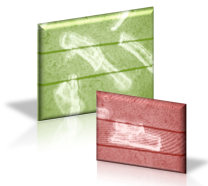


**NILS BROCKMANN**

---

Der Einfluss einer SMAD- und AP-1-Inhibition durch  
Überexpression von YB-1 und JDP2 auf die kontraktile  
Funktion des Herzens



Inauguraldissertation zur Erlangung des  
Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*   
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Der Einfluss einer SMAD- und AP-1-Inhibition durch  
Überexpression von YB-1 und JDP2 auf die kontraktile  
Funktion des Herzens

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Brockmann, Nils  
aus Mönchengladbach

Gießen 2018

Aus dem Physiologischen Institut,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Schulz,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gerhild Euler
2. Gutachter: Prof Dr. Dr. Thomas Braun

Tag der Disputation: 20.12.2018

Für Lisa und meine Eltern.



# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Herzinsuffizienz .....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Pathophysiologie.....	1
1.1.3	Hypertrophie und Apoptose.....	3
1.1.4	TGF- $\beta$ und SMAD .....	3
1.1.5	TGF- $\beta$ und AP-1.....	4
1.2	Das c-Jun Dimerisationsprotein 2 (JDP2).....	5
1.2.1	Transgenes Modell zur JDP2-Überexpression der Maus.....	6
1.3	Das Y-Box-bindendes Protein 1 (YB-1) .....	7
1.3.1	Struktur, Translation und Transkription von YB-1.....	8
1.3.2	Interaktion von YB-1 mit TGF- $\beta$ , SMAD und AP-1 .....	9
1.4	Calciumhaushalt am Herzen.....	10
1.4.1	Physiologie.....	10
1.4.2	Pathologische Veränderung während der Herzinsuffizienz .....	12
1.4.3	Einflüsse von TGF- $\beta$ und JDP2 auf den Calciumhaushalt .....	13
1.5	Fragestellung.....	14
2.	Material .....	15
2.1	Versuchstiere.....	15
2.2	Chemikalien .....	15
2.3	Zellkultur.....	16
2.4	Kontraktionsmessung.....	16
2.5	Echokardiographie.....	17
2.6	Westernblot.....	17
2.7	Antikörper .....	17
2.8	Decoy Oligonukleotide und Antisense .....	18
2.9	Sonstiges.....	18
2.10	EDV .....	18
2.11	Puffer, Lösungen und Medien .....	19
3.	Methoden.....	24
3.1	Isolierung der Kardiomyozyten aus Gesamtherzen .....	24
3.1.1	Versuchstiere.....	24
3.1.2	Präparation der Versuchstiere .....	25

3.2	Behandlung der Kardiomyozyten .....	26
3.2.1	Adenovirale YB-1-Überexpression.....	26
3.2.2	Einsatz von Decoy-Oligonukleotiden oder Antisense-Oligos .....	26
3.3	Transthorakale Echokardiographie in vivo .....	27
3.4	Kontraktionsmessung in vitro .....	28
3.4.1	Stimulation und Steuerung.....	28
3.4.2	Messung der Kontraktionsparameter .....	28
3.4.3	Messprotokoll.....	30
3.5	Proteinnachweis .....	30
3.5.1	Aufbereitung der Proben durch RIPA-Puffer.....	30
3.5.2	Proteinmengenbestimmung nach Bradford.....	31
3.5.3	Vorbereitung der Proben .....	31
3.5.4	SDS-PAGE .....	32
3.5.5	Durchführung der Gelelektrophorese .....	32
3.5.6	Westernblot.....	33
3.5.7	Immunfärbung.....	34
3.6	Statistik.....	36
4.	Ergebnisse .....	37
4.1	Untersuchung der JDP2-Mäuse.....	37
4.1.1	Echokardiographischer Nachweis einer kardialen Dysfunktion nach einer Woche JDP2-Überexpression .....	37
4.1.2	Reduktion der Kontraktilität in vitro durch Überexpression von JDP2 für eine Woche	38
4.1.3	JDP2-Überexpression beeinflusst die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes.....	39
4.2	Einfluss der YB-1-Infektion .....	42
4.2.1	YB-1 beeinflusst die basale Kontraktilität .....	42
4.2.2	Die YB-1-Infektion nimmt Einfluss auf die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes.....	45
4.3	Einfluss auf die Kontraktilität durch Decoy-Oligonukleotide und Antisense .....	47
4.3.1	Decoy-Oligonukleotide haben keinen Einfluss auf die Kontraktilität.....	47
4.3.2	Kein Einfluss auf Kontraktilität durch Antisense-SMAD4 .....	51
5.	Diskussion.....	53
5.1	Der Einfluss von JDP2 .....	53
5.1.1	Kurzzeitige Überexpression von JDP2 schränkt Kontraktilität von Kardiomyozyten in vitro ein .....	54



5.1.2	Einwöchige JDP2-Überexpression reduziert die kardiale Funktion in der Echokardiographie.....	55
5.1.3	Die Rolle von AP-1 und JDP2 in Bezug auf die Kontraktilität.....	56
5.1.4	JDP2 greift in den Calciumhaushalt auf Proteinebene ein .....	58
5.2	Der Einfluss von YB-1 auf die Kardiomyozyten .....	60
5.2.1	YB-1 schränkt die Kontraktilität in vitro ein .....	61
5.2.2	Die Rolle von AP-1 und SMADs für die Beeinträchtigung der kontraktilen Funktion durch YB-1 .....	61
5.2.3	Veränderungen des Calciumhaushaltes unter YB-1.....	63
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	64
6.	Zusammenfassung.....	66
7.	Summary .....	68
8.	Literaturverzeichnis.....	70
9.	Abkürzungsverzeichnis .....	77
10.	Publikationsverzeichnis .....	80
11.	Erklärung zur Dissertation .....	81
12.	Danksagung .....	82



# 1. Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

Eine ausreichende Blutversorgung durch einen kontinuierlichen Kreislauf ist für die Funktionalität des Organismus unerlässlich. Ist das Herz nicht mehr in der Lage, den Kreislauf suffizient aufrechtzuerhalten, so spricht man von einer Herzinsuffizienz. Es kann zwischen einer diastolischen, einer systolischen sowie kombinierten Funktionsstörungen unterschieden werden. Ebenso können isoliert nur das linke und das rechte Herz betroffen sein. Sind beide Systeme betroffen, so spricht man von einer Globalinsuffizienz.

Hauptursachen für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind eine verminderte Kontraktionsfähigkeit (Systole), eine verminderte Füllung (Diastole) oder eine Kombination aus beidem. Die häufigste Ursache für eine Dysfunktion des Myokards sind die koronare Herzerkrankung, akute Ischämien, arterielle Hypertonie und Klappendefekte am Herzen (Ponikowski et al., 2016)

### 1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland starben im Jahr 2015 38,5 % an Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Die führenden Ursachen waren die chronisch Ischämische Herzkrankheit (Koronare Herzerkrankung, KHK), der akute Myokardinfarkt (Herzinfarkt) und Herzinsuffizienz. Im Jahr 2015 verstarben an letzterer 47.414 Menschen in Deutschland, was einem Anteil von 13,3 % an allen kardiovaskulären Todesursachen entspricht. Die Sterberate war bei Frauen höher (15 %) als bei Männern (11,2 %). (Statistisches Bundesamt, 2015).

### 1.1.2 Pathophysiologie

Eine insuffiziente Herzarbeit führt unabhängig von der Ätiologie zu einer erhöhten Wandspannung des Herzens, zur Aktivierung von Barorezeptoren und zu einer Minderperfusion des peripheren Gewebes. Darauf folgen neurohormonale, funktionelle und strukturelle Kompensationsmechanismen (Weil und Schunkert, 2006).

Durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems werden vermehrt Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet. Dies führt zu einer dauerhaften Stimulation der  $\beta$ -Adrenorezeptoren und damit zu einer Zunahme von Kontraktilität und Herzfrequenz. In der Folge wird der physiologisch am stärksten exprimierte  $\beta_1$ -Adrenorezeptor

runterreguliert, sodass  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptor im Verhältnis 1:1 vorliegen (Port und Bristow, 2001). Neben dem vegetativen Nervensystem wird auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert. Angiotensin II hat eine vasokonstriktorische und endothelschädigende Wirkung. Zudem fördert es die Ausschüttung von Aldosteron, welche durch vermehrte Natrium-Rückresorption in der Niere die Nachlast und damit die Herzarbeit erhöht. Zudem spielt Angiotensin II zusammen mit TGF- $\beta$  eine zentrale Rolle während des kardialen Remodelings. Aldosteron fördert am Herzen die Proliferation von Bindegewebszellen und Fibrosierung (Unger und Li, 2004). Die beschriebenen hormonalen Veränderungen bieten im klinischen Alltag Angriffspunkte für die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz. Neben dem Einsatz von selektiven  $\beta$ -Adrenorezeptorblockern, um das Herz vor der erhöhten Katecholaminwirkung zu schützen, ist die Hemmung des RAAS mittels Inhibierung des *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE-Hemmer) und Blockierung des Angiotensin Typ II Rezeptor Subtyp 1 (AT-1-Blocker) von hoher Bedeutung.

Strukturelle Veränderungen am Herzen lassen sich sowohl makroskopisch, als auch mikroskopisch beobachten. Betrachtet man den gesamten Ventrikel, unterscheidet man das konzentrische Remodeling infolge einer erhöhten Druckbelastung von dem exzentrischen Remodeling, welches Folge einer vermehrten Volumenbelastung des Ventrikels ist. Auch durch Infarkte entstandene Narben können einen insuffizienten Auswurf bewirken.

Auf zellulärer Ebene kann aufgrund der erhöhten Wandspannung eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) beobachtet werden. Dabei führt eine chronische Druckbelastung zu einer Zunahme des Querschnitts, wohingegen eine Volumenbelastung eine Zunahme der Länge der Zellen als Folge hat. Gleichzeitig gehen einige Kardiomyozyten in den programmierten Zelltod (Apoptose) (Weil und Schunkert, 2006). Im Vergleich zu einem gesunden Myokard zeichnet sich das Myokard eines insuffizienten Herzens durch weniger, aber vergrößerte Kardiomyozyten aus. Zunächst bewirkt die Hypertrophie des Ventrikels eine verbesserte Auswurfraction (Ejektionsfraction). Es wurde jedoch gezeigt, dass die Hypertrophie ein Prädiktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist (Levy et al., 2002).

Eine wichtige Rolle beim kardialen Remodeling scheint das Zytokin TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*  $\beta$ ) einzunehmen. Es wird beim Übergang von einer kompensierten in eine dekompenzierte Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert (Deten et al., 2001). Zusammen mit seinen Effektormolekülen (SMADs) und anderen DNA-bindenden Faktoren (AP-1, SP1, GATA) kann TGF- $\beta$  fibrosierende, apoptotische und hypertrophe Prozesse verstärken (Euler-Taimor und Heger, 2006). Im Mausmodell

konnte gezeigt werden, dass eine TGF- $\beta$ -Inhibierung das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt verhindern kann (Ikeuchi et al., 2004).

### 1.1.3 Hypertrophie und Apoptose

Eine wichtige Rolle bei der Induktion der Hypertrophie spielen neben TGF- $\beta$  das lokale Renin-Angiotensin-System (Baker et al., 1992), Endothelin-1 (Ito et al., 1993) und Phenylephrin (Schlüter et al., 1992). Diese Faktoren induzieren intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die zu einer veränderten Gen-Expression führen und eine gesteigerte Proteinbiosynthese auslösen. Ein besonderes Augenmerk soll hier auf die Interaktion von Angiotensin II und TGF- $\beta$  gelegt werden. Wenzel (2001) zeigte, dass ein erhöhter Angiotensin II-Spiegel TGF- $\beta$  sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene hochreguliert. In TGF- $\beta$ -knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II in Abwesenheit von TGF- $\beta$  nicht zu Hypertrophie und Fibrose des Myokards führt (Schultz et al., 2002). In vitro kann der Anstieg von TGF- $\beta$  und SMADs durch AT-1-Blocker verhindert werden (Hao et al., 2000). Außerdem nimmt TGF- $\beta$  Einfluss auf die adrenerge Signaltransduktion. Eine  $\beta$ -adrenerge Hypertrophiestimulation kann durch TGF- $\beta$  verstärkt werden (Schlüter et al., 1995). Zudem kann eine  $\beta$ -Blockade in TGF- $\beta$ -überexpmierenden Mäusen das Herz vor Hypertrophie schützen (Rosenkranz, 2004). Neben der Modulation der kardialen Hypertrophie spielt TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle bei der Induktion des programmierten Zelltodes. Schneiders et al (2004) zeigten, dass TGF- $\beta$  in ventrikulären Kardiomyozyten Apoptose auslöst. Hierbei ist eine simultane Induktion der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD erforderlich. Außerdem kann TGF- $\beta$  durch die Induktion von SMAD4 ein hypertrophes in ein apoptotisches Signal umwandeln (Heger et al., 2009).

### 1.1.4 TGF- $\beta$ und SMAD

Für die Apoptoseinduktion durch TGF- $\beta$  sind die Signalmoleküle der Familie der SMAD-Proteine entscheidend. Es werden acht verschiedene SMAD (*small mother against decapentaplegic*)-Proteine unterschieden, die sich in drei verschiedene Klassen einteilen lassen: in rezeptoraktivierte R-SMADs (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8), Co-SMADs (SMAD4) und inhibitorische I-SMADs (SMAD6 und SMAD7). Alle drei funktionellen Klassen sind im Herzen nachgewiesen worden. Durch Bindung von TGF- $\beta$  an transmembrane Rezeptoren, die aus einem Komplex von Typ I- und Typ II-Rezeptoren bestehen, kommt es zu einer Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 (Dennler et al., 2002). Diese bilden zusammen mit dem Co-SMAD SMAD4 einen

aktivierten Komplex, der in den Zellkern transloziert und dort die Transkription verschiedener Gene beeinflusst (Euler-Taimor und Heger, 2006). Dass dieser Schritt in der Signaltransduktion von TGF- $\beta$  für die Apoptoseinduktion notwendig ist, wurde durch das Abfangen der SMAD-Molekülen mit Hilfe von spezifischen SBE(*SMAD binding elements*)-Decoy-Oligonukleotiden sowie durch die Inhibition der SMAD4-Synthese mittels Antisense-Oligonukleotiden gezeigt. Diese Behandlung konnte ventrikuläre Kardiomyozyten vor der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose schützen (Schneiders et al., 2005).

#### 1.1.5 TGF- $\beta$ und AP-1

Ein weiterer mehrfach identifizierter Mediator von hypertrophen und apoptotischen Prozessen ist der Transkriptionsfaktor *Activator Protein 1* (AP-1). Er gehört zur Familie der *basic amino acid leucine zipper*-Proteine (bZIP-Familie), die eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion des Herzens, aber auch von vielen anderen Gewebe- und Zelltypen einnimmt. AP-1 ist ein Dimer aus Proteinen der Jun (c-Jun, JunB, JunD)- und Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2)-Familie. Mit Hilfe des Leucin-Zippers kann es DNA an bestimmten Abschnitten, wie *TPA-Responsive Elements* (TRE) und *cAMP-Responsive Element* (CRE), binden. Den Jun- und Fos-Proteinen sehr ähnlichen Mitgliedern der ATF- oder JDP-Familie sowie den *CCAT/Enhancer-Binding Proteinen* (C/EBP) ist es ebenfalls möglich diese Sequenzen zu binden und somit die AP-1-abhängige Genexpression zu modulieren (Hess et al., 2004). Aktiviert wird AP-1 über mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK), wie z.B. die c-Jun amino-terminale Kinase (JNK) und die *extracellular signal regulated Kinase* (ERK) (Taimor et al., 2001). Die Wirkung von AP-1 variiert je nach Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors und je nach Zelltyp. Das Heterodimer aus c-Jun und c-Fos weist dabei die höchste transkriptionelle Aktivität auf. Beschriebene Wirkungen sind Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Hypertrophie (Hess et al., 2004).

In vivo konnte eine Induktion von AP-1 in Druck-belasteten Herzen (Nadruz et al., 2004) und nach Myokardinfarkt in der chronischen Phase des linksventrikulären Remodelings gezeigt werden (Frantz et al., 2003). In einer vergleichenden Studie an humanen Proben herzinsuffizienter Herzen wurde nach ischämischer Kardiomyopathie eine vermehrte Genexpression von Fos und JunB gezeigt. AP-1 scheint während des kardialen Remodelings eine zentrale Rolle einzunehmen (Kuner et al., 2008).

In neonatalen Herzmuskelzellen konnte durch Expression dominant-negativer AP-1-Mutanten die Beteiligung von AP-1 an hypertrophem Wachstum bestätigt werden (Omura et al., 2002). An ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte konnte gezeigt werden, dass diese vor einer  $\alpha$ -adrenerg induzierten Hypertrophie mittels Phenylephrin durch den

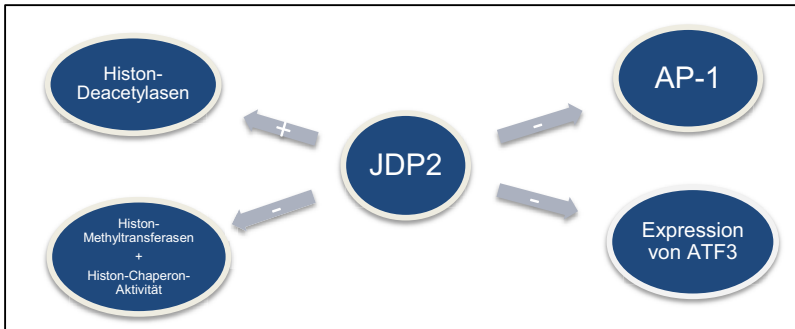
Einsatz von CRE-Decoy-Oligonukleotiden geschützt werden können. Letztere verhindern die Bindung von AP-1 an entsprechende DNA-Sequenzen und inhibieren somit die AP-1-Wirkung (Taimor et al., 2004).

AP-1 ist ebenfalls in der Lage eine apoptotische Wirkung zu erzielen. Für eine TGF- $\beta$ - oder NO-induzierte Apoptose wird eine simultane Induktion von AP-1 und SMAD benötigt. Auch hier konnten Herzmuskelzellen durch das Abfangen von AP-1 mittels spezifischer Decoy-Oligonukleotiden (CRE-Oligonukleotide) vor der Apoptose geschützt werden (Schneiders et al., 2005). Zudem kann AP-1 die Expression von anti-apoptotischen Proteinen herunterregulieren, woraufhin der programmierte Zelltod vermehrt induziert wird (Schlieper et al., 2007).

## 1.2 Das c-Jun Dimerisationsprotein 2 (JDP2)

Ebenso wie AP-1 gehört das *c-Jun Dimerisationsprotein 2* (JDP2) zu der Familie der DNA-bindenden bZIP-Proteine. Es ist ein natürlich vorkommender AP-1-Inhibitor und lässt sich in geringen Konzentrationen in nahezu allen Zelllinien nachweisen (Kehat et al., 2006). Strukturell ähnelt JDP2 anderen AP-1-Untereinheiten, wie den Jun- und Fos-Proteinen sowie dem *Activating Transcription Factor 3* (ATF3) (Hess et al., 2004). Es ist daher auch in der Lage, an die AP-1-spezifischen DNA-Abschnitte CRE und TRE zu binden. Seine transkriptionelle Aktivität übt JDP2 überwiegend als Heterodimer aus. Es ist jedoch auch in der Lage, AP-1 als Homodimer zu inhibieren. Insbesondere durch die Heterodimerisierung mit c-Jun unterbindet JDP2 die AP-1-abhängige Transkription, da es mit den typischen AP-1-Untereinheiten um die DNA-Bindungsstellen konkurriert (Aronheim et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass JDP2 die Expression von ATF3 herunterregulieren kann. Letzteres bildet ebenso wie AP-1 einen Aktivator für die Transkription zusammen mit c-Jun als Heterodimer (Weidenfeld-Baranboim et al., 2009). ATF3 wird vermehrt nach Myokardinfarkt und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation induziert und scheint ein direktes Zielgen von Angiotensin II zu sein. Es könnte somit am kardialen Remodeling infolge der neuro-hormonalen Stimulation eine Rolle spielen (Hasin et al., 2011).

Es konnten zudem AP-1-unabhängige Einflüsse von JDP2 auf die Transkription gezeigt werden. JDP2 ist in der Lage Histon-Deacetylasen (HDAC) zu aktivieren. Die daraus resultierende Kondensation der DNA scheint Teil der Transkription-repremierenden Funktion von JDP2 zu sein (Darlyuk-Saadon et al., 2012). Weiterhin inhibiert JDP2 die Aktivität von Histon-Methyltransferasen (HMTF) (Huang et al., 2011) und beeinflusst die Histon-Chaperon-Aktivität, was den Zusammenbau von Nukleosomen erleichtert (Tsai et al., 2016).

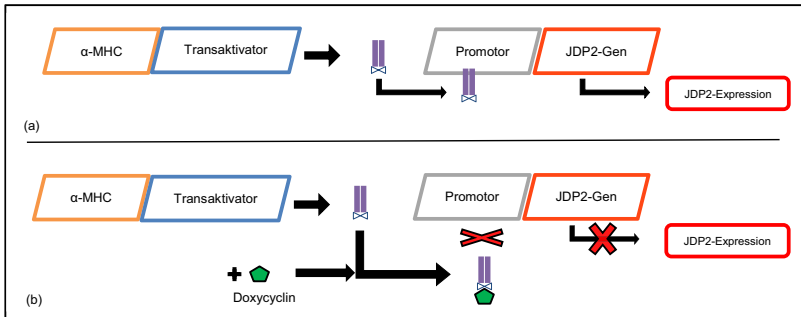


**Abbildung 1:** Schemazeichnung der transkriptions-regulierenden JDP2-Wirkung in der Zelle

### 1.2.1 Transgenes Modell zur JDP2-Überexpression der Maus

Für die herzspezifische JDP2-Überexpression dieser Arbeit wurden Mäuse der Linie C57Bl6/FVB aus Haifa, Israel bezogen. Benötigt wurden zwei transgene Mauslinien, die mittels Pronukleusinjektion generiert wurden, bei der DNA in den Vorkern befruchteter Eizellen eingebracht wird. Für die Zucht der doppelt transgenen Mäuse, die im Physiologischen Institut Gießen stattfand, muss die heterozygote JDP-2-Responder-Linie mit der heterozygoten  $\alpha$ -MHC-Transaktivator-Linie gekreuzt werden. Doppelt-transgene Tiere werden mittels PCR aus DNA-Proben, die aus Schwanzbiopsien der Tiere gewonnen werden, identifiziert. Diese überexprimierten herzspezifisch JDP2 unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Myosin-Schwere-Kette-Promoters ( $\alpha$ -MHC-Promoters) (Kehat et al., 2006). Zunächst wird unter kardiospezifischer  $\alpha$ -MHC-Kontrolle verstärkt ein Transaktivator exprimiert, der durch Bindung an den minimalen Promotor vor dem JDP2-Gen die Transkription dieses Gens und somit die Synthese von JDP2 aktiviert. Das Antibiotikum Doxycyclin ist ein spezifischer Inhibitor des Transaktivators. Somit kann die JDP2-Überexpression durch Fütterung der Mäuse mit Doxycyclin reguliert werden. Der  $\alpha$ -MHC-Promotor ist in den Herzvorhöfen ab dem 13. Tag der Embryonalentwicklung und in ventrikulären Herzmuskelzellen frühestens 12 Stunden vor Geburt aktiv (Subramaniam et al., 1991). Um ein Eingreifen von JDP2 während der Embryonalentwicklung auszuschließen, sollte ein Doxycyclin-Spiegel bereits vor Geburt der Tiere bestehen.





**Abbildung 2:** (a) Expression von JDP2 in transgenen Mäusen; (b) Inhibierung der JDP2-Expression durch Doxycyclin

Wird die JDP2-Überexpression nicht unterdrückt, so zeigen die JDP2-Mäuse im Alter von vier Wochen eine massive Vorhofdilataion sowie eine geringe ventrikuläre Hypertrophie. Die Mortalität ist gegenüber nicht-transgenen Mäusen erhöht. Echokardiographische Untersuchungen der JDP2-Mäuse konnten keinen signifikanten Unterschied der ventrikulären Wanddicke oder Volumina gegenüber Wildtieren zeigen. Auch die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit blieb erhalten (Kehat et al., 2006). Hill et al. (2013) zeigten, dass eine JDP2-Überexpression isolierte Kardiomyozyten vor TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose und vor einer adrenerg induzierten Hypertrophie schützt. Dieser Effekt ließ sich sowohl bei langfristiger, als auch bei einwöchiger JDP2-Überexpression reproduzieren. Nach siebenwöchiger Überexpression konnte eine reduzierte kontraktile Funktion auf Ebene der isolierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte ein geringeres Ansprechen der Kontraktilität der Zellen auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin gezeigt werden. Eine Untersuchung der Proteine des Calciumhaushalts ergab eine reduzierte SERCA-Expression auf mRNA-Ebene. JDP2-KO-Mäuse zeigten basal keinen kardialen Phänotyp. Erst nach Aortenkonstriktion (*Transverse Aortic Constriction*, TAC-Modell) zeigten sich eine verstärkte Hypertrophie des Herzens sowie eine reduzierte Auswurfleistung des linken Ventrikels gegenüber Wildtyp-Mäusen. (Kalfon et al., 2017).

### 1.3 Das Y-Box-bindendes Protein 1 (YB-1)

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der inhibierende Wirkung auf die TGF- $\beta$ -Signalwege und AP-1 hat, ist das Y-Box-bindendes Protein 1 (YB-1). Das YB-1-Protein gehört der Familie der DNA- und RNA-bindenden Faktoren an, die als Cold-Shock-Proteine bezeichnet werden (Dooley et al., 2006). Diese gelten evolutionär als eine der stärksten konservierten Familien, da sie gerade in Prokaryonten sehr gut erhalten geblieben sind

(Kohno et al., 2003). Erstmals wurde das YB-1-Protein von Didier et al. (1988) beschrieben, um Transkriptionsfaktoren zu benennen, die eine hohe Affinität zur Y-Box von *Major-Histocompatibility-Complex*-Promotoren Klasse II (MHC-Promotoren Klasse II) haben. Diese Y-Box enthält eine inverse CCAAT-Box, die vom YB-1-Protein gebunden werden kann. So nimmt das YB-1-Protein auf unterschiedliche Weise Einfluss auf zelluläre Funktionen, wie beispielsweise DNA-Reperatur, Transkription und Translation (Lyabin et al., 2014a).

### 1.3.1 Struktur, Translation und Transkription von YB-1

Das YB-1-Gen besteht aus acht Exons und ist auf dem Chromosom 1p 34 lokalisiert. Die mRNA ist 1,5 kb lang und kodiert ein 43 kDa großes Protein, welches aus 324 Aminosäuren besteht. Das Protein kann in drei Teile unterteilt werden: die N-terminale Domäne, die Cold-Shock-Domäne (CSD) und die C-terminale Domäne (CTD). Ersterer wird eine transaktivierende Funktion zugeschrieben (Kohno et al., 2003). In vitro wurde gezeigt, dass die CTD eine hohe Affinität zu einzelsträngiger DNA und RNA aufweist. Außerdem ist sie an der Protein-Protein-Interaktion beteiligt und wird daher auch als Charged Zipper bezeichnet (Izumi et al., 2001). Die CSD bildet eine fünf-strängige  $\beta$ -Faltblattstruktur aus und trägt RNA-bindende Proteine. Ihr wird die Funktion der Nukleinsäurebindung zugeschrieben, jedoch wurde gezeigt, dass sie lediglich schwach und unspezifisch an DNA bindet. Für die RNA-Bindung dagegen wurden spezifische Areale gefunden (Tanabe et al., 2015).

YB-1 ist ubiquitär in allen Geweben vorhanden und spielt bei vielen zellulären Funktionen eine Rolle. So ist es an der Translation und Transkription (Kohno et al., 2003), am Splicing (Stickeler et al., 2001) und an der Interaktion mit Reparaturproteinen beteiligt. Zudem scheint es DNA vor schädlichen Substanzen zu schützen (Kim et al., 2013). Nach myokardialer Ischämie wird das Protein hochreguliert. Im Rattenmodell wurde gezeigt, dass es drei bis zehn Tage nach Infarzierung vermehrt exprimiert wird. Dies führt zur Proliferation und Migration von Myofibroblasten. Außerdem kommt es nach dem zehnten Tag zu einer Translokation des Proteins vom Nukleus ins Zytoplasma (Kamalov et al., 2005).

YB-1 ist in den meisten Zellen im Zytoplasma lokalisiert. Die Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und TGF- $\beta$  können jedoch eine Translokation des Proteins vom Zytosol in den Nukleus bewirken (Higashi et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass YB-1 nicht nur seine namensgebende Y-Box in der DNA bindet, sondern auch mit anderen Promotoren interagiert, die die Y-Box nicht enthalten (Zasedateleva et al., 2002). Des Weiteren hat YB-1 Einfluss auf einen anderen cotranskriptionalen Prozess, das Splicing.

Es ist bisher nicht direkt als Teil des Spliceosoms beschrieben worden, kann aber beispielsweise Adaptermoleküle, wie das *Translocation Liposarcoma Protein* (TLS), binden und somit modulierenden Einfluss auf den Splicing-Prozess nehmen. Auch hier scheint die regulatorische Funktion von YB-1 im Vordergrund zu stehen (Chansky et al., 2001).

Bei der Betrachtung des Einflusses von YB-1 auf die Translation kann eine globale Wirkung von einer spezifischen Wirkung unterschieden werden. Evdokimova et al. (2001) haben gezeigt, dass YB-1 die 5'-Cap-Struktur bindet und damit die mRNA stabilisiert. Letzteres wird durch die CSD des YB-1 Proteins ermöglicht.

### 1.3.2 Interaktion von YB-1 mit TGF- $\beta$ , SMAD und AP-1

YB-1 kann auf vielfältige Weise in den TGF- $\beta$ /SMAD-Signalweg hemmend eingreifen. In Fibroblasten konnte eine direkte Bindung von YB-1 an SMAD3 nachgewiesen werden, die antagonistisch auf die TGF- $\beta$ -induzierte Kollagensynthese wirkt (Higashi et al., 2003). Liu et al. (2009) zeigten ebenfalls eine hemmende Wirkung von YB-1 auf die TGF- $\beta$ -induzierte Stimulation des  *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA)-Gens in Myofibroblasten. Hier beruht die Wirkung von YB-1 auf einer kompetitiven Bindung von YB-1 an SMAD-Bindungsstellen im Promotor des Gens. Eine weitere Möglichkeit von YB-1 in den SMAD-Signalweg einzugreifen, ist die Induktion von inhibitorischem SMAD7 in HEK293-Zellen (Dooley et al., 2006). Auf translationeller Ebene kann durch die Bindung von YB-1 an die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) des TGF- $\beta$ -Gens die Translation von TGF- $\beta$  in der Zelle reduziert werden (Jenkins et al., 2010).

2010 zeigte Partsch, dass eine adenovirale Transfektion, durch die YB-1 in ventrikulären Kardiomyozyten überexprimiert wird, Herzmuskelzellen der Ratte vor Hypertrophie durch adrenerge Stimulation und vor TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose schützt. Eine Inhibierung der Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 durch YB-1 wurde ausgeschlossen. Zudem konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass YB-1 in der Lage ist, eine TGF- $\beta$ -induzierte SMAD4-Hochregulation zu verhindern (Harjung, 2012).

Auch eine direkte Interaktion von YB-1 mit AP-1 wurde beschrieben. YB-1 scheint dabei hauptsächlich hemmende Wirkung auf die AP-1-Genexpression zu haben (Samuel et al., 2005). Zudem ist YB-1 in der Lage, die Hochregulation der AP-1-bindenden Untereinheiten JunB und JunD durch TGF- $\beta$  zu verhindern (Harjung, 2012).

## 1.4 Calciumhaushalt am Herzen

Für die Kontraktilität des Herzmuskels, das heißt für die Fähigkeit der Herzmuskelzellen sich zu verkürzen, ist der Calciumhaushalt von immenser Bedeutung. Veränderung der Konzentration, des Flusses oder der Speicherkapazität des Calciumions ( $\text{Ca}^{2+}$ , von hier an vereinfacht Calcium genannt) können die kontraktile Funktion der Herzmuskelzelle sowohl einschränken als auch verbessern.

### 1.4.1 Physiologie

Für die Umwandlung von elektrischer Erregung in eine mechanische Antwort der Herzmuskelzelle, der sogenannten elektro-mechanischen Kopplung, spielt Calcium eine entscheidende Rolle. Beim Kontraktionsvorgang lagert sich das Myosinfilament mit seinen ATP-beladenen Myosinköpfchen an das Troponin C des Aktinfilaments an. Durch die Rotation des Myosinköpfchens und einer Bewegung der dicken Myosinfilamente gegenüber den dünnen Aktinfilamenten kommt es unter ATP-Verbrauch zu einem teleskopartigen Ineinandergleiten der Myofilamente. Lagert sich nun wieder ein ATP an das Myosin an, löst sich das Myosinköpfchen vom Aktinfilament, um dann wieder eine neue Bindung einzugehen. Eine hemmende Wirkung auf die Querbrückeninteraktion üben das Tropomyosin und Troponin I aus. Bindet Calcium spezifisch an Troponin C, kommt es über Affinitätsänderungen zu einer Aufhebung der hemmenden Wirkung von Tropomyosin und Troponin I. Es kommt zur Querbrückeninteraktion, also zur Kontraktion des Kardiomyozyten.

Das Calcium muss, um an die Myosinfilamente zu binden, im Zytosol vorliegen. Die Calcium-Konzentration in Ruhe beträgt dort lediglich  $10^{-7}$  M, kann jedoch in der Systole auf bis zu  $10^{-5}$  M erhöht werden. Zu dem erhöhten Calcium-Transienten tragen sowohl das extrazelluläre Calcium als auch das gespeicherte Calcium im intrazellulär gelegenen sarkoplasmatischen Retikulum (SR) bei. Der Fluss über die Zellmembran erfolgt über spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ, über den Natrium/Calcium-Austauscher ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger, NCX) und über eine Calcium-ATPase. Der L-Type-Calciumkanal öffnet sich bei einem entsprechenden Aktionspotenzial und kann von intrazellulär sowohl durch hohe Calcium-Konzentrationen inhibiert (negativer Rückkopplungsmechanismus) als auch durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation aktiviert werden. Der NCX ist in der Lage ein Calcium-Ion gegen drei Natrium-Ionen über die Zellmembran auszutauschen. Der jeweilige Ionengradient entscheidet dabei in welcher Richtung der Austausch stattfindet. Während der Relaxation der Herzmuskelzelle ist der NCX für die Beförderung von Calcium nach extrazellulär verantwortlich. Aus energetischer Sicht wird er indirekt von der membranständigen Natrium/Kalium-ATPase angetrieben. Die Calcium-ATPase pumpt dagegen unter direktem Energieverbrauch Calcium aus der

Zelle. Da sie jedoch sehr langsam arbeitet, wird ihr lediglich ein langfristiger Einfluss auf die Calciumhomöostase zugeschrieben (Fearnley et al., 2011).

Der schnelle Calciumeinstrom über den L-Type-Calciumkanal aktiviert zusätzlich den topographisch nahe gelegenen Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2). Dieser liegt in der Membran der terminalen Zisternen des SRs und entspricht einem intrazellulären Calcium-Kanal, über den Calcium aus den zellulären Speichern ins Zytosol gelangen kann. Eine weitere membrangebundene Pumpe des SRs ist die herzspezifische sarcoplasmatische Calcium-ATPase 2 (SERCA2). Diese befördert während der Relaxation unter ATP-Verbrauch zwei Calcium-Ionen aus dem Zytosol in das SR und ist damit überwiegend für die diastolische Abnahme der Calciumkonzentration verantwortlich. In Maus- und Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die SERCA2 bis zu 92% des Calciums aus dem Zytosol heraus befördert, während der NCX nur 7% des Calcium nach extracellulär befördert (Puglisi et al., 2014).

Die Aktivität der SERCA wird von ihrem natürlichen Inhibitor Phospholamban (PLB) bestimmt. In unphosphoryliertem Zustand bindet PLB an die SERCA und inhibiert diese. Wird es durch die Proteinkinase A (PKA) oder durch die *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII) phosphoryliert, diffundiert es von der SERCA ab, erhöht deren Affinität für Calcium und beschleunigt die Beladung des SRs in der Diastole, wodurch die Relaxationszeit verkürzt und die Kontraktilität erhöht wird (positive Lusitropie) (Schmidt et al., 2001). Eine enge Zusammenarbeit aller Proteine des Calciumhaushaltes wurde unter anderem in SERCA2-KO-Mäusen deutlich. In diesem Modell konnte eine verminderte Expression der SERCA2 auf weniger als 5% durch vermehrten Calciumfluss über den L-Type-Calciumkanal und über den NCX kompensiert werden (Andersson et al., 2009).

Eine weitere Möglichkeit den Calciumhaushalt zu modulieren ist der  $\beta$ -adrenerge Signalweg. Durch Bindung von beispielsweise Adrenalin an dem am Herzen am stärksten exprimierten  $\beta_1$ -Adrenorezeptor wird über stimulierende GTP-bindende Proteine ( $G_s$ -Proteine) das membranständige Enzym Adenylatzyklase aktiviert. Dieses katalysiert die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP. cAMP ist unter anderem ein Aktivator der PKA, die verschiedene zelluläre Schlüsselproteine durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität moduliert. Hierzu gehören der L-Type-Calciumkanal und der Ryanodinrezeptor. Die phosphorylierten Kanäle ermöglichen einen höheren Calciumfluss und steigern somit durch eine höhere Calciumkonzentration im Zytosol die Kontraktionskraft (Inotropie). Auch die Phosphorylierung von PLB wird durch  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation verstärkt (Dorn und Molkentin, 2004).

#### 1.4.2 Pathologische Veränderung während der Herzinsuffizienz

Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass die Herzinsuffizienz mit einem veränderten Calciumhandling einhergeht. Von besonderer Bedeutung scheint das Gleichgewicht zwischen der SERCA2 und seinem Inhibitor PLB zu sein, sowie das Verhalten der NCX-Expression. In einem Review von 2014 führten Locatelli et al. zahlreiche Studien auf, die den Calciumhaushalt während der Herzinsuffizienz untersucht haben. Eine Herunterregulation von der SERCA2 und von PLB konnte mehrfach sowohl im Tiermodell als auch am menschlichen Herzen gezeigt werden. Es wird vermutet, dass die resultierende geringere Calciumbelastung des SRs die Kontraktilität des Herzens einschränkt. Auf zellulärer Ebene dagegen stellte sich heraus, dass eine geringe Überexpression der SERCA die Kontraktilität der Kardiomyozyten verbessert. Eine sehr hohe SERCA-Expression dagegen schränkt die Kontraktilität wiederum ein (Teucher et al., 2004). Neben dem Nachweis der Herunterregulation des PLBs konnte in anderen Studien kein Einfluss auf die PLB-Expression im insuffizienten Herzen gefunden werden. Die Inhibierung von PLB mittels Antisense konnte die Kontraktilität humaner Kardiomyozyten aus insuffizienten Herzen sogar verbessern (del Monte et al., 2002). Der NCX dagegen wurde in den unterschiedlichen Modellen sowohl hoch-, als auch herunterreguliert vorgefunden (Armoundas et al., 2007; Hu et al., 2011). Es ist nicht von der Hand zu weisen, dass eine Störung der Homöostase im Calciumhaushalt gravierende Folgen für das Herz und dessen Funktion hat.

Ein weiteres Augenmerk soll auf die Veränderung am  $\beta$ -Adrenorezeptor gelegt werden. Wie oben beschrieben, geht eine Herzinsuffizienz mit kompensatorisch erhöhten Katecholaminspiegeln einher. Daraus resultiert eine dauerhafte Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalwege. In der Folge kommt es zu veränderten Expressionen von G-Proteinen, von cAMP und von der PKA. Letztere erhöht damit die Phosphorylierungsrate von L-Type-Calciumkanälen, RyR2 und PLB (Lou et al., 2012). Außerdem wird der physiologisch am stärksten exprimierte  $\beta_1$ -Adrenorezeptor herunterreguliert, sodass  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptor im Verhältnis 1:1 vorliegen (Port und Bristow, 2001). Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine 24-stündige adrenerge Stimulation zu einer vermehrten SERCA-Expression in ventrikulären Kardiomyozyten führt. Die Kontraktilität blieb in diesem Versuchsansatz unbeeinflusst (Anwar et al., 2008).

### 1.4.3 Einflüsse von TGF- $\beta$ und JDP2 auf den Calciumhaushalt

Die Verbindung von Herzinsuffizienz und verändertem Calciumhaushalt macht einen Einfluss von TGF- $\beta$  und seinen Effektormolekülen auf den Calciumhaushalt wahrscheinlich. Bisher konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die Signaltransduktion von  $\beta$ -Adrenorezeptoren beeinflusst (Schlüter et al., 2000). Zudem hemmt es am nativen menschlichen Vorhofmyokard die SERCA-Expression und erhöht die NCX-Expression (Fliedner und Holubarsch, 2003). Dies konnte auch in TGF- $\beta$ -überexprimierenden Mäusen nachgewiesen werden. Auf zellulärer Ebene vermindert TGF- $\beta$  zudem die basale Kontraktilität in Form von verminderter relativer Verkürzung (Wenzel et al., 2010). Der AP-1-Inhibitor JDP2, der die Herzmuskelzelle vor dem kardialen Remodeling durch TGF- $\beta$  schützen kann, scheint ebenfalls negative Einflüsse auf das Calciumhandling zu haben. Eine siebenwöchige JDP2-Überexpression im Maus Herzen verschlechterte die Kontraktilität und supprimierte die SERCA-Expression der Kardiomyozyten auf mRNA-Ebene. Auch die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten war auf kontraktile Ebene vermindert. Die Expression von PLB und NCX blieben in diesem Model unbeeinflusst (Hill et al., 2013).

## 1.5 Fragestellung

Sowohl JDP2 als auch YB-1 sind in der Lage, hypertrophe und apoptotische Prozesse am Herzmuskel zu verhindern. Hill et al. (2013) zeigten jedoch, dass bei einer sieben Wochen langen Überexpression von JDP2 in transgenen Mäusen die aus dem Herzen isolierten Kardiomyozyten eine verminderte Kontraktilität, sowie eine geringere Ansprechbarkeit auf einen  $\beta$ -adrenergen Stimulus aufwiesen. Eine zusätzlich signifikante Reduktion der SERCA2-Expression wies auf einen Eingriff in den Calciumhaushalt hin. Unklar blieb bisher, ob der negative Einfluss von JDP2 auf die Kontraktilität ebenfalls bereits nach kurzfristiger JDP2-Überexpression auftritt und ob er über die Inhibition von AP-1 vermittelt wird. Des Weiteren war unklar, ob YB-1, das ebenso wie JDP2 protektiv gegen Hypertrophie und Apoptose wirkt, auch negative Effekte auf die Kontraktilität der Herzmuskelzelle hat.

In der vorliegenden Arbeit sollte die kontraktile Funktion nach einwöchiger JDP2-Überexpression am Herzen mittels echokardiographischer Untersuchungen in vivo sowie in isolierten Kardiomyozyten durch Kontraktionsmessungen in vitro analysiert werden. Zudem wurde der Einfluss der Überexpression auf die Proteine des Calciumhaushaltes analysiert. Des Weiteren sollte mit Hilfe von CRE-Decoy-Oligonukleotiden geprüft werden, ob negative Effekte auf die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen über spezifisches Abfangen von AP-1 vermittelt werden können.

Weiterhin sollte die basale und die  $\beta$ -adrenerg stimulierte Kontraktilität der Kardiomyozyten in vitro nach 24- und 48-stündiger YB-1-Überexpression bestimmt werden. Auch hier sollte zusätzlich der Einfluss von YB-1 auf die Calciumhomöostase überprüft werden. Mit Hilfe von SBE-Decoy-Oligonukleotiden und Antisense SMAD4-Oligos sollte zudem geprüft werden, ob eine spezifische SMAD-Inhibition die Kontraktilität der Herzmuskelzellen beeinträchtigt.

Zusammengefasst soll das Ziel dieser Arbeit sein, einen für das kardiale Remodeling protektiven Faktor zu finden, der die Wirkung von TGF- $\beta$  hemmt, ohne jedoch selber einen negativen Einfluss auf die Funktionalität des Herzmuskels zu haben. Zudem soll geprüft werden, welche Rolle die Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD in der JDP2- und YB-1-Wirkung spielen. Ein negativer Einfluss auf die Kontraktilität allein durch die Transfektion der hier überprüften Faktoren würde diese als potenzielles therapeutisches Target in der Herzinsuffizienztherapie in Frage stellen.



## 2. Material

### 2.1 Versuchstiere

Es wurden männliche Wistar-Ratten verwendet. Für Mausversuche dienten Tiere aus dem JDP2-Stamm, sowie deren nicht-transgene Geschwistertiere.

### 2.2 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammonium-Persulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Coomassie Brillant Blue G 250 (wt/vol)	Sigma, Taufkirchen
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Cytosin-β-Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Desoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetal calf serum (FCS)	PAA, Cölbe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
β-Glycerophosphat	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Baxter, Unterschleisheim
Isoprenalin	Roth, Karlsruhe
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Laminin	Roche, Mannheim
Medium 199 / Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt

NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	AppliChem, Karlsruhe
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
PhosSTOP	Roche, Mannheim
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Pierce Biotechnology, Rockfort, USA
SuperSignalRWest Pico / Femto	Pierce Biotechnology, Rockfort, USA
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Sigma, Taufkirchen
TRIS	Merck, Darmstadt
XT Reducing Agent	Bio-Rad, München
XT Sample Buffer	Bio-Rad, München

### 2.3 Zellkultur

Absauger	INTEGRA Biosciences, Biebertal
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Gewebehacker	Hugo Sachs Elekt, March-Hugsteten
Langendorff-Apparatur	Eigenbau Physiologie, Gießen
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkulturschalen	Falcon Becton Dickinson, USA

### 2.4 Kontraktionsmessung

Brutschrank (Modell 400)	Memmert, Schwabach
Exsikkator	Duran, Wertheim/Main
Interface	Scientific Instruments, Heidelberg
Mikroskop (Nikon TMS)	Nikon, Düsseldorf

Nylonnetz (Polyamid, 200µm)	NeoLab, Heidelberg
Observation Monitor	Philips, Hamburg
Oszillograph (GoldStar OS-9020A)	Scientific Instruments, Heidelberg
Stimulator T	Sachs Elektronik, March-Hugstetten
TissueChopper Mc Ilwain	GALA instruments, Bad Schwalbach
Zeilenkamera	Scientific Instruments, Heidelberg

## 2.5 Echokardiographie

Vevo 2100 imaging systems 43	Visualsonics, Toronto, Canada
------------------------------	-------------------------------

## 2.6 Westernblot

Blot-Kammer	Bio-Rad, München
Blot-Kassette	Bio-Rad, München
Chemilumineszenz-Messgerät	PeQLab GmbH, Erlangen
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München
Filterpapier	Biotec. Fischer, Reiskirchen
Glasplatten	Bio-Rad, München
Guss-Rahmen	Bio-Rad, München
Guss-Ständer	Bio-Rad, München
Hamilton-Spritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen
Nitrocellulose-Transfermembran	Whatman GmbH, Dassel
Taschenkämme	Bio-Rad, München

## 2.7 Antikörper

anti Aktin	mouse	#A4700	Sigma, Taufkirchen
anti Vinkulin	mouse	#V9131	Sigma, Taufkirchen
anti SERCA2	goat	#sc8095	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti NCX	rabbit	#sc32881	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti β <sub>1</sub> -Adrenorezeptor	rabbit	#sc568	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti Phospholamban	rabbit	#sc30142	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti P-Phospholamban	goat	#sc12963	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti YB-1	rabbit	#2749	Cell signaling, Danvers, USA
anti Rabbit IgG, HRP-linked		#AB16284	abcam, Cambridge, USA

anti Mouse IgG, HRP-linked	#sc2371	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti Goat IgG, HRP-linked	#sc2350	Santa Cruz Biotechnology, USA

## 2.8 Decoy Oligonukleotide und Antisense

SBEDecoy1	GTACATTGTCAGTCTAGACATACT
SBEDecoy2	AGTATGTCTAGACTGACAATGTAC
SBEDecoy3	GTACATTGTCAAGCTTGAATACT
SBEDecoy4	AGTATTCCAAGCTTGACAATGTAC
CRE	ATGACGTCATGACGTCATGACGTCA
mut. CRE	ATGACGATCTGCAGTACAGTCGTCA
Smad4-antisense 1	CATTGCTTGTCCGGTGT
Smad4-antisense 2	TACAATGCTCAGACAG
Antisense Random	GCATGCATGCATGCATC

Damit die SBE-Oligonukleotide SMAD-Proteine binden können, müssen die komplementären Stränge von SBE1 und SBE2 sowie SBE3 und SBE4 hybridisiert werden. Hierfür wurden gleiche Mengen der jeweiligen Oligonukleotide auf 95°C erhitzt und langsam abgekühlt. Bei einem bestimmten Temperaturniveau hybridisieren sich die beiden Stränge zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment.

Antisense SMAD4 1 und 2 wurden als Einzelstränge verwendet.

## 2.9 Sonstiges

Vortexer	IKA Works Inc., USA
Dauerschüttler	IKA Works Inc., USA
Bunsenbrenner	INTEGRA Biosciences, Biebertal
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
24- und 48-Well Platten	Falcon Becton Dickinson, USA
Zellschaber	Falcon Becton Dickinson, USA
Handschuhe	Ansell Healthcare, Belgien

## 2.10 EDV

BZ-Analyzer	Keyence, Neu-Isenburg
BZ-Observation	Keyence, Neu-Isenburg
MUCELL	Scientific Instruments GmbH,

Citavi 5.7  
i-control  
Image Quant Molecular Dynamics  
Magellan  
Microsoft Office Professional 2013®  
  
Microsoft Windows® (10)  
  
QuantityOne  
SPSS® Version 23

Heidelberg  
Swiss Academic Software, Schweiz  
Tecan, Crailsheim  
  
Tecan, Crailsheim  
Microsoft Deutschland,  
Unterschleißheim  
Microsoft Deutschland,  
Unterschleißheim  
BioRad, München  
SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA

## 2.11 Puffer, Lösungen und Medien

### 4x Lämmli

1 M Tris pH 6,8	1,5 ml
20 % SDS	4 ml
Glycerol abs.	2 ml
DTT	154 mg
10% Bromphenolblau	10 µl
demin. H <sub>2</sub> O	1,5 ml

### 10x Laufpuffer

Tris	30,3 g
Glycin	144 g
demin. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 1x Laufpuffer

10x Laufpuffer	100 ml
10 % SDS	10 ml
demin. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 10x Towbin-Puffer

Tris	30,3 g
Glycine	144 g
demin. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 1x Towbin-Puffer / Laufpuffer

10x Towbin	100 ml
Methanol	100 ml
demin. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 10x TBS

Tris	24,2 g
NaCl	175,3 g
demin. H <sub>2</sub> O	ad 2 l
pH 7,4	

### 1x TBS/Tween

10x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
demin. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 5% MMP/TBS

1x TBS/Tween	100 ml
Magermilchpulver	5 g

### 5% BSA/TBS

BSA	5g
1x TBS/Tween	100 ml

### Acrylamid 30 %

Acrylamid	29,2 g
Bisacrylamid	0,8 g
demin. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G250	0,1 % (wt / vol)
Methanol 96 %	5 % (vol / vol)
Ortho-Phosphorsäure, 85 %	10 % (vol / vol)
demin. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### Perfusionsmedium (Powell-Medium)

NaCl	110,0 mM
KCl	2,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,0 mM
Glukose	11,0 mM

### RIPA-Puffer

Ripa-Stocklösung	1000 µl
PMSF (0,1 M)	10 µl
EDTA (0,2 M)	5 µl
β-Glycerolphosphat (0,4 M)	100 µl
Pepstatin (0,1 M)	1 µl

### RIPA-Stocklösung

Tris pH 7,5	50mM
NaCl	150mM
Nonidet P 40	1%
Desoxycholol	0,5%
SDS	0,1%
demin. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 10 x PBS

KCl	2,68 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM
NaCl	137 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,09 mM

### Collagenase-Lösung

Perfusionsmedium	5 ml
Collagenase	20 mg
CaCl <sub>2</sub> 100mM	12,5 µl

### Vorplattiermedium Maus

CCT-Medium	x ml
Penicillin/Streptomycin	2 %
Laminin	1 %

### Vorplattiermedium Ratte

CCT-Medium	x ml
Penicillin/Streptomycin	2 %
fetal calf serum (FCS)	4 %

### Ausplattiermedium/ Waschmedium

CCT-Medium	x ml
Penicillin/Streptomycin	2 %

### CCT-Medium

M 199/HEPES-Stammlösung	x ml
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM
Taurin	5 mM
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µM

### M 199/HEPES-Stammlösung

M 199	9,62 g/l
HEPES	15,1 mM
demin. H <sub>2</sub> O	ad 10 l
pH 7,4	

### Sammelgel

Acrylamid/Bisacrylamid 30%	504 µl
demin. H <sub>2</sub> O	2,025 ml
Tris 1,5 M pH 6,8	375 µl
10 % SDS	30 µl
10 % APS	30 µl
TEMED	16 µl



Trenngel 10 %

Acrylamid/Bisacrylamid 30%	2,64 ml
demin. H <sub>2</sub> O	3,36 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2 ml
10 % SDS	80 µl
10 % APS	20 µl
TEMED	16 µl

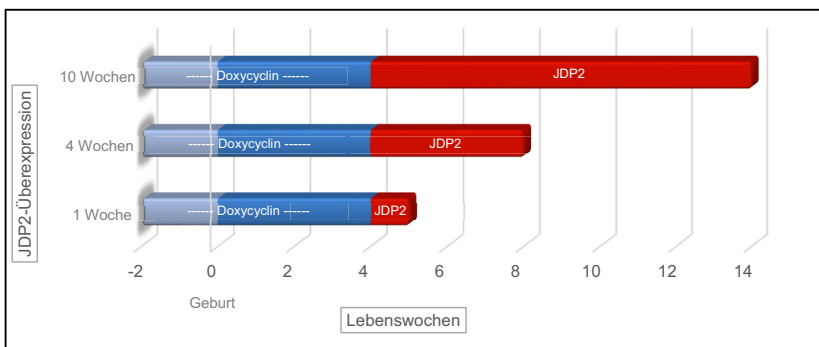
### 3. Methoden

#### 3.1 Isolierung der Kardiomyozyten aus Gesamtherzen

##### 3.1.1 Versuchstiere

Für die Maus-Versuche wurden weibliche und männliche Mäuse des doppelt transgenen Mäusestamms JDP2 sowie deren nicht transgenen Geschwistertiere verwendet. Die Geschlechterverteilung der verwendeten Tiere war annähernd 1:1.

In den Versuchstieren wird unter  $\alpha$ -MHC-Kontrolle verstärkt ein Transaktivator exprimiert, der durch Bindung an den Promotor vor dem JDP2-Gen die Transkription dieses Gens und somit die Synthese von JDP2 aktiviert. Das Antibiotikum Doxycyclin ist ein spezifischer Inhibitor des Transaktivators. Somit kann die JDP2-Überexpression durch Fütterung der Mäuse mit Doxycyclin reguliert werden (Kehat et al., 2006). Die Tetrazyklin-Gabe erfolgte durch „Dox Diet-Sterile“-Futter der Firma Altromin® in der Konzentration 200 mg/kg Körpergewicht. Um einen negativen Einfluss von JDP2 während der Embryonalentwicklung der Mäuse zu verhindern, wurden für die verschiedenen Versuche die Zuchtpaare und ihre Nachkommen bis vier Wochen nach ihrer Geburt mit Doxycyclin gefüttert. Im Anschluss wurde die Doxycyclin-Fütterung für eine, für vier oder für zehn Wochen abgesetzt, sodass JDP2 für die jeweilige Anzahl an Wochen überexprimiert wurde. Um einen Einfluss allein durch die Doxycyclin-Gabe auszuschließen, erhielten nicht-transgene Tiere in der Kontrollgruppe das gleiche Futterschema.



**Abbildung 3:** Zeitliche Regulation der JDP2-Überexpression mittels Doxycyclin-Fütterung in den transgenen Mäusen

Die Ratten-Kardiomyozyten wurden aus 3-4 Monate alten und 300-400 g schweren Wistar-Ratten isoliert. Die Zucht der Versuchstiere erfolgte im Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Ratten hatten freien Zugang zu Nahrung (Altromin®) und Wasser. Es wurden nur Tiere männlichen Geschlechts verwendet.

### 3.1.2 Präparation der Versuchstiere

Da sich die Präparation der Herzen von Mäusen und Ratten lediglich marginal unterschied, wird im Folgenden beispielhaft die Mäuse-Präparation beschrieben. Bei Abweichungen zur Ratten-Präparation wird dieses kenntlich gemacht.

Die Mäuse wurden mit Isofluran (5%) narkotisiert und anschließend wurde das Rückenmark durchtrennt. Der Thorax wurde eröffnet und das Herz mitsamt beiden Lungen herausgenommen und in eine Petrischale mit kaltem NaCl (0,9%) gegeben. Die Lungen und das Mediastinum wurden abgeschnitten und die Aorta ascendens freipräpariert und anschließend mit zwei Pinzetten über eine Kanüle gestülpt und dort fixiert. Dabei war darauf zu achten, dass die Kanüle nicht über die Aortenklappe hinausragt, da sonst die Koronarperfusion nicht mehr möglich ist. Die Kanüle wurde nun an die Langendorff-Apparatur angebracht, die mit 50 ml Perfusionsmedium Luft frei gefüllt war. Anschließend wurde das Herz mit 5 ml Perfusionsmedium retrograd perfundiert (Ratte: 40 ml Perfusionsmedium) und das Blut herausgespült. Die korrekte Lage der Kanüle konnte durch die Volumenzunahme und das Verblässen der Herzkranzgefäße überprüft werden. Im Anschluss wurden 5 ml einer Collagenase-Lösung in das System gegeben (Ratte: 40 ml Collagenase-Lösung) und die Perfusion für 25 Minuten mit ca. 1 Tropfen/Sekunde gestartet. Nach diesem Verdau wurden die Ventrikel von den Vorhöfen und abgehenden Gefäßen abgeschnitten und sowohl quer als auch längs mithilfe des Gewebhackers zerhackt. In einem 50 ml Röhrchen erfolgte ein Nachverdau in 5 ml des Perfusionsmediums aus der Langendorff-Apparatur (Ratte: 30 ml Perfusionsmedium) für 5 Minuten. Während dieser Zeit wurde mehrmals auf- und abpettiert. Nach dem Nachverdau wurde der Zellbrei samt Lösung, durch eine Nylongaze gefiltert und in einem 10 ml Röhrchen aufgefangen. Dieses wurde für eine Minute bei 400 U/min zentrifugiert (Ratte: 3 Minuten bei 400 U/min) und im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde dann in vier Einzelschritten in 2 ml Perfusionsmedium (Ratte: 10 ml Perfusionsmedium) mit jeweils 125 µM, 250 µM, 500 µM und 1000 µM CaCl<sub>2</sub> gelöst. Zwischen den einzelnen Schritten wurde nochmals bei 300 U/min für eine Minute zentrifugiert (Ratte: 2 Minuten bei 400 U/min). Nach dem letzten Konzentrationsschritt und einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet unter

der Sterilbank in vorgewärmtes Ausplattiermedium aufgenommen und je 1 ml auf vorplattierte 35 mm Gewebekulturschalen (Falcon Nr. 3001) gegeben. Auf diese Schalen wurde mindestens zwei Stunden vorher oder am Vortag 1 ml Vorplattiermedium auf Lamininbasis gegeben (Ratte: FCS-basiert). Nach einer Stunde Anheftungszeit in den Kulturschalen konnten die Zellen inkubiert oder den Kontraktionsmessungen zugeführt werden.

## 3.2 Behandlung der Kardiomyozyten

### 3.2.1 Adenovirale YB-1-Überexpression

Für die Überexpression von YB-1 wurden die ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte mit einem adenoviralen YB-1-Konstrukt infiziert. Hierfür wurden die Viren unter sterilen Bedingungen im S2-Labor in das Kulturmedium gegeben. Eine Infektion mit 1000 MOI reicht aus, um eine siebenfach erhöhte Expression in Herzmuskelzellen innerhalb von 24 Stunden zu erzielen. Diese Expressionsrate reicht aus, um die Herzmuskelzellen vor Apoptose- und Hypertrophieinduktion zu schützen (Partsch, 2010). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem GFP-Adenovirus infiziert. Mit Hilfe des *Green Fluorescent Protein* (GFP) lässt sich die korrekte Infektion der Zelle mit dem Virus unter einem Fluoreszenzmikroskop überprüfen. Andererseits sollen durch die GFP-Infektion negative Einflüsse auf die Zelle allein durch die adenovirale Infektion ausgeschlossen werden. Zudem wurden uninfizierte Zellen als Kontrolle verwendet. Die Kontraktionsmessungen und Proteinbestimmungen erfolgten nach 24- und 48-stündiger Infektion.

### 3.2.2 Einsatz von Decoy-Oligonukleotiden oder Antisense-Oligos

Für die Transformation von Kardiomyozyten mit Decoy-Oligos wurden die Zellen mit 500 nM Decoy-Oligonukleotiden mit spezifischen Bindungsstellen für SMAD (SBE 1/2) oder AP-1 (CRE) für 24 Stunden inkubiert. Als Kontroll-Decoys wurden entsprechend SBE 3/4 und mut. CRE verwendet. Diese enthalten keine spezifische Bindungsstellen für AP-1 und SMAD, sollen jedoch einen Effekt allein durch die Transfektion ausschließen.

Um die Translation von SMAD4 zu unterbinden, wurden die Kardiomyozyten mit 500 nM Antisense-SMAD4 für 24 und 48 Stunden inkubiert. Als Kontroll-Decoy wurde Antisense-random verwendet.

### 3.3 Transthorakale Echokardiographie in vivo

Die kardiale Funktion der Mäuse wurde mittels transthorakaler Echokardiographie bestimmt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der literarischen Empfehlungen (Liu und Rigel 2009). Nach initialer Betäubung des Tieres mit 5% Isofluran wurde die Anästhesie mit 2% während der Messung aufrechterhalten. Die Brust wurde rasiert und die Maus auf einem Wärmekissen in Rückenlage positioniert. Anschließend wurden zweidimensionale sowie M-mode- und B-mode-Untersuchungen gemäß der Kriterien der *American Society of Echocardiography* mit dem Vevo 2100 imaging systems (Visualsonics, Toronto, Canada) durchgeführt. Für die Messungen wurde ein 18 bis 38 MHz Schallkopf (MS400) verwendet. Die Durchführung erfolgte verblindet durch eine erfahrene Mitarbeiterin des Instituts für Physiologie in Gießen.

Für die Analysen wurden unter EKG-Kontrolle drei regelmäßige Herzzyklen gemessen und anhand des Mittelwertes der statistischen Auswertung zugeführt. In der parasternalen kurzen Achse wurden in der Systole und in der Diastole die anteriore und inferiore Wanddicke, sowie der endsystolische und enddiastolische Durchmesser des linken Ventrikels auf Höhe der Papillarmuskeln bestimmt. Die septale und posteriore Wanddicke wurden in der langen Achse von parasternal auf Höhe der Klappen gemessen. Die systolische und diastolische Ventrikellänge wurde in der langen Achse bestimmt. In der kurzen Achse wurde zudem das enddiastolische und endsystolische Volumen bestimmt. Längen- und Volumenparameter wurden mittels B-Mode gemessen. Die Wanddicke wurde mit Hilfe des M-Modus zwischen den epikardialen und endokardialen Grenzen des Ventrikels analysiert.

Mit Hilfe dieser Messungen wurden folgende funktionelle Parameter bestimmt:

Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen =  $LVedV$

Linksventrikuläres endsystolisches Volumen =  $LVesV$

Schlagvolumen des linken Ventrikels =  $LVedV - LVesV$

Relative Auswurfraction (Ejektionsfraction, in %) =  $\frac{\text{Schlagvolumen}}{LVedV} \times 100$

Linke Ventrikellänge endsystolisch =  $LVesL$

Linke Ventrikellänge enddiastolisch =  $LVedL$

Relative Verkürzung (in %) =  $\frac{LVedL - LVesL}{LVedL}$

Herzminutenvolumen (in ml/min) =  $\text{Schlagvolumen} \times \text{Herzfrequenz}$

Die Maus wurde im Anschluss an die Messung nochmal mit 5% Isofluran anästhesiert und das Rückenmark wurde durchtrennt. Das Herz wurde, wie im Kap. 3.1.2 beschrieben, gewonnen und anderen Versuchen zugeführt.

## 3.4 Kontraktionsmessung in vitro

### 3.4.1 Stimulation und Steuerung

Die Gewebekulturschalen (35 mm) wurden nach der Anheftungszeit der Kardiomyozyten in eine Einlassung auf dem Objektisch eines Mikroskops gestellt. Die Schale wurde mit einem speziellen Deckel verschlossen. In diesem waren zwei Drähte eingelassen, die das Plastik jeweils zweimal durchstoßen. Die Durchstoßlöcher waren so angeordnet, dass sie in der runden Schale eine möglichst große Fläche einschlossen. Die Drähte wurden soweit durch die Löcher geführt, bis sie senkrecht in das Kulturmedium eintauchten, dann rechtwinklig gebogen und bis zum benachbarten Loch geführt, durch welches dieser, nachdem er wiederum rechtwinklig gebogen wurde, das Plastik wieder verließ. So entstanden zwei sich parallel gegenüberstehende Elektroden, die beide in das Medium eintauchten und eine möglichst große Fläche der Schale abdeckten. Die Drähte wurden an das Stimulationsgerät angeschlossen und wurden somit zu Anode und Kathode. Durch die Drahtform konnte ein annähernd homogenes elektrisches Feld generiert werden, bei dem der Strom nahezu gleichmäßig zwischen den Drähten und durch das Medium floss.

Die Stimulation der Zellen erfolgte durch biphasische Stromstöße, die im Abstand von 0,5 Sekunden von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst wurden. Eventuell auftretende Spontankontraktionen wurden dadurch vereinheitlicht. Zellen, die die vorgegebene Frequenz nicht annahmen, wurden bei den Messungen nicht berücksichtigt.

### 3.4.2 Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Geräteanordnung der Firma *Scientific Instruments GmbH* aus Heidelberg erfasst. Durch das Mikroskop konnten die Zellen in den Schalen auf dem Objektisch beobachtet und ausgewählt werden. Zudem waren an dem Mikroskop zwei Kameras angeschlossen. Durch die eine war es möglich, das Okularbild auf einen Bildschirm zu übertragen. Bei der anderen handelte es sich um eine Zeilenkamera, die in der Lage war, hell-dunkel- bzw. dunkel-hell-Übergänge zwischen den Zellen und dem Hintergrund zu erkennen. Um nun die Kontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste man diese so positionieren, dass die Längsseite der Zelle parallel zur Längsrichtung der Kamerazeile war. Die Erfassung der zu untersuchenden Zelle erfolgte also durch die Bewegung des Objektisches und durch die Drehung der Zeilenkamera, damit die Zellgrenzen erfasst werden konnten.

Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde über ein Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1 ms/cm eingestellt, der Vertikalverstärker war auf 5 V/div geregelt. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert, so dass man ein stehendes Bild erhielt. Wenn nun die Zeilenkamera verschiedene Helligkeiten wahrnahm, wurden diese auf dem Oszillographen als verschieden starke y-Auslenkungen dargestellt. Die Zellgrenzen konnten durch sich horizontal bewegende Amplituden identifiziert werden. Somit konnte man die Zellkontraktionen auf dem Oszillographen beobachten. Dieser wurde als Zweikanaloszillograph betrieben. An einem anderen Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wurde sie abgelesen, stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dar. Wurde die Spannung nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in der Höhe Null. Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface folgendermaßen getriggert: Man setzte eine Triggermarke des Interfaces, die ebenfalls vom Interface auf dem Oszillographen durch eine Amplitude sichtbar gemacht wurde, vor eine Amplitude des Zellbildes. Erreichte nun die ansteigende Spannung des Zellbildes (sichtbar gemacht durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch die Triggermarke vorgegeben wurde (sichtbar gemacht durch die Amplitude der Triggermarke), so begann der Oszillograph die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Am Bildschirm des Oszillographen sah man an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe. Veränderte nun die Amplitude des Zellbildes im Zuge der Kontraktion ihre Position, so veränderte sich auch die Position, an der der Triggerwert erreicht wurde. Damit veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Im bewegten Bild sah man, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Diese Horizontale entsprach der Zellgrenze. An der anderen Zellkante wurde auf gleiche Weise verfahren und somit konnte man die Zelllänge und die Kontraktion an der sich bewegenden Horizontalen beobachten. Die Information Interface-Spannung „An“ bzw. Interface-Spannung „Aus“ wurde vom Oszillographen an das Interface weitergegeben, welches diese wiederum an einen Computer weiterleitete. Auf diesem Computer lief das Programm *MUCCELL* der Firma *Scientific Instruments GmbH*. Dieses Programm registrierte aus der Information Spannung „An“ bzw. „Aus“ die Länge der Zelle und erstellte einen Graphen mit der absoluten Zelllänge zu einem bestimmten Zeitpunkt. Der Computer erkannte dabei die Längenverkürzung als Beginn der Kontraktion. Hierbei nahm er bis zu fünf Kontraktionen auf und ermittelte für folgende Parameter den Mittelwert der einzelnen Messungen:

- Diastolische Länge in Mikrometern
- Systolische Länge in Mikrometern
- Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (Con V)
- Maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (Rel V)
- Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Verkürzung in Millisekunden (*time-to-peak*, TTP)
- Zeit bis die Zelle um 50% verkürzt ist in Millisekunden (50%-TTP)
- Mittlere Verkürzungsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (*mean shortening*)

Zudem wurde der Quotient aus systolischer und diastolischer Zelllänge errechnet, der der relativen Zellverkürzung (dL/L) in Prozent entspricht.

### 3.4.3 Messprotokoll

Jede Zelle wurde, wie oben beschrieben, viermal bei einer Frequenz von 2 Hz gemessen. Zwischen den Messungen wurde jeweils 15 Sekunden gewartet. Die vier Messwerte pro Zelle wurden in dem Programm Excel zusammengefasst und jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Median errechnet. Fehlerhafte Messungen konnten an dieser Stelle aus der Datensammlung entfernt werden. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die relative Zellverkürzung (dL/L), die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (Con V) und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V) gelegt.

Pro Schale wurden insgesamt 9 Zellen gemessen. Aus jeder Präparation eines Ratten-Herzens wurden als Kontrolle eine gewisse Anzahl an Schalen unbehandelt gemessen. Bei den Mäuse-Versuchen galten die Wildtyp-Mäuse als Kontrolle.

## 3.5 Proteinnachweis

### 3.5.1 Aufbereitung der Proben durch RIPA-Puffer

Die Kardiomyozyten aus den Ventrikeln der Maus- und Rattenherzen wurden teils direkt nach der Inkubation beziehungsweise Infektion, teils direkt nach den Kontraktionsmessungen mit *radio immunoprecipitation assay buffer* (RIPA-Puffer) versetzt. Dieser lysiert die Zellen unter Erhalt sämtlicher Proteine durch Hinzufügen von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren. Die Ventrikel eines Herzens wurde in 100 µl RIPA-Puffer aufgenommen.

Die auf der Petrischale angehefteten Kardiomyozyten wurden zunächst zweimal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 4°C kaltem RIPA-Puffer versetzt. Um eine Hitzedenaturierung zu verhindern, wurde anschließend auf Eis gearbeitet. Nach 30



Sekunden Reaktionszeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und das RIPA-Zell-Gemisch in die nächste Petrischale gegeben, um gleiche Versuchskategorien zusammenzufassen. Letztendlich wurde das Gemisch in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4°C und 12.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, das Zellpellet dagegen wurde verworfen.

Die Mausherzen wurden für den Proteinnachweis im Ganzen in Stickstoff gemörsert und anschließend in 100 µl RIPA-Puffer aufgenommen.

### 3.5.2 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Um den unterschiedlichen Proteingehalt in den Proben in der darauffolgenden Gelelektrophorese angleichen zu können, wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt (Bradford-Test). Hierbei werden sich die Bindungseigenschaften des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 zunutze gemacht. Ungebunden ist der Farbstoff rot und hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. In Anwesenheit von kationischen oder unpolaren Bindungsstellen von Proteinen bildet er mit diesen Komplexe und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595nm.

Die Zunahme des Extinktionskoeffizienten in diesem Bereich kann photometrisch bestimmt und in Bezug zu einer Standardproteinreihe gesetzt werden. Hier wurde eine Standardreihe aus BSA gewählt mit den Konzentrationen 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 Milligramm pro Milliliter. Durch die resultierenden Standardgerade konnte nun die Proteinkonzentration mithilfe der Extinktion der Probe sowie der eventuellen Verdünnung der Proben bestimmt werden.

In einer Mikrotiterplatte erfolgte die Doppelbestimmung der Proteinmenge. Hierfür wurden jeweils 2 x 5 µl der einzelnen BSA-Konzentrationen, sowie 2 x 5 µl der Proben auf die Platte pipettiert und mit 200 µl der Bradford-Reagenz versetzt. Färbt sich anschließend eine Probe bereits subjektiv stärker blau als die höchste Konzentration der Standardreihe, wurde die Probe verdünnt.

### 3.5.3 Vorbereitung der Proben

Anhand der bestimmten Proteinkonzentration wurde das benötigte Volumen der Probe errechnet, sodass jede Probe die gleiche definierte Proteinmenge enthält. Je nach Volumen der Taschen der Gele (s. unten) wurden die Proben mit RIPA-Puffer versetzt und somit auf das gleiche Volumen gebracht. Anschließend wurden 0,25 VT 4x Lämmli

und 0,04 VT 0,5M DTT hinzugegeben. Die fertigen Proben wurden für 10 Minuten bei 95°C in einem Heizblock denaturiert.

### 3.5.4 SDS-PAGE

Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) ist in der Lage die quartäre und tertiäre Struktur von Proteinen zu zerstören, indem es nicht-kovalente Bindungen bricht. DTT wird zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen zugegeben. Außerdem bindet sich SDS an die Hauptketten der Proteine und verleiht ihnen eine stark negative Ladung, die die ursprüngliche Ladung der Proteine egalisiert. Somit ist die Größe des Proteins annähernd proportional zur Ladung. In einem elektrischen Feld wandern die negativen Proteine in Richtung Anode (Pluspol). Das verwendete Polyacrylamid-Gel weist eine gleichmäßige Porenstruktur auf, sodass große Proteine länger brauchen, um durch das Gel zu gelangen als kleine Proteine.

Für die Gelelektrophorese wurde die diskontinuierliche Methode nach Lämmli gewählt. Hierbei wird dem Gel, in dem die Proteine aufgetrennt werden (Trenngel), zunächst ein Sammelgel vorausgesetzt. Dieses unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung von dem Trenngel und enthält größere Poren, sodass sowohl große als auch kleine Proteine etwa gleich schnell durch das Gel laufen. Dies gewährleistet eine Komprimierung der Proben am Anfang des Trenngels.

### 3.5.5 Durchführung der Gelelektrophorese

Zunächst werden zwei Glasplatten, die von 1 mm oder 1,5 mm dicken Spacern voneinander getrennt sind, in eine Haltevorrichtung eingefügt. Der Raum zwischen den Platten ist nach oben und unten offen, wurde für das Gießen der Gele jedoch nach unten hin mittels eines Gummikissens verschlossen. Das Trenngel wurde gemischt, zwischen die Glasplatten gegossen und dann bei Raumtemperatur für 30 Minuten polymerisiert. Währenddessen wurde zum Oxidationsschutz auf das Gel 0,1 % SDS gegeben. Nach abgelaufener Zeit wurde das SDS entfernt und das Sammelgel bis zum Kantenrand gegossen. Anschließend wurden die Kämme eingefügt, die möglichst ohne Luftblasen mit dem Gel abschlossen. Es folgte eine weitere Polymerisation für 20 Minuten.

Das Gel wurde mit den Glasplatten anschließend in eine Elektrodeneinheit eingespannt, die mithilfe eines U-förmigen Gummirings einen Raum bildete, der nach oben hin offen war sowie nach unten hin durch das Gel permeabel war. Diese Einheit wurde in die

Elektrophoresekammer eingefügt und sowohl der kleine Raum der Elektrodeneinheit als auch der große Raum der Kammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Anode befand sich in der großen Kammer, die Kathode in der kleinen. Durch Anlegen einer Spannung von 200 V erfolgte der Stromfluss durch das Gel und die negativ geladenen Proteine wanderten in Richtung Anode.

Nach Entfernung der Kämme wurden die entstandenen Taschen mithilfe einer Hamilton Spritze mit dem Laufpuffer gespült und befüllt. In die erste Tasche wurden 5 µl eines Molekulargewichtsmarkers gegeben, die restlichen Taschen mit den Proben gefüllt. Am unteren Ende des Gels, der an die große Kammer grenzt, wurden eventuelle Luftblasen entfernt, um einen direkten Kontakt des Gels mit dem Laufpuffer zu gewährleisten.

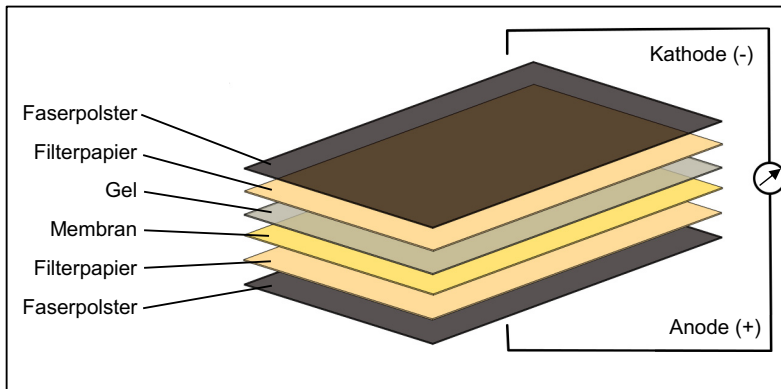
Die Auftrennung der Proteine dauerte bis zu einer Stunde und konnte anhand des Markers kontrolliert werden.

### 3.5.6 Westernblot

Zum weiteren Nachweis wurden die Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran mithilfe des Westernblot-Verfahrens übertragen. Hierbei wird das fertige Gel mit der Membran und zwei Filterpapieren sandwichartig gestapelt und durch einen Puffer befeuchtet. Anschließend wird ein Strom von 400 mA senkrecht zum Sandwich angelegt. Die Membran sollte dabei an der Anodenseite, das Gel dagegen auf der Kathodenseite liegen, damit die negativen Proteine auf dem Gel auf die Membran entlang des elektrischen Feldes übertragen werden.

Zunächst wurden die Filterpapiere und die Blotmembran in der Größe des Gels ausgeschnitten, anschließend gestapelt und befeuchtet in 1x Towbin-Puffer. Durch mehrmaliges Ausstreichen wurden Luftblasen zwischen den Komponenten entfernt. Das Sandwich wurde dann zwischen zwei Faserpolster gegeben und in einer Kassette eingespannt. Diese wurde dann in den Blottank gegeben, der ebenfalls mit 1x Towbin-Puffer gefüllt war und mithilfe eines Kühlakkus gekühlt wurde. Das Blotverfahren erfolgte für etwa 1,5 Stunden.

Die fertige Blotmembran wurde einmal in 1x TBS/Tween gewaschen und anschließend eine Stunde in 5% MMP/TBS geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der erfolgreiche Proteintransfer sowie die Position bestimmter Molekulargewichte konnten anhand des Markers bestimmt werden.

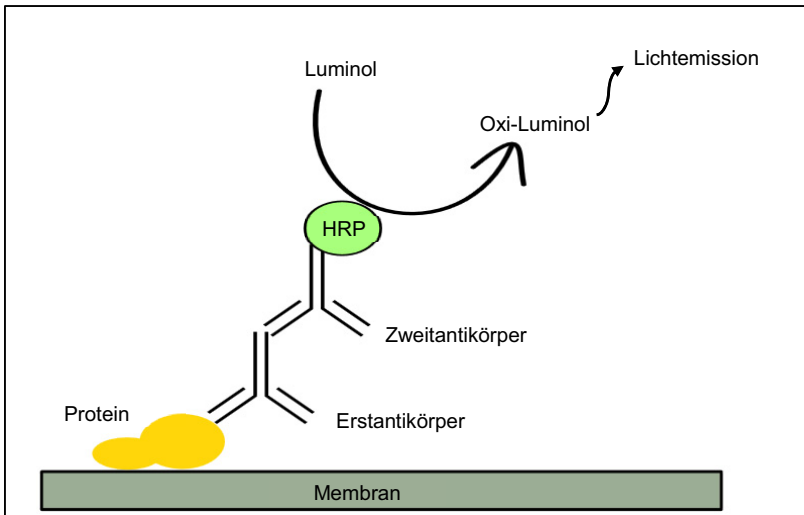


**Abbildung 4:** Schema des Blotverfahrens

### 3.5.7 Immunfärbung

Bei diesem Verfahren macht man sich die Antigen-Antikörper- bzw. Antikörper-Antikörper-Interaktion zunutze. Dabei ist das Antigen das nachzuweisende Protein, welches von einem Erstantikörper spezifisch gebunden wird. Dieser wird wiederum von einem Zweitantikörper gebunden. An dem Zweitantikörper ist das Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) gebunden, welches in der Lage ist, Substrate, wie Luminol, zu oxidieren. Die oxidierte Form des Luminols ist leuchtend und somit können die Proteine indirekt sichtbar gemacht werden.

Nachdem die Blotmembran geblockt wurde, wurde sie nochmals in 1x TBS/Tween gewaschen und dann über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper in 5 ml 5% BSA/TBS auf dem Taumler inkubiert. Anschließend folgten drei Waschvorgänge für 10 Minuten in 1x TBS/Tween. Der Zweitantikörper wurde in 5% MMP/TBS gelöst und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Anschließend folgten drei weitere Waschvorgänge. Zum Anfärben der Proteinbanden wurde die Membran eine Minute in ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) geschwenkt, welche Luminol enthielt. Die Lichtreaktion durch die Oxidation des Luminols wurde mithilfe eines Chemilumineszenz-Aufnahmegeräts detektiert. Als Referenz des Lichtsignals der Banden wurde ein unbeeinflusstes Protein (housekeeping Gen), wie Aktin oder Vinkulin, nachgewiesen, welches stets in gleichen Konzentrationen vorkommt. Dadurch konnten ebenfalls Schwankungen der Proteinmenge ausgeglichen werden. Die Auswertung der Immunfärbung erfolgte durch das Programm *Quantity@one* von Bio-Rad.



**Abbildung 5:** Schema Immunfärbung

Erstantikörper

5% BSA/TBS 5 ml  
 mouse-anti-Aktin-Antikörper 5 µl

5% BSA/TBS 5 ml  
 rabbit-anti-YB1-Antikörper 10 µl

5% BSA/TBS 5 ml  
 goat-anti-SERCA-Antikörper 5 µl

5% BSA/TBS 5 ml  
 rabbit-anti-β1-Adrenorezeptor-Antikörper 5 µl

5% BSA/TBS 5 ml  
 mouse-anti-Vinkulin-Antikörper 5 µl

### Zweitantikörper

5% MMP/TBS 5 ml

anti-mouse-HRP-Antikörper 5  $\mu$ l

5% MMP/TBS 5 ml

anti-rabbit-HRP-Antikörper 2,5  $\mu$ l

5% MMP/TBS 5 ml

anti-goat-HRP-Antikörper 5  $\mu$ l

### 3.6 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus n verschiedenen, unabhängigen Messungen bzw. Präparationen durchgeführt. Wurden zwei Gruppen verglichen, wurde der konventionelle t-Test zur statistischen Auswertung verwendet. Bei Vergleichen zwischen drei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließenden Student-Neumann-Keuls-Test als post-hoc-Test verwendet. Daten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2013® (Microsoft Corp., USA) und SPSS® Version 23 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA) ausgewertet.

## 4. Ergebnisse

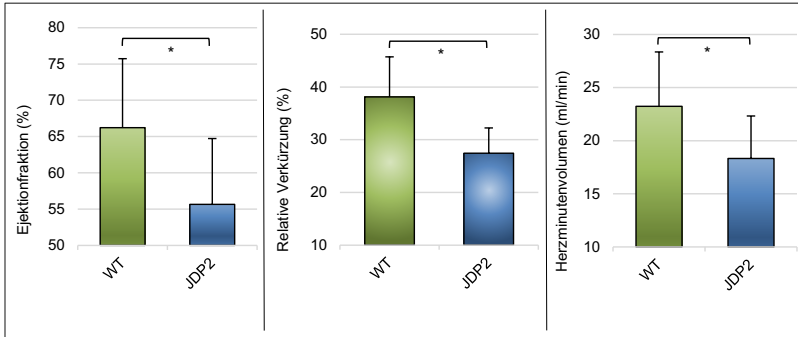
Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Inhibitoren der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD Kardiomyozyten vor Apoptose und Hypertrophie schützen. Unklar war bisher, ob diese Inhibition ebenfalls Einfluss auf die Kontraktilität hat. Dies wurde im Folgenden untersucht. Ebenfalls wurde die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes analysiert.

### 4.1 Untersuchung der JDP2-Mäuse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen an den transgenen Mäusen nach JDP2-Überexpression aufgeführt. JDP2 ist ein Transkriptionsfaktor, der AP-1-abhängige Gene inhibiert. Es wurde bereits gezeigt, dass eine JDP2-Überexpression für sieben Wochen einen negativen Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten hat (Hill et al., 2013). Um negative Nebeneinflüsse der langen JDP2-Überexpression auszuschließen, wurden echokardiographische in vivo Untersuchungen sowie Kontraktionsmessungen in vitro auf Ebene der isolierten ventrikulären Kardiomyozyten nach einer Woche Überexpression durchgeführt. Zusätzlich wurde die Expressionsrate der Proteine des Calciumhaushaltes mittels Westernblot nach einer, vier und zehn Wochen Überexpression durchgeführt.

#### 4.1.1 Echokardiographischer Nachweis einer kardialen Dysfunktion nach einer Woche JDP2-Überexpression

Die echokardiographische Untersuchung der Herzen in vivo konnte eine deutliche kardiale Funktionseinschränkung der JDP2-Mäuse im Vergleich zu den nicht-transgenen Wildtyp-Tieren zeigen (Abb. 6). Die relative Auswurfraction des linken Ventrikels (Ejektionsfraction) war unter JDP2 signifikant reduziert ( $55,66\% \pm 9,07$  JDP2 vs.  $66,23\% \pm 9,5$  WT). Auch die relative Verkürzung des linken Ventrikels während der gesamten Herzaktion war signifikant geringer als bei den Wildtyp-Mäusen ( $27,44\% \pm 3,79$  JDP2 vs.  $38,12\% \pm 7,63$  WT). Eine Reduktion des Herzminutenvolumens konnte am Herzen der JDP2-Mäuse ebenfalls nachgewiesen werden ( $18,33$  ml/min  $\pm 4,02$  JDP2 vs.  $23,24$  ml/min  $\pm 5,13$  WT). Dargestellt sind lediglich die signifikanten Ergebnisse aus der gesamten echokardiographischen Untersuchung.



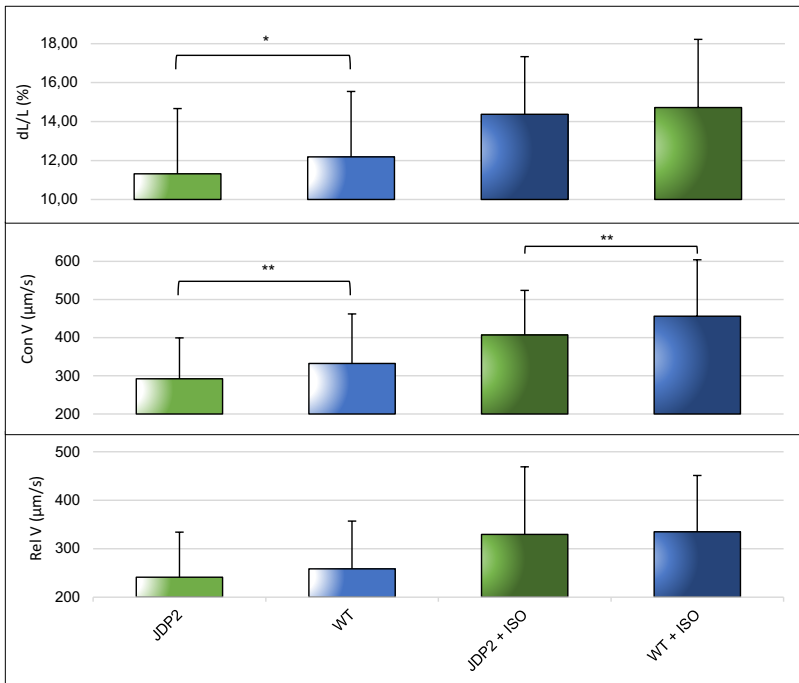
**Abbildung 6:** Echokardiographische Untersuchung der kardialen Funktion der transgenen Mäuse nach einer Woche JDP2-Überexpression, sowie Wildtyp-Mäusen als Kontrolle mittels *Vevo 2100 imaging systems*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für den relativen linksventrikulären Auswurf (Ejektionsfraktion [%]), die relative Verkürzung des Herzens (%) und das Herzminutenvolumen (ml/min). Nach T-Test: \* $p < 0,02$  (Wildtyp:  $n=16$ ; JDP2:  $n=10$ )

#### 4.1.2 Reduktion der Kontraktilität in vitro durch Überexpression von JDP2 für eine Woche

Die Kardiomyozyten der transgenen Mäuse wurden nach einer Woche JDP2-Überexpression aus den Herzen isoliert und mit Hilfe einer Zeilenkamera die Kontraktilität analysiert. Als Kontrolle wurden die Kardiomyozyten von gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen gemessen. Zusätzlich wurden beide Gruppen mit Isoprenalin (ISO, 10 nM)  $\beta$ -adrenerg stimuliert (Abb. 7).

Bei den basalen Kontraktionsparametern zeigte sich eine signifikante Reduktion der relativen Zellverkürzung ( $11,32\% \pm 3,35$  JDP2 vs.  $12,19\% \pm 3,39$  WT) und der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit ( $292 \mu\text{m/s} \pm 107$  JDP2 vs.  $332 \mu\text{m/s} \pm 130$  WT) bei den JDP2-Zellen. Nach Stimulation der Zellen mit Isoprenalin zeigte sich ein adäquater Anstieg der Kontraktilität bei JDP2- und Wildtyp-Tieren. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit zwischen JDP2- und Wildtyp-Mäusen unter Isoprenalin beobachtet werden ( $407 \mu\text{m/s} \pm 117$  JDP2 vs.  $456 \mu\text{m/s} \pm 148$  WT).





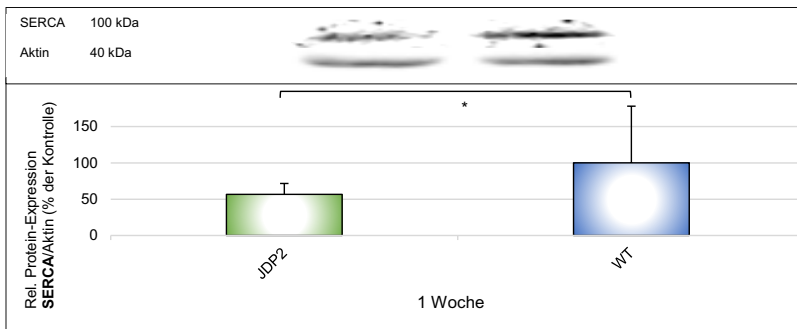
**Abbildung 7:** Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der transgenen Mäuse nach einer Woche JDP2-Überexpression mit denen der Wildtyp-Mäuse bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Zusätzlich wurden die Zellen mit Isoprenalin (10 nM) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]), die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit (Con V) und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V). Nach T-Test: \*p<0,03; \*\*p<0,01 (n=100 Zellen, aus 4 Präparationen)

#### 4.1.3 JDP2-Überexpression beeinflusst die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes

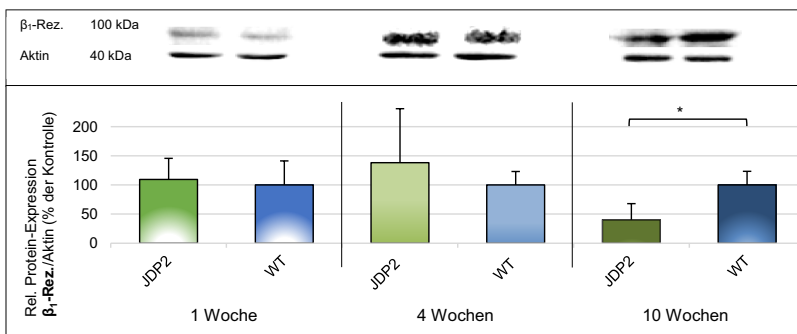
Die Proteine für die Westernblots wurden aus den Herzen von transgenen Mäusen isoliert, nachdem diese JDP2 für eine Woche, für vier Wochen und für zehn Wochen überexprimiert hatten. Als Kontrollgruppe wurden Wildtyp-Mäuse mit gleicher Behandlung verwendet. Es wurde die Expression von NCX,  $\beta_1$ -Adrenorezeptor und Phospholamban untersucht. Bei letzterem wurde zusätzlich noch der Phosphorylierungsstatus analysiert. Die SERCA wurde lediglich nach einer Woche JDP2-Überexpression bestimmt.

Eine signifikante Runterregulation der SERCA (Abb. 8) nach einer Woche Überexpression konnte gezeigt werden ( $56,6\% \pm 15,0$  JDP2 vs.  $100\% \pm 78,1$  WT). Bei der Expression vom  $\beta_1$ -Rezeptors (Abb. 9) zeigte sich eine signifikante Runterregulation

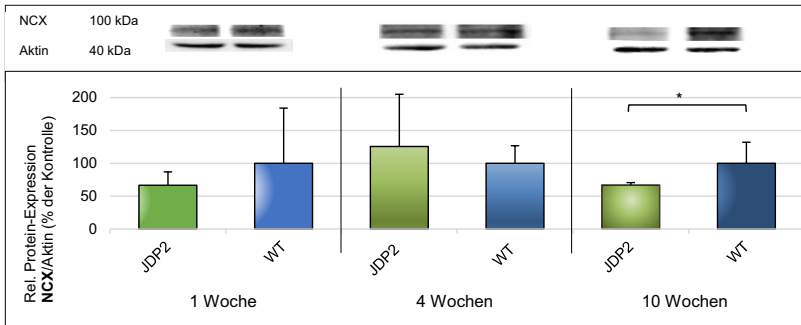
nach zehn Wochen JDP2-Überexpression (40,3% ± 27,7 JDP2 vs. 100% ± 23,4 WT). Ebenfalls wurde NCX (Abb. 10) nach zehn Wochen runterreguliert (66,9% ± 3,78 JDP2 vs. 100% ± 32,1 WT). Die Phospholamban-Expression (Abb. 11) dagegen wurde in allen drei Versuchsgruppen signifikant hochreguliert (1 Woche: 129,3% ± 19,1 JDP2 vs. 100% ± 24,1 WT; 4 Wochen: 171,1% ± 41,5 JDP2 vs. 100% ± 34,3 WT; 10 Wochen: 223,7% ± 82,9 JDP2 vs. 100% ± 35,3 WT). Gleichzeitig zeigt sich in jeder Gruppe eine signifikant geringere Phosphorylierung des Phospholambans (1 Woche: 33,4% ± 8,1 JDP2 vs. 100% ± 22,7 WT; 4 Wochen: 57,2% ± 13,3 JDP2 vs. 100% ± 19,9 WT; 10 Wochen: 47,1% ± 16,2 JDP2 vs. 100% ± 37,5 WT).



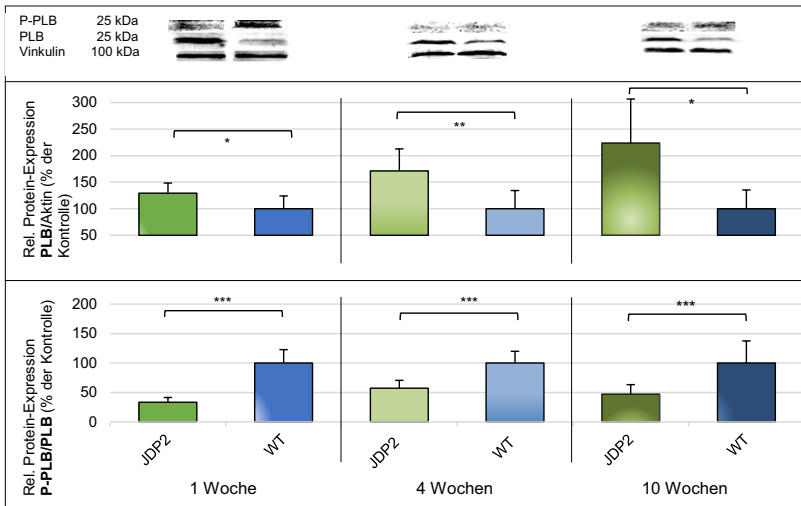
**Abbildung 8:** Relative SERCA-Expression von Kardiomyozyten transgener Mäuse nach JDP2-Überexpression für eine Woche im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Westernblots aus 50 µg Gesamtprotein genomt auf Aktinbanden der gleichen Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Nach T-Test: \*p<0,04 (n=6 Präparationen)



**Abbildung 9:** Relative beta-1-Adrenorezeptor-Expression von Kardiomyozyten transgener Mäuse nach JDP2-Überexpression für eine Woche, vier Wochen und zehn Wochen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Westernblots aus 50 µg Gesamtprotein genomt auf Aktinbanden der gleichen Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Nach T-Test: \*p<0,01 (1W: n=6 Präparationen; 4W: n=7; 10W: n=5)



**Abbildung 10:** Relative NCX-Expression von Kardiomyozyten transgener Mäuse nach JDP2-Überexpression für eine Woche, vier Wochen und zehn Wochen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Westernblots aus 50 µg Gesamtprotein genomt auf Aktinbanden der gleichen Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Nach T-Test: \* $p < 0,01$  (1W: n=6 Präparationen; 4W: n=7; 10W: n=5)



**Abbildung 11:** Relative Phospholamban(PLB)-Expression von Kardiomyozyten transgener Mäuse nach JDP2-Überexpression für eine Woche, vier Wochen und zehn Wochen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Westernblot aus 150 µg Gesamtprotein genomt auf Aktinbanden der gleichen Probe. Darunter die Expression von phosphoryliertem Phospholamban (P-PLB) genomt auf das gesamte Phospholamban. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Nach T-Test: \* $p < 0,04$ ; \*\* $p < 0,03$ ; \*\*\* $p < 0,01$  (1W: n=6 Präparationen; 4W: n=5; 10W: n=5)

## 4.2 Einfluss der YB-1-Infektion

Der Transkriptionsfaktor YB-1 ist sowohl in der Lage inhibierend in den SMAD-Signalweg einzugreifen als auch mit AP-1 zu interagieren und somit dessen Transkription zu unterbinden. Damit deckt YB-1 eine Schnittstelle zwischen SMAD und AP-1 in den Untersuchungen ab.

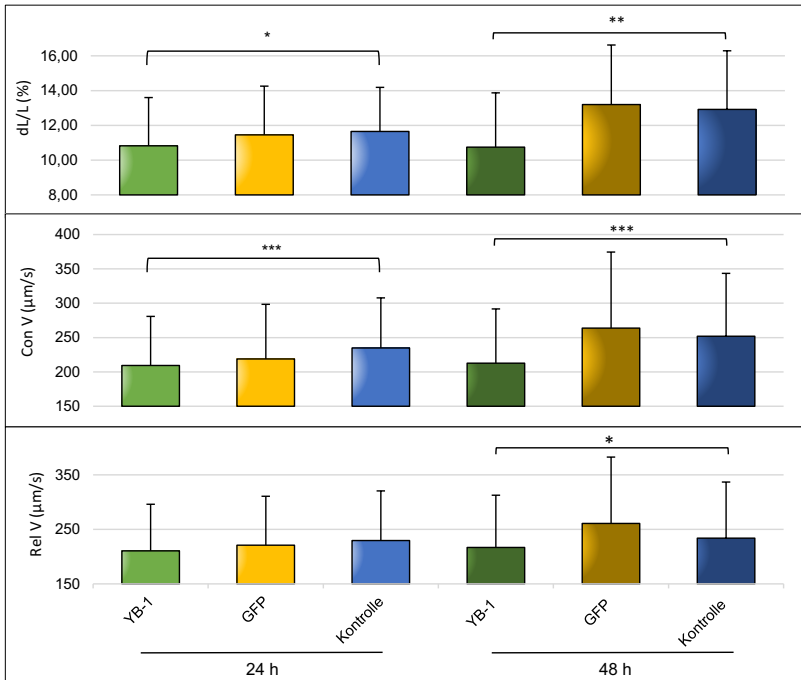
Für die Überexpression von YB-1 wurden die Ratten-Kardiomyozyten mit dem Adenovirus Ad-YB-1 (1000 MOI) sowie dem Kontrollvirus Ad-GFP (1000 MOI) infiziert. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Kardiomyozyten verwendet.

### 4.2.1 YB-1 beeinflusst die basale Kontraktilität

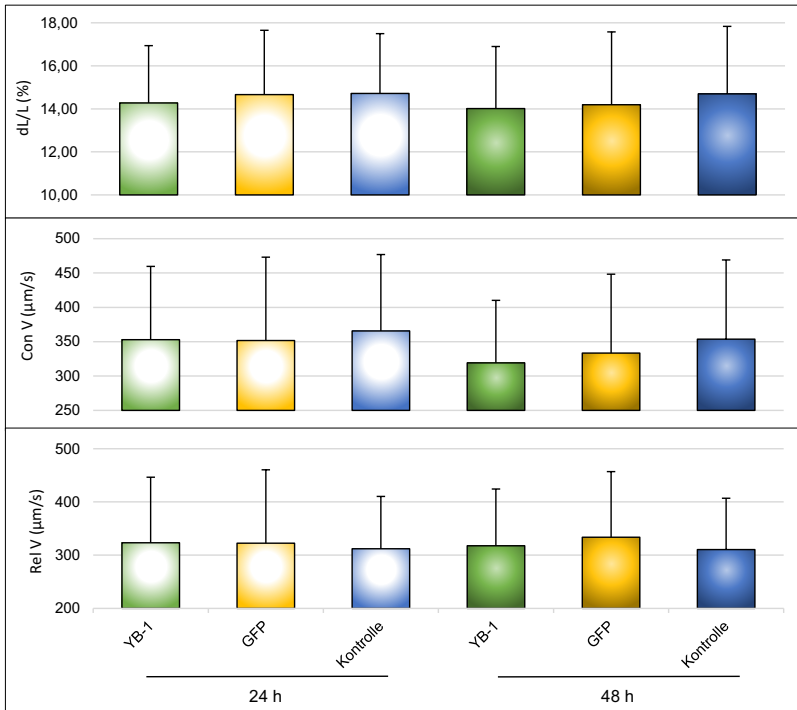
Es wurde einmal die basalen Kontraktilitätsparameter der Zellen gemessen (vgl. Abb. 12) sowie nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation der Zellen mit Isoprenalin (ISO, 10 nM) (vgl. Abb. 13).

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich nach der 24-stündigen YB-1-Infektion eine signifikante Reduktion der basalen relativen Verkürzung ( $10,82\% \pm 2,78$  YB-1 vs.  $11,65\% \pm 2,54$  Kontrolle) sowie der basalen relativen Verkürzungsgeschwindigkeit ( $209 \mu\text{m/s} \pm 71$  YB-1 vs.  $235 \mu\text{m/s} \pm 73$  Kontrolle). Nach Stimulation mit Isoprenalin wurde ein regelgerechter Anstieg der Kontraktilität in allen Gruppen gezeigt, ein signifikanter Unterschied zwischen YB-1-Infektion und Kontrolle unter Isoprenalin konnte nicht beobachtet werden.

Nach 48-stündiger Infektion zeigte sich eine signifikante Reduktion der basalen relativen Verkürzung und der relativen Verkürzungsgeschwindigkeit (dL/L:  $10,75\% \pm 3,12$  YB-1 vs.  $12,92\% \pm 3,37$  Kontrolle; Con V:  $213 \mu\text{m/s} \pm 79$  YB-1 vs.  $252 \mu\text{m/s} \pm 92$  Kontrolle). Auch hier stieg die Kontraktilität in allen Untergruppen unter Isoprenalin regelgerecht an, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden.



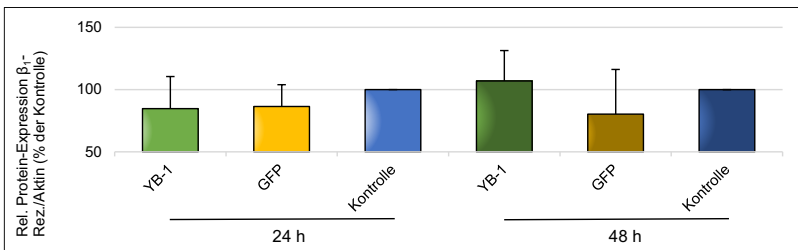
**Abbildung 12:** Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten nach 24- und 48- stündiger Infektion mit Ad-YB-1, sowie Ad-GFP gegenüber Kontrollzellen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]), die relative Verkürzungsgeschwindigkeit (Con V) und die relative Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V). Nach ANOVA: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,03$ ; (24h:  $n \approx 120$  Zellen, aus 5 Präparationen; 48h:  $n \approx 80$  Zellen, aus 4 Präparationen)



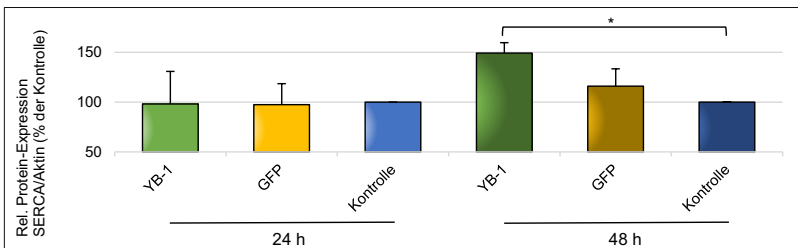
**Abbildung 13:** Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten nach 24 und 48 stündiger Infektion mit Ad-YB-1, sowie Ad-GFP gegenüber Kontrollzellen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Die Zellen wurden kurz vor der Messung mit Isoprenalin (10 nM) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]), die relative Verkürzungsgeschwindigkeit (Con V) und die relative Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V). (24h: n=120 Zellen, aus 5 Präparationen; 48h: n=80 Zellen, aus 4 Präparationen)

#### 4.2.2 Die YB-1-Infektion nimmt Einfluss auf die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes

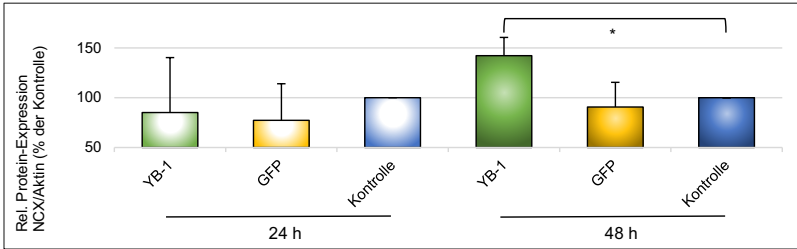
Das Protein für die Westernblots wurde nach 24- und 48-stündiger Infektion aus den Kardiomyozyten der Ratte isoliert. Es wurde die Expression von SERCA, NCX,  $\beta_1$ -Adrenorezeptor und Phospholamban (PLB) untersucht. Bei letzterem wurde zusätzlich noch der Phosphorylierungsstatus analysiert (P-PLB). Durch die 24-stündige Infektion konnte bei keinem der Proteine eine signifikante Veränderung der Expression beobachtet werden. Nach 48 Stunden dagegen konnte eine signifikante Hochregulierung der SERCA ( $149,2\% \pm 10,5$  YB-1 vs.  $100\% \pm 0$  Kontrolle) und von NCX ( $142,2\% \pm 18,3$  YB-1 vs.  $100\% \pm 0$  Kontrolle) gezeigt werden (vgl. Abb. 15 und 16). Der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor und Phospholamban, sowie die Phosphorylierung von Phospholamban, blieben ohne signifikanten Unterschied (vgl. Abb.14 und 17).



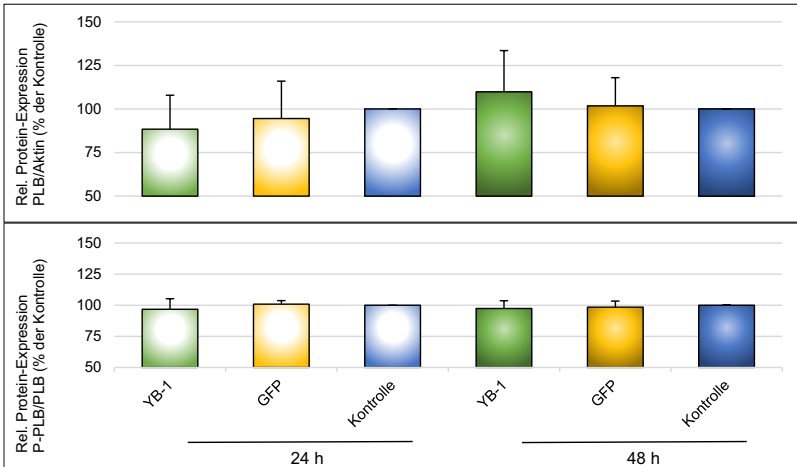
**Abbildung 14:** Relative  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-Expression von Kardiomyozyten nach 24- und 48-stündiger Ad-YB-1-Infektion im Vergleich zur Kontroll-Virus-Infektion (Ad-GFP) und zur Kontrolle. Westernblot aus 50  $\mu$ g Gesamtprotein genormt auf Aktinbanden der gleichen Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Nach ANOVA: \* $p < 0,01$  ( $n=4$ )



**Abbildung 15:** Relative SERCA-Expression von Kardiomyozyten nach 24- und 48-stündiger Ad-YB-1-Infektion im Vergleich zur Kontroll-Virus-Infektion (Ad-GFP) und zur Kontrolle. Westernblot aus 50  $\mu$ g Gesamtprotein genormt auf Aktinbanden der gleichen Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Nach ANOVA: \* $p < 0,01$  ( $n=4$ )



**Abbildung 16:** Relative NCX-Expression von Kardiomyozyten nach 24- und 48-stündiger Ad-YB-1-Infektion im Vergleich zur Kontroll-Virus-Infektion (Ad-GFP) und zur Kontrolle. Westernblot aus 50 µg Gesamtprotein genormt auf Aktinbanden der gleichen Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Nach ANOVA: \* $p < 0,01$  (n=6)



**Abbildung 17:** Relative PLB-Expression von Kardiomyozyten nach 24- und 48-stündiger Ad-YB-1-Infektion im Vergleich zur Kontroll-Virus-Infektion (Ad-GFP) und zur Kontrolle. Westernblot aus 100 µg Gesamtprotein genormt auf Aktinbanden der gleichen Probe. Darunter P-PLB-Expression genormt auf basale PLB-Expression der gleichen Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. (n=4)



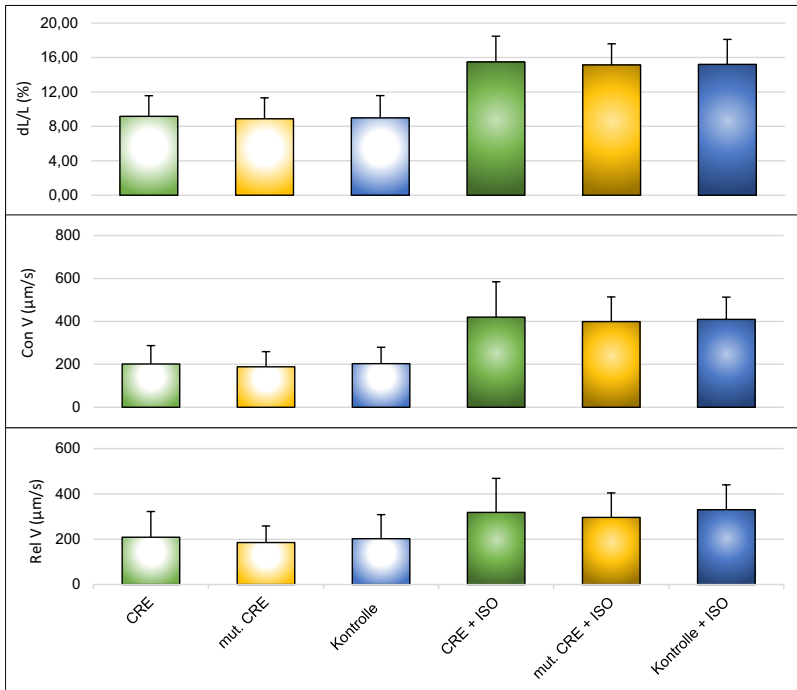
### 4.3 Einfluss auf die Kontraktilität durch Decoy-Oligonukleotide und Antisense

Taimor et al. (2004) und Schneiders et al. (2005) haben bereits gezeigt, dass die selektive Inhibition der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD mittels Decoy-Oligonukleotiden Kardiomyozyten vor Hypertrophie nach  $\alpha$ -adrenerger Stimulation und vor Apoptose nach TGF- $\beta$ -Stimulation schützt. Ob eine Inkubation der Zellen mit dem AP-1-inhibierenden CRE-Oligonukleotiden oder mit dem SMAD-inhibierenden SBE-Oligonukleotiden einen Einfluss auf die Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten hat, wurde im Folgenden untersucht. Zudem wurde der Effekt einer Inkubation der Zellen mit Antisense-SMAD4 untersucht, welches die Expression von SMAD4 in der Zelle verhindert und somit den SMAD-Kreislauf inhibiert.

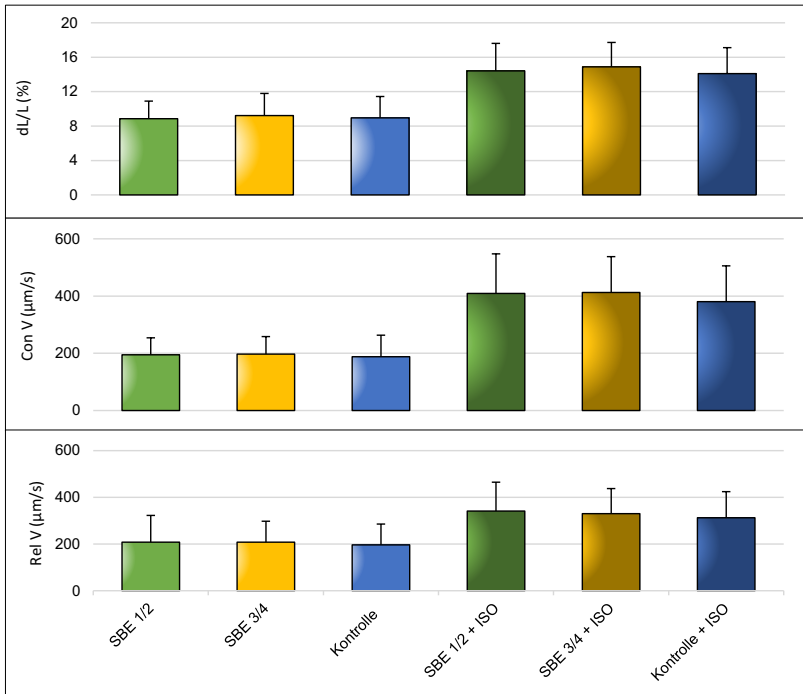
#### 4.3.1 Decoy-Oligonukleotide haben keinen Einfluss auf die Kontraktilität

Die Kardiomyozyten wurden mit den unterschiedlichen Oligonukleotiden (CRE, SBE1/2) sowie deren Kontroll-Nukleotiden (mut. CRE, SBE 3/4) für 24 Stunden inkubiert. Zunächst erfolgte die Transfektion isoliert mit einem Oligonukleotid, im Anschluss wurden beide Oligonukleotide simultan transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen  $\beta$ -adrenerg mit Isoprenalin (ISO, 10 nM) stimuliert.

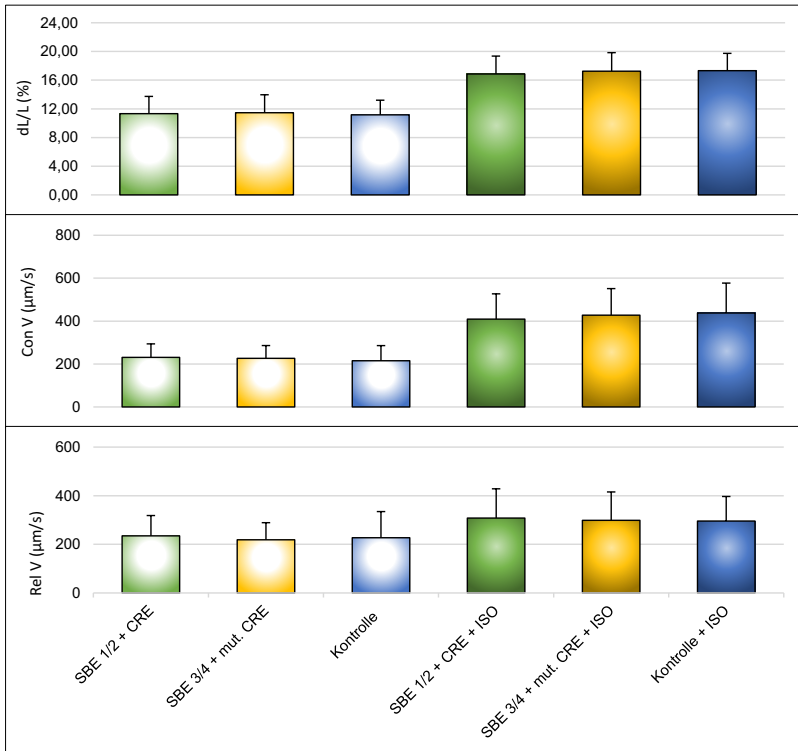
Nach Messung der basalen Kontraktilitätsparameter konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Oligonukleotiden und der Kontrolle beobachtet werden. Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (10 nM) zeigte sich ein regelrechter Anstieg der Kontraktilität, allerdings ohne signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (vgl. Abb. 18, 19, 20).



**Abbildung 18:** Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten nach Inkubation mit CRE-Oligonucleotid für 24 Stunden, sowie mut. CRE-Oligonucleotid gegenüber Kontrollzellen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Zusätzlich werden die Zellen mit Isoprenalin (10 nM) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]), die relative Verkürzungsgeschwindigkeit (Con V) und die relative Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V). (n=80, aus 3 Präparationen)



**Abbildung 19:** Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten nach Inkubation mit SBE 1/2-Oligonukleotid für 24 Stunden, sowie SBE 3/4-Oligonukleotid gegenüber Kontrollzellen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Zusätzlich werden die Zellen mit Isoprenalin (10 nM) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]), die relative Verkürzungsgeschwindigkeit (Con V) und die relative Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V). (n=80, aus 3 Präparationen)

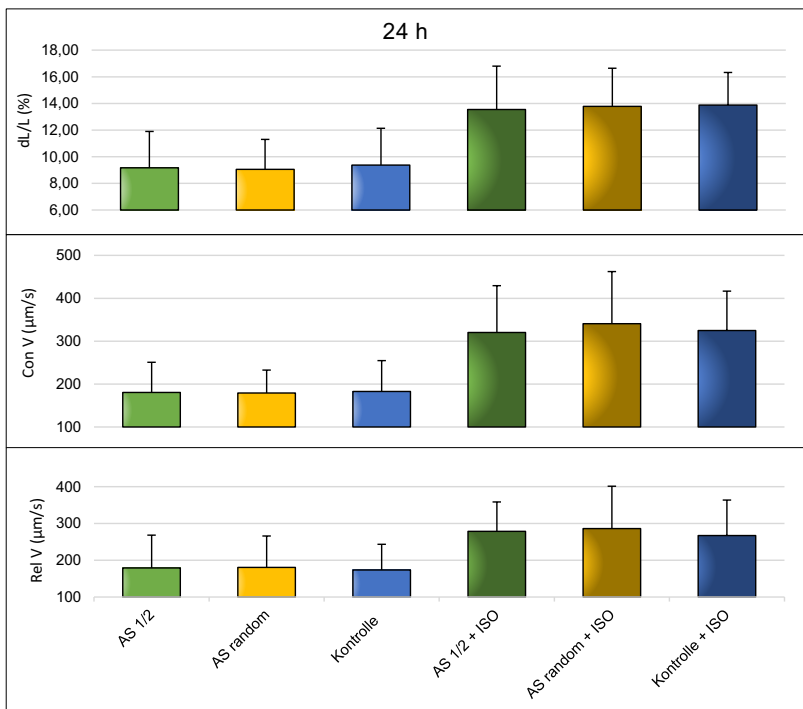


**Abbildung 20:** Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten nach Inkubation mit SBE 1/2- und CRE-Oligonukleotid für 24 Stunden, sowie SBE 3/4- und mut. CRE-Oligonukleotid gegenüber Kontrollzellen für eine Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Zusätzlich wurden die Zellen mit Isoprenalin (10 nM) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]), die relative Verkürzungsgeschwindigkeit (Con V) und die relative Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V). (n=81, aus 3 Präparationen)

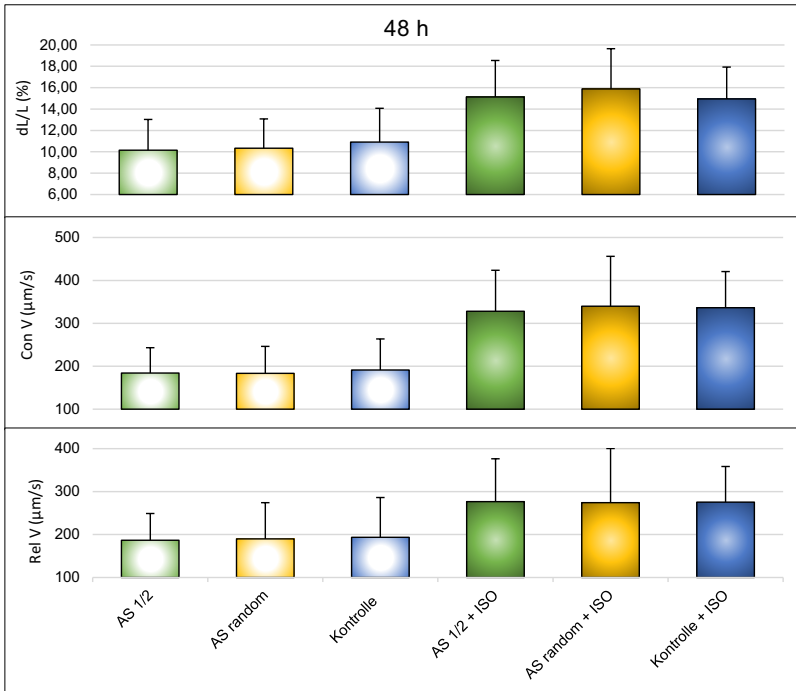
#### 4.3.2 Kein Einfluss auf Kontraktilität durch Antisense-SMAD4

Die Zellen wurden für 24 Stunden (vgl. Abb. 21) und für 48 Stunden (vgl. Abb. 22) mit Antisense-SMAD4 (AS 1/2) sowie mit der Kontroll-Antisense (AS random) inkubiert und mit nicht behandelten Zellen, die als Kontrolle dienten, verglichen. Zusätzlich wurden alle Gruppen  $\beta$ -adrenerg mit Isoprenalin (ISO, 10 nM) stimuliert.

Es konnte keine signifikante Veränderung der Kontraktionsparameter von AS 1/2 gegenüber der Kontrolle gezeigt werden. Die Inkubation mit AS random erzeugte ebenfalls keinen signifikanten Effekt im Vergleich mit den anderen Gruppen. Eine regelrechte Kontraktilitätssteigerung unter Isoprenalin konnte bei allen Untergruppen, beobachtet werden, allerdings ohne signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.



**Abbildung 21:** Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten nach 24 Stunden Inkubation mit Antisense SMAD4 (AS 1/2), sowie Antisense random gegenüber Kontrollzellen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Zusätzlich wurden die Zellen mit Isoprenalin (10 nM) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]), die relative Verkürzungsgeschwindigkeit (Con V) und die relative Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V). (n=60, aus 3 Präparationen)



**Abbildung 22:** Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten nach 48 Stunden Inkubation mit Antisense SMAD4 (AS 1/2), sowie Antisense random gegenüber Kontrollzellen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Zusätzlich wurden die Zellen mit Isoprenalin (10 nM) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]), die relative Verkürzungsgeschwindigkeit (Con V) und die relative Relaxationsgeschwindigkeit (Rel V). (n=80, aus 3 Präparationen)

## 5. Diskussion

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl eine einwöchige JDP2-Überexpression als auch eine YB-1-Überexpression für 24 und 48 Stunden die kontraktile Funktion der Herzmuskelzellen negativ beeinflusst. Für eine einwöchige JDP2-Überexpression konnte zudem eine schlechtere kardiale Funktion in vivo nachgewiesen werden. Die Untersuchungen mittels Decoy-Oligonukleotiden zeigten außerdem, dass eine spezifische Inhibition der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD, darunter auch SMAD4, zu keiner funktionellen Einschränkung der Herzmuskelzellen führt. Dies deutet darauf hin, dass der negative Effekt von JDP2 und YB-1 auf die kontraktile Funktion weder AP-1- noch SMAD-vermittelt ist. Die reduzierte Kontraktilität unter YB-1 und JDP2 könnte auf ein verändertes Calciumhandling der Zellen zurückzuführen sein, denn es zeigten sich signifikante Veränderungen in der Expression der Calciumproteine im Westernblot nach YB-1- und JDP2-Überexpression.

### 5.1 Der Einfluss von JDP2

In dieser Arbeit wurden Kontraktionsversuche in vivo und in vitro mit fünf Wochen alten JDP2-Mäusen durchgeführt, die lediglich in der letzten Lebenswoche JDP2 überexprimiert hatten. Eine einwöchige Überexpression von JDP2 schützt die Kardiomyozyten vor Apoptose durch TGF- $\beta$  und vor Hypertrophie durch einen stetigen  $\beta$ -adrenergen Stimulus in vitro (Hill et al., 2013). Nach einer siebenwöchigen Überexpression von JDP2 wurde bereits gezeigt, dass der protektive Effekt zu Lasten der kontraktile Funktion der isolierten Kardiomyozyten geschieht. Es gab signifikante Unterschiede in der relativen Zellverkürzung, der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (Hill et al., 2013). Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Präparation acht Wochen alt, die JDP2-Überexpression erfolgte daher nahezu lebenslang (Langzeitversuche). Mittels der einwöchigen Überexpression, die in dieser Arbeit generiert wurde, sollte analysiert werden, ob der negative Einfluss von JDP2 auch nach kurzzeitiger Überexpression eine Reduktion der Kontraktilität bewirkt oder ob die schlechtere kontraktile Funktion der Kardiomyozyten aus den Langzeitversuchen mit der nahezu lebenslangen JDP2-Überexpression zusammenhängt.

Zudem wurde die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes untersucht. Um hierbei sowohl kurzzeitige als auch langzeitige Effekte von JDP2 zu untersuchen, wurde die Überexpression für eine, vier und zehn Wochen generiert. Dadurch sollte es einerseits möglich sein, eine Erklärung für die reduzierte Kontraktilität zu finden und andererseits den Einfluss der zeitlichen Dauer der JDP2-Überexpression auf die Kontraktilität zu untersuchen.

### 5.1.1 Kurzzeitige Überexpression von JDP2 schränkt Kontraktilität von Kardiomyozyten in vitro ein

Es zeigte sich nun, dass auch nach kurzzeitiger JDP2-Überexpression eine Reduktion der Kontraktilität eintrat, wobei die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit jedoch erhalten blieb. Im Gegensatz zu den Langzeitversuchen zeigte sich keine signifikante Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit. Diese war nur leicht eingeschränkt. Auch die signifikant reduzierten Parameter (dL/L, Con V) waren in den Kurzzeitversuchen weniger deutlich ausgeprägt. Eine länger andauernde JDP2-Überexpression führt somit zwar zu einer stärkeren kontraktilen Funktionseinschränkung, jedoch zeigt sich auch bereits nach kurzzeitiger JDP2-Einwirkung ein deutlicher negativer Effekt auf die basale Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten.

In den Langzeitversuchen, in denen JDP2 für sieben Wochen überexprimiert wurde, zeigte sich eine nahezu vollständig aufgehobene  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit (Hill et al., 2013). Diese blieb bei kurzzeitiger Überexpression von JDP2 weitestgehend erhalten. Es zeigte sich ein regelrechter, signifikanter Anstieg der Kontraktionsparameter der JDP2-Zellen im Gegensatz zu unstimulierten Zellen. Lediglich bei der Kontraktionsgeschwindigkeit gab es eine signifikante Reduktion im Vergleich zu  $\beta$ -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten aus Wildtyp-Tieren. Der Schluss liegt nahe, dass die positive Inotropie durch den  $\beta$ -adrenergen Stimulus die basal schlechtere Kontraktilität nach kurzzeitiger JDP2-Überexpression zum Teil ausgleichen kann. Andererseits konnte durch die Untersuchungen der Proteine des Calciumhaushaltes im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Überexpression von JDP2 für vier und zehn Wochen mit einer stärkeren Manipulation der Calciumhomöostase einhergeht. Es zeigte sich eine Runterregulation des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors nach zehn Wochen Überexpression, was die verminderte  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit durch langfristige JDP2-Überexpression erklären könnte. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Überexpression von JDP2 einen geringeren Effekt auf die Kardiomyozyten hat als eine nahezu lebenslange Überexpression. Die signifikanten Funktionseinschränkungen sind jedoch auch nach kurzer JDP2-Überexpression signifikant nachweisbar und stellen sowohl den kurzfristigen als auch den langfristigen therapeutischen Einsatz von JDP2 in Frage.



### 5.1.2 Einwöchige JDP2-Überexpression reduziert die kardiale Funktion in der Echokardiographie

Analog zu den in vitro-Versuchen konnte eine kardiale Dysfunktion nach einer Woche JDP2-Überexpression echokardiographisch nachgewiesen werden. Die Versuche in vivo konnten dabei bestätigen, dass JDP2, neben der bisher nur auf zellulärer Ebene nachgewiesenen reduzierten Kontraktilität, auch schädigende Wirkung auf die Funktion des gesamten Herzens hat. Neben morphologischen Veränderungen durch JDP2, wie die angedeutete ventrikuläre Hypertrophie und die Vorhofdilatation (Kehat et al., 2006), konnte in der Echokardiographie nun die effektiv kreislaurelevante Dysfunktion des Myokards nachgewiesen werden. Das signifikant reduzierte Herzminutenvolumen und auch die Ejektionsfraktion, die häufiger in der Klinik echokardiographisch bestimmt wird, deuten auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz unter kurzzeitiger JDP2-Überexpression hin.

In dieser Arbeit wurde eine schädigende Wirkung von JDP2 auf das Myokard nachgewiesen. Dem stehen die Ergebnisse von Untersuchungen von JDP2-KO-Mäusen entgegen. Es wurden echokardiographische Untersuchungen von Mäusen angefertigt, die kein JDP2 exprimieren konnten. Diese wurden mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Zusätzlich wurde ein hypertropher Stimulus durch eine Aortenkonstriktion (TAC-Modell) generiert. Ohne TAC-Modell zeigten die JDP2-KO-Mäuse keine signifikante Veränderung der Ejektionsfraktion. Im TAC-Modell dagegen zeigte sich in den JDP2-KO-Mäusen eine schlechtere Ejektionsfraktion gegenüber den Wildtyp-Mäusen (Kalfon et al., 2017). Zusammen mit den Ergebnissen von Hill et al. (2013) kann festgehalten werden, dass eine JDP2-Überexpression isolierte Kardiomyozyten vor Hypertrophie durch einem adrenergen Stimulus und TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose schützt. Außerdem wird die kardiale Funktion durch den hypertrophen Stimulus im TAC-Modell ohne JDP2-Expression stärker beeinträchtigt als in Wildtyp-Tieren mit normaler JDP2-Expression (Kalfon et al., 2017). Beide Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass JDP2 unter simulierten, pathologischen Bedingungen eine protektive Rolle am Herzmuskel spielt. In den JDP2-KO-Mäusen fällt dieser Schutz weg, folglich entwickelt sich im TAC-Modell eine verstärkte kardiale Dysfunktion. Der negative Einfluss durch den hypertrophen Stimulus des TAC-Modells kann scheinbar ohne JDP2 schlechter kompensiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dagegen, dass die Funktion der gesunden Kardiomyozyten, die durch keine weiteren äußeren Faktoren beeinflusst wurden, durch eine JDP2-Überexpression beeinträchtigt wird. Denn es zeigte sich die verminderte Kontraktilität als führendes Symptom sowohl auf zellulärer Ebene als auch in vivo. Dagegen ist die basale Herzfunktion in JDP2-KO-Mäusen unverändert. Eine vermehrte

JDP2-Expression hat in diesem Kontext folglich einen negativen Einfluss auf das Myokard.

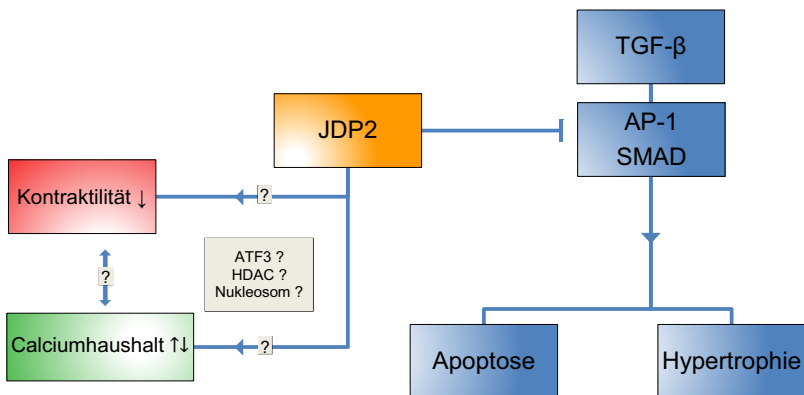
In der Zusammenschau dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass JDP2 weder eine ausnahmslos schlechte noch gute Wirkung auf das Myokard hat. Es scheint dagegen eher einen wichtigen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen kardialer Funktion und Wachstum sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Umständen zu haben. Eine Störung dieses Gleichgewichtes kann die Funktionalität des Myokards beeinträchtigen.

### 5.1.3 Die Rolle von AP-1 und JDP2 in Bezug auf die Kontraktilität

Mehrfach wurde eine inhibierende Wirkung von JDP2 auf AP-1 beschrieben. Unklar war bisher, ob der Einfluss von JDP2 auf die kontraktile Funktion des Myokards ebenfalls AP-1-abhängig ist. Die Kontraktionsmessungen, die im Zuge dieser Arbeit angefertigt wurden, konnten keine Beeinträchtigung der Kontraktilität auf zellulärer Ebene durch eine CRE-Decoy-Transformation zeigen. Auch die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit blieb erhalten. Der Schluss liegt nahe, dass AP-1-abhängige Prozesse bei dem Einfluss von JDP2 auf die Kontraktilität eine untergeordnete Rolle spielen. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass die Wirkung der CRE-Decoys entsprechend der wissenschaftlichen Publikationen angenommen wurde. Ob es während der CRE-Decoy-Kontraktionsversuchen tatsächlich zu einer AP-1-spezifischen Inhibition kam, wurde in dieser Arbeit nicht gezeigt. Da sich jedoch sowohl in der Literatur (Park et al., 1999), als auch in der eigenen Arbeitsgruppe Nachweise finden lassen (Schneiders et al., 2005), kann der inhibitorische Effekt der Decoys mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden. Es wurden die gleichen Bedingungen für die Transfektion verwendet. JDP2 ist in der Lage das Myokard vor TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose und vor einer adrenerg induzierten Hypertrophie zu schützen (Hill et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass dieser protektive Effekt AP-1-vermittelt geschieht. Denn durch den Einsatz von AP-1-spezifischen CRE-Decoy-Oligonukleotiden konnten die Kardiomyozyten vor den Folgen hypertropher und apoptotischer Stimuli geschützt werden (Schneiders et al., 2005). Diese Decoy-Oligonukleotide enthalten eine CRE-spezifische Sequenz, die in der Lage ist die Bindung von AP-1 an die DNA zu unterbinden und damit seine Transkriptions-aktivierende Funktion zu inhibieren.

Da die Kontraktilität unter CRE-Decoy-Transformation unbeeinflusst bleibt, stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus JDP2 in die kontraktile Funktion eingreift. Am Herzen wurde durch JDP2 eine Herunterregulation des strukturell sehr ähnlichen ATF3 beschrieben (Weidenfeld-Baranboim et al., 2009). Durch die nahe strukturelle

Verwandtschaft von ATF3 zu JDP2 und ihre vergleichbare Fähigkeit die Promotorelemente CRE und TRE zu binden, hat ATF3 ebenfalls hauptsächlich AP-1-abhängige Effekte auf die Herzmuskelzelle. Da die AP-1-abhängige Beeinträchtigung der Kontraktilität überwiegend ausgeschlossen wurde, scheint die Herunterregulation des ATF3 durch JDP2 eine untergeordnete Rolle zu spielen. Interessanterweise schränkt eine ATF3-Überexpression ebenfalls die Kontraktilität auf Zellebene ein und beeinflusst die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit (Okamoto et al., 2001). Eine Störung der Homöostase von ATF3 und JDP2 scheint für die kontraktile Funktion des Herzens durchaus relevant zu sein, allerdings wird dieser Effekt nicht über AP-1 selbst vermittelt. Wahrscheinlicher ist es, dass JDP2 auf Ebene der Nucleosomen Einfluss auf die Transkription nimmt. Es konnte gezeigt werden, dass JDP2 die Histon-Deacetylasen (HDAC) und Histon-Methyltransferasen (HMTF) aktiviert (Darlyuk-Saadon et al., 2012; Huang et al., 2011) und die Histon-Chaperon-Aktivität beeinflusst (Tsai et al., 2016). Diese Effekte sind AP-1-unabhängig und fördern die Kondensation der DNA und hemmen somit die Transkription.



**Abbildung 23:** Einfluss von JDP2 auf die Kontraktilität und den TGF- $\beta$ -Signalweg

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass JDP2 die Genexpression über andere Mechanismen beeinflusst, die bisher noch unzureichend erforscht sind. Beispielsweise konnte auch eine Transkriptions-aktivierende Wirkung von JDP2 in Kombination mit CHOP10, einem Mitglied der C/EBP-Familie, gezeigt werden. In diesem Fall sind hauptsächlich TRE-enhaltende Promotorelemente an der Transkription beteiligt (Weidenfeld-Baranboim et al., 2008). Sollte JDP2 seine Wirkung durch Bindung an TRE-

Promotoren entfalten, so kann dies mit alleiniger Transfektion mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die AP-1-Inhibition durch Decoy-Oligonukleotide an Kardiomyozyten der Ratte überprüft wurde, während die JDP2-Überexpression an Mäusen generiert wurde. Eine für die beiden Spezies unterschiedliche Genmodulation ist nicht auszuschließen.

#### 5.1.4 JDP2 greift in den Calciumhaushalt auf Proteinebene ein

Es konnte eine Reduktion der SERCA-Expression durch die in dieser Arbeit angefertigten Westernblots nach einer Woche JDP2-Überexpression gezeigt werden. Zudem zeigen Daten der eigenen Arbeitsgruppe, dass die SERCA auf Proteinebene in Langzeitversuchen mit JDP2-Überexpression für zehn Wochen ebenfalls reduziert exprimiert wird. Auf die Daten kann an dieser Stelle nur hingewiesen werden, da sie zum Zeitpunkt der Ausarbeitung dieser Arbeit noch nicht publiziert worden sind. Auch auf mRNA-Ebene konnte nach siebenwöchiger JDP2-Überexpression eine verminderte SERCA-Expression gezeigt werden (Hill et al., 2013).

Eine Reduktion der SERCA ist also sowohl nach kurzzeitiger als auch nach langzeitiger JDP2-Überexpression nachzuweisen. Durch diese Reduktion kommt es in der Diastole der Kardiomyozyten zu keiner suffizienten Beladung des SRs mit Calcium. Daraus resultiert eine verminderte intrazelluläre Calciumfreisetzung, eine erniedrigte Calciumkonzentrationen im Zytosol und eine verminderte Kontraktilität (Hu et al., 2011). Eine verminderte Kontraktionsfähigkeit konnte nach einer Woche und nach sieben Wochen JDP2-Überexpression bestätigt werden.

Neben der SERCA können auch andere Proteine Einfluss auf den Calciumhaushalt nehmen. Dazu gehören PLB und NCX, aber auch der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor. Nach einer Woche JDP2-Überexpression war neben der SERCA-Reduktion PLB hochreguliert. Das hochregulierte unphosphorylierte PLB inhibiert den Calciumfluss über die SERCA und damit die Beladung des SRs in der Diastole. Dass dies durch den direkten Einfluss von JDP2 geschieht, lässt sich durch die Progredienz der Expression von PLB in Bezug auf die Dauer der JDP2-Überexpression vermuten. Die Proteinexpression des PLBs stieg mit der Dauer der JDP2-Überexpression an (eine Woche: 129,3 %, vier Wochen: 171,1%, zehn Wochen: 223,7 %). Entscheidend ist auch das Verhältnis zwischen unphosphoryliertem und phosphoryliertem PLB (P-PLB). In phosphoryliertem Zustand bindet PLB nicht mehr an die SERCA und verliert dadurch seinen inhibitorischen Effekt (Schmidt et al., 2001). Die Phosphorylierung des PLBs erfolgt durch Kinasen wie die CaMKII oder die relevantere PKA. Diese wird wiederum direkt durch den  $\beta_1$ -

Adrenorezeptor aktiviert. Die Vermutung liegt nahe, dass das reduzierte P-PLB/PLB-Verhältnis mit einer verminderten  $\beta$ -adrenergen Stimulation einhergeht. Dieses ließ sich nur teilweise durch die Westernblots und Kontraktionsmessungen belegen. In den Langzeitversuchen nach siebenwöchiger JDP2-Überexpression zeigten die Kardiomyozyten während den Kontraktionsmessungen eine verminderte  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit (Hill et al., 2013). Gleichzeitig konnte durch die in dieser Arbeit angefertigten Westernblots der Mäuse, die zehn Wochen JDP2 überexprimierten, eine signifikante Reduktion der Expression des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors gezeigt werden. Es ist anzunehmen, dass eine lange JDP2-Überexpression (sieben bis zehn Wochen) einen negativen Einfluss auf den  $\beta$ -adrenergen Signalweg hat, der dann auch zu einer Reduktion des P-PLB/PLB-Verhältnisses führt. Unklar ist die Frage, ob JDP2 direkt Einfluss auf die Expression des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors nimmt. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass JDP2 die Kontraktilität verschlechtert und in der Folge daraus der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor herunterreguliert wird. Vergleichbares geschieht bei der Herzinsuffizienz, bei der es zu einer Herunterregulation des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors kommt (Port und Bristow, 2001). Dieses würde die geringere  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit und das reduzierte P-PLB/PLB-Verhältnis nach längerer JDP2-Überexpression erklären. Durch die eben genannte These lässt sich jedoch nicht erklären, warum auch nach einer und nach vier Wochen JDP2-Überexpression das P-PLB/PLB-Verhältnis reduziert ist, während die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit in den Kontraktionsversuchen nach einer Woche JDP2-Überexpression erhalten bleibt und es auch zu keiner Reduktion der Expression des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors nach einer oder nach vier Wochen Überexpression von JDP2 kommt. Somit scheint JDP2 zunächst direkten Einfluss auf das P-PLB/PLB-Verhältnis zu nehmen. Durch die daraus resultierende Verschlechterung der kardialen Funktion kommt es dann sekundär zur Reduktion der  $\beta_1$ -Adrenorezeptors und damit zu einer weiteren Verschlechterung des P-PLB/PLB-Verhältnisses.

Langfristig kommt es weiterhin nach zehn Wochen JDP2-Überexpression zur signifikant erniedrigten Expression von dem NCX. Dieser bewirkt einen Calciumausstrom aus der Zelle während der Diastole und reduziert dadurch den Calciumgehalt im Zytosol. Die Einordnung der Rolle des NCX erweist sich insofern als schwierig, da in der Literatur Untersuchungen des NCX keinen eindeutigen Schluss auf seine Rolle während der Kontraktion und der Herzinsuffizienz zulassen. Im insuffizienten Herzen wurde sowohl eine Hochregulation (Armoundas et al., 2007), als auch eine Herunterregulation (Hu et al., 2011) von NCX gezeigt. Gleichzeitig wurde eine Reduktion der Kontraktilität sowohl durch erniedrigte NCX-Expression beschrieben (Dorn und Molkentin, 2004) als auch durch eine vermehrte NCX-Expression (Pogwizd et al., 2001). Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich vermutlich durch die verschiedenen Versuchsmodelle, durch die

eine Herzinsuffizienz generiert wurde, begründen. Neben den ätiologischen Unterschieden wurden zudem auch topographische Unterschiede in der Expression der Proteine des Calciumhaushaltes beschrieben (Lou et al., 2012). Es wird jedoch vermutet, dass eine verminderte NCX-Expression vorwiegend in höhergradigen Herzinsuffizienzen vorliegt (Dorn und Molkenkin, 2004). Die vorliegenden Ergebnisse würden diese These bestätigen, da eine Beeinträchtigung der NCX-Expression erst nach zehn Wochen JDP2-Überexpression vorliegt.

Unklar ist an dieser Stelle, wie JDP2 Einfluss auf die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes nimmt. Der SERCA-Promotor weist zwar eine AP-1 Bindungsstelle auf (Jeong et al., 2005), da jedoch AP-1-Decoys keinen Einfluss auf die Kontraktilität hatten (siehe 5.1.3.), ist nicht anzunehmen, dass JDP2 über diese Bindungsstelle die SERCA-Expression reprimiert. Am ehesten kann hier eine noch unbekannte Funktion von JDP2 oder der Effekt auf die DNA-Kondensation und das Nukleosom für den Eingriff in den Calciumhaushalt verantwortlich gemacht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Einfluss von JDP2 auf den Calciumhaushalt vorliegt. Es gibt Grund zu der Annahme, dass die Kontraktilität des Myokards durch die Veränderungen der Calciumhomöostase beeinträchtigt wird. Zudem kann vermutet werden, dass die Wirkung von JDP2 durchaus mit der effektiven Dauer der Überexpression korreliert. Während die SERCA und das PLB schon unmittelbar nach einer Woche JDP2-Überexpression beeinflusst wurden, zeigte sich eine reduzierte Expressionsrate des NCX und des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors erst nach einer zehnwöchigen Überexpression. Eine vierwöchige Überexpression scheint ein Zwischenstadium zu sein. Dieser Aspekt deckt sich mit den Kontraktionsmessungen, die einerseits bereits nach einer Woche JDP2-Überexpression eine verminderte Kontraktilität zeigten und andererseits nach einer siebenwöchigen Überexpression eine noch schlechtere kontraktile Funktion zeigten (Hill et al., 2013).

## 5.2 Der Einfluss von YB-1 auf die Kardiomyozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine YB-1-Überexpression mittels Adenoviren für 24 und 48 Stunden generiert und sowohl die Kontraktilität als auch die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes untersucht. Zudem wurden vergleichende Kontraktionsmessungen nach spezifischer AP-1- und SMAD-Inhibition angefertigt, um einen möglichen Mechanismus zu detektieren, über den YB-1 Einfluss auf die Kontraktilität nimmt.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde das hier angewendete adenovirale Modell zur YB-1 Überexpression bereits erfolgreich angewendet und untersucht. Eine Infektion mit

1000 MOI mit AdYB-1 für 24 Stunden reicht aus, um die Zellen vor einer TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose zu bewahren (Partsch, 2010).

#### 5.2.1 YB-1 schränkt die Kontraktilität in vitro ein

Die Kontraktilität YB-1-infizierter Kardiomyozyten war signifikant erniedrigt. Zudem lässt sich eine Progredienz der YB-1-Wirkung nach 48 Stunden erkennen, da die Unterschiede zwischen Kontrolle und Ad-YB-1 nach 48 Stunden noch deutlicher zu sehen sind (dL/L, Con V). Die Relaxationsgeschwindigkeit wird zudem erst nach 48 Stunden signifikant reduziert. Eine kurzzeitige Wirkung von YB-1 hat zwar einen schützenden Effekt auf die Kardiomyozyten bezüglich Hypertrophie und Apoptose (Partsch, 2010), jedoch geht dieser zu Lasten der Kontraktilität. Einer Überexpression von YB-1 ist eine schädigende Wirkung auf die Kontraktionskraft der Zellen nicht abzusprechen. Der verstärkende Effekt durch eine längere Infektionsdauer lässt sich anhand der Daten in dieser Arbeit bestätigen.

Die zeitliche Komponente spielt eine wichtige Rolle bezüglich der Stärke der YB-1-Expression: Nach 24 Stunden konnte eine deutliche Steigerung der YB-1-Proteinexpression gesehen werden, ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte sich jedoch nicht. Dieser trat erst nach einer 36 Stunden dauernder Infektion ein. Der protektive Effekt durch YB-1 auf hypertrophe und apoptotische Stimuli konnte jedoch schon nach 24 Stunden nachgewiesen werden (Partsch, 2010). Es wurde folglich bewiesen, dass auch eine 24-stündige Infektion einen Effekt auf die Kardiomyozyten hat. Es liegt jedoch auf der Hand, dass sich dieser durch zunehmende Infektionsdauer potenzieren lässt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Infektionsdauer von 24 und 48 Stunden gewählt.

Eine reduzierte Kontraktilität konnte unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ausgeschlossen werden. Hier liegt der Schluss nahe, dass der positiv-ionotrope Effekt des Isoprenalins die basal schlechtere kontraktile Funktion ausgleichen kann. In den später aufgeführten Untersuchungen der Proteine des Calciumhaushaltes konnte zudem keine veränderte Expression des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors gezeigt werden. Ein unmittelbarer Einfluss von YB-1 auf den  $\beta$ -adrenergen Signalweg kann somit als Ursache für die reduzierte Kontraktilität ausgeschlossen werden.

#### 5.2.2 Die Rolle von AP-1 und SMADs für die Beeinträchtigung der kontraktilen Funktion durch YB-1

YB-1 kann auf vielerlei Weise in den TGF- $\beta$ -Signalweg eingreifen und ist in der Lage Kardiomyozyten vor TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose zu bewahren (Partsch, 2010). Es hat

zum einen Einfluss auf den SMAD-Signalweg, indem es unter anderem SMAD3 bindet (Higashi et al., 2003), das inhibitorische SMAD7 induziert (Dooley et al., 2006) und die Expression von dem Co-SMAD SMAD4 inhibiert (Harjung, 2012). Diese Effekte von YB-1 sollten in der vorliegenden Arbeit mittels SBE- und Antisense SMAD4-Decoys imitiert werden. Zum anderen ist YB-1 auch in der Lage, hemmend auf die AP-1-abhängige Genexpression einzugreifen (Samuel et al., 2005) und die Hochregulation von AP-1-Untereinheiten durch TGF- $\beta$  zu verhindern (Harjung, 2012). Zudem benötigt eine TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose eine simultane Aktivierung von SMAD und AP-1 (Schneiders et al., 2005). Aus diesem Grund wurden ebenfalls AP-1-spezifischen Decoys (CRE) sowie die Kombination aus SBE- und CRE-Decoys eingesetzt.

Die erhobenen Daten in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der protektive Einfluss von YB-1 auf Kosten der kontraktilen Funktion der Kardiomyozyten geht. Fraglich war bisher, ob der einschränkende Einfluss von YB-1 auf die Kontraktilität durch die Inhibition der SMAD-Signalwege oder der AP-1-Genexpression hervorgerufen wird. Aus diesem Grund wurde die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten nach spezifischer AP-1- und SMAD-Inhibition gemessen. Es zeigte sich nach Inkubation der Zellen weder mit CRE-, noch mit SBE-Decoy-Oligonukleotiden eine Beeinflussung der Kontraktilität. Um die simultane Wirkung von YB-1 auf AP-1 und die SMADs zu simulieren, wurden die Kardiomyozyten ebenfalls gleichzeitig mit beiden Decoys behandelt. Zudem wurde der SMAD4-hemmende Effekt durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden imitiert. Letztere sind in der Lage die SMAD4-Synthese nach 24 Stunden, besonders aber nach 48 Stunden zu reduzieren (Poursaket, 2011). Keiner dieser Ansätze hatte einen signifikanten Einfluss auf die Kontraktilität oder die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit. Die Beteiligung von der AP-1- und SMAD-inhibierenden Wirkung von YB-1 an dem negativen Einfluss auf die Kontraktilität erscheint eher unwahrscheinlich. Allerdings erfolgte in dieser Arbeit kein Nachweis der effektiven Herunterregulation der jeweiligen Transkriptionsfaktoren. Vorangegangene Arbeiten an isolierten Kardiomyozyten hatten jedoch bereits die erfolgreiche AP-1- und SMAD-Inhibition mittels Decoy-Oligonukleotiden gezeigt (Schneiders et al., 2005), sodass auch in dieser Arbeit eine Reduktion der Aktivität der Transkriptionsfaktoren angenommen werden kann.

In der Zusammenschau der Ergebnisse der Decoy-Transfektion kann davon ausgegangen werden, dass die Beeinträchtigung der kontraktilen Funktion der Kardiomyozyten durch YB-1 über einen anderen Signalweg vermittelt wird als die protektive Funktion von YB-1 gegen den TGF- $\beta$ -Einfluss. Über welchen anderen Weg YB-1 die Kontraktilität erniedrigt, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Durch die Fähigkeit von YB-1 mannigfaltig in Translation, Transkription und Splicing einzugreifen, ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten. Allein die CTD-Domäne des YB-1-Proteins ist



durch ihre unregelmäßige Sekundärstruktur in der Lage sowohl Nukleinsäuren zu binden als auch mit Proteinen zu interagieren (Lyabin et al., 2014b). Zudem wurde gezeigt, dass das YB-1 nicht nur an der namensgebenden Y-Box Sequenz als Transkriptionsfaktor binden kann. Nach Hochregulation oder Translokation von YB-1 in den Nukleus wurde eine vermehrte Expression von Genen beschrieben, dessen Promotoren nicht die Sequenz der Y-Box enthielten (Zasedateleva et al., 2002). Es bedarf folglich weiterer Untersuchungen um herauszufinden, auf welche Weise YB-1 auf den kontraktilem Apparat Einfluss nimmt.

### 5.2.3 Veränderungen des Calciumhaushaltes unter YB-1

Bei Betrachtung der Westernblot-Ergebnisse der Calciumhandling-Proteine zeigten sich deutliche Veränderungen. Die signifikante Hochregulation von der SERCA und des NCX traten in den vorliegenden Ergebnissen erst nach 48 Stunden YB-1-Überexpression auf. Dies unterstreicht wiederum die oben genannte Überlegung, dass die YB-1-Wirkung stark von der Dauer der Überexpression abhängig ist.

Betrachtet man lediglich die physiologische Funktion dieser Transporter, würde man eine verbesserte Relaxation der Kardiomyozyten durch eine Hochregulation der SERCA und des NCX erwarten. Dieses lässt sich in den Kontraktionsversuchen jedoch nicht bestätigen. Im Gegenteil, auch die Relaxationsgeschwindigkeit ist nach 48 Stunden reduziert. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Hochregulation von der SERCA und des NCX um einen Versuch der Kompensation der Kardiomyozyten handelt. Dieses impliziert, dass die reduzierte kontraktile Funktion ursächlich nicht mit einem verändertem Calciumhandling einhergeht, sondern auf eine andere Ursache zurückzuführen ist. Dieser Verdacht erhärtet sich, wenn man die Expressionsraten nach 24 Stunden von NCX, SERCA und dem  $\beta_1$ -Rezeptor mit denen nach 48 Stunden unter Ad-YB-1 vergleicht. Hier zeigt sich nach 24 Stunden gar kein Effekt oder sogar eine angedeutete Herunterregulation (SERCA: 98,1%;  $\beta_1$ -Rezeptor: 84,7%; NCX: 85,1 %), wohingegen nach 48 Stunden eine Hochregulation (SERCA: 149,2%;  $\beta_1$ -Rezeptor: 107%; NCX: 142,2 %) auszumachen ist. Nur bei dem NCX und der SERCA zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Diese gegensätzliche Entwicklung legt den Verdacht nahe, dass YB-1 nicht unmittelbar in die Proteinexpression der Calciumhaushaltes eingreift, sondern dass die Kardiomyozyten mit einem veränderten Calciumhandling auf YB-1-getriggerte Veränderungen außerhalb der untersuchten Calciumproteine reagieren.

In die obige Diskussion, ob unter YB-1 die Veränderungen des Calciumhaushaltes die Kontraktilität beeinflusst oder umgekehrt, sollte auch die Tatsache einfließen, dass die verminderte kontraktile Funktion der YB-1-infizierten Kardiomyozyten durch eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin reversibel ist. Weder nach 24 noch nach 48 Stunden

zeigte sich unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ein signifikanter Unterschied in den drei Kontraktionsparametern. Sollte die Ursache für die reduzierte Kontraktilität eine Störung der Calciumhomöostase sein, so scheint sich diese größtenteils mit dem positiven ionotropen Effekt des Isoprenalins kompensieren zu lassen.

YB-1 agiert häufig als Cofaktor anderer Transkriptionsfaktoren, was voraussichtlich durch die ungeordnete Struktur des Proteins begünstigt wird (Lyabin et al., 2014a). Ein Eingreifen von YB-1 in die Genexpression der Calciumproteine durch die zahlreichen Effekte auf Translation, Transkription und Splicing, unabhängig von der SMAD- und AP-1-Interaktion, ist durchaus möglich.

In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass verschiedene Konzentrationen von YB-1 unterschiedliche Wirkungen auf die Translation haben. Bei hoher YB-1-Konzentration wird die Translation inhibiert und die mRNA akkumuliert in der Zelle. Außerdem wird sie vor dem Abbau geschützt (Evdokimova et al., 2006). Bei abnehmenden YB-1/mRNA-Verhältnissen findet die Translation vermehrt statt, da nun die Bindung der Translationsinitiationsfaktoren an der 5'-Cap-Struktur erleichtert ist (Nekrasov et al., 2003). Zusammenfassend kann man sagen, dass eine basale YB-1-Konzentration eine Cap-abhängige Translation begünstigt. Steigt die Konzentration, so werden eher die Cap-unabhängigen Prozesse begünstigt. Die Translationsrate für mRNAs mit spezifischen Bindungssequenzen dagegen ist bei niedrigen YB-1-Konzentrationen am höchsten (Lyabin et al., 2014b). Dieser Aspekt könnte die gegensätzlichen Effekte nach 24- und 48-stündiger YB-1-Überexpression auf die Proteinexpression erklären.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass YB-1 eine in dieser Arbeit nicht betrachtete Veränderung in der Expression oder Funktionalität der übrigen Proteine des Calciumhaushaltes provoziert. So würde eine erhöhte Expression oder ein verstärkter Calciumfluss über den L-Typ-Calciumkanal oder den RyR2 eine erhöhte, systolische Calciumkonzentration im Zytosol bewirken, die einen erhöhten Calciumausstrom bedarf. Eine Untersuchung der Kontraktilität der YB-1-infizierten Zellen in Medien mit veränderten Calciumkonzentrationen wäre ein zusätzlicher Überlegungsansatz. Es ist zudem bisher unklar, ob YB-1 direkten Einfluss auf Gene hat, die die Expression für SERCA und NCX kodieren.

### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, einen Faktor zu identifizieren, der einerseits den Herzmuskel vor hypertrophen und apoptotischen Prozessen während des kardialen Remodelings schützt und der andererseits keinen negativen Einfluss auf die Kontraktilität hat. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte der protektive Effekt auf Hypertrophie und Apoptose bereits

bestätigend für YB-1 und JDP2 gezeigt werden. Die nun vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass es neben dem protektiven Effekt auch einen negativen Einfluss auf die Funktionalität des Myokards durch YB-1 und JDP2 gibt. Ebenfalls von Interesse wäre der Effekt auf die Kontraktilität nach simultaner Überexpression von TGF- $\beta$  und jeweils YB-1 und JDP2. So könnte erweiternd der basale Effekt von YB-1 und JDP2 mit dem simuliert pathologischen Effekt durch eine erhöhte TGF- $\beta$ -Expression verglichen werden. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen, die eine genauere Unterscheidung zwischen einem negativem und einem protektiven Effekt von YB-1 und JDP2 zulassen. Für beide Faktoren konnte zudem eine veränderte Expression der Proteine des Calciumhaushaltes gezeigt werden. Unklar blieb jedoch, ob es sich ausschließlich um direkte Einflüsse der Transkriptionsfaktoren auf den Calciumhaushalt handelt oder es sich auch um reaktive Veränderung handelt. Letzteres wirft die Frage auf, auf welcher Ebene JDP2 und YB-1 die Kontraktilität beeinflussen. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, beispielsweise des kontraktile Apparates oder der Expression anderer Calciumhandlingproteine.

Die vorliegenden Daten haben gezeigt, dass der negative Einfluss auf das Kontraktionsverhalten durch JDP2 und YB-1 unabhängig von den Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD geschieht, da durch die spezifische Inhibition der AP-1- und SMAD-Bindung an die DNA mittels Oligonukleotiden die Kontraktilität unbeeinflusst bleibt. Diese Schlussfolgerung muss in der Gesamtsicht dieser Arbeit abgeschwächt werden, da jeweils kein Nachweis der effektiven Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD durch die Transfektion mit den Decoys in den Kontraktionsversuchen erbracht wurde.

Die Inhibition von AP-1 und SMAD bleibt dennoch eine vielversprechende Möglichkeit, um hypertrophe und apoptotische Prozesse am Myokard zu unterbinden. Da die Kontraktilität durch AP-1- und SMAD-bindende Gene offensichtlich nicht beeinflusst wird, bleiben diese Transkriptionsfaktoren ein mögliches Target der Herzinsuffizienztherapie.

## 6. Zusammenfassung

Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD sind klassische Signalmoleküle von TGF- $\beta$ , welchem eine entscheidende Rolle im kardialen Remodelling zugeschrieben wird. Eine Inhibition dieser Faktoren mittels AP-1- und SMAD-spezifischen Decoy-Oligonukleotiden als auch durch Überexpression von YB-1 und JDP2, kann die Herzmuskelzellen vor der Apoptose- und Hypertrophie-Induktion durch TGF- $\beta$  schützen. YB-1 ist sowohl in der Lage den SMAD-Signalweg zu inhibieren als auch die AP-1-abhängige Genexpression zu unterbinden. JDP2 dagegen inhibiert nur AP-1, indem es um die gleiche Bindungsstelle wie AP-1 konkurriert. Unklar war bisher, welche Auswirkungen die verschiedenen Möglichkeiten der Inhibition von AP-1 und SMAD auf die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen haben. Deshalb wurden Kontraktionsmessungen auf Zellebene nach YB-1- und JDP2-Überexpression sowie nach Transformation von Herzmuskelzellen mit AP-1- und SMAD-spezifischen Decoy-Oligonukleotiden angefertigt. Zudem wurde mittels Westernblot die Expression der Proteine des Calciumhaushaltes nach YB-1- und JDP2-Überexpression untersucht.

In dieser Arbeit wurde JDP2 für die Kontraktionsversuche für eine Woche überexprimiert. Die Überexpression wurde in doppelt-transgenen Mäusen generiert, die unter der Kontrolle eines Transaktivators JDP2 herzspezifisch überexprimierten. Neben den Untersuchungen an den Herzen, die eine Woche JDP2 überexprimierten, wurde für die Westernblots die JDP2-Überexpression ebenfalls für vier und zehn Wochen generiert. Die YB-1-Überexpression wurde mittels eines adenoviralen Konstrukts in adulten, isolierten Kardiomyozyten der Ratte für 24 und 48 Stunden generiert.

Die erhobenen Daten zeigen, dass sowohl nach einwöchiger JDP2-Überexpression die Kontraktilität auf Zellebene als auch in vivo in der Echokardiographie reduziert ist. Durch die YB-1-Überexpression wurde ebenfalls die Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten reduziert. In beiden Ansätzen blieb in vitro die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit erhalten. Weder eine AP-1- noch SMAD-spezifische Inhibition durch Decoy-Oligonukleotide konnte die Kontraktilität negativ beeinflussen. Dies legt den Schluss nahe, dass die Reduktion der Kontraktilität durch JDP2 und YB-1 weder über AP-1 noch über SMADs vermittelt wird.

Die Westernblots nach JDP2-Überexpression zeigten außerdem eine reduzierte SERCA-Expression, eine Reduktion des NCX und des  $\beta_1$ -Adrenorezeptor nach zehn Wochen und eine verstärkte Expression des PLBs mit einem verminderten Phosphorylierungsstatus nach einer, vier und zehn Wochen JDP2-Überexpression. Dies könnte die reduzierte kontraktile Funktion erklären. Unter YB-1 dagegen konnte eine

erhöhte SERCA- und NCX-Expression nach 48 Stunden nachgewiesen werden. Dies scheint eher ein reaktiver Effekt der YB-1-Überexpression zu sein. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass YB-1 und JDP2 durch ihren negativen Einfluss auf die kontraktile Funktion des Myokards nicht therapeutisch eingesetzt werden sollten. Andererseits wird deutlich, dass AP-1 und SMAD nach wie vor ein mögliches Target zur Verhinderung des kardialen Remodelings darstellen.

## 7. Summary

The transcription factors AP-1 and SMAD were detected as typical signalling molecules of TGF- $\beta$  and thereby they are mediators of cardiac remodelling. By use of decoy-oligonucleotides with specific binding site for AP-1 and SMAD, but also by overexpression of the transcription factors JDP2 and YB-1 processes of cardiac remodelling such as hypertrophy and apoptosis could be prevented in ventricular cardiomyocytes. JDP2 binds AP-1-subunits and AP-1-specific promoter elements. Both lead to inactivated transcription of AP-1. YB-1 is able to interfere in SMAD-signalling pathways and also inhibits the AP-1-signalling. The influence of JDP2- and YB-1-overexpression as well as specific AP-1- and SMAD-inhibition on the contractile function was still unclear. I, therefore, investigated, if overexpression of JDP2 in transgenic mice influences contractile function at the cellular level and in echocardiography. In another approach, cardiomyocytes were either transfected with adenovirus for YB-1 overexpression or transformed with decoy-oligonucleotides for specific SMAD- and AP-1-inhibition, and the contractile function was analysed. Furthermore the expression of the proteins from the calcium signalling pathway after YB-1- and JDP2-overexpression was examined by western blots.

The results showed that JDP2-overexpression for one week as well as the YB-1-overexpression impair the contractility of cardiomyocytes. In both approaches  $\beta$ -adrenergic responsiveness was maintained in vitro. The echocardiography also showed a decreased cardiac output after one week JDP2-overexpression. Neither the AP-1- nor the SMAD-specific inhibition by decoy-oligonucleotides influenced the contractile function of the cardiomyocytes. These results indicate that the impact of YB-1 and JDP2 on the contractile function of cardiomyocytes is not mediated by AP-1 or SMAD, but is more likely mediated via other transcription inhibitory pathways.

The western blots of cardiac proteins after one week JDP2-overexpression revealed a reduced SERCA-expression, a reduction of NCX and  $\beta_1$ -adrenoreceptor after ten weeks and also an increased expression of PLB in association with a decreased phosphorylation of PLB after one, four and ten weeks JDP2-overexpression. All of these changes can be due to altered calcium handling and could, thus, explain the reduction of the contractile function of the myocardium under JDP2.

On the other hand the results of the western blots after YB-1-overexpression showed an increased expression of SERCA and NCX after 48 hour. This seems to be a compensatory effect due to the decreased contractile function upon YB-1 overexpression.

In conclusion, overexpression of JDP2 and YB-1 in transgenic mice or adult cardiomyocytes of rats leads to impairment of contractile function. These transcription factors should, therefore, not be used for therapeutic application. On the other hand the specific inhibition of AP-1 or SMADs for inhibition of hypertrophy and apoptosis in absence of contractile impairments is still possible target for prevention of cardiac remodelling.

## 8. Literaturverzeichnis

### A

Andersson, Kristin Brevik; Birkeland, Jon Arne Kro; Finsen, Alexandra Vanessa; Louch, William E.; Sjaastad, Ivar; Wang, Yibin et al. (2009): Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the Serca2 gene. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 47 (2), S. 180–187. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.013.

Anwar, A.; Schlüter, K-D; Heger, J.; Piper, H. M.; Euler, G. (2008): Enhanced SERCA2A expression improves contractile performance of ventricular cardiomyocytes of rat under adrenergic stimulation. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457 (2), S. 485–491. DOI: 10.1007/s00424-008-0520-7.

Aroundas, Antonis A.; Rose, Jochen; Aggarwal, Rajesh; Stuyvers, Bruno D.; O'Rourke, Brian; Kass, David A. et al. (2007): Cellular and molecular determinants of altered Ca<sup>2+</sup> handling in the failing rabbit heart. Primary defects in SR Ca<sup>2+</sup> uptake and release mechanisms. In: *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 292 (3), H1607-18. DOI: 10.1152/ajpheart.00525.2006.

Aronheim, A.; Zandi, E.; Hennemann, H.; Elledge, S. J.; Karin, M. (1997): Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. In: *Molecular and cellular biology* 17 (6), S. 3094–3102.

### C

Chansky, H. A.; Hu, M.; Hickstein, D. D.; Yang, L. (2001): Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. In: *Cancer research* 61 (9), S. 3586–3590.

### D

Darlyuk-Saadon, Ilona; Weidenfeld-Baranboim, Keren; Yokoyama, Kazunari K.; Hai, Tsonwin; Aronheim, Ami (2012): The bZIP repressor proteins, c-Jun dimerization protein 2 and activating transcription factor 3, recruit multiple HDAC members to the ATF3 promoter. In: *Biochimica et biophysica acta* 1819 (11-12), S. 1142–1153. DOI: 10.1016/j.bbagr.2012.09.005.

del Monte, Federica; Harding, Sian E.; Dec, G. William; Gwathmey, Judith K.; Hajjar, Roger J. (2002): Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. In: *Circulation* 105 (8), S. 904–907.

Dennler, Sylviane; Goumans, Marie-José; Dijke, Peter ten (2002): Transforming growth factor beta signal transduction. In: *Journal of leukocyte biology* 71 (5), S. 731–740.

Deten, A.; Hölzl, A.; Leicht, M.; Barth, W.; Zimmer, H. G. (2001): Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 33 (6), S. 1191–1207. DOI: 10.1006/jmcc.2001.1383.

Didier, D. K.; Schiffenbauer, J.; Woulfe, S. L.; Zacheis, M.; Schwartz, B. D. (1988): Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (19), S. 7322–7326.

Dooley, Steven; Said, Harun M.; Gressner, Axel M.; Floege, Jürgen; En-Nia, Abdelaziz; Mertens, Peter R. (2006): Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (3), S. 1784–1795. DOI: 10.1074/jbc.M510215200.

Dorn, Gerald W.; Molkenin, Jeffery D. (2004): Manipulating cardiac contractility in heart failure. Data from mice and men. In: *Circulation* 109 (2), S. 150–158. DOI: 10.1161/01.CIR.0000111581.15521.F5.



## E

Euler-Taimor, Gerhild; Heger, Jacqueline (2006): The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. In: *Cardiovascular Research* 69 (1), S. 15–25. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.07.007.

Evdokimova, V.; Ruzanov, P.; Imataka, H.; Raught, B.; Svitkin, Y.; Ovchinnikov, L. P.; Sonenberg, N. (2001): The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. In: *The EMBO journal* 20 (19), S. 5491–5502. DOI: 10.1093/emboj/20.19.5491.

Evdokimova, Valentina; Ruzanov, Peter; Anglesio, Michael S.; Sorokin, Alexey V.; Ovchinnikov, Lev P.; Buckley, Jonathan et al. (2006): Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. In: *Molecular and cellular biology* 26 (1), S. 277–292. DOI: 10.1128/MCB.26.1.277-292.2006.

## F

Fearnley, Claire J.; Roderick, H. Llewelyn; Bootman, Martin D. (2011): Calcium signaling in cardiac myocytes. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (11), a004242. DOI: 10.1101/cshperspect.a004242.

Fliedner, Anselm; Holubarsch, Christian J. F. (2003): Einfluss von vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-beta-1, Interleukin-6, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide und Cortisol auf die Gen-Expression des menschlichen Herzmuskels in vitro. Universität, Freiburg.

Frantz, Stefan; Fraccarollo, Daniela; Wagner, Helga; Behr, Thomas M.; Jung, Philip; Angermann, Christiane E. et al. (2003): Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. In: *Cardiovascular Research* 57 (3), S. 749–756.

## H

Hao, J.; Wang, B.; Jones, S. C.; Jassal, D. S.; Dixon, I. M. (2000): Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. In: *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 279 (6), H3020-30.

Harjung, Claudia: YB-1 inhibiert die durch TGF-beta1 induzierte Apoptose und die alpha-adrenerg induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten.

Harjung, Claudia (2012): YB-1 inhibiert die durch TGF-b1 induzierte Apoptose und die adrenerg induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten. 1.Aufl. Gießen, Lahn: VVB Laufersweiler Verlag.

Hasin, Tal; Elhanani, Ofer; Abassi, Zaid; Hai, Tsonwin; Aronheim, Ami (2011): Angiotensin II signaling up-regulates the immediate early transcription factor ATF3 in the left but not the right atrium. In: *Basic research in cardiology* 106 (2), S. 175–187. DOI: 10.1007/s00395-010-0145-9.

Heger, Jacqueline; Peters, Saskia C.; Piper, Hans-Michael; Euler, Gerhild (2009): SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. In: *Journal of cellular physiology* 220 (2), S. 515–523. DOI: 10.1002/jcp.21805.

Hess, Jochen; Angel, Peter; Schorpp-Kistner, Marina (2004): AP-1 subunits. Quarrel and harmony among siblings. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 25), S. 5965–5973. DOI: 10.1242/jcs.01589.

Higashi, Kiyoshi; Inagaki, Yutaka; Fujimori, Ko; Nakao, Atsuhito; Kaneko, Hideo; Nakatsuka, Iwao (2003): Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (44), S. 43470–43479. DOI: 10.1074/jbc.M302339200.

Hill, Christian; Würfel, Alona; Heger, Jacqueline; Meyering, Bettina; Schlüter, Klaus-Dieter; Weber, Martin et al. (2013): Inhibition of AP-1 signaling by JDP2 overexpression protects cardiomyocytes against hypertrophy and apoptosis induction. In: *Cardiovascular Research* 99 (1), S. 121–128. DOI: 10.1093/cvr/cvt094.

Hu, S-T; Liu, G-S; Shen, Y-F; Wang, Y-L; Tang, Y.; Yang, Y-J (2011): Defective Ca(2+) handling proteins regulation during heart failure. In: *Physiological research* 60 (1), S. 27–37.

Huang, Yu-Chang; Hasegawa, Hitomi; Wang, Shin-Wei; Ku, Chia-Chen; Lin, Ying-Chu; Chiou, Shyh-Shin et al. (2011): Jun dimerization protein 2 controls senescence and differentiation via regulating histone modification. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, S. 569034. DOI: 10.1155/2011/569034.

#### I

Ikeuchi, Masaki; Tsutsui, Hiroyuki; Shiomi, Tetsuya; Matsusaka, Hidenori; Matsushima, Shouji; Wen, Jing et al. (2004): Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. In: *Cardiovascular Research* 64 (3), S. 526–535. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.07.017.

Izumi, H.; Imamura, T.; Nagatani, G.; Ise, T.; Murakami, T.; Uramoto, H. et al. (2001): Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'–5' exonuclease activity. In: *Nucleic acids research* 29 (5), S. 1200–1207.

#### J

Jenkins, Robert H.; Bennagi, Rasha; Martin, John; Phillips, Aled O.; Redman, James E.; Fraser, Donald J. (2010): A conserved stem loop motif in the 5'untranslated region regulates transforming growth factor- $\beta$ (1) translation. In: *PLoS ONE* 5 (8), S. e12283. DOI: 10.1371/journal.pone.0012283.

Jeong, Mark Y.; Kinugawa, Koichiro; Vinson, Charles; Long, Carlin S. (2005): AFos dissociates cardiac myocyte hypertrophy and expression of the pathological gene program. In: *Circulation* 111 (13), S. 1645–1651. DOI: 10.1161/01.CIR.0000160367.99928.87.

#### K

Kalfon, R.; Haas, T.; Shofti, R.; Moskovitz, J. D.; Schwartz, O.; Suss-Toby, E.; Aronheim, A. (2017): c-Jun dimerization protein 2 (JDP2) deficiency promotes cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload. In: *International journal of cardiology* 249, S. 357–363. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.08.074.

Kamalov, German; Varma, Balwantkumar R.; Lu, Li; Sun, Yao; Weber, Karl T.; Guntaka, Ramareddy V. (2005): Expression of the multifunctional Y-box protein, YB-1, in myofibroblasts of the infarcted rat heart. In: *Biochemical and biophysical research communications* 334 (1), S. 239–244. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.06.082.

Kehat, Izhak; Heinrich, Ronit; Ben-Izhak, Ofer; Miyazaki, Hiroshi; Gutkind, J. Silvio; Aronheim, Ami (2006): Inhibition of basic leucine zipper transcription is a major mediator of atrial dilatation. In: *Cardiovascular Research* 70 (3), S. 543–554. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.02.018.

Kim, Ekaterina R.; Selyutina, Anastasia A.; Buldakov, Ilya A.; Evdokimova, Valentina; Ovchinnikov, Lev P.; Sorokin, Alexey V. (2013): The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA damaging stress. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (24), S. 3791–3803. DOI: 10.4161/cc.26670.

Kohnno, Kimitoshi; Izumi, Hiroto; Uchiumi, Takeshi; Ashizuka, Megumi; Kuwano, Michihiko (2003): The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. In: *Bioessays* 25 (7), S. 691–698. DOI: 10.1002/bies.10300.

Kuner, Ruprecht; Barth, Andreas S.; Ruschhaupt, Markus; Bunes, Andreas; Zwermann, Ludwig; Kreuzer, Eckart et al. (2008): Genomic analysis reveals poor separation of human cardiomyopathies of ischemic and nonischemic etiologies. In: *Physiological genomics* 34 (1), S. 88–94. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00299.2007.

## L

Levy, Daniel; Kenchaiah, Satish; Larson, Martin G.; Benjamin, Emelia J.; Kupka, Michelle J.; Ho, Kalon K. L. et al. (2002): Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. In: *The New England journal of medicine* 347 (18), S. 1397–1402. DOI: 10.1056/NEJMoa020265.

Liu, Jing; Rigel, Dean F. (2009): Echocardiographic examination in rats and mice. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 573, S. 139–155. DOI: 10.1007/978-1-60761-247-6\_8.

Liu, Xiaoying; Kelm, Robert J.; Strauch, Arthur R. (2009): Transforming growth factor beta1-mediated activation of the smooth muscle alpha-actin gene in human pulmonary myofibroblasts is inhibited by tumor necrosis factor-alpha via mitogen-activated protein kinase kinase 1-dependent induction of the Egr-1 transcriptional repressor. In: *Molecular biology of the cell* 20 (8), S. 2174–2185. DOI: 10.1091/mbc.E08-10-0994.

Locatelli, Jamille; Assis, Leonardo V. M. de; Isoldi, Mauro C. (2014): Calcium handling proteins. Structure, function, and modulation by exercise. In: *Heart failure reviews* 19 (2), S. 207–225. DOI: 10.1007/s10741-013-9373-z.

Lou, Qing; Janardhan, Ajit; Efimov, Igor R. (2012): Remodeling of calcium handling in human heart failure. In: *Advances in experimental medicine and biology* 740, S. 1145–1174. DOI: 10.1007/978-94-007-2888-2\_52.

Lyabin, Dmitry N.; Doronin, Alexander N.; Eliseeva, Irina A.; Guens, Gelena P.; Kulakovskiy, Ivan V.; Ovchinnikov, Lev P. (2014a): Alternative forms of Y-box binding protein 1 and YB-1 mRNA. In: *PLoS ONE* 9 (8), e104513. DOI: 10.1371/journal.pone.0104513.

Lyabin, Dmitry N.; Eliseeva, Irina A.; Ovchinnikov, Lev P. (2014b): YB-1 protein. Functions and regulation. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 5 (1), S. 95–110. DOI: 10.1002/wrna.1200.

## N

Nadruz, Wilson; Kobarg, Claudia B.; Kobarg, Jörg; Franchini, Kleber G. (2004): c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. In: *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 286 (2), H760-7. DOI: 10.1152/ajpheart.00430.2003.

Nekrasov, Maxim P.; Ivshina, Maria P.; Chernov, Konstantin G.; Kovrigina, Elizaveta A.; Evdokimova, Valentina M.; Thomas, Adri A. M. et al. (2003): The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 13936–13943. DOI: 10.1074/jbc.M209145200.

## O

Okamoto, Y.; Chaves, A.; Chen, J.; Kelley, R.; Jones, K.; Weed, H. G. et al. (2001): Transgenic mice with cardiac-specific expression of activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, have conduction abnormalities and contractile dysfunction. In: *The American journal of pathology* 159 (2), S. 639–650. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61735-X.

Omura, Takashi; Yoshiyama, Minoru; Yoshida, Ken; Nakamura, Yasuhiro; Kim, Shokei; Iwao, Hiroshi et al. (2002): Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 39 (1), S. 81–86.

## P

Partsch, Stefan (2010): Einfluss einer adenoviralen Überexpression des SMAD Inhibitors YB-1 auf die Hypertrophie- und Apoptose-Entwicklung in isolierten adulten Herzmuskelzellen der Ratte. 1. Aufl. Giessen: VVB Lauferweiler (Edition scientifique).

Pogwizd, S. M.; Schlotthauer, K.; Li, L.; Yuan, W.; Bers, D. M. (2001): Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure. Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier

potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. In: *Circulation research* 88 (11), S. 1159–1167.

Ponikowski, Piotr; Voors, Adriaan A.; Anker, Stefan D.; Bueno, Héctor; Cleland, John G. F.; Coats, Andrew J. S. et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. In: *European heart journal* 37 (27), S. 2129–2200. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw128.

Port, J. D.; Bristow, M. R. (2001): Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 33 (5), S. 887–905. DOI: 10.1006/jmcc.2001.1358.

Poursaket, Farnoush (2011): Smad4 als endogener Repressor von Hypertrophie in adulten Kardiomyozyten der Ratte. 1. Aufl. Giessen: VVB Laufersweiler (Edition scientifique).

Puglisi, Jose L.; Goldspink, Paul H.; Gomes, Aldrin V.; Utter, Megan S.; Bers, Donald M.; Solaro, R. John (2014): Influence of a constitutive increase in myofilament Ca(2+)-sensitivity on Ca(2+)-fluxes and contraction of mouse heart ventricular myocytes. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 552-553, S. 50–59. DOI: 10.1016/j.abb.2014.01.019.

## R

Rosenkranz, Stephan (2004): TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. In: *Cardiovascular Research* 63 (3), S. 423–432. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.04.030.

## S

Samuel, Shaija; Twizere, Jean-Claude; Bernstein, Lori R. (2005): YB-1 represses AP1-dependent gene transactivation and interacts with an AP-1 DNA sequence. In: *The Biochemical journal* 388 (Pt 3), S. 921–928. DOI: 10.1042/BJ20041497.

Schlieper, A.; Anwar, M.; Heger, J.; Piper, H. M.; Euler, G. (2007): Repression of anti-apoptotic genes via AP-1 as a mechanism of apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454 (1), S. 53–61. DOI: 10.1007/s00424-006-0180-4.

Schlüter, K. D.; Frischkopf, K.; Flesch, M.; Rosenkranz, S.; Taimor, G.; Piper, H. M. (2000): Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy. In: *Cardiovascular Research* 45 (2), S. 410–417.

Schlüter, K. D.; Zhou, X. J.; Piper, H. M. (1995): Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes. In: *The American journal of physiology* 269 (5 Pt 1), C1311-6.

Schmidt, Albrecht G.; Edes, Istvan; Kranias, Evangelia G. (2001): Phospholamban: A Promising Therapeutic Target in Heart Failure? In: *Cardiovascular Drugs and Therapy* 15 (5), S. 387–396. DOI: 10.1023/A:1013381204658.

Schneiders, Daniela (2004): SMAD als Vermittler der Apoptose in ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte. 1. Aufl. Wettenberg: VVB Laufersweiler (Edition scientifique).

Schneiders, Daniela; Heger, Jacqueline; Best, Patrick; Michael Piper, Hans; Taimor, Gerhild (2005): SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. In: *Cardiovascular Research* 67 (1), S. 87–96. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.02.021.

Schultz, Jo El J.; Witt, Sandra A.; Glascock, Betty J.; Nieman, Michelle L.; Reiser, Peter J.; Nix, Stacey L. et al. (2002): TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. In: *The Journal of clinical investigation* 109 (6), S. 787–796. DOI: 10.1172/JCI14190.

Stickeler, E.; Fraser, S. D.; Honig, A.; Chen, A. L.; Berget, S. M.; Cooper, T. A. (2001): The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. In: *The EMBO journal* 20 (14), S. 3821–3830. DOI: 10.1093/emboj/20.14.3821.

Subramaniam, A.; Jones, W. K.; Gulick, J.; Wert, S.; Neumann, J.; Robbins, J. (1991): Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (36), S. 24613–24620.

## T

Taimor, G.; Rakow, A.; Piper, H. M. (2001): Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (13), S. 2518–2520. DOI: 10.1096/fj.01-0353fje.

Taimor, G.; Schlüter, K-D; Best, P.; Helmig, S.; Piper, H. M. (2004): Transcription activator protein 1 mediates alpha- but not beta-adrenergic hypertrophic growth responses in adult cardiomyocytes. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286 (6), S. 75. DOI: 10.1152/ajpheart.00741.2003.

Tanabe, Yumiko; Nagatoishi, Satoru; Tsumoto, Kouhei (2015): Thermodynamic characterization of the interaction between the human Y-box binding protein YB-1 and nucleic acids. In: *Molecular bioSystems* 11 (9), S. 2441–2448. DOI: 10.1039/c5mb00184f.

Teucher, Nils; Prestle, Juergen; Seidler, Tim; Currie, Susan; Elliott, Elspeth B.; Reynolds, Deborah F. et al. (2004): Excessive sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase expression causes increased sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake but decreases myocyte shortening. In: *Circulation* 110 (23), S. 3553–3559. DOI: 10.1161/01.CIR.0000145161.48545.B3.

Tsai, Ming-Ho; Wuputra, Kenly; Lin, Yin-Chu; Lin, Chang-Shen; Yokoyama, Kazunari K. (2016): Multiple functions of the histone chaperone Jun dimerization protein 2. In: *Gene* 590 (2), S. 193–200. DOI: 10.1016/j.gene.2016.03.048.

## U

Unger, Thomas; Li, Jun (2004): The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. In: *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 5 Suppl 1, S7-10. DOI: 10.3317/jraas.2004.024.

## W

Weidenfeld-Baranboim, Keren; Bitton-Worms, Keren; Aronheim, Ami (2008): TRE-dependent transcription activation by JDP2-CHOP10 association. In: *Nucleic acids research* 36 (11), S. 3608–3619. DOI: 10.1093/nar/gkn268.

Weidenfeld-Baranboim, Keren; Hasin, Tal; Darilyuk, Ilona; Heinrich, Ronit; Elhanani, Ofer; Pan, Jianzhi et al. (2009): The ubiquitously expressed bZIP inhibitor, JDP2, suppresses the transcription of its homologue immediate early gene counterpart, ATF3. In: *Nucleic acids research* 37 (7), S. 2194–2203. DOI: 10.1093/nar/gkp083.

Weil, Joachim; Schunkert, Heribert (2006): Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. In: *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 95 Suppl 4, 1-15; quiz 16-7. DOI: 10.1007/s00392-006-2005-z.

Wenzel, Sibylle (2001): Signaltransduktion der Angiotensin-II-vermittelten Steigerung der TGFβ-Expression [TGF-beta-Expression] in adulten ventrikulären Kardiomyozyten. Gießen, Univ., Diss., 2001. Online verfügbar unter <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2001/480/>.

Wenzel, Sibylle; Henning, Kirsten; Habbig, Andreas; Forst, Svenja; Schreckenberger, Rolf; Heger, Jacqueline et al. (2010): TGF-beta1 improves cardiac performance via up-regulation of laminin receptor 37/67 in adult ventricular cardiomyocytes. In: *Basic research in cardiology* 105 (5), S. 621–629. DOI: 10.1007/s00395-010-0108-1.

## Z

Zasedateleva, O. A.; Krylov, A. S.; Prokopenko, D. V.; Skabkin, M. A.; Ovchinnikov, L. P.; Kolchinsky, A.; Mirzabekov, A. D. (2002): Specificity of mammalian Y-box binding protein p50 in interaction with ss and ds DNA analyzed with generic oligonucleotide microchip. In: *Journal of molecular biology* 324 (1), S. 73–87.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Aktivator Protein-1
Aqua bidest.	Zweifach demineralisiertes Wasser
AT-1	Angiotensin Typ II Rezeptor Subtyp 1
ATF3	Activating transcription factor 3
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	basic amino acid leucine zipper-Protein
C/EBP	CCAT/Enhancer-Binding Protein
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CaCl	Calcium(II)chlorid
CaMKII	Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Con V	Kontraktionsgeschwindigkeit
CRE	cAMP-Responsible Element
CSD	Cold-Shock-Domäne
CTD	C-terminale Domäne
dL/L	relative Zellverkürzung
DNA	Desoxyribonucleinacid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
ERK	extracellular signal regulated Kinase
FCS	fetal calve serum; fötales Kälberserum
GATA	GATA-binding factor
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMTF	Histon-Methyltransferasen
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
JDP2	c-Jun Dimerisationsprotein 2

JNK	c-Jun amino-terminale Kinase
kb	Kilobase (= 1000 Nukleotide)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzerkrankung
KO	knock out
M	mol/L
MAPK	mitogen aktivierten Proteinkinasen
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC	myosin heavy chain, schwere Myosin Kette,
MHC	major-histocompatibility-complex
MHz	Megahertz
MMP	Magermilchpulver
MOI	multiplicity of infection; Anzahl eingesetzter Viren pro Zelle
mRNA	messenger RNA; RNA, die im Zytoplasma in Protein
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dinatriumhydrogencarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
nM	nanomol/L
NO	Nitric oxide, Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
P-PLB	phosphoryliertes Phospholamban
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rel V	Relaxationsgeschwindigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SBE	SMAD bindendes Element
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	sarcoplasmatische Calcium-ATPase



SMAD	small mother against decapentaplegic
SP1	specificity protein 1
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SR	sarkoplasmatische Retikulum
TAC	Transverse Aortic Constriction
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TLS	translocation liposarcoma protein
TRE	TPA-responsive elements
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	time to peak
U	unit, Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
VT	Volumenanteil
YB-1	Y-Box-bindendes Protein 1
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin

## 10. Publikationsverzeichnis

### **“JDP2- or YB-1 overexpression impairs contractile function of cardiomyocytes”**

**N. Brockmann**, J. Heger, R. Schulz, G. Euler

Justus-Liebig Universität, Physiologisches Institut, Gießen, Germany

Postervortrag 94. Jahrestagung der dt. Physiologischen Gesellschaft; Magdeburg, 2015

ACTA PHYSIOLOGICA Volume 213, Issue S699, March 2015, P279

### **„Überexpression der Transkriptionsfaktor-Inhibitoren, Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) oder Y-Box-Binding Protein 1 (YB-1), vermindert das Kontraktionsverhalten von ventrikulären Herzmuskelzellen“**

Gerhild Euler, **Nils Brockmann**, Jacqueline Heger, Rainer Schulz

Justus-Liebig Universität, Physiologisches Institut, Gießen, Germany

Postervortrag 83. Jahrestagung Dt. Gesellschaft der Kardiologie / 83. Annual Meeting of the German Cardiac Society; Mannheim, 2017

Clin Res Cardiol 106, Suppl 1, April 2017, P430

### **Overexpression of the transcription factor inhibitors JDP2 or YB-1 provoke contractile dysfunction in ventricular cardiomyocytes**

G. Euler, N. Brockmann, J. Heger, R. Schulz

Justus-Liebig Universität, Physiologisches Institut, Gießen, Germany

ACTA PHYSIOLOGICA, Volume 219, Issue S699, March 2017, OS08-5,

## 11. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, 10.03.2019

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized first name and a long horizontal line extending to the right.

---

Unterschrift

## 12. Danksagung

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Frau Professor Gerhild Euler, Professorin des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Bereitstellung des Themas, für ihre Geduld und Freundlichkeit und für viele produktive Ideen, die meine Arbeit vorangetrieben haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. Jacqueline Heger bedanken, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mir durch ihre fachliche und praktische Kompetenz aus mancher Einbahnstraße heraushalf.

Weiterhin gilt mein Dank den Technischen Assistenten des Physiologischen Instituts. Bei Birgit Stör möchte ich mich für die geduldige und nette Anleitung in die benötigte Methodik bedanken. Daniela Schreiber und Anna Reis danke ich für flexible und zuverlässige Präparation der Versuchstiere.

Außerdem danke ich Frau Dr. Julia Bornbaum für die fachlich einwandfreie Durchführung der echokardiographischen Untersuchungen.

Ein weiterer Dank gilt den anderen Doktoranden des Instituts, die durch ihre nette und freundliche Art meine Zeit am Institut bereichert haben.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6768-7



9 783835 196768 7