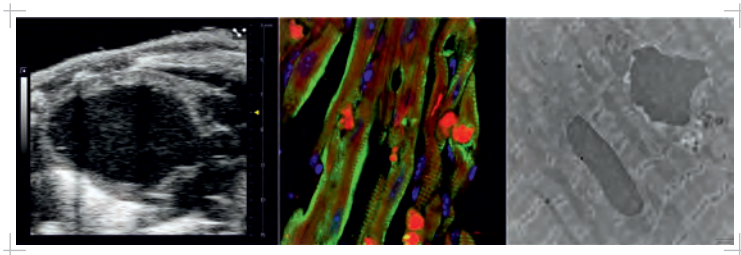


Nesrin Maren Jordis Schmiedel

Die Rolle des Proteins Fibrin in der kardialen Hypertrophie



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem 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 2022

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.

1st Edition 2022

© 2022 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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Schultheiß

und

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie,
Angiologie und internistische Intensivmedizin /
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Betreuer: Prof. Dr. med. Norbert Frey

Die Rolle des Proteins Fibrin in der kardialen Hypertrophie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Nesrin Maren Jordis Schmiedel

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen 2021

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof.Dr. Dr. h.c. Martin Kramer
Klinik für Kleintiere,
Professur für Chirurgie
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Schultheiß

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Norbert Frey

Prüferin: Prof. Dr. Kerstin Fey

Tag der Disputation: 29. Juli.2021

In Liebe und Gedenken an meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die kardiale Hypertrophie	1
1.1.1 Pathogenese der kardialen Hypertrophie	2
1.1.2 Molekulare Signalwege in der pathologischen Herzhypertrophie.....	3
1.1.3 Der Calcineurin-NFAT-Signalweg	4
1.2 Kardiomyopathien durch Protein Aggregate	5
1.2.1 Das Endoplasmatische Retikulum und dessen Qualitätskontrolle	5
1.2.2 Die Aktivierung der <i>Unfolded-Protein-Response</i> durch Protein-Aggregate	8
1.2.3 Abbau der Protein-Aggregate durch das ERAD-System	12
1.2.4 Apoptose	12
1.2.5 Autophagie	14
1.3 Erforschung neuer potentieller Ziel-Gene und deren Signalwege in der kardialen Hypertrophie	15
1.3.1 Identifikation von Fibin als assoziiertes Protein der kardialen Hypertrophie	15
1.3.2 Fibin, der Flossenknospeninitiationsfaktor im Zebraabräbling	16
1.3.3 Fibin, ein potenzieller Protektor gegen die kardiale Hypertrophie.....	19
1.4 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Arznei-und Narkose Mittel	23
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	23
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Enzyme	27
2.1.5 Kits	27
2.1.6 Oligonukleotide und Primer	27
2.1.7 Vektoren und Plasmide	30
2.1.8 Antikörper.....	30
2.1.9 Puffer und Lösungen	32

2.1.10	Medien	34
2.1.11	Bakterien	35
2.1.12	Versuchstiere.....	36
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	37
2.2.2	Molekularbiologische und biochemische Methoden.....	38
2.2.3	Tierversuche	55
2.2.4	Statistische Auswertung	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Effekte der kardialen Fibrin-Überexpression <i>in vivo</i>	62
3.1.1	Generierung einer Mauslinie mit kardialer Fibrin-Überexpression.....	62
3.1.2	Charakterisierung Fibrin-transgener-Mäuse	64
3.1.3	Einfluss der Fibrin-Überexpression im Herz in Modellen kardialer Hypertrophie	79
3.2	Analyse der in den Fibrin-TG-Mäusen beobachteten Aggregate	96
3.2.1	Differenzierung unklarer Aggregate im Herzwewebe von Fibrin-TG-Tieren.....	96
3.2.2	Lokalisation von Fibrin an der Z-Scheibe und in Aggregaten.....	98
3.2.3	Co-Aggregation des Fibrin-Proteins mit anderen Proteinen in den lokalisierten Aggregaten	100
3.2.4	Analyse der Aggregate mittels Elektronenmikroskopie	103
3.3	Analyse von ER-Stress und der <i>Unfolded-Protein-Response</i> in Fibrin-TG-Tieren	103
3.3.1	Expression UPR-Signalkaskaden assoziierten Proteinen in Fibrin-TG-Mäusen	104
3.3.2	Analyse der Caspasen -3,-7 und -12 in Fibrin-TG-Tieren	105
3.3.3	Beobachtung eines geblockten autophagischen Flusses im Herzwewebe von Fibrin-TG-Tieren	107
4	Diskussion.....	109
4.1	Fibrin-TG-Mäuse entwickeln eine Herzfunktionsstörung.....	110
4.2	Fibrin-Überexpression erzeugt keine Verbesserung der Herzfunktion in untersuchten Hypertrophie-Modellen (TAC und CnA-TG-Kreuzung)	114
4.3	Fibrin-TG-Mäuse weisen intrazelluläre Protein-Aggregate auf	118
4.4	Protein-Aggregate induzieren ER-Stress in Fibrin-TG Mäusen	120
4.5	Protein-Aggregate blockieren vermutlich den autophagischen Fluss und induzieren zum untersuchten Zeitpunkt keine Apoptose.....	125
4.6	Induktion einer Kardiomyopathie in Fibrin-TG-Tieren durch Protein-Aggregate.....	128
4.7	Schlussfolgerung.....	130

5	Zusammenfassung.....	132
6	Summary	134
7	Literaturverzeichnis.....	135
8	Anhang	145
9	Erklärung	150
10	Lebenslauf	151
11	Poster und Publikationen	152
12	Danksagungen	154

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Primer-Sequenzen für die Generierung der transgenen Mauslinie	28
Tabelle 2-2: Primer für Genotypisierung (Fibin-TG-Mäuse, Wildtypmäuse und CnA-TG-Mäuse)	28
Tabelle 2-3: Primer für spezifische quantitative Real-Time PCR	29
Tabelle 2-4: Primer für spezifische quantitative Multiplex Real-Time PCR.....	30
Tabelle 2-5: Erstantikörper für Western Blot (WB) oder Immunofluoreszenz (IF)	31
Tabelle 2-6: Zweitantikörper für Western Blot (WB) oder Immunofluoreszenz (IF)	31
Tabelle 2-7: E. coli Bakterienstämme.....	35
Tabelle 2-8: Versuchstier-Linien.....	36
Tabelle 2-9: Fibin-ORF-PCR mit der Pfx-Polymerase	40
Tabelle 2-10 Programm des Thermocyclers für die ORF-PCR	40
Tabelle 2-11: Ansatz für Restriktionsverdau	43
Tabelle 2-12: Ansatz für Ligationsansatz	43
Tabelle 2-13: Ansatz für die quantitative Real-Time PCR.....	46
Tabelle 2-14: Programm für den Thermocycler für die Real-Time PCR	46
Tabelle 2-15: Ansatz für Multiplex Real-Time PCR.....	47
Tabelle 2-16: Programm für Thermocycler zur Multiplex Real-Time PCR.....	47
Tabelle 2-17 Enzymlösung für die Isolierung adulter Mauskardiomyozyten	51
Tabelle 2-18: Stopplösung für die Isolierung adulter Mauskardiomyozyten	52
Tabelle 2-19: PCR-Ansatz zur Genotypisierung	57
Tabelle 2-20: Programm für Thermocycler zur Genotypisierung.....	58
Tabelle 3-1: Echokardiographische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibin-TG-Mäusen (Fibin hohe Expression).....	65
Tabelle 3-2: Morphometrische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibin-TG-Mäusen.....	68
Tabelle 3-3: Echokardiographische Parameter von 6 Monate alten Fibin-TG-Mäusen	75
Tabelle 3-4: Morphometrische Parameter von 6 Monate alten Fibin-TG-Tieren	77
Tabelle 3-5: Echokardiographische Parameter von Fibin-TG Mäusen und Kontrolltiere 14 Tage nach TAC- oder Scheinoperation	81
Tabelle 3-6: Morphometrische Parameter von Fibin-TG-Tieren 14 Tage nach TAC-oder Scheinoperation	83
Tabelle 3-7: Echokardiographische Parameter von 6 Wochen alten Nachkommen der Fibin-TG/CnA-TG-Kreuzung	89
Tabelle 3-8: Morphometrische Parameter von 6 Wochen alten Nachkommen der Fibin-TG/CnA-TG-Kreuzung.....	92
Tabelle 8-1: Echokardiographische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibin-TG-Mäusen (niedrige Expression von Fibin).....	145
Tabelle 8-2: Echokardiographische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibin-TG- Mäusen (mittlere Expression von Fibin)	147
Tabelle 8-3 Morphometrische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibin-TG-Mäusen (mittlere Expression von Fibin).....	147

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 ER-Stress	7
Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Signalwege der UPR	9
Abbildung 1-3: Morphologische Darstellung der Brustflosse eines Zebrabärlings nach einem funktionellem Fibrin Knockdown.....	17
Abbildung 1-4: Bestätigung der Lokalisation von Fibrin an der Z-Scheibe von Kardiomyozyten	21
Abbildung 3-1: Generierung der konstitutiven Fibrin-transgenen Maus	63
Abbildung 3-2: Bestätigung der Fibrin-Überexpression auf Proteinebene in Mauserzen durch Detektion von Fibrin mittels Western-Blot-Analyse.....	64
Abbildung 3-3: Keine echokardiographischen Unterschiede zwischen Fibrin-TG-Mäusen und deren Wildtypgeschwistern	67
Abbildung 3-4: Keine morphometrischen Unterschiede zwischen Fibrin-TG-Mäusen und deren Wildtypgeschwistern	69
Abbildung 3-5: Fibrin-TG-Herzgewebe Ablagerungen nach einer Färbung mit dem Farbstoff mit Lektin (Mauslinie mit höchster Fibrin-Expression)	71
Abbildung 3-6: Fibrin-TG-Herzgewebe zeigt eine geringe Zelloberflächengröße und hohen Fibrosegehalt (Mauslinie mit höchster Fibrin-Expression)	71
Abbildung 3-7: Erhöhte Expression von hypertrophen Marker-Gene in Fibrin-TG-Mäusen.....	73
Abbildung 3-8: Vergleich der Sterblichkeitsrate der Fibrin-TG-Mäuse und WT-Geschwistertiere	74
Abbildung 3-9: 6 Monate alte Fibrin-TG-Mäuse zeigen eine reduzierte Herzfunktion	76
Abbildung 3-10: Analyse morphometrischer Parameter von 6 Monate alten Fibrin-TG-Tiere.....	78
Abbildung 3-11: Erhöhte Expression von hypertrophen Marker-Genen in 6 Monate alten Fibrin-TG-Mäusen.....	79
Abbildung 3-12 Nach TAC-Operation entwickeln WT-, sowie Fibrin-TG-Mäuse eine Dysfunktion des linken Ventrikels	82
Abbildung 3-13: TAC-operierte Fibrin-TG-Mäuse zeigen ein erhöhtes Herz und Lungengewicht	84
Abbildung 3-14: Die Zelloberfläche in TAC-operierten Fibrin-TG-Mäusen ist geringer als in TAC-operierten WT-Tieren.....	85
Abbildung 3-15: TAC-operierte Fibrin-TG Mäusen zeigen die höchste Expression der hypertrophen Marker-Gene	86
Abbildung 3-16: Doppelt-transgene-Nachkommen der Fibrin-TG/CnA-TG-Kreuzung haben eine hohe Sterblichkeitsrate	88
Abbildung 3-17: Fibrin-TG/CnA-TG-Mäuse zeigen eine starke Herzfunktionsstörung.....	90
Abbildung 3-18: Fibrin-TG/CnA-TG-Mäuse zeigen ein erhöhtes Verhältnis von Herz zu Lungen Gewicht	93
Abbildung 3-19: Nachkommen der Kreuzung Fibrin-TG/CnA-TG-Linie zeigen eine geringe Zelloberflächengröße im Vergleich zu den CnA- und WT-Tieren	94
Abbildung 3-20: Erhöhte Expression hypertropher Marker-Gene in Fibrin-TG/CnA-TG-Mäusen	95
Abbildung 3-21: Darstellung von Färbungen muriner Herzschnitte von WT- und Fibrin-TG-Mäusen... ..	97
Abbildung 3-22: Im murinen Herzgewebe ist Fibrin an der Z-Scheibe lokalisiert	98
Abbildung 3-23: Co-Lokalisation von Fibrin und FLAG-Tag Antikörpern im Fibrin-TG-Herzgewebe	99
Abbildung 3-24: Co-Färbungen mit Fibrin und weiteren verschiedenen Antikörpern zeigen Co-Lokalisationen in den festgestellten Aggregaten	101
Abbildung 3-25: Analyse der intrazellulären Lokalisation von Aggregaten in isolierten Mauskardiomyozyten.....	102

Abbildung 3-26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Herzgewebeschnitten adulter Fibrin-TG-Mäuse	103
Abbildung 3-27: <i>Unfolded-Protein-Response</i> in Fibrin-TG-Mäusen	105
Abbildung 3-28: Caspase Aktivität in Fibrin-TG-Mäusen	106
Abbildung 3-29: Die Autophagie-Marker SQTM1 (p62) und LC3-II B sind in Fibrin-TG-Mäusen erhöht	108
Abbildung 4-1: Durch die Fibrin-Überexpression induzierte Aggregate aktivieren die Signalkaskaden der UPR.....	124
Abbildung 8-1: Erhöhte Expression hypertropher Marker-Gene und eine geringere Zelloberflächengröße in Fibrin-TG-Herzgewebe (niedrige Expression von Fibrin)	146
Abbildung 8-2: Erhöhte Expression hypertropher Marker-Gene und eine Geringere Zelloberflächengröße in Fibrin-TG-Herzgewebe (mittlere Expression von Fibrin)	148
Abbildung 8-3: Runterregulation des <i>tbx5</i> -Gens in in Fibrin-TG-Herzgewebe (bei hoher und niedriger Expression von Fibrin).....	148

Abkürzungsverzeichnis

ΔCnA	Konstitutiv aktives Calcineurin
°C	Grad Celsius
Acta1	α-skeletale actin1
ADS	Verdaupuffer mit Kollagenase und Pankreatin
AF	AlexaFluor®-Fluoreszenzfarbstoff
AHA	American Heart Association
ANF	Atrial Natriuretic Factor (atrialer natriuretischer Faktor)
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
AO	Aorta
APS	Ammoniumpersulfat
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1 (Apoptosesignal-regulierende Kinase 1)
ATF6	Activating transcription factor 6 (aktivierender Transkriptionsfaktor 6)
ATG-Gen	Autophagy related gene (autophagiebezogenes Gen)
BiP	Binding immunoglobulin protein
bp	Basenpaare
bpm	Beats per minute (Schläge pro Minute)
BNP	Brain Natriuretic Factor (B-Typ natriuretisches Peptid)
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Komplementäre DNA
CHOP	C/EBP homologous protein
CryAB	αB-Crystallin
d	Diastole
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilated cardiomyopathy (Dilatative Kardiomyopathie)
ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylidicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DRM	Desmin-related-cardiomyopathy (Desmin-bedingte-Kardiomyopathie)
DSCR1	Down syndrome critical region 1
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ECL	Enhanced Chemiluminescence
EF	Ejectionsfraction (Auswurffraktion)
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ER-assozierte Proteindegradation)
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
Fibin	Fin bud initiation factor (Flossenknospeninitiationsfaktor)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FS	Fractional shortening
HCM	Hypertrophic cardiomyopathy (Hypertrophe Kardiomyopathie)
HG	Herzgewicht
HRP	Horseradish Peroxidase
ICM	Ischemic Cardiomyopathy (Ischämische Kardiomyopathie)
IF	Immunofluoreszenz
IRE1α	Inositol-requiring enzyme 1 α
IVC	individually ventilated cages (individuell ventilerter Käfig)
IVS	Interventricular septal dimension (Stärke des interventrikulären Septums)
JNK	c-Jun N-terminale kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LA	Linkes Atrium
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LV	Left ventricle (Linker Ventrikel)
LVID	Left ventricular internal diameter (linksventrikulärer Durchmesser)
LVPW	Left ventricular posterior wall dimension (Stärke der linksventrikulären posterioren Wand)
MAP	Mitogen activated protein
MCIP1	Modulatory calcineurin interacting protein 1
αMHC	Alpha-myosin heavy chain
mm	<i>mus musculus</i>
mRNA	messenger RNA
N	Anzahl
n.s.	Nicht signifikant
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
Nppa	natriuretisches Peptid Typ A
Nppb	natriuretisches Peptid Typ B
NRVCM	Neonatal rat ventricle cardiomyocytes (neonatale)

	Rattenkardiomyozyten)
ORF	Open reading frame
P62	SQSTM1, Sequestosome-1
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phenylephrin
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PPP3	Protein Phosphatase 2B
PSLAX	Parasternal long axis (Parasternale Längsachse)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
Rcan	Regulator von Calcineurin
RCM	(Restriktive Kardiomyopathie)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
s	Sekunde
Syst.	Systole
SAX	Parasternal short axis (parasternale Kurzachse)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SR	Sakroplasmatische Retikulum
TAC	transversale Aortenkonstriktion
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2 (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierter Faktor 2)
TBST	Tris-buffered saline tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Transgen
TNF	tumor necrosis factor (Tumor-Nekrose-Faktor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Units
UPR	Unfolded protein response (ungefaltete Protein-Antwort)
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
Wnt2b	wingless-type MMTV integration site
WT	Wildtyp

x g	Zentrifugalbeschleunigung
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1 Einleitung

1.1 Die kardiale Hypertrophie

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind mit 45 % die häufigsten Todesursachen in Europa. Allein im Jahr 2015 starben in Deutschland 356.616 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (Statistisches Bundesamt, 2015-19). Die Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie Herzklappenerkrankungen, Bluthochdruck, angeborener Herzfehler oder Kardiomyopathien werden beim Menschen häufig von einer linksventrikulären Hypertrophie begleitet. (Maron et al., 2006, Wexler et al., 2009).

Die linksventrikuläre Hypertrophie beschreibt die Zunahme der linksventrikulären Herzmasse (Hill and Olson, 2008). Während der Entwicklung des Fötus vermehren sich die Herzmuskelzellen mit einer hohen Geschwindigkeit, differenzieren sich jedoch schon kurz nach der Geburt irreversibel zu Kardiomyozyten und sind nicht mehr teilungsfähig. Dabei verschiebt sich die Wachstumsform von hyperplastisch zu hypertroph (MacLellan and Schneider, 2000). Im adulten Herz führt eine durch Druck- oder Volumenüberlastung gesteigerte mechanische Arbeit bei den Herzmuskelzellen somit zu hypertrophem Wachstum, um die Wandspannung des linken Ventrikels zu entlasten (Hill and Olson, 2008). Durch diesen Anpassungsmechanismus kann der Herzmuskel seine Funktion kurzfristig gegen die hämodynamische Belastung aufrechterhalten. Jedoch ist dieser Anpassungsmechanismus auf Dauer schädlich (Gardin and Lauer, 2004).

Neben Fettleibigkeit, Herzklappenerkrankungen, sowie anderen chronischen und hereditären Herzerkrankungen ist die arterielle Hypertonie eine der häufigsten Ursachen der Herzhypertrophie. Das Risiko für Patienten mit einer kardialen Hypertrophie an anderen Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie an Arrhythmien oder an einem Myokardinfarkt zu erkranken ist erhöht und sie sind für den plötzlichen Herztod prädisponiert. Daher wird die Herzhypertrophie als Prädiktor für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität angesehen (Kavey, 2013, Semsarian et al., 2015).

Zwar ist der statistische Zusammenhang zwischen kardialer Hypertrophie und den Herz-Kreislauf-Erkrankungen bekannt, die pathophysiologischen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Durch die Erforschung zugrundeliegender Signalwege mit der Identifizierung neuer Modulatoren der kardialen Herzhypertrophie können Grundlagen für

neue Therapiemöglichkeiten gegen Herz-Kreislauf-Krankheiten geschaffen werden, welche von großem gesellschaftlichem Interesse sind (Luedde et al., 2006).

1.1.1 Pathogenese der kardialen Hypertrophie

Ätiologisch wird die kardiale Hypertrophie in die physiologische und die pathologische Herzhypertrophie unterteilt.

Zu der physiologischen Hypertrophie gehört eine entwicklungsbedingte Hypertrophie des Myokards. Sie beschreibt das Wachstum der Zellen von der Geburt bis hin zum Erwachsenenalter. Eine weitere Form der physiologischen Hypertrophie entsteht durch die Adaptation an eine gesteigerte kardiovaskuläre Belastung, welche zum Beispiel während einer Schwangerschaft oder durch eine andauernde Sportbelastung entstehen kann (Heineke and Molkentin, 2006, Hill and Olson, 2008).

Bei der pathologischen Hypertrophie erfährt das Myokard eine gesteigerte mechanische Belastung, was eine zelluläre Umgestaltung („Remodeling“) zur Folge hat. Anfangs reagieren die Kardiomyozyten auch hier mit einer Vergrößerung der Zellmasse, um der gesteigerten mechanischen Belastung durch den Druckanstieg kompensatorisch entgegen zu wirken. Zunächst wird dabei eine konzentrische Hypertrophie beobachtet, bei der das Septum und die Ventrikelwand deutlich an Dicke zunehmen und hierdurch der Innendurchmesser der Herzkammern abnimmt. Nach dem physikalischen Gesetz von Laplace:

$$[K = P \times r / (2 \times d)]$$

Mit: K= Wandspannung, P= transmuraler Druck, r= Gefäßradius, d=Wanddicke

ist die Wandspannung umgekehrt proportional zur Wanddicke eines Hohlorgans. So führt eine Wandverdickung des Herzens zu einer Reduktion der Wandspannung und somit zu deren Entlastung. Darüber hinaus kommt es in diesem Stadium zu einer Reaktivierung der Transkription fetaler Gene wie *Nppa* (atriales natriuretisches Peptid) und *Nppb* (B-Typ natriuretisches Peptid), den Genen für das α -skeletale Aktin (*Acta1*) und für die schwere Kette des β -Myosins (β -myosin heavy chain, β -MHC) (Bernardo et al., 2010, Taegtmeier et al., 2010). Mit der Zeit sorgen die Apoptose von Kardiomyozyten auf Grund verminderter Sauerstoffversorgung, die Proliferation von Fibroblasten als Ersatz für die zu Grunde gegangenen Kardiomyozyten und die dabei einhergehende Kollageneinlagerung im Myokard

für das sogenannte Remodeling. Die Elastizität des Gewebes sinkt, während die Steifigkeit zunimmt (Conrad et al., 1995, Kang and Izumo, 2003). Hält die Belastung weiter an, kann das Herz den Zustand nicht mehr kompensieren und eine exzentrische Hypertrophie, gefolgt von einer Dilatation der Herzkammern, entsteht. In dieser Zeit nimmt die Wandspannung noch weiter ab, was nun die Herzkontraktilität negativ beeinflusst, und den Energieverbrauch steigert (Heineke and Molkentin, 2006). Zusätzlich sorgt die Fibrose für eine diastolische Dysfunktion, da durch die Kollageneinlagerung eine vollständige Kammerrelaxation nicht mehr möglich ist (Conrad et al., 1995). Am Ende der pathologischen Herzhypertrophie nehmen Symptome, wie Dyspnoe und Ödembildung zu und die Wahrscheinlichkeit, dass die Herzhypertrophie in eine mit dem Herztod assoziierte Herzinsuffizienz (dilatative Kardiomyopathie) übergeht, steigt (Mudd and Kass, 2008).

1.1.2 Molekulare Signalwege in der pathologischen Herzhypertrophie

Die kardiale Hypertrophie ist die Reaktion der Kardiomyozyten auf biomechanischen Stress, unabhängig davon, ob dieser durch physiologische oder pathologische Stimuli induziert wird. Die Reaktion der Zellen besteht aus dem hypertrophen Wachstum ihrerseits und wird durch endokrine, parakrine und autokrine Faktoren induziert. Zusätzlich erfolgt die Stimulierung membrangebundener Rezeptoren und der damit verbundenen Aktivierung assoziierter intrazellulärer Signalkaskaden, was schließlich zur Regulation der Genexpression führt (Heineke and Molkentin, 2006).

Die Signalkaskade der Mitogen-aktivierenden Proteinkinase (MAPK) spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Sie führt zur Aktivierung der Proteine p38 (p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen), c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und der *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK), welche weitere intrazelluläre Zielmoleküle phosphorylieren und auf diese Weise eine Neuprogrammierung der kardialen Gen-Expression induzieren (Heineke and Molkentin, 2006).

Zusätzlich zur Stimulation unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, welche zur Expression pro-hypertropher Gene und damit zu Zellstrukturveränderung führen, spielt die Erhöhung der intrazellulären Kalzium (Ca^{2+})-Konzentration für die Entwicklung der kardialen Hypertrophie eine entscheidende Rolle (Frey et al., 2000). Die Ca^{2+} -Konzentration ist in der Zelle ein Regulator der kardialen Kontraktion und des kardialen Wachstums. Ebenso spielt sie eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der kalziumabhängigen Phosphatase

Calcineurin und ist somit insbesondere ein wichtiger Faktor in der pathologischen Herzhypertrophie (Molkentin et al., 1998). Hormone wie Endothelin-1, Angiotensin-II und auch Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin aktivieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G_s -, $G_{q/11}$ - und G_i -Rezeptoren) und wirken über diese auf die Phospholipase C ein. Über eine weitere Signalkaskade führt dies zur Akkumulation von Kalzium in der Zelle und damit zur Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs (Bernardo et al., 2010; Frey & Olson, 2003).

1.1.3 Der Calcineurin-NFAT-Signalweg

Die Serin/Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin, auch als Protein Phosphatase 2B (PP2B) bekannt, ist ein essentieller pro-hypertropher Regulator in der pathologischen Herzhypertrophie (Molkentin et al., 1998). Calcineurin ist ein heterodimeres Protein und besteht aus der katalytischen Untereinheit Calcineurin A (CnA, 57-61 kDa) und der regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (CnB, 19 kDa). In Wirbeltieren existieren drei Isoformen der großen Untereinheit Calcineurin A: CnA α , CnA β und CnA γ ; wovon jedoch nur CnA α und CnA β im Herzen vorkommen (Bueno et al., 2004, van Rooij et al., 2002, Frey and Olson, 2003). Calcineurin A besitzt eine N-terminale katalytische Domäne und eine C-terminale autoinhibierende Domäne, welche die katalytische Domäne blockieren und das Protein somit deaktivieren kann (Taigen et al., 2000, Bueno et al., 2002). In der Molekülmitte befindet sich eine Bindungsstelle für Calmodulin und Calcineurin B. Von der kleineren Untereinheit CnB existieren zwei Isoformen (CnB1 und CnB2). Davon kommt nur CnB1 im Herzen vor und besitzt eine Kalzium-Bindungsstelle (Bueno et al., 2002, Kuznetsov et al., 1992). Kommt es zu einer Konzentrationssteigerung von Kalzium im Zytosol, interagiert das an das Kalzium bereits gebundene Calmodulin mit Calcineurin. Die dadurch entstehende Konformationsänderung des Moleküls bewirkt die Verdrängung der autoinhibierenden Domäne, womit die katalytische Domäne sterisch frei wird und zur Aktivierung von Calcineurin führt. Anschließend kann Calcineurin die Transkriptionsfaktoren der NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*)-Familie dephosphorylieren. Diese translozieren daraufhin in den Nukleus, um dort die Expression prohypertropher Gene wie *Nppa* (kodiert für ANP) und *Nppb* (kodiert für BNP) zu aktivieren (Komuro and Yazaki, 1993, Wilkins et al., 2004, Klee et al., 1998). Neben der Transkription prohypertropher Gene wird zusätzlich auch das Gen des NFAT-abhängigen Calcineurin-Inhibitors RCAN1 (*regulator of calcineurin protein 1*), früher modulatory calcineurin interacting protein 1 (MCIP1) oder *Down syndrome critical*

region gene 1 (DSCR1), transkribiert. Die Proteine der RCAN-Familie inhibieren die Calcineurin-Aktivität direkt durch die Interaktion mit der katalytischen Untereinheit von Calcineurin A (Vega et al., 2003). Zusätzlich scheint es auch eine wichtige Funktion in der Calcineurin-NFAT-Signalübertragung zu besitzen (Sanna et al., 2006). Im Gen RCAN1 sind 7 verschiedene Exons vorhanden, wobei die ersten 4 Exons Startexons für 4 Spleißvarianten oder Isoformen des Gens darstellen. Die anderen sind dabei in jeder Isoform vorhanden (Davies et al., 2007). Die Isoform mit Exon 4 (*Rcan1.4*) weist 15 NFAT-Bindestellen an seiner Promotorregion auf und seine Expression ist NFAT- und Calcineurin-abhängig. Somit dient es als guter Marker der transkriptionellen NFAT-Aktivität. Eine Vermutung ist zudem, dass *Rcan1.4* Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus für den Calcineurin-NFAT-Signalweg ist (Yang et al., 2000).

1.2 Kardiomyopathien durch Protein Aggregate

Bei Patienten, welche an einer hypertrophen oder einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie erkrankt sind, kann das Herzleiden durch fehlgefaltete lösliche Protein-Oligomere in den Herzmuskelzellen hervorgerufen werden (Hofmann et al., 2019). Die Ursache für die Bildung dieser Oligomere kann in der Mutation entsprechender Gene liegen. Bei der Desmin-bedingten Kardiomyopathie (*Desmin-related (cardio-)myopathy*, DRM) sorgen beispielsweise Mutationen im Desmin-Gen, dem α B-Crystallin (CryAB)-Gen oder Myotilin-Gen zur Anhäufung fehlgefalteter Proteine (McLendon and Robbins, 2011). Darüber hinaus sind aberrante Protein-Aggregationen ubiquitinerter Proteine im Herzgewebe von Patienten zu finden, die an einer dilatativen Kardiomyopathie leiden. Dabei stellt sich oft die Frage, ob Protein-Aggregate der Auslöser oder die Folge eines bestimmten Krankheitsprozesses sind (Hofmann et al., 2019). Das Hauptorganell in der Zelle, das für die Faltung, die posttranslationale Modifikation und den Transport von sekretorischen, luminalen und Membran-Proteinen sorgt, ist das Endoplasmatische Retikulum (ER) (Liu et al., 2016a, Sozen et al., 2015b).

1.2.1 Das Endoplasmatische Retikulum und dessen Qualitätskontrolle

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein membranumschlossenes verzweigtes Netzwerk von Tubuli, Vakuolen und Zisternen, welches sich, ausgehend vom Nukleus, durch die gesamte Zelle zieht. Dabei wird zwischen dem glattem und dem rauen ER, an dessen

Membran Ribosomen haften, unterschieden. Das raue ER ist überwiegend an der Proteinsynthese und -Faltung beteiligt, während das glatte ER für die Lipidsynthese und für das Speichern von Kalzium zuständig ist (Schwarz and Blower, 2016). Das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist eine spezielle Form des glatten ERs, welches in Myozyten der glatten und quergestreiften Muskulatur vorkommt. Hier, und vor allem in Kardiomyozyten, spielt es als Kalziumspeicher eine wichtige Rolle und ist an der Regulation von Kontraktion und Relaxation der Muskelzelle beteiligt (Fabiato, 1983, Schwarz and Blower, 2016, Groenendyk et al., 2010b).

Insgesamt ist das ER zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase essenziell. Besonders das Aufrechterhalten der Kalzium-Homöostase im Lumen des ERs ist wichtig. Kalzium spielt als „Second Messenger“ in einer Reihe von zellulären Prozessen wie Metabolismus, Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung eine Rolle und ist ebenfalls für die Homöostase von essenzieller Bedeutung (Berridge et al., 2003). Unter anderem ist Kalzium auch in der Muskelregung und -kontraktion wichtig. Eine Störung in der Kalziumregulation über einen längeren Zeitraum kann zum Zelltod führen (Krebs, 1998).

Um die Homöostase und die korrekte Faltung der Proteine in der Zelle aufrechtzuerhalten, nutzt das ER verschiedene Wege. Wichtige Funktionen sind dabei die posttranslationalen Modifikationen der Proteine, die Ausbildung von Disulfidbrücken, das Anfügen von Kohlenhydratketten und das Falten der Proteine.

Zusätzlich sorgt eine Qualitätskontrolle im ER dafür, dass falsch oder nicht fertig-gefaltete Proteine das ER nicht verlassen können (Schwarz and Blower, 2016). Die Kontrolle beinhaltet das Reduzieren von toxischen Proteinen, indem eine Aggregation verhindert und missgefaltete Proteine degradiert werden (Groenendyk et al., 2010b). Die Vorgänge und Mechanismen der Qualitätskontrolle erhalten dabei Unterstützung von den Chaperonen. Chaperone gehören zu einer Proteinfamilie, welche früher dafür bekannt war, bei einem Hitzeschock vermehrt synthetisiert zu werden. Sie helfen bei der Faltung neugebildeter und fehlgefalteter Proteine (Hartl and Hayer-Hartl, 2002, Hurlley et al., 1989). Zu den häufigsten Chaperonen gehören das BiP (*Binding immunoglobulin protein, HSP70, GRP 78*), welches mit den hydrophoben Aminosäureregionen von Proteinen interagiert (Gething, 1999), das Glukose-regulierte Protein Grp94 (Endoplasmin HSP90B1 (Argon and Simen, 1999) die Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI), die an der Bildung und Umlagerung von Disulfidbrücken beteiligt sind (Noiva, 1999, Wilkinson and Gilbert, 2004) sowie die zwei Chaperone Calnexin

und Calreticulin. Diese beiden lektinartigen Chaperone interagieren mit monoglykosylierten N-verknüpften Oligosacchariden in Glykoproteinen und sind so an der Faltung von Glykoproteinen im ER beteiligt (Chevet et al., 2010). Das Chaperon BiP ist in der Qualitätskontrolle von besonderer Bedeutung. So ist es an der Erkennung von akkumulierten falsch gefalteten Proteinen im ER-Lumen beteiligt und steht zudem in Verbindung mit den Transmembranproteinen ATF6, IRE1 und PERK. Durch eine Interaktion dieser Proteine mit BiP können unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden, welche zu der ungefalteten Protein-Antwort (*unfolded protein response*, UPR) führen und dafür sorgen, dass fehlgefaltete Proteine abgebaut werden können (Malhotra and Kaufman, 2007). Außerdem hilft BiP beim Ca^{2+} -Transport vom ER zu den Mitochondrien und spielt eine wichtige Rolle als Ca^{2+} -Puffer im ER-Lumen (Groenendyk et al., 2010b, Kuznetsov et al., 1992, Liu and Dudley, 2015).

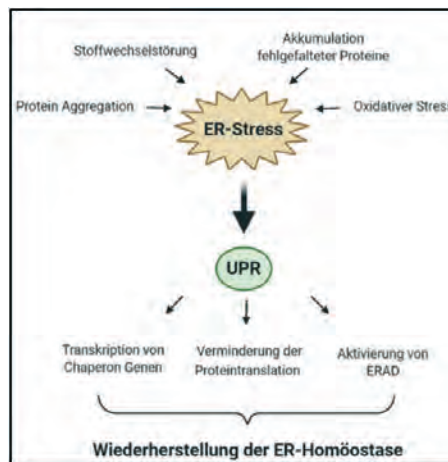


Abbildung 1-1 ER-Stress

Schematische Darstellung des ER-Stress-Signalwegs und die damit induzierte ungefaltete Protein-Antwort (UPR). Fehlgefaltete und unfertige Proteine aktivieren den Stress im Endoplasmatischen Retikulum. Durch verschiedene Signalkaskaden kommt es zu Beginn zur Abschwächung der Proteintranslation, zur Transkriptionsaktivierung von Chaperon- und Faltungsenzymgenen und zur Aktivierung des ERAD-Systems (*endoplasmic reticulum-associated degradation*). Das Ziel dieser Mechanismen ist die Zellschädigung zu begrenzen und die ER-Homöostase wiederherzustellen. Bleibt der ER-Stress jedoch auf Dauer bestehen, führt dies zur Apoptose (Groenendyk et al., 2010b).

1.2.2 Die Aktivierung der *Unfolded-Protein-Response* durch Protein-Aggregate

Kardiomyozyten bilden die Grund- und kontraktile Einheiten des Herzmuskels. Da sie aber kein signifikantes Regenerationspotential aufweisen, ist die Protein-Qualitätskontrolle des ERs für ihr Überleben und für das Aufrechterhalten ihrer Funktion von entscheidender Bedeutung. Eine Störung in der Faltung von Proteinen oder deren Akkumulation kann zu einer Störung in der Zell-Homöostase führen. Proteinakkumulation kann durch eine virale Infektion, oxidativen Stress, Hypoxie, Hitzeschock oder einen Glukose-Mangel ausgelöst werden (Liu and Dudley, 2015, Hurtley et al., 1989). Sie lösen dann einen Prozess aus, der als Stress des ER bezeichnet wird (Abbildung 1-1). Vor allem im Herzen können Hypoxie, Ischämie/Reperfusion, Hypertrophie und Drucküberlastung zur Aktivierung von ER-Stress führen. Um dem ER-Stress entgegen zu wirken und die Homöostase in der Zelle wieder herzustellen, tritt die Protein-Qualitätskontrolle in Kraft (Minamino and Kitakaze, 2010).

Einer der wichtigsten Mechanismen dieser Kontrolle ist dabei die „Ungefaltete Protein-Antwort“ (*unfolded protein response*, UPR). Die UPR wurde während der pathologischen Herzhypertrophie, der dilatativen Kardiomyopathie sowie der ischämischen Kardiomyopathie beschrieben (Sozen et al., 2015a, Doroudgar et al., 2009). Sie ist von der Hefe (*S. cerevisiae*), bis hin zu den Säugetieren und ihren Zellarten hoch konserviert (Cox, Chapman, & Walter, 1997; Manie, Lebeau, & Chevet, 2014). In der Zelle ist die wichtigste Funktion der UPR die Akkumulation beschädigter, fehlgefalteter und mutierter Proteine zu verhindern, und so das Überleben der Zelle zu sichern. Dies geschieht durch drei Mechanismen: 1. Dämpfung der Translation, um weiteres Akkumulieren von Proteinen zu verhindern, 2. Aktivierung der Transkription von Protein-bindenden Chaperonen und 3. Aktivierung der ER-assoziierten Degradation (Schroder and Kaufman, 2005). Durch die Protein-Aggregation wird eine Reihe von Signalkaskaden der UPR ausgelöst (Abbildung 1-2). Am Anfang dieser Signalkaskaden steht meist das Chaperon BiP. Es fungiert hier als Zielprotein und ebenso als Sensor für Protein-Aggregate. Durch BiP werden die drei Transmembran-Proteine PERK (*dsRNA-activated protein kinase-like ER kinase*), IRE1 (*inositol-requiring kinase1*) und ATF6 (*activating transcription factor 6*) aktiviert. Unter normalen Bedingungen sind diese ER-residenten Transmembran-Proteine mit BiP verbunden und damit in einem inaktiven Zustand. Kommt es nun zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen, dissoziiert BiP von den drei Transmembran-Proteinen und bindet an die ungefalteten Proteine. Dadurch gehen die Transmembran-Proteine in ihren aktiven Zustand

über, was zu einer Induktion der UPR-Signalkaskaden führt. Die Folgen sind eine Reduktion der Translationsrate von Proteinen, wobei jedoch gleichzeitig die Synthese von Proteinbindenden ER-Chaperonen gesteigert wird. Auch wird der vermehrte ER-assoziierte Abbau falsch gefalteter Proteine und eine Hochregulierung der Proteine (Metzger et al., 2012), welche am ERAD-System (*endoplasmic reticulum-associated degradation*) beteiligt sind, induziert. ERAD ist der ER-assoziierte Abbauweg, dem fehlgefaltete Proteine zu geführt werden (Schlossarek et al., 2014). Bleibt jedoch der für den ER-Stress verantwortliche Stimulus und somit auch die hohe Aktivität dieser Signalkaskaden bestehen, kommt es früher oder später zur Apoptose, dem programmierten Zelltod der Kardiomyozyten (Groenendyk et al., 2010a)

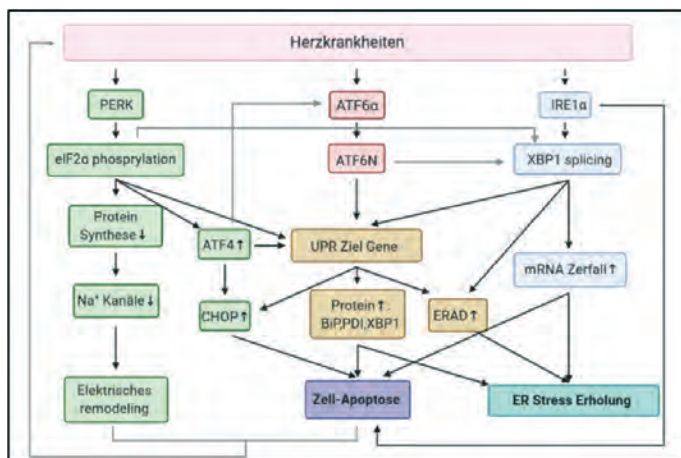


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Signalwege der UPR

Schematische Darstellung der Signalwege der UPR mit ihren Sensorproteinen, dessen nachgeschalteten Effektoren, Zielgenen und möglichen Endpunkten (Liu and Dudley, 2015). Die Signal-Kaskaden, welche mit den Proteinen PERK (grün), IRE1 α (blau) und ATF6 (rot) aktiviert werden, induzieren die Expression von UPR-Zielgenen, die das Gleichgewicht der ER-Homöostase wiederherstellen sollen. Gelingt dies nicht und der ER-Stress bleibt weiterhin bestehen, werden apoptotische Signalwege eingeleitet. (Sano and Reed, 2013, Kadowaki and Nishitoh, 2013).

1.2.2.1 *Inositol-requiring kinase1 (IRE1)*

IRE1 ist der einzige ER-Stress-Sensor, der bei allen Eukaryoten vorkommt und spiegelt den ältesten und am stärksten konservierten Zweig der UPR wider (Abbildung 1-2) (Mori, 2009). In Säugetieren wurden die zwei Homologe α und β identifiziert, wobei das Homolog β nur in Darmepithelzellen vorkommt (Bertolotti et al., 2001). IRE1 α ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität und einer Endoribonuklease (RNase)-Aktivität in seiner C-terminalen zytosolischen-Domäne. Zudem besitzt es eine N-terminale Sensordomäne im ER-Lumen, welche ungefaltete Proteine erkennt. Diese Domäne ist im nicht-gestressten Zustand mit BiP assoziiert und dadurch inaktiv. Bei der Akkumulation ungefalteter Proteine dissoziiert BiP von IRE1 α . Ohne die Verbindung mit BiP erfolgt eine Dimerisierung der luminalen Domänen von IRE1 α . Dies bringt die assoziierte zytosolische Domäne zur Transautophosphorylierung und zu einer damit verbundenen Oligomerisierung, was die Aktivierung der Kinase-Domäne und anschließend der RNase-Domäne des Proteins bewirkt (Yamamoto et al., 2004). Auf diesem Weg aktiviertes IRE1 α initiiert in Säugetieren dann weitere Signalkaskaden des UPR. Vor allem der Mechanismus des unkonventionellen Spleißens des Transkriptionsfaktors-XBP1 steht im Vordergrund (Chen and Brandizzi, 2013). Die XBP1-mRNA wird vorher durch ATF6 induziert (Yoshida et al., 2001). Durch das Spleißen dieser mRNA wird der offene Leserahmen umgestaltet, sodass es zu einer Verbindung der DNA-Bindungsdomäne mit der Aktivierungsdomäne kommt. Das pXBP1, welches aus einer gespleißten XBP1-mRNA translatiert wurde, ist ein effektiver Transkriptionsaktivator, welcher die Expression von UPR-Zielgenen sowie ER-Chaperonen und Komponenten des ERAD-Weges hochreguliert (Yamamoto et al., 2004, Mori, 2003). Ein weiterer Weg führt über posttranskriptionelle Modifikationen mehrerer Substrate mit Hilfe eines IRE1 α -abhängig regulierten Zerfalls (*IRE1 α Dependent Decay, RIDD*). Da die C-terminale Domäne von IRE1 α eine Endoribonuklease ist, kann durch diese direkt mRNA gespalten werden, was als RIDD-Mechanismus bezeichnet wird. Über einen Spleißvorgang an ähnlichen Stellen wie durch XBP1 (*X-box binding protein 1*), werden die mRNA-Fragmente anschließend über Exosome (zelluläre Exoribonukleasen) abgebaut (Maurel et al., 2014, Hollien and Weissman, 2006). Kann der ER-Stress durch diese Signalwege nicht behoben werden und hält weiter in der Zelle an, interagiert das aktivierte IRE1 α über seine zytosolische Domäne auch mit dem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 2 (TRAF2). Der dabei entstehende

Komplex rekrutiert die Apoptosesignal-regulierende Kinase 1 (ASK1) und den Apoptose-auslösenden JNK-Signalweg (c-Jun N-terminale Kinase) (Kadowaki and Nishitoh, 2013).

1.2.2.2 *dsRNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK)*

Wie IRE1 α ist auch PERK ein Typ-I-ER-Transmembranprotein mit einer Serin/Threonin-Kinase-Aktivität und besitzt eine C-terminale zytosolische Domäne. Mit seiner N-terminalen luminalen Domäne erkennt es die Akkumulation fehlgefalteter Proteine. Während des ER-Stresses wird PERK, wie IRE1 α , durch die Dissoziation von BiP von der luminalen Domäne aktiviert (Abbildung 1-2). Es folgt die Oligomerisierung und Autophosphorylierung (Bertolotti et al., 2000b). Im aktiven Zustand induziert es eine Phosphorylierung der α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (*Eukaryotic Initiation Factor 2; eIF2*) an Ser51 und schwächt somit die globale Proteintranslation (Harding et al., 1999). Parallel wird durch die Phosphorylierung von eIF2 α die spezifische Translation von ATF4 (*activating transcription factor*) induziert, was wiederum die Transkription vieler an der UPR beteiligten Gene aktiviert und somit zum Abbau der Protein-Aggregate führt (Harding et al., 2000). Wie im Signalweg des IRE1 α fördert eine verlängerte Aktivierung von PERK unter dauerhaften ER-Stressbedingungen die Apoptose. Dies erfolgt über den PERK-eIF2 α -ATF4-Signalweg. Dieser induziert die Transkription proapoptotischer Faktoren, wie des C/EBP-homologen Proteins (CHOP, auch bekannt als GADD153). CHOP ist ein Transkriptionsfaktor und reguliert unter anderem die proapoptotischen Faktoren GADD34, Todesrezeptor 5 (DR5) und den p53-hochregulierten Modulator der Apoptose (PUMA) (Argon and Simen, 1999, Cazanave et al., 2010). Durch die Induktion von GADD34 wird das zu Beginn durch PERK aktivierte eIF2 α nun dephosphoryliert, was statt der Verminderung der Translation die Apoptose einleitet (Kadowaki and Nishitoh, 2013).

1.2.2.3 *Activating Transcription Factor 6 (ATF6)*

ATF6 ist ein Typ-II-ER-Transmembranprotein, das eine basische Leucin-Zipper-Protein (bZIP)-Domäne im Zytosol und eine ER-Stress empfindliche Domäne im ER-Lumen besitzt. In Säugetieren kommen zwei ATF6-Gene vor, die als ATF6 α und ATF6 β ubiquitär exprimiert werden. Bei der Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen im ER dissoziiert BiP, wie in den Signalkaskaden von PERK und IRE1 α , von ATF6, woraufhin ATF6 von der ER-Membran zum

Golgi-Apparat transloziert (Abbildung 1-2). Hier wird es von der *Site-1-Protease* (S1P) und der *Site-2-Protease* (S2P) in Fragmente zerschnitten. Das N-terminale Fragment, welches die bZIP-Domäne enthält, transloziert als Transkriptionsfaktor zum Nukleus der Zelle und erhöht die Transkriptionen von XBP1-, BiP, CHOP-, PDI- und ERAD-assoziierten Proteinen (Adachi et al., 2008, Hong et al., 2004, Kohno, 2010).

1.2.3 Abbau der Protein-Aggregate durch das ERAD-System

Um falsch gefaltete Proteine abzubauen, wird das ERAD-System (*endoplasmic reticulum-associated degradation*) in der Qualitätskontrolle benötigt. Es fasst eine Reihe von Signalwegen zusammen, die zum einen für das Erkennen des Abbausubstrats und zum anderen für deren Export vom Kern in das Zytosol zuständig sind. Ebenso werden in ihnen die Aggregate zum Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) markiert. Die Translation der an dem ERAD-System beteiligten Gene wird durch die Signalkaskaden der Proteine der UPR, wie ATF4 und ATF6, aktiviert. Das ERAD-System verstärkt insbesondere den Abbau von langsam faltenden Proteinen im ER und verringert damit die Faltungslast des ERs während des Stresses (Schroder and Kaufman, 2005).

Das ERAD-System kann in zwei große Mechanismen unterteilt werden: das ERAD Ubiquitin-Proteasom-abhängige-System (ERAD-TYP I) und das Autophagie-Lysosom-abhängige-System (ERAD-TYP II). Typ-I-ERAD erfasst dabei nur die löslichen fehlgefalteten Proteine während TYP-II-ERAD lösliche und unlösliche (zu Aggregaten zusammengeballte) Formen fehlgefalteter Proteine erkennt (Rashid et al., 2015). Beide Wege haben jedoch auch Überschneidungspunkte (De Meyer and Martinet, 2009).

1.2.4 Apoptose

Kann der Proteinfaltungsdefekt nicht behoben und die Wiederherstellung der ER-Homöostase nicht erreicht werden, werden apoptotische Signalwege unter Beteiligung von UPR-Sensorproteinen aktiviert (Wang et al., 2018). Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, bei der einzelne Zellen innerhalb eines Organismus eliminiert werden, während die Gesamtstruktur des Gewebes erhalten bleibt.

IRE1 α induziert Apoptose durch eine Wechselwirkung mit den Adaptermolekülen TRAF2 und ASK1, was zur Aktivierung von JNK und p38 führt. Im Folgenden aktiviert p38 CHOP durch Phosphorylierung einer Transaktivierungsdomäne (Urano et al., 2000, Wang and Ron, 1996). Kurz nach dem Eintritt des ER-Stresses kodieren die RIDD-mRNAs des IRE1 α -Signalweges

Proteine, welche für das Überleben der Zelle notwendig sind. Diese RIDD-mRNAs sorgen für einen Abbau der missgefalteten Proteine (Maurel et al., 2013).

Ein weiterer Faktor, der zur Einleitung der Apoptose führen kann, ist wie oben beschrieben CHOP, ein Leucin-Zipper-haltiger Transkriptionsfaktor, der durch UPR-Signalwege reguliert wird (McCullough et al., 2001).

Ein wichtiger Weg für die Einleitung der Apoptose führt über das Caspase-Kaskade-Signalsystem (Fribley et al., 2009). Caspasen gehören zu der Familie von Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen. Bisher wurden 14 Caspasen identifiziert. Die Caspasen können in drei Unterklassen unterteilt werden (Fan et al., 2005). Eine dieser Klassen ist dabei an Entzündungsvorgängen beteiligt, während die anderen als die apoptotischen Initiatoren-Caspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und als die apoptotische Effektor (Henker) -Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) beschrieben werden (Anania et al., 2016). Die Primärstruktur von Caspasen besteht aus einer N-terminalen Prodomäne und einer C-terminalen Protease-Domäne, welche einen katalytischen Cystein-Schlüssel besitzt (Boatright and Salvesen, 2003). Die Aktivierung der Caspasen-Signalkaskade und anschließende Apoptoseeinleitung kann dabei über einen zelleigenen intrinsischen oder über einen extrinsischen Weg verlaufen. Der zweite, zellexterne Weg führt über eine Wechselwirkung zwischen einem „Todesrezeptor“, einem Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Proteinfamilie und Caspase-8. Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären und intrazellulären Domäne, welche zur Übertragung von Signalen von der Zelloberfläche in die Zelle von essentieller Bedeutung sind (Elmore, 2007). Die Kaskade des intrazellulären Wegs verläuft über die Mitochondrien und beinhaltet die Atemwegsketten-Komponente Cytochrom c, welche aus dem Zwischenmembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt wird. Über weitere Signalkaskaden wird dann die Caspase-9 durch eine Dimerisierung aktiviert (Boatright et al., 2003). Die Initiator-Caspasen (Caspase-8 und -9) werden aktiviert und können nun die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) ebenfalls über eine limitierte Proteolyse aktivieren. Diese zerlegen nun die Zelle.

Während eines durch die Proteinakkumulation ausgelösten, andauernden ER-Stresses wird die Apoptose im ER vor allem durch die Caspase-12 induziert (Yoneda et al., 2001). Die Aktivierung der Caspase-12 findet über den Regulationsmechanismus von IRE1 α statt. Durch die c-Jun N-terminale inhibitorische Kinase (JIK) ausgelöst, bildet IRE1 α mit dem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 2 (TRAF2) den IRE1 α -TRAF2-Komplex, welcher

auch unter anderem eine Rolle in der Aktivierung der Procaspase-12 (inaktive Form von Caspase-12) spielt (Yoneda et al., 2001). Die Signalkaskade erreicht über die Aktivierung von Caspase-12 und Caspase-9 schließlich Caspase-3, was dann zum Zelltod führt (Szegezdi et al., 2003).

1.2.5 Autophagie

Die Autophagie ist ein intrazellulärer Prozess und sorgt für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase. Durch ihre endolysosomalen Abbauprozesse fehlgefalteter Proteine, defekter Organellen oder eindringender Krankheitserreger, können potenzielle Schäden verhindert und das Überleben der Zelle gesichert werden. Um die optimale Funktion der Zelle aufrecht zu erhalten, ist die Autophagie auch im physiologischen Zustand, wenn auch nur im geringen Maße, aktiv. So kann sich die Zelle zum Beispiel an einen Hungerzustand oder andere zelluläre Belastungen anpassen (Yang and Klionsky, 2010). Die Autophagie ist ein hochkonservierter Prozess, der auch häufig bei Herzerkrankungen wie kardialer Hypertrophie und kardialer Ischämie/Reperfusion vermehrt auftritt (De Meyer and Martinet, 2009). Ebenso wird die Autophagie durch ER-Stress ausgelöst. Dabei wird sie über die drei Signalkaskaden von IRE1 α , PERK und ATF6 der UPR reguliert. So fördert zum Beispiel das gespleißte XBP1 durch die Bindung an den BECN1-Promotor (codiert Protein Beclin-1) im Zellkern eine autophagische Reaktion (Rashid et al., 2015). Ein weiteres durch die UPR induziertes System, nämlich der eIF2 α /ATF4-Weg, ist für die Autophagie von besonderer Bedeutung. Eine Aktivierung von ATF4 geht mit der Hochregulation dutzender Autophagie-Gene einher und die Wechselwirkung von ATF4 und CHOP bewirkt die Hochregulierung der Transkription von SQSTM1 (p62), welches ebenfalls als ein klassischer Regulator der Autophagie angesehen wird (B'Chir et al., 2013, Moscat and Diaz-Meco, 2009).

In Säugetierzellen sind drei Autophagie-Subtypen beschrieben, welche sich nach ihrem Mechanismus des Ladungstransports zum proteolytischen Abbau an gemeinsamen Ziel-Lysosomen unterscheiden:

- die Chaperon-vermittelte Autophagie (direkte Translokation durch die lysosomale Membran),
- die Makroautophagie (Lieferung von zytosolischen Inhaltsstoffen zum Lysosom durch Autophagosomen)

- die Mikroautophagie (Invagination der Lysosomenmembran) (Yang and Klionsky, 2010, Mizushima and Levine, 2010).

Der Mechanismus der Makroautophagie ist der am besten erforschte Weg. Durch Komplexe verschiedener Autophagie bezogener Gene (ATG) wird *de novo* im Zytoplasma die Bildung eines becherförmigen Doppelmembransacks (Phagophor) induziert. Weiterhin vermitteln die ATG die kovalente Konjugation von Phosphatidylethanolamin und dem zytoplasmatischem Mikrotubuli-assoziierten Protein 1A/1B-leichte Kette 3 (*Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LC3*). Das zytosolische LC3 (LC3-I) wird nun über zwei aufeinanderfolgende Ubiquitylierungsreaktionen an Phosphatidylethanolamin konjugiert, wodurch LC3-II entsteht. Die Membran des Phagophors vergrößert sich und ihr offenes Ende schließt sich, um ein Doppelmembranvesikel (Autophagosom) zu bilden. So kann sich LC3-II in der Phagophormembran verankern und Proteine und Organellen können umschlossen werden. Das Autophagosom verbindet sich nun mit einem Lysosom (bei Säugetieren) und in dem somit entstanden Autolysosom wird der Inhalt wie auch LC3-II durch lysosomale Hydrolasen abgebaut (Shibutani and Yoshimori, 2014).

1.3 Erforschung neuer potentieller Ziel-Gene und deren Signalwege in der kardialen Hypertrophie

1.3.1 Identifikation von Fibrin als assoziiertes Protein der kardialen Hypertrophie

Die Erforschung der kardialen Hypertrophie mit den zugrunde liegenden Signalwegen und der Identifizierung neuer Moleküle ist von besonderer Wichtigkeit, da sie Ausgangspunkte der Entwicklung neuer Therapieansätze bilden könnten (Luedde et al., 2006). Um während einer kardialen Hypertrophie differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde in unserer Arbeitsgruppe die kardiale Hypertrophie im Mausmodell untersucht. Dabei unterzogen wir 8 Wochen alte männliche C57BL/6N-Mäuse (N= 7) einer transversalen Aortenverengung (*transverse aortic constriction, TAC*). Als Kontrolle dienten scheinoperierte (Sham) C57BL/6N-Mäuse (N= 8) im gleichen Alter. Zwei Wochen nach dem Eingriff zeigten die Mäuse mit einer operierten Aortenstenose in der echokardiographischen Untersuchung im Gegensatz zu den Kontroll-Tieren eine stark reduzierte Herzfunktion. Messbar durch eine signifikant geringere Verkürzungsfraktion (Fractional shortening (FS)) des linken Ventrikels.

Verglichen mit den scheinoperierten Tieren zeigten die TAC-operierten Mäuse in der Analyse der morphometrischen Parameter einen für die Herzhypertrophie typisch erhöhten Quotienten aus Herz- und Körpergewicht (noch nicht veröffentlichte Daten). Nach einer anschließenden RNA-Isolierung aus dem Gewebe des linken Ventrikels wurden Genexpressionsprofile mittels Microarray (Agilent SurePrint G3 Maus GE 8x60K) erstellt, um differentiell regulierte Gene zu identifizieren. Neben der erwarteten signifikanten Hochregulation hypertropher Marker-Gene wie *Nppa* (ANP) oder *Nppb* (BNP) wurde in den TAC-operierten Tieren mittels der Microarray-Analyse auch eine 4,5-fache Überexpression des *fibin*-Gens beobachtet. In einem weiteren Mausmodell der Herzhypertrophie, einer Calcineurin-transgenen-Mauslinie (CnA-TG), die durch eine kardiale Überexpression des konstitutiv aktiven Calcineurins eine Hypertrophie entwickeln, wurde ebenfalls eine erhöhte *fibin*-Expression festgestellt (noch nicht veröffentlichte Daten).

1.3.2 Fbin, der Flossenknospeninitiationsfaktor im Zebraäbrbling

Im Jahr 2007 wurde während Untersuchungen am Zebraäbrbling (*Danio rerio*, Abbildung 1-3) ein bis dato noch unbekanntes Genprodukt von der Forschergruppe Wakahara *et al.* beschrieben. Dieses Genprodukt wird von einem einzigen Exon kodiert und weist keine bisher bekannten Struktur motive auf. Es wurde bislang nur in Wirbeltieren gefunden und besitzt orthologe Gene in murinem und humanem Gewebe. Weitere Experimente zeigten, dass eine Expressionsunterdrückung dieses Genproduktes während der Ontogenese des Zebraäbrblingembryos ein Nichtausbilden der Brustflosse zur Folge hat (Abbildung 1-3 B, D). Schon in einem frühen Stadium ist hier die Entwicklung der Gliedmaßenknospe gestört. Aufgrund dieser Funktion in der Brustflossenentwicklung, wurde das neu entdeckte Protein Fbin genannt -ein Akronym von „*Fin bud initiation factor*“ (Flossenknospeninitiationsfaktor) (Wakahara *et al.*, 2007).

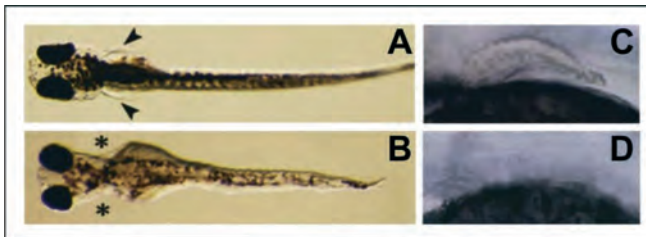


Abbildung 1-3: Morphologische Darstellung der Brustflosse eines Zebrafischbärlings nach einem funktionellem Fibrin Knockdown

A und B zeigen die Morphologie von vier Wochen alten Zebrafischbärlingen, wobei durch funktionelle Inaktivierung des Fibrin-Proteins in B keine Ausbildung der Brustflossen stattfindet. C, D Darstellung der Brustflossenknospe von 48 Stunden alten Zebrafischbärlingembryonen. Schon in einem sehr frühen Stadium der Embryogenese ist eine Störung der Brustflossenentwicklung in D bei einem Fibrin Knockdown feststellbar (Wakahara et al., 2007).

Eine Hypothese von Wakahara *et al.* besagt, dass die Fibrin-Expression über noch unbekanntes Signalwege durch *Raldh2* und *Wnt2b* beeinflusst wird und Fibrin wiederum essenziell für die Transkription des *Tbx5*-Gens ist. Das *Raldh2*-Gen kodiert ein Enzym der Retinsäurebildung. Eine Inaktivierung dieses Gens führt zum Fehlen der Brustflossenknospe und in einem frühen Entwicklungsstadium zum Tod des Embryos (Gibert et al., 2006). *Wnt2b* gehört zur Familie der wnt-Wachstumsfaktoren (*wingless-type* MMTV *integration site*, WNT) und wird im Zebrafischbärling an der mesodermalen Platte im Bereich der zukünftigen Brustflosse exprimiert. Eine Blockade der Retinsäuresynthese verhindert eine *Wnt2b*-Expression und damit ebenfalls die Entwicklung der Brustflosse (Ng et al., 2002). Dies lässt auf einen Einfluss der Retinsäurebildung auf *Wnt2b* schließen (Mercader et al., 2006, Ng et al., 2002). *Wnt2b* beeinflusst durch den wnt- β -Catenin-Signalweg auch den für die Brustflossenentwicklung essenziellen Transkriptionsfaktor *tbx5* (Mercader et al., 2006). Dieser ist ein Mitglied der T-Box-Genfamilie und seine Inaktivierung geht ebenfalls mit dem Fehlen der Brustflosse einher (Gibert et al., 2006). Im menschlichen Genom können Mutationen des *TBX5*-Gens zur Ausbildung des Holt-Oram Syndroms führen. Das Syndrom beinhaltet eine Fehlbildung der vorderen Gliedmaßen und des Herzens (Ahn et al., 2002). Im Zebrafischbärlingmodell konnte bei Inhibition der *fibrin*-Expression auch eine fehlende Expression des *tbx5*-Gens beobachtet

werden und bei der Inhibierung von *Rad1dh2* wurde wiederum eine fehlende Expression von *fibin* festgestellt (Wakahara et al., 2007).

Fibin wird nicht nur im Zebrafisch gefunden, sondern ist allgemein ein strukturell und evolutionär konserviertes Wirbeltierprotein. So wurden orthologe Gensequenzen in verschiedenen Vertebraten, darunter Säugetieren, Knochen- und Knorpelfischen, Reptilien, Amphibien und Vögeln (insgesamt 40 Arten) gefunden. Interessant ist, dass die *fibin*-mRNA nicht nur in Vordergliedmaßen, sondern auch in anderen Geweben embryonal sowie im adulten Alter exprimiert wird. Dabei ist in adulten Geweben die höchste Expression von Fibin im Kleinhirn und im Skelettmuskel zu finden (Lakner et al., 2011). Durchgeführte Microarray-basierte Genexpressionsstudien ergaben einen Anstieg der *fibin*-Expression bei pathophysiologischen Vorgängen. So wurde innerhalb des rechten Herzventrikels während einer chronischen Lungenembolie ein Anstieg der Expression gefunden, was auf eine Rolle in myokardpathogenen Prozessen hindeutet (Zagorski et al., 2009).

Zusammengefasst kann man sagen, dass diese Befunde vermuten lassen, dass Fibin nicht nur in der Ontogenese des Zebrafischs für die Flossenknospeninitiation essenziell ist, sondern auch in anderen Wirbeltierorganismen wichtige Funktionen hat und insbesondere bei pathologischen Veränderungen auch am Herzen eine Rolle spielen könnte.

1.3.2.1 Das Protein Fibin

Vergleicht man die *fibin*-Gensequenzen verschiedener Spezies untereinander wird deutlich, dass Fibin eine einfache genomische Struktur ohne Introns aufweist und das Gen bei Mensch und Maus nur durch ein einziges Exon codiert wird. Die N-Glykosylierungsstelle des Fibin-Proteins besitzt noch zwei konservierte Cystein-Reste, welche eventuell zur Ausbildung von inter- oder intramolekularer Disulfidbrücken wichtig sind. Ob Fibin ein sekretorisches Protein ist, wurde von *Lackner et al.* mittels eines Überexpressionssystems (rekombinantes Fibin) in COS-7-Zellen (Fibroblasten-Zelllinie) und *E. coli* untersucht. In COS-7-Zellen zeigte das rekombinante Fibin eine hohe Co-Lokalisation mit Markern des ERs. Zudem lag Fibin in den Zellen als ein durch Disulfidbrücken verbundenes Homodimer vor. In *E. coli* war das synthetisierte Fibin in Einschlusskörperchen eingeschlossen. Außerdem wurde eine Neigung zur Aggregation nachgewiesen (Lakner et al., 2011).

Eine Theorie zur Sekretion von Fibin ist die essenzielle Bildung eines Heterodimers des Proteins, wofür noch unbekannte Proteine notwendig sind. Hierfür würden jedoch die hohe Aggregationstendenz und die hohe Anreicherung des rekombinanten Fibin im ER sprechen (Lakner et al., 2011).

1.3.3 Fibin, ein potenzieller Protektor gegen die kardiale Hypertrophie

Auf Grund der Tatsache, dass beim Herzmuskel unter pathologischen Bedingungen Fibin eine Rolle spielen könnte, wurde die Funktion des *fibin*-Gens genauer untersucht. Dazu wurde in unseren *in vitro* Vorarbeiten die murine *fibin*-Gensequenz in einen pAd/CMV/V5-Vektor kloniert, die zur Herstellung von adenoviralen Vektoren verwendet wurde. Anschließend wurden die adenoviralen Vektoren in isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten neonataler Ratten (*neonatal rat ventricular cardiomyocytes* (NRVCMs)) zur Überexpression von Fibin genutzt. Durch eine Stimulation der Zellen mit Phenylephrin (PE), einem Sympathomimetikum, wurde eine zelluläre Hypertrophie induziert. PE wirkt über den α 1-adrenergen Rezeptor positiv inotrop am Herzen und führt bei langfristiger Stimulation zu einem hypertrophen Phänotyp (Meidell et al., 1986). Während es in der Kontrollgruppe durch die PE-Behandlung zu einer Zunahme der Zellgröße kam, konnte dies in den Zellen mit einer induzierten adenoviralen *fibin*-Überexpression inhibiert bzw. nicht festgestellt werden. Bei diesen Experimenten wurde gleichzeitig auch die Runterregulierung der hypertrophen Marker-Gene in den *fibin*-überexprimierenden Zellen beobachtet, während die Zellen der Kontrollgruppe eine Hochregulation der Gene *Nppa* und *Nppb* durch PE zeigten (nicht veröffentlichte Daten). Weitere Versuche mit einem *fibin*-Knockdown in NRVCMs mit Hilfe synthetischer siRNAs zeigten eine geringe, aber dennoch signifikante Vergrößerung der Zelloberfläche (nicht veröffentlichte Daten), auch blieb ein signifikanter Effekt nach PE-Stimulation aus.

Im Gegensatz zu den hypertrophen-Marker-Genen *Nppa* und *Nppb* blieb die Expression des Marker-Gens des Calcineurin-NFAT-Signalwegs *Rcan1.4* sowohl von einer Überexpression von *fibin* als auch von dessen Knockdown in der Untersuchung der mRNA unbeeinflusst. Eine weitere Untersuchung von Fibin und seine potentielle Rolle im Calcineurin-NFAT-Weg sollte mit Hilfe eines NFAT-Luciferase-Reporter-Assays festgestellt werden. Hier konnte durch eine *fibin*-Überexpression eine Reduktion der NFAT-Reporteraktivität im Wildtyp sowie von konstitutiv aktivem Calcineurin beobachtet werden, was für eine Beteiligung von Fibin im Calcineurin-NFAT-Signalwegs spricht.

Neben der Funktion von Fibin wurde auch die Lokalisation des Proteins in den Kardiomyozyten untersucht. Der Hauptbestandteil der quergestreiften Muskulatur, und damit auch des Herzmuskels, ist das Sarkomer, welches auch die kleinste funktionelle kontraktile Einheit bildet (Abbildung 1-4 A). Ein Teil des Sarkomers besteht aus dicken und dünnen Filamenten, die als Myosin bzw. Aktin bezeichnet werden. Die dicken Filamente setzen sich aus schweren und leichten Myosin-Ketten, die durch das Myosin-Bindungsprotein C gebündelt werden, zusammen. Über das Verankerungsprotein Titin sind diese mit der Z-Scheibe, welche das Sarkomer in Längsrichtung begrenzt, verbunden. Die dünnen Filamente, auch Aktin-Filamente genannt, bestehen aus α -Aktin, α -Tropomyosin, Troponin und Nebulin. Sie sind mit der Z-Scheibe durch Aktinin verbunden und verzahnen sich mit den zwischen ihnen liegenden, dicken Filamenten (Luther, 2009). Die Z-Scheiben sind nicht nur bloße strukturelle Bestandteile der Sarkomere, sondern auch Knotenpunkte für viele biochemische Signalkaskaden. Verschiedene Mutationen von Z-Scheiben-Proteinen sind als Ursache für Kardiomyopathien und/ oder Muskeldystrophien beschrieben (Frank et al., 2006).

Durch immunzytochemische-Färbemethoden konnte das Fibin-Protein *in vitro* zwischenzeitlich in den NRVCs lokalisiert werden. Um die gesuchten Proteine in den Zellen zu erkennen, wurden deren spezifische Antigene mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper gekoppelt und somit unter dem Mikroskop sichtbar gemacht. Neben dem Antikörper gegen Fibin wurden auch Antikörper gegen das Protein α -Aktinin und Myosin verwendet. Das Protein α -Aktinin ist ein bekanntes Z-Scheiben Protein, während Myomesin in der M-Bande (Mittel-Scheibe) des Sarkomers zu finden ist. Eine Co-Färbung mit den jeweiligen Antikörpern und dem Fibin-Antikörper zeigte eine deutliche Co-Lokalisation von Fibin-Antikörper mit dem α -Aktinin-Antikörper und damit die Position der Fibin-Lokalisation an der Z-Scheibe (Abbildung 1-4 B).

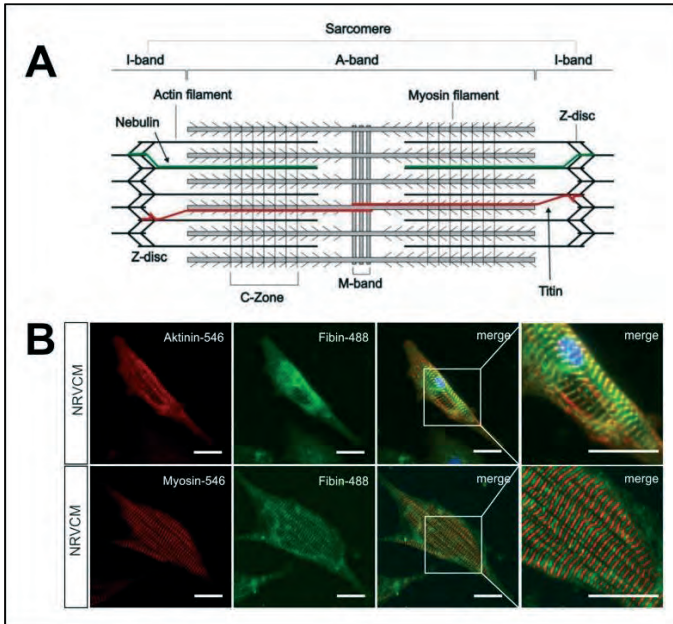


Abbildung 1-4: Bestätigung der Lokalisation von Fibin an der Z-Scheibe von Kardiomyozyten

A, Schematische Darstellung des Sarkomers. (Luther, 2009). B, Co-Immunofärbung in neonatale Rattenkardiomyozyten. In diesen Färbungen zeigt Fibin (grün) eine Co-Lokalisation mit dem α -Aktinin (rot) an der Z-Scheibe (erste Reihe) jedoch nicht mit dem Antikörper gegen das Myomesin-Protein (zweite Reihe, rot). Die Lokalisation des Fibin-Proteins kann somit an der Z-Scheibe (Co-Lokalisation mit dem α -Aktinin) in Kardiomyozyten Zellen bestätigt werden. (Maßstabsbalken= 10 μ m).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es die (patho-)physiologische Bedeutung von Fibin im Rahmen von kardialen Prozessen genauer zu untersuchen, denn durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte das Fibin-Protein, welches als wichtiger Faktor in der Vorderflößenentwicklung im Zebraäbbling beschrieben ist, als protektiver Faktor und potentielles Therapeutikum gegen kardiale Hypertrophie in Betracht gezogen werden.

Als erster Schritt wurde zunächst eine transgene Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression von Fibin generiert und dann unter basalen Bedingungen bei unterschiedlichen Altersstufen auf funktionelle, morphologische und molekularbiologische Veränderungen analysiert. Die erste Untersuchung erfolgte dabei mittels Echokardiographie, um die Funktion des Herzens zu überprüfen. Danach wurden die Tiere per zervikaler Dislokation getötet und die Organe von Interesse (Herz, Lunge, Leber) aus den Mäusen entnommen. Nach anschließender Vermessung der Organe wurde das Gewebe des linken Ventrikels mittels molekularbiologischer und biochemischer Methoden untersucht.

Nach der Basischarakterisierung der Fibin-TG-Linie wurden die Mäuse anschließend in 2 unterschiedlichen Mausmodellen der kardialen Hypertrophie auf den Einfluss einer Fibin-Überexpression untersucht. Hierzu wurden die Tiere einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) unterzogen, die eine kardiale Hypertrophie induziert. Die Entwicklung einer bereits vorliegenden kardialen Hypertrophie wurde zwei Wochen nach der Operation zuerst echokardiographisch und anschließend auch morphometrisch nach Organentnahme untersucht.

Das zweite Tiermodell zur Untersuchung der potentiell kardioprotektiven Wirkung von Fibin stellte die Analyse von Nachkommen aus der Kreuzung von Fibin-TG-Tieren mit der CnA-TG-Mauslinie dar. CnA-TG-Mäuse überexprimieren kardial konstitutiv aktives Calcineurin, wodurch die Mäuse im Laufe ihres Lebens eine stark ausgeprägte kardiale Hypertrophie entwickeln. Die Hypothese war, dass durch die Fibin Überexpression im Herzen eine Verbesserung der vorliegenden kardialen Hypertrophie in den Tieren vorliegt. Auch hier wurde zuerst echokardiographische und anschließend auch morphometrisch nach erfolgter Organentnahme Untersuchung durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Arznei- und Narkose Mittel

Baxter Isofluran	Baxter
Temgesic, Buprenorphin (0,05 -0,1 s.c. Maus)	Indivior UK Limited
Tramal, Tamadol (1 mg/ml im Trinkwasser, Maus)	Grünental

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

AmershamHybond-PVDF Membran	GE Healthcare
Amersham Nitrocellulose Membran	GE Healthcare
Axiovert 40 C Mikroskop	Carl Zeiss
BZ-9000 Mikroskop	Keyence
Centrifuge 5810	Eppendorf
CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
Chromatographiepapier	Whatman
Deckgläser 18 mm Durchmesser	VWR International
Duomax 1030, Wippschüttler	Heidolph Instruments
ECX-F26.M UV-Transluminator	Peqlab Biotechnologie
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie
Enthaarungscreme	Insana, Rossmann
Extra Fine Graefe Forceps	Fine science tools
Faltenfilter 110 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
FlourChem Q Kamera	Alpha Innotech
Fluovac Anesthetic Scavenging System	Havard Apparatus
Fluosorber Canister	Havard Apparatus
Galaxy ministar Mikrozentrifuge	VWR International
Hardened Fine Iris Scissors	Fine science tools
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Pico 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Horizon 11-14 Gel-Elektrophorese	Life Technologies
Infinite® M200Pro Mikroplattenleser	Tecan
Isotonische Kochsalzlösung 10ml	Isotonische Kochsalzlösung 10ml

Kaltlichtquelle CL 6000 LED	Zeiss
Kanüle 30 G 1/2 0,29x13 mm	BD Microlance
Kanüle 27 G 3/4 0,4x19 mm	BD Microlance
LSM800	Carl Zeiss Microscopy
MaxQ 8000 Schüttler	Thermo Fisher Scientific
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories
Mouse Ventilator MiniVent Type 845	Havard Apparatus
MyCycler Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Neubauer-Zählkammer	Assistent
Parafilm	Bemis
Pasteurpipetten, Glas	Carl Roth
PCR Platte 96-Well, farblos	Biozym Scientific
PCR Folien, adhäsiv, farblos	Biozym Scientific
Petrischale 35*10 mm	Sarstedt
Pipette Eppendorf- Reference	Eppendorf Research
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories
PP-Mikroplatte 96-Well	Greiner Bio-One
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab Biotechnologie
Prolene monofil blau 6-0, mit Nadel C-1, 75 cm Faden (3 Dtz.) nicht resorbierbar	Ethicon
QIAvac 24 Plus	Qiagen
RCT Basic Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5/1,5/2,0 mL	Sarstedt
Röhrchen, luftdurchlässig, 14 mL	Sarstedt
Röhrchen, 15/50 mL	Sarstedt
Serologische Pipetten, 2/5/10/25 mL	Sarstedt
Seven Easy pH-Messgerät	Mettler Toledo
Steri-Cult 200 Inkubator	Labotec
Sterifilter 0,2 µm Porengröße	Nalgene Labware

SteriGARD Hood	The Baker Company
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Arbeitsstation	Scanlaf
Tuberkulinspritzen 1 ml	BD Plastipak
Vacusaft Absaugsystem	Integra Bioscience
Variomag Poly Magnetrührer	Thermo Fisher Scientific
Vevo 1100	VisualSonics
Vicryl rapide ungefärbt geflochten 4-0, mit	Ethicon
Nadel FS-2, 45 cm Faden (3 Dtz.) resorbierbar	
Visiled MC 1000	Zeiss
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

2.1.3 Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Agar	Carl Roth
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck
Carbenicillin	Carl Roth
DAPI	Roche
DEPC	Carl Roth
DMEM	PAA-Laboratories
DMSO	Sigma Aldrich
dNTP	Thermo Fisher Scientific
DNA Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Fisher Scientific
DTT	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	ThermoFischer
Kanamycin	Sigma-Aldrich

Glycerin	Carl Roth
iQ Multiplex 2000	Bio-Rad Laboratories
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
LB-Agar X969	Carl Roth
LB-Medium X968	Carl Roth
Magnesiumheptasulfat	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
NP-40	Sigma Aldrich
Natriummonohydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
PageRuler™ Plus Protein Ladder	Thermo Scientific
Pankreatin	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Percoll	GE Healthcare
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
QIAzol Lysis Reagenz	Qiagen
SDS	Serva Electrophoresis
Spectinomycin	Carl Roth
Spectra Multicolor High Range Protein L.	Thermo Fisher Scientific
SyBR GreenEr qPCR SuperMix	Thermo Fisher Scientific
TEMED	Carl Roth
Tissue-Tek	Sakura Finetek Germany GmbH
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Tween 20	Sigma Aldrich

2.1.4 Enzyme

Collagenase Typ 2	Worthington/Cellsystems
Complete-Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma Aldrich
Dream Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
LR-Clonase™ II	Invitrogen
NheI	Thermo Scientific
Pacl	Biolabs
Pfu DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

2.1.5 Kits

DC Protein Assay	Bio-Rad
ECL-Detektionssystem	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
ProteoStat Aggreosome Detection Kit	Enzo
Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QuickExtract DNA Extraction Solution	Biozym
Superscript® III First Strand Kit	Invitrogen
SYBR® GreenEr qPCR SuperMix	Invitrogen

2.1.6 Oligonukleotide und Primer

Alle Oligonukleotid und Primersynthesen sowie Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Eurofins MWG Operon.

Tabelle 2-1: Primer-Sequenzen für die Generierung der transgenen Mauslinie

Primername	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
MmFibinORFos_F	GAGAGCTAGCGCCGCATGGTGTCCCGAAGTTG ATC	FibinORFPRimer
MmFibinORFos_R	GAGAGCTAGCGCCTGTCTTCTGTGCCCC	
Fibin_col_F	ATGCCTACTCCAACCTGAC	FibinORFPRimer
hGH1pA/TG_R	CAACTTCCAGGGCCAGGAGAG	
hGHpolyA 3'	ACAGGCATCTACTGAGTGGACCCAAC	aMHC Promotor transgen Sequenzierprimer
hGHpolyA 5'	GTCTATTCGGGAACCAAGCTGGAGTG	

Tabelle 2-2: Primer für Genotypisierung (Fibin-TG-Mäuse, Wildtypmäuse und CnA-TG-Mäuse)

Primername	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
Fibin	GGAGACTGGACATCTCTG	Primer für Fibin transgene Mäuse
HGH1pA/TG_R	CAACTTCCAGGGCCAGGAGAG	
PPP3CAMr_201_F	GCCTGTATGATGCCTTCGACTG	Primer für CnA transgene Mäuse
hGHpolyA 3'	ACAGGCATCTACTGAGTGGACCCAAC	
18S_122_F	CTCAACACGGGAAACCTCAC	Primer für interne Kontrolle bei transgenen Mäusen
18S_122_R	AACCAGACAAATCGCTCCAC	

Tabelle 2-3: Primer für spezifische quantitative Real-Time PCR

Primername	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
Fibin_RT_f	GGAGACTGGACATCTCTG	qPCR- Primer für Fibin
Fibin_RT_r	AAAAGCGACTATCTGGAGGG	
qPCR-mmu+rno-RPL32_F	GGTGGCTGCCATCTGTTTTACG	qPCR- Primer für Rpl32
PCR-mmu+rno-RPL32_R	CCGCACCCTGTTGTCAATGC	
qPCR-hsa-RPL32_F	TCTCCTTCTCGGCATCATGG	qPCR- Primer für RPL32
qPCR-hsa-RPL32_R	GGCATCAAGATCTGGCCCTT	
qPCR-hsa-NPPA_F	AGTGGATTGCTCCTTGACGA	qPCR- Primer für NPPA
qPCR-hsa-NPPA_R	CCAAATGGTCCAGCAAATCTTG	
qPCR-hsa-NPPB_F	CACAGGTGTGGAAGTCCC	qPCR- Primer für NPPB
qPCR-hsa-NPPB_R	AGCCCTTGTGGAATCAGAA	
qPCR-mmu+rno-ACTA1_F	CCAGAGTCAGAGCAGCAGAACTAG	qPCR- Primer für Acta1
qPCR-mmu+rno-ACTA1_R	GACCATGACACCCTGGTGACG	
qPCR-mmu+rno-MYH7_F	TCCTCGATGCGTGCCTGAAG	qPCR- Primer für Myh7
qPCR-mmu+rno-MYH7_R	TCCTCGATGCGTGCCTGAAG	
qPCR-mmu+rno-MYH6_F	GCTACACTTCTCTACCTATGC	qPCR- Primer für Myh6
qPCR-mmu+rno-MYH6_R	CTTGTTGAGATTTCCCGTG	

Tabelle 2-4: Primer für spezifische quantitative Multiplex Real-Time PCR

Primername	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
mmu+rno-Rpl32_F	CTGCTGATGTGCAACAAATCT	Multiplex Primer und Sonde für Rpl32
mmu+rno-Rpl32_R	GCTGTGCTGCTCTTCTACAAT	
mmu+rno-Rpl32_PRB	RED-ACTGTGCTGAGATTGCTCACAATGTGT-BHQ2	
mmu+rno-Nppa_F	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG	Multiplex Primer und Sonde für Nppa
mmu+rno-Nppa_R	ACCTCATCTTCTACCGGCAT	
mmu+rno-Nppa_PRB	AM-TGATGGATTCAAGAACCTGCTAGACCA-BHQ1	
mmu-Nppb_F	ACAAGATAGACCGGATCGGA	Multiplex Primer und Sonde für Nppb
mmu-Nppb_R	AGCCAGGAGGTCTTCTACA	
mmu-Nppb_PRB	HEX-TCAGTGC GTTACAGCCCAAACGA-BHQ1	
rno-Nppb_F	AGCCAGGAGGTCTTCTAAA	Multiplex Primer und Sonde für Nppb
rno-Nppb_R	AGCCAGGAGGTCTTCTAAA	
rno-Nppb_PRB	HEX-TCAGCCGTCACAGCCCAAGCGA-BHQ1	
mmu+rno-Rcan1_F	TAGCTCCCTGATTGCTTGTG	Multiplex Primer und Sonde für Rcan1.4
mmu+rno-Rcan1_R	GGATTCAAATTTGGCCCTGG	
rno-Rcan1_PRB	CY5.5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-ECL	
mmu-Rcan1_PRB	CY5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-BHQ2	

2.1.7 Vektoren und Plasmide

Plasmid: pBS_SKII-aMHC-MmFibin-Flag-hgH1

2.1.8 Antikörper

Erstantikörper:

Tabelle 2-5: Erstantikörper für Western Blot (WB) oder Immunfluoreszenz (IF)

Antikörper	Spezies	Klonalität	Gebrauch	Hersteller
α -Aktinin	Maus	Mono	IF	Sigma
α -Aktinin	Kaninchen	Poly	IF	Abcam
α -Tubulin	Maus	Mono	WB	Sigma
BIP	Kaninchen	Maus	WB	Cell Signaling Technologie
Calnexin	Kaninchen	Poly	IF/WB	Abcam
Caspase-3	Kaninchen	Poly	WB	Cell Signaling Technologie
Caspase-7	Kaninchen	Poly	WB	Cell Signaling Technologie
Desmin	Kaninchen	Poly	IF	Abcam
α B-Crystallin	Maus	Maus	IF	Abcam
Fibin	Maus	Poly	IF/WB	Abcam
Fibin	Kaninchen	Poly	IF/WB	Sigma
FLAG	Maus	Mono	IF/WB	Sigma
GAPDH	Maus	Mono	WB	Sigma
LC3B	Kaninchen	Poly	WB	Cell Signaling Technologie
PARP	Kaninchen	Poly	WB	Cell Signaling Technologie
PERK	Kaninchen	Poly	WB	Cell Signaling Technologie
PDI	Kaninchen	Poly	WB	Cell Signaling Technologie
SQSTM1 (=p62)	Kaninchen	Poly	WB	Sigma

Zweitantikörper:

Tabelle 2-6: Zweitantikörper für Western Blot (WB) oder Immunfluoreszenz (IF)

Antikörper	Spezies	TAG	Gebrauch	Hersteller
Maus	Ziege	HRP	WB	SantaCruz
Kaninchen	Ziege	HRP	WB	SantaCruz
Maus	Esel	AF546	IF	Thermo Fisher Scientific
Kaninchen	Esel	AF546	IF	Thermo Fisher Scientific

2.1.9 Puffer und Lösungen

ADS-Puffer (10x)

1,16 M	NaCl
197 mM	HEPES
94 mM	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
55,5 mM	Glukose
53,6 mM	KCl
8,3 mM	MgSO ₄
	in H ₂ O, pH 7,4, sterilfiltriert

Isolationstyrode (1 x Perfusionspuffer)

0,51 g	2,3 Butane-dione-Monoxim
50 ml	10 x Perfusionspuffer
0,4955 g	Glucose

In 500 ml H₂O angesetzt und sterilfiltriert

Kernlysepuffer für Proteinextraktion

20 mM	Tris (pH 8)
12,5% (v/v)	Glycerol
10 mM	DTT
1% (v/v)	NP-40
500 mM	NaCl

Vor dem Gebrauch wurden folgende Enzyme hinzugegeben:

1 ml Puffer

40 µl	25x Protease-Inhibitor-Cocktail
10 µl	Phosphatase-Inhibitor 2
10 µl	Phosphatase-Inhibitor 3
1 µl	1 M DTT

Perfusion Puffer (Stammlösung)

65,992 g (113mM)	NaCl
------------------	------

3,506 g	KCL
10,8 g	Natriumhydrogencarbonat
10,10 g	Natriumhydrogencarbonat
1,0679 g	Na ₂ HPO ₄ (x 2H ₂ O)
2,95 g	MgSO ₂ HPO ₄ (x 7H ₂ O)
23,831 (10mM)	HEPES
37,530 g	Taurine
816,6 mg	KH ₂ PO ₄
120,4 mg	Phenol Rot

In 1000 ml x H₂O angesetzt und sterilfiltriert.

Laufpuffer, SDS-Gel (10x)

250 mM	Tris
1,9 M	Glycerin
1% (w/v)	SDS

PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na ₂ HPO ₄

Laemmli-Puffer (4x)

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

Sammelgelpuffer, SDS-Gel

0,5 M	Tris-Cl (pH 7,5)
-------	------------------

TAE-Puffer (50x)

3 M	Tris-Acetat
0,05 M	EDTA (pH 8,3)

TBS-Lösung

100 mM	Tris-Cl (pH 7,5)
0,9% (w/v)	NaCl

TBST-Lösung

0,1%	Tween 20 in TBS
------	--------------------

Transferpuffer, Western Blot

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

Trenngelbutter, SDS-Gel

1,5 M	Tris (pH 8,8)
-------	---------------

Verdauulösung, AMVCM Isolation

0,5 mg/ml	Collagenase Typ 2
0,6 mg/ml	Pankreatin

In 1x ADS-Puffer angesetzt und sterilfiltriert.

2.1.10 Medien

2 YT Medium

0,5%(w/)	NaCl
1,6% (w/v)	Trypton
1,0% (w/v)	Hefeextrakt
pH 7,0	

LB-Medium (Luria-Bertani)

1,0% w/v NaCl
 1,0% (w/v) Trypton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 pH 7,0

LB-Agar

1,0% (w/v) NaCl
 1,0% (w/v) Trypton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 1,5% (w/v) Agar
 pH 7,0

Stopplösung 2

23,75 ml 1 x Isolationstyrode
 1,25 ml Bovines Kälber Serum

2.1.11 Bakterien

Tabelle 2-7: E. coli Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller	Genotyp
DH10B, elektrokompetent	Thermo Fisher Scientific	F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-

2.1.12 Versuchstiere

Die Zucht der genetisch veränderten Mauslinien (genetisch veränderter Organismus, GVO) basieren auf dem C57BL/6N-Hintergrund. Die Fibrin-TG-Mauslinie ist eine heterogene Mauslinie. Ein transgenes Tier wurde mit einem Wildtypier verpaart. Die Mäuse wurden in der „Zentralen Tierhaltung“ des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel gehalten. Elterntiere hierfür waren adulte männliche und weibliche Mäuse (Charles-River). Die Wahl der Spezies war im Wesentlichen darin begründet, dass die transgenen Mauslinien wissenschaftlich interessante Verpaarungsmöglichkeiten eröffnen und somit auch die Vergleichbarkeit der Daten gegeben ist.

Tabelle 2-8: Versuchstier-Linien

Mauslinie (Mus musculus)	Abkürzung
C57BL/6NcrL-TG (α -MHC-Mm-Fibrin-Flag)	Fibrin-TG
C57BL/6-TG (α -MHC-Ppp3ca) ^{37E} no/0	CnA-TG
C57BL/6	Wildtyp

Die Calcineurin transgenen Mäuse (C57BL/6-Tg(α -MHC-Ppp3ca)^{37E}no/0) sind im Labor etabliert und besitzen einen belasteten Phänotyp. Die Fibrin-TG-Linie wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden in unserem Auftrag generiert und nach Kiel transferiert. Zu Beginn des Projektes wurde trotz initialer Annahme keine Belastung im Phänotyp beobachtet, wobei die Basischarakterisierung noch nicht vollends abgeschlossen war.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Transformation und Vermehrung von gewünschten Plasmiden werden elektrokompetente *E. coli* DH10B benötigt. Zu Beginn wurde 50 ml LB-Medium mit *E. coli* DH10B angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im MaxQ8000 vorinkubiert. Die so entstandene Vorkultur wurde anschließend in 1 l auf RT vorgewärmtes 2YT-Medium überführt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,4-0,8 weiterhin bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterienkulturen sofort für 10 min auf Eis heruntergekühlt und anschließend bei 4°C und 11.000 x g für 15 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Pellet zweimal mit eiskaltem, autoklaviertem ddH₂O gewaschen und dabei das Pellet sorgfältig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 % Glycerin in ddH₂O, wurde das gereinigte Bakterienpellet in 1,5 ml 10 % Glycerin aufgenommen und zu jeweils 50 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Mit Hilfe eines Stromimpulses können Plasmide von elektrokompetenten Bakterien aufgenommen und dann in ihnen vermehrt werden. Dazu wurden entsprechende *E. coli* DH10B Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend mit 5 ng Plasmid DNA versehen. Nach einer sorgfältigen Durchmischung der Suspension durch auf- und abpipettieren, wurde diese in eine bereits bei -20 °C vorgekühlte Elektroporationsküvette gefüllt und danach in eine entsprechende Vorrichtung, dem Elektroporator, gestellt und einem unter vorgegebenen Bedingungen (2,0 kV, 200 Ω, 25 µF) einem Stromimpuls ausgesetzt. Die somit transformierten Bakterien wurden nun in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 37°C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Diese Suspension wurde danach auf mit spezifischen Antibiotika versetzten LB-Agarplatten ausplattiert.

2.2.1.3 Herstellung von Selektivnährböden

Zur Herstellung von selektiven Agarplatten wurde LB-Medium mit 1,5 % (v/v) Agar versetzt, autoklaviert, und nach dem Abkühlen zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Platten wurde es nun auf 55°C und mit den gewünschten Antibiotika versetzt. Dazu zählten Spectinomycin und Kanamycin, welche mit einer Konzentration von 50 µg/ml dazugegeben wurden und das Antibiotikum Carbenicillin welches mit einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt wurde. 10 cm Petrischalen wurden dann unter einer sterilen Bank mit einer entsprechenden Menge des Mediums befüllt und nach dem Abkühlen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.4 Aussaat der Bakterien auf Selektivnährböden

Die gewünschte Menge an LB-Medium (6-50 ml) wurde in einen Kolben gegeben und mit zu vermehrenden Bakterien beimpft. Außerdem wurde das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum, welches von der Resistenzkassette des zu amplifizierenden Plasmids abhängig ist, versetzt. Durch eine Inkubation über Nacht bei 37°C und 200 rpm kam es dann zu einer Anreicherung der Bakterien.

2.2.1.5 Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur

Die gewünschte Menge an LB-Medium (6-50 ml) wurde in einen Kolben gegeben und mit zu vermehrenden Bakterien beimpft. Außerdem wurde das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum, welches von der Resistenzkassette des zu amplifizierenden Plasmids abhängig ist, versetzt. Durch eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kam es dann zu einer Anreicherung der Bakterien.

2.2.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.2.2.1 Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterienkultur (Mini)

Um kleine Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterien zu erhalten, wurde am vorherigen Tag 6 ml Bakterienflüssigkultur mit LB-Medium und entsprechenden Antibiotika angesetzt. Die DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin Mini-Präparation-Kit von Macherey-Nagel extrahiert. Die über Nacht inkubierte Bakterienkultur wurde bei 11.000 x g 30 s zentrifugiert und dann

das Pellet in 250 µl A1-Puffer (versetzt mit RNase A) resuspendiert. Es erfolgte eine Zugabe von 250 µl A2-Lysepuffer worauf dann die entstandene Suspension invertiert und 5 min bei RT inkubiert wurde. Die Lysereaktion wurde mit 300 µl A3-Neutralisationspuffer abgestoppt und danach wurde die Suspension bei 11.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine Säule mit Silikatmembran gegeben und für eine Minute zentrifugiert, wobei die DNA in der Membran aufgefangen wurde. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl AW-Puffer und 600 µl A4-Ethanolpuffer gewaschen und 2 min lang trocken zentrifugiert. Zum Schluss wurde die DNA mit 22 µl vorgewärmtem AE-Puffer aus der Membran eluiert und in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.2.2.2 Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterienkultur (Midi/Maxi)

Zur Isolierung einer größeren DNA-Menge wurde am Vortag eine 50-100 ml Bakterienflüssigkultur angesetzt und bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Extraktion der DNA erfolgte nun unter Verwendung des Qiagen Plasmid Plus Purification Midi/Maxi-Kits. Die vorbereitete Bakterienkultur wurde bei 4 °C und 6.000 x g für 20 min abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml P1-Puffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 2 ml P2-Puffer mit anschließendem Invertieren und einer Inkubation bei RT von 5 min. Die Suspension wurde dann mit 2 ml S3-Puffer neutralisiert und nach mehrmaligem Invertieren vollständig in ein QIAfilter Cartridge überführt und hier für 10 min inkubiert. Durch einen Plunger wurde die Suspension durch die Cartridge gepresst und das Filtrat in einem frischen 50 ml Röhrchen aufgefangen. Danach wurde 2 ml BB-Puffer dazugegeben, invertiert und das Filtrat mit dem QIAvac24 Plus bei etwa 300 mbar durch eine Silikatsäule gesaugt. Hierbei wurde die DNA in der Membran aufgefangen und danach mit 700 µl ETR-Puffer und 700 µl PE-Puffer gewaschen. Das Trocken der Säule erfolgte durch Zentrifugieren für eine Minute bei 10.000 x g. Zum Schluss wurde die DNA aus der Membran mit 200 µl EB-Puffer eluiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt.

2.2.2.3 Amplifikation des Fibin Genkonstrukts mit Open reading frame (ORF) PCR

Der erste Schritt für die Generierung des Genkonstrukts für Fibin-Überexpression war das Amplifizieren des spezifischen Fibin DNA-Abschnittes. Um eine geringere Fehlerrate bei der Vervielfältigung des gewünschten Genabschnittes zu garantieren, wurde anstatt einer Taq-

Polymerase die Pfx-Polymerase (*Thermococcus species KOD*) von Thermo Fisher Scientific verwendet. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wurde durch spezifische Primer festgelegt. Die Länge der Primer und auch die Menge an G- und C-Nukleotiden in ihnen wurden so gewählt, dass die Schmelztemperatur der Primer nahe der Annealing-Temperatur des PCR-Prozesses lag. Neben dem entsprechenden DNA-Template wurde Magnesium-Sulfat für ihre Enzymaktivität, zum Reaktionsansatz hinzugefügt, da dieser nicht im speziellen Pfx-Buffer enthalten war.

Tabelle 2-9: Fibin-ORF-PCR mit der Pfx-Polymerase

In der ORF-PCR wurden die entsprechenden Primer 10 µM eingesetzt.

Reagenzien	Gesamtvolumen (50 µl)
dH2O	36,75
10x Pfu-Puffer	5
dNTP (10µM)	1
MgSO ₄	1
Primer_F (10µM)	1,5
Primer_R (10µM)	1,5
Pfx- Polymerase	0,75
DNA-Template	2

Tabelle 2-10 Programm des Thermocyclers für die ORF-PCR

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Denaturierung (initial)	5 min	94 °C	1 x
Denaturierung	30 s	94 °C	45 x
Annealing	45 s	58 °C	
Elongation	1 min	68 °C	
Elongation (final)	10 min	68 °C	1 x

2.2.2.4 Agarose Gelelektrophorese

Die Elektrophorese dient zur Auftrennung unterschiedlich elektrisch geladener Teilchen. Die zu untersuchenden Moleküle wandern unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel und abhängig von ihrer molekularen Größe und ihrer Ladung bewegen sich die Teilchen unterschiedlich schnell. Dadurch ist die Bestimmung der Größe und der Reinheit der Konstrukte möglich. Für die DNA-Moleküle wurden 1%-ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde 1% Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle kurz erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach dem Abkühlen auf ungefähr 60 °C wurde Ethidiumbromid (2-5 ml) dazu gegeben, das Gemisch in eine Gelkammer gegossen und diese zur Bildung von Taschen mit Kämmen versehen. Sobald das Gel fest war, wurden die Proben mit Ladebuffer versetzt und, wie auch ein spezifischer DNA-Marker (Gene Ruler 1kb Plus), in die Taschen pipettiert. An die Gelkammer mit Gel und Pufferlösung wurde nun eine Spannung von etwa 100 V angelegt. Dabei wanderten die negativ geladenen DNA-Moleküle zur positiv geladenen Anode. Anschließend wurden die Proben unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und ausgewertet. Auch konnten die Proben auf eine UV-Platte gelegt und ausgeschnitten werden.

2.2.2.5 DNA-Gelextraktion

Zur weiteren Verarbeitung des hergestellten Konstruktes mussten die Proben aus dem Agarosegel extrahiert werden. Dazu wurden die Proben unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und jeweils in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit dem QIAquick-Gel Extraktions-Kit erfolgte dann die Gelextraktion. Das Gewicht der Probenstücke wurde gemessen und danach die dreifache Menge an GQ-Puffer dazugegeben. Bei 55 °C und 700 rpm wurden die Gelstücke für 10 min gelöst. Danach wurde das Gemisch auf eine QIAquick-Silikamembransäule gegeben und bei 11.000 x g für eine Minute abzentrifugiert. Dabei lagerte sich die DNA an der Membran in der Säule an, während der Rest im Überstand gesammelt und verworfen wurde. Nach einmaligem Waschen der Membran mit 750 µl PE-Puffer wurde die Säule durch Zentrifugation für 2 min getrocknet. Zum Schluss wurde die QIAquick-Silikamembransäule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die auf der Membran gebundene DNA mit 22 µl EB-Puffer von dieser eluiert.

2.2.2.6 DNA/RNA Messung Nanodrop

Mit Hilfe des Spektrophotometers (NanoDrop 2000) der Firma Peqlab wurde die Konzentration der RNA / DNA in den Proben bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte bei der Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen und das 260 / 280 Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei diesen Wellenlängen ermittelt, um die Reinheit der Proben zu beurteilen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm sollte bei 1,8-2,0 liegen. Zur Kontrolle wurden die Proben jeweils doppelt gemessen.

2.2.2.7 Klonierung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen oder Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die kurze DNA-Sequenzen erkennen und durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung die Doppelstrang-DNA an spezifischen Stellen innerhalb oder in der Nähe der entsprechenden Erkennungssequenzen zerschneidet. Dabei kann das Schneiden symmetrisch oder asymmetrisch erfolgen, wodurch entweder glatte Enden (blunt end) oder leicht versetzte Enden mit einem ein 3'- oder 5'-Überhang von wenigen Basen (sticky ends) entstehen können. Dabei hat jede Restriktionsendonuklease ihre eigene optimale Inkubationstemperatur und ihren speziellen Reaktionspuffer, die den Herstellerangaben zu entnehmen sind. Zur Plasmid-Klonierung wurde der gewünschte Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment mit einem spezifischen Restriktionsenzym versetzt und geschnitten, sodass komplementäre Enden an Vektor und Ziel-DNA entstanden und diese dann ligiert werden konnten.

2.2.2.8 Restriktionsverdau

Zu Beginn der Klonierung wurden das durch PCR produzierte DNA-Insert und der Vektor (PBS alpha- MHC-Vektor) mit dem Restriktionsenzym NheI geschnitten. Es wurden jeweils 1500 ng von Vektor und Insert verwendet und dazu das Herstellerprotokoll angepasst. Ein weiterer Verdau fand zur Entfernung der Antibiotikaresistenz des Plasmides mit dem Restriktionsenzym Not I statt.

Tabelle 2-11: Ansatz für Restriktionsverdau

Reagenzien	Gesamtvolumen (Vektor, 25 µl)	Gesamtvolumen (Insert, 25 µl)
dH ₂ O	17,5	13,5
1x Tango Buffer	2,5	2,5
DNA/Vektor (template)	2	8
NheI	3	2

Der Reaktionsansatz mit dem Restriktionsenzym NheI wurde leicht gemischt, kurz abzentrifugiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Der Verdau mit dem Restriktionsenzym Not I erfolgte für 1 h bei 37 °C und die Inaktivierung für 20 min bei 80 °C. Zum Gewinnen des verdauten Materials folgte eine erneute Gelelektrophorese mit Extraktion. Nach dem Auftrennen der Ansätze im 1%-igen Agarosegel wurden die Proben fotografiert und analysiert. War das gewünschte Konstrukt vorhanden, wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch das Katalysieren und der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylresten der DNA-Fragmente, können DNA-Ligasen verschiedene DNA-Fragmente miteinander verknüpfen. Am meisten werden hierzu die T4-Ligase und die *E.coli*-Ligase genutzt. Diese unterscheiden sich im Wesentlichen in ihren Fähigkeiten die „stumpfen“ Enden (blunt ends) zu verknüpfen und in ihrer Energiequelle. Während der Ligation-Reaktion können auch unerwünschte Verknüpfungen wie Vektor-Vektor- und Insert-Insert-Ligationen entstehen. Aus diesem Grund wird immer eine höhere molare Menge vom Insert zur molaren Vektormenge angestrebt. Im folgenden Reaktionsansatz wurde die T4-Ligase mit entsprechendem Puffer verwendet. Zudem wurde ein Vektor-zu-Insert-Verhältnis von 1:3 benutzt.

Tabelle 2-12: Ansatz für Ligationsansatz

Reagenzien	Gesamtvolumen (20 µl)
dH2O	6
10x Ligations-Puffe	2
Insert (22 ng)	1
Vektor (100 ng)	10
Ligase (TA4 DNA)	1

Der Ligationsansatz wurde gemischt und bei 25 °C für 3 bis 4 h (oder über Nacht) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inaktivierung bei 65 °C für 10 min. Der Ansatz konnte nun zur Transformation von Bakterienzellen verwendet werden.

2.2.2.10 RNA

2.2.2.10.1 RNA Isolation aus Gewebe

Zur RNA Isolierung wurden bei der Organentnahme gewonnene Gewebeproben verwendet. Zusammen mit Keramikkügelchen und 1 ml QIAzol von Qiagen wurden die Proben in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermischt und mittels des Precellys Homogenisator für 2 x 20 s bei je 650 rpm homogenisiert.

Danach wurde das Gemisch bei 14.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Extraktion der RNA wurden jeweils 200 µl Chloroform auf die Proben gegeben und durch Invertieren gemischt. Nach weiterem Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 15 min bei 4 °C hatte sich die RNA in einer oberen wässrigen von der organischen Phase getrennt und konnte so vorsichtig in eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Mit Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die RNA für 40 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde von Isopropanol befreit und danach mit 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde auch das Ethanol entfernt und das Pellet bei RT für 5 bis 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration mittels des NanoDrop Spektrophotometers bestimmt.

Um die RNA von eventuell vorhandener DNA zu befreien wurde für einen DNase Verdau zu einem Ansatz mit bis zu 5 µg RNA in 50 µl 5 µl 10 x DNase-Puffer und 5 µl DNase gegeben

und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis: 25: 24: 1) vermischt. Eine Phasentrennung ergab sich nach 15 min Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und die RNA mit einer Mischung aus 300 µl 99,99%igem Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetatlösung bei -20 °C über Nacht gefällt. Am nächsten Morgen wurden die Proben dann bei 14000 rpm für 60 min bei 4 °C zentrifugiert und das so entstandene Pellet mit 500 µl 75%-igem Ethanol gewaschen, indem es bei 14000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert wurde. Danach wurde das Ethanol abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 12 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop-Spektrophotometer gemessen.

2.2.2.10.2 cDNA-Synthese

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde das Superscript III First Strand Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Für den Ansatz einer Probe wurden 1000 ng der zuvor isolierten und gereinigten RNA mit 12 µl DEPC-Wasser, 1 µl dNTPs (10 mM) und 0,5 µl Random Hexamer Primer (250 ng / µl) versetzt und dann bei 65 °C für 5 min denaturiert. Zum Kühlen wurde der Ansatz danach eine Minute auf Eis gestellt. Dann wurden 4 l 5 x First Strand Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT und 0,5 µl SuperScript III RT (200 U / µl) dazu pipettiert und durch vorsichtiges auf und abpipettieren gemischt. Für die Reverse Transkription wurde der Ansatz dann für 10 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 50 °C inkubiert und im finalen Prozess für 5 min bei 70 °C die Reaktion gestoppt. Zum Schluss wurde alles auf 4 °C heruntergekühlt. Die Proben wurden dann mittels Zugabe von DEPC-Wasser auf die RNA-Konzentration von 5 oder 10 ng/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.10.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der verschiedenen Gentranskripte wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR mit Hilfe von Express SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Invitrogen) wird während der Elongation an die DNA gebunden. Somit korreliert die produzierte DNA-Menge mit der Menge des Fluoreszenzfarbstoffes. So kann durch die Erfassung der Intensität des Leuchtsignals auf die

Menge der entsprechenden DNA-Sequenz geschlossen werden. Durch spezifische Primer bei der Amplifikation konnte somit die Anzahl der gesuchten Gentranskripte bestimmt werden. Zur Normalisierung der Expression der Ziel-Gene wurde die Expression des Referenzgens Rlp32 (Ribosomales Protein L32) erfasst. Die Messung wurde mit Hilfe des CFX96 Real-Time PCR Detections Systems von BioRad Laboratories durchgeführt und danach mit dessen Software ausgewertet.

Tabelle 2-13: Ansatz für die quantitative Real-Time PCR

Reagenzien	Gesamtvolumen (20 µl)
ddH ₂ O	7,2
SYBR GreenEr Mastermix	10
Primer_F (10 µM)	0,4
Primer_R (10 µM)	0,4
cDNA	2

Tabelle 2-14: Programm für den Thermocycler für die Real-Time PCR

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
UDG Inkubation	2 min	50 °C	1 x
Denaturierung (initial)	2 min	95 °C	1 x
Denaturierung	15 s	95 °C	40 x
Annealing/ Elongation	45 s	60 °C	
Schmelzkurve	10 s	95 °C	
Messung	5 s	60-95 °C	Zunahme von 0,5 °C/ Zyklus

Während eines Zyklus wurde die gesamte Platte vermessen und die Werte in relative Fluoreszenzeinheiten angegeben. Zur Quantifizierung wurde das Prinzip des Threshold-Cycles (Ct, Schwellenwert) verwendet. Dabei lag die Intensität der gesuchten Werte im exponentiellen Bereich und hob sich signifikant von der Hintergrundfluoreszenz ab. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Dazu wurden zunächst die Ct-Werte von Zielgen und Referenz voneinander abgezogen (ΔCt). Danach folgte die Bildung der Differenz beider ΔCt -Werten der einzelnen Gruppen (z.B. transgen und wildtyp). Der daraus entstandene Wert ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert) wurde anschließend in die Gleichung:

n-fache Expression (Gruppe transgen zu Gruppe Wildtyp) = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt.

Die Werte der Expression des zu untersuchenden Gens wurden mit Hilfe des Wertes der Expression eines nicht regulierten Gens (Rpl32) normalisiert.

Zur Untersuchung des hypertrophen Genprogramms wurde die Multiplex-PCR-Methode verwendet. Bei dieser Methode konnten bis zu vier Gene pro Probe gleichzeitig mit Hilfe von unterschiedlichen Sonden analysiert werden. Es wurden folgende Gene analysiert: *Nppa*, *Nppb*, *Rcan1.4* und das Kontrollgen *Rpl32*. Für jedes Gen wurde ein Mix aus Primer_F (10 μM), Primer_R (10 μM) und eine entsprechende Sonde (10 μM) im Verhältnis 1:1:2 lichtgeschützt vorbereitet und verwendet.

Tabelle 2-15: Ansatz für Multiplex Real-Time PCR

Reagenzien	Gesamtvolumen (20 μl)
ddH2O	6
iQ-PowerMix	10
Nppa-Mix (FAM)	0,5
Nppb-Mix (HEX)	0,5
Rcan1.4-Mix (Cy5-Maus, Cy5.5-Ratte)	0,5
Rpl32-Mix (Texas Red)	0,5
cDNA	2

Tabelle 2-16: Programm für Thermocycler zur Multiplex Real-Time PCR

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung (initial)	2 min	95 °C	1 x
Denaturierung	15 s	95 °C	45 x
Annealing/Elongation	45 s	60 °C	

2.2.2.11 Protein

2.2.2.11.1 Proteinisolierung aus Gewebe

Das gewonnene Gewebe wurde zusammen mit 500 ml Kernlyse-Puffer und Keramikugeln in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zur Extraktion des Proteins wurde es mittels des Precellys 24 Homogenisators für 2 x 20 s bei 6.000 rpm homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C und 14.000 x g für 20 min zentrifugiert und danach der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.2.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Methode

Die Konzentration wurde mit dem Bradford-Verfahren ermittelt. Es handelt sich dabei um eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Am Anfang wurde eine BSA Standardverdünnungsreihe erstellt.

Das Verfahren beinhaltet einen Farbumschlag, welcher auf einer Komplexbildung des Triphenylmethan-Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau-G-250 (CBBG) mit nichtpolaren, hydrophoben und kationischen Seitenketten von Proteinen in saurer Umgebung beruht. Durch die Komplexbildung wird das Absorptionsmaximum des ungebundenen kationischen, roten Farbstoffes verschoben. Der Komplex mit den Proteinseitenketten stabilisiert im sauren Milieu die anionische, unprotonierte Sulfatform.

Die Reihe bestand aus den Konzentrationen 2,56 µg/µl, 1,28 µg/µl, 0,64 µg/µl und 0,32 µg/µl und wird auf ddH₂O als „blank“ normalisiert. Es wurden 2 µl der Proteinproben, bzw. der Verdünnungsreihe einzeln in je ein Well einer 96-Well Platte pipettiert, wobei jeder Ansatz in Triplikaten pipettiert wurde. Dann wurden in jedes Well 200 µl filtrierte Bradfordreagenz gegeben und die Flüssigkeiten auf einem Schüttler für 5 min gemischt. Der im Bradfordreagenz enthaltene Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 hat ein Absorptionsspektrum von 470 nm bis 595 nm. Die Absorptionsmessung wurde mit einem

Spektrophotometer (Tecan infinite M200 Pro) durchgeführt und über den Abgleich mit der Standard Verdünnungsreihe die Konzentration an Proteinen ermittelt.

2.2.2.11.3 SDS-Page

Um die Proteine aus dem Proteingemisch nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die Elektrophorese mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel angewandt. Durch die Anlagerung von SDS werden die Proteine entfaltet und negativ geladen, sodass ihre eigentliche Ladung überdeckt wird. Zusätzlich wurden die Proben durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min denaturiert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine von der Kathode zur positiv geladenen Anode. Das Polyacrylamid-Gel ist in ein Sammel- und in ein Trenngel unterteilt. Die Aufgabe des Sammelgels ist es die Proteine aus dem Probengemisch in einer Ebene zu konzentrieren, bevor sie dann im Trenngel separiert werden. Die Porengröße im Trenngel hängt von der Konzentration des Acrylamids ab. Zur Herstellung der Gele diente das Mini-Protein-Tetra-Elektrophorese-System (Bio-Rad) und wurden selbst gegossen. Dazu wurden zwei Glasplatten des Systems vorher mit Alkohol gereinigt und danach in einen Rahmen eingespannt. Nachdem als erstes das Trenngel mit APS und TEMED versetzt wurde, wurde das noch flüssige Gel bis zu $\frac{3}{4}$ Höhe zwischen die Glasplatten gegossen und zum Glätten der Gelgrenze und zum Schutz vor Sauerstoffkontakt mit Isopropanol bedeckt. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und nun das Sammelgel auf gleiche Weise zum Auspolymerisieren mit APS und TEMED versetzt. Sobald es auf das Trenngel gegossen wurde, wurde ein Kamm zwischen die zwei Glasplatten gesteckt, welcher zur Bildung von Taschen im Gel diente. Die fertigen Gele wurden nun in der Elektrophoresekammer befestigt, der Kamm gezogen und die entstandenen Taschen mit Laufpuffer ausgespült. Eine vorher berechnete und gewünschte Menge an Protein von den Proben wurde mit 4 x Laemmli-Proben-Puffer versehen. Danach wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert, wobei ein Marker zur Größenorientierung der Proteine mit aufgetragen wurde. Anschließend wurde eine Spannung von 100 V angelegt und die Proteine bis zur gewünschten Höhe im Gel laufen gelassen.

2.2.2.11.4 Western-Blot-Verfahren

Beim Western-Blot-Verfahren wurden die vorher aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran überführt. Für den Western-Blot wurde das Tank-Transfer-System von Biorad verwendet. Für den Elektronentransfer vom SDS-Gel auf eine entsprechende Membran wurde das Gel anodenseitig auf die Membran gelegt, mit Transferpuffer-befeuchteten Filterpapieren umschlossen und in einen dafür vorgesehenen Tank gehängt.

Hier wurden für jede Seite jeweils drei Filterpapiere verwendet und alles zusätzlich von einem Schwamm umgeben. Danach wurde alles in eine Blot-Kassette eingespannt. Die Membran wurde zuvor in Methanol gelegt wodurch die Hydrophobie gemindert wird und die Membran somit für den Transfer aktiviert wird. Beim Zusammenbau wurde darauf geachtet die Vorrichtung luftblasenfrei zu halten. Anschließend wurde die Kassette in den Tank eingehängt und dieser mit Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Tank wurde unter ständiger Kühlung an konstanten Gleichstrom bei 350 mA für 90 min angeschlossen. Während dieser Zeit wurden die Proteine aus dem SDS-Gel in Richtung der Anode auf die Membran transferiert.

2.2.2.11.5 Ponceau S-Färbung

Die Ponceau-Färbung (Ponceau S Solution SIGMA P7170) wurde zum einen zur Überprüfung der Effizienz des Blotting-Transfers und zum anderen als Ladekontrolle genutzt. Direkt nach dem Western-Blotting wurde die Membran für 1-2 min in 0,1% Ponceau S in 5%iger Essigsäure (w/v) inkubiert und die Proteine somit fixiert und reversibel rot angefärbt. Anschließend wurden die Protein-Banden in jeder Ladespur durch zwei Waschschrte mit TBST (1 M TRIS-HCl pH 7,50, 0,8% NaCl, 0,1% Tween 20) sichtbar gemacht. Nach Detektion der Banden wurde die Membran zwei bis dreimal für 10 min in TBST gewaschen, um sie zu entfärben.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde die Membran nach dem Transfer und der Ponceau-Färbung für 2 h bei RT in 5% Magermilchpulver oder 5% BSA in TBST-Lösung inkubiert.

2.2.2.11.6 Immundetektion von membrangebundenen Proteinen

Nachdem Transfer der Proteine der vom SDS-Gel auf die Membran wurde diese anschließend mit dem spezifischen Antikörper in 5% Milchpulver oder 5% BSA in TBST-Lösung über Nacht

bei 4 °C inkubiert, am nächsten Tag 3 x für 10 min in TBST gewaschen und danach mit einem Peroxidase (HRP)-gekoppelt Zweitantikörper in 5% Milchpulver in TBST-Lösung für 2-3 h bei RT inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen für je 10 min in TBST-Lösung erfolgte die Detektion.

Bei der Detektion wurde das Enhanced-Chemiluminescence (ECL)-Advance-Detection-Kit von verwendet. Hierzu wurden die beiden Reagenzien, welche Luminol enthalten, zu gleichen Teilen vermischt, auf die Membran pipettiert und für 3 min im Dunkeln inkubiert. Das an den Zweitantikörper gekoppelte HRP wirkt als Katalysator und sorgt für eine Oxidation des Luminols und damit für eine Lumineszenz. Diese kann nun detektiert werden. Bei der Chemilumineszenz-analyse wurde dann die Lichtemission bei 425 nm von der Alpha Innotech Multiimage III Dokumentationsanlage aufgenommen und nachher mittels densitometrischen Verfahren (durch die Reemission der unterschiedlichen Proben ermittelt) analysiert.

2.2.2.11.7 Isolierung von adulten Mauskardiomyozyten

Zur Isolierung von adulten Mauskardiomyozyten wurden F1bin-TG-Mäuse sowie Wildtypmäuse zur Kontrolle verwendet. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, der Thorax eröffnet und das Herz entnommen. Das Herz wurde danach sofort in einer gekühlten vorher angesetzten Perfusionslösung (Enzymlösung) gewaschen. Dazu wurde das Herz über die Aorta auf eine 18 G Kanüle gezogen und an dieser mit einem Prolenfaden (3,0-4,0) befestigt. Dies geschah unter einem Mikroskop in einer Petrischale. Hier wurde das Herz dann mit der Perfusionslösung (20 ml) gespült. Danach wurde das Herz in eine vorgewärmte (37 °C) Perfusionsanlage (Verdaukammer) gehängt.

Tabelle 2-17 Enzymlösung für die Isolierung adulter Mauskardiomyozyten

Reagenzien	Volumen
1 x Isolationstyrode	20 ml
Liberase	300 µl
Trypsin (10 x)	111,2 µl
CaCL2 (10 mM)	25 µl

Mit einer Pumpe wurde über die Kanüle eine Verdaulösung mit einem konstanten Fluss von 3 ml/min bei 37 °C für 10 min durch das Herz geleitet. Die Verdaulösung wurde dabei solange

durch das Herz geleitet, bis es eine milchige Farbe annimmt und leicht aufgetrieben ist (4-7 min).

Nach der Perfusion wurde das Herz von der Perfusionsanlage genommen, die Vorhöfe abgetrennt und die Ventrikel nach der Zugabe von 2,5 ml der vorgewärmten Stopplösung mit einer Schere 30 s gründlich zerkleinert.

Tabelle 2-18: Stopplösung für die Isolierung adulter Mauskardiomyozyten

Reagenzien	Volumen
1x Isolationstyrode	225 ml
Bovines Kälber Serum	250 μ l
Kalziumchlorid 0,9 %	3,125 μ l

Die verbliebenen Gewebestücke wurden durch das auf und ab Pipettieren weiter zerkleinert. Die entstandene Zellsuspension wurde dann durch Nylongaze in ein 50 ml Röhrchen gefiltert und danach für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen, während das Zellsediment in Medium resuspendiert wurde. Um die Zellen in einer definierten Konzentration weiter zu verwenden, wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.2.11.8 Perfusion von Mausherzen zur Erstellung von Elektronenmikroskop-Bildern

Fibin-TG-Mäuse sowie Wildtyp-Geschwistertiere als Kontrolle wurden per zervikaler Dislokation Tiere getötet. Nach dem Ausbleiben der Reflexe (Zwischenzehenreflex, Zucken der Hinterläufe) und Atmung des Tieres wurde der Brustkorb aufgeschnitten und durch eine Butterflynadel der linke Ventrikel direkt zuerst mit einer Procain-PBS Lösung und danach mit einem Glutaraldehyd-Phosphatpuffer perfundiert. Das Perfundieren wurde abgeschlossen, sobald der Mausschwanz steif wurde. Im Anschluss wurde das Herz herausgeschnitten und in den Glutaraldehydpuffer über Nacht eingelegt. Am nächsten Tag wurde unter dem Lichtmikroskop zum einen der Papillarmuskel wie auch ein Stück des linken Ventrikels aus den Präparaten geschnitten. Danach wurden die Präparate bis zur Untersuchung am Elektronenmikroskop in Puffer bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2.12 Histologie

2.2.2.12.1 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurde das Herz *post mortem* entnommen und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der mittlere Teil des linken Ventrikels für Gewebeschnitte in Kryomolds (Kryoeinbettformen aus Plastik) mit Tissue-TEK eingebettet und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden von den Kryoproben $5\text{ }\mu\text{m}$ dünne Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger gelegt und danach bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor der immunhistochemischen Behandlung wurden die Schnitte zuerst im Inkubator bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min aufgetaut. Nach dem Waschen mit PBS wurden sie 10 min bei RT mit 2%iger PFA-Lösung fixiert. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, wurde auf die Schnitte nach dreimaligem Waschen mit PBS eine Blockierungslösung mit 2,5% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS gegeben und für 1 h bei RT inkubiert.

Nach weiterem Waschen mit PBS wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet und die Objektträger dann in eine „feuchte Kammer“ überführt. Anschließend wurden die Primäntikörper in einer Verdünnung von 1:200 und DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer (2,5% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS) angesetzt, auf die Schnitte gegeben und diese dann über Nacht im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am folgenden Morgen wurden die Schnitte erneut 3 x mit PBS gewaschen und mit den Zweitantikörpern, angesetzt 1:300 in Blockpuffer, versehen und bei RT für 1 h inkubiert. Zum Schluss wurden die Schnitte wiederum 3 x 5 min mit PBS und anschließend 1 x 5 min mit H_2O gewaschen und schließlich mit Deckgläschen versehen und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse gelagert.

Eine weitere Färbung wurde mit dem ProteoStat Aggreosome Detection Kit von der Firma Enzo durchgeführt. Diese Färbung konnte gleichzeitig mit der Antikörperfärbung gegen bestimmte Proteine, als Ko-lokalisationsstudien verwendet werden. Die Färbung wurde wie im oben beschriebenen Immunhistochemie-Protokoll durchgeführt. Sie ist für den Nachweis von Wechselwirkungen zwischen aggregierten und anderen Proteinen, die an der Aggresomenbildung beteiligt sind, vorgesehen. Dadurch können denaturierte Proteine, die sich innerhalb von Aggresomen in der Zelle befinden, detektiert werden. Es entsteht ein Rot-Fluoreszenz Farbstoff bei der Bindung an das aggregierte Protein.

Hämatoxylin-Eosin-, Toluidinblau-, und Siriusrot-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurde in der Dermatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt basische (eosinophile) Strukturen wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien und das glatte ER rot an. Im Gegensatz dazu ist Hämatoxylin ein natürlicher Farbstoff, welcher alle sauren (basophilen) Strukturen in der Zelle blau anfärbt. Hierzu zählen die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das raue ER.

Die Toluidinblau Färbung wurde im Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Das Toluidinblau ist eine Färbung von sauren Molekülen, wie Nucleinsäuren, Amyloide oder den Granulae von endokrinen Zellen.

Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Färbung ist die Siriusrot-Färbung oder auch Kollagenfärbung (SR-Färbung). In dieser Färbung stellen sich Muskelfasern in rot-Tönen, Zytoplasma gelb dar. So weisen Kollagenfasern vom Typ I (dicke Fasern) eine orange und die vom Typ III (dünne Fasern) eine grüne Farbe auf. Zu Beginn wurden die zu färbenden Schnitte mindestens 24 h in der Sirius-Rot/Fast Green-Lösung (1 g Fast green FCF und 0,5 g Sirius Red F3BA in 500 ml Pikrinsäure gelöst) inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit H₂O gewaschen und mittels einer Alkoholverdünnungsreihe (70%, 96%, 100%) gespült und dehydriert, und zum Schluss für 5 min in Xylol-Ersatz getaucht. Nach dem Trocken wurden die Präparate mit Deckgläsern versehen.

2.2.2.12.2 Bestimmung der Zelloberflächengröße

Zur Bestimmung der Zelloberflächengröße wurden Herzschnitte mit dem Glycoprotein Lektin (FITC-konjugiertes Lektin des *Triticum vulgare*, Sigma) und DAPI angefärbt. Bei der Färbung wurde ein ähnliches Protokoll wie bei der Antikörper-Färbung angewandt. Mit Hilfe des BZ-9000-E HS All-in-one Fluorescence Mikroskopes (Keyence) wurden mit einem 40x Objektiv Bilder des querangeschnittenen Papillarmuskels in den mit Lektin und DAPI gefärbten Herzschnitten aufgenommen. Die anschließende Vermessung der Zelloberfläche wurde manuell (nachziehen der Zellgrenzen am PC) mittels Image J Software durchgeführt. Pro Tier wurden 5 Bilder pro Schnitt angefertigt und hier 15-20 Zelloberfläche pro Schnitt vermessen.

2.2.2.12.3 Bestimmung des Fibrosegehaltes mittels Masson-Trichrom-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung besteht aus drei verschiedenen Farbstoffen und wurde in dieser Arbeit zur Analyse der Gewebsfibrose im Mauserz verwendet. Die Masson-Trichrom-Färbung besteht zum einen aus der Eisen und Hämatoxylin-Färbelösungen (HE-Färbung) nach Weigert für eine braun-schwarze Färbung der Zellkerne sowie aus Säurefuchsin und Ponceau 2R in wässriger Essigsäurelösung für die Färbung des Zytoplasmas in rosa. Zu Beginn wurden die vorher bei -80 °C gefrorenen Gewebeschnitte aufgetaut, dehydriert und in Bouin-Lösung über Nacht fixiert. Die Färbung der Schnitte begann danach mit Weigerts Hämatoxylin-Eosin-Färbelösung (Zellkernfärbung) für 5 min in einer Küvette. Nach einem anschließenden zweimaligen Waschgang mit Wasser erfolgten nach ähnlichem Vorgehen weitere Färbungen mit der Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung (Zytoplasma-, und Muskelgewebefärbung), der Phosphorwolframsäure/Phosphormolybdänsäure-Arbeitslösung und der Anilinblau-Lösung (Kollagenfärbung). Zum Schluss wurden die Schnitte zur weiteren Fixierung für 2 min in 1%-ige Essigsäure gegeben, danach mit Alkohol dehydriert und anschließend mit einem Deckgläschen versehen. Die Analyse des Fibroseanteils in den Gewebeschnitten, die durch eine grünliche und weiße Färbung erkennbar wurde, erfolgte mittels eigens kreierter Software.

2.2.3 Tierversuche

2.2.3.1 Generierung und Zucht der Versuchstiere

In Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut Max-Planck-Instituts of *Molecular Cell Biology and Genetics* in Dresden wurde ein transgenes-Maus-Modell generiert, welches eine kardiale Fibrin-Überexpression aufwies. Hierzu wurde der pBS-SKII+ α -MHC-FLAG-hGH1-Vektor verwendet. Neben einem α -MHC-Promotor enthält dieser Vektor einen FLAG-Tag, eine Multiple Cloning Site (MCS,) sowie eine Genkassette mit der Sequenz für einen Poly-A-Tail aus dem „human Growth Hormone“ (hGH). Die entsprechenden Primer für murines Fibrin wurden mit einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym NheI designed, womit die so zugeschnittene Sequenz in den Vektor eingebracht werden konnte. Nach einem weiteren Verdau mit dem Restriktionsenzym NotI wurde das entwickelte Konstrukt aufgereinigt, am Max-Planck-Institut in Blastozysten von C57BL/6N-Mäusen mikroinjiziert und diese danach in BALB/C-Ammenmäuse transplantiert. Von den daraus entstandenen chimären Tieren wurde

aus den Schwanzspitzen die isolierte genomische DNA auf die Integration des Transgens überprüft. Hierzu dienten für das Transgen spezifische Primer. Bei sechs Tieren wurde das gewünschte PCR-Produkt von 225kb nachgewiesen. Diese 6 Mäuse oder Founder wurden unabhängig voneinander mit jeweils einer C57BL/6N-Maus (1: 1-Verpaarung) verpaart. Die daraus entstandenen Nachkommen waren der Ausgangspunkt von Mauslinien mit einer unterschiedlichen Fabin-Überexpression im Herzen.

Die Tiere wurden danach in der Zentralen Tierhaltung der Universitätsklinik Schleswig-Holstein in Kiel gehalten. 5 Mäuse wurden in einem Individuell ventiliertem Käfig (IVC) bei freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. In der Haltung herrschte ein Tag/Nacht Rhythmus von 12/12 h, bei einer RT von 20-24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-65%. Die Haltung entsprach den neuen Anforderungen des TierSchG. Die Mäuse wurden in IVCs, Typ II long (Tecniplast®, Greenline) gehalten, ein Umsetzen erfolgte wöchentlich. Alle Gegenstände (z.B. Käfige, Futter, Wasser, Einstreu usw.) wurden autoklaviert. Das Futter (Maus-Zuchtfutter: Ssniff), die Einstreu und das Nistmaterial (Tapvei) wurden kommerziell bezogen.

Der Tierversuchsantrag (Antragsnummer: V242-53853/2016(104-8/16) und 242-7224.121-4) und die Anzeige von Vorhaben nach §4 TierSchG (Töten zu wissenschaftlichen Zwecken) zu den Tierversuchsvorhaben wurden vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (MELUND) genehmigt oder bzw. dort angezeigt (EU RL 2010/63).

2.2.3.2 Genotypisierung

2.2.3.2.1 Amputation der Mausschwanzspitzen und DNA-Extraktion

Die Schwanzspitzenamputation wurden beim Absetzen der Jungtiere (Alter von 3 Wochen) oder kurz danach ohne Betäubung durchgeführt (1 mm - 3 mm).

Das Schmerzempfinden bei der Amputation nimmt mit dem Alter der Tiere und mit der einhergehenden Verknöcherung der Schwanzwirbel zu. Das optimale Alter der Schwanzbiopsie liegt zwischen dem ersten bis 16ten Lebenstag. Nach § 6 des Tierschutzgesetzes wurde das Gewebe zu nicht-wissenschaftlichen Zwecken (Identifizierung des Genotyps) entnommen (Tierschutzgesetz§ 6 (1) Nr.4), eine entsprechende Anzeige beim MELUND lag vor.

Zur Aufreinigung und Isolierung der genomischen DNA wurde die Quick Extract DNA Extraction Solution von Biozym verwendet. Nach Zugabe von 25 µl des Quick Extract und kurzem vortexen, inkubierten die Proben 30 min unter kontinuierlichem Schütteln mit 700 rpm im Thermomixer bei 65 °C. Danach wurden die Proben noch einmal mittels eines Vortexers durchmischt und der Reaktionsvorgang durch Erhitzen im Thermomixer auf 95 °C gestoppt.

2.2.3.2.2 Genotypisierung

Zur Polymerase-Ketten-Reaktion wurde die aus Mausschwanzspitzen isolierte DNA verwendet. Zuerst wurde folgender Mastermix zusammenpipettiert und mit jeweils 2 µl der Probe versehen. Danach wurde die DNA in einem Thermocycler (Bio-Rad) mit dem unten beschriebenen Temperaturprofil amplifiziert. Im Anschluss wurden die Proben auf ein Agarosegel (1% Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen und so der Genotyp bestimmt. Mittels einer hGH-Poly-A-Tail Kasette wurden die transgenen Tiere bestimmt. Dabei betrug die Bandengröße der Wildtyptiere 118 bp und die Bandengröße der transgene Tiere 225 bp.

Tabelle 2-19: PCR-Ansatz zur Genotypisierung

Reagenzien	Gesamtvolumen (µl)
ddH ₂ O	ad 48
10x Dream Taq Green Buffer	5
dNTP (10mM)	1,25
Primer 18Sm/r_122F (10 µM)	0,6
Primer 18Sm/r_122R (10 µM)	0,6
Primer Fbin_RT_f (10 µM)	0,5
Primer paigt (10 µM)	0,5
Dream Taq dann Polymerase (5U/µL)	0,25

Tabelle 2-20: Programm für Thermocycler zur Genotypisierung

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Initialisierung	5 min	95 °C	1 x
Denaturierung	30 s	95 °C	30 x
Annealing	30 s	60 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	1 x
Ende (Kühlung)	⇒	4 °C	1 x

2.2.3.3 Transversale Aortenkonstriktion

Zum Induzieren einer kardialen Hypertrophie wurden die Mäuse einer transversalen Aortenkonstriktion unterzogen. Zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs waren die Tiere 8-10 Wochen alt. Bei der Operation wurde die Aorta zwischen *Truncus brachiocephalicus* und der *Arteria carotis communis sinistra* ligiert, sodass der Durchmesser der Aorta verkleinert wurde. Zur perioperativen Analgesie wurden den Mäusen 0,1 mg/kg Buprenorphin subkutan etwa 15 min vor der OP gespritzt. Über eine Inhalationsmaske wurde mit 4% (v/v) Isofluran eine tiefe Allgemein-Narkose eingeleitet. Zum Aufrechterhalten einer konstanten Anästhesie wurden die Tiere mit einer 22 G Braunüle intubiert und mit 2% Isofluran kontrolliert maschinell beatmet. Dabei erfolgte die Beatmung mit einem Tidalvolumen von 200 µl und einer Atemfrequenz von 120-130 Atemzüge/min. Die Körpertemperatur wurde mittels erwärmbarem Operationstisch mit Rektalthermometer und zusätzlichem Wärmestrahler kontrolliert und aufrechterhalten (automatische Feedbackregulation). Der Eingriff begann mit der Fixierung der Extremitäten Enthaarung des Brustbereiches mit handelsüblicher Enthaarungscreme (Insana) und mit einer Lidocain Injektion (6 mg/kg KG) subkutan um den OP-Bereich. Um den Aortenbogen dazustellen, wurde die Haut in cranio-caudaler Richtung eröffnet und unter einem Operationsmikroskop der sekundäre Interkostalraum freigelegt. Dieser wurde danach mit Hilfe einer Pinzette stumpf penetriert und der Thorax somit linksseitig eröffnet. Nach Freilegen und Mobilisieren des Aortenbogens, wurde unter diesem

nun ein 6-0 Prolene-Faden hindurchgezogen. Eine 27 G Kanüle, welche auf dem Bogen platziert wurde, diente zur Standardisierung des Ligaturdurchmessers. Nach Platzieren eines chirurgischen Knotens wurde die Kanüle rasch entfernt und die Öffnung des Thorax verschloss sich selbst über der Muskulatur. Die Haut wurde mit Einzelheften mit einem 4-0 Vicryl rapid (Ethicon) zugenäht. Bei scheinoperierten Tieren (Sham) wurde jeweils nur der Aortenbogen mobilisiert aber nicht ligiert. Der gesamte operative Eingriff dauerte 15-20 min pro Tier. Um eine Rekonvaleszenz zu gewährleisten, wurden nach der Operation die Mäuse einzeln gesetzt und bekamen zur postoperativen Analgesie 7 Tage lang Tramadol (1mg/100 ml) über das Trinkwasser.

Zwei Wochen nach dem Eingriff wurde die Funktion des linken Ventrikels mittels Echokardiographie ermittelt und anschließend morphometrische Parameter der Tiere erfasst.

2.2.3.4 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde zur Evaluation der linksventrikulären Funktion in den Gruppen der Basischarakterisierung (6, 8 Wochen oder 6 Monate) oder der operierten Gruppen 2 Wochen nach induzierter Herzhypertrophie durch die transversale Aortenkonstriktion angewandt. Hierzu erhielten die Mäuse eine Sedierung von 3% Isofluran (v/v) in einer Narkose-Box. Die Tiere wurden während der Untersuchung auf einem beheizbaren OP-Tisch mit eingebauter Temperatursonde und integriertem EKG fixiert. Der Hemithorax wurde mit Enthaarungscreme enthaart. Zum Erfassen der Echodaten wurde das Vevo 1100 Ultraschallgerät mit dem 400MS Schallkopf verwendet. Die Funktion des Myokards sowie die Herzkammergröße und Klappenfunktion wurden überprüft. Zur Messung der Pumpfunktion des linken Ventrikels wurden die Parameter Verkürzungsfraktion (*Fractional shortening, FS*) und Auswurffraktion (*Ejectionsfraktion, EF*) herangezogen. Diese wurden im B-mode (*brightness-mode*) des 4-Kammerblickes in der parasternalen Längsachse (*parasternal long axis, PSLAX*) sowie in der parasternalen kurzen Achse (*parasternal short axis, SAX*) gemessen. Beim B-mode wird der zu schallende Bereich mit mehreren Schallstrahlen getroffen. Die resultierenden Grauwerte ergeben die Echoamplitude des Bildes und geben die Struktur des Herzgewebes wieder.

Die Ejektionsfraktion oder auch Auswurfraction ist der Anteil des vom Herzen bei einer Kontraktion ausgeworfenen Blutes im Bezug zum Gesamtblutvolumen in der Herzkammer während der end Diastole. Sie wird als der Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen Volumen definiert, welches beim gesunden Herzen des Menschen ungefähr 80 ml (67 %) von einem enddiastolischen Volumen von 120 ml (100%) beträgt. (Das Schlagvolumen ist die Differenz aus enddiastolischem und endsystolischem Volumen).

Die Verkürzungsfraktion ist die prozentuale Durchmesser-Verkürzung des linken Ventrikels. Dieser in Prozent angegebene Wert ergibt sich aus dem Verhältnis von endsystolischem und enddiastolischem Durchmesser des linken Ventrikels und ist ein Maß für die Kontraktilität von Kammerwand und Septum.

Weitere Parameter, wie der linksventrikuläre Diameter (*Left ventricular internal diameter*, LVID), die Wandstärke des Septums (*Interventricular septum*, IVS) und die Stärke der Hinterwand (*Left ventricular posterior wall*, LVPW) wurden im *M-mode* des 4-Kammerblicks in der kurzen Achse jeweils in Systole (s) und Diastole (d) erfasst. Im *M-Mode (motion-mode)* sorgt ein einzelner Schallstrahl mit hoher Wiederholungsfrequenz für eine hohe zeitliche Auflösung und wird zur Messung der Wanddicken verwendet. Die gesammelten Daten wurden mittels der Software „Vevo LabWorkstation“ (VisualSonics) ausgewertet.

2.2.3.5 Organentnahme

Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wurde die Bauchdecke und der Brustkorb eröffnet und das Herz sowie Lunge und Leber herausgenommen. Als Parameter wurden bei den Organen das Gewicht und bei der Tibia die Länge bestimmt. Das Lungengewicht war von Interesse, da sich durch die künstlich herbeigeführte Aortenstenose ein erhöhtes Druckniveau im linken Ventrikel entwickelt, welcher sich retrograd auf den Lungenkreislauf überträgt. Die Folge ist die Entwicklung eines Lungenödems und somit die Erhöhung des Lungengewichtes. Durch die Bildung von Ödemen und der Einlagerung von Wasser im Körper verändert sich jedoch auch das „Körpergewicht“. Aus diesem Grund wurde die Länge der Tibia als weiterer Parameter mit vermessen. Die entnommenen Organe wurden mit PBS von Blut gereinigt und gewogen. Das Herz wurde mittels Analysewaage gewogen. Der linke Ventrikel wurde vom Rest des Herzens abgetrennt und ebenfalls gewogen. Danach wurde der linke Ventrikel weiter zerteilt und für molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach dem Befreien von der Muskulatur wurde die Tibia mit einem Messschieber vermessen.

Zum Vergleich der Gruppen wurden aus den erhobenen Größen die Quotienten Herzgewicht zu Körpergewicht (HG/KG), Herzgewicht zu Tibialänge (HG/Tibia) und das Gewicht des linken Ventrikels zum Körpergewicht (LVG/KG) wie auch zur Tibia (LVG/Tibia) gebildet zusätzlich wurde das Verhältnis von Lungengewicht zu Körpergewicht (LG/KG) bestimmt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und deren dazugehörige Standardfehler angegeben. Die mathematischen Analysen der Mittelwerte, ihrer Standardfehler (SEM), Standardabweichungen (SD) sowie deren Signifikanzen wurden mit dem Programm SigmaPlot 13.0 (Systat Software GmbH) ermittelt. Bei der statistischen Auswertung wurde die Signifikanz bei zwei Gruppen mittels t-Test (Student's t-Verteilung, Zweistichprobentest) und bei mehreren Gruppen der Two-Way ANOVA-Test (Faktoren ergeben sich aus den verschiedenen untersuchten Parametern und Gruppen) gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant angenommen. Die Überlebenszeitanalyse wurde mit dem Kaplan-Meier-Verfahren dargestellt. Mit dem Log-rank-Test kann man die Überlebenszeiten von zwei Gruppen miteinander vergleichen. Für mehrere Gruppen wurde die Cox-Regression verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der kardialen Fibrin-Überexpression *in vivo*

3.1.1 Generierung einer Mauslinie mit kardialer Fibrin-Überexpression

Um das Fibrin-Protein zu analysieren und es in verschiedenen kardialen Hypertrophie-Modellen *in vivo* zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik (Dresden) ein transgenes-Maus-Modell generiert, welches eine kardiale Fibrin-Überexpression aufwies. Dazu wurde das herzspezifische Fibrin-Gen mittels Vektor in die Maus eingebracht (Abbildung 3-1 A, siehe Methoden 2.1.12).

Von den daraus entstandenen chimären Tieren wurde aus den Schwanzspitzen die isolierte genomische DNA auf die Integration des Transgens überprüft. Hierzu dienten für das Transgen spezifische Primer. Bei sechs der chimären Tiere wurde das gewünschte PCR-Produkt von 225kb in ihrem Genom nachgewiesen (siehe Methoden 2.2.3.2.2, Abbildung 3-1 B). Diese sechs „Founder“ (Keimbahnüberträger) wurden nun in unserer Einrichtung jeweils mit einer C57BL/6N-Wildtyp-Maus verpaart. Jeder Founder bildete mit seinem Wildtyppartner den Ausgangspunkt einer potentiellen Fibrin-TG-Mauslinie (C57Bl/6NCrI-TG(α -MHC-Mm-Fibrin-Flag)). Durch den an die transgene DNA-Sequenz angebrachten Promotor konnte der Ort der eingebrachten transgenen DNA im Muengenom bestimmt werden. Die Häufigkeit, wie oft die transgene DNA in das Genom eingebaut wurde konnte damit jedoch nicht bestimmt werden. So können in den Tieren eine unterschiedliche Anzahl des Transgens vorhanden sein, was zu einem unterschiedlichen Expressions-Level des hier gewünschten Proteins führt.

Es erfolgte die Bestimmung des Genotyps der heterozygoten Fibrin-transgenen (Fibrin-TG)-Mäuse, welche aus diesen potentiellen Linien entstanden, mittels PCR-Analyse. Die dazu benötigte DNA wurde auch hier aus den Mausschwanzspitzen gewonnen. Um ein negatives Ergebnis einer ungenügenden PCR-Reaktion auszuschließen, wurde neben dem zu untersuchenden Gen auch das Kontroll-Gen 18S parallel amplifiziert (Abbildung 3-1 B). 18S ist als interne Kontrolle wegen ihrer geringen Expressionsvarianz (Regulation) unter Änderungen des physiologischen Zustandes der Zelle gut geeignet. Seine Expression bleibt in den meisten Zellen stabil. In jeden Wurf eines jeden Founders wurde das gesuchte PCR-Produkt von 225kb in einigen Nachkommen nachgewiesen. Somit ist neben den

Wildtypgeschwistertieren (nur 18S) auch heterogene Fibrin-TG-Mäuse (225kb und 18S) zu finden.

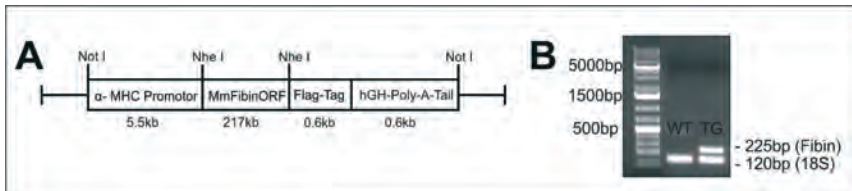


Abbildung 3-1: Generierung der konstitutiven Fibrin-transgenen Maus

A, Schematische Darstellung des generierten *fibin*-Konstruktes, welches für die Mikroinjektion eingesetzt wird. Es enthält den α -MHC-Promotor, das murine Fibrin-Konstrukt mit einem open reading frame (ORF), einen FLAG-Tag und eine Kassette mit der Sequenz für einen Poly-A-Tail aus dem „human Growth Hormone“ (hGH). B, die auf einem Agarosegel aufgetragenen PCR-Proben, die für die Fibrin-transgenen-Mäuse etablierten PCR, zeigen bei den transgenen-Tieren eine Bande bei 225 Basenpaaren (bp). Die Kontrollbande von 18S zeigt sich bei der Höhe von 120 bp. (Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT=Wildtyp-Mäuse; kb=Kilobasenpaare).

Durch die Steuerung des α -MHC-Promotors wird das Fibrin-Gen spezifisch in den Kardiomyozyten der transgenen Tiere überexprimiert. Um sicher zu gehen, dass Fibrin auch auf Proteinebene im Herzen überexprimiert wurde, wurde das Herzgewebe auf die Überexpression von Fibrin per Western-Blot- Verfahren überprüft. Hierzu wurde der linke Ventrikel der Herzen von 4 Wochen alten Mäusen der Fibrin-TG-Linie (Transgene und Wildtypen) der Founder entnommen. Die davon erzeugten Proteinlysate wurden nun mittels SDS-PAGE aufgetrennt, per Western-Blotting auf eine Membran übertragen und analysiert (siehe Methoden 2.2.2.11). Wie erwartet zeigten die Nachkommen in Abhängigkeit ihrer Elterntiere unterschiedliche Expressions-Level von Fibrin im Herzen (Abbildung 3-2 A). Um den Effekt der unterschiedlichen Expressions-Level von Fibrin in den Mäusen zu analysieren, wurden aus den Foundern anschließend 3 Tiere ausgewählt, bei denen die Nachkommen eine niedrige, eine mittlere oder eine hohe Fibrin-Überexpression in der Western-Blot-Analyse zeigten. Diese Founder bildeten nun die Basis für 3 Mauslinien unterschiedlicher kardialer Fibrin-Überexpression, an denen anschließend nun die Wirkung einer kardialen Fibrin-Überexpression *in vivo* analysiert werden sollte (Abbildung 3-2 B).

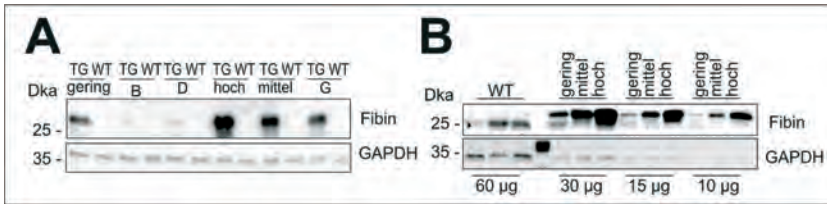


Abbildung 3-2: Bestätigung der Fibin-Überexpression auf Proteinebene in Mausherzen durch Detektion von Fibin mittels Western-Blot-Analyse

A, Von den Nachkommen der 6 Founder wurde jeweils das Proteinlysate des linken Ventrikels mit einem Wildtyp-Geschwistertier aus der gleichen Linie aufgetragen. Die Nachkommen zeigen jeweils eine unterschiedlich hohe Fibin-Protein Konzentration an. Das Protein GAPDH dient hierbei als Ladekontrolle. B, Aus den 6 Foundern wurden anhand des unterschiedlichen Expressionsniveaus 3 Tiere ausgewählt, welche als Ursprung dreier Fibin-transgener-Tierlinien (niedrig, mittel, hoch) dienten. Das aus Herzgewebe isolierte Proteinlysate der transgenen Tiere zeigt im Western-Blot-Verfahren eine sehr hohe Konzentration an Fibin-Protein. Aus diesem Grund ist eine Verdünnungsreihe mit verschiedenen Protein-Konzentrationen angelegt worden. Bei den Wildtyptieren (WT) wurden jeweils 60 µg und bei den transgenen Tieren (Linie: gering, mittel, hoch) je Linie 30 µg, 15 µg und 10 µg Protein aufgetragen. A, B Aufgrund des an das Fibin-Konstrukt angeklonte Flag-TAG sind in den transgenen Tieren neben der endogenen Wildtyp Bande eine weitere etwas höhere Bande des überexprimierten Fibins zu sehen. Da an das Fibin-Gen-Konstrukt eine Flag-Gensequenz anklont wurde wird das gesamte Gen schwerer (höheres molekular Gewicht) als das endogene Protein. Auf der Membran wird es dadurch höher dargestellt. Die Bande des transgenen Proteins liegt etwas höher als 25kDa und kann vom endogenen Protein unterschieden werden.

3.1.2 Charakterisierung Fibin-transgener-Mäuse

3.1.2.1 Charakterisierung Fibin-transgener-Mäuse im Alter von 8 Wochen

Um die Auswirkungen einer herzspezifischen Überexpression von Fibin in der Maus phänotypisch zu erfassen, wurden männliche sowie weibliche Mäuse aller 3 Fibin-transgenen-Linien (Fibin-TG) im Alter von 8 Wochen einer Basisanalyse unterzogen. Zudem wurden die Geschlechter auch untereinander ebenfalls verglichen. In diesem Alter zeigten die Fibin-TG-Tiere der 3 Linien zu den C57BL/6N-Geschwistertieren keine offensichtlichen Unterschiede in ihrer körperlichen Entwicklung. Anschließend wurden von jeder Linie 5-9 Mäuse zuerst echokardiographisch und anschließend morphometrisch untersucht. Die

Ergebnisse von Fibin-TG-Mäusen und von deren Wildtyp-Geschwistertieren wurden danach verglichen.

Stellvertretend für alle 3 Linien sind die Resultate der Basischarakterisierung von einer Fibin-TG-Mauslinie im Ergebnisteil gezeigt. Hier handelte es sich um die Linie mit der höchsten kardialen Fibin-Expression. Diese Linie wurde auch für alle weiteren Experimente genommen, da mit der höchsten Expression auch der größte Effekt der Überexpression erwartet wurde. (Ergebnisse der anderen Linien befinden sich im Kapt. 8. Anhang).

3.1.2.1.1 Echokardiographische Untersuchung

Im Alter von 8 Wochen wurde das Herz der Fibin-TG-Mäuse und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere auf Auffälligkeiten bzw. Unterschiede per Sonographie untersucht. Durch die echokardiographische Analyse wurden die Herzkammergröße und Klappenfunktion überprüft. Zur Messung der Pumpfunktion des linken Ventrikels wurden die Parameter Verkürzungsfraktion (*Fractional shortening, FS*) und Auswurffraktion (*Ejectionsfraktion, EF*) herangezogen (siehe Methoden 2.2.3.4, Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Echokardiographische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibin-TG-Mäusen (Fibin hohe Expression) im Vergleich zum Wildtyp (WT)

	♂ WT N=6	♂ Fibin-TG N=9	♀ WT N=5	♀ Fibin-TG N=5
Alter [d]	56,0±0,9	55,4±0,1	55,0±0,0	55,0±0,0
Herzfrequenz [bpm]	374,8±6,3	371,2±9,9	383,5±6,7	431,9±2,4
FS [%]	31,0±1,0	31,3±0,4	32,4±0,6	31,3±1,0
EF [%]	65,1±1,6	65,3±2,6	63,±1,6	60,1±2,6
IVS,s [mm]	0,8±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1
IVS,d [mm]	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,3	0,7±1,7
LVID,s [mm]	3,3±0,1	3,3±0,1	2,9±0,2	3,1±0,2
LVID,d [mm]	4,4±0,3	4,3±0,3	3,9±0,8	4±0,3
LVPW,s [mm]	1,0±0,1	1,1±0,1	0,9±0,3	0,9±0,7
LVPW,d [mm]	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,7±0,1

Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA oder durch Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt (beide zeigen keine signifikanten Unterschiede auf). (Mittelwert \pm SEM; FS= *Fractional shortening*; EF= *Ejection fraction*, IVS= *Interventricular Septum*; LVIDd= *Left Ventricular internal diameter*; LVPWd= *Left ventricular posterior wall*; syst.= Systole, diast.= Diastole; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

In den Fbin-TG-Mäusen und in ihren WT-Geschwistern wurde eine Ejektionsfraktion von $62,4 \pm 0,3\%$ (TG, männlich) bis $65,3 \pm 2,8\%$ (TG, weiblich) und eine Verkürzungsfraktion von $31,8 \pm 1,2\%$ (TG, männlich) bis $33,9 \pm 1,9\%$ (WT, männlich) gemessen. Weder Die EF noch die FS Ergebnisse zeigten Unterschiede zwischen diesen Versuchsgruppen. Allerdings wurde bei der Messung der linksventrikulären posterioren Wanddicken während der Diastole ein geringerer Wert des Parameters (LVPWdiast) bei den weiblichen Tieren verglichen mit den jeweiligen männlichen Tieren festgestellt (Abbildung 3-3 F, Im Alter von 8 Wochen wurde das Herz der Fbin-TG-Mäuse und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere auf Auffälligkeiten bzw. Unterschiede per Sonographie untersucht. Durch die echokardiographische Analyse wurden die Herzkammergröße und Klappenfunktion überprüft. Zur Messung der Pumpfunktion des linken Ventrikels wurden die Parameter Verkürzungsfraktion (*Fractional shortening*, FS) und Auswurffraktion (*Ejectionsfraktion*, EF) herangezogen (siehe Methoden 2.2.3.4, Tabelle 3-1). Tabelle 3-1).

Es waren somit keine Unterschiede in der hier untersuchten Herzfunktion der transgenen Tiere zu ihren Wildtypgeschwistern unter basalen Bedingungen feststellbar.

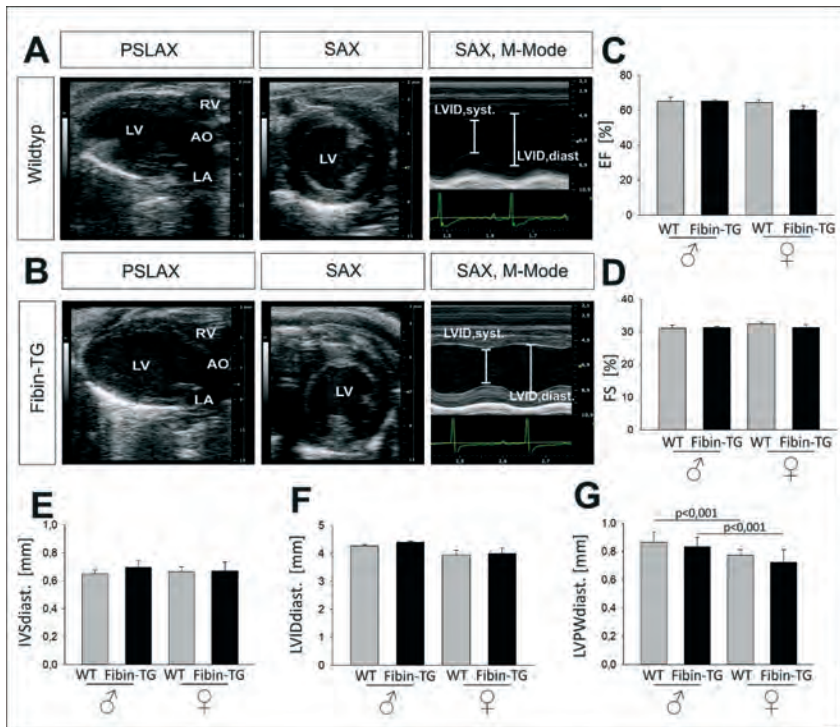


Abbildung 3-3: Keine echokardiographischen Unterschiede zwischen Fbin-TG-Mäusen und deren Wildtypgeschwistern

A, B, Repräsentative Abbildungen der parasternal langen (PSLAX) und kurzen Achse (SAX) des linken Ventrikels im B-mode, sowie repräsentative Abbildungen des linksventrikulären Diameters in Systole und Diastole im M-mode (SAX, Mode) von 8 Wochen alten Fbin-TG-Tieren und deren Wildtypgeschwistertieren. C, In der ermittelten Ejektionsfraktion (EF) sowie in der Verkürzungsfraktion (D, FS) können keine signifikanten Differenzen zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden (Fbin-TG: männlich, N=9; weiblich, N=5; WT: männlich, N=6; weiblich, N=5). G, Im Vergleich zu den männlichen Tieren zeigen beide weiblichen Gruppen der Linien Fbin-TG und WT eine signifikant geringere linksventrikuläre posteriore Wandstärke in der Diastole während der linksventrikulären Diameter (F, LVIDdiast) keine Unterschiede aufweisen. (Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. PSLAX= parasternale Längsachse; SAX= Parasternale Kurzachse; LV= Linker Ventrikel; RV= Rechter Ventrikel; LA= Linkes Atrium; AO= Aorta; FS= Fractional shortening; EF= Ejection fraction; IVSdiast= Interventricular Septum, diastole LVIDdiast= Left Ventricular internal diameter, diastole; LVPWd= Left ventricular posterior wall, Diastole; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.1.2.1.2 Morphometrische Untersuchung

Für die nach der Echokardiographie anschließende morphologische Untersuchung wurden die Mäuse per Genickbruch getötet, die zu untersuchenden Parameter wie Körpergewicht, Herzgewicht und Länge der Tibia wurden bestimmt. Danach wurden die Ergebnisse der Transgenen und Wildtyp Tiere miteinander verglichen (siehe Methoden 2.2.3.5).

Tabelle 3-2: Morphometrische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fbin-TG-Mäusen

	♂ WT N=6	♂ Fbin-TG N=9	♀ WT N=5	♀ Fbin-TG N=5	♂ Fbin-TG v.s. ♀ WT
Alter [d]	56±0,9	55,4±0,9	55,0±0,0	55,0±0,0	n.s.
KG [g]	24,0±1,8	21,8±1,3	19,1±1,1	20,3±0,7	n.s.
HG [mg]	100,8±3,5	94,7±2,1	100,6±3,1	93,4±3,5	n.s.
LVG [mg]	81,8±3,2	77,9±2,3	70,2±2,0	74,6±2,6	n.s.
Tibialänge [mm]	16,2±0,6	15,9±0,4	15,9±0,5	16,0±0,4	n.s.
HG/KG [mg/g]	4,2±0,6	4,3±0,5	5,2±0,8	4,7±0,7	p<0,001
LVG/KG [mg/g]	3,5±0,6	3,6±0,5	3,7±0,6	3,6±0,5	n.s.
HG/Tibia Länge [mg/g]	6,2±0,8	5,9±0,6	6,2±0,8	5,9±0,8	n.s.
LVG/Tibia Länge [mg/g]	5,0±0,7	4,8±0,5	4,4±0,5	4,4±0,6	n.s.
Lungen gewicht [mg]	144,4±4,5	134,7±4,0	117,1±2,3	126,4±3,1	n.s.

Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA oder vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. (n.s. = nicht signifikant, Mittelwert ± = SEM; HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Um die Tiere besser untereinander vergleichen zu können, wurden von den gemessenen Parametern Quotienten gebildet.

In den Fbin-TG-Mäusen wurde im Parameter Herzgewicht zu Körpergewicht (HG/KG) kein signifikant erhöhter Wert festgestellt (Abbildung 3-4 A). Ähnlich dazu verhält sich auch es auch beim Quotienten von linkem Ventrikelgewicht zu Körpergewicht (LVG/KG,

Abbildung 3-4). Bei dem Quotienten HG/Tibia waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar (Abbildung 3-4 C). Das Verhältnis von Lungengewicht zu Körpergewicht (L G/KG) wies keine signifikanten Unterschiede in der Linie auf (Abbildung 3-4 D). Morphologisch waren demnach keine Unterschiede zwischen Fibrin-TG-Mäusen und ihren Wildtypgeschwistern festzustellen. In der Analyse der Herzfunktion, auch die der Morphologie waren keine Unterschieden zwischen transgenen Tieren und Wildtyp-Mäusen festzustellen.

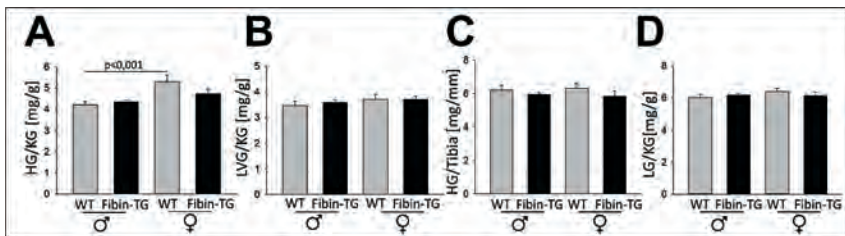


Abbildung 3-4: Keine morphometrischen Unterschiede zwischen Fibrin-TG-Mäusen und deren Wildtypgeschwistern

A-D, In den Verhältnissen der morphometrischen Parameter sind sowohl bei Herzgewicht (HG) zu Körpergewicht (KG) (A), bzw. Herzgewicht (HG) zu Tibialänge (Tibia) (B) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fibrin-TG-Mäusen (männlich, N= 9; weiblich, N= 5) und den WT-Mäusen (männlich, N= 6; weiblich, N= 5) zu beobachten. Der Quotient LG/KG zeigt keine Abweichungen zur Kontrolle (D). Ein signifikanter Unterschied wurde beim Quotienten von HG/KG zwischen den WT-Tieren zwischen den Geschlechtern festgestellt (A). (Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; LG = Lungengewicht; Fibrin-TG = Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Um eine eventuell vorliegende Hypertrophie in den Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde die Zelloberflächengröße, die in den Fibrin-TG-Mauserhschnitte mit denen der WT-Mäusen verglichen. Dazu wurde von jeder Maus eine Muskelprobe zwischen Basis und Apex, möglichst nah am Papillarmuskel, entnommen und daraus Gewebeschnitte gefertigt (siehe Methoden 2.2.2.12). Mit dem autofluoreszierenden Glykoprotein Lektin wurde die Zellmembran der Kardiomyozyten unter dem Mikroskop sichtbar gemacht und die Fläche ausgemessen (siehe Methoden 2.2.2.12.2, Abbildung 3-5 A).

Die *in vivo* Untersuchung zeigten in allen 3 Fibin-TG-Maus-Linien, unabhängig ob mit einer niedrigen, mittleren oder hohen Fibin-Überexpression, eine signifikant geringere Zelloberflächengröße in den Gewebsschnitten n(Fibin TG hoch exprimiert: $p < 0,001$ zu WT) verglichen mit der WT-Kontroll-Gruppe auf. Dies ist exemplarisch für die Fibin hoch exprimierende Gruppe in Abbildung 3-5 A dargestellt. In dem Fibin-TG-Herzgewebe wurden mit Lektin neben der Zellmembran zudem unbekannte Ablagerungen angefärbt. Diese erschienen auch in grüner Farbe (Abbildung 3-5 A Pfeile).

Für den Nachweis einer möglichen Fibrose, welche mit einer Hypertrophie einher geht, wurden weitere Schnitte mit der Masson-Trichome-Färbung angefärbt (siehe Methoden 2.2.2.12.3, Abbildung 3-5 B). Die Messung der Fibrose wurde in dieser Arbeit nur in der Versuchsgruppe mit der höchsten Fibin-Überexpression und deren Kontrollgruppe durchgeführt. Hier wurde eine signifikante Erhöhung des Fibrosegehaltes in den Fibin-TG-Tieren im Herzgewebe festgestellt. Zusammengefasst zeigten die Tiere mit einer Fibin-Überexpression eine geringere Zelloberflächengröße der Kardiomyozyten und einen höheren Fibrose Anteil im Herzgewebe, als ihre Wildtypgeschwistertiere.

Die festgestellte geringere Zelloberflächengröße der Kardiomyozyten in Fibin-TG-Tieren, im Vergleich zu den Kontroll-Tieren sprach eher gegen eine Hypertrophie der Zellen. Im Gegensatz dazu stand der hohe Fibrose Anteil im Herzgewebe. Die Ablagerungen, welche ebenfalls mit Lektin angefärbt wurden, sollten später in der Arbeit behandelt werden.

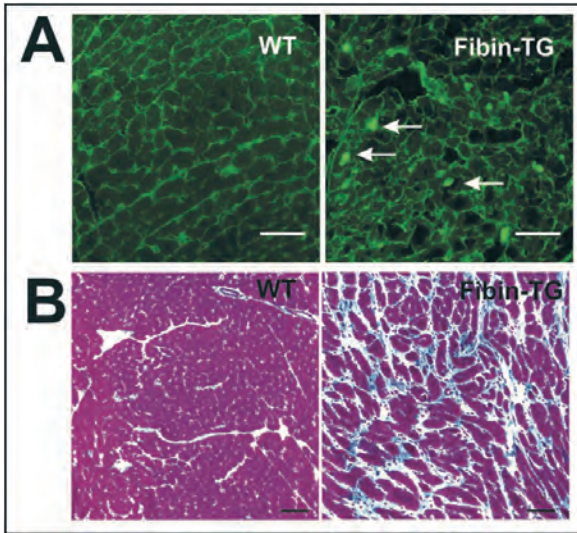


Abbildung 3-5: Fibin-TG-Herzgewebe Ablagerungen nach einer Färbung mit dem Farbstoff mit Lektin (Mauslinie mit höchster Fibin-Expression)

A, Durch die mit dem Lektin-Farbstoff versehene Zellmembran kann die Oberflächengröße der Kardiomyozyten im Herzgewebe ermittelt werden. Neben der Zellmembran sind weitere unbekannte Ablagerungen in den Fibin-TG-Mäusen mit Lektin angefärbt (Pfeile). B, Darstellung von murinem Herzgewebe mit einer Masson-Trichome-Färbung. Die Kardiomyozyten erhalten durch die Färbung eine rote und das Fibrosehaltige Gewebe eine blaue Färbung. (Maßstabbalken= 50 µm; Fibin-TG= Fibin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

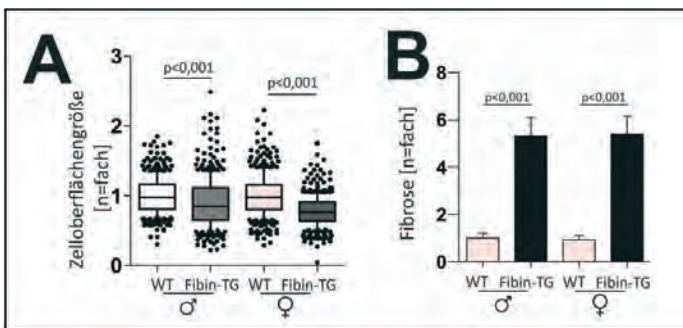


Abbildung 3-6: Fibin-TG-Herzgewebe zeigt eine geringe Zelloberflächengröße und hohen Fibrosegehalt (Mauslinie mit höchster Fibin-Expression)

A, In den Fbin-TG-Mäusen ist eine signifikant kleiner Zelloberflächengröße als in den WT-Mäusen zu beobachten (Fbin-TG: männlich, N= 6; weiblich, N= 5; WT: männlich, N= 5; weiblich, N= 5) Dieses Ergebnis zeigt sich in den männlichen sowie in den weiblichen Versuchsgruppen. B, Masson-Trichome-Färbung der Fbin-TG-Linie (Fbin-TG: männlich, N= 6; weiblich, N= 5; WT: männlich, N= 8; weiblich, N= 6). Der Fibrosegehalt in den männlichen Fbin-TG-Mäusen zeigt im Vergleich zu den WT-Tieren einen signifikant höheren Wert. (Mittelwert \pm SEM; Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des t-Tests ermittelt. Maßstabbalken= 50 μ m; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.1.2.1.3 Molekularbiologische Analyse

In der molekulargenetischen Untersuchung waren das Gen für den *atrial natriuretic factor* (*Nppa*) wie auch für das *brain natriuretic peptide* (*Nppb*), von besonderem Interesse, denn diese Gene werden durch Stressinduktion im Ventrikel exprimiert und sind valide experimentelle Biomarker für eine entwickelte Hypertrophie im Herzen (Bernardo, Weeks et al. 2010). Wie auch in den vorangegangenen *in vitro* Experimenten an isolierten neonatalen Ratten Kardiomyozyten wurde auch in diesem Experiment eine Herunterregulation dieser Gene postuliert. Allerdings waren entgegen den Erwartungen die hypertrophen Marker-Gene in den Fbin-TG-Mäusen hochreguliert (Fbin-TG= *Nppa*: 13,7 \pm 3,6-fach; *Nppb*: 1,9 \pm 0,6-fach Fbin-TG, N= 6; WT, N= 7) (Abbildung 3-7). Ebenso war auch das Gen *Myh7*, welches eine hauptsächlich im Herzen vorkommende β -Isoform der schweren Kette von Myosin transkribiert, in den Fbin-TG-Mäusen überexprimiert (*Myh7*: 3,8 \pm 1,5-fach). Anschließend wurde auch eine signifikant erhöhte Expression der RNA von *Rcan1.4* (2,5 \pm 1,0-fach), ein Calcineurin-abhängiges Hypertrophie-Marker-Gen, ebenfalls in den transgenen-Tieren gemessen.

Die Fbin-TG-Tiere zeigten demnach eine Hochregulierung der hier gemessenen Hypertrophie-Marker-Gene, was für eine Hypertrophie im Herzen sprechen würde.

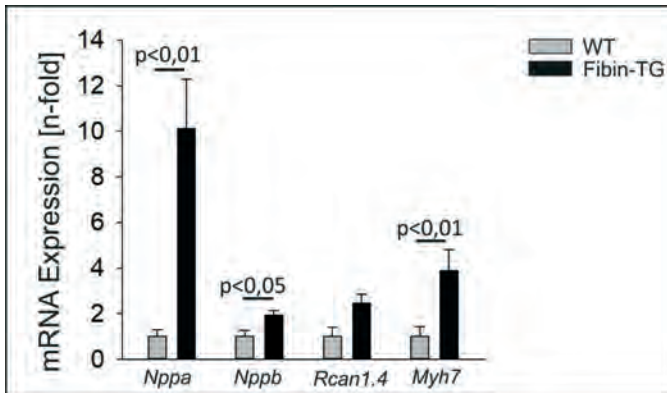


Abbildung 3-7: Erhöhte Expression von hypertrophen Marker-Gene in Fbin-TG-Mäusen

Die hypertrophen Marker-Gene *Nppa*, *Nppb* und *Myh7* sind in Fbin-TG Tieren (N= 6) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (N= 7) signifikant hochreguliert. *Rcan1.4*, ein Calcineurin-abhängiger Marker, ist leicht hochreguliert. (Mittelwert \pm SEM; Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student t-Tests ermittelt (N-fach im Bezug auf Kontroll-(WT)-Gruppe. n.s. = nicht signifikant; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.1.2.2 Charakterisierung Fbin-transgener-Mäuse im Alter von 6 Monaten

Die Auswirkungen einer kardialen Fbin-Überexpression *in vivo* wurden bisher noch in keinem transgenen Mausmodell untersucht und wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal analysiert. Um die Langzeit-Auswirkung einer kardialen Fbin-Überexpression in der Maus zu untersuchen, sollten deswegen transgene Tiere sowie ihre Wildtypgeschwistertiere bis zu einem Jahr oder länger gehalten werden. Diese Tiere sollten dann ebenfalls einer Basischarakterisierung unterzogen werden. Für diese *in vivo* Versuche wurden nur Tiere der Mauslinie mit der höchsten Fbin-Überexpression genommen, da bei der höchsten Konzentration die deutlichsten Effekte von einer Fbin-Überexpression zu erwarten waren. Die Untersuchung erfolgte echokardiographisch und morphometrisch. Interessanterweise verstarben alle Fbin-TG-Tiere im 8ten Lebensmonat, während die WT-Geschwistertiere weiterlebten (Abbildung 3-8). Aus diesem Grund wurde die weitere *in vivo* Charakterisierung der Mauslinie mit 6 Monaten alten Tieren durchgeführt.

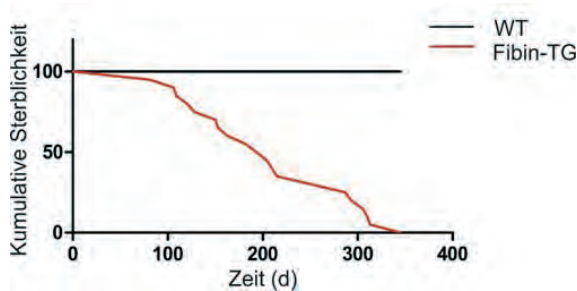


Abbildung 3-8: Vergleich der Sterblichkeitsrate der Fibrin-TG-Mäuse und WT-Geschwistertiere

Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve (siehe Material u. Methoden 2.2.4) von Fibrin-TG-Tieren mit der höchsten Fibrin-Überexpression (N= 21) im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren (N= 12). Die durchschnittliche Lebenserwartung der Fibrin-TG-Tiere liegt bei 305 Tagen. (Das Signifikanzniveau ($p < 0,001$) wurde mittels Log-rank (Mantel-Cox)-Test ermittelt. Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Zur Analyse wurden die echokardiographischen und morphometrischen Parameter von 6 Monate alten männlichen transgenen-Tieren (N= 6) aus der Linie mit der höchsten Fibrin-Überexpression und dessen gleichaltrigen WT-Geschwistern (N = 7) erhoben und danach verglichen. Es wurden die gleichen Parameter wie bei den 8 Wochen alten Tieren ermittelt (siehe Material u. Methoden 2.2.3.4).

3.1.2.2.1 Echokardiographische Untersuchung

Zu Beginn wurden die 6 Monate alten Fibrin-TG-Mäuse sowie die WT-Geschwistertiere des gleichen Alters echokardiographisch untersucht, um auch hier die Myokardfunktion des Herzes beurteilen zu können (Tabelle 3-3, siehe Material u. Methoden 2.2.3.4).

Tabelle 3-3: Echokardiographische Parameter von 6 Monate alten Fibin-TG-Mäusen

	♂ WT N=7	♂ Fibin-TG N=5-6	Signifikanzniveau
Alter [d]	200,6±0,5	193,6±3,15	n.s.
Herzfrequenz [bpm]	439,1±6,5	357,5±5,7	p=0,047
FS [%]	36,0±3,6	15,0±1,6	p<0,001
EF [%]	59,8±2,7	30,5±1,3	p<0,001
IVS,syst. [mm]	1,0±0,4	1,1±0,7	n.s.
IVS,diast. [mm]	0,7±0,4	0,7±0,4	n.s.
LVID,syst. [mm]	3,6±0,5	3,9±0,8	n.s.
LVID,diast. [mm]	4,3±0,6	4,9±0,8	p=0,04
LVPW,syst. [mm]	0,9±0,3	1,2±0,5	n.s.
LVPW,diast. [mm]	0,8±0,3	0,8±0,6	n.s.

Das Signifikanzniveau wurde unter Verwendung des Student-t-Tests ermittelt. (n.s. = nicht signifikant; Mittelwert ± SEM; FS= *Fractional shortening*; EF= *Ejection fraction*, IVS= *Interventricular septum*; LVID= *Left ventricular internal diameter*; LVPW= *Left ventricular posterior Wall*; syst.= Systole, diast.= Diastole; Fibin-TG= Fibin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

In den echokardiographischen Daten war eine signifikante Verringerung in der linksventrikulären Pumpfunktion (FS) und der Auswurfraction (EF) (Abbildung 3-9 C, D) in den transgenen Tieren nachweisbar. Der linksventrikuläre diastolische Diameter (Abbildung 3-9 F) war zudem signifikant erhöht. Ebenfalls war in den Aufnahmen der parasternalen Längsachse (PSLAX) und der sternalen Kurzen Achse (SAX) des Herzes eine leichte Vergrößerung des linken Ventrikels in den Fibin-TG-Mäusen zu beobachten (Abbildung 3-9 A, B).

Die Daten deuten hierdurch auf eine Dysfunktion des linken Ventrikels in den 6 Monate alten Fibin-TG-Mäusen hin.

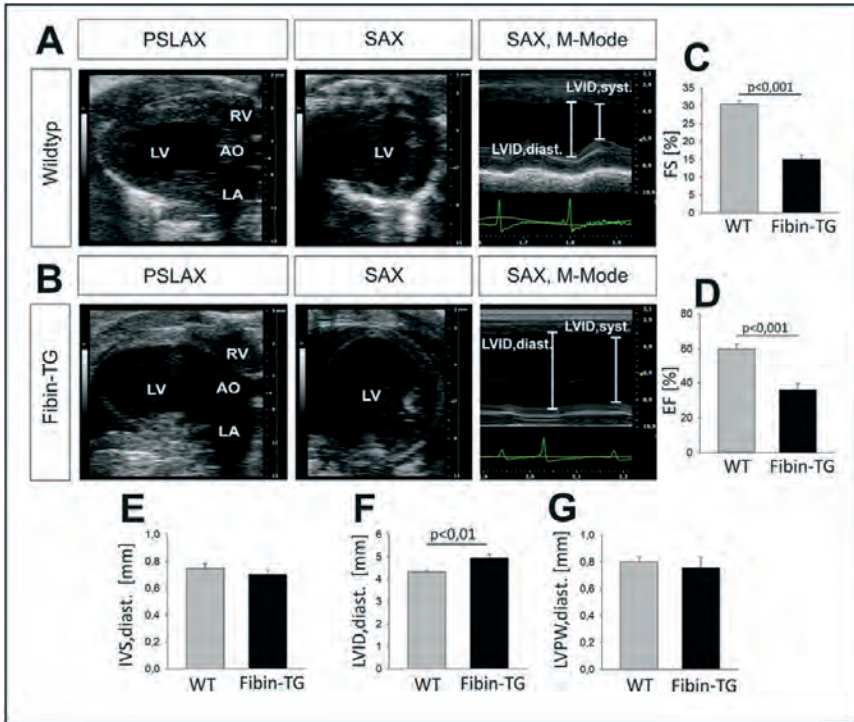


Abbildung 3-9: 6 Monate alte Fibin-TG-Mäuse zeigen eine reduzierte Herzfunktion

A, B, zeigen echokardiographische Aufnahmen der Herzen von 6 Monaten alten Fibin-TG-Mäusen (N= 6), im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren (N= 7). Während der linke Ventrikel (LV) der Wildtyp-Mäuse nach 6 Monaten keine Auffälligkeiten aufweist zeigt sich das linke Ventrikelvolumen der Fibin-TG-Tiere vergrößert (B). Die Fibin-TG-Mäuse zeigen außerdem eine reduzierte FS (C) sowie systolische EF (D). Der LVID in der Diastole ist im Vergleich zu den WT-Tieren in den Fibin-TG-Mäusen signifikant erhöht (F). Die linksventrikuläre posteriore Wandstärke (G) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen. (Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-t-Tests ermittelt. PSLAX= parasternale Längsachse; SAX= Parasternale Kurzachse; LV= Linker Ventrikel; RV= Rechter Ventrikel; LA= Linkes Atrium; AO= Aorta; FS= Fractional shortening; EF= Ejection fraction; IVS,diast.= Interventricular Septum, diastole LVID,diast.= Left Ventricular internal diameter, diastole; LVPW,diast.= Left ventricular posterior wall, Diastole; Fibin-TG= Fibin-transgene-Mäuse; WT=Wildtyp-Mäuse).

3.1.2.2.2 Morphometrische Untersuchung

Auf dem ersten Blick waren im Gegensatz zur echokardiographischen Untersuchung in den morphometrischen Daten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fibrin-TG-Tieren und den WT-Mäusen sichtbar. Es wurden die gleichen Parameter wie von den 8 Wochen alten Tieren ermittelt.

Tabelle 3-4: Morphometrische Parameter von 6 Monate alten Fibrin-TG-Tieren

	♂ WT N=6	♂ Fibrin-TG N=6
Alter [d]	200,6±0,5	193,6±3,15
KG [g]	30,4±1,1	29,3±1,1
HG [mg]	128,3±3,8	120,6±10,8
LVG [mg]	105,9±3,1	98,4±6,2
Tibiallänge [mm]	17,1±0,2	16,9±0,2
HG/KG [mg/g]	4,5±0,3	5,4±0,5
LVG/KG [mg/g]	3,5±0,1	3,3±0,5
HG/Tibia Länge [mg/g]	8,0±0,2	9,1±0,5
LVG/Tibia Länge [mg/g]	6,2±0,2	5,0±0,9
Lungengewicht [mg]	153,4±3,3	177,7±11,1

Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-t-Tests ermittelt. (Mittelwert±SEM; HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Das Resultat zeigte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung in den Quotienten HG/KG (Abbildung 3-10 A) und HG/Tibia (Abbildung 3-10 C) in den 6 Monate alten transgenen-Tieren. Ein signifikanter Unterschied konnte beim Quotienten aus Lungengewicht zu Tibiallänge festgestellt werden. (Abbildung 3-10 D).

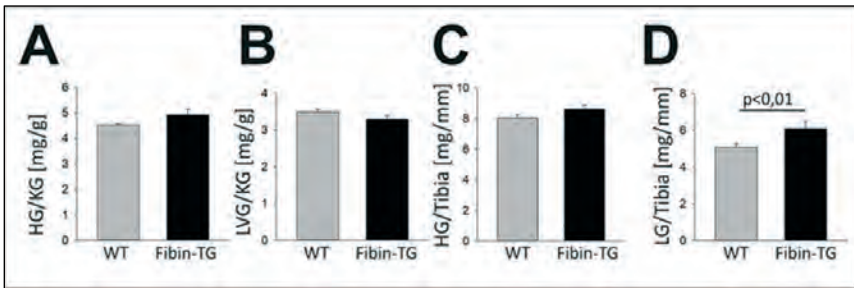


Abbildung 3-10: Analyse morphometrischer Parameter von 6 Monate alten Fbin-TG-Mäusen

A-D, Analyse morphometrischer Daten von 6 Monate alten Fbin-TG-Mäusen (Fbin-TG: N= 6) und deren Wildtyp-Geschwistern (WT: N= 7). Die Untersuchung der Parameter ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Fbin-TG-Tieren und WT-Mäusen in Bezug auf einen erhöhten Quotienten aus Lungengewicht und Tibialänge (D). In den anderen Parametern konnten Tendenzen zu einem erhöhten Quotienten aus Herz- und Körpergewicht (HG/KG) bei den Fbin-TG-Tieren beobachtet werden. (Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-t-Tests ermittelt. (n.s. = nicht signifikant; Mittelwert \pm SEM; HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; LG=Lungengewicht; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.1.2.2.3 Molekularbiologische Untersuchung

Auch in den gealterten Tieren wurde eine molekularbiologische Untersuchung des Herzwebes durchgeführt. Wie in den 8 Wochen alten Fbin-TG-Tieren zeigte sich eine erhöhte Expression der hypertrophen Marker-Gene *Nppa* ($9,5 \pm 0,3$ -fach), *Nppb* ($6,71 \pm 0,4$ -fach) und *Myh7* ($26,7 \pm 2,4$ -fach) Zusätzlich wurde auch hier die Hochregulierung des Calcineurin-abhängigen Markers *Rcan1.4* ($9,9 \pm 0,5$ -fach) beobachtet (Abbildung 3-11).

Wie schon in den 8 Wochen alten Tieren zeigten sich hoch regulierte hypertrophe Marker-Gene, was für ein Herzleiden sprechen könnte.

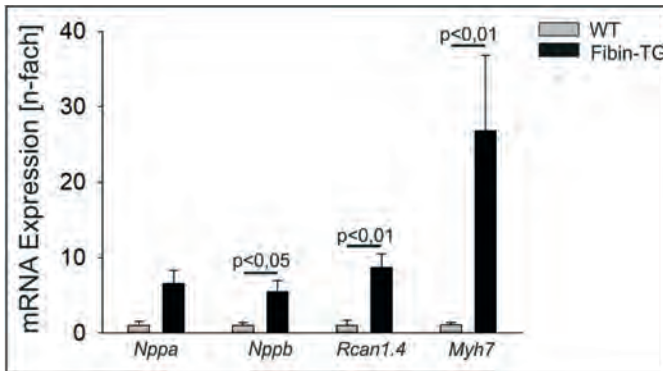


Abbildung 3-11: Erhöhte Expression von hypertrophen Marker-Genen in 6 Monate alten Fibin-TG-Mäusen

Im Vergleich zur Kontrolle, 6 Monate alten Wildtyp-Mäusen (N= 6), zeigt sich in den gleich alten Fibin-TG-Tieren (N=5) eine signifikante erhöhte Expression der Marker-Gene der Hypertrophie *Nppb* und *Myh7* sowie von *Rcan1.4* (die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-t-Tests ermittelt, N-fach im Bezug auf Kontroll-(WT)-Gruppe. (n.s. = nicht signifikant; Mittelwert \pm SEM, Fibin-TG= Fibin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Im Gegensatz zu den 8 Wochen alten Fibin-TG-Tieren ließ sich in den 6 Monate alten Fibin-TG-Tieren eine gestörte Herzfunktion nachweisen, was auch die frühe Sterblichkeit der Tiere erklären könnte.

3.1.3 Einfluss der Fibin-Überexpression im Herz in Modellen kardialer Hypertrophie

Dieser protektive Effekt von Fibin sollte nun an der generierten Fibin-TG-Mauslinie *in vivo* überprüft werden.

Um den größtmöglichen Effekt von Fibin zu messen, wurde die Mauslinie mit der am höchsten kardialen Fibin-Überexpression in zwei verschiedenen Hypertrophie-Mausmodellen getestet:

- Die induzierte Herzhypertrophie durch eine biomechanische Stimulation bedingt durch eine Konstriktion der Aorta transversa (TAC) mit Steigerung der Nachlast und durch

- die Kreuzung der Fbin-TG-Linie mit der kardial konstitutiv Calcineurin überexprimierenden Mauslinie (CnA-TG), die einen genetisch bedingten, kardialen hypertrophen Phänotyp zeigt.

Die Hypothese ist, dass unter beiden Bedingungen Fbin kardioprotektiv wirkt. Bisher wurde weder in den echokardiographischen noch in den morphometrischen Parametern Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und Wildtypgeschwistern oder zwischen den Geschlechtern in den transgenen Tieren festgestellt. Um die Standardisierung der Versuche zu erhöhen, wurden die folgenden Versuche nur mit männlichen Tieren der höchsten Fbin-Expression durchgeführt.

3.1.3.1 Untersuchung von Fbin-TG-Tieren im TAC-Modell

Die operative Konstriktion der Aorta transversa (TAC) bei der Maus ist ein häufig verwendetes experimentelles Modell für eine durch Nachlasterhöhung induzierte Herzhypertrophie. Sie führt zunächst zu einer kompensierenden Hypertrophie des Herzens, welche durch Vergrößerung des Myokards mit einer vorübergehenden Verbesserung der Herzkontraktilität einhergeht. Eine lang andauernde hämodynamische Überlastung führt jedoch zu einer Herzkammererweiterung und einer einhergehenden Herzinsuffizienz (de Almeida et al., 2010). Um den Einfluss einer Fbin-Überexpression im Herzen während einer druckinduzierten Hypertrophie zu untersuchen, wurden 8 männliche Fbin-TG-Mäuse und als Kontrolle 7 WT-Geschwistertiere der TAC-Operation unterzogen. Zur Überprüfung der TAC-Operation wurden zwei weitere Versuchsgruppen bestehend aus Fbin-TG-Mäusen und deren WT-Geschwistertieren einer Schein-Operation (Sham) unterzogen (Fbin-TG, N= 6 und WT, N= 5). Diese Versuchsgruppen wurden 2 Wochen nach dem Eingriff auf die Funktion des linken Ventrikels mittels Echokardiographie untersucht und anschließend die morphometrischen Parameter der Tiere nach der Euthanasie erfasst (siehe Methoden 2.2.3.3., 2.2.3.4, 2.2.3.5)

3.1.3.1.1 Echokardiographische Untersuchung

Jedes Tier der 4 Versuchsgruppen wurde echokardiographisch auf die linke Ventrikel Funktion hin untersucht. Durch diese nicht-invasive Untersuchung konnte die Kompensationsfähigkeit des Herzens ermittelt und eine erfolgreiche erzeugte Hypertrophie in den TAC-operierten-Tieren bestätigt werden (siehe Methoden 2.2.3.4).

Tabelle 3-5: Echokardiographische Parameter von Fbin-TG Mäusen und Kontrolltieren 14 Tage nach TAC- oder Scheinoperation

	WT-Sham N=5	Fbin-TG- Sham N=6	WT-TAC N=7	Fbin-TG- TAC N=8	TAC-WT v.s. TAC-TG	TAC-WT v.s. Sham- WT	TAC-TG v.s. Sham-TG	Sham-WT v.s. Sham- TG
Alter [d]	73,8±1,5	74±2,0	75,7±1,5	76,5±1,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Herzfrequenz [bpm]	390,3±5,3	369,8±4,2	388,3±5,3	376,2±4,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FS [%]	32,4±1,3	30,9±2,2	18,9±1,8	15,6±1,8	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
EF [%]	64,9±2,7	63,1±1,4	42,1±2,9	35,4±2,9	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
IVS,syst. [mm]	1,1±0,4	1,3±0,5	1,1±0,5	1,2±0,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IVS,diast. [mm]	0,8±0,3	0,9±0,5	0,9±0,4	0,9±0,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVID,syst. [mm]	3,2±0,5	3,4±0,6	3,8±0,6	4,1±0,8	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.
LVID,diast. [mm]	4,3±0,5	4,3±0,5	4,5±0,4	4,7±0,6	n.s.	n.s.	p=0,04	n.s.
LVPW,syst. [mm]	1,1±0,3	1,1±0,3	1,1±0,4	1,1±0,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVPW,diast. [mm]	0,9±0,2	0,9±0,4	0,9±0,4	0,9±0,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way-ANOVA-Tests gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. (Mittelwert ± SEM; n.s. = nicht signifikant; FS= *Fractional shortening*; EF= *Ejection fraction*, IVS= *Interventricular Septum*; LVID= *Left Ventricular internal diameter*; LVPW= *Left ventricular posterior wall*; syst.= Systole, diast.= Diastole; TAC= transverse Aorten Konstriktion; Sham= Scheinoperation; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Die 2 Wochen nach dem Eingriff erfolgte echokardiographische Untersuchung ergab im Gegensatz zu den Erwartungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den TAC- operierten Fbin-TG-Mäusen und der TAC-operierten WT-Kontrollgruppe. Die Aufnahmen in der parasternalen-Längs-, der (PSLAX) und in der parasternalen-Querstellung (SAX) zeigten bei beiden Versuchsgruppen einen ähnlich stark vergrößerten linken Ventrikel verglichen mit der jeweiligen Scheinoperierten-Gruppe (Abbildung 3-12 A, B). Zudem zeigte die Analyse der linken Ventrikelfunktion, erhoben durch die Parameter FS (Abbildung 3-12 C) und EF (Abbildung 3-12 D) eine gleichermaßen reduzierte Pumpleistung in beiden TAC-operierten Gruppen. Einen signifikanten Unterschied ergab die Messung des LVID während der Diastole. Dieser Wert war in den TAC-operierten Fbin-TG-Tieren im Vergleich zu den Fbin-scheinoperierten Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 3-12 E).

Die beobachtete reduzierte Pumpleistung in beiden TAC-Gruppen ließ eine linksventrikuläre Dysfunktion in WT-Mäusen und ebenso in den Fbin-TG-Tieren gleichermaßen vermuten.

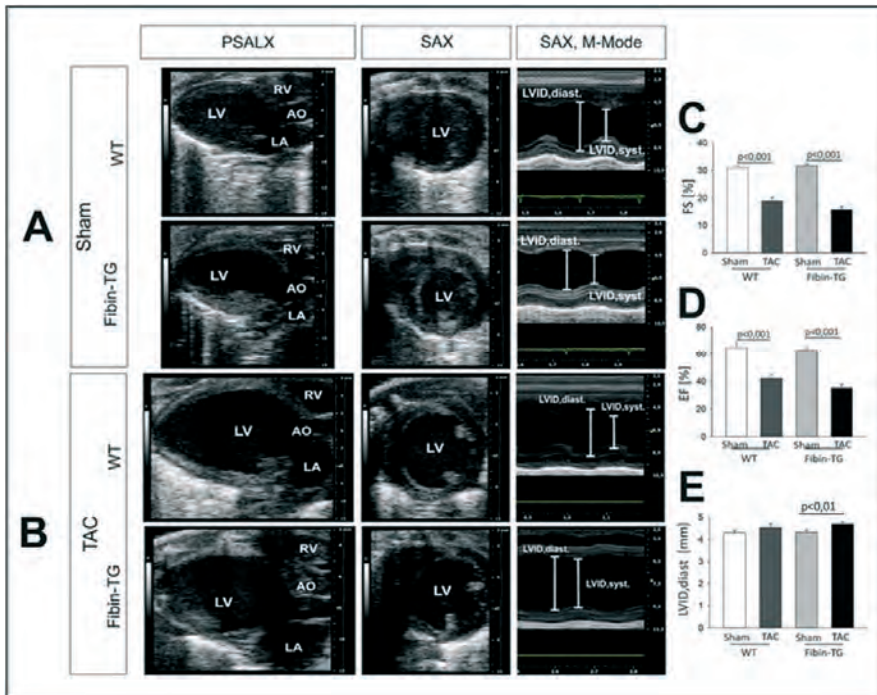


Abbildung 3-12 Nach TAC-Operation entwickeln WT-, sowie Fibrin-TG-Mäuse eine Dysfunktion des linken Ventrikels

A, B, Darstellung echokardiographischer Aufnahmen von jeweils einer Maus der Versuchsgruppen der TAC-operierten Mäuse (WT, N= 7; Fibrin-TG, N= 8) und der scheinoperierten Tiere (WT, N= 5; Fibrin-TG, N= 6). Die Parameter der linken Ventrikelfunktion FS und EF sind in den TAC-operierten WT- und Fibrin-TG-Mäusen im Vergleich zu den scheinoperierten Versuchsgruppen signifikant reduziert. Auch zeigen die TAC-operierten WT-Tiere einen tendenziell und die TAC-operierten Fibrin-TG-Mäuse sogar einen signifikant vergrößerten LVID während der Diastole. Zwischen den TAC-operierten Versuchsgruppen ist somit kein signifikanter Unterschied feststellbar.

(Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. PSLAX= parasternale Längsachse; SAX= Parasternale Kurzachse; LV= Linker Ventrikel; RV= Rechter Ventrikel; LA= Linkes Atrium; AO= Aorta; FS= Fractional shortening; EF= Ejection fraction; IVSdiast.= Interventricular Septum, diastole LVIDd= Left Ventricular internal diameter, diastole; LVPWdiast.= Left ventricular posterior wall, Diastole; TAC= transverse Aorten Konstriktion; Sham= Scheinoperation; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.1.3.1.2 Morphometrische Untersuchung

Anschließend an die echokardiographische Untersuchung wurden die morphometrischen Parameter der Versuchsgruppen erfasst (siehe Methoden 2.2.3.5)

Tabelle 3-6: Morphometrische Parameter von Fibrin-TG-Tieren 14 Tage nach TAC-oder Scheinoperation

	WT Sham N=5	Fibrin-TG Sham N=6	WT TAC N=7	Fibrin-TG TAC N=8	TAC-WT v.s. TAC- TG	TAC-WT v.s. Sham- WT	TAC-TG v.s. Sham TG	Sham-WT v.s. Sham- TG
Alter [d]	73,8±1,5	74±2,0	75,7±1,5	76,5±1,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
KG [g]	25,1±0,8	24,06±0,9	22,6±1,6	20,6±1,6	n.s.	n.s.	p<0,001	n.s.
HG [mg]	115±2,9	116,7±2,7	146,8±3,5	174,1±3,3	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.
LVG [mg]	89,7±2,5	84,6±1,3	116,8±3,5	110,9±2,6	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.
Tibialänge [mm]	16,6±0,3	16,2±0,4	16±0,8	16,2±0,7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HG/KG [mg/g]	4,6±0,6	4,9±0,6	6,6±1,1	8,6±1,1	p<0,001	p=0,002	p<0,001	n.s.
LVG/KG [mg/g]	3,6±0,6	3,5±0,3	5,3±0,9	5,5±0,9	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.
HG/Tibia Länge [mg/g]	6,9±0,7	7,2±0,7	9,2±0,7	10,7±0,8	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
LVG/Tibia Länge [mg/g]	5,4±0,6	5,2±0,4	7,3±0,8	6,8±0,7	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.
Lungengewicht [mg]	136,1±2,2	135,1±4,3	194,7±9,5	282,0±9,8	p<0,001	n.s.	p<0,001	n.s.

Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. (n.s. = nicht signifikant; Mittelwert ± SEM; HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; TAC= transverse Aorten Konstriktion; Sham= Scheinoperation; WT= Wildtyp-Tiere; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Tiere).

In der Analyse aus den morphometrischen Parametern HG und LVG unterschieden sich beide TAC-operierten Gruppen mit signifikant erhöhten Werten zu ihren jeweiligen scheinoperierten Kontroll-Versuchsgruppen (Tabelle 3-5 und Abbildung 3-12 A, B). So wiesen beide TAC-operierten Gruppen gleichermaßen signifikant erhöhte Quotienten aus HG/KG und LVG/KG auf, was auf eine myokardiale Hypertrophie hindeutet. Zusätzlich wurde in den TAC-operierten Fibrin-TG-Mäusen ein massiv vergrößertes Verhältnis von HG zur Tibialänge festgestellt (Abbildung 3-12 C), was die Annahme einer myokardialen Hypertrophie unterstützt. Das im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich erhöhte Lungengewicht in den Fibrin-TG-Tieren könnte auf ein mit einer Hypertrophie einhergehendes Lungenödem hinweisen (Tabelle 3-5). Aufgrund gestörter Starling-Kräfte und ihrer Wirkung auf die Alveolar-Kapillar-Schranke in den Venen korrelieren akute Lungenödeme oft mit einer kardialen Hypertrophie. Der Blutrückstau aus dem linken Vorhof in die Lunge sorgt für einen

Flüssigkeitsaustritt ins umliegende Gewebe, was zu einer Bildung von Ödemen führt (Chioncel et al., 2015). Die Lunge wie auch der Körper werden schwerer.

Die oben beschriebenen Unterschiede zwischen den beiden TAC-Gruppen in der Morphologie könnten auch wie die Ergebnisse der Echokardiographie auf eine Herzdisfunktion hinweisen.

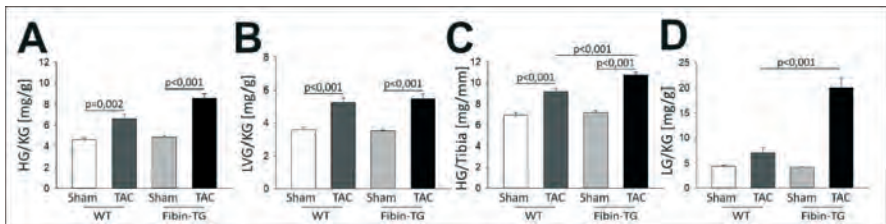


Abbildung 3-13: TAC-operierte Fbin-TG-Mäuse zeigen ein erhöhtes Herz und Lungengewicht

A-D, Vergleich der aus den morphometrischen Parametern ermittelten Quotienten der Versuchsgruppen der TAC-operierten-Tiere (WT, N= 7; Fbin-TG, N= 8) und der scheinoperierten Mäuse (WT, N= 5; Fbin-TG, N= 6). Durch die TAC-Operation entsteht eine signifikante Steigerung in den Verhältnissen HG/KG (A) und LVG/KG (B) in beiden TAC-operierten Gruppen. In dem Quotienten HG/Tibia (C) und LG/KG (D) sind die höchsten Werte in den TAC-operierten Fbin-TG-Tieren zu verzeichnen, die sich zu den anderen Versuchsgruppen signifikant unterscheiden.

(Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Tests gefolgt von Student-Newman-Keul Post-hoc-Tests ermittelt. HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; LG=Lungengewicht; TAC= transverse Aorten Konstriktion; Sham= Scheinoperation; WT= Wildtyp-Tiere; Fbin-TG= Fbin-transgene-Tiere).

In der Zelloberflächenbestimmung war bei den TAC-operierten WT-Tieren im Vergleich zu den scheinoperierten WT-Tieren eine signifikante Oberflächenvergrößerung der Kardiomyozyten und damit eine Hypertrophie festzustellen. Interessanterweise waren keine Unterschiede zwischen den Fbin-TG-Versuchsgruppen (TAC und Sham) untereinander feststellbar. Beide Gruppen zeigten wie auch in der Basis-Analyse, eine signifikant geringere Kardiomyozytenoberflächengröße im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abbildung 3-14 B). So waren in den TAC-operierten Fbin-TG-Mäusen eine Zellenoberflächenvergrößerung bzw. eine durch die TAC induzierte Hypertrophie der Zellen nicht festzustellen. Wie auch in der Basischarakterisierung wurden durch den Lektin-Farbstoff neben der Zellmembran

undefinierte Ablagerungen im transgenen Herzgewebe angefärbt (weiße Pfeile, Abbildung 3-14), die bei den WT-Tieren nicht zu finden waren.

Diese Beobachtung in den TAC operierten Fibin-TG-Tieren entsprach unseren durch *in vitro* Versuche postulierten Erwartungen. Jedoch sollte dies auch mit einer Verbesserung der Herzfunktion einhergehen, die aber nicht festzustellen war. Wir vermuteten eine Beteiligung der undefinierten Ablagerungen in den Zellen für den pathologischen Phänotyp.

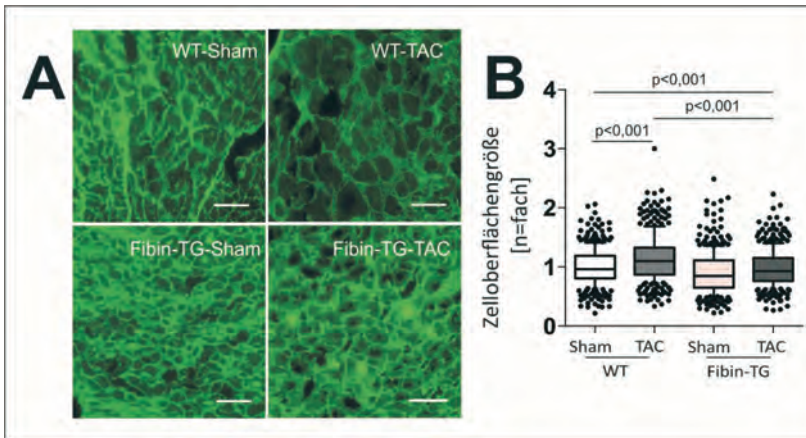


Abbildung 3-14: Die Zelloberfläche in TAC-operierten Fibin-TG-Mäusen ist geringer als in TAC-operierten WT-Tieren

A, Darstellung der durch Lektin angefärbten Schnitte des murinen Herzgewebes der verschiedenen Versuchsgruppen: Scheinoperierte, WT-Tiere (N= 5), TAC-operierte WT-Tiere (N= 5), scheineroperierte Fibin-TG-Tiere (N= 5) und TAC-operierte (N= 5) Fibin-TG-Tiere (N= 5) (Maßstabsbalken= 50 μ m). B, In den TAC-operierten Wildtyp-Tieren zeigt sich eine signifikante Vergrößerung der der Kardiomyozytenoberflächen im Vergleich zu ihrer Kontroll-Versuchsgruppe, den scheineroperierten WT-Mäusen. Verglichen mit dem Wildtyp-Tieren weisen die scheineroperierten Fibin-TG-Mäuse, wie auch schon in der Basis-Analyse der 8 Wochen alten Tiere, durchschnittlich eine signifikant kleinere Zelloberflächenengröße auf. Allerdings zeigt die Zelloberflächenbestimmung der TAC-operierten Fibin-TG-Tiere ein ähnliches Resultat, wie in den scheineroperierten Fibin-TG-Tieren, nämlich ein durchschnittlich kleinerer Wert als die scheineroperierten WT-Mäuse. (Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Tests gefolgt von Student-Newman-Keul Post-hoc-Tests ermittelt. TAC= transverse Aorten Konstriktion; Sham= Scheinoperation; Fibin-TG= Fibin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.1.3.1.3 Molekularbiologische Untersuchung

Auf molekularer Ebene waren die Auswirkungen der künstlich herbeigeführten Aortenstenose ebenfalls sichtbar (Abbildung 3-15). Die schon in der Basis-Analyse untersuchten hypertrophen Marker-Gene waren in den TAC-operierten WT-Tieren verglichen mit den scheinoperierten, wie erwartet, hochreguliert (*Nppa*: $11,3 \pm 2,0$ -fach; *Nppb*: $3,3 \pm 1,0$ -fach, *Myh7*: $5,8 \pm 1,0$ -fach). Entgegen den Erwartungen wurde in den TAC-operierten Fibin-TG-Mäusen ebenfalls eine stark erhöhte Expression der Gene *Nppa* ($14,4 \pm 2,6$ -fach), *Nppb* ($3,2 \pm 1,4$ -fach) und *Myh7* ($7,5 \pm 1,5$ -fach) beobachtet. Darüber hinaus wurden in diesem Versuch sogar die höchsten Expressionen von *Nppa* ($22,6 \pm 3,2$ -fach) und *Myh7* ($22,3 \pm 2,1$ -fach) in dieser Gruppe gemessen. Die scheinoperierten Fibin-TG-Tiere zeigten, wie in der Basischarakterisierung, eine erhöhte Expression der hypertrophen Marker-Gene, verglichen mit der WT-Kontrolle. Ein signifikant erhöhter Wert von *Rcan1.4* war in den scheinoperierten Fibin-TG und in den TAC-operierten WT- und Fibin-TG-Mäusen festzustellen (Fibin-TG: $4,5 \pm 1,2$ -fach; TAC-WT: $4,3 \pm 2,1$ -fach; TAC-Fibin-TG: $4,5 \pm 1,3$ -fach).

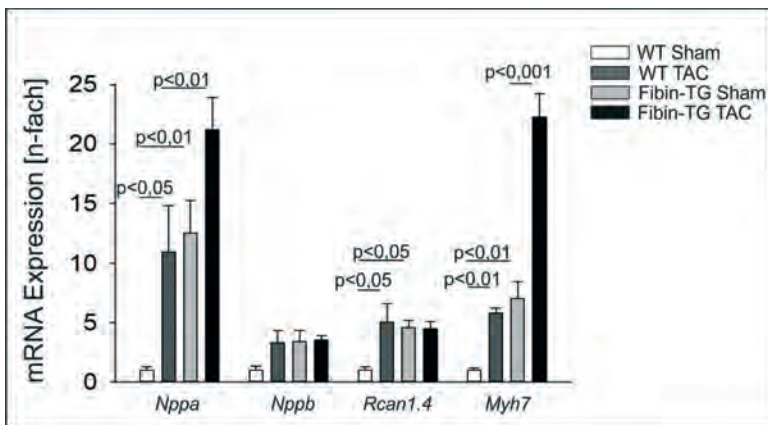


Abbildung 3-15: TAC-operierte Fibin-TG Mäusen zeigen die höchste Expression der hypertrophen Marker-Gene

Durch Konstriktion der Aorta transversa werden in den WT-Tieren die Gene des fötalen Genprogramms, *Nppa*, *Nppb*, *Myh7*, induziert. Auch in den Fibin-TG-Mäusen ist durch die TAC-Operation eine gesteigerte Expression der hypertrophen Marker-Gene *Nppa*, *Nppb* und *Myh7* zu beobachten. Zudem ist *Rcan1.4* in den TAC-operierten WT-Tieren signifikant und in den TAC-operierten Fibin-TG-Mäusen tendenziell überexprimiert. Dabei ist in der TAC-operierten transgenen

Gruppe die signifikant höchste Expression der Gene *Nppa* und *Myh7* zu verzeichnen. (Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way-ANOVA-Tests gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s.=nicht signifikant, Mittelwert± SEM; N-Fach= Bezug auf die Kontrolle= Sham-WT-Gruppe; TAC= transverse Aorten Konstriktion; Sham= Scheinoperation; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.1.3.2 Charakterisierung doppel-transgener Fbin-TG/CnA-TG-Tiere

Das nächste untersuchte hypertrophe Mausmodell war die Kreuzung von Calcineurin transgenen Mäusen mit Fbin-TG-Tieren. In unseren Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass in Calcineurin-transgenen-Tieren (CnA-TG) neben der Expression hypertropher Marker-Gene (*Nppa*, *Nppb*) auch das Fbin-Gen eine erhöhte Expression aufwies. Die kardial konstitutiv aktives Calcineurin überexprimierenden Mäuse (CnA-TG) entwickeln im Laufe ihres Lebens eine durch Calcineurin ausgelöste, stark ausgeprägte kardiale Hypertrophie. Diese führt zu einer Herzinsuffizienz, woran die Tiere schon in den ersten Lebensmonaten versterben (Molkentin et al., 1998).

Um die Funktion des *fbin*-Gens in diesen Tieren und in dem zugrundeliegenden Calcineurin-NFAT-Signalweg genauer zu untersuchen wurden weibliche Fbin-transgene-Mäuse (mit der höchsten Fbin-Überexpression) mit 12 männlichen Calcineurin-transgenen-Mäusen verpaart und deren Nachkommen in ihrer Entwicklung verglichen sowie echokardiographische und morphometrische Parameter erhoben und analysiert.

Da durch die vorangegangenen *in vitro* Experimenten eine protektive Rolle von im Fbin Calcineurin-NFAT-Signalweg vermutet wurde, vermuteten wir auch einen protektiven Effekt durch die kardiale Fbin-Überexpression in den doppelt-transgenen-Nachkommen (Fbin-TG/CnA-TG).

Jedoch war die erste Beobachtung in diesem Experiment die kurze Lebensspanne der doppelt-transgenen (Fbin-TG/CnA-TG)-Tiere, welche bereits schon in der 7ten Lebenswoche verstarben. 50% der Tiere wurden nicht älter als 66 Tage alt. Die Fbin-TG/CnA-TG-Mäuse verstarben sogar vor ihren CnA-TG-Geschwistertieren, wo 50% der Mäuse vor ihrem 90ten Lebenstag verstarben (Abbildung 3-16). Aus diesem Grund erfolgte die Basischarakterisierung der Fbin-TG/CnA-TG-Kreuzung in der 6ten Lebenswoche der gezüchteten Nachkommen.

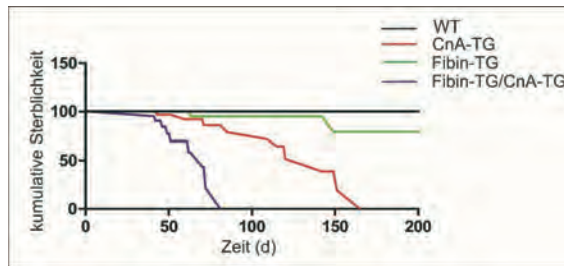


Abbildung 3-16: Doppelt-transgene-Nachkommen der Fibrin-TG/CnA-TG-Kreuzung haben eine hohe Sterblichkeitsrate

Darstellung der Sterberate durch die Kaplan-Meier-Kurve von CnA-TG (N= 9), Fibrin-TG-Mäusen (N= 19) und Fibrin-TG/CnA-TG-Nachkommen (N= 10) im Vergleich zu den WT-Mäusen (N= 11). Die doppelt-transgenen-Nachkommen weisen eine kurze Lebensspanne auf. 50% der Tiere sind bereits vor dem 70ten Lebenstag verstorben und verenden damit früher als die CnA-TG- Mäuse (durchschnittliche Lebensspanne der CnA-TG Tiere beträgt in diesem Versuch 142 Tage). (Das Signifikanzniveau wurde mittels Log-rank (Mantel-Cox)-Test ermittelt. WT= Wildtyp-Mäuse; CnA-TG= Calcineurin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG/CnA-TG= Fibrin-transgene/Calcineurin-transgene-Mäuse).

3.1.3.2.1 Echokardiographische Untersuchung

Nach 6 Wochen wurden wie in den vorangegangenen Versuchen die echokardiographischen Parameter zur Analyse der Herzfunktion in den Nachkommen der Fibrin-TG/CnA-TG-Kreuzung erhoben und die Versuchsgruppen verglichen (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Echokardiographische Parameter von 6 Wochen alten Nachkommen der Fibrin-TG/CnA-TG-Kreuzung

	WT N=8	Fibrin-TG N=7	CnA-TG N=7	Fibrin-TG/ CnA- TG N=5	FibrinCnA-TG v.s. Fibrin-TG	CnA-TG v.s. WT	CnA-TG v.s. Fibrin-TG	WT v.s. Fibrin-TG
Alter [d]	44,8±2,7	44,9±1,0	43,9±1,5	44,7±0,9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Herzfrequenz [bpm]	380,8±5,5	388,5±8,0	351,8±6,8	284,6±5,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FS [%]	31,3±2,6	30,5±1,6	22,9±1,9	9,7±1,3	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
EF [%]	64,3±1,7	63,3±1,6	47,3±1,1	23,8±1,7	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
IVS,s [mm]	1,10	1,1±0,3	1,4±0,4	0,8±0,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IVS,d [mm]	0,7±0,4	0,7±0,4	1,1±0,3	0,9±0,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVID,s [mm]	2,9±1,1	2,6±0,6	3,2±0,7	4,4±0,4	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.
LVID,d [mm]	3,5±0,7	3,7±0,6	3,9±0,7	4,7±0,6	p=0,03	n.s.	n.s.	n.s.
LVPW,s [mm]	0,9±0,4	0,9±0,4	1,3±0,4	2,7±0,2	p<0,001	p<0,001	n.s.	n.s.
LVPW,d [mm]	0,9±0,8	2,6±0,4	1,4±0,4	0,9±0,2	p<0,001	p<0,001	p=0,007	n.s.

Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. (n.s. = nicht signifikant; Mittelwert± SEM; FS= *Fractional shortening*; EF= *Ejection fraction*, IVS= *Interventricular Septum*; LVID= *Left Ventricular internal diameter*; LVPW= *Left ventricular posterior wall*; syst.= Systole, diast.= Diastole; WT= Wildtyp-Mäuse; CnA-TG= Calcineurin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG/CnA-TG= Fibrin-transgene/Calcineurin-transgene-Mäuse).

In den echokardiographischen Aufnahmen der Mäuse war ein vergrößertes linkes Ventrikelvolumen in den doppelt-transgenen-Tieren sowie in den CnA-Mäusen zu erkennen (Abbildung 3-16 C, D). Neben einem vergrößerten Volumen war in den doppelt-transgenen-Mäusen auch ein vergrößertes rechtes Ventrikelvolumen zu beobachten. Die Parameter, Auswurfraction (EF) sowie Verkürzungsfraktion (FS), welche die Funktion des linken Ventrikels darstellen, zeigten in den Fibrin-TG/CnA-TG-Mäusen signifikant schlechtere Werte, als in den CnA-TG-Tieren (Abbildung 3-17 E). Auch war der linksventrikuläre diastolische Diameter in den Fibrin-TG/CnA-TG-Mäusen signifikant vergrößert (Abbildung 3-17 G), was auch auf eine schwächere Ventrikel Funktion hindeutet. Allerdings wies die posteriore Wandstärke in den CnA-TG-Tieren den signifikant höchsten Wert der Versuchsgruppen auf (Abbildung 3-17 H). Wie in der Basischarakterisierung war in den

Versuchsgruppen auf (Abbildung 3-17 H). Wie in der Basischarakterisierung war in den Kontrollgruppen (WT- und Fibrin-TG-Mäuse) kein Unterschied feststellbar (Abbildung 3-17 A B). Die Pumpleistung der doppelt-transgenen-Tiere schien damit im Gegensatz zu der postulierten Hypothese schwächer zu sein als in ihren CnA-TG- Geschwistertieren, was auf eine schwere Herzdysfunktion hindeutet.

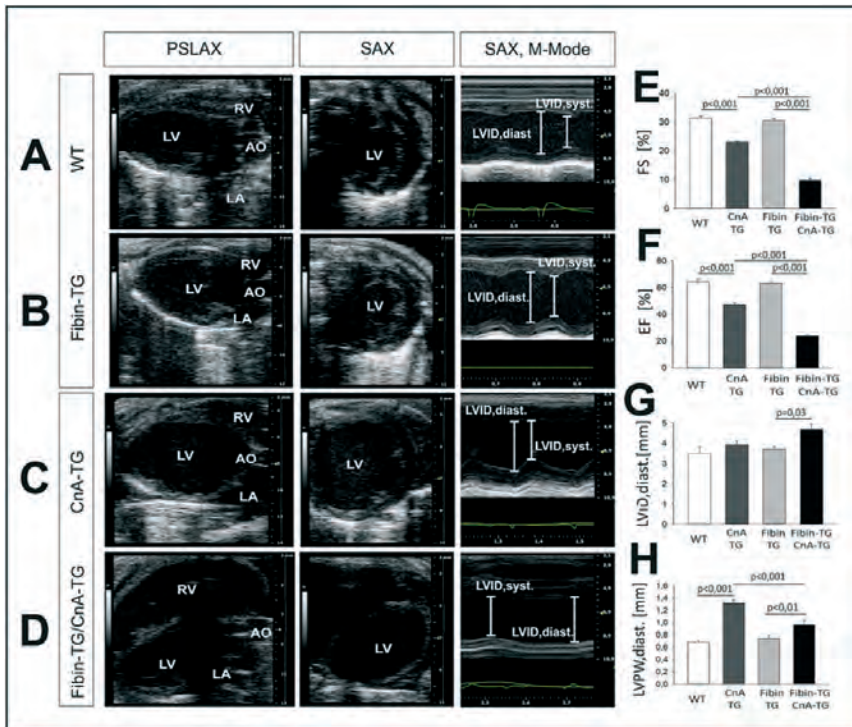


Abbildung 3-17: Fibin-TG/CnA-TG-Mäuse zeigen eine starke Herzfunktionsstörung

A- D, Darstellung echokardiographischer Aufnahmen von jeweils einer Maus der Versuchsgruppen: WT-Mäuse (WT, N= 8), Fibrin-TG-Mäuse (N= 7), CnA-TG-Mäuse (N= 7) und Fibrin-TG/CnA-TG-Mäuse (N= 5). Verglichen mit den Kontrollgruppen der WT- und Fibrin-TG-Mäuse fällt in den CnA-TG-Tieren sowie in den Fibrin-TG/CnA-TG-Mäusen ein stark vergrößerter linker Ventrikel auf. Zusätzlich ist bei den doppel-transgenen-Nachkommen auch ein vergrößerter rechter Ventrikel zu erkennen (D). E, F, EF und FS sind in den CnA-TG-Mäusen und in den Fibrin-TG/CnA-TG-Mäusen stark reduziert, wobei beide Parameter in der zuletzt genannten Versuchsgruppe im Vergleich zu den CnA-TG noch einmal

signifikant stärker verringert sind. G, Der in der Diastole gemessene LVID ist in den CnA-TG-Mäusen tendenziell und in den doppel-transgenen-Tieren signifikant vergrößert. H, Die posteriore Wandstärke ist ebenfalls in diesen beiden Versuchsgruppen erhöht, wobei die CnA-TG- Gruppe den höchsten Wert aufweist. (Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. PSLAX= parasternale Längsachse; SAX= Parasternale Kurzachse; LV= Linker Ventrikel; RV= Rechter Ventrikel; LA= Linkes Atrium; AO= Aorta; FS= *Fractional shortening*; EF= *Ejection fraction*; IVSdiast.= *Interventricular Septum, diastole* LVIDdiast.= *Left Ventricular internal diameter, diastole*; LVPWdiast.= *Left ventricular posterior wall, Diastole*; WT= Wildtyp-Mäuse; CnA-TG= Calcineurin-transgene-Mäuse; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; Fbin-TG/CnA-TG= Fbin-transgene/Calcineurin-transgene-Mäuse).

3.1.3.2.2 Morphologische Untersuchung:

In der Analyse der Fbin-TG/CnA-TG-Kreuzung waren schon während der ersten Lebenswochen einige Unterschiede in der Entwicklung unter den Nachkommen zu beobachten. So wurde bei den doppelt-transgenen-Nachkommen ein signifikant geringeres Körpergewicht als bei ihren Geschwistertieren festgestellt (Tabelle 3-8). Auch schienen sie von kleinerer Statur zu sein, was durch das anschließende Vermessen der signifikant kleineren Tibialängen bestätigt werden konnte (Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8: Morphometrische Parameter von 6 Wochen alten Nachkommen der Fibrin-TG/CnA-TG-Kreuzung

	WT N=8	Fibrin-TG N=7	CnA-TG N=7	Fibrin-TG/ CnA-TG N=5	FibrinCnA- TG v.s. Fibrin-TG	CnA-TG v.s. Fibrin- TG	CnA-TG v.s. Fibrin-TG	WT v.s. Fibrin-TG
Alter [d]	44,8±2,7	44,9±1,1	43,9±1,5	44,7±0,9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
KG [g]	19,5±1,2	19,2±1,2	19,2±1,5	15,5±0,9	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.
HG [mg]	84,9±2,8	85,3±2,8	217,8±3,4	179,3±4,4	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
LVG [mg]	64,9±2,7	62,5±2,7	139,1±3,5	94,7±4,4	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
Tibiallänge [mm]	13,6±0,8	14,7±0,7	13,0±0,7	11,9±0,7	p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.
HG/KG [mg/g]	4,3±1,5	4,5±1,5	11,3±0,7	11,5±1,0	p<0,001	p<0,001	n.s.	n.s.
LVG/KG [mg/g]	5,5±1,2	5,8±1,1	14,7±0,5	12,91,1	p<0,001	n.s.	p<0,001	n.s.
HG/Tibia Länge [mg/g]	3,3±0,6	3,3±0,4	7,3±0,4	6,1±0,9	p<0,001	n.s.	p<0,001	n.s.
LVG/Tibia Länge [mg/g]	4,3±1,3	4,3±1,7	5,9±0,9	8,4±1,3	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.
Lungengewicht [mg]	102,1±2,7	110,1±2,7	114,0±3,4	97,3±4,2	p<0,05	p<0,001	p<0,001	n.s.

Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s. = nicht signifikant; Mittelwert±SEM; HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; WT= Wildtyp-Mäuse; CnA-TG= Calcineurin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG/CnA-TG= Fibrin-transgene/Calcineurin-transgene-Mäuse).

Bei der Untersuchung der morphometrischen Parameter wiesen die Quotienten aus HG/KG und LVG/KG in den doppelt-transgenen-Tieren sowie in den CnA-TG Mäusen ähnliche Ergebnisse auf (Abbildung 3-18 A B). Beide Versuchsgruppen hatten einen höheren Quotienten-Wert als deren Kontrolltiere, was auf eine Herzhypertrophie in den doppelt-transgenen-Tieren sowie in den CnA-TG Mäusen hinweist. Allerdings zeigten die doppelt-transgenen-Tiere einen höheren Wert des HG/KG-Quotienten, wobei der LVG/Tibiallänge Quotient in den CnA-TG höher war (Abbildung 3-18 C). Dies könnte auf eine Größenzunahme des rechten Ventrikels hindeuten und spiegelt somit die Beobachtung aus der echokardiographischen Untersuchung wider. Die doppelt-transgenen-Nachkommen zeigten den höchsten Wert bei dem Verhältnis von LG zu KG, was auf einen Lungenstau verursacht durch eine linksventrikuläre Dysfunktion, hindeutet (Abbildung 3-18 D). Die Kontrollgruppen wiesen untereinander keinerlei Unterschiede in den gemessenen morphometrischen Parametern auf (Abbildung 3-18 A-D).

Wie auch in der echokardiographischen Untersuchung zeigte die Analyse der morphologischen Parameter ein signifikant vergrößertes Ventrikelvolumen der doppelt-transgenen-Tiere was auf eine linksventrikuläre Dysfunktion hindeutet.

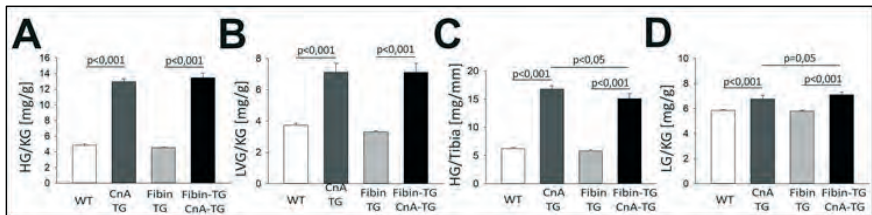


Abbildung 3-18: Fibrin-TG/CnA-TG-Mäuse zeigen ein erhöhtes Verhältnis von Herz- zu Lungengewicht

A-D, Vergleich der Quotienten von den morphometrischen Parametern der Versuchsgruppen WT-Tiere (N= 8), Fibrin-TG-Mäuse (N= 7), CnA-TG-Tiere (N= 5) und doppelt-transgene-Nachkommen (Fibrin-TG/CnA-TG, N= 5). A, Verglichen mit den WT-Tieren zeigen die CnA-TG-Mäuse, ein signifikant vergrößertes Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht, Linkes Ventrikelgewicht zu Körpergewicht (B), Herzgewicht/Tibia (C) und Lungengewicht/Körpergewicht (D). Die Quotienten HG/KG (A), LVG/KG (B), HG/Tibia (C) und LG/KG (D) sind in den Fibrin-TG/CnA-TG ebenfalls erhöht. Wobei jedoch der Quotient HG/Tibia in diesen Tieren signifikant geringer ist als in den CnA-TG-Tieren (D). (Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikelgewicht; LG=Lungengewicht; WT= Wildtyp-Mäuse; CnA-TG= Calcineurin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG/CnA-TG= Fibrin-transgene/Calcineurin-transgene-Mäuse).

Die Kardiomyozytenoberflächen wurden in Gewebeschnitten der linken Ventrikel in allen vier Gruppen vermessen. Die Zelloberflächengröße der CnA-TG Mäuse war im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant erhöht und damit eine Zellhypertrophie durch das überexprimierte Calcineurin bestätigt. Die Fibrin-TG/CnA-TG-Mäuse zeigten ein ähnliches Resultat wie die Fibrin-TG-Tiere, nämlich eine kleinere Zelloberflächengröße als die Wildtypen und die CnA-TG Tiere (Abbildung 3-19 B). In den Herzschnitten wurden auch hier mit Lektin angefärbte Ablagerungen in den Fibrin-TG Mäusen beobachtet. Auch in den Fibrin-TG/CnA-TG Tieren wurden die Ablagerungen gefunden (weiße Pfeile, Abbildung 3-19 A).

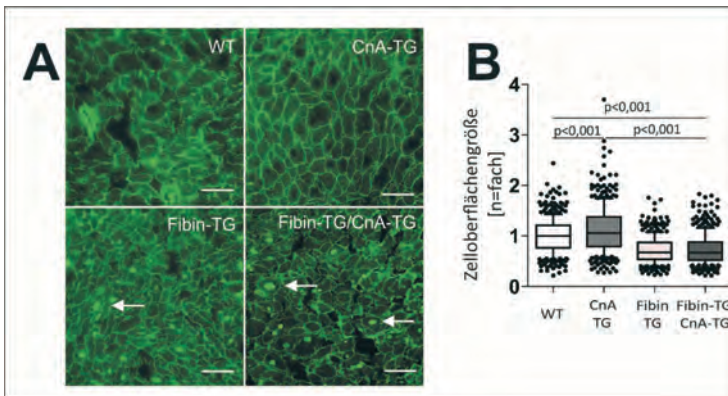


Abbildung 3-19: Nachkommen der Kreuzung Fibin-TG/CnA-TG-Linie zeigen eine geringe Zelloberflächengröße im Vergleich zu den CnA- und WT-Tieren

A, Darstellung von mit Lektin gefärbten murinen Herzgewebeschnitten der Versuchsgruppen: WT-Mäuse (N= 5), Fibin-TG-Mäuse (N= 5), CnA-TG-Mäuse (N= 5) und Fibin-TG/CnA-TG-Mäuse (N= 5). B, Die CnA-TG-Tiere zeigen eine signifikant vergrößerte Zelloberflächengröße, wie es häufig beschrieben wird. Wie in der Basischarakterisierung weisen die Kardiomyozyten der Fibin-TG-Mäuse verglichen mit den WT-Tieren eine signifikante verringerte Oberflächengröße auf. Auch die Zelloberflächengröße der doppelt-transgenen Tiere zeigt eine signifikante Verkleinerung. (Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. Maßstabsbalken= 50 μ m; WT= Wildtyp-Mäuse; CnA-TG= Calcineurin-transgene-Mäuse; Fibin-TG= Fibin-transgene-Mäuse; Fibin-TG/CnA-TG= Fibin-transgene/Calcineurin-transgene-Mäuse).

3.1.3.2.3 Molekularbiologische Untersuchung

Auf molekularer Ebene ließ sich in den CnA-TG-Tieren die erwartete Induktion der Hypertrophie-assoziierten Gene nachweisen. So waren im Vergleich zu den WT-Kontrollmäusen *Nppa* und *Nppb* in den CnA-TG Mäusen aktiviert (Abbildung 3-19). Auch der Calcineurin-spezifische Marker *Rcan1.4* war stark hochreguliert. Entgegen der Erwartungen, die durch die vorangegangenen *in vitro* Experimente gestützt wurden, fand in den doppelt-transgenen-Tieren keine Inhibierung der hypertrophen Marker-Gene durch die kardiale Fibin-Überexpression statt. Vielmehr war in diesen Tieren die höchste Expressionssteigerung von *Nppa* ($14,8 \pm 3,0$ -fach) und *Rcan1.4* ($22,4 \pm 3,3$ -fach) zu messen (Abbildung 3-20). Ein

ähnliches Bild der Überexpression von hypertrophen Marker-Genen zeigte sich auch in den Fibrin-TG-Tieren (*Nppa*: $5,7 \pm 1,7$ -fach; *Nppb*: $4,45 \pm 2,4$ -fach; *Rcan1.4*: $8,7 \pm 1,0$ -fach).

Somit zeigten die doppelt-transgenen Nachkommen der Fibrin-TG/CnA-TG-Kreuzung entgegen den Erwartungen erhöhte hypertrophe Marker-Gene im linken Herzgewebe, was auf eine kardiale Hypertrophie hindeutet.

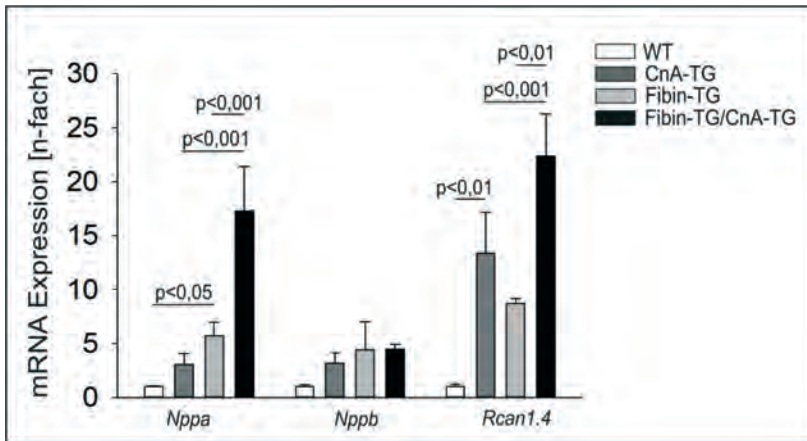


Abbildung 3-20: Erhöhte Expression hypertropher Marker-Gene in Fibrin-TG/CnA-TG-Mäusen

Im Vergleich zu der WT-Gruppe (N= 5) ist in den CnA-TG Tieren (N= 5) eine signifikante Aktivierung der Hypertrophie-Marker-Gene (*Nppa*: $3,1 \pm 0,9$ -fach; *Nppb*: $3,2 \pm 1,5$ -fach), sowie eine gesteigerte Expression des Calcineurin-spezifische Markers *Rcan1.4* (*Rcan1.4*: $13,4 \pm 3,0$ -fach) zu beobachten. Wie schon in der Basis-Analyse sind diese Gene auch in den Fibrin-TG-Mäusen (N= 5) hochreguliert. Jedoch ist in den Fibrin-TG/CnA-TG-Mäusen (N= 5) ebenfalls eine erhöhte Expression dieser Gene festzustellen. In diesen Tieren werden sogar die signifikant höchsten Expressionen der Gene *Nppa* und *Rcan1.4* gemessen. (Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA-Test gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. n.s.=nicht signifikant, Mittelwert \pm SEM; N-Fach= Bezug zu WT Mäusen. WT= Wildtyp-Mäuse; CnA-TG= Calcineurin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; Fibrin-TG/CnA-TG= Fibrin-transgene/Calcineurin-transgene-Mäuse).

Unsere Untersuchung der Fibrin-TG-Tiere in den zwei oben beschriebenen Mausmodellen der kardialen Hypertrophie zeigte somit nicht die erwartete protektive Wirkung einer spezifischen Fibrin-Überexpression im Herzgewebe. Vielmehr zeigten sie eine ähnliche (nach

der TAC-Operation) oder sogar eine schwerwiegendere (Kreuzung mit CnA-TG-Mäusen) linksventrikuläre Dysfunktion als die Kontrollgruppen in den Experimenten. Weiterhin vielen in der histologischen Untersuchung kleine, mit Lektin anfärbbare Ablagerungen im Herzgewebe bei den Fbin-TG-Tieren auf. Um einen eventuellen Zusammenhang zu überprüfen, war der nächste Schritt eine Analyse dieser Ablagerungen.

3.2 Analyse der in den Fbin-TG-Mäusen beobachteten Aggregate

3.2.1 Differenzierung unklarer Aggregate im Herzgewebe von Fbin-TG-Tieren

In der Basischarakterisierung sowie bei der Untersuchung von Fbin-Überexpression in den Hypertrophie-Modellen wurde in den Herzgewebeschnitten der Fbin-TG-Tiere durch den Lektin-Farbstoff (Lektin, WGA) neben den Zellmembranen ungleichmäßige undefinierte Ablagerungen angefärbt (Abbildung 3-21 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** B). Lektin, welches sich an Kohlenhydratstrukturen anheftet, wird zur Vermessung der Zelloberfläche genutzt (Goldstein and Hayes, 1978). In der Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin konnten diese Ablagerungen ebenfalls beobachtet werden (siehe Methoden 2.2.2.12.3, Abbildung 3-21 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** A). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um bei den Ablagerungen in der Lektinfärbung um Färbartefakte handelt.

Um den Fibrosegehalt im murinen Herzgewebe zu ermitteln, wurden zwei weitere Färbungen, zum einen die Pikro-Siriusrot-, und zum anderen die Masson-Trichome-Färbung, angewandt (Abbildung 3-21 D). Die Ablagerungen zeigten sich in der Pikro-Siriusrot-Färbung grün schimmernd, während sie in der die Masson-Trichome-Färbung in einer dunkelroten Farbe erschienen. Eine weitere Untersuchung wurde durch die Färbung mit Toluidinblau an 6 % Glutaraldehyd fixierten Gewebeschnitten durchgeführt (siehe Methoden 2.2.2.11.8, Abbildung 3-21 F). Toluidinblau färbt dabei saure Moleküle. Durch die Toluidinblau-Färbung waren einige Aggregate klein und von dunkelblauer Farbe, während andere groß und hellblau erschienen.

Die Ablagerung zeigten sich in jeder Färbung nur in den Fbin-TG-Tieren und nicht in ihren Wildtypgeschwistertieren, was auf einen Zusammenhang mit den Ablagerungen und der Fbin-Überexpression vermuten lässt. Eine Möglichkeit könnte eine Akkumulation des überexprimierten Fbin- Proteins sein.

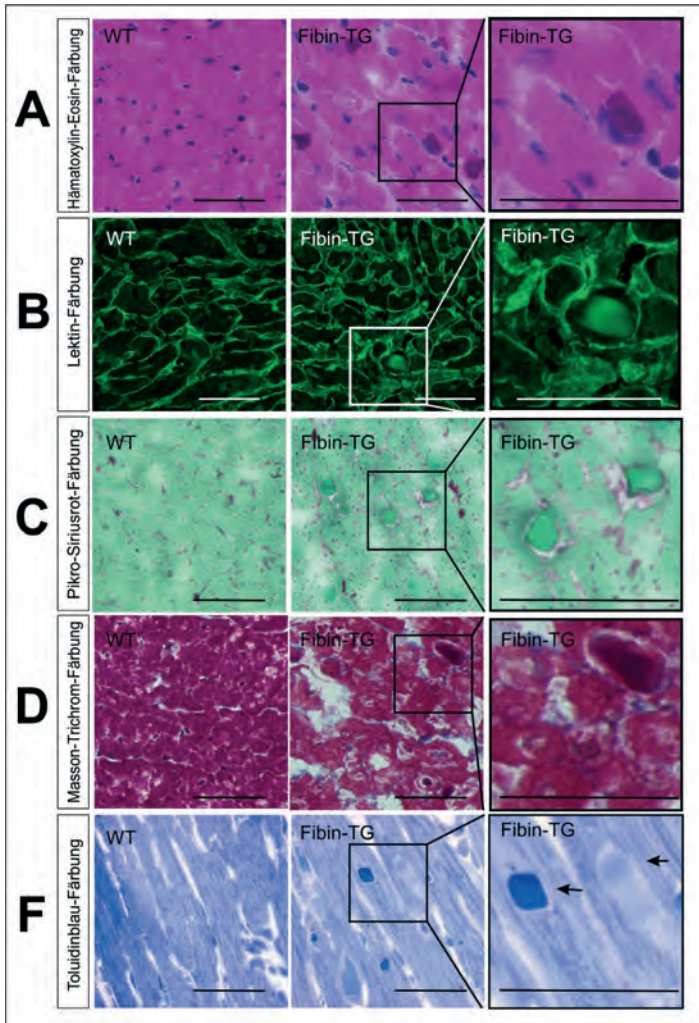


Abbildung 3-21: Darstellung von Färbungen muriner Herzschnitte von WT- und Fbin-TG-Mäusen

A-F, In den Fbin-TG-Tieren sind in einer Vielzahl von Färbungen Aggregate mit unregelmäßiger Form zu beobachten, welche in den WT-Tieren nicht zu finden sind.

A, Durch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung werden die Aggregate in den Fbin-TG-Mäusen violett bis blau angefärbt. B, Der Lektin-Farbstoff lässt die Zellmembranen und die Aggregate in grüner Farbe erscheinen. C, In der Piko-Siriusrot-Färbung waren die Aggregate grün schimmernd zu sehen. D, In der Masson-Trichrome-Färbung sind Aggregate von dunkelroter Farbe. E, Die Toluidinblau-Färbung

lässt zwei verschiedene Typen der Aggregate (hellblau und dunkelblau) erkennen (Pfeile) (Maßstabsbalken: 50 µm; WT-Wildtyp-Tiere; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Tiere).

3.2.2 Lokalisation von Fibrin an der Z-Scheibe und in Aggregaten

In den Vorarbeiten an isolierten neonatalen Ratten Kardiomyozyten konnte das Fibrin-Protein an den Z-Scheiben der Herzmuskelzellen lokalisiert werden. Dazu wurde Methode der Immunhistochemie angewandt. Um diese Lokalisation im linksventrikulären Gewebe der Mäuse zu überprüfen, wurde hier das gleiche Verfahren wie in den neonatalen Rattenkardiomyozyten durchführt. Dazu wurden, wie zur Lektin-Färbung, 5 µm dicke kryokonservierte Herzschnitte von 8 Wochen alten WT- sowie Fibrin-TG-Mäusen mit einem Fibrin-Antikörper und dem Antikörper für α -Aktinin Co-gefärbt (siehe Methoden 2.2.2.12.1). α -Aktinin ist ein bekanntes, an der Z-Scheibe lokalisiertes Protein. Die Färbung zeigte eine Co-Lokalisation beider Antikörper an der Z-Scheibe. Die Lokalisation des Fibrin-Proteins in Kardiomyozyten an der Z-Scheibe im murinen Herzgewebe von WT- sowie Fibrin-TG-Mäusen war damit bestätigt (Abbildung 3-22). Darüber hinaus wurden in den Fibrin-TG-Mäusen die auch in den anderen Färbungen festgestellten Ablagerungen beobachtet. Diese wurden durch den Fibrin-Antikörper markiert (Abbildung 3-22 Pfeil).

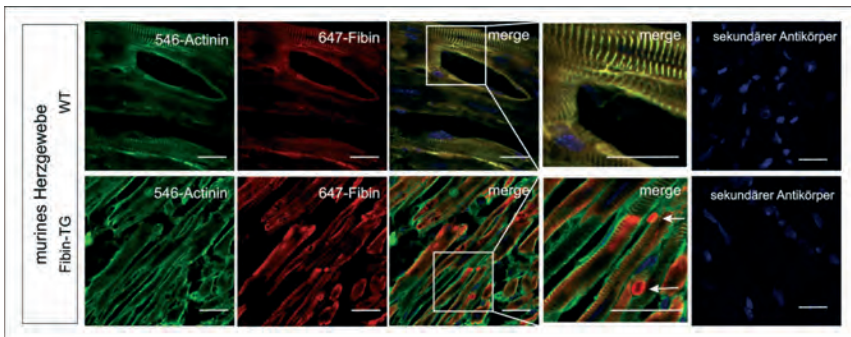


Abbildung 3-22: Im murinen Herzgewebe ist Fibrin an der Z-Scheibe lokalisiert

Darstellung von Aufnahmen des murinen Herzgewebes durch das Konfokal-Mikroskop. Durch eine Co-Färbung mit den Antikörpern gegen das Fibrin-Protein und gegen das an der Z-Scheiben lokalisierte Protein α -Aktinin kann Fibrin an der Z-Scheibe der Kardiomyozyten im murinen Herzgewebe von WT- sowie von Fibrin-TG-Mäusen lokalisiert werden. In den Fibrin-TG-Tieren sind

neben der Co-Lokalisation dieser beiden Proteine, Fibrin und, Ablagerungen unbekannter Herkunft zu erkennen. (Maßstabsbalken= 20 µm; WT-Wildtyp-Tiere; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Tiere; AK= Antikörper. Färbung mit DAPI und sekundärem Antikörper als Negativkontrolle mitgeführt).

Das zu Beginn in die Fibrin-TG-Mäuse eingebrachte *fibin*-Konstrukt beinhaltete zur Erkennung des rekombinanten Proteins eine zusätzliche FLAG-Tag-Gensequenz. Um eine Co-Lokalisation von Fibrin und dem FLAG-Tag in den transgenen-Tieren zu überprüfen, wurden Fibrin-TG-Herzschnitte mit den Antikörpern gegen den FLAG-Tag und gegen Fibrin Co-gefärbt. In dieser Färbung zeigte sich eine Co-Lokalisation beider AK in den beobachteten Ablagerungen (Abbildung 3-23).

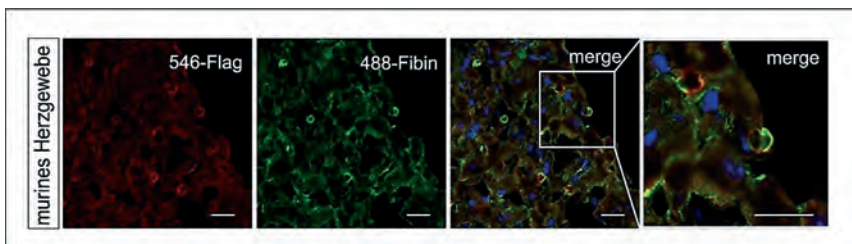


Abbildung 3-23: Co-Lokalisation von Fibrin und FLAG-Tag Antikörpern im Fibrin-TG-Herzgewebe

Darstellung von Aufnahmen des murinen Herzgewebes durch das Konfokal-Mikroskop. Der Fibrin-Antikörper zeigt mit dem FLAG-Tag-Antikörper eine Co-Lokalisation im Herzgewebe der Fibrin-transgenen-Mäuse. Diese Co-Lokalisation zeigt sich vor allem in den beobachteten Ablagerungen. Beide Antikörper sind hier sichtbar (Maßstabsbalken= 20 µm).

Durch die immunhistochemischen Färbungen konnte somit das Fibrin-Protein wie in den Ratten Kardiomyozyten auch in den Maus Kardiomyozyten an der Z-Scheibe lokalisiert werden. Zudem ließ sich auch in der Färbung mit dem Fibrin die Ablagerungen im Herzgewebe beobachten. Dies deutet auch auf eine Beteiligung des Fibrin-Proteins bei der Pathogenese hin.

3.2.3 Co-Aggregation des Fibrin-Proteins mit anderen Proteinen in den lokalisierten Aggregaten

Um die Ablagerungen und ihre Herkunft genauer definieren zu können, wurde die Färbung mit „ProteoStat“ angewandt. ProteoStat ist ein molekularer Farbstoff mit fluoreszierenden Eigenschaften. Sind akkumulierte Proteine vorhanden, bindet das ProteoStat an deren Tertiärstruktur. Somit wird es zum spezifischen Nachweis für Protein-Aggregate und aggresomartiger Einschlusskörper in Zellen genutzt (Shen et al., 2011). Die Färbung des transgenen Herzgewebes wurde mit ProteoStat zusammen mit einem Antikörper gegen Fibrin durchgeführt. In dieser Färbung unter dem Konfokal-Mikroskop zeigte sich das Anfärben der Ablagerungen durch das ProteoStat und durch den Fibrin Antikörper (Abbildung 3-24 A). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass es sich bei den Ablagerungen im Herzgewebe um akkumulierte Proteine, also um Protein-Aggregate, handelt. Jedoch wurde in dieser Färbung nicht in jedem Aggregat, welches durch ProteoStat angefärbt wurde, auch der Fibrin-Antikörper festgestellt. (Abbildung 3-24 A).

Da Kardiomyopathien durch intrazelluläre Protein-Aggregate ausgelöst werden, könnten auch die hier beobachteten Protein-Aggregate eine Rolle in der Dysfunktion der transgenen Tiere spielen. Ein Beispiel hierfür ist die Desmin-related-Kardiomyopathie. Durch eine oder mehrere Mutationen im Desmin-Gen oder in einem Desmin-assoziierten Gen wie α -B-Crystallin (CryAB), einem Chaperon, kommt es zur Störung der Faltung des Desmin-Proteins und zu dessen Akkumulation in den Herzzellen (McLendon and Robbins, 2011). Zur Überprüfung, ob die beobachteten Aggregate in den Fibrin-TG-Mäusen akkumulierte Protein-Aggregate der Proteine Desmin oder CryAB sind, wurde in einer weiteren immunhistochemischen Färbung die Antikörper gegen diese beiden jeweils mit dem Fibrin-Antikörper co-gefärbt (Abbildung 3-24 B, C).

Dabei war eine Co-Lokalisation in den Aggregaten mit den Antikörpern gegen Fibrin und Desmin nicht feststellbar (Abbildung 3-24 B). Die Co-Färbung mit den Antikörpern gegen Fibrin und CryAB zeigte jedoch etwas anderes. In den Aggregaten, in denen der Fibrin-Antikörper beobachtet wurde, konnte auch vereinzelt eine Co-Lokalisation mit dem Antikörper gegen CryAB festgestellt werden (Abbildung 3-24 C).

Eine weitere Lokalisation des Fibrin-Proteins wurde im Endoplasmatischem Retikulum (ER) beschrieben (Lakner et al., 2011). Um diese Lokalisation in den Fibrin-TG-Tieren zu

überprüfen, wurde auf einem weiteren Herzschnitt eine Färbung mit den Antikörpern gegen die Proteine Fibin und gegen das sich im ER befindende Calnexin vorgenommen. Calnexin ist ein Lektin (Glykoprotein) und zählt zu den Chaperonen (Fewell et al., 2001). In dieser Färbung wurde in den Aggregaten, in denen der Fibin-Antikörper beobachtet wurde, immer eine Co-Lokalisation mit dem Calnexin-Antikörper beobachtet werden (Abbildung 3-24 C).

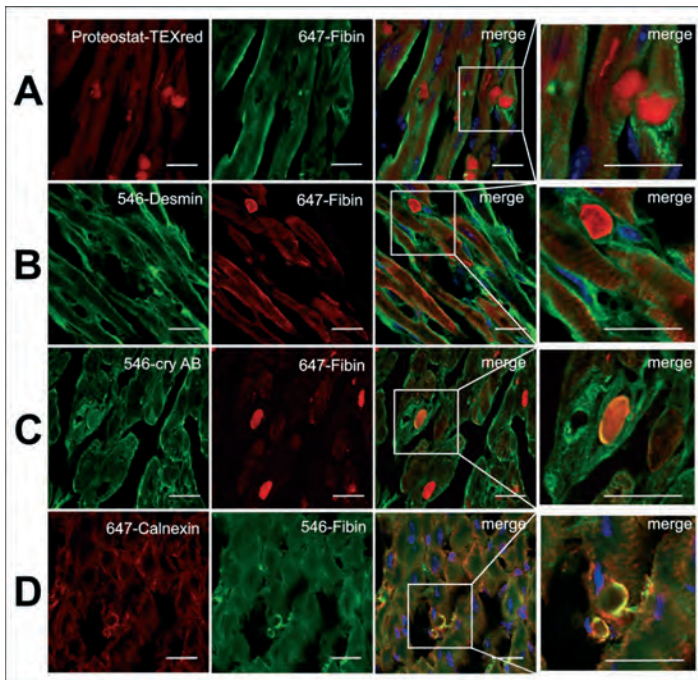


Abbildung 3-24: Co-Färbungen mit Fibin und weiteren verschiedenen Antikörpern zeigen Co-Lokalisationen in den festgestellten Aggregaten

A-D, Darstellung immunhistochemischer Färbungen mit verschiedenen Antikörpern.

A, Durch die Färbung mit einem Fibin-Antikörper und einer ProteoStat-Färbung lässt sich in dem transgenen Herzgewebe eine Co-Lokalisation beider Färbungen in den gefundenen Aggregaten beobachten. B, Eine Co-Färbung mit den Fibin- und Desmin-Antikörpern zeigt keine Co-Lokalisation und keine Lokalisation von Desmin in den Aggregaten. C, In vereinzelt Aggregaten kann man eine Co-Lokalisation von den Antikörpern der Proteine Fibin und CryAB erkennen. Eine weitere Färbung mit dem Antikörper gegen das Protein Calnexin und dem Fibin-Antikörper zeigen eine Co-Lokalisation in den Aggregaten (Maßstabsbalken= 20 µm).

Durch die Immunhistochemischen Färbungen mittels unterschiedlicher Antikörper und ProteoStat konnten die Ablagerungen in den Zellen als Proteinaggregate identifiziert werden. Darüber hinaus konnte eine Beteiligung des Fibin- Proteins und weitere Proteine bei den Aggregaten werden. Eine weitere Klärung bedarf jedoch ihrer Lokalisation.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die immunhistochemischen Analysen nur in murinen Herzgewebeschnitten der WT- und Fibin-TG-Mäuse durchgeführt. Jedoch war in diesen Untersuchungen nicht zu erkennen, ob sich die Aggregate außerhalb oder in den Kardiomyozyten befanden. Deshalb wurden Kardiomyozyten aus den adulten Fibin-TG-Mausherzen isoliert, auf Objektträgern fixiert und ebenfalls mit verschiedenen Antikörpern angefärbt (siehe Methoden 2.2.2.11.7). Wie auch im murinen Herzgewebe wurde in den isolierten murinen Herzzellen eine Co-Lokalisation des Lektin-Farbstoffs (WGA, Weizenkeim-Lektin) und den Calnexin- und Fibin-Antikörpern beobachtet. Eine weitere Beobachtung war die intrazelluläre Lokalisation der Aggregate in den Kardiomyozyten (Abbildung 3-25).

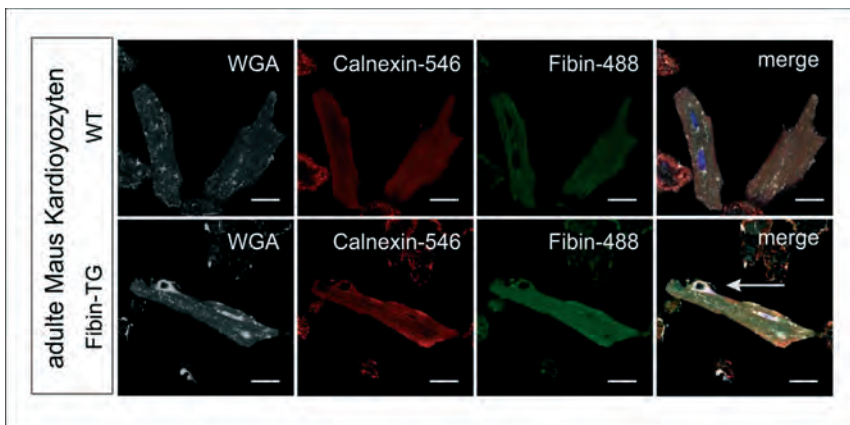


Abbildung 3-25: Analyse der intrazellulären Lokalisation von Aggregaten in isolierten Mauskardiomyozyten

Unter dem Konfokal-Mikroskop werden die isolierten adulten Mauskardiomyozyten mit WGA (Silber), sowie mit den Antikörpern der Proteine Calnexin (rot) und Fibin (grün) angefärbt. Alle drei Färbungen zeigen eine Co-Lokalisation in den Aggregaten, welche sich in den Kardiomyozyten der transgenen Tiere befinden (weißer Pfeil, Maßstabsbalken= 20 µm).

3.2.4 Analyse der Aggregate mittels Elektronenmikroskopie

Eine weitere Analyse der Aggregate wurde mittels Elektronenmikroskopie durchgeführt. Durch die viel kürzere Wellenlänge der Elektronen als die des sichtbaren Lichts kann durch das Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung (derzeit etwa 0,1 nm) erzielt werden. In der Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wurden Schnitte des linken Ventrikels von Fibrin-TG-Mäusen und deren Wildtyp-Geschwistern mit einem Elektronenmikroskop untersucht (siehe Methoden 2.2.2.11.8). Unter dem Elektronenmikroskop wurde die intrazelluläre Lokalisation der Aggregate bestätigt (Abbildung 3-26). Die Aggregate besaßen keine Membran und wiesen eine undefinierte Füllung auf. Zusätzlich waren neben den Aggregaten noch weitere kleinere Konglomerate zu erkennen (Abbildung 3-26 B).

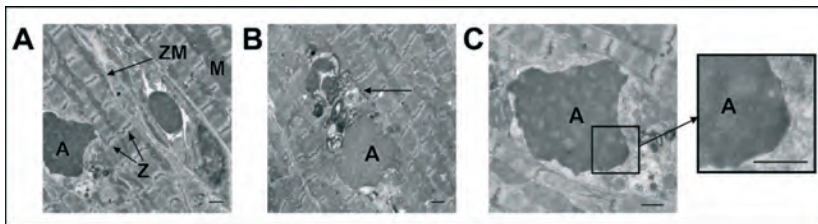


Abbildung 3-26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Herzgewebeschnitten adulter Fibrin-TG-Mäuse

A, B, C, Darstellung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen des linken Ventrikels von Fibrin-TG-Mäusen mit Fokus auf den Aggregaten. Die Aggregate sind in Fibrin-TG-Gewebeschnitten intrazellulär zu finden. Weiterhin sind die Aggregate mit einem undefinierten Inhalt gefüllt und weisen keine Membran auf. Neben den Aggregaten sind weitere kleine Gebilde (B, Pfeil) zu erkennen. (Maßstabsbalken= 1 µm; A= Aggregate; M= Mitochondrien; Z= Z-Scheibe; ZM= Zellmembran).

Die Untersuchung an isolierten Maus Kardiomyozyten sowie unter dem Elektronenmikroskop zeigten eine intrazelluläre Lage der Protein-Aggregate im Herzgewebe. Nun sollte ein potentieller Zusammenhang zwischen den Protein-Aggregaten und der kardialen Dysfunktion in den Tieren geklärt werden (nächster Abschnitt).

3.3 Analyse von ER-Stress und der *Unfolded-Protein-Response* in Fibrin-TG-Tieren

3.3.1 Expression UPR-Signalkaskaden assoziierten Proteinen in Fibin-TG-Mäusen

Durch eine Akkumulation von fehlerhaft gefalteten Proteinen im ER kann es zu einer Störung im Stoffwechsel der Zelle kommen, was bis zum Zelltod führen kann. Um sich dagegen zu schützen, reagiert die Zelle mit der *Unfolded Protein-Response* (UPR). Die UPR ist eine komplexe Reaktion im ER und aktiviert Signalkaskaden, um die durch Protein-Aggregate gestörte Homöostase der Zelle wiederherzustellen (Schroder and Kaufman, 2005). Die Theorie, es könne sich bei den bei Fibin-Überexpression gefundenen Aggregaten um eine Akkumulation von fehlerhaft gefalteten Proteinen handeln, welche eine UPR auslösen, sollte nun untersucht werden. Dabei wurde zunächst ein erhöhtes Vorkommen von Chaperonen in den transgenen Tieren untersucht. Normalerweise sorgen Chaperone für eine fehlerfreie Faltung der entstehenden Proteine und werden vermehrt produziert, sobald die UPR induziert wurde. Somit ist ein hohes Vorkommen von Chaperonen ein Indiz für einen durch Protein-Aggregate ausgelösten Stress in der Zelle, was eine UPR auslöst (siehe Einleitung 1.2.1). Per Western-Blot-Verfahren wurden die Level entsprechender Chaperone und Faltungsproteine überprüft (siehe Methoden 2.2.2.11.4). Dazu wurden Proteinlysate der linken Ventrikel von 8 Wochen alten Tieren des Fibin-transgenen Genotypus (N= 6) und von C57BL/6N Geschwistertieren (N= 7) verglichen. In den Fibin-TG-Mäusen wurde eine hohe Menge der Chaperone Calnexin, BiP und PDI (Abbildung 3-27 A, B) gemessen. Das Protein BiP kann neben seiner Funktion als Chaperon auch als ER-Stressmarker gesehen werden, da es an der Aktivierung der UPR beteiligt ist. Neben den Chaperonen sind Transmembranproteine an den Signalkaskaden der UPR beteiligt. Um eine induzierte UPR in den Tieren zu ermitteln wurden zwei dieser Signalwege, IRE1 α und PERK, ebenfalls in den 8 Wochen alten Fibin-TG-Tieren und deren Wildtyp-Geschwistertieren per Western-Blot Verfahren untersucht. In den transgenen-Tieren wurde ein hoher Spiegel des Proteins IRE1 α festgestellt (Abbildung 3-27 C, D). Anschließend wurde der PERK-Signalweg untersucht. Die Proteine PERK und CHOP, dessen Transkription durch PERK induziert wird, waren in den Fibin-TG-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren in geringeren Mengen vorhanden. Obwohl die Proteine des PERK-Signalweges einen geringen Spiegel in den Tieren aufwiesen, deutet das hohe Vorkommen von BiP und IRE1 α auf eine Aktivierung der UPR hin.

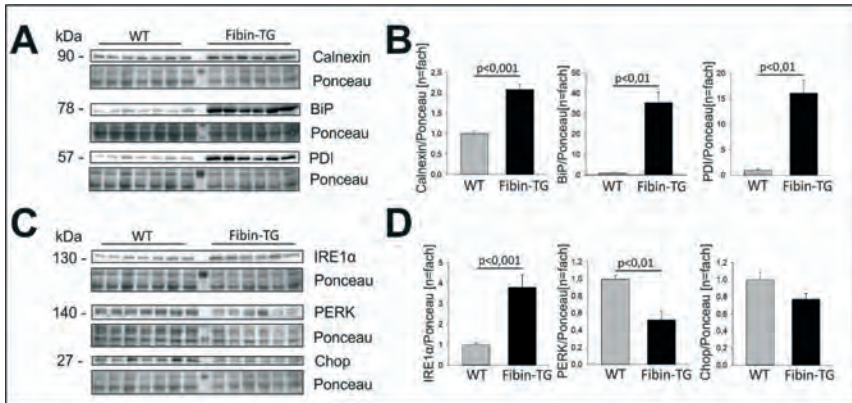


Abbildung 3-27: *Unfolded-Protein-Response* in Fibin-TG-Mäusen

A-D, Darstellung der Immunoblots (A, C) und der densitometrischen Analysen (B, D) der an der *unfolded protein response* (UPR) beteiligten Proteine. Die Proben entstammen aus den Proteinproben des linken Ventrikels der Fibin-TG-Mäuse (N=6) und dessen Wildtypgeschwistertieren (N= 6). Ponceau zeigt die Ladekontrolle. A, B zeigen eine signifikante Induktion der Proteinsynthese der Chaperone Calnexin, und BiP in Fibin-TG-Tieren (N=6). Auch das Protein PDI (ein weiteres Chaperon) ist in Fibin-TG-Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren. C, D In den Fibin-TG-Mäusen ist die Synthese des UPR-Proteins IRE1 α erhöht. Allerdings sind die Proteine PERK und CHOP in den Fibin-TG-Mäusen herunterreguliert. (Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-t-Tests ermittelt. N.s.=nicht signifikant, Mittelwert \pm SEM; N-Fach= Bezug zu WT-Mäusen. Fibin-TG= Fibin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.3.2 Analyse der Caspasen -3,-7 und -12 in Fibin-TG-Tieren

Zwar hat die Zelle mit der UPR hochspezifische Signalwege entwickelt um eine normale ER-Funktion wiederherzustellen, jedoch induziert eine anhaltende UPR einen programmierten Zelltod, die Apoptose, um den Organismus durch das Entfernen der gestressten Zellen zu schützen (Fribley et al., 2009). Dies könnte auch nach Hypertrophie erfolgen, wobei nach Zellvolumenzunahme ein programmierter Zelltod in den Fibin-TG-Mäusen stattfinden könnte und daher untersucht wurde. Ein Signalweg zur Apoptose-Induktion wurde bereits durch die Untersuchung der CHOP-Expression analysiert (Abbildung 3-28 C, D). Neben dem Zusammenwirken weiterer Moleküle, einschließlich Rezeptoren und Enzymen, ist für die Induktion und Ausführung von Apoptose vor allem das Caspase-Kaskade-Signalsystem von Bedeutung (Fan et al., 2005). Caspasen werden aufgrund ihrer Position in apoptotischen

Signalkaskaden als Initiator- (Caspase-2, -8, -9 und -10) oder Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) eingestuft. Durch eine Initiator-Caspase werden die Effektor-Caspasen aktiviert und induziert die Apoptose. Gute Biomarker für die Apoptose-Induktion sind die Effektor-Caspasen-3 und-7, wobei diese aktiviert sein müssen. Durch den Nachweis eines geringeren Pro-Caspase-Spiegels (nicht aktiv) der Caspasen 3 und 7 und einer erhöhten Menge ihrer aktiven Form kann eine Aktivierung der Apoptose gezeigt werden (McIlwain et al., 2013). Durch das Western-Blot-Verfahren konnte in den Fibin-TG-Mäusen zwar ein hoher Spiegel der Pro-Caspasen-3 und -7, aber nicht ihrer aktiven Formen (cleaved Caspase) gemessen werden (Abbildung 3-28 A, B). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Apoptose zu diesem Zeitpunkt nicht aktiv ist.

Andere Zellkompartimente, wie das Endoplasmatische Retikulum (ER) können über die Aktivierung der Caspase-12 eine Apoptose induzieren (Yoneda et al., 2001). In den TG-Tieren wurde ein signifikant erhöhte Spiegel der Pro-Caspase-12, sowie deren aktivierter Form (cleaved Caspase-12) festgestellt (Abbildung 3-28 C, D). Im Gegensatz zuder Beobachtung einer aktivierten Caspsase 12, wurde keine Expression der aktiven Form von Caspase-3 und-7, die für eine Apoptose- Einleitung nötig sind, in den Tieren festgestellt.

Die Untersuchung der Caspasen ergab kein eindeutiges Ergebnis, ob eine induzierte Apoptose in den Tieren vorhanden ist.

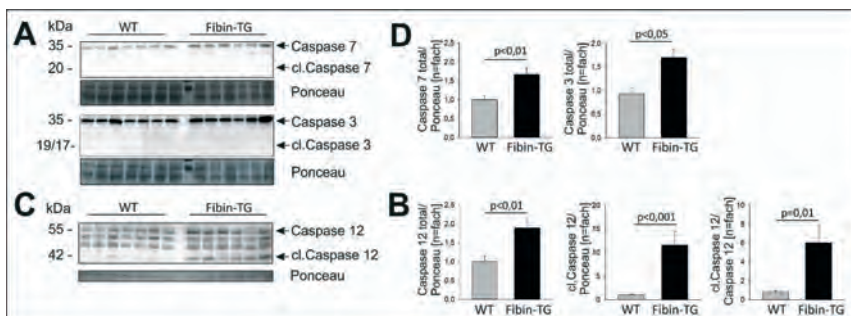


Abbildung 3-28: Caspase Aktivität in Fibin-TG-Mäusen

A- D, Darstellung der Immunoblots und deren densitometrische Analysen von Caspase-3, -7 und -12. Die Proben entstammen dabei aus dem Protein des Linken Ventrikels der Fibin-TG-Mäuse (N= 6) und dessen Wildtypgeschwistertieren (N= 6). A, B, Von den Effektor-Caspasen-3 und -7 ist nur ein hoher Spiegel der Pro-Caspase nicht aber die aktive Form (cl. Caspase) vorhanden. C, D Die Caspase-12 zeigt

eine hohe Syntheserate der inaktiven sowie in der aktiven Form (Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-t-Tests ermittelt. N.s.=nicht signifikant, Mittelwert \pm SEM; N-Fach= Bezug zu WT-Mäusen. Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

3.3.3 Beobachtung eines geblockten autophagischen Flusses im Herzgewebe von Fbin-TG-Tieren

Nach der Untersuchung des ER-Stresses in den Fbin-TG-Mäusen erfolgte als nächstes die Untersuchung der autophagischen Aktivität. Um den Abbau von ungefalteten oder fehlerhaft gefalteten Proteinen zu fördern aktiviert die UPR, neben verschiedenen apoptotischen Signalkaskaden, auch jene der Autophagie (Senft and Ronai, 2015). Ob eine gesteigerte autophagische Aktivität in den Fbin-TG-Tieren herrscht wurde mittels Western-Blot-Verfahren untersucht. Dazu wurde auch hier das isolierte Proteinlysate der linken Ventrikel der 6 Fbin-TG- und 7 WT-Mäuse verwendet.

Bekannte Autophagie-Marker sind die Proteine LC3 II und p62. Während der Autophagie wird eine zytosolische Form von LC3 (LC3-I) an Phosphatidylethanolamin konjugiert, um ein LC3-Phosphatidylethanolamin-Konjugat (LC3-II) zu bilden, welches an die autophagosomalen Membranen bindet. Der Inhalt des final gebildeten Autolysosomen, aber auch das LC3-II im autolysosomalen Lumen, wird durch lysosomale Hydrolasen abgebaut. Somit spiegelt der lysosomale Umsatz des autophagosomalen Markers LC3-II die autophagische Aktivität wider (Tanida et al., 2008). Von LC3 wurden 3 Isoformen (LC3A, LC3B, LC3C) beschrieben, wobei LC3B in Herz, Gehirn und Plazenta vorkommt (Koukourakis et al., 2015). Ein weiterer Marker für den autophagischen Fluss ist das Autophagie-Rezeptor-Sequestosom, genannt Sequestosom 1 (SQSTM1, p62). Es kann dazu dienen ubiquitinierte Proteine an die autophagische Maschinerie zu binden, um deren Abbau im Lysosom zu ermöglichen. Kommt es zur Hemmung der Autophagie akkumuliert p62, während es bei einer Induktion der Autophagie einen geringen Spiegel aufweist (Bjorkoy et al., 2009).

Um den autophagischen Fluss im murinen Herzgewebe der Fbin-TG-Mäuse zu untersuchen, wurde die Aktivität der oben vorgestellten Marker ermittelt. In der Analyse wurde ein signifikant erhöhter Spiegel von LC3-II sowie von p62 in den Fbin-TG festgestellt, was auf eine Blockierung des Flusses hindeuten könnte, was einer gehemmten Autophagie entspricht (Abbildung 3-29).

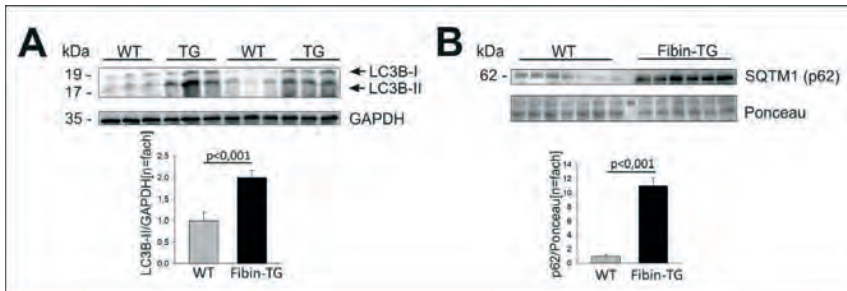


Abbildung 3-29: Die Autophagie-Marker SQT1 (p62) und LC3-II B sind in Fibin-TG-Mäusen erhöht

A, B Darstellung der Immunoblots und deren densitometrischer Analysen der an Autophagie mitwirkenden Proteine p62 und LC3-II. Von beiden Proteinen wurde ein erhöhter Spiegel in den Fibin-TG-Tieren (N= 6), verglichen mit den WT-Tieren (N= 6) festgestellt. Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-t-Tests ermittelt. N.s.=nicht signifikant, Mittelwert \pm SEM; N-Fach= Bezug zu WT-Mäusen. Fibin-TG= Fibin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

4 Diskussion

Die kardiale Hypertrophie ist die Reaktion der Kardiomyozyten auf hämodynamischen Stress, welcher pathologisch durch Bluthochdruck und Klappenerkrankungen hervorgerufen werden kann. Die Folge dieser Form der Hypertrophie ist eine Verringerung der Herzkammerwand-Spannung wie auch des Sauerstoffverbrauchs und eine Verbesserung der Herzleistung, was die Belastung zunächst kompensiert. Bei einer länger andauernden Belastung erfährt das Myokard jedoch eine pathologische Umgestaltung (kardiales Remodeling, siehe Einleitung 1.1.1). Die Patienten mit einer kardialen Hypertrophie sind für viele Herz-Kreislauf-Erkrankungen, einschließlich Arrhythmien, Herzinfarkt und plötzlichem Herztod prädisponiert (Samak et al., 2016). Während des letzten Jahrzehnts wurden daher große Anstrengungen unternommen, um die molekularen Signalwege zu entschlüsseln, die dem kardialen Remodeling zu Grunde liegen. Somit ist die Identifizierung neuer Moleküle, welche die Herzhypertrophie regulieren, für die Forschung von besonderem Interesse. Diese könnten die Basis für eine neue Generation von Medikamenten und Therapieansätzen bilden (Luedde et al., 2006, Frey and Olson, 2003).

In unseren Vorarbeiten wurde Fibin als ein neues potenzielles "Regulationsmolekül" in der Herzhypertrophie-Signalkaskade identifiziert. Eine genauere Untersuchung des Proteins mittels *in vitro* Experimenten ließ auf einen protektiven Effekt gegen die kardiale Hypertrophie schließen, und das Fibin-Gen könnte daher ein potenzielles Ziel für neue therapeutische Maßnahmen sein. Fibin ist als Wachstumsfaktor essenziell für die Induktion der Brustflossenentwicklung im Zebrafisch. Seine hoch konservierte Sequenz ist im Genom zahlreicher Vertebraten wie Maus und Mensch zu finden. Seine Existenz während der Embryogenese und im Erwachsenenalter sowie das Vorkommen in unterschiedlichen Geweben lassen weitere Funktionen im Körper vermuten und seine Wirkung im Herzen wurde bisher noch nicht erforscht (Lakner et al., 2011, Zagorski et al., 2009). Zagorski et al. beschrieben eine Zunahme der Fibin-Expression innerhalb des rechten Herzventrikels während einer chronischen Lungenembolie in Ratten (Zagorski et al., 2009). Unklar war dabei jedoch, ob die Fibin-Expression Folge oder Ursache der Lungenembolie war. In unseren Vorarbeiten mit Tiermodellen einer kardialen Hypertrophie konnten wir auch eine Induktion von Fibin im Herzgewebe von Mäusen (nach TAC-Operation) und in Mäusen, die ein konstitutiv aktives Calcineurin überexprimieren (CnA-TG), nachweisen.

Die Frage, ob Fibin auf Grund einer Hypertrophie hochreguliert wurde, war nach wie vor nicht geklärt. Für eine potentiell kardioprotektive Wirkung von Fibin sprachen unsere *in vitro* Vorversuche, bei denen mit Phenylephrin (PE) behandelte neonatale Ratten Kardiomyozyten (NRVCM) durch eine induzierte Überexpression von Fibin die Hochregulation der Hypertrophie Marker-Gene *Nppa* und *Nppb* inhibiert werden konnte (noch nicht veröffentlichte Daten). In diesem Experiment war eine geringere Zellgröße der NRVCMS im Vergleich zur Kontrolle (Zellen ohne adenoviral-induzierte Überexpression von Fibin) zu beobachten. Dies führte zu der Frage, ob Fibin, wie in den *in vitro*-Versuchen, in einem komplexen Organismus (im Tiermodell) den gleichen protektiven Effekt erzeugen kann. Die Überprüfung dieser Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit mittels eigens generierter Fibin-transgener Mäuse in unterschiedlichen kardialen Hypertrophie-Modellen *in vivo* durchgeführt werden.

4.1 Fibin-TG-Mäuse entwickeln eine Herzfunktionsstörung

Zu Beginn dieser Arbeit wurden 6 Founder mit unterschiedlich stark ausgeprägter Überexpression des Fibin-Proteins im Herzen generiert, um anschließend Tiermodelle mit Induktion einer Herzhypertrophie durchführen zu können. Bei der Generierung eines Tiermodells mittels Gentransfer kann man mit Hilfe eines vorgeschalteten Promotors die Lokalisation der Gen-Expression bestimmen, jedoch ist das Expressions-Level in den generierten Tieren meist unterschiedlich. Dies kommt dadurch zustande, dass das injizierte Volumen der DNA-Lösung eine unterschiedliche Anzahl von transgenen-Molekülen enthalten kann. Zum anderen können sich ein oder mehrere Kopien der Transgene in das Wirtschromosom integrieren und damit häufiger abgelesen werden (Dolatshad et al., 2015). Es entstehen unterschiedliche Expressionslevel des Transgens in den Tieren. Von den 6 generierten Foundern wurden 3 Tiere ausgesucht, welche zueinander unterschiedliche Fibin-Expressionslevel aufwiesen (gering, mittel und hoch). Diese wurden dann jeweils mit einem WildtypTier verpaart und bildeten den Ausgangspunkt dreier Fibin-TG-Mauslinien mit unterschiedlich hohem Fibin-Expressionslevel.

Mit diesen 3 ausgesuchten Foundern und deren Verpaarungen mit Wildtypmäusen konnten somit erfolgreich 3 Fibin-TG-Mauslinien mit unterschiedlichen kardialen Fibin-Expressionsleveln generiert werden, welche den Ausgangspunkt für die weitere Arbeit

darstellten. Da alle 3 Fbin-TG-Mauslinien in der Basischarakterisierung einen ähnlichen Phänotyp zu ihren Wildtypgeschwistertieren zeigten und wir den größtmöglichen Effekt einer spezifisch kardialen Fbin-Expression in den Mäusen untersuchen wollten, wurden für die weiteren Versuche in der Arbeit immer die Linie mit der höchsten Fbin-Überexpression gewählt.

In der Basischarakterisierung unter normalen Bedingungen von 8 Wochen alten Tieren zeigten die Fbin-transgenen-Mäuse keinen auffälligen Phänotyp im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistern. Zwar wurden einige Unterschiede in den morphometrischen Parametern zwischen beiden Geschlechtern festgestellt, welche sich jedoch nur in den Wildtyp-Mäusen zeigten. Hier ist der Vergleich mittels Quotients von HG/KG der männlich und weiblichen Wildtypgeschwister zu nennen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Fbin in diesen Mäusen unabhängig vom Geschlecht wirkt. Da zwischen den Geschlechtern kein Unterschied vorhanden war und die Versuche möglichst unter standardisierten Bedingungen (kein Östrogeneinfluss) stattfinden sollte, wurden für die weiteren Experimente Mäuse des männlichen Geschlechtes verwendet.

Die Untersuchung der Herzfunktion mittels Echokardiographie (z.B. FS: WT= $31,0 \pm 0,1$; Fbin-TG= $31,3 \pm 0,4$) zeigte keine Unterschiede zwischen den Fbin-TG-Tieren und ihren Kontrollgeschwistertieren. Auch bei den morphometrischen Daten der Tiere waren keine Unterschiede festzustellen (z.B. HG/KG: WT= $4,1 \pm 0,6$; Fbin-TG= $4,2 \pm 0,4$).

Erst bei genaueren Untersuchungen wie auf der molekularbiologischen und histologischen Ebene zeigten sich Veränderungen in den Fbin-TG-Tiere im Gegensatz zur Funktion und Morphometrie des Herzens wurde auf molekularer Ebene eine signifikante Hochregulierung der Hypertrophie Marker-Gene (Fbin-TG= *Nppa*: $13,7 \pm 3,6$ -fach; *Nppb*: $1,9 \pm 0,6$ -fach Fbin-TG, N= 6; WT, N= 7) in den transgenen-Tieren gemessen, was auf eine gestörte Herzfunktion hindeutet (Man et al., 2018). Nach einer nachgewiesenen Hochregulierung der Hypertrophie Marker-Gene müssten die Tiere eine kardiale Hypertrophie aufweisen und nicht wie ihre Wildtypgeschwister eine gesunde Herzfunktion zeigen. Zudem bestätigen diese Daten nicht die zuvor gewonnen *in vitro* Ergebnissen, bei denen eine Inhibierung der entsprechenden Hypertrophie Marker-Gene *Nppa*, *Nppb* festgestellt wurde (nicht veröffentlichte Daten).

Ein weiterer Unterschied der Fbin-TG-Tiere zu den WT-Mäusen zeigte sich auf histologischer Ebene, welche sich jedoch wiederum nicht mit den gefundenen molekularbiologischen Ergebnissen, die erhöhte Hypertrophie Marker-Gene *Nppa*, *Nppb* und *Mhy7*, vereinbaren lässt. Hier ist die geringere gemessene Zelloberflächengröße der Fbin-TG-Tiere in allen 3 Linien zu den Wildtypgeschwistertieren zu nennen. Wie in den zuvor erhobenen *in vitro* Vorarbeiten (nicht veröffentlichte Daten), zeigten auch die Tiere aller 3 Fbin-TG-Linien eine geringere Zelloberflächengröße der Kardiomyozyten im murinen Herzgewebe (Fbin-Line „hohe Expression“: Fbin-TG-Männchen = $0,77 \pm 0,01$ -fach; Fbin-TG-Weibchen = $0,66 \pm 0,8$ -fach) im Gegensatz zu den *in vitro* Daten, wo es mit einer Inhibierung der Hypertrophie Marker-Gene in den Zellen verbunden war.

Auch zeigen die morphometrischen erhobenen Parameter HG/KG (WT= $4,1 \pm 0,6$; Fbin-TG= $4,2 \pm 0,4$) wie auch HG/Tibia (WT= $5,9 \pm 0,6$; Fbin-TG= $6,1 \pm 0,4$) zwischen den transgenen Mäusen und den Wildtypgeschwistern keinen Unterschied. Nach den histologischen Resultaten müsste jedoch eine geringere Zelloberflächengröße, was auf eine geringere Zellgröße in den Tieren schließen lässt, auch dann mit einer kleineren Herzgröße zusammenhängen, was jedoch nicht festgestellt werden konnte.

Eine mögliche Antwort auf das kaum zu unterscheidende Herzgewicht zum Wildtyp oder kaum veränderter Parameter HG/KG trotz kleinerer Zellen könnte ein hoher Anteil an Fibrose im Fbin-TG-Herzgewebe sein, da der Fibrosegehalt in den Fbin-TG-Tieren signifikant erhöht war. Im mit der kardialen Hypertrophie assoziierten Remodeling sorgen Fibroblasten mit ihrer Akkumulation und mit Ablagerung von Proteinen in der extrazellulären Matrix für die Bildung von Narbengewebe im Herzgewebe (Krenning et al., 2010). Zwei Arten der Fibrose werden hierbei unterschieden. Im kardial hypertrophen Tiermodell wurde zu Beginn eine reaktive interstitielle Fibrose ohne Apoptose, beobachtet. Nach einer gewissen Zeit jedoch geht dieser Zustand in eine Ersatzfibrose über. Diese zeigt sich durch den Verlust von Kardiomyozyten (Isoyama and Nitta-Komatsubara, 2002). In der Lektin-Färbung und damit verbundenen Messung der Zelloberflächengröße wurde nur auf die Oberflächengröße der Kardiomyozyten nicht jedoch auf die Fibrose geachtet. Erst in der Trichrom-Masson-Färbung konnte der signifikant erhöhte Fibrosegehalt in den Herzen der Fbin-TG-Tiere beobachtet und bestimmt werden. Mit diesem erhöhten Fibrosegehalt im transgenen Gewebe lässt sich wahrscheinlich die geringere Zelloberflächengröße ausgleichen. Die oben genannten Parameter HG/KG und HG/Tibia unterscheiden sich somit nicht zwischen den Gruppen.

Den letzten zu nennenden Unterschied zwischen den transgenen und den Wildtyp-Tieren stellen die in den Kardiomyozyten beobachteten Ablagerungen, welche als definierte Protein-Aggregate identifiziert wurden, dar. Diese könnten auch die Ursache für die erhöhte Regulierung der hypertrophen-Marker-Gene in den Fibrin-TG-Tieren und der Grund des hohen Fibroseanteils im Gewebe sein. Diese beiden Beobachtungen in den Tieren weisen auf eine kardiale Hypertrophie in den Tieren hin. Dass Protein-Aggregate im Herzen eine kardiale Hypertrophie induzieren können wurde schon oft beschrieben (Hofmann et al., 2019)

Neben einer möglichen Induktion einer kardialen Hypertrophie könnten diese Ablagerungen die Kardiomyozyten an ihrer Entwicklung oder am Wachstum hindern. Hier könnte die Assoziation von Fibrin zum TBX5-Faktor eine Rolle spielen. Wie in der Einleitung beschrieben spielt TBX5 eine Rolle in der Herzentwicklung (Ahn et al., 2002). Bekannte Ziel-Gene von *Tbx5* sind meist an der Proliferation, Reifung und Funktion der Kardiomyozyten beteiligt. Obwohl es schon lange als wichtiges Gen für die Herzstruktur bekannt ist, ist hier die funktionelle Rolle von *TBX5* noch weitestgehend unklar (Steinle and Moskowitz, 2017). Es könnte in diesem Fall eine Schlüsselrolle besitzen. Fibrin besitzt einen direkten Einfluss auf die TBX5-Expression (Wakahara et al., 2007). Dessen Überexpression könnte somit ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklung der Kardiomyozyten haben. Eine Möglichkeit wäre demnach, dass die Fibrin Überexpression und eine eventuelle Akkumulation des Fibrin-Proteins eine Inhibierung des TBX5-Gens induzieren würde. Durch die fehlende Unterstützung zur Entwicklung der Kardiomyozyten durch TBX5 kommt es demnach zu einer Verkleinerung oder gestörten Entwicklung der Kardiomyozyten. Die jüngsten molekularbiologischen Analysen (*q-PCR*) in dieser Arbeit bestätigen eine Inhibierung des *Tbx5*-Gens. So wurde mittels real-time-PCR-Verfahren eine Runterlierung des *tbx 5*-Gens in den transgene Tieren der Mauslinie mit der höchsten Fibrin-Expression (Fibrin-TG (N= 5) *tbx5*: $0,33 \pm 0,06$ -fach $p < 0,001$, zu WT (N= 5)) zum anderen aber auch in der Linie mit der niedrigsten Fibrin-Expression (Fibrin-TG (N= 5) *tbx5*: $0,31 \pm 0,05$ $p < 0,001$ zu WT (N= 5)) gemessen. Dies untermauert den oben beschriebenen Sachverhalt.

Obwohl die Fibrin-TG-Tiere im Alter von 8 Wochen keinen auffälligen pathologischen Phänotyp aufwiesen, verstarben alle Tiere bis zum 8ten Lebensmonat. Um diesen Sachverhalt näher zu betrachten wurden neben der Basischarakterisierung eine Analyse bei 6 Monaten alten Mäusen durchgeführt. In der Basischarakterisierung der älteren Fibrin-TG-

Tiere wurden zum Vergleich dieselben morphometrischen und echokardiographischen Daten erfasst. Im Vergleich zu den Wildtypen zeigten die Fbin-TG- Tiere in den morphometrischen Parametern (Verhältnis HG/KG: WT = $4,5 \pm 0,3$; Fbin-TG = $4,5 \pm 0,3$; Verhältnis HG/Tibia: WT = $8,0 \pm 0,2$; Fbin-TG = $9,1 \pm 0,5$) tendenzielle, aber nicht signifikante Unterschiede. Eine signifikante Erhöhung war im erhobenen Parameter LG/Tibia (WT = $8,0 \pm 0,2$; Fbin-TG = $10,5 \pm 1,3$) feststellbar. Im Vergleich zu den 8 Wochen alten Tieren wiesen die 6 Monate alten Fbin-TG-Mäuse in der echokardiographischen Untersuchung eine signifikant reduzierte Auswurfleistung (EF: WT = $59 \pm 2,7$; Fbin-TG = $30,5 \pm 1,3$) sowie Verkürzungsfraktion (FS: WT = $36,0 \pm 3,6$; Fbin-TG = $15,0 \pm 1,6$) auf. Außerdem war der linksventrikuläre Durchmesser in der Diastole signifikant erhöht (LVID: WT = $4,3 \pm 0,6$; Fbin-TG = $3,9 \pm 0,8$; $p < 0,05$). Diese Ergebnisse deuten auf eine schwere linksventrikuläre Dysfunktion hin. Vor allem der vergrößerte linksventrikuläre Diameter lässt auf eine Dilatation des linken Ventrikels in diesen Tieren schließen. Auch die Tendenz der geringeren Dicke der posterioren Herzwand spricht für die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie in den Tieren (Lakdawala et al., 2013). Die molekularbiologische Untersuchung der hypertrophen Marker-Gene ergab eine signifikante Hochregulation der Gene in den Fbin-TG-Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren Fbin-TG (*Nppa* = $9,5 \pm 0,3$ -fach; *Nppb* = $6,71 \pm 0,4$ -fach und *Myh7* = $6,4 \pm 2,4$ -fach).

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass Fbin-TG-Tiere nach etwa 6 Monaten eine dilatative Kardiomyopathie entwickelt haben und daran verstorben sind.

Zusammengefasst haben die Fbin-TG Mäuse nach 6 Monaten einen pathologischen kardialen Phänotyp entwickelt, welcher sich schon in den jungen Tieren (8 Wochen) mit einem höheren Fibrosegehalt im Gewebe und mit einer hohen Expression von Hypertrophie Marker-Genen erahnen lässt. Die Überlebenskurve zeigt, dass viele Fbin-TG-Mäuse nach ungefähr 8 Monaten dann versterben.

4.2 Fbin-Überexpression erzeugt keine Verbesserung der Herzfunktion in untersuchten Hypertrophie-Modellen (TAC und CnA-TG-Kreuzung)

Der von uns *in vitro* beobachtete kardioprotektive Effekt einer Fbin-Überexpression sollte an 2 Hypertrophie-Modellen *in vivo* an der höchst-exprimierten Fbin-TG-Linie überprüft werden.

Im ersten Hypertrophie-Modell wurden die Mäuse (Fibin-TG sowie WT) im Alter von 8 Wochen einer TAC-Operation unterzogen. In der echokardiographischen Untersuchung zeigten die TAC-operierten Fibin-TG-Tiere eine ähnlich starke Reduzierung der Auswurf-fraktion (EF8: WT-TAC = $42,1 \pm 1,9$; Fibin-TG-TAC = $35,4 \pm 1,8$) und der Verkürzungs-fraktion (FS: WT-TAC = $18,9 \pm 1,8$; Fibin-TG-TAC = $15,6 \pm 1,8$), wie ihre Wildtypgeschwister Tiere. Die Schein-operierten Mäusen zeigten eine normale Herzfunktion. Die bei diesen Tierenerhobenen Parameter weisen auf eine systolische Dysfunktion des linken Ventrikels hin. Weiterhin deutet die signifikante Vergrößerung des linken ventrikulären diastolischen Diameters auf eine sich entwickelnde dilatative Kardiomyopathie (DCM) in den Tieren hin, welche vor allem mit einem signifikant erhöhtem Wert in den Fibin-TG-TAC-Tieren festzustellen ist (LVID: diast: WT-TAC= $4,5 \pm 0,4$; Fibin-TG-TAC= $4,7 \pm 0,6$) (Lakdawala et al., 2013). Die Daten der Echokardiographie zeigen also keine Verbesserung der Herzfunktion, wenn in den Tieren kardial Fibin überexprimiert wird. Die *in vitro* Experimente konnten *in vivo* also in der Herzfunktion nicht bestätigt werden.

Die signifikant erhöhten morphometrischen Parameter (HG/KG: WT-TAC: $6,6 \pm 1,1$; Fibin-TG-TAC: $8,6 \pm 1,1$, HG/ Tibiallänge: WT-TAC: $9,2 \pm 0,7$; Fibin-TG-TAC: $10,7 \pm 0,8$ und LG/KG WT-TAC: $194,7 \pm 9,5$; Fibin-TG-TAC: $382 \pm 9,8$) sprechen ebenfalls für eine kardiale Hypertrophie in beiden TAC-Versuchsgruppen. Vor allem der Parameter Lungengewicht / Körpergewicht ist in den Fibin-TG-TAC-operierten Tieren erhöht und spricht für eine Erhöhung des Lungengewichtes. Der Grund dafür könnte die Entwicklung eines erhöhten Druckniveaus im linken Ventrikel sein, welcher sich retrograd auf den Lungenkreislauf überträgt und ein Lungenödem zur Folge hat. Die Druckerhöhung hat auch eine Hypertrophie der Herzmuskulatur zur Folge (Man et al., 2018). Zusätzlich zeigte die molekularbiologische Untersuchung des Herzgewebes wie in der Basischarakterisierung eine signifikante erhöhte Regulation der Hypertrophie Marker-Gene in den TAC-operierten Fibin-TG-Tieren.

Mit den gemessenen morphometrischen und molekularbiologischen Daten wurde ebenfalls gezeigt, dass keine Verbesserung durch eine Fibin-Überexpression der kardialen Hypertrophie zumindest im Mausmodell zu beobachten ist. Vielmehr sorgt es eher für eine weitere Verschlechterung, was man an dem hohen Lungengewicht beobachten kann.

Wie in der Basischarakterisierung der Fibin-TG-Linien konnten die Ablagerungen oder Protein-Aggregate und eine signifikant geringere Zellgröße in den TAC-sowie in den Schein-operierten Fibin-TG-Tieren beobachtet werden. Diese Feststellung kann aber wiederum

nicht mit der kardialen Hypertrophie in den TAC-operierten Fibin-TG-Tieren in Verbindung gebracht werden. Die Hypertrophie zeichnet sich durch eine Vergrößerung der Zellen aus. Die geringen Zellgröße in diesem Fall ist vermutlich den beobachteten Ablagerungen geschuldet oder der Fibin-Überexpression und damit folgende Inhibierung von TBX5. Dieser bereits im Phänotyp vorhandene Zustand und die zusätzliche Druckbelastung durch die TAC sorgen in den Fibin-TG-Tieren für einen schlechteren Zustand und schweren pathologischen Phänotyp in den Mäusen als eine alleinige TAC-Operation.

Im zweiten Tiermodell wurden die Fibin-TG-Mäuse mit Calcineurin-TG-Mäusen verpaart. Eine weitere Untersuchung erfolgte in Form einer Basischarakterisierung der Kreuzung. Durch unsere Vorarbeiten und vorangegangene Experimente mit Calcineurin-transgenen Mäusen (CnA-TG) konnte eine gesteigerte Fibin-Expression im kardialen Gewebe festgestellt werden. Dies lässt auf eine mögliche Verbindung zwischen Fibin und dem Calcineurin-NFAT-Signalweg schließen, wobei dieser Zusammenhang bisher noch nicht untersucht worden ist. CnA-TG-Mäuse entwickeln im Laufe ihres Lebens eine massive konzentrische Kardiohypertrophie, welche schon nach wenigen Lebensmonaten in einer Herzinsuffizienz endet (Molkentin et al., 1998).

In der Analyse der Nachkommen der oben genannten Kreuzung waren die Parameter der doppelt-transgenen-Tiere (Fibin-TG/CnA-TG) von besonderer Bedeutung. Diese wurden mit ihren Geschwistertieren (WT, Fibin-TG und CnA-TG) verglichen. Auch in diesem Experiment wurde ein kardioprotektiver Effekt einer Fibin-Überexpression in diesen Tieren erwartet. Die erste Beobachtung in diesem Versuch war neben der geringen Körpergröße (Tibiallänge) und reduziertem Körpergewicht der Fibin-TG/CnA-TG-Tiere zudem eine kürzere Lebensspanne zu ihren Geschwistertieren.

Der Grund für die geringere Körpergröße sowie das reduzierte Körpergewicht der doppelt-transgenen-Tiere beruht wahrscheinlich auf einer kardial bedingten Kachexie als Folge einer stark eingeschränkten Herzfähigkeit. Beim Menschen wird durch eine solch geschwächte Herzfunktion der Körper nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, was zu einem Verlust von Muskel-, Fett- und Knochenmasse führt (Bertolotti et al., 2000b). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies bei den Fibin-TG/CnA-TG-Tiere auch der Fall ist. Für diese Hypothese spricht, dass wie weiter unten beschrieben wird, die Tiere an einer kardialen Dysfunktion bis zu einer dilatativen Kardiomyopathie leiden.

Die echokardiographische Analyse dieser Mäuse zeigte eine reduzierte EF (CnA-TG: $47,3 \pm 1,1$; Fbin-TG/CnA-TG: $23,8 \pm 1,7$) sowie FS (CnA-TG: $22,9 \pm 1,9$; Fbin-TG/CnA-TG: $9,7 \pm 1,3$) im Vergleich zu ihren Geschwistergruppen, wobei die im Vordergrund zu vergleichende Gruppe, die der CnA-TG-Tiere war. Dies lässt, wie schon oben beschrieben, auf eine schwere kardiale Dysfunktion des linken Ventrikels der doppel-transgenen-Mäuse schließen. Auch war hier der linke diastolische Durchmesser in den CnA-TG-Mäusen (LVID, diast: CnA-TG= $3,9 \pm 0,7$) sowie in den Fbin-TG/CnA-TG-Tieren (LVID diast: CnA-TG= $4,7 \pm 0,6$) signifikant erhöht. Alle diese Parameter deuten auf eine Entwicklung einer kardialen Hypertrophie in den Tieren hin (Lakdawala et al., 2013, Molkentin et al., 1998). Neben dem vergrößerten linken Ventrikelvolumen der doppelt-transgenen-Tiere wurde auch ein vergrößertes rechtes Ventrikelvolumen in diesen Tieren festgestellt. Dies könnte ebenfalls die Folge einer starken kardialen Hypertrophie darstellen. So wird häufig beim Menschen eine strukturelle und auch funktionelle Beteiligung des rechten Ventrikels bei einer HCM beschrieben (Keramida et al., 2018).

Zwar gibt es auch die Beobachtung eines vergrößerten rechten Ventrikels in 8 Wochen alten Ratten mit chronischen Lungenembolien, wo mittels Microarray-basierter Genexpressionsanalyse eine Fbin-Expression im rechten Ventrikel gemessen wurde, jedoch war der vergrößerte rechte Ventrikel die Folge der dort bestehenden Obstruktion der Lungengefäße (Zagorski et al., 2009). Da die Doppelt-transgene-Tiere hier vermutlich keine Obstruktion der Lungengefäße hatten, kann die hier als Grund damit ausgeschlossen werden.

Auch wie in den vorangegangenen histologischen Untersuchungen des murinen Herzgewebes konnten auch in den doppelt-transgenen-Nachkommen eine geringere Zelloberflächengröße der Kardiomyozyten beobachtet werden. Auch die molekularbiologische Untersuchung ergab - wie schon in der Basischarakterisierung und im TAC-Hypertrophie-Modell - eine signifikant erhöhte Regulierung der Hypertrophie-Marker-Gene. Wie auch oben beschrieben, sind vermutlich dafür die Fbin-Überexpression und zusammenhängende Inhibierung von TBX5 sowie die wieder beobachteten Ablagerungen oder Protein-Aggregate im murinen Herzgewebe in den Fbin-TG und den doppelt-transgenen-Nachkommen verantwortlich.

Zusammenfassend konnte der *in vitro* beobachtete potentiell protektive Effekt des Fbin-Proteins in den untersuchten Mausmodellen der kardialen Hypertrophie (TAC und Kreuzung

mit CnA-TG-Mauslinie) *in vivo* nicht bestätigt werden. Vielmehr wurde eine Verschlechterung der Herzfunktion in den Versuchsgruppen Fibrin-TG-TAC und Fibrin-TG/CnA-TG-Mäuse beobachtet. Ob die festgestellten Protein-Aggregate für die oben beschriebenen Beobachtungen in den Versuchen verantwortlich sind, soll nun im folgenden Teil diskutiert werden.

4.3 Fibrin-TG-Mäuse weisen intrazelluläre Protein-Aggregate auf

In der histologischen Analyse des murinen Herzgewebes wurde in jeder der 3 untersuchten Fibrin-TG-Mauslinien sowie in den doppelt-transgenen-Nachkommen der Fibrin-TG/CnA-TG-Kreuzung mittels eines Lektin-Farbstoffes, welcher an spezifische Kohlenhydratstrukturen bindet, neben den Zellmembranstrukturen auch undefinierte Ablagerungen entdeckt. In der Lektin-Färbung konnte noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Ablagerungen durch einen Färbefehler entstanden sind, diese sich intra- oder extrazellulär befinden, oder woraus sie bestehen. In weiteren Färbungen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Sirius-Rot-Färbung und andere, siehe Methoden 3.2.1) waren die Ablagerungen ebenfalls nachweisbar, wodurch ein Färbefehler ausgeschlossen werden konnte. Durch die Untersuchung am Elektronenmikroskop wurde gezeigt, dass die Ablagerungen intrazellulär lokalisiert sind. Außerdem waren diese nicht von einer Membran umgeben und lagen frei im Zytosol. Neben den großen Ablagerungen waren meistens noch weitere kleine Konglomerate zu beobachten.

Durch die immunhistologische Färbung mit dem fluoreszierenden Antikörper gegen das Z-Scheibenprotein, α -Aktinin, und dem gegen das Fibrin-Protein, konnte eine Lokalisation von Fibrin an der Z-Scheibe im murinen Herzgewebe nachgewiesen werden. Durch eine weitere Färbung mit „ProteoStat“ und dem Fibrin-Antikörper konnten die Ablagerungen als Protein-Aggregate mit einer Beteiligung des Fibrin-Proteins identifiziert werden (s.o. Ergebnis 3.1.2.1.2). (Sind aggregierte Proteine vorhanden, bindet das Rotormolekül ProteoStat an deren Tertiärstruktur, wodurch Fluoreszenz emittiert wird). Somit wird es zum spezifisch Nachweis für Protein-Aggregate und Aggrosom-artige Einschlusskörper in Zellen genutzt (Shen et al., 2011).

Im Allgemeinen wird die Protein-Aggregation als eine unspezifische Koagulation von unvollständig gefalteten oder teilweise denaturierten Polypeptiden beschrieben, welche

durch die Wechselwirkung zwischen exponierten hydrophoben Oberflächen hervorgerufen wird. Durch die hydrophoben Oberflächen besitzen sie die Fähigkeit sich mit nicht verwandten zellulären Proteinen, die vorübergehend komplementäre Oberflächen aufweisen, zusammenzuballen (Rajan et al., 2001). In Säugetier-Zellen werden aggregierte Proteine normalerweise in diskreten Strukturen, den Einschlusskörpern, gebunden. Diese können eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine enthalten, wie molekulare Chaperone, Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems, zentrosomales Material und Proteine des Zytoskeletts (Kopito, 2000). Die Struktur des Fibin-Proteins wurde bisher noch nicht vollständig geklärt. So könnte es im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als Monomer oder als Homodimer, welches durch Disulfidbrücken-Bindungen gebildet wird, vorliegen. In bereits beschriebenen *in vitro* Versuchen zeigte Fibin eine hohe Aggregationstendenz. Wahrscheinlich benötigt es zudem einen assoziierten, bisher aber noch unbekanntem, Co-Faktor, um aus dem ER sezerniert zu werden (Lakner et al., 2011). In dieser Arbeit wurden die ersten Ergebnisse und Analysen von einer Fibin-Überexpression in einem Mausmodell oder überhaupt in einem *in vivo*-Modell beschrieben. So konnten wir in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Aggregatbildung dieses Proteins *in vivo* aufzeigen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass extrem hohe Protein-Expression zu einer Aggregatbildung, und somit zu einer Belastung der Zellen bzw., eines Organismus (*Saccharomyces cerevisiae*) führen kann (Bolognesi and Lehner, 2018, Makanae et al., 2013). Gegen die Annahme, dass die Aggregate nur Ablagerungen einer überaus hohen künstlichen Überexpression sind spricht, dass in dieser Arbeit auch schon die Mauslinie mit der geringsten induzierten Fibin-Überexpression eine Aggregatbildung aufwies, obwohl auch hier das Expressionsniveau im Vergleich zum nativen Fibin-Level sehr hoch war.

Eine weitere Beobachtung während der ProteoStat-Färbung war, dass nicht immer eine Co-Lokalisation zwischen Fibin und den gefundenen Aggregaten gegeben war. Zwar konnte jedes Aggregat mit dem ProteoStat-Farbstoff angefärbt werden, doch wiesen nicht alle Aggregate eine Färbung mit dem Fibin Antikörper auf, was auf weitere Aggregate unabhängig von Fibin-Proteinen hindeuten könnte. Eine immunhistochemische Untersuchung mit weiteren Antikörpern für potentielle beteiligte Proteine wurde mit dem Antikörpern gegen Desmin, CryAB und Calnexin durchgeführt. Diese Proteine können, wie unten beschrieben, an einer UPR oder an einer durch Protein-Aggregation induzierte Kardiomyopathien beteiligt sein.

Chaperone, wie das im ER lokalisierte Calnexin, binden unter anderem an fehlgefaltete Proteine. Calnexin verhindert dabei deren Export aus dem ER in den Golgi-Apparat (Williams, 1995). Zusätzlich wurde in einer Studie in COS-7 Zellen (Fibroblasten-Zelllinie), Calnexin als ER-Marker verwendet und die Co-Lokalisation mit Fibrin festgestellt (Lakner et al., 2011). Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine Co-Lokalisation mit Fibrin und die Vermutung liegt nahe, dass es auch hier als Chaperon fungiert, um der Akkumulation von Proteinen entgegen zu wirken, und weitere Aggregationen von entfalteten Proteinen zu verhindern, was zur ER-Qualitätskontrolle beiträgt (Ihara et al., 1999).

In einigen Aggregaten konnte eine Lokalisation des Chaperons α B-Crystallin (CryAB) beobachtet werden. In der Studie von Koyama *et al.* konnte die Funktion von CryAB als Chaperon in kultivierten Astrozyten beobachtet werden. Durch eine Überexpression von CryAB konnten die durch Überexpression des fibrillären Gliazellen-Proteins entstandenen Aggregate aufgelöst werden (Koyama and Goldman, 1999). Eine ähnliche Funktion könnte das Chaperon auch bei den in dieser Arbeit beschriebenen Aggregaten erfüllen. Eine weitere Rolle spielt CryAB im Herzen, da es hier als Chaperon unter anderem für die korrekte Faltung des Desmin-Proteins benötigt wird. Das intermediäre Filamentprotein Desmin ist integraler Bestandteil der Kardiomyozyten und hält die Gesamtstruktur sowie die zytoskeletale Organisation in gestreiften Muskelzellen aufrecht. Eine Desmin-bedingte Kardiomyopathie, welche Desmin Protein-Aggregate in den Zellen aufweist, kann durch Mutationen des Desmin-Gens oder weiterer assoziierter Proteine verursacht werden (McLendon and Robbins 2011). Bei einer Desmin-bedingten Kardiomyopathie sorgt eine gesteigerte Synthese von CryAB für das Abschwächen der mutierten Desmin-Protein Aggregation (Wang et al., 2003). Da der Desmin Antikörper jedoch nicht mit den Aggregaten in dem Fibrin-TG-Herzgewebe kolo-kalisiert ist ein direkter Zusammenhang von einer Fibrin-Überexpression mit einer Desmin-bedingten Kardiomyopathie unwahrscheinlich.

4.4 Protein-Aggregate induzieren ER-Stress in Fibrin-TG Mäusen

Das Endoplasmatische Retikulum ist in der Zelle an einer Reihe von wesentlichen zellulären Prozessen, wie der Faltung von Sekretions- und Membran-Proteinen oder der Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase beteiligt. Die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen, ausgelöst durch eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Faktoren

wie Nährstoffentzug, Kalzium-Erschöpfung oder oxidativem Stress, sorgt für Stress im endoplasmatischen Retikulum und in der Zelle. Vorallem in den Kardiomyozyten ist die Aufrechterhaltung der Homöostase und eine hohe Proteinqualität für ihre Funktion notwendig. Dementsprechend gibt es Zusammenhänge zwischen dem ER-Stress und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Liu et al., 2016a).

Auf den durch Akkumulation von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen induzierten ER-Stress reagiert das ER mit der *unfolded-protein response* (UPR) (Minamino and Kitakaze, 2010). Um dem ER-Stress entgegenzuwirken, induziert die *unfolded protein response* (UPR) eine vorübergehende Verringerung der Translation allgemeiner Proteine und sorgt parallel für eine vermehrte Synthese von Chaperonen und anderen Faltungsproteinen (Badiola et al., 2011). Durch die UPR soll die Proteinproduktion reduziert und durch die Chaperone die Proteinfaltung verbessert werden. Mit diesen Reaktionen soll die Belastung durch die akkumulierten Proteine entfernt und gleichzeitig eine weitere Erhöhung des Stresses durch neue Proteine erst einmal verhindert werden, damit die normale Funktion des ER wiederhergestellt wird.

Die Protein-Aggregate wurden bereits in den nur 8 Wochen alten Fbin-TG-Tieren festgestellt. Daher wurde das Herzgewebe dieser Tiere auf die Expressionslevel verschiedener Chaperone hin mittels Western-Blot-Verfahren überprüft und mit ihren Wildtypgeschwister-Tieren verglichen (s.o. Ergebnisse 3.3.1). Die Analyse des Gewebes der linken Ventrikel ergab eine Hochregulation des schon oben beschriebenen Chaperons Calnexin. Auch war die Expression der Proteindisulfidisomerase (PDI) erhöht. Das genannte Enzym arbeitet zum einen als ein Chaperon, welches die Protein-Aggregation hemmt und katalysiert zum anderen katalysiert es die Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen. Es ist ein Faltungshilfsmittel und sorgt dafür, dass Disulfidbrücken die richtigen Cysteine verbinden (Wilkinson and Gilbert, 2004). Das hohe Expressionslevel dieser Chaperone lässt auf eine hohe Aktivität dieser und auf eine Induktion der UPR schließen.

Wie oben beschrieben ist eine Reihe von Chaperonen an den Signalwegen der UPR beteiligt. Bei der Untersuchung dieser Signalwege wurde auch das Chaperon BiP in den Tieren genauer untersucht. Das Immunglobulin bindende Protein (BiP), auch bekannt als Glukose-reguliertes Protein 78kDa (GR78), wurde in den Fbin-TG-Tieren ebenfalls verstärkt exprimiert. In früheren Arbeiten wie zum Beispiel in denen von Ron und Walter (ER-Stress in Leberzellen der Maus) wurde beschrieben, dass IRE1 α und PERK, zwei für die UPR essenzielle

ER-Transmembran-Effektor-Proteine, durch die Verbindung mit BiP in einem monomeren und somit inaktiven Zustand gehalten werden (Ron and Walter, 2007). Steigt der Spiegel von fehlgefalteten Proteinen in der Zelle an, dissoziiert BiP von den Luminal-Domänen der Proteine IRE1 α und PERK, welche danach spontan oligomerisieren und die UPR-Signalkaskade aktivieren (Ron and Walter, 2007). In den Studien von Ron und Walter korrelierte die Verringerung von BiP mit der Bildung von aktiviertem IRE1 α oder PERK, wohingegen eine Überexpression von BiP die Aktivierung beider Signalwege inhibierte. In dieser Arbeit wurde jedoch ein hoher Spiegel an BiP zusammen mit einem hohen Spiegel an IRE1 α im Gewebe der Fabin-Tiere gemessen. Eine Erklärung hierfür liefern die Ergebnisse von Kimata *et al.*. Dort wurde gezeigt, dass eine IRE1-Regulation unabhängig von BiP induziert werden kann (Kimata *et al.*, 2004). Die Arbeit von Kimata *et al.* zeigte, dass während eines induzierten ER-Stresses in Hefezellen der den Säugetieren entsprechende UPR-Signalweg von IRE1 α unabhängig des Proteins BiP aktiviert werden konnte. Es wurde die Theorie aufgestellt, dass ungefaltete Proteine direkt an IRE1 α binden können, bzw. IRE1 α diese fehlgefalteten Proteine direkt erfassen kann, und auf diese Weise die UPR aktiviert wird. Ein weiterer *in vitro* Versuch an Hefezellen von Gardner *et al.* zeigte eine Bindung von analogem IRE1 α an ungefalteten Proteinen (Gardner and Walter, 2011). Die *in vitro* Versuchen gezeigte von BiP unabhängige Induktion des IRE1 α -Signalweges, könnte in den Fabin-TG-Mäusen *in vivo* zu beobachten sein. Diese Beobachtungen aus den *in vitro* Versuchen, könnten sich in den Ergebnissen dieser Arbeit im murinen Herzgewebe der Fabin-TG-Tiere widerspiegeln. Im Herzgewebe der Fabin-TG-Tiere wurde neben dem erhöhten Vorkommen von BiP auch ein hohes Level des ER-Transmembran-Effektor-Proteins IRE1 α gemessen. So interagiert IRE1 α vermutlich auch, wie in den Hefezellen beobachtet, direkt mit fehlgefalteten Proteinen und induziert die UPR-Signalkaskade trotz einer hohen Menge von BiP.

Eine weitere analysierte UPR-Signalkaskade in dieser Arbeit war die des ER-Transmembran-Effektor-Proteins PERK. PERK sorgt für die Abschwächung der mRNA-Translation unter ER-Stress. Durch die von PERK induzierte Phosphorylierung vom eukaryotischem Translationsinitiationsfaktor 2 (eIF2 α) wird die Polypeptidsynthese gehemmt. Weiterhin wird die eIF2 α -abhängige Translation des aktivierten Transkriptionsfaktors 4 (ATF4) induziert, was wiederum den proapoptotischen Transkriptionsfaktor von CHOP (C/EBP-homologes Protein, GADD153) aktiviert, und zur Einleitung der Apoptose führt (Sano and Reed, 2013).

Da die bisherigen Ergebnisse aus den Fibrin-transgenen-Herzgewebeprobe, wie die hohe Menge an Chaperonen oder von IRE1 α auf eine induzierte UPR schließen ließen, wurde auch eine hohe Expression von PERK im Herzgewebe erwartet, denn PERK stellt den zweiten UPR-Signalweg dar. Jedoch konnte eine hohe Expression von PERK nicht bestätigt werden. Anstatt einer Steigerung war eine Suppression des Proteinlevels von PERK zu beobachten. Um diesen Befund zu verifizieren wurde auch die Expression von CHOP, welches eine Rolle in der UPR-Signalkaskade von PERK spielt, untersucht und ebenfalls eine Herunterregulation des Proteinlevels festgestellt. Das geringe Vorkommen beider Proteine deutet auf eine Blockierung dieses Signalwegs in den Fibrin-TG-Tieren hin. Dies kann durch die oben beschriebenen Beobachtungen von Ron und Walter oder auch von Bertolotti *et al.* erklärt werden. Wie dort beschrieben, hält BiP PERK in einem inaktiven Zustand (Ron and Walter, 2007, Bertolotti et al., 2000a). Wird in der Zelle die UPR durch ER-Stress aktiviert, dissoziiert BiP von PERK und induziert dessen Signalweg. Da BiP sich an die missgefalteten Proteine heftet, nimmt der BiP-Spiegel ab, da PERK nun frei wird und mit sich selbst oligomerisiert, also aktiv wird, steigt die Konzentration. In den *in vitro* Experimenten an COH-Zellen jedoch korrelierte die BiP-Menge weiter mit der von PERK. So induzierte eine Überexpression von BiP eine Inhibierung von PERK. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in unseren erhobenen Daten wider. Im Herzgewebe der Fibrin-TG-Tiere im Vergleich zu den Wildtypmäusen war eine hohe Menge an BiP aber kaum PERK vorhanden. In der Studie von Gomez et al. wurde diese Beobachtung auch als negativer Feedback-Mechanismus beschrieben. In Mäusen, in denen ein chronischer ER-Stress induziert wurde, konnte ebenfalls eine hohe Menge von BiP und eine Suppression von PERK beobachtet werden (Gomez and Rutkowski, 2016).

Die Ergebnisse der Analyse des Herzgewebes deuten somit auf einen durch die Protein-Aggregate induzierten ER-Stress in den Kardiomyozyten der Fibrin-TG-Tiere hin. Eine Hochregulation des Chaperons BiP blockiert den UPR-Signalweg von PERK. IRE1 α kann jedoch unabhängig von BiP mit vorhandenen Protein-Aggregaten agieren, womit schlussendlich dessen Signalkaskade aktiviert und die UPR eingeleitet wird. Um diese Theorie zu unterstützen, könnte in weiterführenden Experimenten der dritte bekannte UPR-Signalweg, der von ATF6 α , untersucht werden.

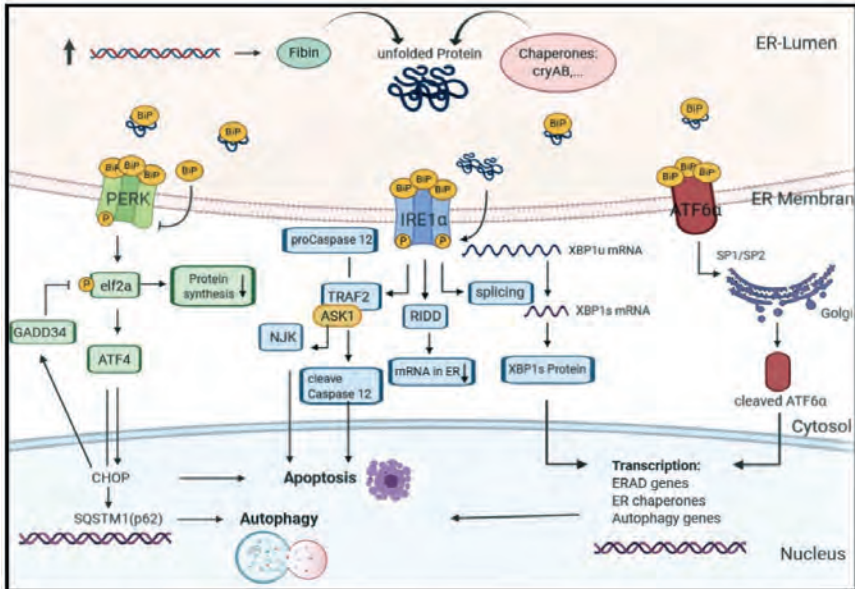


Abbildung 4-1: Durch die Fibin-Überexpression induzierte Aggregate aktivieren die Signalkaskaden der UPR

Die Überexpression von Fibin führt zur Akkumulation von Fibin selbst und weiterer Proteine (u.a. CryAB, Calnexin) wodurch das Endoplasmatische Retikulum (ER) gestresst wird. Im inaktiven Zustand ist BiP an die ER-Transmembranproteine PERK, IRE1 α und ATF6 α gebunden. Durch den ER-Stress induzierte UPR-Signalkaskaden (PERK, IRE1 α und ATF6 α) werden durch die Dissoziation von BiP, aktiviert. Die Signalkaskaden der *unfolded protein response* (UPR) sorgen mit zunehmender Transkription von ER-Faltungs-Chaperonen, von ER-assoziierten Abbaukomponenten (ERAD) und von Autophagie-Genen für die Wiederherstellung der Zellhämostase. Dabei kann das ER-Transmembranprotein IRE1 α auch direkt von Protein-Aggregaten und unabhängig von der Überexpression von BiP aktiviert werden. Der PERK-Signalweg besitzt mehrere negative Rückkopplungsmechanismen, wodurch dieser Weg gehemmt werden kann (Überexpression von BiP oder GADD34). Durch einen länger anhaltenden ER-Stress in der Zelle wird über die UPR-Signalkaskaden die Apoptose eingeleitet.

4.5 Protein-Aggregate blockieren vermutlich den autophagischen Fluss und induzieren zum untersuchten Zeitpunkt keine Apoptose

Um den ER-Stress in der Zelle entgegen zu wirken und eine Wiederherstellung der Zell-Homöostase zu erreichen, induziert die UPR mehrere Signalwege der Autophagie in der Zelle.

So fördert der Signalweg von IRE1 α über das Spleißen der mRNA von XBP1 dessen Produktion

und dessen Bindung an den BECN1-Promotor im Zellkern eine autophagische Reaktion (Rashid et al., 2015).

Der durch die UPR über PERK induzierte eIF2 α /ATF4-Signalweg spielt für die Autophagie ebenfalls eine Rolle, da eine Aktivierung von ATF4 mit der vermehrten Transkription dutzender Autophagie-Gene einhergeht. Daneben bewirkt die Wechselwirkung von ATF4 und CHOP die gesteigerte Transkription von SQSTM1 (p62) (B'Chir et al., 2013). Das SQSTM1-Protein (p62), ist ein multifunktionales Protein und ist mit bei dem autophagischen Abbau von ubiquitinierten Protein-Aggregaten in der Zelle beteiligt (Bjorkoy et al., 2005). Durch seine Wechselwirkung mit LC3-II kann es auch als Autophagie-Marker angesehen werden und wurde in dieser Arbeit auch als ein solcher verwendet (Moscat and Diaz-Meco, 2009, Bjorkoy et al., 2005). Ein weiterer Marker des autophagischen Flusses, welchen wir ebenfalls in den Fbin-TG- Mäusen untersuchten, ist das Protein LC3-II. Durch den dynamischen Umsatz von LC3-II (Umwandlung LC3-I in LC3-II) während des Autophagie-Prozesses kann die autophagische Aktivität gemessen werden (Tanida et al., 2008). Im Herzgewebe der Fbin-TG-Tiere zeigte sich eine signifikant höhere Menge an LC3-II als in den Kontrolltieren, was auf einen hohen autophagischen Fluss hindeutet. Darüber hinaus könnten die mit dem Elektronenmikroskop neben den Aggregaten beobachteten kleineren Konglomerate auf Autophagosomen hindeuten, was ebenfalls für einen aktiven autophagischen Fluss sprechen würde. Generell sind bei Autophagosomen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (je nach Aufbereitung der Proben) eine doppelte oder manchmal mehrfache Membran zu beobachten und das Zytoplasma im Inneren hat die gleiche Morphologie und Elektronendichte wie das externe Zytoplasma. So ist die Identifizierung von Autophagosomen auf diesem Weg schwierig und bedarf einer weitergehenden Untersuchung (Eskelinen, 2008).

Jedoch ist LC3-II in dem autophagischen Prozess nur ein Zwischenprodukt (Autophagosom) und zeigt deswegen nur zu einem bestimmten Zeitpunkt die autophagische Aktivität an. Genauso kann die erhöhte LC3-II Menge für eine Störung des Autophagosomen-Abbaus und Blockierung des autophagischen Flusses sprechen (Mizushima et al., 2010).

Zur weiteren Untersuchung eines in den Fibin-TG-Tieren aktivierten autophagischen Flusses, wurde zudem die Menge des Proteins p62 bestimmt. P62 wird durch LC3-II in das Autophagosom eingebaut, danach durch Autophagie abgebaut und korreliert so mit dem autophagischen Fluss. In den transgenen Mäusen konnte ein hoher Spiegel an p62 festgestellt werden.

Herrscht in Zellen ein Autophagie-Mangel so akkumuliert p62. Somit kann die hohe LC3-II Konzentration in Verbindung mit einer größeren Menge an p62 auf eine Blockade des autophagischen Flusses hindeuten (Mizushima et al., 2010).

Jedoch wurde bereits ein ähnlicher Zustand in D7-des-Mäusen beobachtet. Zeng *et al.* beschreiben dass die Tiere, welche an einer durch Protein-Aggregate induzierten Kardiomyopathie (in den D7-des-Mäusen durch eine Desminmutation) leiden, einen erhöhten Proteinspiegel von p62 und LC3-II im Herzgewebe aufweisen. Jedoch war hier der autophagische Fluss nicht blockiert, sondern wies eine hohe Aktivität in den Tieren auf (Zheng et al., 2011). P62 wurde als eine häufige Komponente in Ubiquitin-positiven Aggregaten beschrieben und kann in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle in der Clearance spielen (Liu et al., 2016b). In den Herzgeweben von D7-des-Mäusen wurde das p62 an den Ubiquitin-positiven Aggregaten gebunden gefunden. Auch die *in vitro* Versuche an NRVCs von Zeng *et al.* zeigten, dass bei einer Überexpression von p62 vorhandene Protein-Aggregate in den Zellen verringert wurden (Zheng et al., 2011). Wie in den D7-des-Mäusen könnte sich auch in den Protein-Aggregaten der Fibin-TG-Tiere das p62 angereichert haben und mit einer hohen Aktivität des autophagischen Flusses assoziiert sein.

Um weitere Erkenntnisse über die Autophagie-Aktivität oder eine mögliche Blockierung des autophagischen Flusses in den Fibin-TG-Mäusen zu gewinnen, könnte eine Kreuzung zwischen Fibin-TG-Tieren, und GFP-RFP-LC3-TG-Mäusen hilfreich sein. Mit der mRFP-GFP-LC3-Maus kann bei einer Beobachtung von erhöhter Autophagosomenanzahl zwischen der Ansammlung durch eine erhöhte Induktion der Autophagie oder einer Blockade des lysosomalen Abbaus oder beidem unterschieden werden. Mittels Fluoreszenz sichtbar

gemachter „RFP-, und GFP-Puncta“ (Autophagosome in der Zelle und Marker der Autophagie) kann der autophagische Fluss ermittelt werden (Moulis and Vindis, 2017).

Hält der durch eine Belastung induzierte ER-Stress weiterhin an und kann die Homöostase der Zelle nicht wiederhergestellt werden, wird der Plan in der Zelle geändert. Nun werden die pro-apoptotischen Signalwege der UPR induziert.

Einer der wichtigsten Signalwege ist der durch PERK induzierte apoptotische Signalweg über das C/EBP-homologe Protein (CHOP). Dieser wird durch den aktivierten Transkriptionsfaktor 4 (ATF4) induziert. Die für die Apoptose wichtigen Zielgene, die durch CHOP induziert werden sind zum Beispiel DR5 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing-ligand/TRAIL-R2), ein Caspase-aktivierender Zelloberflächentodesrezeptor der Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie. Zudem spielt es auch eine Rolle in der Signalvermittlungen der pro-apoptotische Bcl-2-Protein Familie (Sano and Reed, 2013).

Jedoch war in den Fibrin-TG-Tieren nur eine geringe Menge an den Proteinen PERK sowie CHOP feststellbar, was eine Apoptose auf diesem Signalweg vermutlich ausschließt.

Weitere Signalwege der Apoptose können auch über den Weg von IRE1 α aktiviert werden. In den Fibrin-TG-Mäusen wäre eine Induktion der Apoptose über IRE1 α möglich, da in den Mäusen ein hoher Spiegel des Proteins vorhanden war. Eine Möglichkeit ist dabei eine Apoptoseeinleitung durch IRE1 α selbst. Seine C-terminale cytosolische Domäne hat neben der Proteinkinase- auch eine Endoribonukleaseaktivität. Somit spaltet IRE1 α nicht nur wie beschrieben die mRNA des XBP-1-Proteins, sondern auch andere mRNA, was als regulierter IRE1 α -abhängiger Zerfall von mRNA (RIDD) beschrieben ist (Sano and Reed, 2013)

Weiterhin führt die Wechselwirkung von IRE1 α und TRAF2 (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 2) zu einer Aktivierung der c-Jun N-terminalen inhibitorischen Kinase (JNK), was auch zu einer Einleitung der Apoptose führen kann (Yoneda et al., 2001).

Eine weitere Induktion der Apoptose kann durch die Caspasen erfolgen. In dieser Arbeit war vor allem die Caspase-12 von Bedeutung, da diese meist mit dem ER-Stress in einer Zelle assoziiert wird (Nakagawa et al., 2000). Darüber hinaus kann Caspase-12 über den IRE1 α Signalweg aktiviert werden (Yoneda et al., 2001). Im murinen Herzgewebe der Fibrin-TG-Mäuse konnte ein hoher Spiegel der aktivierten Form Caspase-12 (cleaved Caspase-12) festgestellt werden, was auf eine Einleitung der Apoptose auf diesem Weg hindeutet. Eine Studie von Nakagawa *et al.* konnte eine Einleitung der Apoptose in Caspase-12 defizienten

Mäusen zeigen (Nakagawa et al., 2000). Die Beobachtung einer weiteren Studie war eine durch Thapsigargin-induzierte ER-Stress induzierte Apoptose, unabhängig von erhöhter Regulation von Caspase-12 in B16/B16-Melanomzellen (Kalai et al., 2003). Somit kann noch nicht ausgeschlossen werden, ob eventuell doch ein weiterer noch nicht untersuchter Weg zur Apoptoseeinleitung vorliegt. Eine genauere Untersuchung der Apoptose könnte hier anhand eines TUNEL-Assays erfolgen.

4.6 Induktion einer Kardiomyopathie in Fibrin-TG-Tieren durch Protein-Aggregate

In der Basischarakterisierung der Fibrin-TG-Mäuse zeigten die Tiere aller 3 Linien mit einer jeweils unterschiedlich hohen kardialen Fibrin-Überexpression keine signifikanten Differenzen zu ihren C57BL/6N-Geschwistern, doch war nach 6 Monaten eine entstehende oder bereits vorhandene dilatative Kardiomyopathie durch die echokardiographischen Parameter in den Fibrin-TG-Tieren zu beobachten. In den weiteren untersuchten Herzhypertrophie-Mausmodellen (TAC sowie die Kreuzung mit CnA-TG-Tieren) konnte keine Verbesserung der Herzfunktion durch eine kardiale Fibrin-Überexpression erzeugt werden. Im Kreuzungsmodell mit Calcineurin-Überexpression wurde sogar eine gravierende Verschlechterung der Herzfunktion, welche sich durch einen vergrößerten rechten Ventrikel, ein geringeres Körpergewicht und eine hohe frühzeitige Sterblichkeitsrate zeigte, festgestellt.

Die Ursache für dieses Ergebnis könnte an den histologisch beobachteten intrazellulären Ablagerungen liegen. Diese Ablagerungen, welche sich als Protein-Aggregate herausstellten, könnten durch ihre intrazelluläre Lage die Kardiomyozyten in ihrer zellulären Homöostase und Funktion behindern. Schon in mehreren Patientenfällen wurde berichtet, dass durch Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen und daraus resultierender Proteotoxizität Herzkreislauf-Erkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes mellitus und Krebs assoziiert sind (Wang and Hill, 2015, Kim et al., 2013). Die durch intrazelluläre Protein-Aggregation verursachten Kardiomyopathien beim Menschen, wie auch in der Maus, werden vor allem durch Mutationen von Genen wie Desmin oder α B-Crystallin (CryAB) ausgelöst (Xu et al., 2017). Da bisher noch keine Überexpression von Fibrin in einem Mausmodell erzeugt worden ist, waren die phänotypischen Auswirkungen in den Tieren noch unbekannt. Die genaue Struktur des Fibrin-Proteins ist immer noch nicht gänzlich aufgeschlüsselt. *In vitro* Experimente in CO7-Zellen zeigten eine hohe Aggregationstendenz des Fibrin-Proteins (Lakner et al., 2011). Die Vermutung liegt nahe, dass durch die kardiale Überexpression von

Fibin Proteine in den Kardiomyozyten akkumulieren und so die Aggregate entstehen. Trotz der hohen Fibin-Expression, welcher ein Grund der Aggregation sein könnte, ist aber Fibin allein, sondern auch andere Proteine, wie zum Beispiel CryAB nachweisbar.

Um weitere Bestandteile der Aggregate genauer zu untersuchen, könnte man deren Inhalt mittels Massenspektrometrie (MS) in Kombination mit Flüssigkeitschromatographie (LC) analysieren. In dieser Methode werden Proteingemische zu Beginn enzymatisch in kürzere Fragmente geschnitten, dann chromatographisch getrennt und schließlich mit Hilfe des Massenspektrometers charakterisiert. Die entstehenden MS-Signale können über Tandemmassenspektrometrie analysiert und mittels Proteindatenbanken und Suchalgorithmen automatisch den entsprechenden Peptidsequenzen zugeteilt werden (Aebersold and Mann, 2003).

Die hohe Menge an Chaperonen und des an der UPR beteiligten IRE1 α spricht für eine Aktivierung der *unfolded-protein-response* (UPR) in den Zellen, welche durch Protein-Aggregate induziert werden kann (Hofmann et al., 2019). Die niedrige Menge an PERK und des im Signalweg folgenden ebenfalls weniger vorkommenden Proteins CHOP, hängen dabei mit dem hohen Vorkommen von BiP zusammen. Durch die erhöhte Menge von BiP wird die UPR-Signalkaskade von PERK mittels eines negativen Feedback-Mechanismus blockiert, weswegen PERK und CHOP runterreguliert sind (Gomez and Rutkowski, 2016).

Gefolgt von der Aktivierung der UPR-Signalkaskaden im Herzgewebe der Fibin-TG-Tiere könnte auch ein erhöhter autophagischer Fluss in den Tieren vorhanden sein, um die Protein-Aggregate abzubauen (Rashid et al., 2015). Der erhöhte Spiegel von LC3-II und p62 in den Fibin-TG-Tieren könnte darauf hindeuten. Ob es sich um eine Blockierung des autophagischen Flusses handelt oder ob p62 in den Zellen als Adaptermolekül in Verbindung zwischen ubiquitinierten Proteinen und der autophagischen Maschinerie, wie in den von Zeng et al. beschriebenen D7-des-Mausmodell (eine induzierte Kardiomyopathie durch eine Mutation in Desmin) arbeitet und hilft die Aggregate abzubauen, ist noch unklar (Zheng et al., 2011, Pankiv et al., 2007).

Durch die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen der Fibin-TG-Mauslinie können bisher weder einen induzierten oder geblockten autophagischen Prozess (die Proteine LC3-II und p62 sind beide erhöht) noch eine vorhandene Apoptose (keine Effektor-Caspase Aktivität und eine Runteriregulierung des Protein CHOP und damit seines proapoptischen

Signalweges) der Kardiomyozyten bestätigt werden (s.o. Pkt. 4.5). Die Hypothese zu diesem Zeitpunkt ist, dass die Kardiomyozyten in den 8 Wochen alten Fibrin-TG-Tieren, den durch die Protein-Aggregate induzierten ER-Stress noch kompensieren können.

Wahrscheinlich kann der chronisch belastende „Stress“ in den 6 Monate alten Tieren nicht mehr von den Kardiomyozyten kompensiert werden und die Apoptose in den Zellen wird induziert. Die Folgen sind damit eine Herzfunktionsstörung, welche sich durch eine geschwächte Ejektionsfraktion sowie Verkürzungsfraktion zeigt.

4.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit sollte der in *in vitro* Experimenten gezeigte protektive Effekt von Fibrin gegen die kardiale Hypertrophie *in vivo* (im Mausmodell) überprüft werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine vollkommen neue genetisch modifizierte Mauslinie generiert, welche eine Fibrin-Überexpression spezifisch im Herzen aufweist.

In der echokardiographischen und morphometrischen Basischarakterisierung von 8 Wochen alten Fibrin-TG-Mäusen zeigte sich kein pathologischer Phänotyp in beiden Geschlechtern. Erst durch eine zusätzliche Belastung, welche durch einen künstlich erzeugten Druck (TAC), durch eine genetische Mutation (Kreuzung mit CnA-TG-Tieren) oder Alterung der Tiere induziert wurde, verschlechterte sich die Pumpleistung und die Herzfunktion gravierend.

Die Herzfunktionsstörungen der Tiere lassen sich vermutlich auf die in den Mäusen festgestellten Protein-Aggregate im Herzgewebe zurückführen. Die zum größten Teil Fibrin-haltigen Aggregate, sind wahrscheinlich die Folge der Fibrin- Überexpression in den Zellen, da das Fibrin-Protein eine hohe Aggregationstendenz besitzt. Zwar konnte die Beteiligung von anderen Proteinen in den Aggregaten festgestellt werden, doch ein Großteil der Zusammensetzung ist noch unbekannt. Letztendlich induzieren die Protein-Aggregate einen ER-Stress, welcher zur Autophagie und später zur Apoptose der Kardiomyozyten führen könnte und sich in der schlechteren Herzfunktion bei Belastung der Tiere manifestiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich der protektive Effekt einer Fibrin-Überexpression gegen kardiale Hypertrophie, der *in vitro* (in isolierten Rattenkardiomyozyten) festgestellt wurde, *in vivo* in einem Gesamtorganismus (hier: Maus) nicht bestätigen lässt.

Neben der Übertragung der Versuche von *in vitro* zu *in vivo* sollte jedoch nicht nur die Überlegung von der einzelnen Zelle auf einen Gesamtorganismus, sondern auch der hier bestehende Wechsel der Spezies (Rattenkardiomyozyten zu Mausmodell) betrachtet werden. Trotz einer hohen Ähnlichkeit der beiden Spezies in ihrem Aussehen unterscheiden sich Maus und Ratte jedoch in der Struktur der Kardiomyozyten.

Mauskardiomyozyten weisen zum Beispiel eine höhere Anzahl der Isoformen der schweren Kette von Myosin als bei Ratten oder Menschen auf, was für schnellere Kontraktions- und Relaxationskinetik sorgt (Milani-Nejad and Janssen, 2014, Alpert et al., 2002). Somit erliegen Rattenherzen einer etwas langsameren Kinetik der Kontraktion und Entspannung als Mäuse (Milani-Nejad and Janssen, 2014). Dadurch könnte die Fibin-Überexpression in den Mauskardiomyozyten andere Auswirkungen haben als die in Ratten. So muss auch der Aspekt der Übertragbarkeit unterschiedlicher Spezies und nicht nur von Maus zu Mensch sondern auch von Ratte zu Maus bedacht werden.

Mit dem aus dieser Arbeit erlangten Ergebnissen kann die kardiale Überexpression von Fibin nicht als Ansatz für neue Therapien gegen die kardiale Hypertrophie angesehen werden. Zusätzlich konnten durch diese Arbeit neue Rückschlüsse auf die Funktion und auf neue Eigenschaften des Fibin-Proteins gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

Die kardiale Hypertrophie ist die Anpassung des Herzens an eine hämodynamische Druck- oder Volumenbelastung und ist assoziiert mit einer Reihe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Sie gilt als ein unabhängiger Risikofaktor für den plötzlichen Herztod und die Herzinsuffizienz.

Ziel dieser Arbeit war es, eine kardioprotektive Wirkung von Fibrin (*Fin bud initiationsfactor*) *in vivo* zu untersuchen.

In Vorarbeiten konnte im Herzgewebe von männlichen C57BL/6N-Mäusen, in denen eine kardiale Hypertrophie induziert worden war, eine Regulation des Fibrin-Gens beobachtet werden. In den *in vitro* Experimenten an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigte eine adenoviral erzeugte Fibrin-Überexpression einen protektiven Effekt gegen eine mit Phenylephrin in den Zellen induzierte kardiale Hypertrophie, sodass in dieser Arbeit die Hypothese einer protektiven Wirkung von Fibrin in verschiedenen Hypertrophie-Mausmodellen *in vivo* überprüft wurde.

Es wurden drei transgene Mauslinien generiert, welche das Fibrin-Protein spezifisch im Herzen (niedrig, mittel und hoch) überexprimieren. Mit einem Alter von 8 Wochen wurden die Tiere basal echokardiographisch charakterisiert. In diesem Alter war kein belasteter Phänotyp feststellbar, trotz Hochregulation von Hypertrophie-Markern. In den Hypertrophie-Modellen (TAC, Kreuzung mit Calcineurin transgenen Mäusen) konnte jedoch keine funktionale Verbesserung und sogar eine geringere Pumpleistung des Herzens festgestellt werden. Darüber hinaus wurde in 6 Monate alten Fibrin-TG-Tieren eine gestörte Herzfunktion beobachtet, die zudem durchschnittlich nach dem 8ten Lebensmonat verstarben.

In den Fibrin-TG-Tieren wurden *in vitro* und auch *in vivo* intrazelluläre Ablagerungen im Herzgewebe beobachtet, welche sich nach weiteren Untersuchungen als Fibrin haltige Protein-Aggregate herausstellten. Weitere Untersuchungen des Herzgewebes deuteten auf einen im ER lokalisierten „Stress“ in den Zellen hin. Dieser Stress kann anschließend zum Tod der Zellen führen. Eine zusätzliche Belastung durch TAC bzw. CnA-Kreuzung der Tiere förderte vermutlich neben den Protein-Aggregaten auch der durch diese ausgelösten ER-Stress in den Kardiomyozyten was sich in einer ausgeprägten Kardiomyopathie der Tiere äußerte.

Daher konnte eine kardioprotektive Wirkung von Fibrin *in vivo* in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

6 Summary

Cardiac hypertrophy is the adaptation of the heart to a hemodynamic pressure or volume load and is associated with a lot of cardiovascular diseases. It is considered to be an independent risk factor for sudden cardiac death and heart failure. The aim of this work was to investigate the cardioprotective effect of fibin (fin bud initiation factor) *in vivo*. In previous experiments, an upregulation of the fibin gene was observed in the heart tissue of male C57BL / 6N mice in which cardiac hypertrophy had been induced. In the *in vitro* experiments on isolated neonatal rat cardiomyocytes, a fibin overexpression induced by an adenovirus showed a protective effect against cardiac hypertrophy induced with phenylephrine (PE) administration in the cells. In this project our hypothesis of a protective effect of fibin against cardiac hypertrophy should be checked in various hypertrophy mouse models. Transgenic mouse lines were generated which overexpressed a cardiac specific fibin protein in 3 different concentrations (low, medium and high). At the age of 8 weeks, we did a basic characterization of the heart function with echocardiography. At this age, no stressed phenotype was detectable. Only an upregulation of hypertrophy markers was observed. In the hypertrophy models (TAC, crossbreeding with calcineurin transgenic mice), however no functional improvement could be determined. Even a worse heart function was found. An impaired cardiac function was observed in 6-month-old Fibin-TG animals as well. In the Fibin-TG animals, intracellular deposits were observed in the heart tissue *in vitro* and also *in vivo*, which after further investigations turned out to be fibin-containing protein aggregates. Further examinations of the heart tissue of Fibin-TG-mice showed a "stress" of the ER in the cells. This stress can subsequently lead to cell death. An additional exposure to TAC or a crossbreed with the CnA-mouseline presumably promoted the ER stress of the cells in addition to the protein aggregates, which was expressed in a pronounced cardiomyopathy of the animals. Therefore, a cardioprotective effect of fibin *in vivo* could not be confirmed in this work.

7 Literaturverzeichnis

- ADACHI, Y., YAMAMOTO, K., OKADA, T., YOSHIDA, H., HARADA, A. & MORI, K. 2008. ATF6 Is a Transcription Factor Specializing in the Regulation of Quality Control Proteins in the Endoplasmic Reticulum. *Cell Structure and Function*, 33, 75-89.
- AEBERSOLD, R. & MANN, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 198-207.
- AHN, D. G., KOURAKIS, M. J., ROHDE, L. A., SILVER, L. M. & HO, R. K. 2002. T-box gene *tbx5* is essential for formation of the pectoral limb bud. *Nature*, 417, 754-758.
- ALPERT, N. R., BROSSEAU, C., FEDERICO, A., KRENZ, M., ROBBINS, J. & WARSHAW, D. M. 2002. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H1446-54.
- ANANIA, V. G., YU, K., GNAD, F., PFERDEHIRT, R. R., LI, H., MA, T. P., JEON, D., FORTELYNY, N., FORREST, W., ASHKENAZI, A., OVERALL, C. M. & LILL, J. R. 2016. Uncovering a Dual Regulatory Role for Caspases During Endoplasmic Reticulum Stress-induced Cell Death. *Mol Cell Proteomics*, 15, 2293-307.
- ARGON, Y. & SIMEN, B. B. 1999. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 495-505.
- B'CHIR, W., MAURIN, A. C., CARRARO, V., AVEROUS, J., JOUSSE, C., MURANISHI, Y., PARRY, L., STEPIEN, G., FAFOURNOUX, P. & BRUHAT, A. 2013. The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*, 41, 7683-99.
- BADIOLA, N., PENAS, C., MINANO-MOLINA, A., BARNEDA-ZAHONERO, B., FADO, R., SANCHEZ-OPAZO, G., COMELLA, J. X., SABRIA, J., ZHU, C., BLOMGREN, K., CASAS, C. & RODRIGUEZ-ALVAREZ, J. 2011. Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis*, 2, e149.
- BERNARDO, B. C., WEEKS, K. L., PRETORIUS, L. & MCMULLEN, J. R. 2010. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, 128, 191-227.
- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-29.
- BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y., HENDERSHOT, L. M., HARDING, H. P. & RON, D. 2000a. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2, 326-32.
- BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y. H., HENDERSHOT, L. M., HARDING, H. P. & RON, D. 2000b. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2, 326-332.

- BERTOLOTTI, A., WANG, X., NOVOA, I., JUNGREIS, R., SCHLESSINGER, K., CHO, J. H., WEST, A. B. & RON, D. 2001. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 107, 585-93.
- BJORKOY, G., LAMARK, T., BRECH, A., OUTZEN, H., PERANDER, M., OVERVATN, A., STENMARK, H. & JOHANSEN, T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 603-14.
- BJORKOY, G., LAMARK, T., PANKIV, S., OVERVATN, A., BRECH, A. & JOHANSEN, T. 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-97.
- BOATRIGHT, K. M. & SALVESEN, G. S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 725-31.
- BOATRIGHT, K. M., RENATUS, M., SCOTT, F. L., SPERANDIO, S., SHIN, H., PEDERSEN, I. M., RICCI, J. E., EDRIS, W. A., SUTHERLIN, D. P., GREEN, D. R. & SALVESEN, G. S. 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*, 11, 529-41.
- BOLOGNESI, B. & LEHNER, B. 2018. Reaching the limit. *Elife*, 7.
- BUENO, O. F., LIPS, D. J., KAISER, R. A., WILKINS, B. J., DAI, Y. S., GLASCOCK, B. J., KLEVITSKY, R., HEWETT, T. E., KIMBALL, T. R., ARONOW, B. J., DOEVENDANS, P. A. & MOLKENTIN, J. D. 2004. Calcineurin A beta gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction. *Circulation Research*, 94, 91-99.
- BUENO, O. F., WILKINS, B. J., TYMITZ, K. M., GLASCOCK, B. J., KIMBALL, T. F., LORENZ, J. N. & MOLKENTIN, J. D. 2002. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin A β -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4586-91.
- CAZANAVE, S. C., ELMI, N. A., AKAZAWA, Y., BRONK, S. F., MOTT, J. L. & GORES, G. J. 2010. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, G236-43.
- CHEN, Y. & BRANDIZZI, F. 2013. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol*, 23, 547-55.
- CHEVET, E., SMIRLE, J., CAMERON, P. H., THOMAS, D. Y. & BERGERON, J. J. 2010. Calnexin phosphorylation: linking cytoplasmic signalling to endoplasmic reticulum lumenal functions. *Semin Cell Dev Biol*, 21, 486-90.
- CHIONCEL, O., COLLINS, S. P., AMBROSY, A. P., GHEORGHIADE, M. & FILIPPATOS, G. 2015. Pulmonary Oedema-Therapeutic Targets. *Card Fail Rev*, 1, 38-45.
- CONRAD, C. H., BROOKS, W. W., HAYES, J. A., SEN, S., ROBINSON, K. G. & BING, O. H. 1995. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*, 91, 161-70.

- DAVIES, K. J., ERMAK, G., ROTHERMEL, B. A., PRITCHARD, M., HEITMAN, J., AHNN, J., HENRIQUE-SILVA, F., CRAWFORD, D., CANAIDER, S., STRIPPOLI, P., CARINCI, P., MIN, K. T., FOX, D. S., CUNNINGHAM, K. W., BASSEL-DUBY, R., OLSON, E. N., ZHANG, Z., WILLIAMS, R. S., GERBER, H. P., PEREZ-RIBA, M., SEO, H., CAO, X., KLEE, C. B., REDONDO, J. M., MALTAIS, L. J., BRUFORD, E. A., POVEY, S., MOKKENTIN, J. D., MCKEON, F. D., DUH, E. J., CRABTREE, G. R., CYERT, M. S., DE LA LUNA, S. & ESTIVILL, X. 2007. Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J*, 21, 3023-8.
- DE MEYER, G. R. & MARTINET, W. 2009. Autophagy in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1485-95.
- DE ALMEIDA, A. C., VAN OORT, R. J. & WEHRENS, X. H. 2010. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp*.
- DOLATSHAD, H., BIGGS, D., DIAZ, R., HORTIN, N., PREECE, C. & DAVIES, B. 2015. A versatile transgenic allele for mouse overexpression studies. *Mamm Genome*, 26, 598-608.
- DOROUDGAR, S., THUERAUF, D. J., MARCINKO, M. C., BELMONT, P. J. & GLEMBOTSKI, C. C. 2009. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 29735-45.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ESKELINEN, E. L. 2008. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*, 4, 257-60.
- FABIATO, A. 1983. Calcium-Induced Release of Calcium from the Cardiac Sarcoplasmic-Reticulum. *American Journal of Physiology*, 245, C1-C14.
- FAN, T. J., HAN, L. H., CONG, R. S. & LIANG, J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 37, 719-27.
- FEWELL, S. W., TRAVERS, K. J., WEISSMAN, J. S. & BRODSKY, J. L. 2001. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annual Review of Genetics*, 35, 149-191.
- FRANK, D., KUHN, C., KATUS, H. A. & FREY, N. 2006. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl)*, 84, 446-68.
- FREY, N., RICHARDSON, J. A. & OLSON, E. N. 2000. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14632-7.
- FREY, N. & OLSON, E. N. 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*, 65, 45-79.
- FRIBLEY, A., ZHANG, K. & KAUFMAN, R. J. 2009. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol*, 559, 191-204.
- GARDIN, J. M. & LAUER, M. S. 2004. Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer? *JAMA*, 292, 2396-8.

- GARDNER, B. M. & WALTER, P. 2011. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*, 333, 1891-4.
- GETHING, M. J. 1999. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 465-72.
- GIBERT, Y., GAJEWSKI, A., MEYER, A. & BEGEMANN, G. 2006. Induction and prepatterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling. *Development*, 133, 2649-2659.
- GOLDSTEIN, I. J. & HAYES, C. E. 1978. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 35, 127-340.
- GOMEZ, J. A. & RUTKOWSKI, D. T. 2016. Experimental reconstitution of chronic ER stress in the liver reveals feedback suppression of BiP mRNA expression. *Elife*, 5.
- GROENENDYK, J., SREENIVASIAH, P. K., KIM, D. H., AGELLON, L. B. & MICHALAK, M. 2010a. Biology of Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circulation Research*, 107, 1185-1197.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y. & RON, D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397, 271-4.
- HARDING, H. P., NOVOA, I., ZHANG, Y. H., ZENG, H. Q., WEK, R., SCHAPIRA, M. & RON, D. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6, 1099-1108.
- HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295, 1852-8.
- HEINEKE, J. & MOKKENTIN, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 589-600.
- HILL, J. A. & OLSON, E. N. 2008. Mechanisms of disease: Cardiac plasticity. *New England Journal of Medicine*, 358, 1370-1380.
- HOFMANN, C., KATUS, H. A. & DORODGAR, S. 2019. Protein Misfolding in Cardiac Disease. *Circulation*, 139, 2085-2088.
- HOLLIN, J. & WEISSMAN, J. S. 2006. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*, 313, 104-7.
- HONG, M., LI, M. Q., MAO, C. H. & LEE, A. S. 2004. Endoplasmic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92, 723-732.
- HURTLEY, S. M., BOLE, D. G., HOOVER-LITTY, H., HELENIUS, A. & COPELAND, C. S. 1989. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol*, 108, 2117-26.
- IHARA, Y., COHEN-DOYLE, M. F., SAITO, Y. & WILLIAMS, D. B. 1999. Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Molecular Cell*, 4, 331-341.
- ISOYAMA, S. & NITTA-KOMATSUBARA, Y. 2002. Acute and chronic adaptation to hemodynamic overload and ischemia in the aged heart. *Heart Fail Rev*, 7, 63-9.

- KADOWAKI, H. & NISHITOH, H. 2013. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes (Basel)*, 4, 306-33.
- KALAI, M., LAMKANFI, M., DENECKER, G., BOOGMANS, M., LIPPENS, S., MEEUS, A., DECLERCQ, W. & VANDENABEELE, P. 2003. Regulation of the expression and processing of caspase-12. *J Cell Biol*, 162, 457-67.
- KANG, P. M. & IZUMO, S. 2003. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9, 177-182.
- KAVEY, R. E. 2013. Left ventricular hypertrophy in hypertensive children and adolescents: predictors and prevalence. *Curr Hypertens Rep*, 15, 453-7.
- KERAMIDA, K., LAZAROS, G. & NIHOYANNOPOULOS, P. 2018. Right ventricular involvement in hypertrophic cardiomyopathy: Patterns and implications. *Hellenic J Cardiol*.
- KIM, Y. E., HIPPEL, M. S., BRACHER, A., HAYER-HARTL, M. & HARTL, F. U. 2013. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem*, 82, 323-55.
- KIMATA, Y., OIKAWA, D., SHIMIZU, Y., ISHIWATA-KIMATA, Y. & KOHNO, K. 2004. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol*, 167, 445-56.
- KLEE, C. B., REN, H. & WANG, X. T. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 13367-13370.
- KOHNO, K. 2010. Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *J Biochem*, 147, 27-33.
- KOMURO, I. & YAZAKI, Y. 1993. Control of Cardiac Gene-Expression by Mechanical-Stress. *Annu Rev Physiol*, 55, 55-75.
- KOPITO, R. R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, 10, 524-30.
- KOUKOURAKIS, M. I., KALAMIDA, D., GIATROMANOLAKI, A., ZOIS, C. E., SIVRIDIS, E., POULILIOU, S., MITRAKAS, A., GATTER, K. C. & HARRIS, A. L. 2015. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS One*, 10, e0137675.
- KOYAMA, Y. & GOLDMAN, J. E. 1999. Formation of GFAP cytoplasmic inclusions in astrocytes and their disaggregation by alphaB-crystallin. *Am J Pathol*, 154, 1563-72.
- KREBS, J. 1998. The role of calcium in apoptosis. *Biometals*, 11, 375-82.
- KRENNING, G., ZEISBERG, E. M. & KALLURI, R. 2010. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*, 225, 631-7.
- KUZNETSOV, G., BROSTROM, M. A. & BROSTROM, C. O. 1992. Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 3932-9.

- KYRYLKOVA, K., KYRYACHENKO, S., LEID, M. & KIOUSSI, C. 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*, 887, 41-7.
- LAKDAWALA, N. K., WINTERFIELD, J. R. & FUNKE, B. H. 2013. Dilated cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 6, 228-37.
- LAKNER, J., SEYER, C., HERMSDORF, T. & SCHONEBERG, T. 2011. Characterization of the expression, promoter activity and molecular architecture of fibin. *BMC Biochem*, 12, 26.
- LIU, M. & DUDLEY, S. C., JR. 2015. Role for the Unfolded Protein Response in Heart Disease and Cardiac Arrhythmias. *Int J Mol Sci*, 17.
- LIU, M. Q., CHEN, Z. & CHEN, L. X. 2016a. Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37, 425-43.
- LIU, W. J., YE, L., HUANG, W. F., GUO, L. J., XU, Z. G., WU, H. L., YANG, C. & LIU, H. F. 2016b. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*, 21, 29.
- LUEDDE, M., KATUS, H. A. & FREY, N. 2006. Novel molecular targets in the treatment of cardiac hypertrophy. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 1, 1-20.
- LUTHER, P. K. 2009. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil*, 30, 171-85.
- MACLELLAN, W. R. & SCHNEIDER, M. D. 2000. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol*, 62, 289-319.
- MAKANAE, K., KINTAKA, R., MAKINO, T., KITANO, H. & MORIYA, H. 2013. Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res*, 23, 300-11.
- MALHOTRA, J. D. & KAUFMAN, R. J. 2007. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 716-31.
- MAN, J., BARNETT, P. & CHRISTOFFELS, V. M. 2018. Structure and function of the Nppa-Nppb cluster locus during heart development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 75, 1435-1444.
- MARON, B. J., TOWBIN, J. A., THIENE, G., ANTZELEVITCH, C., CORRADO, D., ARNETT, D., MOSS, A. J., SEIDMAN, C. E. & YOUNG, J. B. 2006. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113, 1807-16.
- MAUREL, M., DEJEANS, N., TAOUJI, S., CHEVET, E. & GROSSET, C. F. 2013. MicroRNA-1291-mediated silencing of IRE1alpha enhances Glypican-3 expression. *RNA*, 19, 778-88.
- MAUREL, M., CHEVET, E., TAVERNIER, J. & GERLO, S. 2014. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci*, 39, 245-54.

- MCCULLOUGH, K. D., MARTINDALE, J. L., KLOTZ, L. O., AW, T. Y. & HOLBROOK, N. J. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21, 1249-59.
- MCILWAIN, D. R., BERGER, T. & MAK, T. W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a008656.
- MCLENDON, P. M. & ROBBINS, J. 2011. Desmin-related cardiomyopathy: an unfolding story. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H1220-8.
- MEIDELL, R. S., SEN, A., HENDERSON, S. A., SLAHETKA, M. F. & CHIEN, K. R. 1986. Alpha 1-adrenergic stimulation of rat myocardial cells increases protein synthesis. *Am J Physiol*, 251, H1076-84.
- MERCADER, N., FISCHER, S. & NEUMANN, C. J. 2006. Prdm1 acts downstream of a sequential RA, Wnt and Fgf signaling cascade during zebrafish forelimb induction. *Development*, 133, 2805-15.
- METZGER, M. B., HRISTOVA, V. A. & WEISSMAN, A. M. 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci*, 125, 531-7.
- MILANI-NEJAD, N. & JANSSEN, P. M. 2014. Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacol Ther*, 141, 235-49.
- MINAMINO, T. & KITAKAZE, M. 2010. ER stress in cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 1105-1110.
- MIZUSHIMA, N. & LEVINE, B. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*, 12, 823-30.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & LEVINE, B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140, 313-26.
- MOLKENTIN, J. D., LU, J. R., ANTOS, C. L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S. R. & OLSON, E. N. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 93, 215-228.
- MORI, K. 2003. Frame switch splicing and regulated intramembrane proteolysis: key words to understand the unfolded protein response. *Traffic*, 4, 519-28.
- MORI, K. 2009. Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem*, 146, 743-50.
- MOSCAT, J. & DIAZ-MECO, M. T. 2009. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*, 137, 1001-4.
- MOULIS, M. & VINDIS, C. 2017. Methods for Measuring Autophagy in Mice. *Cells*, 6.
- MUDD, J. O. & KASS, D. A. 2008. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, 451, 919-928.

- NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B. A. & YUAN, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103.
- NG, J. K., KAWAKAMI, Y., BUSCHER, D., RAYA, A., ITOH, T., KOTH, C. M., RODRIGUEZ ESTEBAN, C., RODRIGUEZ-LEON, J., GARRITY, D. M., FISHMAN, M. C. & IZPISUA BELMONTE, J. C. 2002. The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development*, 129, 5161-70.
- NOIVA, R. 1999. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 481-93.
- PANKIV, S., CLAUSEN, T. H., LAMARK, T., BRECH, A., BRUUN, J. A., OUTZEN, H., OVERVATN, A., BJORKOY, G. & JOHANSEN, T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282, 24131-45.
- RAJAN, R. S., ILLING, M. E., BENICE, N. F. & KOPITO, R. R. 2001. Specificity in intracellular protein aggregation and inclusion body formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13060-5.
- RASHID, H. O., YADAV, R. K., KIM, H. R. & CHAE, H. J. 2015. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, 11, 1956-1977.
- RON, D. & WALTER, P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-29.
- SAMAK, M., FATULLAYEV, J., SABASHNIKOV, A., ZERIOUH, M., SCHMACK, B., FARAG, M., POPOV, A. F., DOHMEN, P. M., CHOI, Y. H., WAHLERS, T. & WEYMANN, A. 2016. Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic Res*, 22, 75-9.
- SANNA, B., BRANDT, E. B., KAISER, R. A., PFLUGER, P., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., VAN ROOIJ, E., DE WINDT, L. J., ROTHENBERG, M. E., TSCHOP, M. H., BENOIT, S. C. & MOLKENTIN, J. D. 2006. Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7327-32.
- SANO, R. & REED, J. C. 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3460-3470.
- SCHLOSSAREK, S., FREY, N. & CARRIER, L. 2014. Ubiquitin-proteasome system and hereditary cardiomyopathies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 71, 25-31.
- SCHRODER, M. & KAUFMAN, R. J. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-89.
- SCHWARZ, D. S. & BLOWER, M. D. 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 73, 79-94.
- SEMSARIAN, C., INGLES, J., MARON, M. S. & MARON, B. J. 2015. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 65, 1249-1254.

- SENF, D. & RONAI, Z. A. 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*, 40, 141-8.
- SHEN, D., COLEMAN, J., CHAN, E., NICHOLSON, T. P., DAI, L., SHEPPARD, P. W. & PATTON, W. F. 2011. Novel cell- and tissue-based assays for detecting misfolded and aggregated protein accumulation within aggregates and inclusion bodies. *Cell Biochem Biophys*, 60, 173-85.
- SHIBUTANI, S. T. & YOSHIMORI, T. 2014. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res*, 24, 58-68.
- SOZEN, E., KARADEMIR, B. & OZER, N. K. 2015a. Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 78, 30-41.
- SOZEN, E., KARADEMIR, B. & OZER, N. K. 2015b. Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*, 78, 30-41.
- STEIMLE, J. D. & MOSKOWITZ, I. P. 2017. TBX5: A Key Regulator of Heart Development. *Curr Top Dev Biol*, 122, 195-221.
- SZEGEZDI, E., FITZGERALD, U. & SAMALI, A. 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 186-94.
- TAEGTMEYER, H., SEN, S. & VELA, D. 2010. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci*, 1188, 191-8.
- TAIGEN, T., DE WINDT, L. J., LIM, H. W. & MOLKENTIN, J. D. 2000. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1196-201.
- TANIDA, I., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88.
- URANO, F., WANG, X., BERTELOTTI, A., ZHANG, Y., CHUNG, P., HARDING, H. P. & RON, D. 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287, 664-6.
- VAN ROOIJ, E., DOEVENDANS, P. A., DE THEIJE, C. C., BABIKER, F. A., MOLKENTIN, J. D. & DE WINDT, L. J. 2002. Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 48617-48626.
- WAKAHARA, T., KUSU, N., YAMAUCHI, H., KIMURA, I., KONISHI, M., MIYAKE, A. & ITOH, N. 2007. Fibin, a novel secreted lateral plate mesoderm signal, is essential for pectoral fin bud initiation in zebrafish. *Dev Biol*, 303, 527-35.
- WANG, X. Z. & RON, D. 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, 272, 1347-9.
- WANG, X., KLEVITSKY, R., HUANG, W., GLASFORD, J., LI, F. & ROBBINS, J. 2003. AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circ Res*, 93, 998-1005.
- WANG, Z. V. & HILL, J. A. 2015. Protein quality control and metabolism: bidirectional control in the heart. *Cell Metab*, 21, 215-226.

- WANG, S., BINDER, P., FANG, Q., WANG, Z., XIAO, W., LIU, W. & WANG, X. 2018. Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *Br J Pharmacol*, 175, 1293-1304.
- WEXLER, R. K., ELTON, T., PLEISTER, A. & FELDMAN, D. 2009. Cardiomyopathy: an overview. *Am Fam Physician*, 79, 778-84.
- WILKINS, B. J., DAI, Y. S., BUENO, O. F., PARSONS, S. A., XU, J., PLANK, D. M., JONES, F., KIMBALL, T. R. & MOKKENTIN, J. D. 2004. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, 94, 110-118.
- WILKINSON, B. & GILBERT, H. F. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1699, 35-44.
- WILLIAMS, D. B. 1995. The Merck Frosst Award Lecture 1994/La conference Merck Frosst 1994. Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem Cell Biol*, 73, 123-32.
- XU, N., BITAN, G., SCHRADER, T., KLARNER, F. G., OSINSKA, H. & ROBBINS, J. 2017. Inhibition of Mutant alphaB Crystallin-Induced Protein Aggregation by a Molecular Tweezer. *J Am Heart Assoc*, 6.
- YAMAMOTO, K., YOSHIDA, H., KOKAME, K., KAUFMAN, R. J. & MORI, K. 2004. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *Journal of Biochemistry*, 136, 343-350.
- YANG, Z. & KLIONSKY, D. J. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12, 814-22.
- YONEDA, T., IMAIZUMI, K., OONO, K., YUI, D., GOMI, F., KATAYAMA, T. & TOHYAMA, M. 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*, 276, 13935-40.
- YOSHIDA, H., MATSUI, T., YAMAMOTO, A., OKADA, T. & MORI, K. 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107, 881-891.
- ZAGORSKI, J., OBRAZTSOVA, M., GELLAR, M. A., KLINE, J. A. & WATTS, J. A. 2009. Transcriptional changes in right ventricular tissues are enriched in the outflow tract compared with the apex during chronic pulmonary embolism in rats. *Physiological Genomics*, 39, 61-71.
- ZHENG, Q., SU, H., RANEK, M. J. & WANG, X. 2011. Autophagy and p62 in cardiac proteinopathy. *Circ Res*, 109, 296-308.

8 Anhang

8.1.1.1.1 Basischarakterisierung der anderen Fbin-TG-Linien

Um die Auswirkungen einer herzspezifischen Überexpression von Fbin in der Maus zu erfassen, wurden männliche sowie weibliche Mäuse aller drei Fbin-transgenen-Linien (Fbin-TG) im Alter von 8 Wochen einer Basisanalyse unterzogen. In diesem Alter zeigten die Fbin-TG-Tiere der 3 Linien C57B/6N-Geschwistertieren keine Unterschiede in ihrer Entwicklung.

Hier werden die Linien mit einer niedrigen und einer mittleren kardialen Fbin-Expression gezeigt.

Tabelle 8-1: Echokardiographische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fbin-TG-Mäusen (niedrige Expression von Fbin)

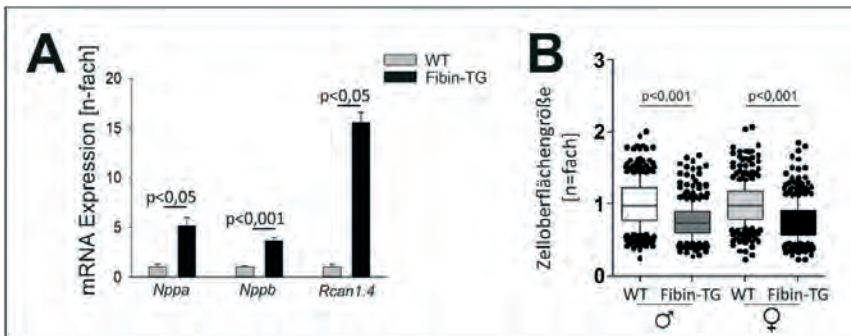
	♂ WT N=5	♂ Fbin-TG N=6	♀ WT N=5	♀ Fbin-TG N=8	♂ Fbin-TG v.s. ♂ WT	♀ Fbin-TG v.s. ♀ WT	♂ Fbin-TG v.s. ♀ Fbin-TG	♀ WT v.s. ♂ WT
Alter [d]	60,6±1,1	60,5±1,2	60,6±1,1	60,0±0,9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Herzfrequenz [bpm]	405,8±6,8	393,5±6,3	371,5±4,1	384,2±6,6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FS [%]	33,9±1,9	31,8±1,2	31,9±0,8	31,8±1,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
EF [%]	64,3±2,6	62,4±0,3	63,9±3,1	65,2±2,7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IVS,syst. [mm]	1,0±0,4	1,0±0,3	0,9±0,3	0,9±0,9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IVS,diast. [mm]	0,7±0,4	0,7±0,1	0,7±0,3	0,7±0,04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVID,syst. [mm]	2,8±0,5	3,3±0,5	2,9±0,7	2,8±0,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVID,diast. [mm]	4,1±0,6	4,0±0,6	3,8±0,6	3,6±0,3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVPW,syst. [mm]	1,1±0,3	1,0±0,5	1,0±0,04	1,0±0,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVPW,diast. [mm]	0,9±0,2	0,9±0,3	0,9±0,04	0,9±0,04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. (n.s. = nicht signifikant, Mittelwert± SEM; FS= *Fractional shortening*; EF= *Ejection fraction*, IVS= *Interventricular Septum*; LVIDd= *Left Ventricular internal diameter*; LVPWd= *Left ventricular posterior wall*; syst.= Systole, diast.= Diastole; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Morphometrische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibrin-TG-Mäusen (niedrige Expression von Fibrin)

	♂ WT N=6	♂ Fibrin-TG N=6	♀ WT N=5	♀ Fibrin-TG N=8	♂ Fibrin-TG v.s. ♂ WT	♀ Fibrin-TG v.s. ♀ WT	♂ Fibrin-TG v.s. ♀ Fibrin-TG	♀ WT v.s. ♂ WT
Alter [d]	60,6±1,1	60,5±1,2	60,6±1,1	60,6±0,9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
KG [g]	23,1±0,9	23,1±1,3	19,1±1,1	19,2±1,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HG [mg]	96,6±2,5	97,2±2,9	97,3±6,1	84,3±3,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVG [mg]	78,7±2,3	81,4±2,9	65,9±5,3	70,4±4,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tibiallänge [mm]	16,2±0,5	16,3±0,5	15,8±0,3	15,6±0,3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HG/KG [mg/g]	4,1±0,6	4,2±0,4	4,1±0,6	4,4±0,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVG/KG [mg/g]	2,9±0,6	3,4±0,4	3,4±0,2	3,7±0,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HG/Tibia Länge [mg/g]	5,9±0,4	6,1±0,6	5,0±0,4	5,4±0,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVG/Tibia Länge [mg/g]	4,2±1,3	5,0±0,5	4,2±0,3	4,5±0,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Lungengewicht [mg]	130,1±2,4	137,4±3,0	127±4,5	123,7±7,0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. (n.s. = nicht signifikant, Mittelwert ± SEM; HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Abbildung 8-1: Erhöhte Expression hypertropher Marker-Gene und eine geringere Zelloberflächengröße in Fibrin-TG-Herzgewebe (niedrige Expression von Fibrin)


A, Die hypertrophen Marker-Gene *Nppa* ($5,12 \pm 1,3$ -fach) und *Nppb* ($3,7 \pm 0,9$ -fach) sind in Fibrin-TG Tieren (N= 6) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (N= 6) signifikant hochreguliert. *Rcan1.4* ($15,6 \pm 1,5$ -fach), ein Calcineurin-abhängiger Marker, ist leicht hochreguliert. Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-T-Test ermittelt B, In den Fibrin-TG-Mäusen ist eine signifikant durchschnittliche kleinere Zelloberflächengröße als in den WT-Mäusen zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt sich in den männlichen sowie in den weiblichen Versuchsgruppen. (Die

Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-T-Test ermittelt n.s. = nicht signifikant; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Tabelle 8-2: Echokardiographische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibrin-TG- Mäusen (mittlere Expression von Fibrin)

	♂ WT N=7	♂ Fibrin-TG N=6	♀ WT N=5	♀ Fibrin-TG N=8	♂ Fibrin-TG v.s. ♂ WT	♀ Fibrin-TG v.s. ♀ WT	♂ Fibrin-TG v.s. ♀ Fibrin-TG	♀ WT v.s. ♂ WT
Alter [d]	56,7±1,2	56,4±1,4	57,83	57,3±1,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Herzfrequenz [bpm]	409,3±6,8	404,9±5,7	385,9±6,2	369,6±5,8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FS [%]	33,3±1,5	31,7±1,5	34,4±2,1	32,7±1,0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
EF [%]	67,5±2,6	62,9±2,6	63,3±1,7	62,6±2,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IVS,syst. [mm]	1,0±0,4	1,08±0,7	0,9±0,4	0,9±0,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IVS,diast. [mm]	0,7±0,3	0,7±0,4	0,7±0,4	0,6±0,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVID,syst. [mm]	0,7±0,7	0,7±0,7	0,7±0,4	0,6±0,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVID,diast. [mm]	2,8±0,56	3,0±0,4	2,5±0,7	2,7±0,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVPW,syst. [mm]	0,9±0,4	0,9±0,4	0,8±0,7	0,9±0,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVPW,diast. [mm]	1,2±0,3	1,0±0,3	1,0±0,5	1,0±0,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

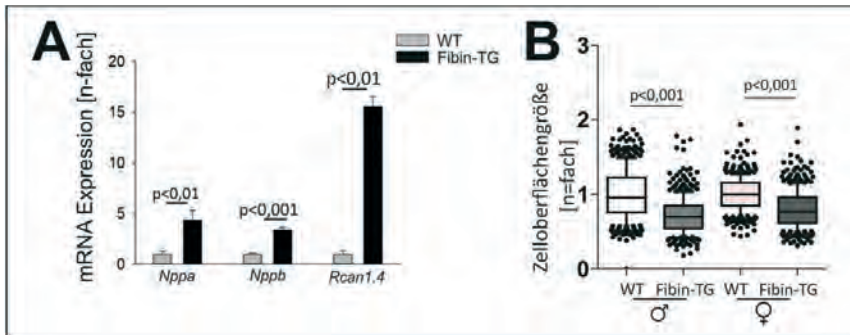
Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. (n.s. = nicht signifikant, Mittelwert± SEM; FS= *Fractional shortening*; EF= *Ejection fraction*, IVS= *Interventricular Septum*; LVIDd= *Left Ventricular internal diameter*; LVPWd= *Left ventricular posterior wall*; syst.= Systole, diast.= Diastole; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Tabelle 8-3 Morphometrische Parameter von 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Fibrin-TG-Mäusen (mittlere Expression von Fibrin)

	♂ WT N=6	♂ Fibrin-TG N=6	♀ WT N=5	♀ Fibrin-TG N=8	♂ Fibrin-TG v.s. ♂ WT	♀ Fibrin-TG v.s. ♀ WT	♂ Fibrin-TG v.s. ♀ Fibrin-TG	♀ WT v.s. ♂ WT
Alter [d]	56,7±0,9	55,4±1,2	56,4±1,4	57,3±1,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
KG [g]	23,1±0,9	23,1±1,2	19,1±1,	18,7±1,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HG [mg]	88,6±2,4	95,2±2,8	80,6±3,3	84,9±2,6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVG [mg]	75,7±2,0	78,8±2,5	65,9±3,1	68,2±2,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tibiallänge [mm]	16,2±0,3	16,15±0,5	16,15±0,5	15,8±0,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HG/KG [mg/g]	3,9±0,5	4,1±0,4	4,1±0,6	4,1±0,6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVG/KG [mg/g]	5,6±0,4	4,8±0,4	4,5±0,8	4,5±0,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HG/Tibia Länge [mg/g]	4,8±0,6	4,8±0,4	3,5±0,8	3,7±0,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LVG/Tibia Länge [mg/g]	4,6±0,5	4,8±0,6	5,0±0,8	3,7±0,46	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Lungengewicht [mg]	137,1±3,2	131,1±3,3	114,0±3,4	125,6±3,3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

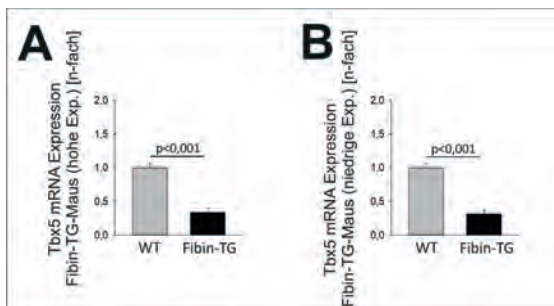
Die Signifikanzniveaus wurden durch Two-Way ANOVA gefolgt vom Student-Newman-Keul Post-hoc-Test ermittelt. (n.s. = nicht signifikant, Mittelwert \pm SEM; HG= Herzgewicht; KG= Körpergewicht; LVG= Linkes Ventrikel Gewicht; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Abbildung 8-2: Erhöhte Expression hypertropher Marker-Gene und eine geringere Zelloberflächengröße in Fibrin-TG-Herzgewebe (mittlere Expression von Fibrin)



A, Die hypertrophischen Marker-Gene *Nppa* ($5,12 \pm 1,3$ -fach) und *Nppb* ($3,7 \pm 0,9$ -fach) sind in Fibrin-TG Tieren (N= 6) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (N= 6) signifikant hochreguliert. *Rcan1.4* ($15,6 \pm 1,5$ -fach), ein Calcineurin-abhängiger Marker, ist leicht hochreguliert. B, In den Fibrin-TG-Mäusen ist eine signifikant kleiner durchschnittliche Zelloberflächengröße als in den WT-Mäusen zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt sich in den männlichen sowie in den weiblichen Versuchsgruppen. (Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-T-Test ermittelt n.s. = nicht signifikant; Fibrin-TG= Fibrin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

Abbildung 8-3: Runterregulation des *tbx5*-Gens in in Fibrin-TG-Herzgewebe (bei hoher und niedriger Expression von Fibrin)



A, B, Die Tbx-5 Gen Regulation wurde per real-time-PCR Verfahren in den Fbin-TG-Mäusen gemessen. Im Vergleich zu den Wildtypmäusen war in den Fbin-TG-Mäusen eine Runterregulierung in den Mäusen mit der hohen Fbin-Überexpression (A) sowie mit der niedrigen Fbin-Überexpression (B) zu beobachten. (Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des Student-T-Test ermittelt n.s. = nicht signifikant; Fbin-TG= Fbin-transgene-Mäuse; WT= Wildtyp-Mäuse).

9 Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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."

Datum, Ort

Unterschrift

10 Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt

11 Poster und Publikationen

N. Schmiedel, M. Petersen, F. Dierck, I. Schmidt, A. Remes, F. Senger, N. Frey, C. Kuhn (Kiel)
Die Rolle des Proteins Fibin in der kardialen Hypertrophie (P1257) DGK JT 2019 Abstracts

L. Kilian, J. Voran, **N. Schmiedel**, J. Richter, N. Frey, O. J. Müller, D. Frank (Kiel, Heidelberg)
Konditionaler Knockout von LMCD1 in Kardiomyozyten von Mäusen verringert die TAC-induzierte Aktivierung des hypertrophen Genprogrammes und Fibrose-assoziiierter Gene (P1400) DGK JT 2021 Abstracts

A. Remes, A. H. Wagner, **N. Schmiedel**, M. Heckmann, A. Jungmann, F. Senger, H. A. Katus, N. Ullrich, N. Frey, M. Hecker, O. J. Müller (Kiel, Heidelberg) AAV-mediated expression of NFAT decoy oligonucleotides protects from cardiac hypertrophy and heart failure (P531) DGK JT 2021 Abstracts

L. Weder, C. Tannert, **N. Schmiedel**, P. Usinger, G. Freundt, N. Frey, M. Eden
Myomasp, a novel regulator of M-band associated signaling pathways, affects cardiac hypertrophy and is required for proper aged heart function *in vivo* (P1887) DGK JT 2020 – Abstracts

Ashraf Y Rangrez, Ankush Borlepawar, **Nesrin Schmiedel**, Lynn Christen, Anushka Deshpande, Alexander Bernt, Manju Kumari, Anca Remes, Andreas Helbig, Andreas Jungmann, Samuel Sossalla, Andreas Tholey, Oliver Mueller, Derk Frank, Norbert Frey HECT Domain Containing-3 (HECTD3) is a Novel Regulator of Cardiac Hypertrophy and Inflammation *Circulation Research*. 2019;125: A800 Abstracts

Paper:

Anca Remes, # Andreas H. Wagner, # **Nesrin Schmiedel**, Markus Heckmann, Theresa RufLin Ding, Andreas Jungmann, Frauke Senger, Hugo A. Katus, Nina D. Ullrich, Norbert FreyMarkus Hecker, #3 and Oliver J. Müller (corresponding author#) (2021) AAV-mediated expression of NFAT decoy oligonucleotides protects from cardiac hypertrophy and heart failure *Basic Res Cardiol* 116(1): 38.

Christian Kuhn MD, Maja Menke MD, FraukeSenger Claudia Mack MD Franziska Dierck PhD, Susanne Hille, IngaSchmidt, Gabriele Brunke, Pia Bünger **Nesrin Schmiedel** Rainer Will PhD, Samuel Sossalla MD, Derk Frank MD, Thomas Eschenhagen MD, Lucie Carrier PhD, RenateLüllmann-Rauch MD, Ashraf Yusuf Rangrez PhD, Norbert Frey MD, FYCO1 (2021) Regulates Cardiomyocyte Autophagy and Prevents Heart Failure Due to Pressure Overload In Vivo, *JACC: Basic to Translational Science Volume 6, Issue 4, April 2021, Pages 365-380*

Ankush Borlepawar, **Nesrin Schmiedel**, Matthias Eden, Lynn Christen, Alexandra Rosskopf, Derk Frank, Renate Lüllmann-Rauch, Norbert Frey and Ashraf Yusuf Rangrez (2020) Dysbindin deficiency Alters Cardiac BLOC-1 Complex and Myozap Levels in Mice *Cells* 9(11), 2390

A Rangrez, **N Schmiedel**, A Borlepawar, L Christen, A Bernt, S Sossalla, D Frank, N Frey (2018) HECTD3 attenuates cardiac hypertrophy acting as an E3 ligase of SUMO2 *European Heart Journal*, 3146

Ashraf Yusuf Rangrez, Ankush Borlepawar, **Nesrin Schmiedel**, Anushka Deshpande, Anca Remes, Manju Kumari, Alexander Bernt, Lynn Christen, Andreas Helbig, Andreas Jungmann, Samuel Sossalla, Andreas Tholey, Oliver J. Müller, Derk Frank & Norbert Frey (2020) The E3 ubiquitin ligase HectD3 attenuates cardiac hypertrophy and inflammation in mice *Communications Biology* (3) 562

Markus B. Heckmann, Ashraf Yusuf Rangrez, Daniel Finke, Andreas Jungmann, Julia S. Kreußner, Alexandra Rosskopf, **Nesrin Schmiedel**, Hugo A. Katus, Norbert Frey & Oliver J. Müller (2020) Cardiac transcriptional and metabolic changes following thoracotomy *Scientific Reports* (10) 9673

12 Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Schultheiß und Herrn Prof. Dr. Norbert Frey, welche mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gegeben haben. Herrn Prof. Schultheiß danke ich für die unterstützenden Betreuung während dieser Arbeit und für die kritischen aber äußerst konstruktiven Ratschläge bei der Korrektur dieser Arbeit. Neben der Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. Norbert Frey vor allem für die hilfreiche Unterstützung durch anregende Diskussionen und ideenreiche Ratschläge, welche mir geholfen hat diese Arbeit zu verwirklichen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Christian Kuhn für Bereitstellung des Themas seiner Betreuung und Unterstützung bei dem Erlernen der OP-Technik und hilfreichen Ratschläge und Hilfestellung zu meinem Projekt. Für seine Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit möchte mich noch einmal besonders bedanken.

Auch möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Labors für Molekulare Kardiologie für die herzliche und freundschaftliche Aufnahme und die schöne Zeit im Labor bedanken. Hier wurde aus guter Zusammenarbeit t auch manchmal Freundschaft. Hier gilt mein besonderer Dank an Alex, Lynn, Franzi, Linda, Kathi, Christin, Anca, Frauke und allen weiteren Mitarbeitern im Labor für die gute Einarbeitung in die Laborarbeit, für ihre Hilfreichen Tipps, guten Ratschlägen und Unterstützung bei der Motivationssuche.

Ein dickes Danke geht an und Lucia, meine Schwester Judith und ihren Freund Tilman für ihre motivierende und tatkräftige Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit und ihrem aufbauenden Optimismus.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken. Ich danke meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich zu jeder Zeit und in allen Lebenslagen unterstützt haben. Neben meiner Schwester danke ich auch meinen Brüdern Henning und Gabriel, die auch in schweren Zeiten an meiner Seite waren.

Meinen Freunden, besonders bei Manu, Julia Anni, Simon und Jakob möchte ich herzlich für ihre Geduld und ihre immer wieder aufmunternden Worte danken.



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: 978-3-8359-7023-6



9 783835 197023 6