte in das Genom von *E. coli* zu integrieren. Im ersten Schritt wurde wie bereits erläutert die gewünschte Sequenz mittels zweier PCRs aus einem cDNA-Pool der Ratte isoliert und jeweils am 3'- und 5'-Ende mit *attB*-Reaktionsstellen versehen.

Diese Konstrukte konnten anschließend enzymatisch in den Donorvektor pDonR221 integriert werden. Hierfür wurden 150 ng des PCR-Produkts und 150 ng des Vektors zusammen mit 1  $\mu$ L BP Clonase® II in einem 10  $\mu$ L-Reaktionsansatz über Nacht bei RT inkubiert.

In den nächsten Schritten wurden die Plasmide nach oben beschriebenen Protokollen in *E. coli* transformiert, entsprechend ihrer durch pDonR221 erworbenen Resistenz auf Kanamycin-haltigem LB-Agar selektioniert und anschließend geerntet.

Eine im Folgenden durchgeführte Sequenzierreaktion garantierte die korrekte Insertion des gewünschten DNA-Abschnitts in den Donorvektor, wobei auf korrekte Orientierung sowie die Vollständigkeit der Sequenz inklusive Start- und Stopcodon geachtet wurde. Bei positivem Ergebnis der Sequenzierung konnte mit der sogenannten LR-Reaktion mit Klonierung in den Vektor pAD/CMV/V5-DEST fortgefahren werden. Hierbei wurden dieselben Mengen an Plasmiden und Enzymen verwendet, wie bei der BP-Reaktion. Im Anschluss erfolgte eine erneute Transformation und Selektion, diesmal entsprechend der durch den Destinationsvektor

erzeugten Resistenz auf Carbenicillin-haltigem LB-Agar. Zuletzt wurde wieder eine Sequenzierung durchgeführt, um die korrekte Integration der gewünschten Sequenz zu kontrollieren.

#### **2.2.4.9 Erzeugung von Adenoviren zur Expression rekombinanter Proteine in Zellkulturen**

Die zur Überexpression bzw. zum Knockdown von Zielproteinen verwendeten rekombinanten Adenoviren wurden mithilfe des ViraPower™ Adenoviral Kit erzeugt. Zunächst erfolgte ein Restriktionsverdau des Vektors. Hierfür wurden 10 µg Vektor-DNA mit 1 µL Pac I (10 U/µL) und 48 µL 1 x CutSmart Puffer über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mithilfe von Silicagel-haltigen Membransäulen aufgereinigt und anschließend in HEK293-A-Zellen transfiziert. Diese wurden 24 h vor der Transfektion auf einer 6-Well-Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % bei 37 °C inkubiert. Für die Transfektion wurden 2 µg DNA mit demselben Volumen Lipofectamin® 2000 vermischt. Die dadurch entstandenen DNA-Lipid-Komplexe konnten dann von den HEK293-A-Zellen aufgenommen werden. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, nach 48 h wurden die Zellen wie oben beschrieben mit einer Trypsinlösung vom Plattenboden gelöst und in eine T75-Flasche mit 12 mL Wachstumsmedium überführt. Alle 72 h wurden nun 50 % des Mediums gewechselt, um eine ständige ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und eine pH-Pufferung des Mediums zu garantieren.

Auf diese Weise wurden die Zellkulturen etwa 2 Wochen lang bebrütet, wobei zweimal täglich mikroskopisch auf Zeichen beginnender Virusproduktion, wie Löcher im Zellrasen oder eine Abrundung der Zellen, überprüft wurde.

Kurz vor der beinahe vollständigen Lyse der Zellen wurden diese mittels Auf- und Abpipettieren vom Flaschenboden gelöst und in ein 15 mL-Tube gegeben. Anschließend wurde die Lösung 5 min bei 1.000 g zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Tube gegeben und das Pellet in 1,5 mL PBS resuspendiert. Nach drei Gefrierzyklen in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 30 °C im Thermoblock, sowie Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 15 min, wurde der Überstand mit dem Überstand aus der ersten Zentrifugation zu einem „Lysat 1“ vermengt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Erzeugung größerer Virusmengen wurden zunächst HEK293-A-Zellen in einer T175-Flasche bebrütet, bis diese eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten. Nun wurden 1-3 mL des „Lysats 1“ hinzugegeben und für 24 – 48 h inkubiert. Bei ersten Anzeichen der Virusproduktion erfolgte die Ernte der Zellen. Die HEK293-A-Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 mL PBS resuspendiert. Nach drei Zyklen „freeze & thaw“, sowie Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurde das überständige Viruslysats abgenommen und in 50 µL-Portionen in frische Reaktionstubes überführt.

#### **2.2.4.10 Titerbestimmung von Adenoviren**

Zur Berechnung der Zahl an infektiösen Viruspartikeln pro µL (ifu/µL) wurden infizierte HEK293-A-Zellen mit einem FITC-gekoppelten Anti-Hexon-Antikörper behandelt. Hierfür wurden die Zellen zunächst in einer 12-Well-Platte mit  $3 \times 10^5$  Zellen / Well und 1 mL Wachstumsmedium ausgesät. Direkt im Anschluss an die Aussaat wurden diese mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen infiziert. In einer seriellen Verdünnung um den Faktor 10 wurden 50 µL Viruslysats in Verdünnungsstufen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  erzeugt. Die  $10^{-2}$ -Verdünnung diente als Positivkontrolle. Mit dieser wurde nur 1 Well infiziert. Ein weiteres Well wurde im Sinne einer Negativkontrolle mit virusfreiem Medium behandelt. Nun wurden je 50 µL der verbleibenden Verdünnungsstufen vorsichtig in je 2 Wells pipettiert und die Zellen bei 37 °C für 48 h inkubiert.

Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen kurz bei RT getrocknet und anschließend mit eiskaltem Methanol für 10 min bei -20 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS + 1 % BSA wurden 100 µL des FITC-gekoppelten Anti-Hexon-Antikörpers in jedes Well gegeben und 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert.

Es folgten erneut drei Waschschritte mit PBS + 1 % BSA bevor die Wells zuletzt mit PBS überschichtet und infizierte Zellen am Mikroskop ausgezählt wurden. Hierfür wurde das FITC mittels UV-Licht angeregt und die emittierte Fluoreszenz mit dem Mikroskop beobachtet. Die infizierten und damit grünen Zellen wurden in zehn willkürlich gewählten, jedoch direkt benachbarten, Gesichtsfeldern bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt und ein Mittelwert aus infizierten Zellen pro Gesichtsfeld nach folgender Formel errechnet:

*infektiöse Viruspartikel pro  $\mu\text{L}$*

$$= \left[ \frac{\text{Mittelwert der infizierten Zellen pro Gesichtsfeld} * 313}{\text{Vergrößerungsstufe}} \right]$$

\* *Virusmenge pro Well*

#### **2.2.4.11 RNA-Extraktion aus *in-vitro*-Zellkulturen**

Zur Isolation von RNA aus Zellkulturen wurde das QIAzol-Lysereagenz verwendet. Nach zweimaligem Waschen der Kulturen mit warmem PBS wurde 1 mL QIAzol pro Well hinzugegeben, kurz bei RT inkubiert und anschließend die Zellen durch Auf- und Abpipettieren weiter lysiert und in ein frisches 1,5 mL-Tube überführt. 200  $\mu\text{L}$  Chloroform wurden in das Tube gegeben, gemischt und 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 15 min mit 15.000 g und 4 °C in eine wässrige sowie eine Phenolphase aufgetrennt. Die RNA-haltige wässrige Phase konnte danach vorsichtig abgenommen und in ein neues DNase- und RNase-freies Reaktionstube überführt werden. Dort wurde im Verhältnis 1:1 (i.d.R. 500  $\mu\text{L}$ ) Isopropanol hinzugegeben, gut gemischt und anschließend über Nacht bei -20 °C die enthaltene RNA präzipitiert. Durch Zentrifugation für 15 min bei 17.500 g und 4 °C wurde ein RNA-Pellet gewonnen, während der Überstand vorsichtig dekantiert und verworfen wurde. Nun wurde das Pellet einmal mit 1 mL 75 % Ethanol gewaschen und erneut 5 min bei 7.500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet 5-10 min bei RT luftgetrocknet.

Anschließend wurde es in DNase- und RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und die Konzentration der gewonnenen RNA im Nanodrop bestimmt. 5  $\mu\text{g}$  RNA wurden im Folgenden in einem 50  $\mu\text{L}$ -Ansatz DNase-verdaut. Der Reaktionsansatz enthielt dabei je 5  $\mu\text{L}$  DNase I und DNase-I-Puffer und wurde 15 min bei RT inkubiert.

Durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung konnte die DNase I im Anschluss ausgefällt und mittels Zentrifugation mit 17.500 g für 10 min bei 4 °C pelletiert werden. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues RNase-freies Reaktionstube überführt und mit 300  $\mu\text{L}$  99,99 % Ethanol sowie 10  $\mu\text{L}$  3 M Natrium-Acetat über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die RNA wurde nun 40 min mit 17.500 g bei 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500  $\mu\text{L}$  75 % Ethanol gewaschen. Nachdem die Lösung bei 7.500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert wurde, konnte das Pellet nach Trocknung für 5-10 min bei RT in

10  $\mu\text{L}$  RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und die RNA-Konzentration im Nanodrop gemessen werden.

#### **2.2.4.12 cDNA-Synthese aus RNA-Proben**

Für das Umschreiben von 1  $\mu\text{g}$  DNA-freier totaler RNA wurde das SuperScript III First Strand cDNA-Synthese-Kit verwendet. Die RNA wurde dabei in einem 13,5  $\mu\text{L}$ -Ansatz mit RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Daneben enthielt dieser Ansatz 0,5  $\mu\text{L}$  10 mM dNTPS (je 2,5  $\mu\text{M}$  Desoxyadenosin, Desoxythmin, Desoxyguanin und Desoxycytosin) und 250 ng Random-Hexamer-Primer. Im ersten Schritt wurde der Reaktionsansatz 5 min bei 65 °C in einem PCR-Cycler denaturiert, anschließend mindestens 1 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Danach wurden pro Reaktion 4  $\mu\text{L}$  5x First-Strand-Puffer, 1  $\mu\text{L}$  0,1 mM DTT, 1  $\mu\text{L}$  RNaseOUT RNase-Inhibitor sowie 0,5  $\mu\text{L}$  SuperScript III DNA-Polymerase in Form eines Mastermix hinzugegeben und durch auf- und abpipetieren gemischt. Im PCR-Cycler durchlief der Syntheseansatz folgende Zyklen: 10 min bei 25 °C, 1 h bei 50 °C, 15 min bei 70 °C und danach ein dauerhafter Halt bei 4 °C. Die so erzeugte cDNA wurde zuletzt noch auf 10 ng/ $\mu\text{L}$  verdünnt und konnte anschließend mittels Realtime-PCR analysiert werden.

#### **2.2.4.13 RNA-Isolation aus Gewebeproben**

Gewebeproben wurden in Reaktionstubes gegeben und mit 1 mL QIAzol-Reagenz sowie Plastikkügelchen aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung für 2 x 15 – 20 s im Precellys® 24 Homogenizer.

Die Proben wurden anschließend 20 min bei 12.000g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionstube überführt. Die Schritte für RNA-Isolation und cDNA-Synthese folgten danach den beschriebenen Protokollen.

#### **2.2.4.14 Quantitative Realtime-PCR**

Zur Quantifizierung von Genexpressionen wurde das SYBR® GreenER™ SuperMix Universal Kit verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 18  $\mu\text{L}$  eines Mastermix aus 10  $\mu\text{L}$  SYBR® GreenER™ SuperMix Universal, 7,2  $\mu\text{L}$  DNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  und je 0,4  $\mu\text{L}$  Primer Forward und Reverse (beide 10  $\mu\text{M}$ ) sowie 2  $\mu\text{L}$  der zu messenden cDNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ ). Die PCR-Platte wurde anschließend in Triplikaten mit den Ansätzen aufgefüllt,

mit Klebefolie bedeckt, kurz abzentrifugiert und dann im qRT-PCR-Cycler gemessen. Das folgende PCR-Protokoll wurde hierfür verwendet: a) 2 min bei 50 °C, b) 30 s bei 95 °C; c) 5 s bei 95 °C, d) 30 s bei 60 °C + Fluoreszenzmessung (40 Wiederholungen für die Schritte c und d).

Als Kontrollgen fungierte bei Experimenten mit NRVCs Rpl32. Zur Quantifizierung diente die  $\Delta\Delta$ CT-Methode (Livak und Schmittgen, 2001).

#### **2.2.4.15 Proteinisolation aus Zellkulturen**

Nach Abnahme des Wachstumsmediums und zweimaligem Waschen der Zellen mit warmem PBS wurden pro Well 50  $\mu$ L RIPA-Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitor hinzugefügt. Die Zellen wurden dann mit einem sterilen Zellschaber vom Boden abgeschabt und zusammen mit dem Puffer in ein 1,5 mL-Tube überführt. Alle Schritte erfolgten dabei auf Eis. Anschließend wurden die NRVCs dreimal für 30 min in flüssigem Stickstoff gefroren und jeweils bei Raumtemperatur für 15 min wieder erwärmt. Nun folgte eine Zentrifugation für 15 min mit 14.000 rpm und bei 4 °C. Der Überstand wurde zuletzt vorsichtig abgenommen, in ein frisches Reaktionstube gegeben und bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.4.16 Proteinisolation aus Gewebeproben**

Für die Extraktion von Protein aus ganzen Mausorganen wurde analog der RNA-Gewinnung das Precellys® 24 System verwendet. Hierfür wurden die Gewebe zusammen mit einigen Plastikkügelchen und 1 mL Lysepuffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Abhängig von Größe und Beschaffenheit der Organe wurden diese im Precellys 2 x 20 s bei Geschwindigkeit 5.000 oder 2 x 15 bei Geschwindigkeit 6.500 homogenisiert. Dabei wurde darauf geachtet, eine zu starke Erwärmung der Proben zu vermeiden, um eine Degradierung der Proteine zu verhindern. Die gelösten Gewebe wurden anschließend 20 min mit 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert und ihr Überstand in ein neues 1,5 mL-Tube überführt.

#### **2.2.4.17 Messung von Proteinkonzentrationen mit dem DC™ Protein-Assay Kit**

Für die Konzentrationsbestimmung gewonnener Proteinproben wurde das DC™ Protein-Assay verwendet. Zur Erzeugung einer Standardkurve wurde eine

Stocklösung mit 4 mg/mL BSA (w/v) in verschiedenen Tubes bis zu einer Konzentration von 0,0625 ng/mL verdünnt. Je 5  $\mu$ L der Standardproben und der zu messenden Proteinproben wurden dann pro Well auf eine 96-Well Platte gegeben, welche eine Messung der OD bei 750 nm ermöglicht. 25  $\mu$ L von Reagenz A sowie 200  $\mu$ L Reagenz B wurden pro Well hinzugegeben. Nach kurzem Mischen und einer Inkubation für 15 min wurden die Proteinproben photometrisch gemessen. Durch lineare Regression der Standards konnte nun die Konzentration errechnet werden. Der Korrelationskoeffizient musste dabei mindestens  $r = 0,999$  betragen, um die Ergebnisse der Messung anzunehmen.

#### **2.2.4.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Vorbereitung wurde zunächst ein Trenngel hergestellt, welches 6 bis 12 % Polyacrylamid enthielt. Dafür wurden Trenngelpuffer, Wasser und eine 37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung sowie TEMED und APS vermischt. Mit diesem Gemisch wurde anschließend eine Polymerisierungskassette befüllt. Nach 20 Minuten wurde auf das inzwischen erstarrte Trenngel ein Sammelgel mit 4 % Polyacrylamidanteil gegossen.

Im noch flüssigen Zustand wurde ein Kamm zur Erzeugung von Taschen eingelegt. Nach Aushärtung des Sammelgels konnte der Kamm entfernt und die Kassette in eine mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer überführt werden. Nach Spülung der Taschen wurden die Proteinproben sowie ein Größenmarker in je eine Tasche pipettiert. Die Proben wurden zuvor mit ddH<sub>2</sub>O auf die gewünschte Proteinkonzentration verdünnt und mit 4x Laemmli-puffer vermischt. Danach wurden sie für 5 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert und abzentrifugiert. Zur Elektrophorese wurde eine Spannung von 100 V angelegt.

#### **2.2.4.19 Western-Blotting**

Eine Blotting-Kammer wurde mit Transferpuffer befüllt und das „Blotting-Sandwich“ hineingestellt. Das „Sandwich“ bestand dabei nacheinander aus einem Schwamm, zwei Lagen Filterpapier, dem Polyacrylamidgel, der PVDF-Membran, weiteren zwei Lagen Filterpapier und einem zweiten Schwamm. Die PVDF-Membran musste vor Benutzung für 10 s im Methanolbad aktiviert werden. Nach Einstellen des

„Sandwiches“ in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer wurde unter Kühlung für 90 min ein elektrisches Feld mit einer konstanten Stromstärke von 380 mA angelegt. Zuletzt wurde die PVDF-Membran für 1-2 h in einer 5 % (w/v) Milchpulverlösung in TBS-T-Puffer geblockt.

#### **2.2.4.20 Spezifische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen**

Nach dem Blocken wurde die Membran mit dem primären Antikörper gegen das Epitop des Zielproteins behandelt. Die verwendeten Antikörper, welche in *Tabelle 1* aufgeführt sind, wurden nach Herstellerangaben in 5 % (w/v) Milchpulverlösung in TBS-T verdünnt. Die Membran wurde anschließend mit mindestens 3,5 mL der antikörperhaltigen Milchlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit TBS-T-Puffer, konnte diese mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper (siehe *Tabelle 2*) für 1 h bei RT inkubiert werden. Nach sechs weiteren Waschschritten in TBS-T-Puffer konnten die Proteinbanden unter Verwendung eines ECL (*Enhanced Chemiluminescence*)-Systems sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden eine Diacylhydrazinluminol- und eine Peroxidlösung im Verhältnis 1:1 vermischt und gleichmäßig über die PVDF-Membran verteilt.

Das emittierte Lichtsignal wurde mit einer speziellen Kamera in einer Detektionskammer erfasst und konnte später mittels Densitometrie quantifiziert werden. Als Kontrollbande fungierten  $\alpha$ -Tubulin und GAPDH mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper.

#### **2.2.4.21 Immunofluoreszenz**

NRVCM wurden auf Kollagen-beschichtete Glasplättchen ausgesät und wie beschrieben in DMEM-Medium bebrütet. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit PBS + 4 % Paraformaldehyd für 5 min bei RT fixiert. Nach erneut dreimaligem Waschen mit PBS wurden die NRVCM mit PBS + 0,1 % Triton X 100 für 1 h bei RT permeabilisiert. Nun wurden die fixierten Zellen für 1 h mit den in *Tabelle 1* genannten Primärantikörpern inkubiert und im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen. Für eine weitere Stunde wurden die Zellen mit Spezies-spezifischen und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern behandelt. Diese sind in *Tabelle 2* aufgelistet. Zuletzt wurden die NRVCM erneut dreimal mit PBS sowie



zweimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 15 µL Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert. Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit dem Keyence BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop mit einer 20 – 40x CFI Plan Apo  $\lambda$  Linse. Die mit der eingebauten CCD-Kamera aufgenommenen Bilder konnten anschließend mit der BZ-II Analyzersoftware weiterverarbeitet werden.

#### **2.2.4.22 Bestimmung von Zellgrößen**

Die Messungen der Zelloberflächen erfolgten in 20-facher Vergrößerung mittels 5x5x5 (x-y-z) aneinander angrenzenden Bilder mit einer Überlappung von 20 %. Diese wurden mit der BZ-II Analyzersoftware zu einem einzigen zweidimensionalen Bild vereint. Mithilfe des HybridCellCount Softwaremoduls (Keyence) wurden nun die Oberflächen der NRVCM vermessen. Dafür musste zunächst die Intensität der Fluoreszenzen in einem Referenzbild eingestellt werden. Die Markierung von  $\alpha$ -Actinin gab dem Programm die Lage der Zellgrenzen vor und die DAPI-markierten Zellkerne wurden per Computer extrahiert, um die Zahl der Zellkerne pro Zelle bestimmen zu können.

Letztlich wurden somit nur die Zellen in die Messung eingeschlossen, welche nur einen Zellkern enthielten und keine direkten Zell-Zell-Kontakte aufwiesen. Ausgeschlossen wurden darüber hinaus apoptotische Zellen mit einer Kern-Plasma-Relation von über 30 % sowie Zellen mit stark abnormen Größen von unter 100 und über 3.000  $\mu\text{m}^2$ .

#### **2.2.4.23 Tierhaltung und Tierexperimente**

Alle Tiere wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel gehalten. Sie hatten ständigen Zugang zu Wasser und Trockenfutter in Form von Pellets, sowie einen Zyklus von 12 h Tag und 12 h Nacht. Die Raumtemperatur betrug konstant 24 °C  $\pm$  1 °C. Die als *in-vivo*-Hypertrophie Modelle dienenden Calcineurin-transgenen sowie TAC-operierten Mäuse sind in der Arbeitsgruppe etabliert.

Bei der TAC-Operation wird die Aorta transversalis der Tiere mittels eines minimalinvasiven Eingriffs auf einen definierten Durchmesser verkleinert, um die Nachlast des Herzens zu erhöhen und einen hypertrophen Phänotyp mit konsekutivem

Herzversagen zu erzeugen. Calcineurin-transgene Mäuse bilden schon in frühem Lebensalter eine kardiale Hypertrophie aus (Molkentin et al., 1998).

Für einen Hungerversuch wurde Mäusen 48 h lang jegliche Nahrung entzogen, der Zugang zu Wasser war während dieser Zeit nicht eingeschränkt. Anschließend wurden die Tiere getötet und ihre Organe entnommen.

*Fyco1*-Knockoutmäuse weisen eine verminderte Herstellung eines Proteins auf, welches den mikrotubulären Transport autophagischer Vesikel fördert. Die Knockout-Mauslinie ist daher Modell einer Inhibition der Autophagie.

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Tierexperimente wurden von der Landesregierung und dem Tierschutzbeauftragten der Universität Kiel genehmigt und wurden unter strikter Befolgung der Ethikrichtlinien durchgeführt, um unnötiges Leid für die Tiere zu vermeiden.

### **2.2.5 Statistische Analyse**

Die statistischen Berechnungen wurden mithilfe von Sigma-Plot der Firma Systat durchgeführt. Zunächst wurde die Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test und Brown-Forsythe-Varianzhomogenitätstest geprüft. Normalverteilte Daten wurden mittels Zweistichproben-T-Test analysiert. Wurden die o.g. Tests nicht bestanden, so wurde stattdessen ein Mann-Whitney-U-Rangsummentest genutzt. Für alle erhobenen Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  gewählt.

### 3 Ergebnisse

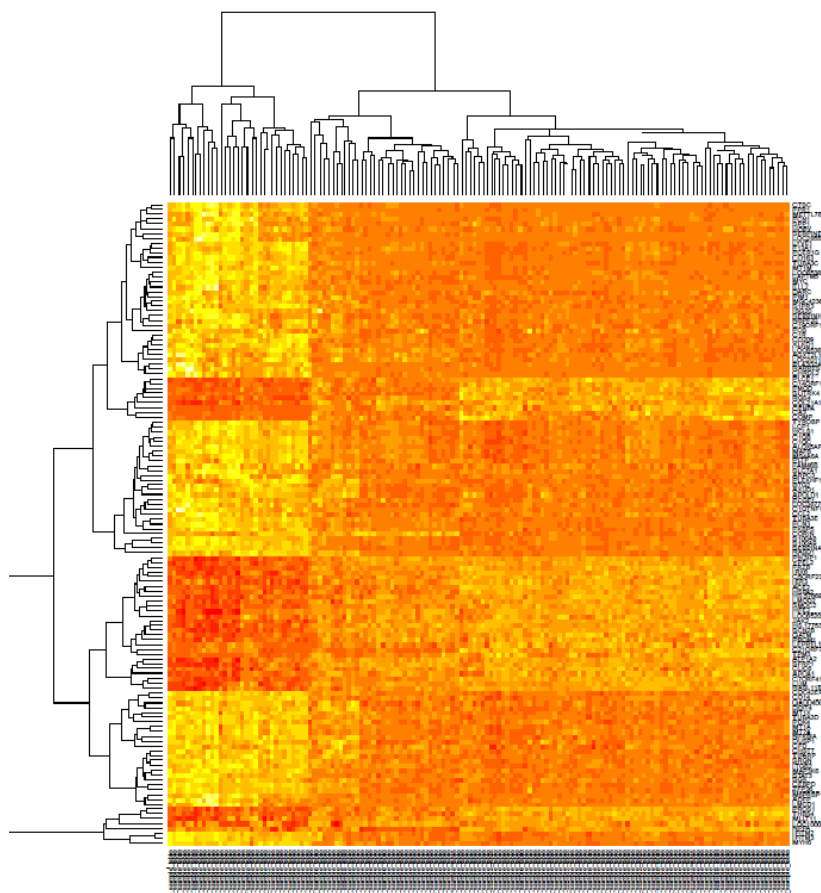
#### 3.1 *In-silico*-Analyse von neuen Kandidatentranskripten aus humanen Microarray-Daten der Hypertrophen Kardiomyopathie

Mittels systematischer Recherche in der Expressionsdatenbank *Gene Expression Omnibus* (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) erfassten wir den größten, qualitativ hochwertigsten verfügbaren Datensatz einer Transkriptomanalyse der humanen Hypertrophen Kardiomyopathie der Mayo Clinic, Rochester MN, USA. Dieser Datensatz umfasst Microarray-Transkriptionsdaten von Myokardgewebe von 106 Patienten mit symptomatischer Hypertropher Kardiomyopathie nach operativer Myektomie und 39 Kontrollen (Herzdonoren bei Transplantation) (Alter: 4 – 78 Jahre, mittleres Alter bei Morrow-Myektomie:  $40,5 \pm 20,2$  Jahre), wobei aus 8.443 Transkripten der Microarray-Plattform 500 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden konnten (vgl. auch Abb. 5). Durch Filterung der Gene nach Ausmaß der Induktion und statistischer Signifikanz sowie durch systematische Literaturrecherche in *PubMed* wählten wir bisher wenig charakterisierte und insbesondere im kardialen Kontext möglichst unbekannte Gene aus und führten diese im Folgenden weiteren Experimenten zu. Hierbei entstand eine Liste von 12 näher zu untersuchenden Genen, welche in Tabelle 7 gelistet sind.

Tabelle 7: Liste der differentiell exprimierten Kandidatengene aus der HCM-Transkriptomanalyse sowie der Zahl der zugehörigen wissenschaftlichen Publikationen (Stand: 06/2014)

Gen	Name	Fold Change (HCM vs. Ctrl)	adj. p-Wert	Publikationen allgemein (Pubmed)	Publikationen Herz (Pubmed)
<i>Sfrp1</i>	Secreted frizzled related protein 1	3,32	< 0,001	493	14
<i>Smoc2</i>	SPARC-related modular calcium binding 2	2,80	< 0,001	28	1
<i>Frzb</i>	Frizzled related protein	2,64	< 0,001	245	10
<i>Irx6</i>	Iroquois Homeobox 6	2,61	< 0,001	13	2
<i>Pik3ip1</i>	PIK3-interacting protein 1	2,56	< 0,001	16	0

Gen	Name	Fold Change (HCM vs. Ctrl)	adj. p-Wert	Publikationen allgemein (Pubmed)	Publikationen Herz (Pubmed)
<i>C7orf41</i>	Maturin	2,47	< 0,001	2	0
<i>C14orf132</i>	<i>keiner</i>	2,47	< 0,001	0	0
<i>Npr3</i>	Natriuretic peptide receptor 3	2,36	< 0,001	2	2
<i>Ypel2</i>	Yippee-like 2	2,10	< 0,001	2	0
<i>Lrrc49</i>	Leucine rich repeat containing 49	2,08	< 0,001	1	0
<i>Prickle1</i>	Prickle homolog 1	2,05	< 0,001	49	1
<i>Irx2</i>	Iroquois homeobox 2	2,01	< 0,001	35	4

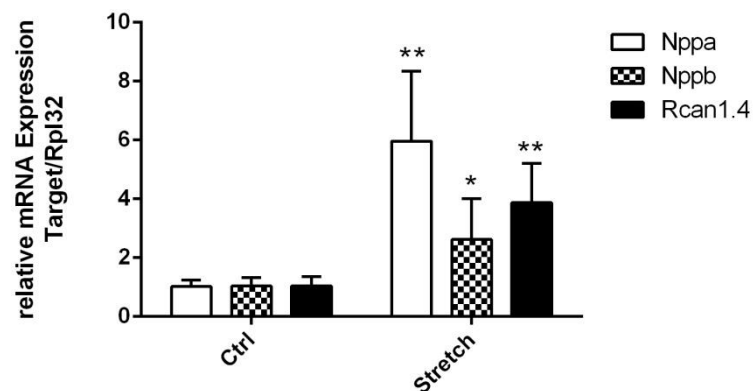


**Abbildung 5: Heatmap des HCM-Microarray.** Aufgetragen ist die Expression der untersuchten Gene in den einzelnen Patientenproben. Der Grad der Expressionsänderung ist durch die Farbintensität kodiert: je intensiver die rote Färbung, desto stärker die Induktion.

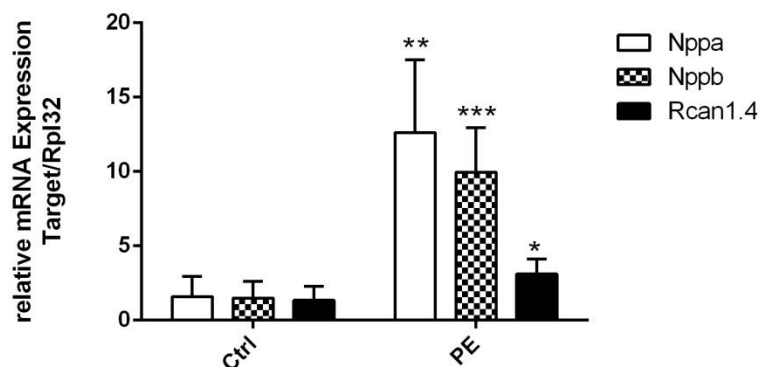
### 3.2 Kardiale Hypertrophiemodelle und fetales Genprogramm

Zur Validierung unserer *in silico* ausgewählten Kandidaten-Transkripte untersuchten wir deren differentielle Expression in etablierten Modellen der kardialen Hypertrophie *in vitro* und *in vivo*. Hierbei verwendeten wir die pharmakologische Stimulation mittels Phenylephrin (PE), den mechanischen Stretch von NRVCM sowie murine *in-vivo*-Modelle Calcineurin-transgener Mäuse und der transversen aortalen Konstriktion (TAC). Zur initialen Validierung des pro-hypertrophen Effektes wurde mittels Multiplex-qRT-PCR die Expression des fetalen Genprogrammes gemessen. Als Markergene fungierten dabei *Nppa*, *Nppb* sowie *Rcan1.4*. Die stärkste Induktion ließ sich nach Phenylephrin-Stimulation nachweisen. Im Stretch- und im TAC-Modell zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Effekt. Calcineurin-transgene Mäuse wiesen bei schwerem Phänotyp, wie erwartet, die stärkste Induktion von *Rcan1.4* auf. Abbildung 6 zeigt die Induktion der fetalen Gene durch pathologische Hypertrophie im Modell.

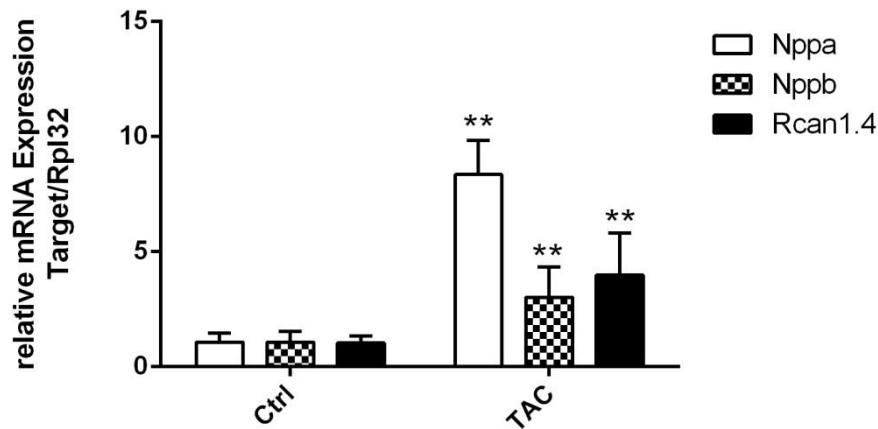
**A**



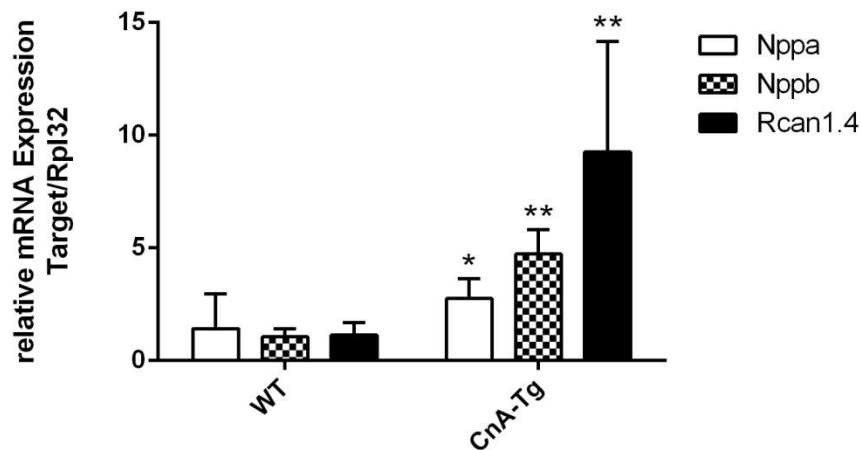
**B**



C



D



**Abbildung 6: Induktion des Hypertrophen Genprogrammes in Modellen der pathologischen Hypertrophie.**

Es zeigt sich in allen Modellen eine signifikante Induktion von *nppa*, *nppb* und *rcan1.4* in der Multiplex-qRT-PCR als Ausdruck einer pro-hypertrophen Reaktion der Zelle auf den jeweiligen Stimulus. Als Regulator der Calcineurin-Aktivität ist *rcan1.4* besonders stark im CnA-Tg-Modell reguliert.

**A:** Stretch (*nppa*: 5,58-fach  $\pm$  2,38 vs. Ctrl,  $p < 0,01$ ; *nppb*: 2,34-fach  $\pm$  1,39 vs. Ctrl,  $p < 0,05$ ; *rcan1.4*: 3,67-fach  $\pm$  1,33 vs. Ctrl,  $p < 0,01$ ;  $n = 3$ )

**B:** Phenylephrin (*nppa*: 10,83-fach  $\pm$  4,53,  $p < 0,001$ ; *nppb*: 9,63-fach  $\pm$  2,49,  $p < 0,001$ ; *rcan1.4*: 2,88-fach  $\pm$  0,86,  $p < 0,01$ ;  $n=3$ )

**C:** Transverse Aortale Konstriktion: (*nppa*: 8,36-fach  $\pm$  1,47 vs. Ctrl,  $p < 0,01$ ; *nppb*: 3,02-fach  $\pm$  1,33 vs. Ctrl,  $p < 0,01$ ; *rcan1.4*: 3,98-fach  $\pm$  1,83 vs. Ctrl,  $p < 0,01$ ;  $n = 6$ )

**D:** Calcineurin-transgen: *nppa*: 2,53-fach  $\pm$  0,96 vs. WT,  $p < 0,05$ ; *nppb*: 4,74-fach  $\pm$  1,07 vs. WT,  $p < 0,01$ ; *rcan1.4*: 9,25-fach  $\pm$  4,90 vs. WT,  $p < 0,01$ ;  $n = 6$ )

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

### 3.3 Validation neuer Transkripte in Hypertrophie-Modellen *in vitro* und *in vivo* mittels qRT-PCR

In einem nächsten Schritt prüften wir die Expression der ausgewählten Gene in den beschriebenen Hypertrophie-Modellen, um die Ergebnisse des Microarray zu validieren (s. auch Tabelle 8 und Abb. 7). Aufgrund der hohen Zahl an Kandidatengenen wurden nur die potentiell interessantesten sowie jene, welche sich in den ersten Messungen als signifikant reguliert bestätigten, in allen 4 Modellen untersucht.

*Leucine rich repeat containing 49 (Lrrc49)* analysierten wir nur im Phenylephrin-Modell, wo es sich mit 1,05-fach unverändert exprimiert zeigte ( $p = 0,595$ ).

*Natriuretic peptide receptor 3 (Npr3)* war nach transverser Aortenkonstriktion 0,069-fach vermindert exprimiert ( $p = 0,017$ ). Im Gegenzug zeigte sich jedoch im Calcineurin-transgenen Modell eine über 6-fache Induktion (6,26-fach,  $p < 0,001$ ).

*Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1 (Pik3ip1)* stellte sich insbesondere nach PE-Stimulation, hier 0,2-fach ( $p < 0,001$ ), sowie nach TAC-Operation (0,63-fach,  $p = 0,03$ ) signifikant reduziert exprimiert dar. Im Calcineurin-transgenen Modell kam es jedoch auch hier zu einer Verstärkung der Expression (2,31-fach,  $p < 0,001$ ). *Pik3ip1* wurde kurz nach Beginn der Experimente zu dieser Arbeit im Kontext der kardialen Hypertrophie umfassend charakterisiert (Song et al., 2015) und wurde somit nicht weiter berücksichtigt.

*Prickle planar cell polarity protein 1 (Prickle1)* war in unseren *in-vivo*-Modellen statistisch nicht signifikant herabreguliert (TAC: 0,59-fach,  $p=0,08$ ; CnA: 0,73-fach,  $p = 0,054$ ).

*Secreted frizzled protein 1 (Sfrp1)* zeigte eine signifikante Induktion in beiden *in-vivo*-Modellen (TAC: 2,39-fach,  $p < 0,001$ ; CnA: 3,41-fach,  $p < 0,001$ ) sowie nach PE-Stimulation (3,09-fach,  $p < 0,001$ ).

*Secreted modular calcium binding 2 (Smoc2)* wies *in vitro* eine Herabregulation (Stretch: 0,31-fach,  $p < 0,001$ ; PE: 0,30-fach,  $p < 0,001$ ) auf, während sich in Calcineurin-transgenen Mäusen auch hier eine Induktion zeigte (1,79-fach,  $p = 0,03$ ). In TAC-operierten Mäusen stellte sich kein Unterschied des Expressionslevels dar (0,97-fach,  $p = 0,6$ ).

*Yippee-like 2 (Ypel2)*, ein im kardialen Kontext gänzlich unbekanntes Gen, war in unseren *in-vivo*-Modellen statistisch signifikant herabreguliert (TAC: 0,71-fach,  $p = 0,03$ ; CnA: 0,42-fach,  $p = 0,007$ ).

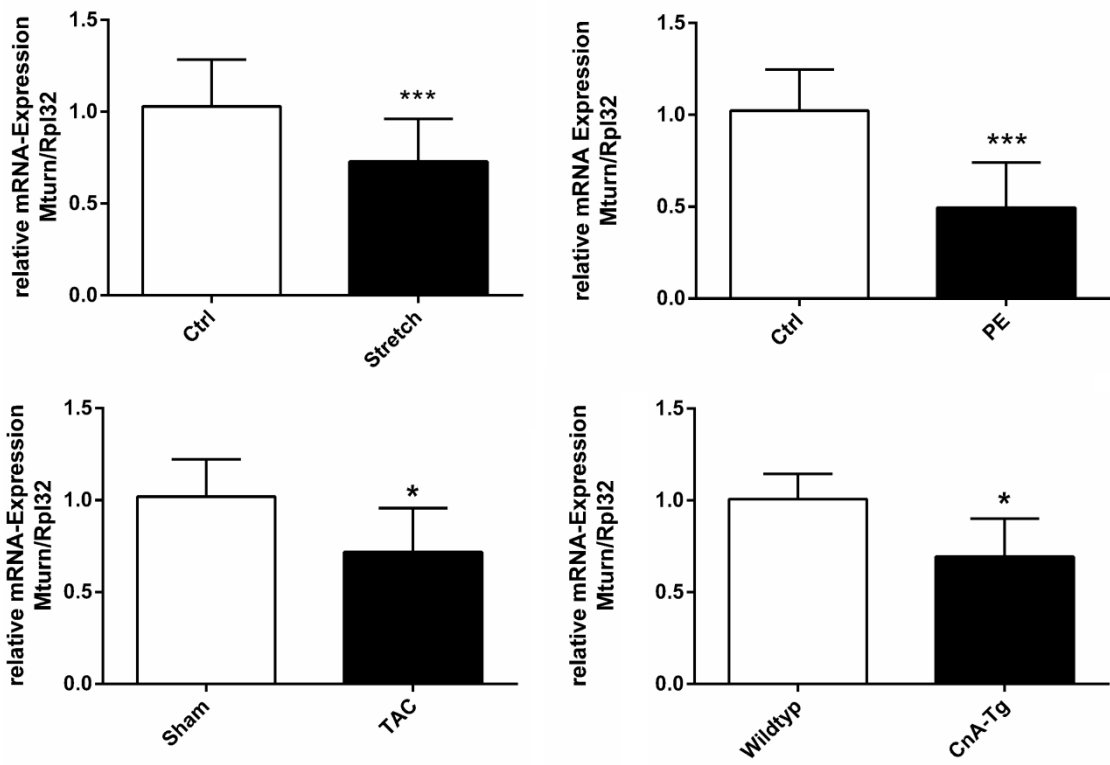
Schließlich zeigte Maturin (*Mturn, C7orf41*) in allen Experimenten eine signifikante Herabregulation. Dieser Effekt war nach PE-Stimulation am stärksten und betrug hier über 70 % (0,28-fach,  $p < 0,001$ ). In den *in-vivo*-Modellen ging die Maturin-Expression um über 30 % zurück (TAC: 0,66-fach,  $p = 0,002$ ; CnA: 0,67-fach,  $p = 0,008$ ). Im Rahmen der systematischen Literaturrecherche wurden für Maturin 2 wissenschaftliche Publikationen gefunden, wobei eine Beteiligung des Proteins im Kontext der kardialen Hypertrophie bisher unbeschrieben war. Aufgrund der über alle 4 Modelle konsistent verminderten Expression sowie als bislang kaum beschriebenes Protein wurde Maturin zum Fokus für weitere Experimente.

Tabelle 8: Quantitative Realtime-PCR der HCM-Zielgene (Differentielle Expression vs. Haushaltsgen *Rpl32*) in Hypertrophie-Modellen, jeweils vs. unbehandelter Kontrolle.

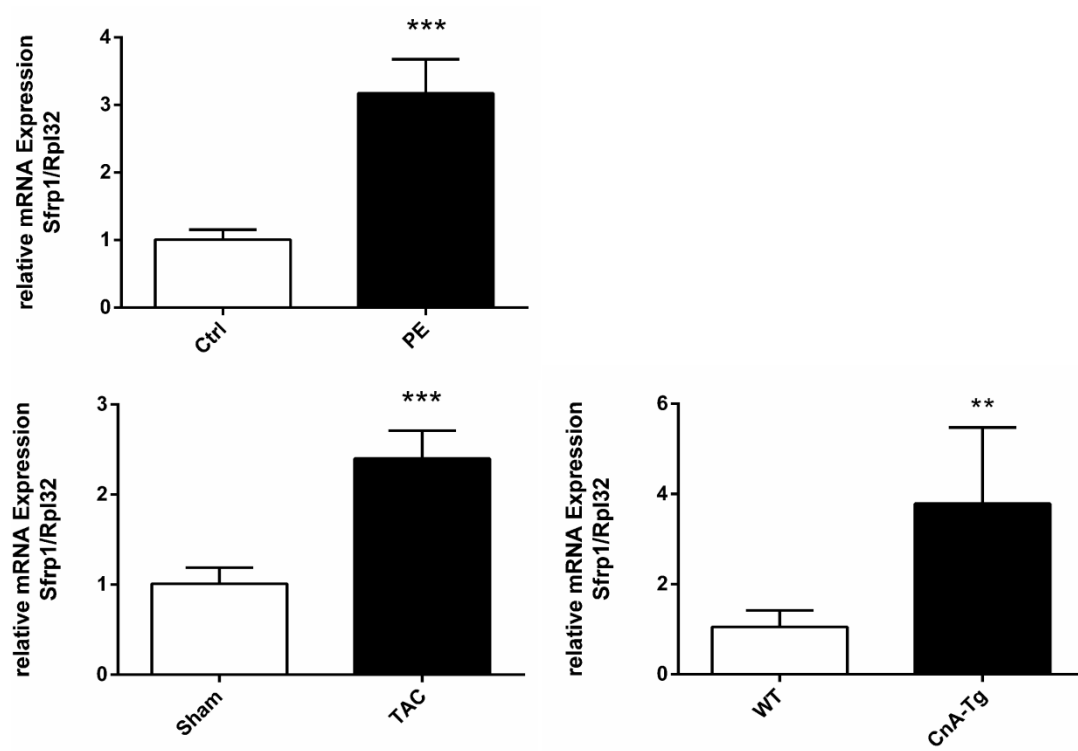
Gen	Expression Stretch	Expression PE	Expression TAC	Expression CnA
<i>Lrrc49</i>	nicht getestet	1,05 ( $p=0,595$ , $n=3$ )	nicht getestet	
<i>Mturn</i>	0,57 ( $p=0,015$ , $n=3$ )	0,28 ( $p=0,002$ , $n=4$ )	0,66 ( $p=0,002$ , $n=6$ )	0,67 ( $p=0,008$ , $n=6$ )
<i>Npr3</i>	nicht getestet		0,69 ( $p=0,017$ , $n=6$ )	6,26 ( $p<0,001$ , $n=6$ )
<i>Pik3ip1</i>	nicht getestet	0,20 ( $p<0,001$ , $n=3$ )	0,63 ( $p=0,03$ , $n=6$ )	2,31 ( $p<0,001$ , $n=6$ )
<i>Prickle1</i>	nicht getestet		0,59 ( $p=0,08$ , $n=6$ )	0,73 ( $p=0,054$ , $n=6$ )
<i>Sfrp1</i>	nicht getestet	3,09 ( $p<0,001$ , $n=3$ )	2,39 ( $p<0,001$ , $n=6$ )	3,41 ( $p=0,001$ , $n=6$ )
<i>Smoc2</i>	0,31 ( $p<0,001$ , $n=3$ )	0,30 ( $p<0,001$ , $n=3$ )	0,97 ( $p=0,6$ , $n=6$ )	1,79 ( $p=0,03$ , $n=6$ )
<i>Ypel2</i>	nicht getestet		0,71 ( $p=0,03$ , $n=6$ )	0,42 ( $p=0,007$ , $n=6$ )



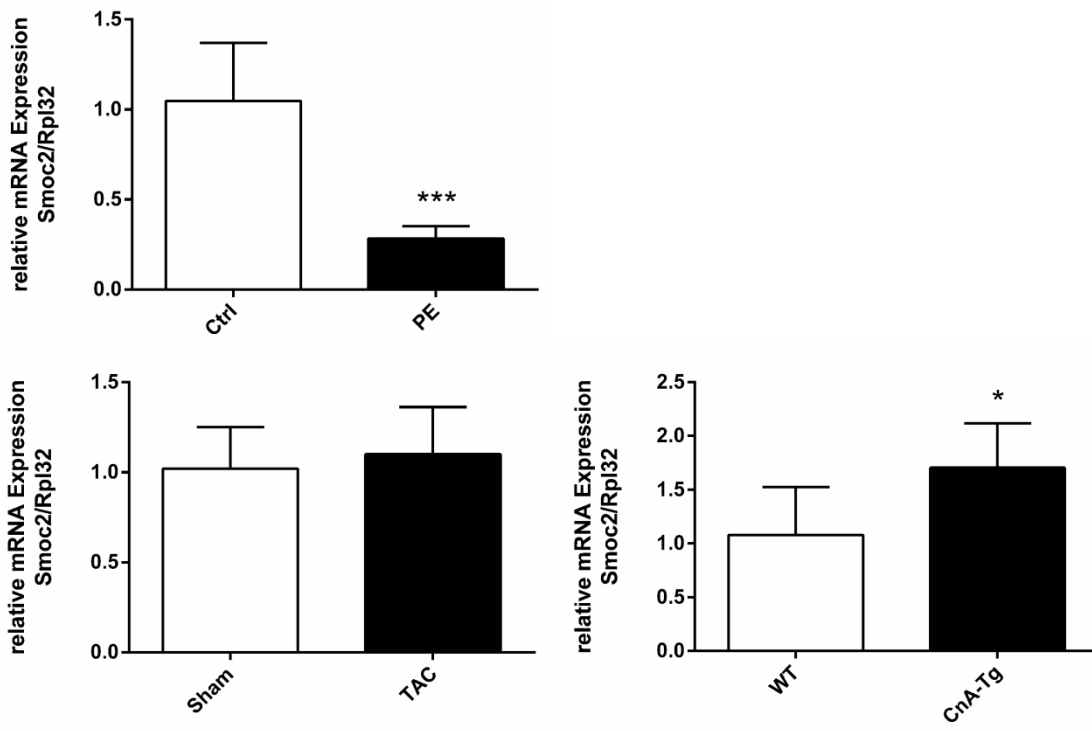
A



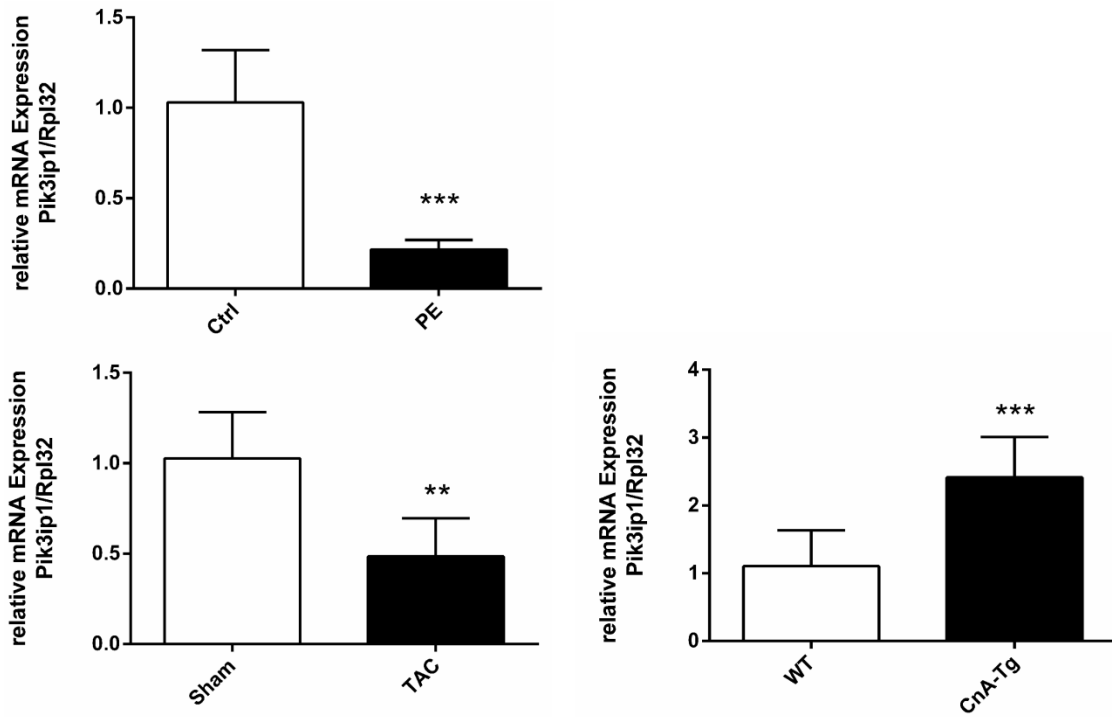
B



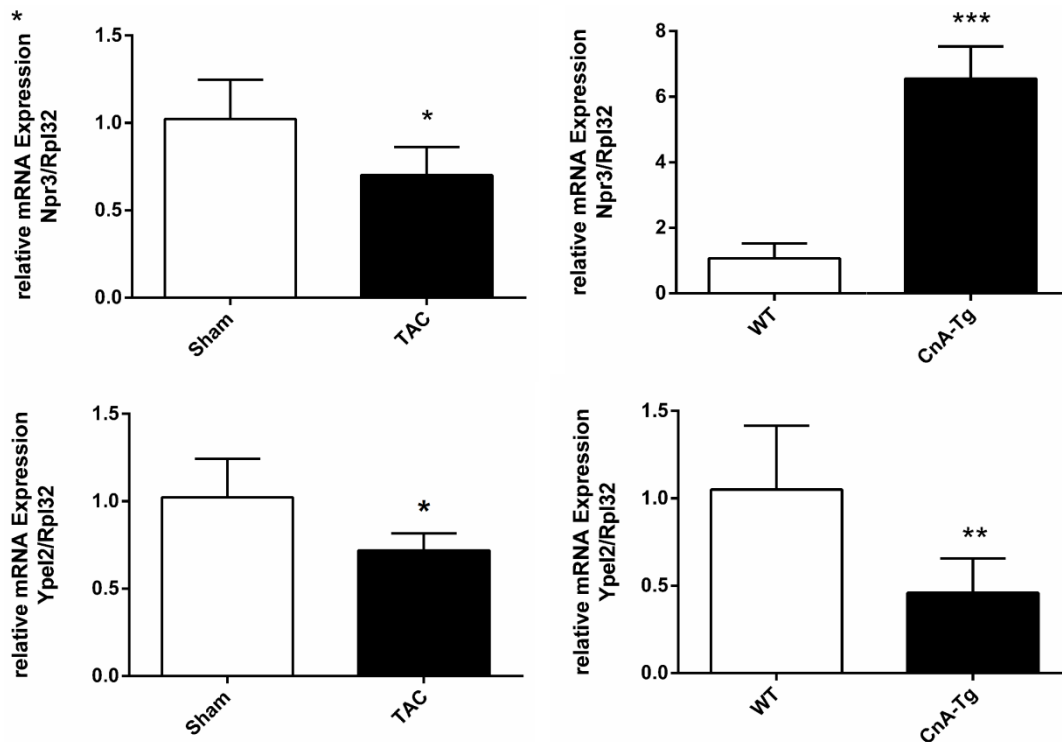
C



D



E



**Abbildung 7:** qRT-PCR-Screening der im HCM-Array regulierten Gene in verschiedenen Hypertrophie-Modellen (Stretch, PE, TAC, CnA-Tg). A: *Mturn*, B: *Sfrp1*, C: *Smoc2*, D: *Pik3ip1*, E: *Npr3*, *Ypel2*. Es bestätigt sich in nahezu allen Modellen eine signifikant regulierte Expression der untersuchten Gene. *Smoc2*, *Npr3* und *Pik3ip1* zeigen eine gegenläufige Regulation mit Induktion im Calcineurin-Modell.

n = 6 für CnA-Tg und TAC, n = 3 für PE und Stretch. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001

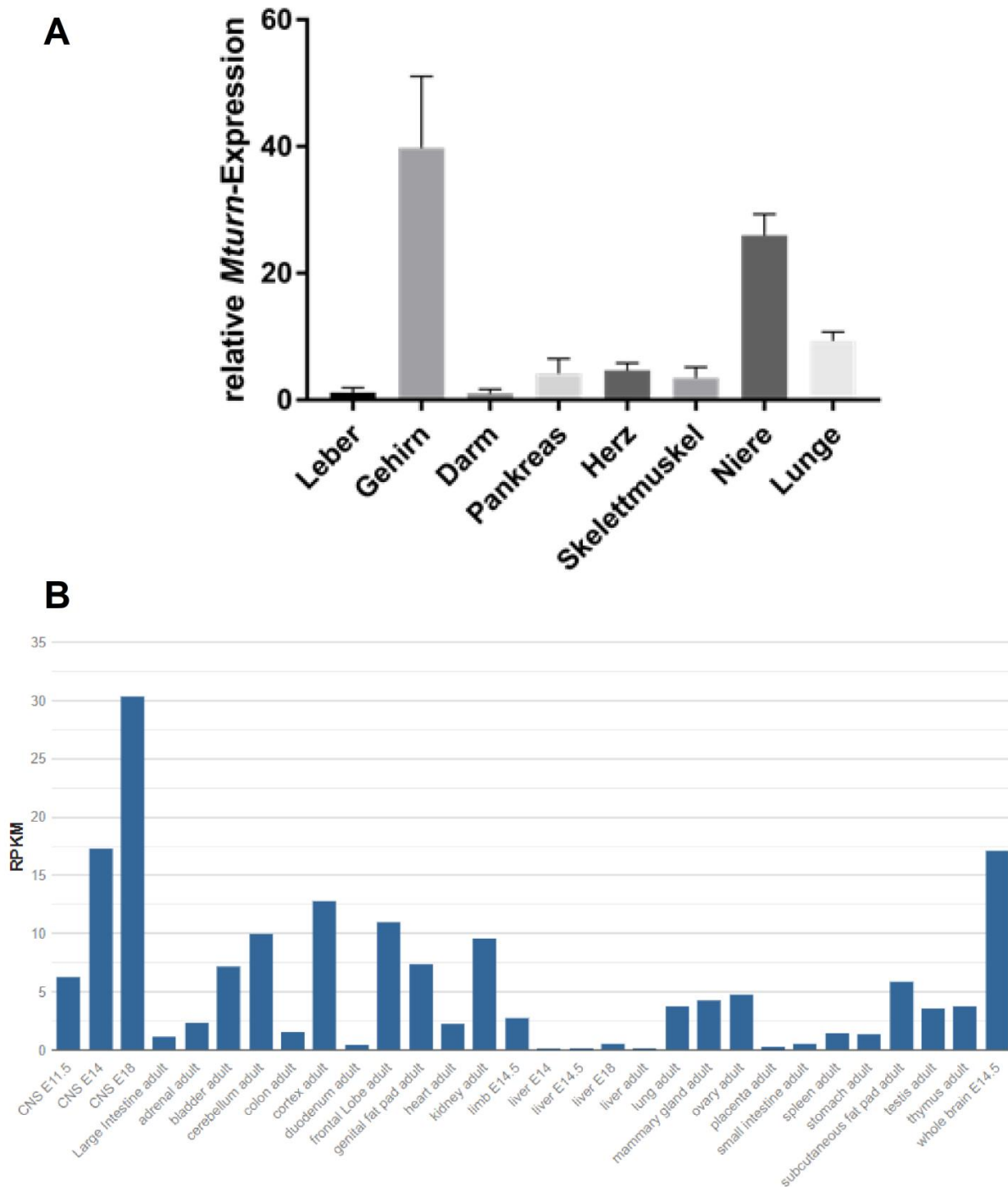
### 3.4 Expression von Maturin in adulten Mausgeweben

Um die gewebespezifische Expression von Maturin nachweisen zu können, verwendeten wir eine Multi-Tissue-qPCR. Hierzu verwendeten wir Proben aus Leber, Gehirn, Darm, Pankreas, Herz, Skelettmuskel, Niere und Lunge. Die Proben entstammten gesunden Wildtypmäusen (Alter: 8 Wochen). Es zeigte sich ein deutlich erhöhtes relatives Expressionslevel des Gens in Gehirn und Niere, jedoch keine spezifische Expression in Herz- und Skelettmuskel (Abb. 8A). Die Ergebnisse decken sich mit *in-silico*-Daten aus murinen Transkriptomanalysen, welche der Online-Datenbank NCBI-Gene entnommen sind (Abb. 8B).

### **3.5 Die adenovirale Überexpression von Maturin induziert Hypertrophie *in vitro***

Zur Überexpression von Maturin wurde ein spezifischer Adenovirus generiert. Bereits in der zunächst gewonnenen Dosis-Kurve zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt auf die Maturinexpression, welcher sich durch Applikation geringer Viruskonzentrationen erzeugen ließ (Abb. 9A). Die Überexpression von Maturin ließ sich auch auf Proteinebene spezifisch darstellen (Abb. 9B). Allerdings war es nicht möglich, native Proteinbanden im Western-Blot sichtbar zu machen.

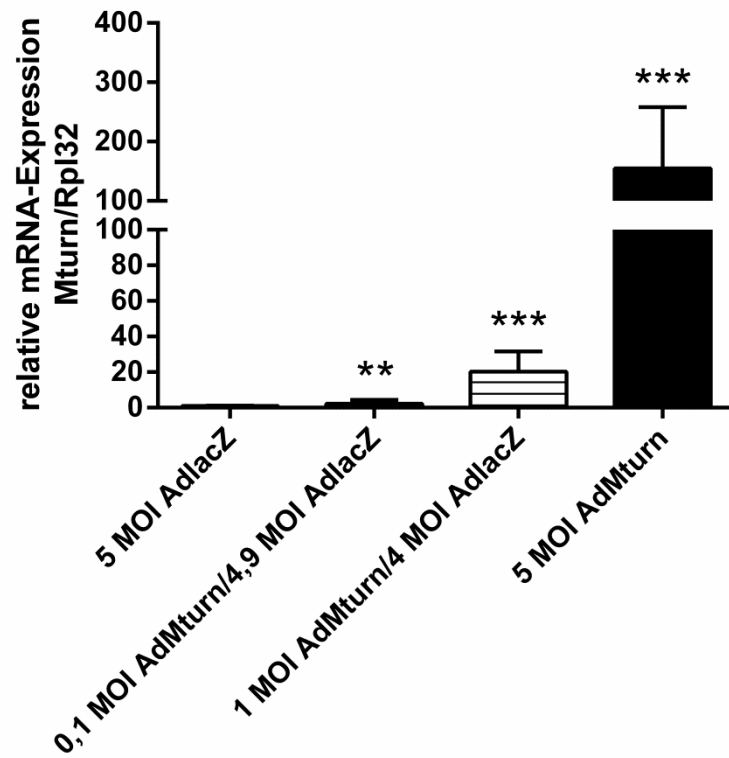
Die Überexpression von *Mturn* führte zu einer signifikanten und reproduzierbaren Induktion des hypertrophen Genprogrammes (Abb. 10A). Und auch phänotypisch konnte über die Zellgrößenvermessung mit AdMturn infizierter NRVCN ein hypertropher Effekt nachgewiesen werden (Abb. 10B).



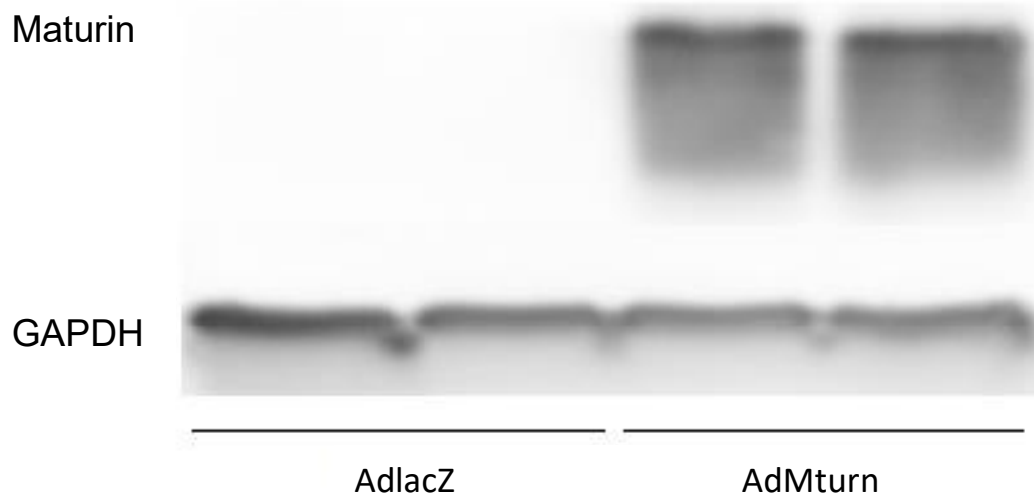
**Abbildung 8: Multi-Organ-qRT-PCR und organspezifische Expression des *Mturn*-Gens.** Eigene, aus adulten Mausgeweben gewonnene Proben (**A**) wurden mit *in-silico*-Transkriptomdaten aus dem murinen ENCODE-Projekt (**B**) verglichen. Die höchsten Expressionslevel des Gens liegen bei beiden Auswertungen im zentralen Nervensystem. Herz- und Skelettmuskel zeigen dagegen ein vergleichsweise geringes Expressionsniveau.

n=5; Haushaltsgen: *Rpl32*. RPKM = reads per kilobase per million reads placed; Quelle: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/68235/?report=expression>

A



B

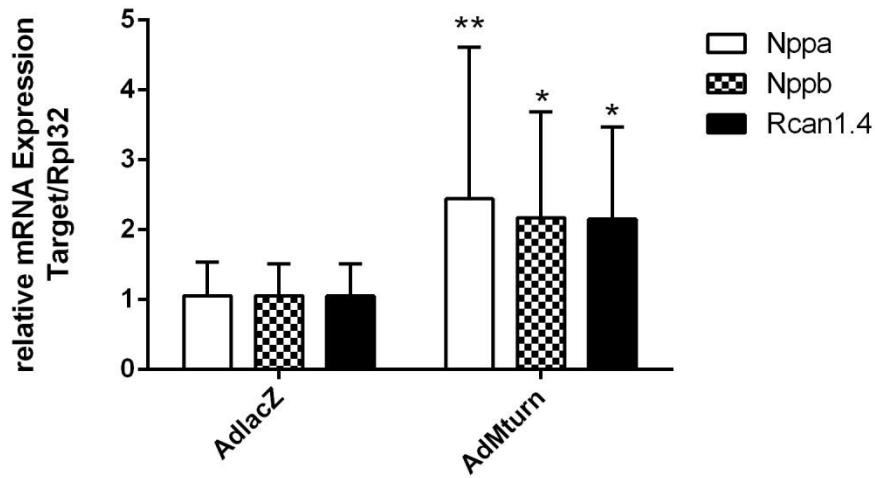


**Abbildung 9: Überexpression von Maturin mittels Adenovirus.**

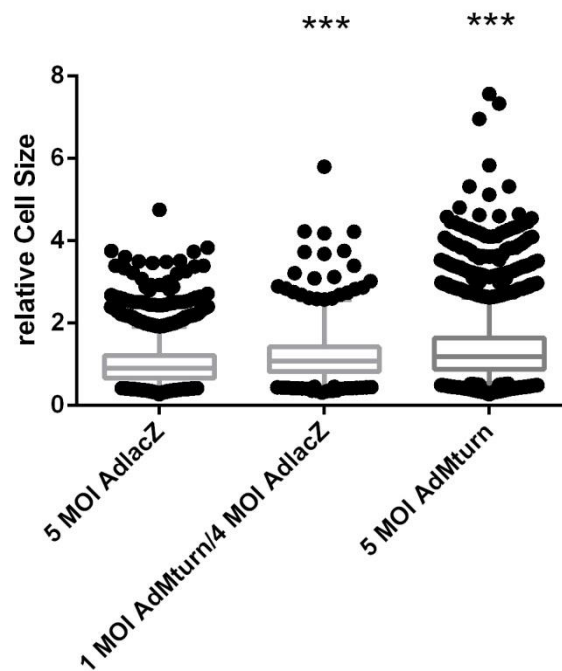
**A:** Die Infektion von NRVCN mit dem AdMturn-Virus induziert die Expression von *Mturn* dosisabhängig. n = 3 **B:** Im Western-Blot zeigt sich nach AdMturn-Infektion auch eine verstärkte Expression von Maturin auf Proteinebene. n = 3

\*\* : p<0,01, \*\*\*p<0,001

A



B



### Abbildung 10: Adenovirale Überexpression von Maturin induziert Hypertrophie *in vitro*.

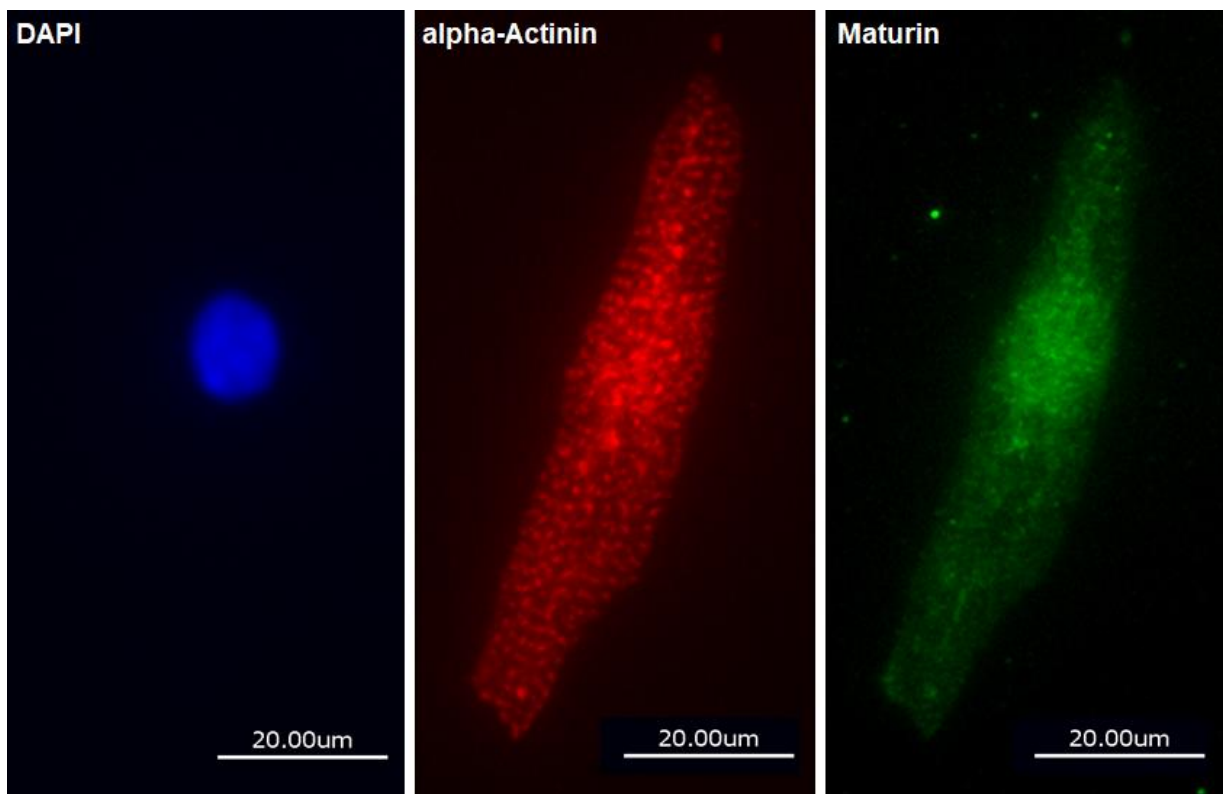
**A:** *Mturn*-Überexpression führt zu einer signifikanten Induktion des fetalen Genprogrammes in NRVCs (*Nppa*: 2,44-fach  $\pm$  2,17,  $p = 0,006$ ; *Nppb*: 2,17-fach  $\pm$  1,52,  $p = 0,028$ ; *Rcan1.4*: 2,16-fach  $\pm$  1,32,  $p = 0,017$ ;  $n = 4$ ; jeweils vs. Kontrolle mit AdlacZ). **B:** Mittels immunocytochemischer Anfärbung und computergestützter Zellgrößenvermessung stellt sich eine Zunahme der Größe von NRVCs nach Infektion mit dem AdMturn-Virus dar (1 MOI AdMturn: 1,22-fach  $\pm$  0,66,  $p < 0,001$ ; 5 MOI AdMturn: 1,34-fach,  $\pm$  0,69,  $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ; jeweils vs. Kontrolle mit AdlacZ).

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

### 3.6 Maturin zeigt eine Ko-Lokalisation mit Markerproteinen des Endoplasmatischen Retikulums

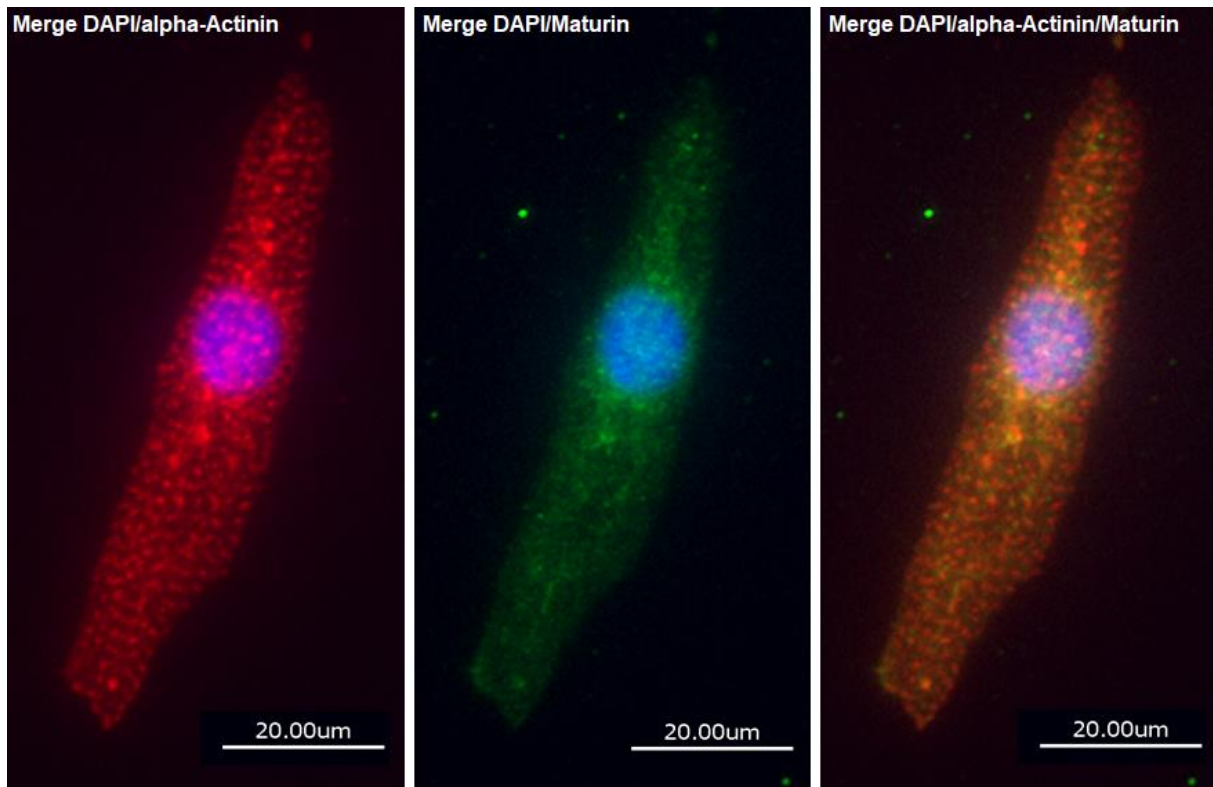
Zur weiteren Charakterisierung von Maturin untersuchten wir mittels Immunocytochemie und Fluoreszenzmikroskopie in Ratten-Kardiomyozyten die intrazelluläre Lokalisation des Proteins. Dabei wurden spezifische Färbungen für den Zellkern (DAPI), das endoplasmatische Retikulum (GRP78), das Sarkomer ( $\alpha$ -Actinin) sowie Maturin angefertigt. In Abb. 11A und 11B ist neben dem muskelspezifischen Marker  $\alpha$ -Actinin ein Fluoreszenzsignal v.a. perinukleär erkennbar, was auf eine Anreicherung von Maturin im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums hindeutet. Es besteht hier zudem eine farbliche Deckung nach Co-Färbung mit dem ER-Chaperon GRP78, wie in Abb. 11C dargestellt.

A

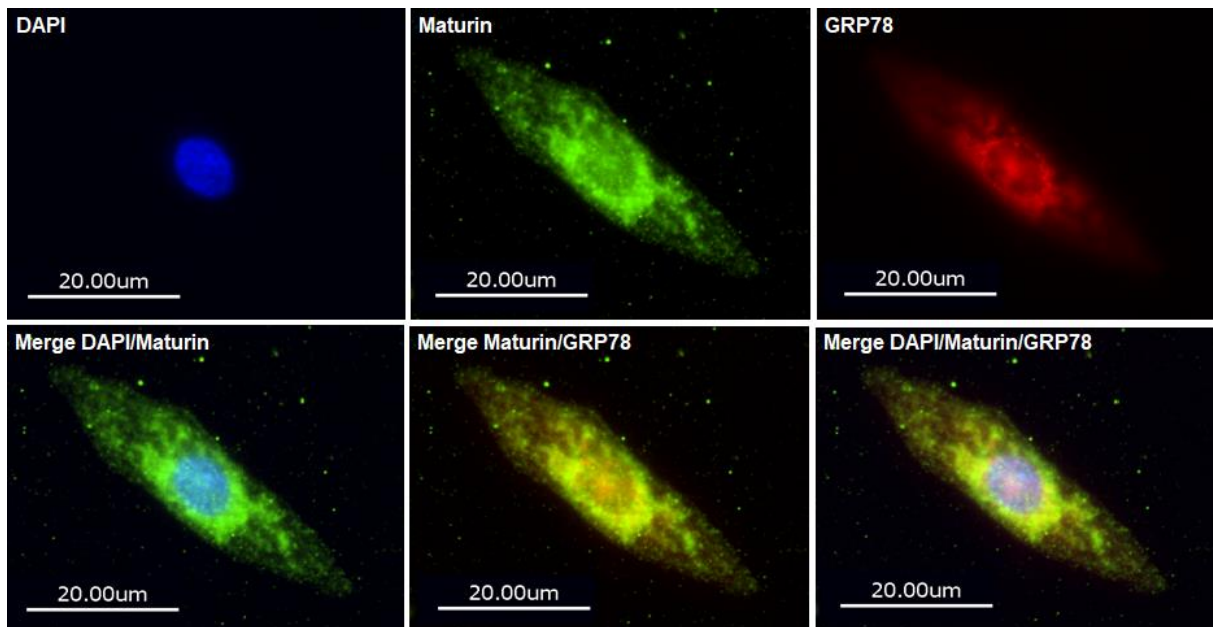




B



C

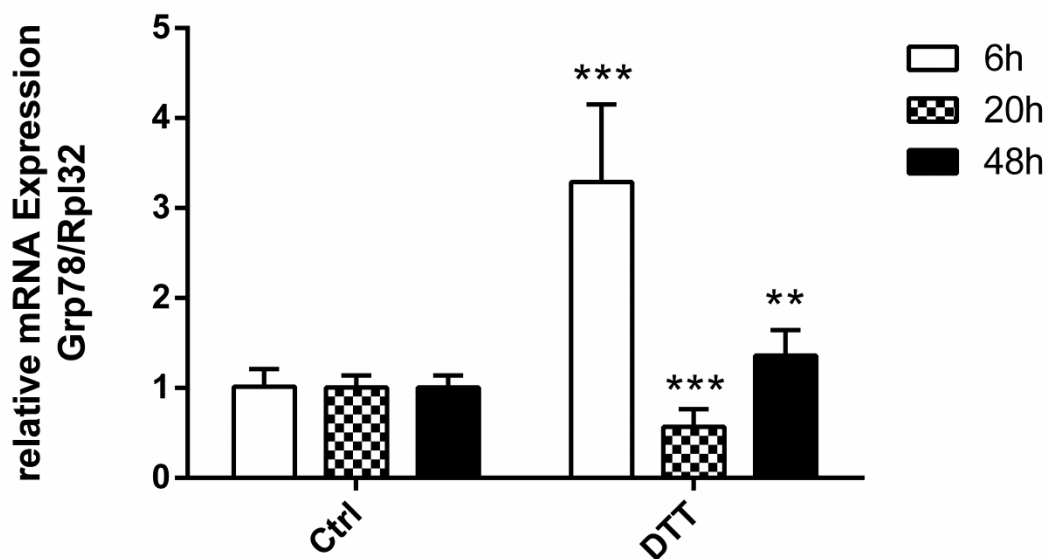


**Abbildung 11: Immuncytochemische Detektion von MTURN und Co-Lokalisation mit verschiedenen Strukturproteinen des ER.** Insbesondere in **C** zeigt sich um den Nucleus eine Signalverstärkung, welche sich zum großen Teil mit GRP78 deckt und dem Bereich des Endoplasmatischen Retikulums zu entsprechen scheint.

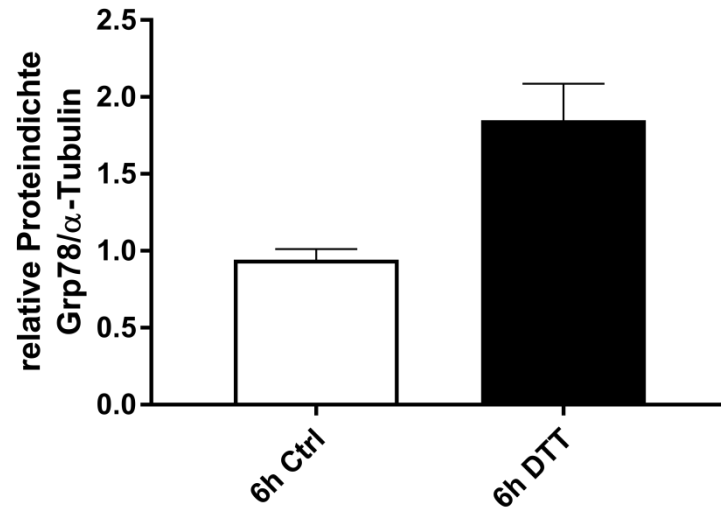
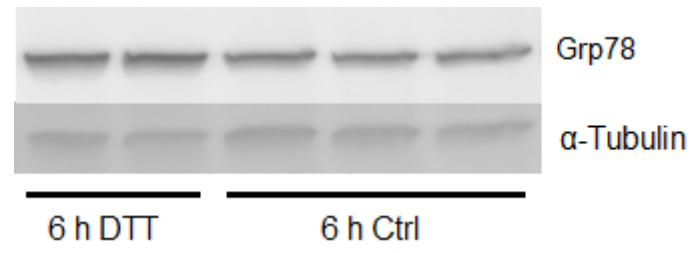
### 3.7 Induktion von ER-Stress durch Behandlung von Rattenkardio-myozyten mit DTT führt zu verstärkter Expression von Maturin

Aufgrund der Ergebnisse der immunocytochemischen Experimente stellten wir die Hypothese einer Beteiligung von Maturin an Signalwegen des endoplasmatischen Retikulums auf. Um dieser weiter nachzugehen, analysierten wir nach Induktion von ER-Stress mit Dithiothreitol die Expression von bekannten UPR-Genen sowie von Maturin. *Grp78* und *Atf6* zeigten sich nach 6 h DTT-Stress deutlich induziert. Für GRP78 wiesen wir diese Induktion auch auf Proteinebene nach (Abb. 12A, B, C). Die Analyse der *Mturn*-Expression zeigte einen starken Anstieg nach 20 h DTT-Stress, während nach 48 h eine abnehmende Tendenz zu erkennen war (Abb. 12D). Die adenovirale Überexpression von Maturin führte schließlich nicht zur Induktion von ER-Marker-Transkripten (Abb. 12E).

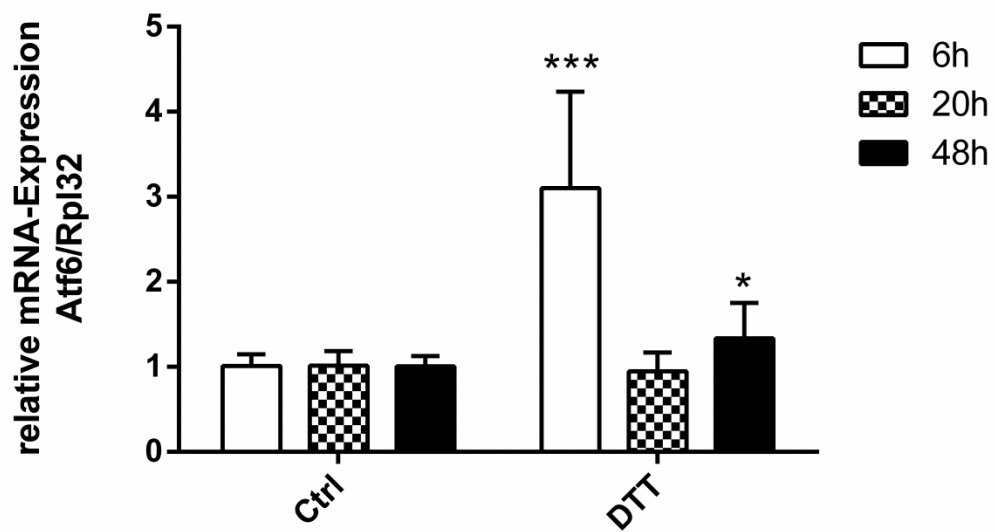
A



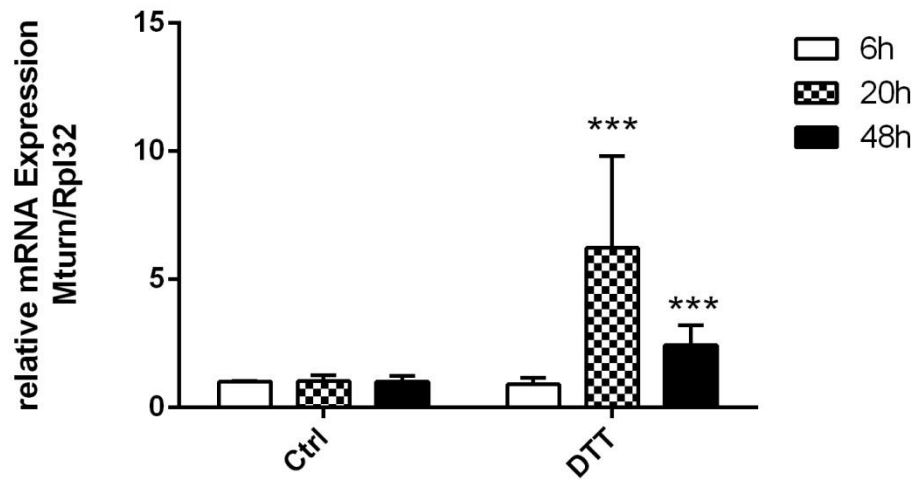
B



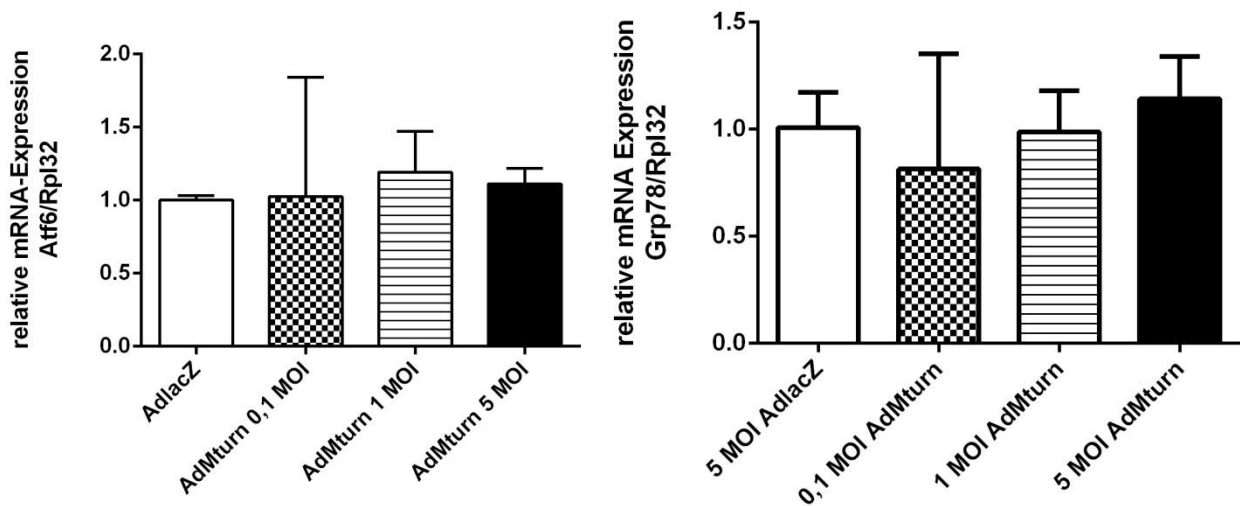
C



D



E



**Abbildung 12: Erhöhung der *Mturn*-Expression durch DTT-induzierten ER-Stress.** Nach 6-stündiger Inkubation mit Dithiothreitol zeigt sich eine Induktion von *Grp78* (A, B) und *Atf6* (C). Die Expression von Maturin ist mit einer Latenz von 20 h ebenfalls signifikant induziert (6,24-fach  $\pm$  3,58 vs. Kontrolle,  $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ) (D). Nach 48-stündigem Stress nimmt dieser Effekt ab (2,44-fach  $\pm$  0,78 vs. Kontrolle,  $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ). Die Überexpression von Maturin führt zu keiner relevanten Expressionsänderung von *Atf6* und *Grp78* (E) ( $n = 1$ ).

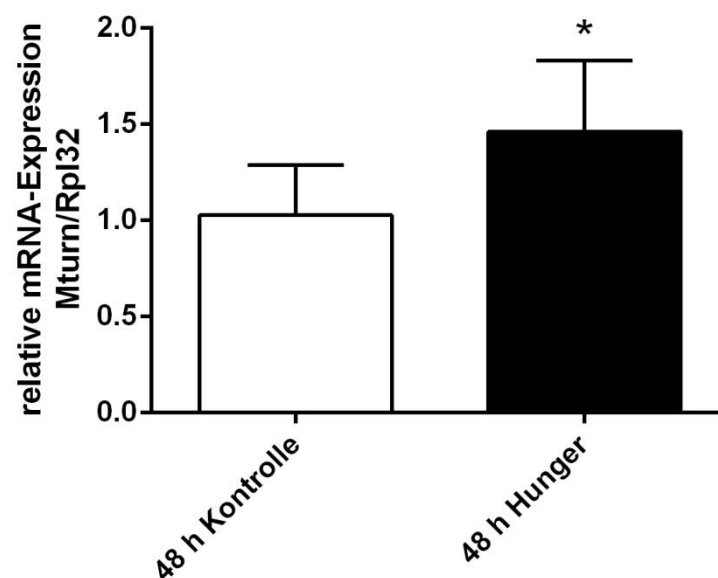
\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ;  $n = 3$

### 3.8 Die Expression von Maturin wird im Hungermodell induziert

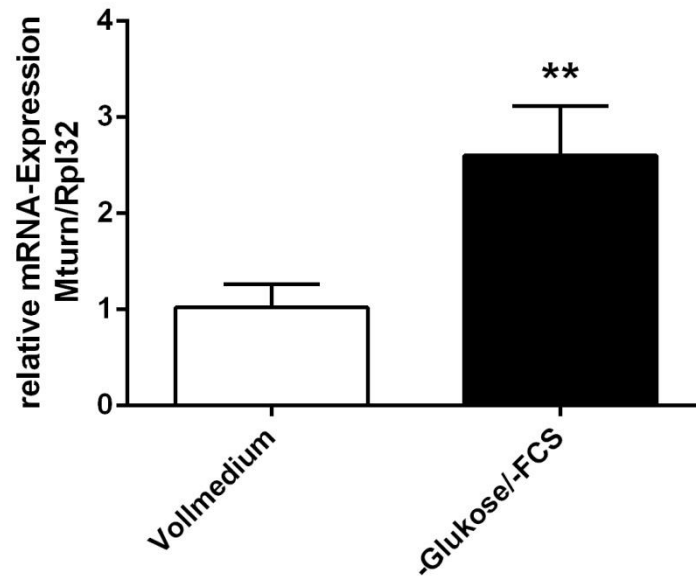
Um weitere Hinweise auf die beteiligten Mechanismen des Proteins Maturin zu erhalten, untersuchten wir dessen Expression in Hungermodellen. Prozesse des ER-Stress und der Autophagie sind, wie bereits in der Einleitung erwähnt, eng verzahnt. Die Expression von Maturin zeigte sich am Ende einer vierstündigen Nährstoffdepletion in NRVCN signifikant induziert. (Abb. 13A). Analog zu diesen Ergebnissen war die Transkription von Maturin auch in den Herzen zuvor 48 Stunden hungernder Mäuse statistisch signifikant erhöht (Abb. 13B).

Schließlich wurde der Effekt einer experimentell inhibierten Autophagie auf die *Mturn*-Expression in *Fyco1*-Knockoutmäusen getestet. Das Protein FYCO1 bindet Autophagosomen an Mikrotubuli der Zelle und ermöglicht so deren Transport (Pankiv et al., 2010). Mithilfe des *Fyco1*-Knockout wird der Vesikeltransport entlang der Mikrotubuli gehemmt. Diese Experimente ergaben jedoch keine relevante Regulation.

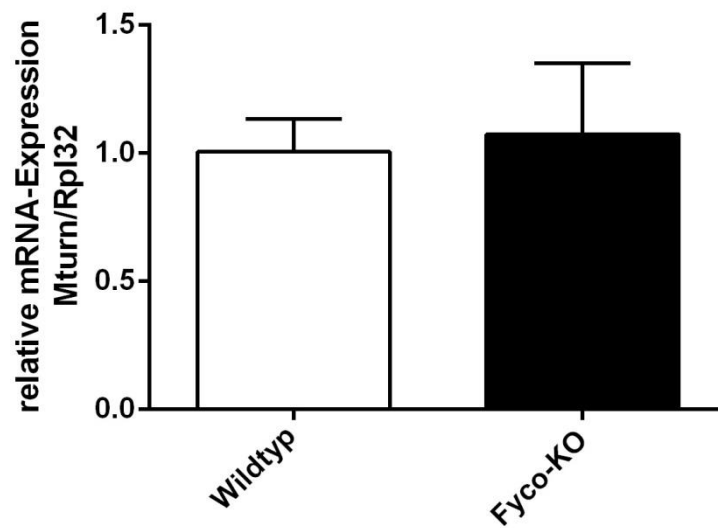
A



B



C



**Abbildung 13: Maturin wird im Hungerzustand verstärkt exprimiert.** Die Expression von Maturin ist sowohl *in vitro* in NRVCM (A: 2,69-fach  $\pm$  0,47 vs. Kontrolle mit nährstoffhaltigem Medium,  $p < 0,001$ ,  $n=3$ ), als auch *in vivo* in Mauserherzen (B: 1,46-fach  $\pm$  0,34 vs. Kontrolle,  $p = 0,041$ ,  $n=6$ ) im Hungermodell verstärkt. Im *fyco1*-KO-Modell, in welchem autophagische Prozesse inhibiert werden, zeigt sich die Expression hingegen unverändert (C).

\*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

## 4 Diskussion

Kardiale Hypertrophie als Reaktion auf biomechanische Stressfaktoren bewirkt eine vorübergehende Normalisierung der Wandspannung und eine Konservierung der Pumpfunktion. Bei persistierender Überbelastung kommt es jedoch zur Dekompensation mit Entwicklung einer Herzinsuffizienz (You et al., 2017). Molekulare Mechanismen der Hypertrophie sind vielfältig und werden insbesondere durch neurohumorale Faktoren des autonomen Nervensystems aktiviert (Frey & Olson, 2003). Ist eine Verdickung des Herzmuskels nicht durch eine mechanische Überbeanspruchung erklärbar, so spricht man von Hypertropher Kardiomyopathie (HCM) (Elliott et al., 2014). Die intrazellulären Vorgänge im Rahmen dieser häufig genetisch bedingten Erkrankung ähneln dabei zum Teil der reaktiven Hypertrophie. Die komplexe Pathophysiologie der HCM ist jedoch noch nicht hinreichend verstanden. Da es interindividuell starke Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung und damit auch der Symptomatik und der Prognose gibt, werden Modifier-Gene vermutet, welche Entstehung und Progress der Erkrankung beeinflussen (Marian & Braunwald, 2017). Ziel dieser Arbeit war es, in einem Bedside-to-Bench-Ansatz aus bestehenden Microarraydaten aus humanen Herzproben der HCM neue Modifikatoren der Hypertrophie zu identifizieren, ihre differentielle Regulation in unterschiedlichen Hypertrophie-Modellen zu prüfen und ihre funktionelle Rolle näher zu beleuchten.

### 4.1 Identifikation neuer Transkripte *in silico* aus Transkriptionsanalysen der Hypertrophen Kardiomyopathie

Die HCM ist eine in der Mehrzahl der Fälle genetisch bedingte Erkrankung (Elliott et al., 2014). Mit neuen gentechnologischen Methoden sind systematische Sequenzierungen des Genoms von Patienten mit unterschiedlichsten Krankheitsbildern möglich. Diese können allerdings häufig nur bestimmte DNA-Mutationen mit dem gehäuftem Auftreten der Erkrankung assoziieren. Die Erkrankung muss jedoch nicht in jedem Individuum, insbesondere nicht mit gleicher Penetranz, zur Ausprägung kommen.

Das *Exome Aggregation Consortium* (ExAc) erbrachte eine Prävalenz HCM-assoziiierter genetischer Varianten von 12 % im Testkollektiv, was die Häufigkeit der Manifestation der Erkrankung jedoch bei weitem übersteigt (Walsh et al., 2017).

Transkriptionsanalysen aus Proben tatsächlich erkrankter Personen sind zwar aufwendig, bilden in einer ausreichend hohen Probandenzahl die genetischen Veränderungen im Rahmen der jeweiligen Erkrankung jedoch gut ab. Als Transkriptom wird die Gesamtheit aller mRNA-Transkripte innerhalb einer Spezies bzw. eines spezifischen Zelltyps verstanden (Ren et al., 2016). Im Kontext der HCM existieren nur wenige solcher Transkriptionsanalysen, insbesondere aus humanen Proben. In *Mybpc3*-Knockoutmäusen, welche einen HCM-Phänotyp zeigten, ergaben sich Hinweise, dass insbesondere Signalwege der Extrazellulärmatrix sowie eine frühe Dysregulation von Kaliumkanälen für die Entstehung der pathologischen Hypertrophie relevant sind (Farrell et al. 2018). In einer kleinen Studie in 7 HCM-Patienten wurden über 1.400 differentiell exprimierte *long non-coding RNAs* (lncRNAs) nachgewiesen, welche einen modulierenden Einfluss auf mehrere pathologische Signalkaskaden zu haben schienen (Yang et al., 2015). In einer weiteren Publikation wurde, in einem zu der vorliegenden Arbeit ähnlichen Ansatz, das Transkriptom von 6 HCM-Patienten im Vergleich zu 6 herzgesunden Kontrollen untersucht, wobei über 250 differentiell exprimierte Gene identifiziert und ein Teil hiervon mittels qRT-PCR validiert werden konnte. Die funktionelle Relevanz dieser Transkripte wurde jedoch nicht im experimentellen Rahmen geprüft (Ren et al., 2016).

In einem ersten Schritt filterten wir systematisch den zu dieser Zeit größten verfügbaren Transkriptomdatensatz der HCM mit über 8.000 differentiell regulierten Transkripten aus der Online-Datenbank *GEO* (*Gene Expression Omnibus*) heraus und untersuchten diesen näher. Da eine Proteomanalyse der HCM als eigentlicher Goldstandard nicht vorliegt, wurde ein RNA-Ansatz gewählt. Dieser bedeutet gegenüber einem proteomischen Ansatz zwar gewisse Limitationen, er weist jedoch auch einige Vorteile auf. So ist er mit geringeren Kosten, einem geringeren technischen Aufwand sowie einer einfacheren Auswertung der gewonnenen Daten verbunden. Zudem kann eine Untersuchung auf RNA-Ebene auch relevante Veränderungen der Genexpression erkennen, welche sich nicht direkt auf die Proteinexpression auswirken. Post-translationale Regulation, alternatives Splicen, Phosphorylierung oder Ubiquitylierung werden von diesem Verfahren hingegen nicht berücksichtigt.

Aufgrund der sehr großen Datenmenge nahmen wir eine computergestützte Auswertung vor und ergänzten diese um eine systematische Literaturrecherche in der



Online-Datenbank *PubMed*. Hierbei wurden die Gesamtzahl der zu dem jeweiligen Protein veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten sowie spezifischer die Publikationen im Kontext kardialer Erkrankungen erfasst. Ziel war es, als Erweiterung zu dem Ansatz von Ren et al., nicht nur stark regulierte, sondern auch bisher in der Literatur im Kontext der Hypertrophie und HCM möglichst noch nicht beschriebene Kandidatengene zu finden. Das Ergebnis war eine Liste von 12 Genen, welche eine mindestens 2-fache Überexpression im HCM-Kollektiv zeigten. *Sfrp1* (*Secreted frizzled-related protein 1*) und *Frzb* (*Frizzled related protein*) waren mit 14 respektive 10 Publikationen im kardiologischen Kontext die bekanntesten Kandidaten. Daneben wurden jedoch auch unbeschriebene Gene wie *Yippee-like 2* (*Ypel2*), *Pik3-interacting protein 1* (*Pik3ip1*) oder *Leucine-rich repeat containing 49* (*Lrrc49*) aufgenommen.

Die Relevanz der auf diesem Wege identifizierten Gene für die Pathophysiologie von kardialer Hypertrophie wird durch die Publikationen neuer wissenschaftlicher Arbeiten gestützt. So wurde *Pik3ip1* nach Beginn der Experimente zu dieser Dissertation als Aktivator des Phosphatidylinositol-1,4,5-Kinase/Akt/mTOR-Signalweges beschrieben und eine Zunahme von Proteinsynthese und Zellgröße durch Knockdown von *Pik3ip1* in NRVCN nachgewiesen (Song et al., 2015). Ein Knockdown von *Npr3* führte in *in-vivo*-Experimenten zu einer Zunahme der zirkulatorischen ANF-Konzentration sowie zu reduziertem oxidativen Stress und somit zu einer Milderung von  $\beta$ -Adrenorezeptor-vermittelter kardialer Hypertrophie (Venkatesan et al., 2016). Schließlich wurde in Mäusen nach *Sfrp1*-Deletion eine altersabhängige Entstehung ventrikulärer Dilatation und Hypertrophie sowie ausgeprägter kardialer Fibrose beobachtet (Sklepkiwicz et al., 2015). Im Gegenzug erholte sich die ventrikuläre Funktion durch Überexpression von *Sfrp1* in Mäusen nach transverser Aortenkonstriktion. Die Autoren beschrieben eine inhibitorische Wirkung des Proteins auf die myokardiale Apoptose durch Hemmung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (Pan et al., 2018).

Durch quantitative Realtime-PCR konnten wir im Anschluss an das Screening die differentielle Regulation nahezu aller ausgewählten Zielgene bestätigen. Hierfür verwendeten wir vier in der experimentellen Forschung etablierte Modellsysteme, welche *in vitro* sowie *in vivo* eine zuverlässige Induktion von Hypertrophie ermöglichen. Solche Modelle können helfen, insbesondere funktionelle Aspekte auf kardiomyozytärer Ebene zu untersuchen. Als speziell aufgearbeitete Zellreihen können sie jedoch nicht uneingeschränkt stellvertretend für den Gesamtorganismus

stehen. Dies erklärt womöglich auch die auffällig unterschiedliche Regulation einzelner Gene zwischen Modell und Transkriptom. So waren die gewählten Kandidatengene zwar im Microarray signifikant induziert, in unseren Hypertrophie-Modellen jedoch zum Teil reproduzierbar herabreguliert. *Npr3*, *pik3ip1* sowie *smoc2* wiesen zudem eine solche Herabregulation in nur 3 der 4 Modelle auf, im Calcineurin-transgenen Modell zeigten sie jedoch eine Induktion. Dies ist möglicherweise auch auf eine direkte induzierende Wirkung von Calcineurin auf die Transkription dieser Gene zurückzuführen, welche das Ergebnis verzerrt.

Zusammenfassend korrelierten wir das Expressionsniveau ausgewählter Zielgene aus der seinerzeit größten verfügbaren humanen Transkriptomanalyse mit cDNA-Proben aus unterschiedlichen experimentellen Hypertrophie-Modellen und gewannen hieraus neue Kandidatengene, welche in der Pathophysiologie der Hypertrophie und Hypertrophen Kardiomyopathie eine bislang unbekannte Rolle spielen könnten.

#### **4.2 Maturin als Protein des Endoplasmatischen Retikulums und als neuer Faktor in der Entstehung der kardialen Hypertrophie**

Maturin (*mturn*, *chromosome 7 open reading frame 41* oder auch *ells1*) war im Myokard-Microarray im HCM-Kollektiv 2,47fach stärker exprimiert als in der gesunden Kontrollpopulation. Im Gegensatz hierzu zeigte es in den qRT-PCR-Experimenten eine zuverlässige Herabregulation in allen Hypertrophie-Modellen mit hoher statistischer Signifikanz. Dieser Effekt ist, wie bereits angedeutet, womöglich Ausdruck der jeweils verschiedenen Ursprungsgewebe und -organismen. Umso wichtiger ist in diesem Fall die weitere Untersuchung der funktionellen Relevanz des Proteins mittels Überexpressionsexperimenten.

Maturin ist bislang im Kontext der kardialen Hypertrophie unbekannt, weshalb es für eine weitere Charakterisierung ausgewählt wurde. Als wichtiger Induktor neuronaler Differenzierung wurde es als Faktor der primären Neurogenese beschrieben. Zwar konnten bislang keine funktionellen Motive des 131 Aminosäuren großen Proteins aufgedeckt werden. Maturin ist jedoch in Wirbeltieren evolutionär hoch konserviert, insbesondere ein 29 Aminosäuren langer Abschnitt, der von den Autoren als Maturin-Motiv bezeichnet wird. Sie kommen zu dem Schluss, dass dieses Motiv für die Funktion des Proteins von größter Bedeutung ist (Martinez-De Luna et al., 2013). Zudem ist das Protein an der Differenzierung von Megakaryozyten beteiligt. Es konnte

gezeigt werden, dass Maturin – wahrscheinlich durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes in seiner Peptidkette – die JNK- und MAPK/ERK-Signalwege stimuliert. Daneben wird es durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B induziert und bewirkt über eine negative Feedbackschleife eine Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs (Sun et al., 2014).

Vor dem Hintergrund, dass MAP-Kinasen in der Entstehung der Hypertrophie eine tragende Rolle spielen, ergeben sich Verbindungen zu den Ergebnissen der adenoviralen Überexpression von Maturin. Hierbei zeigten wir zum einen eine signifikante Induktion des fetalen Genprogrammes in NRVCM. Insbesondere konnten wir aber phänotypisch einen pro-hypertrophen Effekt nachweisen. Die Zunahme der Zellgröße der Kardiomyozyten nimmt eine entscheidende Bedeutung für die Definition von Hypertrophie ein (Dorn, Robbins & Sugden, 2003). Die Überexpression von Maturin führte zu einer signifikanten und relevanten Größenzunahme der Herzmuskelzellen und bewirkte somit eine klare Induktion von Hypertrophie. Eine Wirkung durch Stimulation des MAPK/ERK-Signalweges ist hierbei denkbar. Zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese wäre ein *in-vivo*-Experiment ein nächster Schritt. Hierdurch könnten die Effekte einer Überexpression von Maturin auf das Herz und den Gesamtorganismus analysiert und weitere Beiträge zur funktionellen Einordnung des Proteins geleistet werden. Außerdem sollten *loss-of-function*-Experimente durchgeführt werden. Aufgrund der geringen nativen Expression von Maturin erschien eine Überexpression zunächst erfolgsversprechender und wurde daher primär verfolgt.

```

Xenopus laevis  M D F Q Q L A D V A D K W C S N T P F D L I A T E E T - E R R M D F Y A D P G V S F Y V L C P E S G 49
Homo sapiens   . . . . . E . . . . . E . . . . . - . . . . . D N . 49
Mus musculus   . . . . . E . . . . . S . . . . . A . . . . . D N . 49
Gallus gallus  . A . E A . . E A . E R . . A R . . Q . . A . . - . . . . . E . . . . . A A 49
Danio rerio    . E . K E . V . A . E . . . . T G N . . . . . F A . D V D . . . . L . . . . . E . . I . . . . . D N L 50

Xenopus laevis  C G - - D H F H V W S E S E D C L P F L Q L A Q D Y I S S C G K K T L H E I L E K V F K S F R P L L 97
Homo sapiens   . . - - N . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . V . . . . . 97
Mus musculus   . . - - S . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . V . . . . . 97
Gallus gallus  . . - - N . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . L . V . D . . . R . . . . . 97
Danio rerio    T . G T . N . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . L . V . D . . . R . . . . . 100

Xenopus laevis  G L P D V D D T F E E Y N A D V E E E P E A D H Q Q M G V S Q Q 131
Homo sapiens   . . . . A . . . . A . . . . S . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . P . . . . . 131
Mus musculus   . . . . A . . . . A . . . . S . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . P . . . . . 131
Gallus gallus  . . . . . . . . . A . . . . . . . . . M . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 131
Danio rerio    . . . . I . . . . . D Q . H . . . . . - . . . . . P . . . . . . . . . . . . . . . . 133

```

**Abbildung 14: Aminosäuresequenz von Maturin.** Die 131 Aminosäuren lange Peptidkette von Maturin weist eine hohe evolutionäre Konservierung auf. Die Sequenz unter dem roten Balken entspricht dem 29 Aminosäuren langen funktionellen „Maturin-Motiv“.  
(Martinez-De Luna et al. 2013)

In der Analyse der gewebespezifischen Expression des Gens zeigte sich Maturin ubiquitär exprimiert, mit einer Anreicherung insbesondere in Gehirn und Nieren. Diese Ergebnisse decken sich mit dem zu Maturin publizierten Multi-Organ-Blot (Sun et al., 2014). Die vermehrte Expression im Gehirn ist zur Funktion des Proteins in der Neurogenese passend (Martinez-De Luna et al., 2013).

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation verwendeten wir einen immunocytochemischen Ansatz mit spezifischer Anfärbung von Maturin mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper. Die perinukleäre Anreicherung des Signals in der Fluoreszenzmikroskopie zusammen mit der Überlagerung mit dem ER-Protein GRP78 deutet auf eine Lokalisation von Maturin im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums hin. Allerdings ist anzumerken, dass sich die Signale der beiden Proteine nicht vollständig überschneiden. Maturin dehnt sich über die durch GRP78 definierten Grenzen hinaus aus. Zum genaueren Nachweis einer Beteiligung von Maturin an den komplexen Abläufen des ER sollten daher komplementäre Untersuchungen, zum Beispiel eine spezifische Isolation des ER oder eine Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit ER-Proteinen erfolgen.

Im Folgenden wurde die Hypothese verfolgt, dass Maturin als ER-Protein auch an ER-spezifischen Signalwegen beteiligt ist. Daraufhin führten wir ER-Stress-Experimente durch. Zur Auslösung von ER-Stress und *Unfolded Protein Response* diente die Anwendung von Dithiothreitol (DTT), welches über eine Reduzierung von Disulfidbrücken die Tertiärstruktur der Proteine stört und somit zu deren Fehlfaltung führt.

Da hiervon jedoch auch neu synthetisierte Proteine beispielsweise des Zytosols oder im Bereich der Ribosomen betroffen sind, ist dieser Effekt nicht spezifisch für ER-Stress. Neben DTT sind weitere, zum Teil spezifischere pharmakologische Induktoren von ER-Stress bekannt, wie Tunicamycin, Thapsigargin, Brefedin A oder MG132 (Osłowski & Urano, 2011). DTT ist jedoch in Laboren ubiquitär verfügbar und einfach zu handhaben. Zum Monitoring der UPR dienen die zentralen ER-Stressgene *Grp78* und *Atf6*. GRP78 ist als zentraler Regulator des ER-Stress-Mechanismus bekannt, besitzt anti-apoptotische Funktionen und kann die Aktivierung weiterer wichtiger transmembranärer ER-Stress-Sensoren wie IRE1, PERK und ATF6 kontrollieren (Lee, 2005).

Die Induktion der UPR durch DTT war verlässlich reproduzierbar und der Effekt auf die Expression der ER-Stress-Sensoren hochsignifikant. Und auch Maturin stellte sich nach 20-stündiger Inkubation mit Dithiothreitol deutlich induziert dar. In der Literatur finden sich Erklärungsansätze hierfür. So wurde in der Promotorsequenz von humanem *C7orf41* ein ERSE-9-Motiv identifiziert (Misiewicz et al., 2013). Dieses Motiv wird durch die Sequenz CCAAT-N9-CCACG (N9 = 9 beliebige Basenpaare) gebildet und wird durch den Transkriptionsfaktor Atf6 transaktiviert. Das Vorliegen einer solchen spezifischen Sequenz ist ein klarer Hinweis auf die Verbindung von Maturin mit dem ER-Stress-Mechanismus. Allerdings ist einschränkend anzumerken, dass eigene Bemühungen, das ERSE-9-Motiv im Maturin-Promotor aufzufinden, nicht erfolgreich waren. Hierfür verwendeten wir die einschlägigen Online-Datenbanken (UCSC, NCBI, Ensembl) und durchsuchten die Promotorsequenz von Maturin 2000 bp vor der 5'-UTR bis 500 bp nach der 3'-UTR. Das genannte Motiv wurde hierbei nicht gefunden.

Eine Hypothese wäre mit Blick auf die Ergebnisse der ER-Stress-Versuche, dass die Expression von *Atf6* durch die mittels DTT ausgelöste Fehlfaltung von Proteinen verstärkt wird und über eine Bindung an dessen ERSE-9-Motiv die Expression von Maturin induziert. Dies würde die zeitlich versetzt ansteigenden Expressionslevel der beiden Gene erklären. Die Hypothese einer Induktion von Maturin durch ER-Stress als pro-hypertrophem Mechanismus steht jedoch im Kontrast zur sinkenden Expression des Gens in den eigenen Hypertrophieexperimenten. Das Ausbleiben einer Veränderung im Expressionslevel von *Atf6* nach *Mturn*-Überexpression lässt außerdem darauf schließen, dass zwischen diesen Genen zumindest kein

Feedbackmechanismus existiert. Ob und welcher Zusammenhang zwischen ihnen besteht, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Einen weiteren Hinweis stellen die Ergebnisse aus den Autophagieexperimenten dar. Sowohl NRVCM, die wenige Stunden in nährstoffreiem Medium gehalten wurden, als auch Kardiomyozyten von Mäusen nach 48-stündigem Nahrungsentzug exprimierten Maturin auf einem signifikant höheren Level, als unter Kontrollbedingungen. Mangel an Nährstoffen ist der stärkste bekannte Auslöser autophagischer Prozesse in der Zelle (Kroemer, Mariño & Levine, 2010). Autophagie wiederum ist an einer Vielzahl kardialer Pathologien beteiligt und spielt auch in der Entstehung von Hypertrophie eine wichtige Rolle (Nemchenko et al., 2011; Rifki & Hill, 2012; Li, Wang & Yang, 2015). Zahlreiche Arbeiten widmen sich darüber hinaus auch der Verbindung zwischen ER-Stress und Autophagie. Es wird dabei allgemein angenommen, dass Autophagie durch ER-Stressproteine aktiviert wird, möglicherweise als alternativer Weg zum ERAD-Mechanismus (Ogata et al., 2006; Yorimitsu & Klionsky, 2008). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Autophagosomen von der Aktivierung der Kinase JNK in der ER-Stress-Phase abhängig ist. Maturin ist, wie in der Literatur bereits beschrieben, ein Aktivator des MAPK/JNK-Signalweges. Dies könnte die verstärkte *Mturn*-Expression als Teil der autophagischen Signalkaskade erklären.

Um einen eventuellen Effekt einer partiellen Inhibition von Autophagie auf die Maturin-Expression zu testen, verwendeten wir kardiale cDNA aus einem *fyco1*<sup>-/-</sup>-Mausmodell. FYCO1 ist im Rahmen dieses Mechanismus am Vesikeltransport entlang von Mikrotubuli beteiligt, wobei es u.a. mit LC3 interagiert (Pankiv et al., 2010). Maturin war in dieser transgenen Mauslinie nicht differentiell reguliert. Möglicherweise spielt das Protein an einer gänzlich anderen Stelle der Autophagie-assoziierten Signalwege eine Rolle und bleibt von der Funktion des mikrotubulären Transports unbeeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit *C7orf41*/Maturin ein im Kontext kardialer Erkrankungen und insbesondere kardialer Hypertrophie gänzlich unbekanntes Gen identifiziert werden konnte, welches unter hypertrophen Bedingungen herabreguliert ist und dessen Überexpression einen pro-hypertrophen Phänotyp bewirkt. Die vorliegende Arbeit zeigt dabei erstmals die intrazelluläre Anreicherung des Proteins im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums und verbindet es mit Prozessen der *Unfolded Protein Response* sowie der Autophagie. Autophagie, ER-Stress und der UPR-Mechanismus werden mit der Entstehung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz

in Verbindung gebracht. Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir erste experimentelle Ergebnisse liefern, die auf eine Beteiligung von Maturin an diesen Prozessen hindeuten. Weitere Experimente sind jedoch erforderlich, um die funktionellen Zusammenhänge näher zu beleuchten.

### **4.3 Das Maturin-Protein besitzt trotz niedrigem Expressionsniveau funktionelle Relevanz**

Eine Limitation der vorliegenden Arbeit ist das Fehlen von Proteindaten. Bei problemloser Überexpression von Maturin, welche mittels spezifischer Bandendarstellung im Western-Blot auch auf Proteinebene dargestellt werden konnte, konnten wir womöglich aufgrund eines niedrigen Expressionsniveaus keinen reliablen Proteinnachweis in nativen NRVCM erbringen. Zum Ausschluss eines methodischen Fehlers wurden mehrere Antikörper verschiedener Hersteller (Sigma-Aldrich, Creative Diagnostics) und Proteinmengen bis 150 µg verwendet. Dies ist angesichts der in der qRT-PCR und den immunocytochemischen Messungen erhobenen Ergebnisse überraschend. Der  $C_t$ -Wert unbehandelter NRVCM und Maus-Kardiomyozyten für Maturin, also der PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen zum ersten Mal signifikant übersteigt und der somit direkte Rückschlüsse auf die Zahl an cDNA-Kopien im Reaktionsvolumen möglich macht, hätte bei einer derart niedrigen Expression ungewöhnlich hoch sein müssen. In unseren Experimenten waren die  $C_t$ -Werte mit 25 - 28 Zyklen jedoch in einem normalen Bereich. Immunocytochemisch ergaben sich bei distinkter Darstellung eines spezifischen Maturinsignals außerdem keine Hinweise auf die Bildung von Proteinaggregaten.

Möglicherweise führen posttranslationale Prozesse in der Zelle trotz eines ausreichend hohen Transkriptionsniveaus zu einer nicht proportionalen Proteinmenge.

In der Literatur liegt dennoch ein Multi-Organ-Western-Blot mithilfe eines eigens generierten Maturin-Antikörpers vor, was zeigt, dass ein Proteinnachweis prinzipiell möglich ist (Sun et al., 2014). Diesbezüglich sollten künftig weitere eigene Versuche unternommen werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind somit zwar zurückhaltend zu interpretieren. Bei eindeutigen funktionellen Ergebnissen der Überexpression und der ER-Stress- und Autophagieexperimente ist die Wirkung von Maturin trotz dieser Einschränkungen

nicht als irrelevant anzusehen. Am Beispiel von *long non-coding RNAs* ist zudem zu demonstrieren, dass auch ein niedriges Expressionsniveau mit einer überaus wichtigen funktionellen Rolle einhergehen kann (Shen et al., 2017).



## 5 Zusammenfassung

Pathologische kardiale Hypertrophie tritt als Anpassungsmechanismus auf anhaltende Überbeanspruchung des Herzmuskels auf und bedeutet für die Betroffenen mittel- und langfristig eine Einschränkung von Belastbarkeit und Lebensqualität sowie eine gesteigerte Mortalität. Zwar sind mittlerweile vielfältige molekulare Mechanismen bekannt, welche das Krankheitsbild verursachen und aggravieren können. Jedoch sind die therapeutischen Möglichkeiten nach wie vor unzureichend. Ziel dieser Arbeit war es daher, in einem „bedside-to-bench“-Ansatz die differentielle Regulation ausgewählter Gene aus einer Microarray-Analyse von humanen HCM-Gewebeproben in experimentellen Hypertrophie-Modellen zu überprüfen und nähere Hinweise auf deren Funktion zu liefern. In diesem Zusammenhang konnten wir *c7orf41/Maturin* identifizieren, welches in Modellversuchen zur Hypertrophie in der Zellkultur und auch *in vivo* signifikant herabreguliert war. Die adenovirale Überexpression von Maturin bewirkt eine Induktion des fetalen hypertrophen Genprogrammes sowie eine Zunahme der Zellgröße von NRVCN. Maturin ist in diesen Zellen perinukleär lokalisiert, was auf eine Anreicherung im Endoplasmatischen Retikulum hindeuten könnte. Analog hierzu konnte die Expression des Gens durch Auslösung von ER-Stress deutlich induziert werden. Überexpression von Maturin führt jedoch zu keiner Veränderung in der Expression der zentralen ER-Stressgene. Weiterhin konnte in Hungerversuchen *in vitro* und *in vivo* eine Induktion von Maturin beobachtet werden, was eine Verbindung zum Prozess der Autophagie vermuten lässt. Sowohl ER-Stress bzw. die *Unfolded Protein Response* als auch die Autophagie sind mittlerweile als möglicherweise bedeutende molekulare Mechanismen an der Entstehung einer Vielzahl kardialer Pathologien, u.a. auch der Hypertrophie, bekannt.

Es konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass Maturin in hypertrophierten Maus- und Rattenkardiomyozyten vermindert exprimiert wird, eine artifizielle Überexpression des Gens jedoch zur Induktion von Hypertrophie führt. Dieser Effekt wird möglicherweise über eine Beteiligung des Maturin-Proteins an ER-Stress und Autophagie hervorgerufen und stellt eine Basis für künftige Forschung zu diesem bislang nur wenig charakterisierten Gen dar.

## 6 Literaturverzeichnis

Akers, W. S. et al. (2000) 'Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(6), pp. 2797-806.

Antos, C. L. et al. (2001) 'Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A', *Circulation Research*, 89, pp. 997–1004. doi: 10.1161/hh2301.100003.

Antos, C. L. et al. (2002) 'Activated glycogen synthase-3 suppresses cardiac hypertrophy in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), pp. 907–12. doi: 10.1073/pnas.231619298.

Barger, P. M. et al. (2000) 'Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-?? during cardiac hypertrophic growth', *Journal of Clinical Investigation*, 105(12), pp. 1723–1730. doi: 10.1172/JCI9056.

Berk, B. C., Fujiwara, K., Lehoux, S. (2007) 'ECM remodeling in hypertensive heart disease', *Journal of Clinical Investigation*, pp. 568–575. doi: 10.1172/JCI31044.

Van Berlo, J. H., Maillet, M., Molkenin, J. D. (2013) 'Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart', *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), pp. 37–45. doi: 10.1172/JCI62839.

Bertolotti, A. et al. (2000) 'Dynamic interaction of Bip and ER stress transducers in the unfolded-protein response', *Nat Cell Biol*, 2(6), pp. 326–332.

Bisognano, J. D. et al. (2000) 'Myocardial-directed overexpression of the human  $\beta$ 1-adrenergic receptor in transgenic mice', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(5), pp. 817–30. doi: 10.1006/jmcc.2000.1123.

Bristow, M. R. et al. (1982) 'Decreased Catecholamine Sensitivity and  $\beta$ -Adrenergic-Receptor Density in Failing Human Hearts', *New England Journal of Medicine*, 307(4), pp. 205–11. doi: 10.1056/NEJM198207223070401.

Bueno, O. F. et al. (2000) 'The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice.', *The EMBO journal*, 19(23), pp. 6341–6350. doi: 10.1093/emboj/19.23.6341.

- Charron, P. et al. (1998) 'Genotype–phenotype correlations in familial hypertrophic cardiomyopathy. A comparison between mutations in the cardiac protein-C and the beta-myosin heavy chain genes', *European Heart Journal*, 19, pp. 139–145.
- Christ, M. et al. (2016) 'Heart failure epidemiology 2000–2013: insights from the German Federal Health Monitoring System', *European Journal of Heart Failure*, 18(8), pp. 1009–1018. doi: 10.1002/ejhf.567.
- D'Angelo, D. D. et al. (1997) 'Transgenic G alpha q overexpression induces cardiac contractile failure in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, pp. 8121–26.
- Davis, J., Molkentin, J. D. (2014) 'Myofibroblasts: Trust your heart and let fate decide', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 70, pp. 9–18. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.10.019.
- Díez, J. (2017) 'Chronic heart failure as a state of reduced effectiveness of the natriuretic peptide system: implications for therapy', *European Journal of Heart Failure*, pp. 167–176. doi: 10.1002/ejhf.656.
- Dorn, G., Robbins, J., Sugden, P. (2003) 'Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation', *Circulation Research*, 92(11), pp. 1171–5.
- Edelmann, F. et al. (2018) 'Chronische Herzinsuffizienz', *Dtsch Arztebl Int*, 115(8), pp. 124–30.
- Elliott, P. M. et al. (2014) '2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology ( ESC )', *European Heart Journal*, 35, pp. 2733–2779. doi: 10.1093/eurheartj/ehu284.
- Farrell, E. et al. (2018) 'Transcriptome analysis of cardiac hypertrophic growth in MYBPC3-null mice suggests early responders in hypertrophic remodeling', *Frontiers in Physiology*, 9, p. 1442. doi: 10.3389/fphys.2018.01442.
- Fatkin, D. et al. (2000) 'An abnormal Ca<sup>2+</sup> response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy', *Journal of Clinical Investigation*, 106(11), pp. 1351–1359. doi: 10.1172/JCI11093.

- Frank, D. et al. (2007) 'Calsarcin-1 Protects Against Angiotensin-II Induced Cardiac Hypertrophy', *Circulation*, 116(22), pp. 2587–2596. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.711317.
- Frey, N., Luedde, M., Katus, H. A. (2012) 'Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy.', *Nature reviews. Cardiology*. Nature Publishing Group, 9(2), pp. 91–100. doi: 10.1038/nrcardio.2011.159.
- Frey, N., Olson, E. N. (2003) 'Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly', *Annual Review of Physiology*, 65(1), pp. 45–79. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243.
- Frey, N., Richardson, J. A., Olson, E. N. (2000) 'Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), pp. 14632–7. doi: 10.1073/pnas.260501097.
- Gersh, B. et al. (2011) '2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy', *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 142(6), pp. e153–e203. doi: 10.1016/j.jtcvs.2011.10.020.
- Groenendyk, J. et al. (2010) 'Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart', *Circulation Research*, pp. 1185–1197. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227033.
- Heineke, J. & Molkenin, J. D. (2006) 'Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), pp. 589–600. doi: 10.1038/nrm1983.
- Helms, A. S. & Day, S. M. (2016) 'Hypertrophic cardiomyopathy: single gene disease or complex trait?', 37, pp. 1823–1825. doi: 10.1093/eurheartj/ehv562.
- Huang, W. et al. (2016) 'Gene expression patterns in transgenic mouse models of hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in myosin regulatory light chain', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 601, pp. 121–132. doi: 10.1016/j.abb.2016.02.022.

Ivandic, B. T. et al. (2012) 'Whole-genome analysis of gene expression associates the ubiquitin-proteasome system with the cardiomyopathy phenotype in disease-sensitized congenic mouse strains', *Cardiovascular Research*. doi: 10.1093/cvr/cvs080.

Iwaki, K. et al. (1990) 'Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response', *Journal of Biological Chemistry*, 265, pp. 13809–13817.

Kehat, I. & Molkentin, J. D. (2010) 'Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation', *Circulation*, 122(25), pp. 2727–2735. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268.

Kim, B. J., Ryu, S. W., Song, B. J. (2006) 'JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells', *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), pp. 21256–21265. doi: 10.1074/jbc.M510644200.

Kim, S. et al. (2015) 'PKA regulates calcineurin function through the phosphorylation of RCAN1: identification of a novel phosphorylation site', *Biochem Biophys Res Commun*, 459(4), pp. 604–9.

Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., Rockman, H. A. (2000) 'Functional Consequences of Altering Myocardial Adrenergic Receptor Signaling', *Annual Review of Physiology*, 62, pp. 237–60. doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.237.

Kong, P., Christia, P., Frangogiannis, N. G. (2014) 'The pathogenesis of cardiac fibrosis', *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 549–574. doi: 10.1007/s00018-013-1349-6.

Kroemer, G., Mariño, G., Levine, B. (2010) 'Autophagy and the Integrated Stress Response', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.

Lee, A. S. (2005) 'The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress', *Methods*, pp. 373–381. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.10.010.

- Li, Z., Wang, J., Yang, X. (2015) 'Functions of autophagy in pathological cardiac hypertrophy', *International Journal of Biological Sciences*, pp. 672–678. doi: 10.7150/ijbs.11883.
- Lip, G., Gibbs, C., Beevers, D. (2000) 'ABC of heart failure: Aetiology', *British Medical Journal*, 320(7227), pp. 104–7. doi: 10.1136/bmj.320.7227.104.
- Liu, M., Chen, Z., Chen, L. (2016) 'Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases', *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(4), pp. 425–443. doi: 10.1038/aps.2015.145.
- Liu, M., Dudley, S. C. (2016) 'Role for the Unfolded Protein Response in Heart Disease and Cardiac Arrhythmias.', *International journal of molecular sciences*, 17(1), p. 52. doi: 10.3390/ijms17010052.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.', *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp. 402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Maillet, M., van Berlo, J. H., Molkenin, J. D. (2013) 'Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players', *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group, 14(1), pp. 38–48. doi: 10.1038/nrm3495.
- Malgija, B., Kumar, N. S., Piramanayagam, S. (2018) 'Collective transcriptomic deregulation of hypertrophic and dilated cardiomyopathy – Importance of fibrotic mechanism in heart failure', *Computational Biology and Chemistry*. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.01.011.
- Malhi, H., Kaufman, R. J. (2011) 'Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Disease', *J Hepatol.*, 54(4), pp. 795–809.
- Marian, A. J., Braunwald, E. (2017) 'Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy', *Circ Res*, 121(7), pp. 749–770.
- Maron, B., Ferrans, V., Roberts, W. (1975) 'Ultrastructural features of degenerated cardiac muscle cells in patients with cardiac hypertrophy', *Am J Pathol*, 79(3), pp. 387–434.

Martinez-De Luna, R. I. et al. (2013) 'Maturin is a novel protein required for differentiation during primary neurogenesis', *Developmental Biology*, 384(1), pp. 26–40. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.09.028.

McCullough, K. D. et al. (2001) 'Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state', *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), pp. 1249–1259. doi: 10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001.

McDermott-Roe, C. et al. (2017) 'Transcriptome-wide co-expression analysis identifies LRRC2 as a novel mediator of mitochondrial and cardiac function', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0170458.

McMurray, J. J. V. et al. (2014) 'Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure', *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJMoa1409077.

Misiewicz, M. et al. (2013) 'Identification of a novel endoplasmic reticulum stress response element regulated by XBP1.', *The Journal of biological chemistry*, 288(28), pp. 20378–91. doi: 10.1074/jbc.M113.457242.

Molkentin, J. D. et al. (1998) 'A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy', *Cell*, 93(2), pp. 215–228. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81573-1.

Morisco, C., Seta, K., et al. (2000) 'Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Regulates GATA4 in Cardiac Myocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), pp. 14466–75. doi: 10.1074/jbc.M103166200.

Morisco, C., Zebrowski, D., et al. (2000) 'The Akt-glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), pp. 14466–75. doi: 10.1074/jbc.275.19.14466.

Mutlak, M., Kehat, I. (2015) 'Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy', *Frontiers in Pharmacology*. doi: 10.3389/fphar.2015.00149.

Nakai, A. et al. (2007) 'The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress', *Nature Medicine*, 13(5), pp. 619–624. doi: 10.1038/nm1574.

- Nemchenko, A. et al. (2011) 'Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.06.010.
- Nicol, R. L., Frey, N., Olson, E. N. (2000) 'From the Sarcomere to the Nucleus: Role of Genetics and Signaling in Structural Heart Disease', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1, pp. 179–223. doi: 10.1146/annurev.genom.1.1.179.
- Nishitoh, H. et al. (2002) 'ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats', *Genes and Development*, 16(11), pp. 1345–1355. doi: 10.1101/gad.992302.
- O'Mahony, C. et al. (2014) 'A novel clinical risk prediction model for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy (HCM Risk-SCD)', *European Heart Journal*, 35, pp. 2010–2020.
- Offermanns, S. et al. (1998) 'Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in Gα(q)/Gα11-mutant mice', *EMBO Journal*, 17, pp. 4304–12. doi: 10.1093/emboj/17.15.4304.
- Ogata, M. et al. (2006) 'Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress.', *Molecular and cellular biology*. doi: 10.1128/MCB.01453-06.
- Olson, E. N., Williams, R. (2000) 'Calcineurin signaling and muscle remodeling', *Cell*, 101(7), pp. 689–92.
- Osowski, C., Urano, F. (2011) 'Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system', *Methods Enzymol*, 490, pp. 71–92.
- Oudit, G. Y. et al. (2004) 'The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, pp. 37(2), 449–71. doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.015.
- Pan, S. et al. (2018) 'Sfrp1 attenuates TAC-induced cardiac dysfunction by inhibiting Wnt signaling pathway- mediated myocardial apoptosis in mice', *Lipids in Health and Disease*, 17(1), p. 202. doi: 10.1186/s12944-018-0832-3.



- Pankiv, S. et al. (2010) 'FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end - Directed vesicle transport', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200907015.
- Prinz, C. et al. (2011) 'Diagnostik und Therapie bei hypertropher Kardiomyopathie', *Deutsches Ärzteblatt international*, 108(13), pp. 209–15. doi: 10.3238/arztebl.2011.0209.
- Puthalakath, H. et al. (2007) 'ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim', *Cell*, 129(7), pp. 1337–1349. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.027.
- Rajabi, M. et al. (2007) 'Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis', *Heart Fail Rev.*, 12(3–4), pp. 331–43.
- Rajan, S. et al. (2013) 'Microarray analysis of active cardiac remodeling genes in a familial hypertrophic cardiomyopathy mouse model rescued by a phospholamban knockout.', *Physiological genomics*. doi: 10.1152/physiolgenomics.00023.2013.
- Ren, C. W. et al. (2016) 'RNA-seq profiling of mRNA associated with hypertrophic cardiomyopathy', *Molecular Medicine Reports*, 14(6), pp. 5573–5586. doi: 10.3892/mmr.2016.5931.
- Rifki, O., Hill, J. (2012) 'Cardiac Autophagy: Good with the Bad', *J Cardiovasc Pharmacol*, 60(3), pp. 248–252.
- Roth, D. M. et al. (1999) 'Cardiac-directed adenylyl cyclase expression improves heart function in murine cardiomyopathy', *Circulation*, 99, pp. 3099–3102. doi: 10.1161/01.CIR.99.24.3099.
- Roth, D. M. et al. (2002) 'Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy', *Circulation*, 105, pp. 1989–1994. doi: 10.1161/01.CIR.0000014968.54967.D3.
- Schwarz, D. S., Blower, M. D. (2016) 'The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling.', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(1), pp. 79–94. doi: 10.1007/s00018-015-2052-6.
- Shen, S. et al. (2017) 'Long non-coding RNAs in cardiac remodeling', *Cellular Physiology and Biochemistry*, pp. 1830–1837. doi: 10.1159/000471913.

Shimizu, I., Minamino, T. (2016) 'Physiological and pathological cardiac hypertrophy', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 97, pp. 245–262. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.06.001.

Sklepkiwicz, P. et al. (2015) 'Loss of secreted frizzled-related protein-1 leads to deterioration of cardiac function in mice and plays a role in human cardiomyopathy', *Circulation: Heart Failure*, 8(2), pp. 362–72. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001274.

Son, S. M. et al. (2014) 'Reduced IRE1 $\alpha$  mediates apoptotic cell death by disrupting calcium homeostasis via the InsP3 receptor', *Cell Death and Disease*, 5(4), p. e1188. doi: 10.1038/cddis.2014.129.

Song, H. K. et al. (2015) 'Pik3ip1 modulates cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K pathway', *PLoS ONE*, 10(3). doi: 10.1371/journal.pone.0122251.

Spirito, P. et al. (2014) 'Risk of Sudden Death and Outcome in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy with benign Presentation and without Risk Factors', *American Journal of Cardiology*, 113(9), pp. 1550–5.

Trojanowska, M., Lenna S. (2012) 'The role of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in fibrosis', *Curr Opin Rheumatol.*, 24(6), pp. 663–668.

Sun, X. et al. (2014a) 'Novel function of the chromosome 7 open reading frame 41 gene to promote leukemic megakaryocyte differentiation by modulating TPA-induced signaling', *Blood Cancer Journal*, 4, p. e198.

Sun, X. et al. (2014b) 'Novel function of the chromosome 7 open reading frame 41 gene to promote leukemic megakaryocyte differentiation by modulating TPA-induced signaling', *Blood Cancer Journal*, 4(3). doi: 10.1038/bcj.2014.18.

Urano, F. (2000) 'Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1', *Science*, 287(5453), pp. 664–666. doi: 10.1126/science.287.5453.664.

- Venkatesan, B. et al. (2016) 'Transient silencing of Npr3 gene expression improved the circulatory levels of atrial natriuretic peptides and attenuated  $\beta$ -adrenoceptor activation- induced cardiac hypertrophic growth in experimental rats', *European Journal of Pharmacology*, 782, pp. 44–58. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.037.
- Walsh, R. et al. (2017) 'Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples', *Genet Med*, 19(2), pp. 192–203.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R. (2004) 'The RAF proteins take centre stage.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(11), pp. 875–885. doi: 10.1038/nrm1498.
- Wettschureck, N. et al. (2001) 'Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of G $\alpha$ q/G $\alpha$ 11 in cardiomyocytes', *Nature Medicine*, 7, pp. 1236–40. doi: 10.1038/nm1101-1236.
- Yang, W. et al. (2015) 'Microarray profiling of long non-coding RNA (lncRNA) associated with hypertrophic cardiomyopathy', *BMC Cardiovascular Disorders*, 15, p. 62. doi: 10.1186/s12872-015-0056-7.
- Yorimitsu, T., Klionsky, D. J. (2008) 'Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy.', *Autophagy*. doi: 281.30299.304.
- You, J. et al. (2017) 'Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload.', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. doi: 10.1152/ajpheart.00212.2017.
- Young, M. E. (2001) 'Reactivation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Is Associated with Contractile Dysfunction in Hypertrophied Rat Heart', *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), pp. 44390–44395. doi: 10.1074/jbc.M103826200.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Ampere
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>AF</b>	AlexaFluor®, fluoreszierender Farbstoff
<b>ANF</b>	atrial natriuretic factor
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BNP</b>	brain natriuretic peptide
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cDNA</b>	<i>copy desoxyribonucleic acid</i> = kopierte Desoxyribonukleinsäure
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminescence
<b><i>E. coli</i></b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
<b>ERAD</b>	ER-assoziierte Proteindegradierung
<b>F</b>	Farad
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothyocyanat, fluoreszierender Farbstoff

<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Stunden
<b>HCM</b>	Hypertrophe Kardiomyopathie
<b>HEK-Zellen</b>	“human embryonic kidney”-Zellen
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>HZ</b>	Hertz (Einheit der Frequenz: 1/s)
<b>ifu</b>	<i>infectious units</i> = infektiöse (Virus-)Einheiten
<b>kb</b>	Kilobasenpaare
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>L</b>	Liter
<b>LV</b>	linksventrikulär
<b>λ</b>	Lambda
<b>lacZ</b>	Kontrollgen, codiert für das Enzym β-Galactosidase
<b>M</b>	Molar
<b>μ</b>	Mikro
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>min</b>	Minuten
<b>miRNA</b>	micro-RNA
<b>MOI</b>	<i>multiplicity of infection</i> = zahlenmäßiges Verhältnis infektiöser Agenzien (hier: Viren) zu Zielzellen
<b>n</b>	Nano
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NFAT</b>	Nuclear Factor of activated T-Cells
<b>NRVCM</b>	Neonatal rat ventricular cardiomyocytes
<b>Ω</b>	Ohm
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i> = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PE</b>	Phenylephrin
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	negativ-dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion
<b>Rcan1-4</b>	Regulator of Calcineurin 1-4
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.</b>	Siehe
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>TAC</b>	Transverse aortic constriction
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'- Tetramethyldiamin
<b>Tg</b>	Transgen
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UTR</b>	<i>untranslated region</i> = nicht für Aminosäuren codierende Bereiche, die das offene Leseraster eines Gens flankieren
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>vs</b>	versus
<b>v/v</b>	Volumen in Volumen
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>w/v</b>	Gewicht in Volumen

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Arbeit – abgesehen von der Beratung durch den zuständigen Betreuer – nach Inhalt und Form meine eigene ist, soweit dies nicht explizit vermerkt ist. Ich erkläre weiterhin, dass Teile dieser Arbeit zur Publikation eingereicht wurden und dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel, den 30.11.2020

---

Matthias Gröger





## Anhang

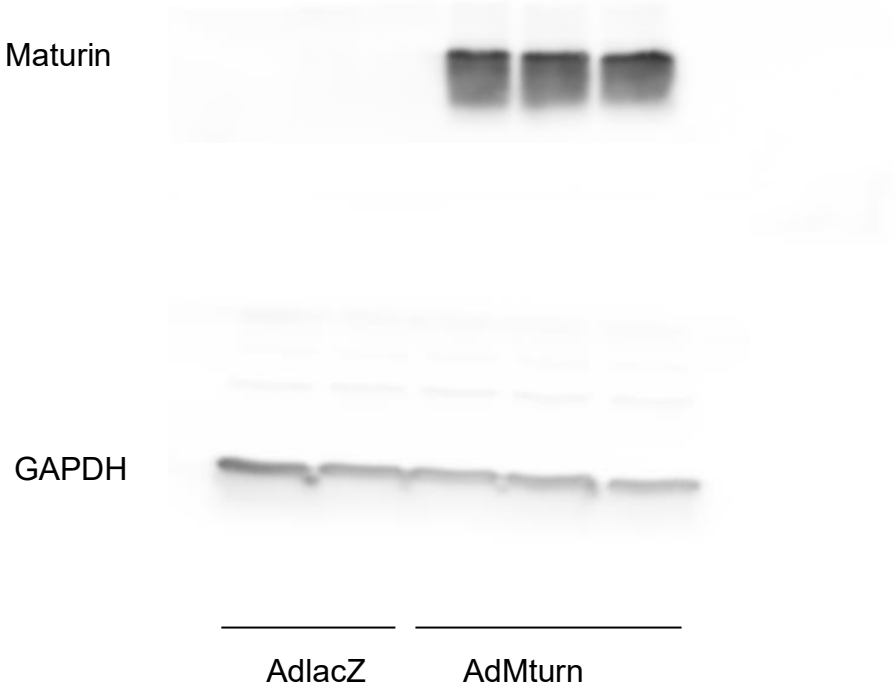
Liste der verwendeten *Forward(F)*- und *Reverse(R)*-Primer für die Spezies *Rattus norvegicus (R)* sowie *Mus musculus (M)* zur spezifischen Amplifikation des jeweiligen Gens mittels qRT-PCR

Primername	Sequenz (5' → 3')	Gen
R_Smoc2_F	ACACCAAATGGAAGGCCAT	<i>Smoc2</i>
R_Smoc2_R	GCATCATCTGCTTTTCCGGC	
M_Smoc2_F	AGACTCAGCCCCAAGGAGAT	
M_Smoc2_R	TGGTCTTGTTCTGCCGACTC	
R_Sfrp1_F	CGAAGCCCCAAGGTACAACA	<i>Sfrp1</i>
R_Sfrp1_R	ATGTTGATGATGGCCTCCG	
M_Sfrp1_F	GAAGCCTCTAAGCCCCAAGG	
M_Sfrp1_R	ATCCTCAGTGCAAACCTCGCT	
R_Pik3ip1_F	ACCACTCCGGTGACAAAGA	<i>Pik3ip1</i>
R_Pik3ip1_R	TGGAGTTCATCCTCACACGC	
M_Pik3ip1_F	AGTTGCCAGAGACCACTTC	
M_Pik3ip1_R	CCTGTGCCTCTTTGTACCT	

Primername	Sequenz (5' → 3')	Gen
R_Npr3_F	AGAAGGCCGGTTCAAATGC	<i>Npr3</i>
R_Npr3_R	CTAGGCCACATGATTTGCAAGG	
R_Ypel2_F	GGGCTGGAAATATGAACACGC	<i>Ypel2</i>
R_Ypel2_R	TGGTTTCAGTCACTCTCTCAC	
R_Grp78_F	CTGGGTACATTTGATCTGACTGG	<i>Grp78</i>
R_Grp78_R	GCATCCTGGTGGCTTTCCAGCCATTC	
R_Atf6_F	ACCAGGTGAAGACTGGGAGT	<i>Atf6</i>
R_Atf6_R	TATTTTCGTAAGTCTCATGTGCTGC	
M/R_Rpl32_F	CTGCTGATGTGCAACAAATCT	<i>Rpl32</i>
M/R_Rpl32_R	GCTGTGCTGCTCTTTCTACAAT	

Ungeschnittene Aufnahmen von Western-Blot-Detektionen:

1. Mturn-Überexpression (Kapitel 4.4, S. 60)





2. ER-Stress durch DTT, GRP78-Blot (Kapitel 4.7 S. 65)

