

# **Autophagische Prozesse bei kindlichen Kardiomyopathien**

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



vorgelegt von Schumann, Elisabeth Petra  
aus Radebeul

Gießen 2023

# **Autophagische Prozesse bei kindlichen Kardiomyopathien**

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

vorgelegt von Schumann, Elisabeth Petra  
aus Radebeul

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Neuropathologie

Gutachterin: Prof. Dr. med. Anne Schänzer

Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Jux

Tag der Disputation: 19.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Kardiomyopathien im Kindesalter .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Klassifikationen von Kardiomyopathien .....	2
1.1.2	Genetische Kardiomyopathien .....	3
<b>1.2</b>	<b>Klinische Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>Aufbau der Herzmuskulatur im Vergleich zur Skelettmuskulatur .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4</b>	<b>Definition und Bedeutung der Autophagie .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5</b>	<b>Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) .....</b>	<b>7</b>
<b>1.6</b>	<b>Autophagie-Proteine und ihre Rolle bei der CASA .....</b>	<b>10</b>
1.6.1	p62.....	10
1.6.2	LC3 .....	10
1.6.3	WIPI1 .....	11
1.6.4	Ubiquitin .....	11
1.6.5	BAG3 und Hitzeschockproteine .....	12
<b>1.7</b>	<b>Autophagie beim Alterungsprozess des Herzens .....</b>	<b>14</b>
<b>1.8</b>	<b>Regulation von CASA-assoziierten Proteinen.....</b>	<b>15</b>
<b>1.9</b>	<b>Sarkomerproteine .....</b>	<b>17</b>
1.9.1	FilaminC (FLNC).....	17
1.9.2	Desmin.....	19
<b>1.10</b>	<b>Mitochondriale Proteine.....</b>	<b>22</b>
1.10.1	Mitophagie .....	22
1.10.2	PINK1.....	22
1.10.3	BNIP3L/Nix .....	23
1.10.4	MUL1 .....	23
1.10.5	SOD2.....	24
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungskohorte .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Ethikvotum .....</b>	<b>30</b>

<b>3.3</b>	<b>Western Blot.....</b>	<b>30</b>
3.3.1	Protein-Extraktion .....	30
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration an Herzmuskelgewebe.....	31
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentrationen an Skelettmuskelgewebe.....	31
3.3.4	Vorbereitung der Proteinlysate .....	33
3.3.5	SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	33
3.3.6	Übertragung (Blotting) auf die Trägermembran .....	34
3.3.7	Primärantikörper .....	37
3.3.8	Sekundärantikörper .....	39
3.3.9	Signaldetektion.....	39
3.3.10	Vergleich der Entwicklungsmethoden Fotochemie und ECL-Imager .....	41
3.3.11	Ladekontrolle .....	43
3.3.12	Stripping .....	44
3.3.13	Auswertung .....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen .....</b>	<b>46</b>
4.1.1	Vergleich der klinischen Parameter für Herzinsuffizienz der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen .....	47
4.1.2	Vergleich der Proteinexpressionen in den unterschiedlichen Subgruppen (DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen).....	50
<b>4.2</b>	<b>Darstellung von besonderen Einzelfällen.....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Herzmuskelgewebe mit einer Mutation im FLNC-Gen (p.Ala2430Val) .....	65
4.2.2	Herzmuskelgewebe mit Mitochondriopathie bei Barth-Syndrom .....	65
<b>4.3</b>	<b>Vergleich der Proteinexpression im rechten und linken Ventrikel.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>Korrelation der Proteinexpression mit klinischen Parametern.....</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>73</b>
<b>5.1</b>	<b>Kohorte.....</b>	<b>75</b>
<b>5.2</b>	<b>Erhöhte EF-Werte bei der HCM-Gruppe und erniedrigte EF-Werte bei der DCM-Gruppe .....</b>	<b>76</b>
<b>5.3</b>	<b>Korrelation der Proteinexpression mit klinischen Parametern.....</b>	<b>77</b>
<b>5.4</b>	<b>Veränderte CASA in Herzmuskelzellen bei DCM und HCM im Vergleich zu weiteren Herzerkrankungen .....</b>	<b>78</b>

5.4.1	Dysregulation von CASA bei der DCM .....	79
5.4.2	Defekte CASA bei der HCM.....	80
<b>5.5</b>	<b>Unterschiedliche Proteinexpression im rechten und linken Ventrikel .....</b>	<b>82</b>
<b>5.6</b>	<b>HCM bedingt durch neue Mutation im FLNC-Gen (p.Ala2430Val) .....</b>	<b>83</b>
<b>5.7</b>	<b>Regulation der Mitophagieproteine bei DCM, HCM und weiteren Herzerkrankungen.....</b>	<b>84</b>
5.7.1	DCM bei mitochondrialer Erkrankung bei Barth-Syndrom.....	85
<b>5.8</b>	<b>Limitationen der Studie.....</b>	<b>87</b>
5.8.1	Kohorte.....	87
5.8.2	Kontrollen.....	88
5.8.3	Methode.....	88
<b>5.9</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>Darstellungs- und Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>12</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>110</b>
<b>12.1</b>	<b>WB-Protokolle .....</b>	<b>110</b>
12.1.1	Vorbereiten der Gele .....	110
12.1.2	Proteinkonzentrationsmessungen nach Lowry.....	111
12.1.3	Vorbereitung der Proteinlysate.....	111
12.1.4	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese .....	112
12.1.5	Übertragung (Blotting) auf die Trägermembran - Wet-Blotting-Verfahren.....	112
12.1.6	Antikörper-Inkubation.....	113
12.1.7	Entwicklung und Dokumentation.....	113
12.1.8	Verfahren zum Strippen der Membran.....	114
<b>12.2</b>	<b>Zusammensetzung der Gebrauchslösungen .....</b>	<b>115</b>
<b>12.3</b>	<b>Verwendete Chemikalien .....</b>	<b>118</b>

<b>12.4</b>	<b>Verwendete Geräte, Softwares und Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>120</b>
<b>13</b>	<b><i>Publikationsnachweis</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>14</b>	<b><i>Ehrenwörtliche Erklärung</i> .....</b>	<b>142</b>
<b>15</b>	<b><i>Danksagung</i> .....</b>	<b>143</b>

# 1 Einleitung

Kardiomyopathien sind strukturelle, pathologische Veränderungen der Herzmuskulatur (Ciarambino, Menna, Sansone, & Giordano, 2021), die zu jedem beliebigen Zeitpunkt mindestens 100 000 Kinder weltweit betreffen (Lipshultz et al., 2013). Circa 40 % der Kinder mit symptomatischer Kardiomyopathie sterben oder benötigen eine Herztransplantation innerhalb von 2 Jahren. Der häufigste Grund für Herztransplantationen bei Kindern älter als 1 Jahr sind Kardiomyopathien. (Lipshultz et al., 2013) Es gibt noch viele Unklarheiten über die Ätiologie und Pathogenese von Kardiomyopathien im Kindesalter und genaue Untersuchungen von Herzmuskelgewebe sind ein wichtiger Schritt, um das Wissen und damit Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zu verbessern. (Yuan, 2018)

Um die Pathologie von Herzmuskelerkrankungen näher zu untersuchen, bietet sich insbesondere Herzmuskelgewebe von Kindern an, weil es noch weniger altersbedingten Veränderungen, wie zum Beispiel einer Zunahme der Herzfibrose (Nicin et al., 2021), und Komorbiditäten, wie z.B. Diabetes mellitus oder arterielle Hypertonie, unterlegen ist.

## 1.1 Kardiomyopathien im Kindesalter

Herzinsuffizienz im Kindesalter wird häufig durch Kardiomyopathien verursacht und die Inzidenz von Kardiomyopathien im Kindesalter steigt zunehmend (Yuan, 2018). Bei Kindern (Alter: < 20 Jahre) wird, in Studien aus Australien, den USA und Finnland, die Inzidenz von primären Kardiomyopathien auf 1 Fall pro 100 000 Personenjahre geschätzt (Lipshultz et al., 2019). Von der *American Heart Association* wurden Kardiomyopathien wie folgt definiert: „Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, die mit mechanischen und/oder elektrischen Dysfunktionen assoziiert sind (...) und auf eine Vielzahl von Ursachen zurückzuführen sind, die häufig genetisch sind. Kardiomyopathien sind entweder auf das Herz beschränkt oder Teil generalisierter systemischer Erkrankungen, die oft zum kardiovaskulären Tod oder zur fortschreitenden, durch Herzinsuffizienz bedingten, Behinderung führen.“ (Maron et al., 2006). Ob, auf welche Art und in welcher Ausprägung eine Kardiomyopathie symptomatisch ist, hängt von dem Grad der Herzinsuffizienz und der Form der Kardiomyopathie (siehe 1.1.1) ab.

Typische Symptome einer Herzinsuffizienz sind zum Beispiel Dyspnoe, Fatigue, Synkopen und Palpitationen. Bei Neugeborenen und Säuglingen sind verzögertes Wachstum, Schwierigkeiten beim Füttern und übermäßiges Schwitzen bei Aktivität Warnzeichen. (Yuan, 2018)

### 1.1.1 Klassifikationen von Kardiomyopathien

Im Laufe der Jahre wurden unterschiedliche Klassifikationen für Kardiomyopathien entwickelt und eine genaue Zuteilung ist schwierig, da häufig eine Zuordnung einer Kardiomyopathie zu mehreren Gruppen möglich ist und auch ein Wechsel im Krankheitsverlauf zu einer anderen Gruppe vorkommt (Yuan, 2018). Im „*Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies*“ werden Kardiomyopathien in 5 Gruppen eingeteilt: dilatative (DCM), hypertrophe (HCM), restrictive (RCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre (ARVC) und unklassifizierte Kardiomyopathien (Richardson et al., 1996). DCMs sind mit 55 % die häufigste symptomatische Form der Kardiomyopathien (Prävalenz Allgemeinbevölkerung 1:2500; Prävalenz in Population mit Herzinsuffizienz 1:250-400) und gekennzeichnet durch eine pathologische Erweiterung/ Dilatation und damit einhergehenden Funktionsbeeinträchtigung einer oder beider Ventrikel (Ciarambino et al., 2021; Towbin, 2014). HCMs sind die häufigsten vererbten Kardiomyopathien (Prävalenz 1:500). Sie sind in vielen Fällen zunächst asymptomatisch, aber eine wichtige Ursache für den plötzlichen Herztod bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen. HCMs sind gekennzeichnet durch eine Hypertrophie vor allem des linken Ventrikels. Dabei werden Hypertrophien der Ventrikel durch Druck- oder Volumenbelastung des Herzens, z.B. durch Klappenerkrankungen, nicht zu den HCMs gezählt. (Ciarambino et al., 2021; Rupp et al., 2019; Towbin, 2014) Nach der *American Heart Association* werden Kardiomyopathien in genetische und erworbene Formen unterteilt (siehe Abbildung 1) (Maron et al., 2006).

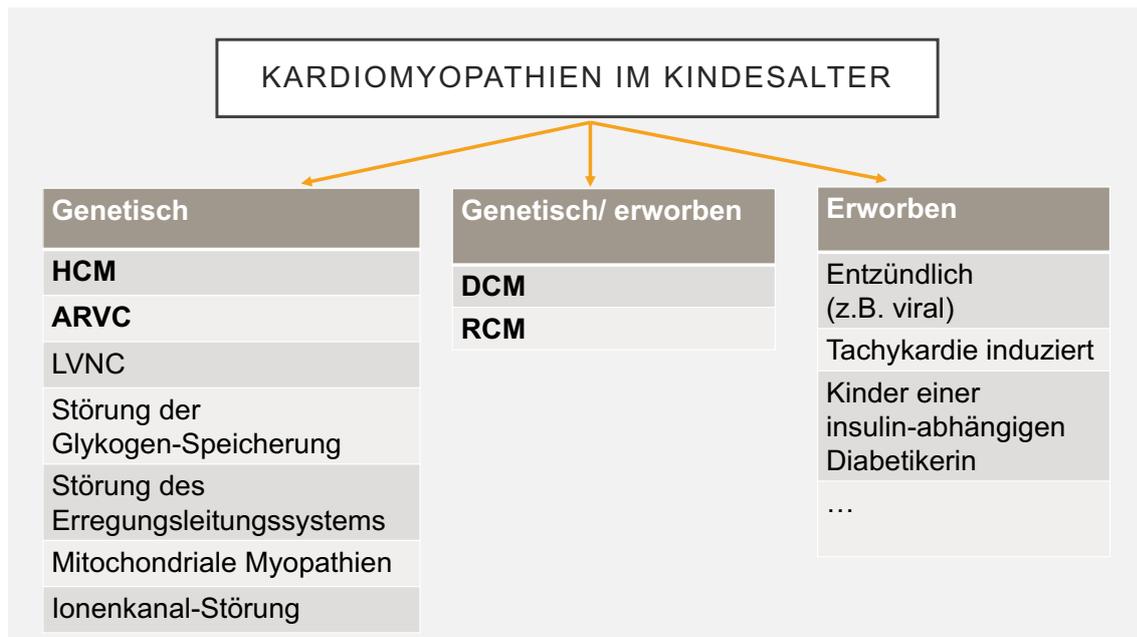


Abbildung 1: Klassifikation von Kardiomyopathien modifiziert nach Maron et al. (2006); LVNC=linksventrikuläre Noncompaction-Kardiomyopathie

### 1.1.2 Genetische Kardiomyopathien

Genetische Kardiomyopathien können durch eine Vielzahl an Mutationen hervorgerufen werden. Häufig sind Gene betroffen, die für Sarkomer Proteine und Proteine der Sarkomer-Sarkolemm-Verbindung kodieren (Rupp et al., 2019; Towbin, 2014) und herzspezifisch sind, wie zum Beispiel MYBPC3 und MYH7 (Hinton & Ware, 2017; Zschirnt et al., 2020). Das Intermediärfilament Desmin vernetzt verschiedene zelluläre Komponenten mit dem Zytoskelett und Mutationen im Gen von Desmin können deshalb zu verschiedenen Pathomechanismen und infolgedessen zu verschiedenen Kardiomyopathien (z.B. DCM, HCM oder RCM) führen (Brodehl, Gaertner-Rommel, & Milting, 2018). Auch Mutationen im FilaminC (FLNC) Gen können zu diversen klinischen Ausprägungen führen und sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus als Verursacher genetischer Kardiomyopathien und insbesondere der RCM gelangt (Brodehl, Gaertner-Rommel, & Milting, 2017).

Weitere wichtige Ursachen für genetische Kardiomyopathien sind metabolische Systemerkrankungen, wie zum Beispiel Störungen der Glykogen-Speicherung oder mitochondriale Myopathien (Maron et al., 2006; Zschirnt et al., 2020), neurodegenerative Erkrankungen, wie zum Beispiel Morbus Pompe oder Friedreich-

Ataxie (Zschirnt et al., 2020) und Ionenkanal-Erkrankungen, wie zum Beispiel das QT-Syndrom oder das Brugada-Syndrom (McKenna, Maron, & Thiene, 2017), (siehe Abbildung 1).

## 1.2 Klinische Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion

Bei Patienten mit Kardiomyopathie ist die Erhebung der klinischen Parameter wichtig, um die kardiale Funktion zu beurteilen. Dazu gehören das natriuretische Peptid vom B-Typ (BNP) und die Ejektionsfraktion (EF).

Das natriuretische Peptid vom B-Typ (BNP) ist wichtig bei der klinischen Bewertung der Herzinsuffizienz. Es kann die Diagnose unterstützen und als Schweregrad- und Prognose-Parameter dienen. Durch Dehnung und/ oder Drucküberlastung der Herzmuskulatur wird BNP von den Ventrikeln ausgeschüttet und reduziert durch zahlreiche Funktionen, wie Verlagerung von Flüssigkeit in den interstitiellen Raum und Verringerung des Gefäßtonus, die Vor- und Nachlast. Die Interpretation der BNP-Werte wird dadurch erschwert, dass es individuelle und interindividuelle Abweichungen und Schwankungen des BNP-Spiegels, sowohl bei Gesunden als auch bei Erkrankten, gibt. Es konnte gezeigt werden, dass BNP-Werte bei Frauen höher sind als bei Männern und im Alter ansteigen. Zudem findet man höhere BNP-Werte bei renaler Dysfunktion. Es gibt unterschiedliche Angaben zu Normal- und Grenzwerten von BNP. Teilweise wird 100 pg/ml und teilweise 200 pg/ml als unterer Grenzwert für die akute Herzinsuffizienz angegeben. Die BNP-Werte sollten deshalb immer in Zusammenschau mit allen klinischen Befunden bewertet werden. (Maries & Manitiu, 2013) Für die chronische Herzinsuffizienz gilt ein Grenzwert für BNP von 35 pg/ml. Die genannten Grenzwerte wurden durch Studien an Erwachsenen ermittelt. Für Neugeborene und Kinder gibt es vergleichsweise wenig Studien. Es konnte nachgewiesen werden, dass die BNP-Plasmaspiegel erhöht sind bei Kindern mit klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz. Dies war unabhängig davon, ob zum Beispiel eine systolische Dysfunktion oder eine Volumenüberlastung der Ventrikel vorlag. (Westerlind, Wählander, Lindstedt, Lundberg, & Holmgren, 2004) Bei Neugeborenen, die jünger als eine Woche sind, sind die BNP-Plasmakonzentrationen relativ hoch und sinken in den ersten Lebenstagen stark ab (Koch & Singer, 2003; Law, Hoyer, Reller, & Silberbach, 2009). Law et al. (2009) schlug für die Gruppe, der bis zu einer Woche alten

Neugeborenen (n=42), einen unteren Grenzwert für BNP von 170 pg/ml vor und in dieser Studie erreichte man für diesen Grenzwert eine Sensitivität von 94 % und eine Spezifität von 73 % (Law et al., 2009). Insgesamt gab es in der Gruppe der Neugeborenen große individuelle Schwankungen der BNP-Werte (Koch & Singer, 2003). Im Vergleich zu Erwachsenen sind bei Neugeborenen, die älter als eine Woche sind, und bei Säuglingen und Kindern die mittleren BNP-Plasmakonzentrationen relativ niedrig (Koch & Singer, 2003; Law et al., 2009). Für diese Gruppe wurden von Law et al. (2009) Menschen (n=58) im Alter von > 7 Tage bis 19 Jahre untersucht. Ein unterer BNP-Grenzwert von 41 pg/ml ergab eine Sensitivität von 87 % und eine Spezifität von 70 % (Law et al., 2009). Bei Mädchen und Jungen im Alter unter 10 Jahren unterschieden sich die Mittelwerte der BNP-Plasmakonzentrationen nicht signifikant. Bei Mädchen älter als 10 Jahre wurden dahingegen signifikant höhere BNP-Plasmakonzentrationen als für Jungen älter als 10 Jahre festgestellt. (Koch & Singer, 2003) Insgesamt steigen die BNP-Plasmakonzentrationen mit zunehmenden Alter an (Maries & Manitiu, 2013).

Die EF (Ejektionsfraktion) ist ein Maß für die systolische Funktion eines Ventrikels oder genauer der Bruchteil in Prozent des enddiastolischen Blutvolumens, das als Schlagvolumen während der Systole ausgeworfen wird. (Kosaraju, Goyal, Grigorova, & Makaryus, 2021) Besonders wichtig ist dabei die LVEF (Linksventrikuläre Ejektionsfraktion). Sie wird am häufigsten mit Hilfe der Echokardiografie des Herzens bestimmt und berechnet sich wie folgt:  $LVEF = \frac{[Schlagvolumen (SV) / Enddiastolisches Volumen (EDV)] \times 100}{100}$  (Kosaraju et al., 2021). **Die Normwerte der LVEF wurde für Kinder und Neugeborene zwischen 56 und 78 % definiert (Tissot, Singh, & Sekarski, 2018).** In der Vergangenheit lag der Fokus auf der Bewertung erniedrigter LVEF-Werte, aber auch erhöhte LVEF-Werte sind von Bedeutung. Eine LVEF von 60-65 % scheint mit der niedrigsten Mortalität verbunden zu sein und sowohl niedrigere als auch höhere Werte zeigen eine erhöhte Mortalität. (Wehner et al., 2020)

### 1.3 Aufbau der Herzmuskulatur im Vergleich zur Skelettmuskulatur

Herzmuskulatur ist ähnlich aufgebaut wie Skelettmuskulatur. In beiden Geweben findet man eine Sarkomer-Struktur des kontraktiven Apparates (siehe Abbildung 2). (Mao & Nakamura, 2020) Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle Einheit der quergestreiften

Muskulatur (Herz- und Skelettmuskulatur) und wird begrenzt von den sog. Z-Scheiben, in welchen die Aktinfilamente fixiert sind (Welsch & Deller, 3. Auflage 2010). Durch die Gemeinsamkeiten sind bei vielen genetischen Erkrankungen sowohl Herz-, als auch Skelettmuskulatur betroffen (Jefferies, Blaxall, Towbin, & Robbins, 2016). Wesentliche Unterschiede zwischen beiden Gewebearten sind, dass Skelettmuskulatur aus fusionierten Myozyten besteht, während Herzmuskulatur aus verzweigten Kardiomyozyten besteht, die über sog. Glanzstreifen miteinander verbunden sind. Herzmuskelzellen sind mononukleär und die Zellkerne liegen zentral, während Skelettmuskelzellen polynukleär sind und die Kerne peripher liegen. (Welsch & Deller, 3. Auflage 2010)

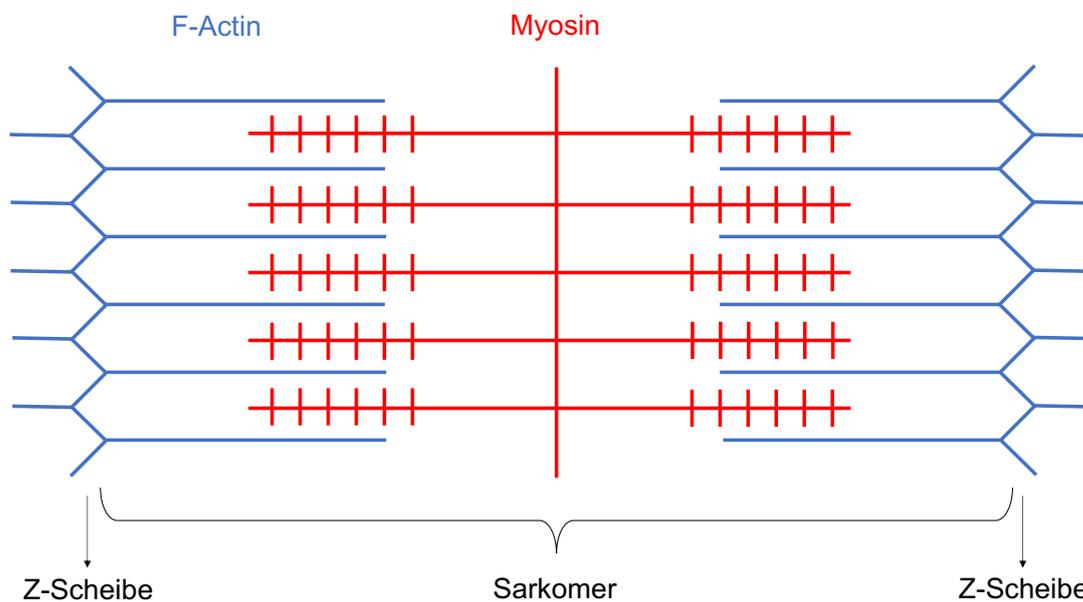


Abbildung 2: Grundstruktur der quergestreiften Muskulatur modifiziert nach Mao and Nakamura (2020)

## 1.4 Definition und Bedeutung der Autophagie

Autophagie ist ein komplexer und vielseitiger biologischer Prozess, bei dem zelleigene Strukturen, wie beschädigte Proteine, und zellfremde Strukturen, wie z.B. intrazelluläre Krankheitserreger, abgebaut werden (Deretic, 2010; Glick, Barth, & Macleod, 2010). Eine zentrale Rolle spielt die Autophagie bei der Balancierung des Proteinhaushaltes und dem Funktionserhalt der Zellhomöostase durch Abbau und Recycling von beschädigten Substraten. (Arndt et al., 2010; Glick et al., 2010; N. Mizushima, 2007; Moreau, Luo, & Rubinsztein, 2010; H. Zhang et al., 2008) Je nach Zelltyp ist der Bedarf an Autophagie unterschiedlich (Moreau et al., 2010) und besonders hoch in Gewebe mit hohem metabolischem Umsatz, wie Herzmuskelgewebe (Collier & Benesch, 2020). Es wurde gezeigt, dass Autophagie wichtig ist für die Aufrechterhaltung der Integrität der Z-Scheiben und der physiologischen Muskelkontraktilität (Arndt et al., 2010). In der Zelle müssen unter physiologischen Bedingungen Proteinsynthese und -abbau stets in kompensierten Umfang ablaufen und eine kontinuierliche Anpassung an Änderungen des Gleichgewichts ist essenziell (Balch, Morimoto, Dillin, & Kelly, 2008; Klimek et al., 2017). Eine beeinträchtigte Autophagie führt zu vermehrten Zellstress und aggraviert damit pathologische Prozesse. (Höhfeld et al., 2021) Autophagie kann nicht-selektiv und selektiv ablaufen. Bei Letzterem müssen Substrate zunächst erkannt werden, bevor sie entsorgt werden können. (Glick et al., 2010; Johansen & Lamark, 2011; Kraft, Peter, & Hofmann, 2010) Im Rahmen der selektiven Autophagie unterscheidet man in Ubiquitin-abhängige und Ubiquitin-unabhängige Abbauwege (Gal et al., 2009; Johansen & Lamark, 2011). Die Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) zählt zu den Ubiquitin-abhängigen Abbauwegen (Klimek et al., 2017).

## 1.5 Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA)

Die spannungsinduzierte Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) ist eine Form der Makroautophagie und damit wichtig für den Abbau von großen Strukturen (z.B. Proteinaggregate oder Zellorganellen) (Kraft et al., 2010). Sie ist gekennzeichnet durch Autophagosomenbildung (Yoo & Jung, 2018). Mechanische Kräfte als Bedrohung für die Erhaltung des Proteoms in der Zelle wurden in der Vergangenheit oft vernachlässigt und gelangen zunehmend in den Fokus (Höhfeld et al., 2021). CASA ist eine zelluläre

Adaption an mechanische Kräfte (Ulbricht et al., 2013). Quergestreifte Muskulatur steht unter ständiger mechanischer Belastung. Dabei ist es leicht denkbar, dass es an vielen Stellen der Proteinverarbeitung zu schwerwiegenden Fehlern, wie zum Beispiel eine inkorrekte Proteinfaltung, kommen kann (Balchin, Hayer-Hartl, & Hartl, 2016). Eine gesunde Zelle benötigt daher Protein-Qualitätskontrollsysteme, wobei Chaperone, wie Hitzeschockproteine (HSPs), und ihre regulierenden Co-Chaperone wichtige Hauptakteure sind (Balchin et al., 2016; Klimek et al., 2017). Ein schematisiertes Modell der CASA wird in Abbildung 3 dargestellt. Zunächst müssen die Substrate, z.B. Proteinaggregate, von molekularen Chaperonen als abzubauen, möglicherweise zellgefährdende Strukturen erkannt werden. Für die CASA wichtige Chaperone sind HSP70 (Hitzeschockprotein 70) und HSPB8 (Hitzeschockprotein B8). Außerdem spielt das Co-Chaperon BAG3 (Bcl-2-assoziiertes Athanogen 3) eine entscheidende Rolle. BAG3-HSP70-HSPB8-Komplexe (Multikomponenten-Chaperon-Komplexe) dienen als Hauptakteure zur Einleitung der CASA. Das Substrat wird durch Verknüpfung mit dem Protein Ubiquitin markiert (Ubiquitinierung). Weitere wichtige CASA-Proteine sind LC3-I (*Microtubule-associated protein 1 light chain 3B-I*), LC3-II, WIPI1 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1) und p62. LC3-II wird mit Hilfe von WIPI1 aus LC3-I gebildet. Die Rekrutierung von p62 ermöglicht eine weitere Sequestrierung der Substrate in größere Aggregate und durch die p62-Verknüpfung von Ubiquitin und LC3-II, welches am Phagophor gebunden vorliegt, und mit Hilfe von BAG3 kann sich das Autophagosom bilden. Dies geschieht durch eine Fusion der Phagophormembranen um den Multikomponenten-Chaperon-Komplex. Danach entstehen, durch die Verschmelzung von Autophagosomen mit Lysosomen, die Autolysosomen, in welchen die BAG3-HSP70-HSPB8-Komplexe mit den beschädigten Proteinen abgebaut werden. (Johansen & Lamark, 2011; Klimek et al., 2017; Li, Zhang, Zhang, & Han, 2022; Proikas-Cezanne, Takacs, Dönnies, & Kohlbacher, 2015)

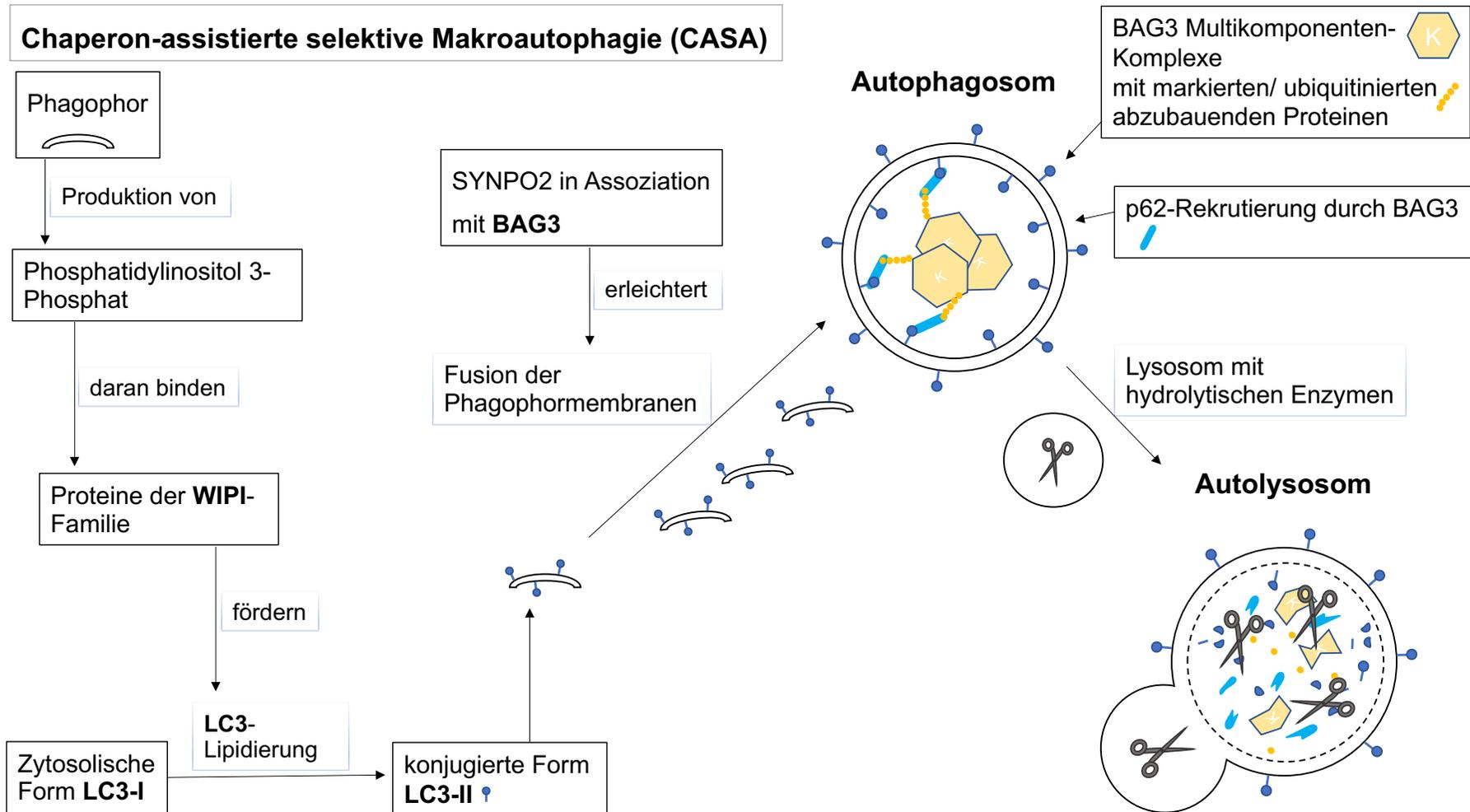


Abbildung 3: CASA beschädigter Proteine (z.B. FilaminC) modifiziert nach Klimek, Kathage, Wördehoff, and Höhfeld (2017)

## 1.6 Autophagie-Proteine und ihre Rolle bei der CASA

### 1.6.1 p62

p62 (oder SQSTM1) spielt eine zentrale Rolle in der selektiven Autophagie von Proteinaggregaten und Organellen. Dabei wird p62 selbst während der Autophagie abgebaut (Manley, Williams, & Ding, 2013). In der Regel korreliert p62 invers mit der Aktivität der Autophagie. Das bedeutet bei hochregulierter regelrecht ablaufender Autophagie ist p62 erniedrigt und bei Unterdrückung, Blockierung oder Überforderung der Autophagie kommt es zur Akkumulation von p62. (Bartlett et al., 2011; Klionsky et al., 2012; Lippai & Löw, 2014) Es entsteht eine Art Teufelskreis, denn eine Ansammlung von p62 führt über eine Aktivierung von mTORC1 zu einer weiteren Unterdrückung der Autophagie (Duran et al., 2011). Kommt es zur p62-Akkumulation aufgrund von Autophagie-Defekten, führt dies zu oxidativem Stress (Mathew et al., 2009). Allerdings kann auch unabhängig von der Autophagie das Expressionsniveau von p62 verändert werden (Bardag-Gorce et al., 2005; Kuusisto, Suuronen, & Salminen, 2001; Noboru Mizushima & Yoshimori, 2007; Nakaso et al., 2004). Daher sollten verschiedene Autophagie-Marker für die Beurteilung einer womöglich gestörten Autophagie untersucht werden.

### 1.6.2 LC3

Man unterscheidet 2 Formen von *Microtubule-associated protein 1 light chain 3B* (LC3). LC3-I befindet sich im Zytoplasma und LC3-II liegt membrangebunden vor. LC3-II entsteht aus LC3-I durch Konjugation mit Phosphatidylethanolamin im Rahmen der Autophagosomenbildung (siehe Abbildung 3). (Kabeya et al., 2000; Kabeya et al., 2004) Eine Erhöhung von LC3-I kann auf eine defekte Autophagie hinweisen (Runwal et al., 2019). Ein Anstieg von LC3-II kann entweder auf eine Induktion der Autophagosomenbildung im Rahmen einer hochregulierten Autophagie hindeuten oder auf eine Blockierung des autophagischen Flusses mit Ansammlung von Autophagosomen (Noboru Mizushima & Yoshimori, 2007; Tanida, Minematsu-Ikeguchi, Ueno, & Kominami, 2005). Die Expression von LC3-II korreliert gut mit der Zahl der Autophagosomen (Kabeya et al., 2000).

### 1.6.3 WIPI1

Im Rahmen der Autophagie-Initiierung kommt es zur Phosphatidylinositol 3-Phosphat Bildung am, sich aus dem endoplasmatischen Retikulum bildenden, Phagophor. Eine Rekrutierung und Bindung von WIPI-Proteinen, darunter WIPI1 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1), durch Phosphatidylinositol 3-Phosphat ist essenziell für die LC3-Lipidierung mit Phosphatidylethanolamin (siehe Abbildung 3). Ein Anstieg von WIPI1 kann, neben einer Autophagie-Induktion, auch auf eine Blockade im Autophagie Prozess hinweisen. (Proikas-Cezanne et al., 2015)

### 1.6.4 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein Signal-Polypeptid und Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation, welche eine Steuerfunktion in der Autophagie übernimmt. Während bei der nicht-selektiven Autophagie Ubiquitinketten vor allem eine modulierende Funktion haben, wird Ubiquitin in der selektiven Autophagie als Markierung zum Beispiel an toxische Proteinaggregate angehängt und leitet den autophagischen Abbau dieser speziell ausgewählten Moleküle ein. (Chen, Chen, & Huang, 2019; Grumati & Dikic, 2018) Werden bei beeinträchtigter Autophagie die markierten Proteine nicht effizient abgebaut, kann als Hinweis darauf die Gesamtmenge an ubiquitinierten Proteinen erhöht sein (Riley et al., 2010; Schänzer et al., 2018).

### 1.6.5 BAG3 und Hitzeschockproteine

BAG (Bcl-2-assoziiertes Athanogen) Proteine gehören zur Familie der Co-Chaperone. BAG3 (Bcl-2-assoziiertes Athanogen 3) wird im Herzmuskelgewebe stark exprimiert (Homma et al., 2006). Es ist ein Multifunktionsprotein zahlreicher wichtiger biologischer Prozesse. Dazu zählen u.a. eine Stimulation der Autophagie als auch der Proteinsynthese (Kathage et al., 2017; Klimek et al., 2017). Im Folgenden wird die Rolle von BAG3 im Rahmen der Autophagie näher betrachtet (siehe Abbildung 4).

Multikomponenten-Chaperon-Komplexe (siehe Abbildung 4) sind Ausdruck der stressinduzierten Interaktionen von dem Co-Chaperon BAG3 und Chaperonen, z.B. HSP70 und kleine Hitzeschockproteine (sHSPs): HSPB5, HSPB6 und HSPB8 (Arndt et al., 2010; Briknarová et al., 2002; Fuchs et al., 2009; Rauch et al., 2017). BAG3 bringt HSP70 und kleine Hitzeschockproteine (sHSPs) zusammen und aktiviert sie (Arndt et al., 2010; Rauch et al., 2017; Yerabandi, Kouznetsova, Kesari, & Tsigelny, 2022). Die Bindung der Chaperone untereinander ermöglicht einen optimalen Zustand für die Weiterverarbeitung von toxischen Proteinen (Ungelenk et al., 2016). Zum einen kann eine Neufaltung durch HSP70 ermöglicht werden (Rauch et al., 2017) und zum anderen kann der Multikomponenten-Chaperon-Komplex den Abbau von fehlgefalteten Proteinen einleiten (Arndt et al., 2010). Zusammen mit der Ubiquitin Ligase CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting Protein*) und Ubiquitin-konjugierenden Enzymen ermöglicht HSP70 die Ubiquitinierung von Proteinen (Klimek et al., 2017; Stankiewicz, Nikolay, Rybin, & Mayer, 2010; Huaqun Zhang et al., 2015), welche so für diverse Abbauege markiert werden (Arndt et al., 2010). Dabei wird die selektive Makroautophagie bevorzugt, wenn die von CHIP ubiquitinierten Proteine von BAG3-Komplexen präsentiert werden (siehe 1.5) (Arndt et al., 2010; Klimek et al., 2017). BAG3 unterstützt die Autophagosomenbildung im Rahmen der CASA. Dazu zählt eine Rekrutierung von p62 (Arndt et al., 2010; Gamerdinger et al., 2009) und die Interaktion mit SYNPO2 (Synaptopodin-2), welches die Fusion der Phagophormembranen erleichtert (Klimek et al., 2017; Ulbricht et al., 2013).

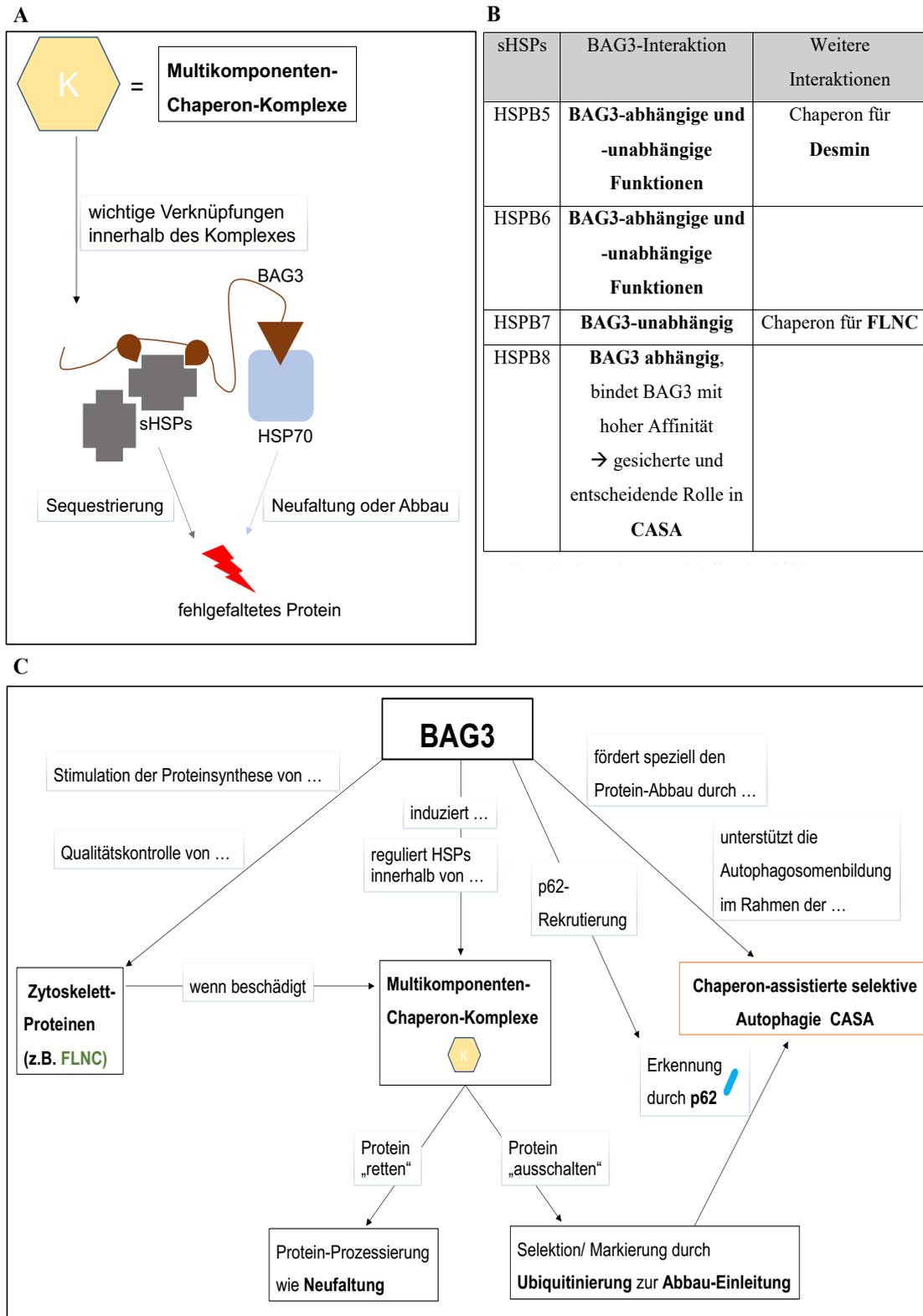


Abbildung 4: BAG3 und Hitzeschockproteine und ihre Rolle in der CASA; **A**: Multikomponenten-Chaperon-Komplexe modifiziert nach Rauch et al. (2017); **B**: Interaktionen der sHSPs, Quellen: Klimek et al. (2017), Perng et al. (1999), Juo et al. (2016), Fang, Bogomolovas, Trexler, and Chen (2019); **C**: Wichtige Funktionen des Co-Chaperons BAG3 in der Autophagie im quergestreiften Muskel

Ein Anstieg von BAG3 und Hitzeschockproteinen kann ein Hinweis auf mechanischen Stress mit Ansammlung von Proteinaggregaten in den Muskelzellen sein, da Chaperon-verknüpfte Autophagie-Wege hochreguliert werden (Carra et al., 2017; Collier & Benesch, 2020). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass BAG3 und HSPB8 während der CASA zusammen mit den beschädigten Proteinen abgebaut werden. (Arndt et al., 2010; Klimek et al., 2017; Ulbricht et al., 2013) Bei hochregulierter Autophagie erniedrigt sich dadurch die BAG3-Proteinexpression in der Zelle und bei Inhibition der Autophagie, zum Beispiel durch Unterdrückung, Blockierung oder Überforderung der Autophagie, erhöht sich die BAG3-Proteinexpression (Arndt et al., 2010). Das Gleiche gilt für HSPB8 (Klimek et al., 2017).

Für die Pro209Leu BAG3 Mutation konnte gezeigt werden, dass es zu einer Myofibrillären Myopathie (MFM) und restriktiven Kardiomyopathie (RCM) bereits im Kindesalter führt (Kostera-Pruszczyk et al., 2015; Schänzer et al., 2018). Zudem konnten bei dilatativen Kardiomyopathien im Erwachsenenalter Mutationen im BAG3-Gen nachgewiesen werden (Norton et al., 2011). Die Ergebnisse der Studie von Martin et al. (2021) zeigten, dass eine Reduzierung von BAG3 bei der menschlichen Herzinsuffizienz korreliert mit einer verringerten Fähigkeit der Myofilamente zur Krafterzeugung (Fmax) und einer vermehrten Ubiquitinierung von Myofilamenten (Martin et al., 2021), was wiederum ein Hinweis auf eine beeinträchtigte Autophagie ist.

Für HSPB8 gibt es eindeutige Hinweise, dass Missense-Varianten mit der distalen hereditären motorischen Neuropathie 2A (dHMN2A) und der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT2L) in Verbindung stehen. Die entstehende MFM ist morphologisch ähnlich derer, welche durch Defekte im BAG3-Gen ausgelöst werden. (Savarese et al., 2020)

## 1.7 Autophagie beim Alterungsprozess des Herzens

Eine beeinträchtigte Autophagie spielt beim Alterungsprozess des Herzens eine wichtige Rolle und kann Pathologien hervorrufen und verstärken (Vidal et al., 2019). Nicin et al. (2021) haben gezeigt, dass Herzmuskelgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) altersabhängige strukturelle Veränderungen aufweisen. So

kommt es zu einer Zunahme der Herzfibrose und älteres Herzmuskelgewebe hat in der Regel weniger pro-regenerative Fähigkeiten. (Nicin et al., 2021) Darüber hinaus wurde von Gamerdinger et al. (2009) beschrieben, dass der Proteinabbauweg der Autophagie, im Vergleich zu anderen Abbauwegen, wie z.B. das Ubiquitin-Proteasom-System, im Laufe der Zellalterung verstärkt abläuft, wobei BAG3 eine wesentliche Rolle spielt. Ziel ist dabei die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase im Alterungsprozess. (Gamerdinger et al., 2009) Aufgrund der Veränderungen beim Alterungsprozess wurde in dieser Arbeit Herzmuskelgewebe von Kindern und Jugendlichen verwendet.

## 1.8 Regulation von CASA-assoziierten Proteinen

Abbildung 5 zeigt eine Zusammenfassung der Bedeutungen von CASA-assoziierten Proteinexpressionen. Veränderungen sollten immer im Zusammenspiel mehrerer Autophagiemarker betrachtet werden, da viele Faktoren einen Einfluss auf die Proteinexpression haben können.

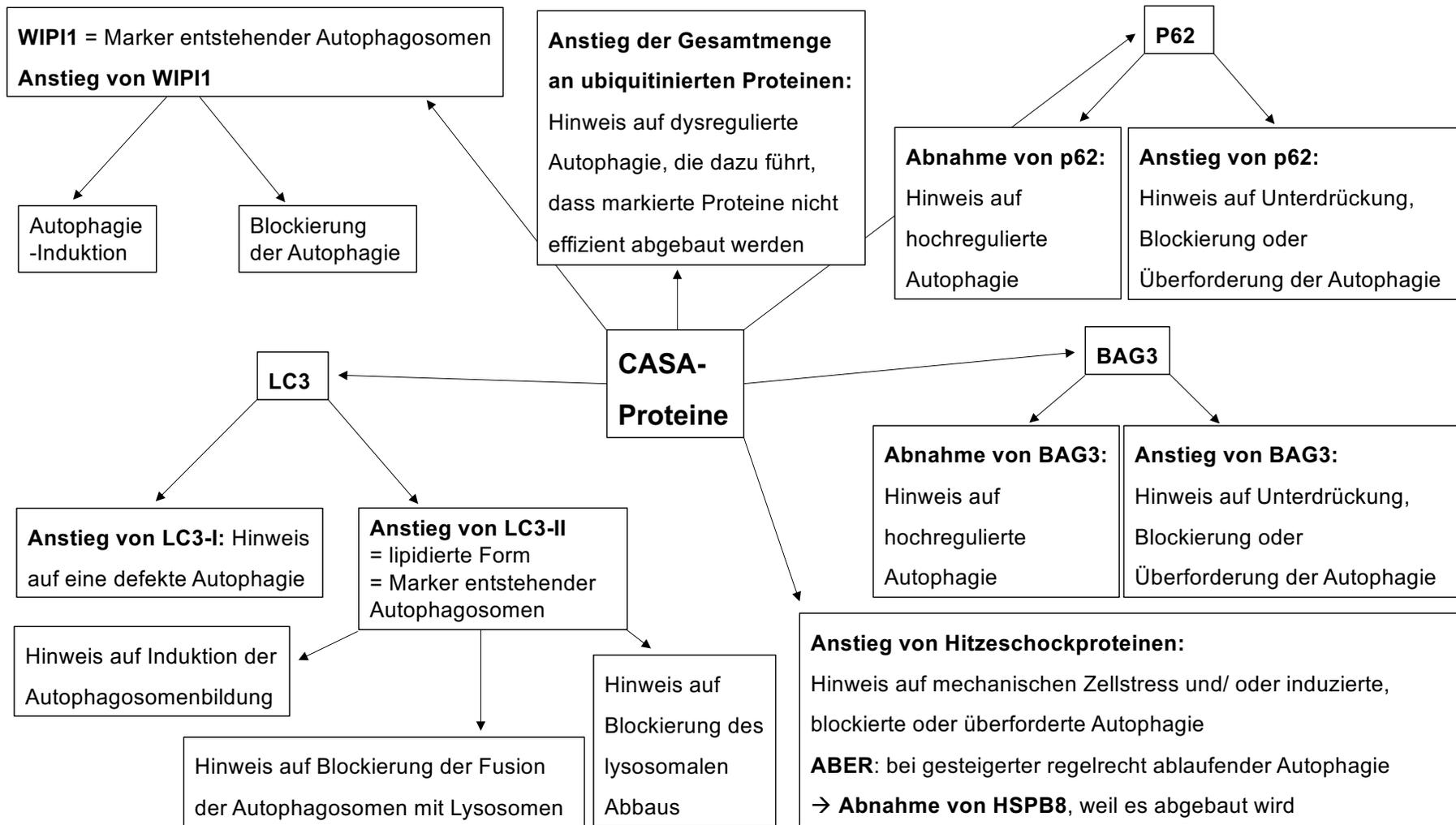


Abbildung 5: Regulation von CASA-assoziierten Proteinen

## 1.9 Sarkomerproteine

Sarkomerproteine sind Strukturproteine und ein essenzieller Bestandteil des Zytoskeletts und dienen im Herzmuskel u.a. der mechanischen Stabilisierung, Kraftübertragung, intrazellulären Signalübertragung und Mechanosensation (Goldfarb & Dalakas, 2009; Leber et al., 2016). Zu den wichtigsten Sarkomerproteinen gehören zum Beispiel Aktin und Myosin, die kontraktilen Proteine des Sarkomers (Sweeney & Hammers, 2018). Mutationen in Sarkomerproteinen können die Ursache von HCMs sein (Rupp et al., 2019). Besonders interessieren uns in dieser Arbeit die Sarkomerproteine FLNC und Desmin.

### 1.9.1 FilaminC (FLNC)

In den letzten Jahren ist die Bedeutung von FilaminC (FLNC) für die Funktion der Herzmuskelzelle und Rolle bei Kardiomyopathien untersucht worden (Brodehl et al., 2017; Ehsan, Jiang, K, & Gehmlich, 2017; Fürst et al., 2013) Filamine sind große, homodimere Strukturproteine mit einer Molekülmasse von 291 kDa, die Aktinfilamente binden und vernetzen und als Strukturproteine in den menschlichen Zellen zahlreiche Funktionen im Zellzytoskelett und in der Zellkommunikation erfüllen. Es existieren 3 menschliche Filamin-Isoformen: FilaminA (FLNA), FilaminB (FLNB) und FLNC, welche von 3 homologen Genen abstammen. Während FLNA und FLNB in vielen verschiedenen Gewebearten, wie zum Beispiel Nervenzellen oder Knochen- und Bindegewebszellen, vorkommen, wird FLNC hauptsächlich in der quergestreiften Muskulatur exprimiert und ist unter anderem an den Z-Scheiben, dem Sarkolemm und den Glanzstreifen im Herzmuskelgewebe lokalisiert (siehe Abbildung 6). Durch die Beteiligung an der mechanischen Stabilisierung, der intrazellulären Signalübertragung und Mechanosensation ist es ein essenzieller Bestandteil des Zytoskeletts und interagiert mit vielen Herzmuskelproteinen unterschiedlicher Funktionen wie Myotilin und Xin. (Dalkilic, Schianda, Thompson, & Kunkel, 2006; Fürst et al., 2013; Juo et al., 2016; Leber et al., 2016; Rosa, Raslova, & Bryckaert, 2019; Ulbricht et al., 2013; van der Ven et al., 2006)

Durch die Dauerbelastung des Herzmuskels kommt es zur Schädigung von FLNC. Abbau von geschädigten Proteinen durch Autophagie ist ein wesentlicher Bestandteil des Funktionserhalts. Es wurde gezeigt, dass FLNC teilweise über den BAG3-haltigen Multikomponenten-Chaperon-Komplex abgebaut wird. (Arndt et al., 2010; Klimek et al., 2017; Nakamura, Song, Hartwig, & Stossel, 2014; Ulbricht et al., 2013) Die Ergebnisse von Martin et al. (2021) bestätigten FLNC als einen BAG3-Klienten im Herzmuskel. BAG3 reguliert neben dem Abbau durch CASA auch die Synthese von FLNC (Kathage et al., 2017). Unter physiologischen Bedingungen kann der Abbau von beschädigtem FLNC bei mäßiger Krafteinwirkung/ Belastung auf die Zellen durch Hochregulation der Synthese ausgeglichen werden. Die Proteinexpression bleibt in diesem Fall gleich. Unter Bedingungen von zellulärem Stress, wie zum Beispiel eine akute mechanische Überbelastung der Zellen, kann es zu Veränderungen des Gleichgewichts kommen. Wenn eine gesteigerte Autophagie die Synthese von FLNC übersteigt, kann dies zu einer Verminderung des Filamin-Proteinlevels führen. Unter Inhibition der Autophagie steigt dagegen die Menge an Filamin in der Zelle. (Ulbricht et al., 2013)

Ein wichtiger Bindungspartner von dimerisiertem FLNC ist HSPB7, welches essenziell für den Funktionserhalt von FLNC und damit des Herzmuskelgewebes ist. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es in Abwesenheit von HSPB7 zur abnormalen FLNC-Lokalisation mit Sarkomer-Zerstörung und FLNC-Aggregation kommt. (Juo et al., 2016)

Mutiertes FLNC neigt zu einer abnormen Struktur, welche zu einer verminderten Stabilität, zum Zerfall der Z-Scheibe und damit zur Myopathie führt (Fürst et al., 2013; Zhou et al., 2020). Bestimmte FLNC-Mutationen führen zu einer dauerhaften Überforderung der Abbau-Maschinerie der Muskelzellen und zu FLNC-positiven Proteinaggregaten, welche den Abbau weiter erschweren (Fürst et al., 2013). Mutationen im FLNC-Gen können verschiedene Arten von Kardiomyopathien verursachen. Dazu gehören DCM, HCM, RCM und ARVC. (Begay et al., 2016; Brodehl et al., 2017; Gómez et al., 2017; Karmouch, Protonotarios, & Syrris, 2018) Dabei führen trunkierende Mutationen im FLNC-Gen eher zum klinischen Phänotyp der DCM und Missense-Mutationen zur Sarkomer-Zerstörung und zu den klinischen Phänotypen HCM und RCM (Verdonschot et al., 2020). In unserer Veröffentlichung von 2021 stellten wir einen

jungen Patienten vor, bei dem eine p.Ala2430Val-Mutation in FLNC zu einer HCM geführt hat (Schänzer et al., 2021) (siehe 4.2.1 und 5.6).

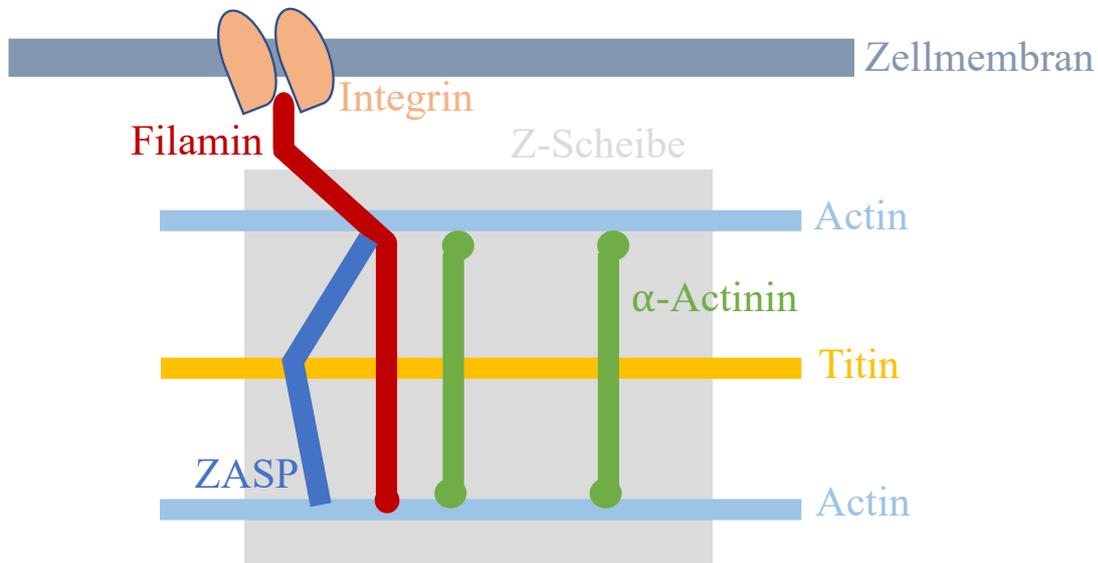


Abbildung 6: Lokalisation von FLNC in der Z-Scheibe modifiziert nach Fürst et al. (2013)

### 1.9.2 Desmin

In Muskelzellen ist Desmin die Hauptproteinkomponente der zytoplasmatischen Intermediärfilamente. (Singh, Kadioglu, Patel, Carrier, & Agnetti, 2020) Das Strukturprotein ist wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung der zellulären Zytoskelett-Integrität und ist beteiligt an Kraftübertragung und mechanochemischer Signalübertragung. Desmin macht im Herzmuskelgewebe einen deutlich größeren Teil des Gesamtproteins aus (2 %) im Vergleich zum Skelettmuskelgewebe (0,35 %) und stellt einen Hauptbestandteil des Erregungsleitungssystems des Herzes dar. (Goldfarb & Dalakas, 2009) Martin et al. (2021) identifizierten Desmin als einen weiteren Klienten von BAG3 und des damit verbundenen BAG3-Proteinumsatzes im Herzmuskel.

Intaktes Desmin kann ansteigen durch eine gesteigerte Genexpression oder eine verminderte oder gestörte Autophagie. Eine Akkumulation von Desmin-Aggregaten wurde sowohl bei ischämischer als auch bei nicht-ischämischer Herzinsuffizienz beobachtet. (Singh et al., 2020)

Mutiertes Desmin führt zu einer Zerstörung der Z-Scheiben-Struktur und es kommt zu unlöslichen Aggregationen, die zu weiteren Zerstörungen in der Muskelzelle führen und letztendlich zu einer Myopathie (Goldfarb & Dalakas, 2009). Nach neueren Studien könnte die Desmin-Aggregation auch einen schützenden Effekt haben und eine Möglichkeit von Zellen sein, übermäßigen mechanischen und Redox-Stress abzubauen. Diese Art Kompensationsmechanismus erreicht bei anhaltendem Stress allerdings seine Grenzen und übermäßige Desmin-Aggregate wirken krankheitsfördernd. (Singh et al., 2020)

Es konnte gezeigt werden, dass HSPB5 als Chaperon für Desmin fungiert und wichtig ist für dessen Funktionserhalt. HSPB5-Mutationen können Ursache für Desminopathien sein, denn unter physiologischen Bedingungen verhindert HSPB5 eine pathologische Aggregation von Desmin. (Goldfarb & Dalakas, 2009; Perng et al., 1999) Autophagie der Proteinaggregate zeigte sich als wichtige Zellreaktion auf HSPB5-Mutationen und hat einen entscheidenden Effekt in der Abschwächung der Krankheitsprogression (Tannous et al., 2008).

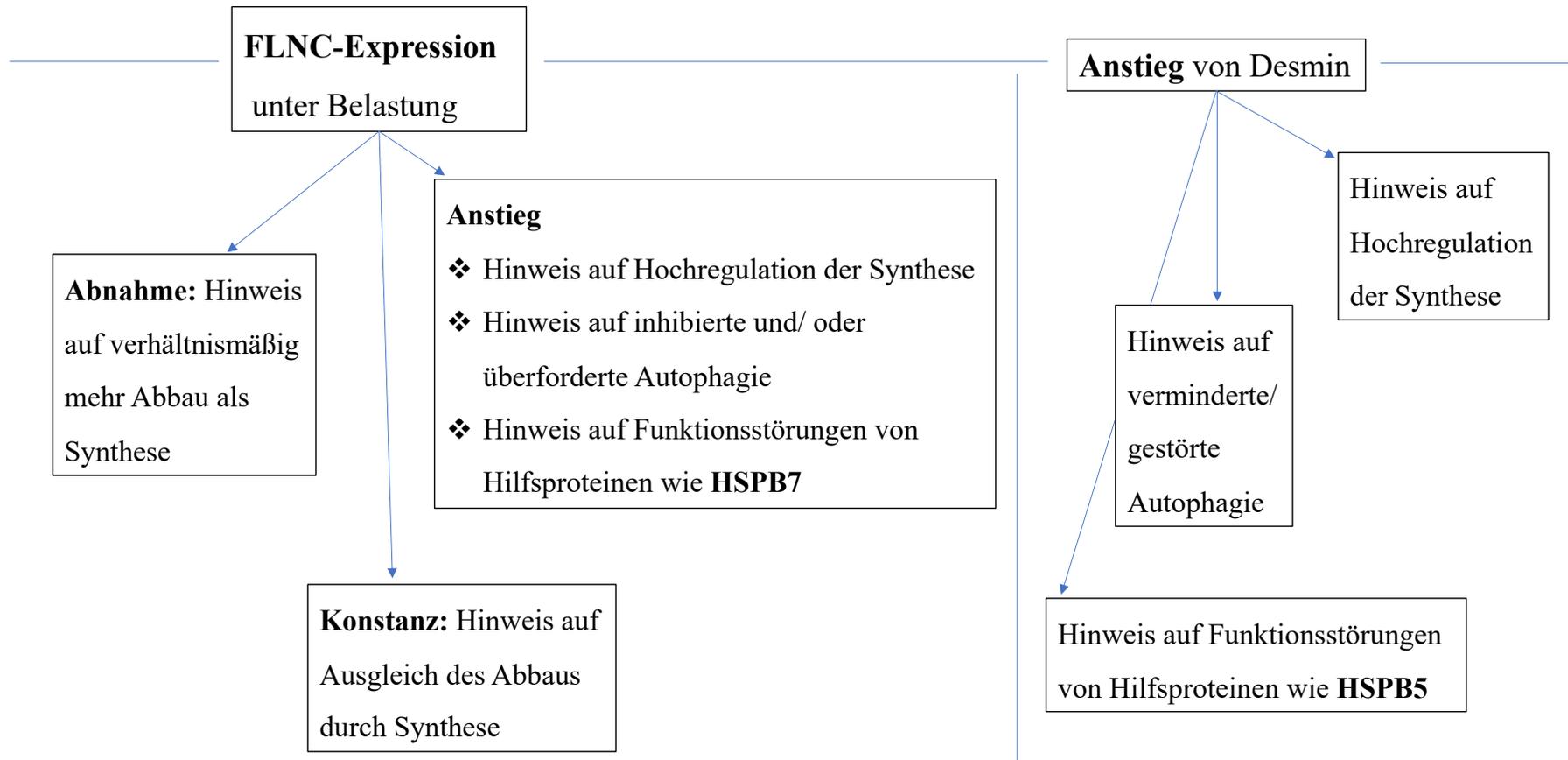


Abbildung 7: Bedeutungen der Proteinexpression von FLNC und Desmin

## 1.10 Mitochondriale Proteine

### 1.10.1 Mitophagie

Der Begriff Mitophagie beschreibt den selektiven autophagischen Abbau von Mitochondrien. In Säugetierzellen erfolgt der mitochondriale Abbau hauptsächlich über Makroautophagie. (Tolkovsky, 2009) Herzmuskelgewebe ist ständig aktiv und hat einen hohen Energiebedarf im Vergleich zu anderen Gewebearten. Mitochondrien stellen Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) bereit und sind im Herzmuskelgewebe besonders zahlreich. (Iglewski, Hill, Lavandero, & Rothermel, 2010) In Kardiomyozyten erfolgt ein hoher Umsatz an Mitochondrien. Es entstehen ständig neue Mitochondrien durch Wachstum und Teilung bereits bestehender Mitochondrien und es findet ständig ein autophagischer Abbau auf einem basalen Niveau statt, welches hoch oder runter reguliert werden kann. Dabei ist es von Bedeutung, dass Synthese und Abbau im Gleichgewicht stehen, da sowohl zu viele als auch zu wenige Mitochondrien einen zellulären Schaden verursachen können. (Iglewski et al., 2010; Russell et al., 2004) Defekte in der Mitophagie führen zu Kardiomyopathien (H. Li et al., 2022).

Der Prozess der Autophagosom-vermittelten Mitophagie ist der bereits beschriebenen CASA (siehe 1.5) ähnlich. Es gibt aber einige Besonderheiten, wie zum Beispiel der Stellenwert der Qualitätskontroll-Proteine PINK1, BNIP3L/Nix und MUL1 (siehe Abbildung 8). (Klimek et al., 2017; Schänzer et al., 2018)

### 1.10.2 PINK1

PINK1 (PTEN induzierte Kinase 1) ist eine mitochondriale Serin/Threonin-Protein-Kinase. Parkin ist eine Chaperon-assoziierte zytosolische E3-Ubiquitin-Ligase und kann in der Mitophagie CHIP ersetzen. (Klimek et al., 2017; Yoo & Jung, 2018) Eine mitochondriale Schädigung verursacht eine Depolarisation der mitochondrialen Membran, welche eine physiologisch ablaufende Spaltung von PINK1 verringert. Es kommt zur Akkumulation von PINK1 an Außenmembran der Mitochondrien. Akkumuliertes PINK1 rekrutiert und aktiviert Parkin. Parkin aggregiert ebenfalls an der äußeren Mitochondrienmembran und polyubiquitiniert bestimmte mitochondriale

Proteine. Die Polyubiquitinierung kann auf verschiedene Weise Mitophagie fördern. LC3-Adapter wie p62 können die entstandenen Ubiquitinketten an LC3 binden und so die Mitophagosomenbildung induzieren. Es ist außerdem ein weiterer komplexer Mitophagie fördernder Prozess bekannt: Parkin polyubiquitiniert das mitochondriale Protein Mitofusin1/2 (MFN1/2) und induziert damit dessen Abbau im Proteasom. MFN1/2-Entfernung induziert Mitochondrienspaltung und erleichtert damit Mitophagie.

Zusammenfassend wird durch eine mitochondriale Schädigung PINK1 aktiviert, welches Parkin aktiviert und Parkin fördert über Polyubiquitinierung Mitophagie. (Tanaka et al., 2010; Y. Yang et al., 2020; Yoo & Jung, 2018) Mit Grundlage dieser Informationen kann eine Erhöhung des Proteinlevels von PINK1 ein Hinweis auf vermehrte Induktion von Mitophagie sein. Zudem wurden auch Parkin-unabhängige stimulierende Funktionen von PINK1 in der Mitophagie beschrieben (Yoo & Jung, 2018).

#### 1.10.3 BNIP3L/Nix

Es gibt sog. LC3-Rezeptoren auf den Mitochondrien, die direkt mit LC3 interagieren und dafür keine zusätzlichen Proteine benötigen. Dazu zählt zum Beispiel BNIP3L/Nix (BNIP3L=*BNIP3-like=BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like*; Nix=*NIP3-like protein X*), welches auf diesem Weg Parkin-unabhängig Mitophagie vermitteln kann. BNIP3L/Nix hat allerdings auch Funktionen in der Parkin-abhängigen Mitophagie, indem es als Substrat von Parkin einen LC3-Adapter rekrutiert. BNIP3L/NIX scheint sowohl auf das basale Niveau der Mitophagie als auch auf eine Hochregulation bei Hypoxie Einfluss zu haben. Eine erhöhte Proteinexpression von BNIP3L/NIX kann auf eine hochregulierte Mitophagie hinweisen. (Yoo & Jung, 2018)

#### 1.10.4 MUL1

MUL1 (*mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1*) ist eine mitochondriale E3-Ubiquitin-Ligase, die in der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist (Yun et al., 2014). Die Funktionen von MUL1 sind komplex und im Fokus gegenwärtiger Forschungen. PINK1 rekrutiert und aktiviert bei mitochondrialer Schädigung E3-Ubiquitin-Ligasen wie Parkin und MUL1. Die Ligasen ubiquitinieren mitochondriale

Proteine und leiten Mitophagie ein. (Igarashi et al., 2020) MUL1 kann parallel zu dem PINK1/Parkin-Weg Mitofusin (MFN) regulieren und Mitophagie erleichtern. Der MUL1-Signalweg kann, zumindest bis zu einem gewissen Grad, einen Verlust von PINK1/Parkin kompensieren. (Yun et al., 2014) Zusammenfassend kann eine erhöhte MUL1-Proteinexpression auf eine PINK1-abhängige und PINK1-unabhängige Induktion von Mitophagie hinweisen.

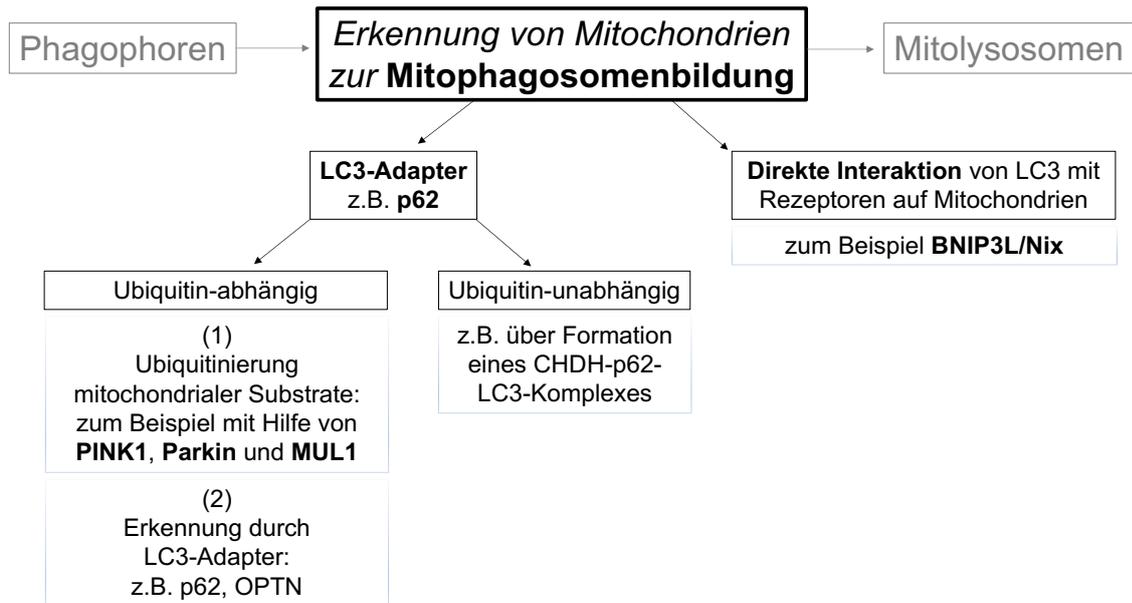


Abbildung 8: Erkennung von Mitochondrien bei der Mitophagosomenbildung modifiziert nach Y. Yang et al. (2020) und Yoo and Jung (2018)

### 1.10.5 SOD2

Mitochondrien sind der Hauptbildungsort von Superoxid ( $O_2(\cdot-)$ ), welches oxidativen Zellstress verursacht und dadurch Zellen zerstören kann. Um das zu verhindern, besitzen Zellen antioxidative Enzyme, wobei die SOD2 (Superoxiddismutase 2), auch manganabhängige SOD (MnSOD), durch ihre mitochondriale Lage einen besonderen Stellenwert hat. (Bresciani, da Cruz, & González-Gallego, 2015) Mitophagie hat einen entscheidenden Einfluss auf mitochondrialen oxidativen Stress. Erhöhtes SOD2 ist ein Hinweis auf oxidativen Stress und kann in Zusammenschau mit anderen Daten ein Hinweis auf beeinträchtigte Mitophagie sein. (Baechler, Bloemberg, & Quadrilatero, 2019)

## 2 Aufgabenstellung

Die Ursache der zugrunde liegenden pathologischen Veränderungen bei Kardiomyopathien und die daraus folgende Herzinsuffizienz sind noch immer nicht ganz verstanden (Yuan, 2018). Genaue Untersuchungen von erkranktem Herzmuskelgewebe sind daher wichtig, um pathologische Prozesse besser zu verstehen und Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zu erweitern. Insbesondere bei kindlichen Kardiomyopathien fehlen systematische Untersuchungen an humanem Gewebe (Lipshultz et al., 2019; Rupp et al., 2019).

Autophagische Prozesse spielen eine große Rolle zum Erhalt der Zellfunktion insbesondere am Herzmuskel, welcher stetigen Belastungen ausgesetzt ist (Höhfeld et al., 2021). Wir stellten die Hypothese auf, dass Autophagie, und insbesondere die spannungsinduzierte Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA), eine wichtige Rolle bei der Pathologie von Kardiomyopathien und der Ausbildung von Herzinsuffizienz spielt.

Um erkranktes Herzmuskelgewebe aussagekräftig untersuchen zu können, bedarf es etablierter Untersuchungsmethoden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung von Western-Blot-Analysen (WB) der Autophagieregulierung an Proteinextrakten aus Herzmuskelgewebe. Dabei wurden die Kardiomyopathie Subtypen sowie verschiedene Lokalisationen innerhalb des Herzmuskels untersucht. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der klinischen Parameter, wie EF-Wert, korreliert.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Untersuchungskohorte

Analysiert wurde Herzmuskelgewebe, welches von Patienten aus dem „Kinderherzzentrum und Zentrum für angeborene Herzfehler der Justus-Liebig-Universität Gießen“ im Zeitraum von 2016 bis 2018 entnommen wurde. Zusätzlich wurde ein Fall aus dem Jahr 2005 analysiert. Insgesamt wurden 17 Patienten im Alter von 2 Monaten bis 23 Jahren untersucht (Mittelwert = 91,65 Monate, SD = 84,38 Monate, 71% männlich) (siehe Tabelle 1). Das Gewebe stammt aus explantierten Herzen nach Herztransplantation (n=14) oder wurde im Rahmen von Myektomien (n=4) entnommen (siehe Tabelle 2). Retrospektiv wurden klinische Befunde, Laborparameter und genetische Befunde aus der Datenbank durch Mitarbeiter des Kinderherzzentrums generiert und im Rahmen der Kooperation dem Institut für Neuropathologie zur Verfügung gestellt. 35% der Patienten hatten eine dilatative Kardiomyopathie (DCM), 24% eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) und 41% eine andere Form einer Herzerkrankung. Unter Letztgenanntem wurde jeweils 1 Fall einer arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC), einer Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation, eines unterbrochenen Aortenbogens Typ A und 1 Fall mit kombiniert atrioventrikulärem Septumdefekt (AVSD) und hypoplastischem Aortenbogen, sowie 3 Fälle eines hypoplastischen Linksherzsyndroms (HLHS) untersucht (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Klinische Daten und Laborparameter der Patienten

Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter bei Gewebentnahme (Monate)	Dauer der Herzinsuffizienz* (Monate)	Ursache der Herzinsuffizienz	Kommentar	Genetik	Höchster BNP-Wert (pg/ml)	Niedrigster EF-Wert (%)
P1	M	6	5	DCM		TAZ C280C>G BARTH	6161	25
P2	M	154	46	DCM	Z.n. nach Myokarditis		656	15
P3	M	187	22	DCM			3241	37
P4	W	70	66	DCM			5000	13
P5	W	9	9	DCM			11000	25
P6	M	15	5	DCM			11286	16
P7	W	172	157	weitere	Abstoßungsreaktion		3977	56
P8a	M	149 (a)	24 (a)	weitere	ARVC	PKP-2	701 (a)	36 (a)
P8b		171 (b)	46 (b)			c.2327C>T	1900 (b)	21 (b)
P9	M	18	18	weitere	unterbrochener Aortenbogen Typ A		3435	53

ARVC=Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie; AVSD=Atrioventrikulärer Septumdefekt; BNP=B-natriuretisches Peptid; DCM=Dilatative Kardiomyopathie; EF=Ejektionsfraktion (Auswurfraction); HCM=Hypertrophe Kardiomyopathie; HLHS=Hypoplastisches Linksherzsyndrom; M=männlich; RCM=Restriktive Kardiomyopathie; W=weiblich; WB=Western Blot; \* vom Zeitpunkt der Diagnosestellung bis Biopsie/OP

Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter bei Gewebentnahme (Monate)	Dauer der Herzinsuffizienz* (Monate)	Ursache der Herzinsuffizienz	Kommentar	Genetik	Höchster BNP-Wert (pg/ml)	Niedrigster EF-Wert (%)
P10	M	14	14	weitere	AVSD, hypoplastischer Aortenbogen		5002	55
P11	M	151	151	weitere	HLHS		985	26
P12	W	4	4	weitere	HLHS		11625	62
P13	M	2	2	weitere	HLHS		4588	45
P14	M	101	53	HCM	RCM	BAG3 Pro209Leu	3194	65
P15	M	277	12	HCM		FLNC p.Ala2430Val	628	70
P16	M	162	161	HCM		PTPN11 c.1391G>C LEOPARD	2068	88
P17	W	67	67	HCM		Raf-1 C770C>T Noonan	214	91

ARVC=Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie; AVSD=Atrioventrikulärer Septumdefekt; BNP=B-natriuretisches Peptid; DCM=Dilatative Kardiomyopathie; EF=Ejektionsfraktion (Auswurffraktion); HCM=Hypertrophe Kardiomyopathie; HLHS=Hypoplastisches Linksherzsyndrom; M=männlich; RCM=Restriktive Kardiomyopathie; W=weiblich; WB=Western Blot; \* vom Zeitpunkt der Diagnosestellung bis Biopsie/OP

Tabelle 2: Myokardiales Gewebe der Patienten

Patient	Gewebe	Ventrikel rechts (I)	Ventrikel links (II)	weitere Lokalisation oder ohne Angabe
P1	Explantiertes Herz			X (Herzspitze)
P2	Explantiertes Herz		X	
P3	Explantiertes Herz		X	
P4	Explantiertes Herz		X	
P5	Explantiertes Herz		X	
P6	Explantiertes Herz		X	
P7	Explantiertes Herz	X V	V	
P8a	Myektomie		X	
P8b	Explantiertes Herz			Q (ohne Angabe)
P9	Explantiertes Herz	V	X V	
P10	Explantiertes Herz	V	X V	
P11	Explantiertes Herz	X		
P12	Explantiertes Herz			X (Herzspitze)
P13	Explantiertes Herz <b>Verzögerung beim Einfrieren</b>			X (ohne Angabe)
P14	Explantiertes Herz		X	
P15	Myektomie		X	
P16	Myektomie		X	
P17	Myektomie		X	

X=verwendet bei Western Blots zum Vergleich DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen; V=verwendet bei Western Blots zum Vergleich rechter und linker Ventrikel; Q=verwendet zur Western Blot Analyse für den Qualitätsnachweis der Methode (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12)

## 3.2 Ethikvotum

Die Berechtigung zur Durchführung der Studie wurde von der Justus-Liebig-Universität Gießen erteilt (Ethikvotum Nummer: 258/16) und von allen Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten wurde eine Einverständniserklärung zur Verwendung des Gewebes unterschrieben. Alle personenbezogenen Daten sind für die Doktorarbeit anonymisiert wurden.

## 3.3 Western Blot

Die Methode der Western Blot Analyse erlaubt es, Proteine im Gewebe semiquantitativ untersuchen zu können (Alegria-Schaffer, Lodge, & Vattem, 2009; Gilda et al., 2015, p. 2). Das bedeutet, dass man eine Erhöhung oder Erniedrigung von Proteinkonzentrationen zwischen verschiedenen Proben feststellen kann. Im Folgenden werden die Arbeitsschritte der Western Blot Analyse genauer beschrieben. Die Western Blot Protokolle, die Zusammensetzung der Gebrauchslösungen, die verwendeten Chemikalien, sowie die Geräte, Softwares und Verbrauchsmaterialien werden im Anhang detailliert aufgelistet.

### 3.3.1 Protein-Extraktion

Die in flüssigen Stickstoff gelagerten Herzmuskelproben wurden für die Proteinextraktion aufgearbeitet. Zur mechanischen Zerkleinerung des Gewebes wurden ein Dispergier-Gerät und ein Homogenisator genutzt. Als Lyse-Puffer der unfixierten Herzmuskelproben diente Laemmli-Puffer. Dieser wurde im Homogenisator zusammen mit den Proben durch Keramik-Homogenisator-Kügelchen zu einem homogenen Lysat verarbeitet. Das Dispergier-Gerät führt gleichwertig zu einer Homogenisierung. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß pipettiert und zentrifugiert (3 Minuten, Heraeus Fresco 17 Zentrifuge von Thermo Scientific, RCF 17000 x g). Nach Abpipettieren des Überstandes erfolgte die Ultraschall-Behandlung mit einem Ultraschall Sonifier zur DNA-Zerkleinerung. Das Proteinlysate im Laemmli-Puffer wurde, bis zur weiteren Verarbeitung, bei -20°C gelagert.

### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration an Herzmuskelgewebe

Die Proteinkonzentrationen (Gesamtproteinmenge) wurden quantitativ mit der Proteinmessung nach Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) bestimmt (Protokoll siehe Anhang). Die Messungen wurden mit dem Plattenleser TriStar LB 941 durchgeführt. Die Absorption der Proben-Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Es wurde einmalig anhand von bekannten Konzentrationsgemischen eine Eichkurve erstellt, welche als Bezugsgröße diente. Diese deckt 0-10µg/µl Proteinkonzentration ab. Die Standardkurve mit der Charakteristik  $y=0,1175x$ ,  $R^2=0,989$  wurde mir vom Forschungslabor des Instituts für Neuropathologie in Gießen zur Verfügung gestellt und anhand dessen konnten die unbekannt Konzentrationen der Proteinlysate bestimmt werden (siehe Abbildung 9). Jeder Absorptions-Wert  $A_{750}$  wurde zur Kontrolle von Pipettier-Ungenauigkeiten zweimal bestimmt und bei Abweichungen über zehn Prozent wurde die komplette Messung wiederholt. Zusätzlich wurde eine Leerwertmessung von dem Laemmli-Puffer durchgeführt und von den ermittelten Absorptions-Werten wurde der Leerwert abgezogen und dann der Mittelwert aus beiden Absorptionswerten gebildet.

### 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentrationen an Skelettmuskelgewebe

Als Nebenprojekt sollte bestimmt werden, wieviel Gewebe von Skelettmuskel notwendig ist, um eine valide Proteinbestimmung durchzuführen. Die Schnittmenge ist abhängig von der Probengröße. Die verwendeten Proben waren ca. 1cm im Durchmesser. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens 6 bis 9 Kryostat-Schnitte (20 µm) verwendet werden sollten, um die für Western Blots geeignete Proteinmenge von 30 µg zu erhalten (siehe Abbildung 10). Dies ergibt sich aus der Überlegung, dass die zu pipettierende Menge nicht zu groß (> 22 µl), limitiert durch die Größe der Geltaschen, und nicht zu klein (< 7 µl) sein sollte, da sonst der mögliche Pipettier-Fehler immer größer wird. Bei der Verwendung von 9 x 20µm-Kryostat-Schnitten im Vergleich zu 3 x und 6 x 20µm-Schnitten zeigt sich in der Proteinmessung proportional, wie erwartet, eine höhere Proteinkonzentration (siehe Abbildung 10).

Für ein WB von Skelettmuskelgewebe sollte eine Menge von 9 x 20µm-Kryostat-Schnitten verwendet werden.

<b>Kardiomyopathie-Projekt Proteinmessung 23.11.2018 Proben:</b>	<b>A<sub>750</sub> #1</b>	<b>A<sub>750</sub> #2</b>	<b>Konzentration (µg/µl)</b>	<b>verdünnte Proben! Konzentration (µg/µl) nach Zugabe von 1/4 Volumen Laemmli-Puffer</b>	<b>µl Protein-Lysat in Laemmli-Probenpuffer zu laden für den folgenden Betrag: 30 µg</b>
<b>Leerwert</b>	0,124	0,135			
<b>P9</b>	0,578	0,548	3,69	2,77	10,8
<b>P16</b>	0,582	0,578	3,83	2,88	10,4
<b>P17</b>	0,447	0,446	2,70	2,02	14,8
<b>P13</b>	0,851	0,804	5,94	4,46	6,7
<b>P8</b>	0,38	0,359	2,04	1,53	19,6

Abbildung 9: Proteinmessung an Herzmuskelgewebe

<b>Skelettmuskel Proteinmessung 18.05.2018</b>	<b>A<sub>750</sub> #1</b>	<b>A<sub>750</sub> #2</b>	<b>Konzentration (µg/µl)</b>	<b>verdünnte Proben! Konzentration (µg/µl) nach Zugabe von 1/4 Volumen Laemmli-Puffer</b>	<b>µl Protein-Lysat in Laemmli-Probenpuffer zu laden für den folgenden Betrag: 30 µg</b>
<b>Leerwert</b>	0,149	0,149			
<b>3 Schnitte</b>	0,254	0,266	0,94	0,71	42,3
<b>6 Schnitte</b>	0,348	0,381	1,83	1,38	21,8
<b>9 Schnitte</b>	0,453	0,496	2,77	2,08	14,4

Abbildung 10: Proteinmessung an Skelettmuskelgewebe

### 3.3.4 Vorbereitung der Proteinlysate

3 Teile Proteinlysat wurden mit 1 Teil Probenpuffer zusammengegeben und dann bei 95°C für fünf Minuten mit einem AccuBlock™ denaturiert und danach zentrifugiert (Protokoll siehe Anhang).

### 3.3.5 SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Bei der SDS-PAGE wandern Proteine in Polyacrylamid-Gelen im elektrischen Feld und werden dabei in einem Gel nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt (Laemmli, 1970). SDS bedeutet Natriumdodecylsulfat, welches die Proteine denaturiert und ummantelt, weshalb dann alle Proteine eine negative Ladung besitzen und zur Anode wandern (Laemmli, 1970; Smith, 1984). Damit die Proteine gleichmäßig im Gel verlaufen, wird ein weitporiges Sammelgel benötigt, welches sie zuerst durchwandern. Im, unter dem Sammelgel befindlichen, Trenngel erfolgt die Separation der Proteine (Smith, 1984). Die Gele werden vor der SDS-PAGE gegossen (Protokoll siehe Anhang). Dazu wurde der Gießstand (Bestandteil des Mini-PROTEAN® Tetra System) von Bio-RAD verwendet. Teilweise wurden 10er und teilweise 15er Probenkämme benötigt. Für die bestmögliche Darstellung eignen sich je nach Proteingröße unterschiedlich prozentige Gele. Kleinere Proteine lassen sich mit höher prozentigen Trenngelen gut darstellen und umgekehrt: für große Proteine (ca. 100kDa) 8 %, für mittelgroße Proteine (ca. 60kDa) 10 % Gele oder 12 % Gele und für kleine Proteine (ca. 20kDa) 15 % Gele. Kleinere Proteine wandern schneller als Größere und mit Hilfe eines Proteinmarkers kann man deshalb feststellen, an welcher Stelle im Gel sich die Proteine einer bestimmten Größe nach der Gelelektrophorese befinden.

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN® Tetra System von Bio-RAD verwendet. Die polymerisierten Gele wurden in das System eingebaut und 1x Laufpuffer bis zur Markierung eingefüllt. Die Proteinlysate wurden dann, nach Herausnahme der Probenkämme, in die dadurch entstandenen Taschen des Sammelgels pipettiert. Hilfreich war dabei, die Taschen vor dem Auftragen der Proteine mit einer Pipette zu spülen. Die verschiedenen Proben wurden mit gleichen Proteinmengen (30µg) pipettiert, so wie bei der Proteinmessung ermittelt. 30µg wurden gewählt, da bei der Erprobung der Western

Blots mit Herzmuskelgewebe mit dieser Proteinmenge eine gute Darstellung der Banden erreicht werden konnte. Das Ziel war es, so viel Proteinmenge zu verwenden, dass ein qualitatives Western Blot Ergebnis entsteht und dennoch so viel wie möglich wertvolles Gewebe einzusparen. Außerdem wurde ein Proteinmarker (=Größenstandard) ebenfalls in mindestens 2 Taschen aufgetragen. Zunächst wurden 80 V eingestellt für die Gelelektrophorese der Proteine durch das Sammelgel und nach ungefähr 15 Minuten, wenn die Proteine das Trenngel erreichten, wurde auf 130 V umgestellt. Darunter wanderten die Proteine 1 bis 2 Stunden.

### 3.3.6 Übertragung (Blotting) auf die Trägermembran

Der nächste Schritt bestand aus dem Transfer der Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran. Dafür wurde ein *Wet-Blotting*-Verfahren benutzt und das Transfer-System von Bio-RAD „Mini Trans Blot Module“ verwendet. Vor Beginn wurde die Membran zum Äquilibrieren für eine Minute in Methanol inkubiert. Für die Proteinübertragung mussten Gel und Membran möglichst passgenau aufeinander fixiert werden. Um Gel und Membran herum wurden „Whatman™ Gel Blot paper“ mit Filterfunktion und auf beiden Seiten jeweils ein Vlies platziert. Dies erfolgte im Transferpuffer, um ein gutes Aneinanderhaften und die Abwesenheit von Luftblasen zu garantieren. So entstand ein Transfer-Sandwich (Gel-Membran-Filterpapier-Sandwich), welches in eine Transfer-Kassette eingelegt wurde. Zum Errichten der Transferzelle wurden dann die Kassetten im Transfer-Tank platziert. Wichtig war dabei, dass das Gel in Richtung Kathode und die Membran in Richtung Anode zeigte. Damit das System nicht überhitzt dienten ein Kühlakku und ein Magnetrührer als Schutz. 1x Wet-Transferpuffer wurde in den Transfer-Tank gegeben und die Stromversorgung wurde angeschlossen. Bei einem Transfer-Tank (1-2 Gele) wurden 250 mA und bei zwei Transfer-Tanks (3-4 Gele) 500 mA für 2 Stunden angelegt.

Das Bild der elektrophoretischen Auftrennung wird bei der Übertragung der Proteine auf die Membran beibehalten. Die Proteine besitzen durch das SDS, wie oben beschrieben, eine negative Ladung (Smith, 1984). Ist das System angeschlossen wandern sie dadurch in Richtung positiver Elektrode (Anode) und somit in Richtung Membran. Nach den beschriebenen 2 Stunden sind alle Proteine vom Gel zur Membran transferiert und das System kann gestoppt werden.

Nach der Übertragung auf die Trägermembran war das Blocken dieser Membran ein wichtiger Schritt, um unspezifische Antikörperbindungen in den folgenden Schritten zu verhindern. Durch eine Blocklösung (5 % Milchpulver-Lösung) wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. (Cui, 2020) Bei Ubiquitin wurde das Blocken mit 1 % BSA-Lösung durchgeführt, weil bei diesem Antikörper das Blocken mit 5 % Milchpulver-Lösung nicht ausreichte. Die Membranen sollten bei beiden Blocklösungen mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubieren.

### *3.3.6.1 Qualitätskontrolle der Western Blot Analyse mittels Ponceau*

Abbildung 11 und Abbildung 12 zeigen eine Western Blot Analyse, die zur Etablierung und zum Qualitätsnachweis der Methode diente. Auf den PVDF-Membranen wurde die Proteinverteilung von Herzmuskelgewebe eines Patienten (P8b) mit einem Ponceau-Farbstoff sichtbar gemacht. Die Zahlenwerte entsprechen der geladenen Proteinmasse in µg. Marker bedeutet Proteinmarker und ist der Größenmaßstab.

In Abbildung 11 wurden die Proteinmassen von links nach rechts in aufsteigender Reihenfolge aufgetragen, was sich im Ergebnis eindeutig widerspiegelt. Die zwei nebeneinander aufgetragenen Proben wurden jeweils in der gleichen Menge pipettiert. In Abbildung 12 wird das gleiche Gewebe wie in Abbildung 11 gezeigt, aber mit veränderter Reihenfolge der Proteinmassen, um zu bestätigen, dass die Methode auch unabhängig von der Reihenfolge, beziehungsweise der Lage auf der Membran, aussagekräftig ist. Im Ergebnis bilden sich die Proteinbanden mit der gleichen Proteinmasse auch gleich ab. Zusammenfassend bestätigten diese Befunde, dass in der vorliegenden Arbeit die Western Blot Analysen sehr gut reproduzierbar sind.

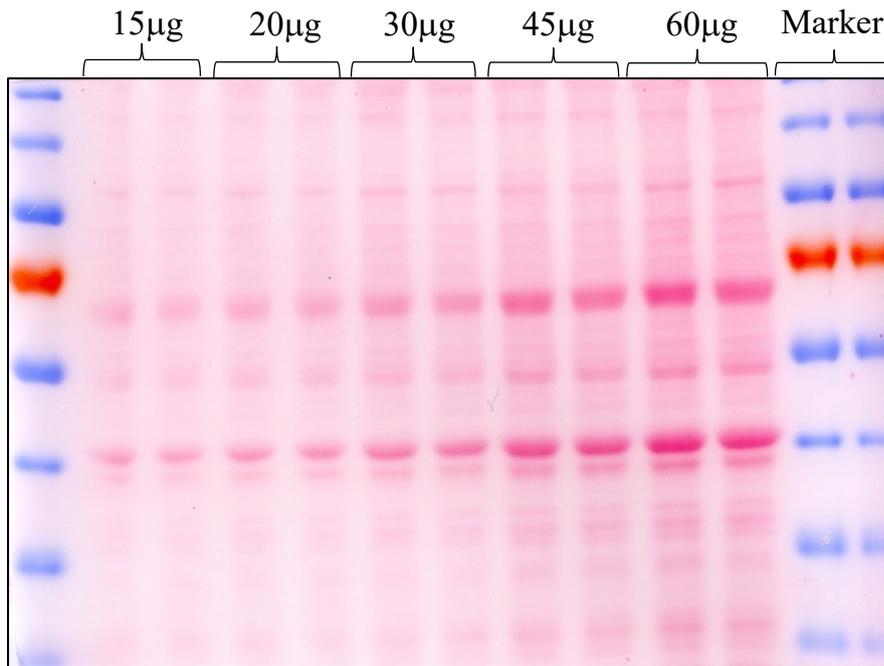


Abbildung 11: Proteinexpression in Herzmuskelgewebe, Proteinmassen in aufsteigender Reihenfolge

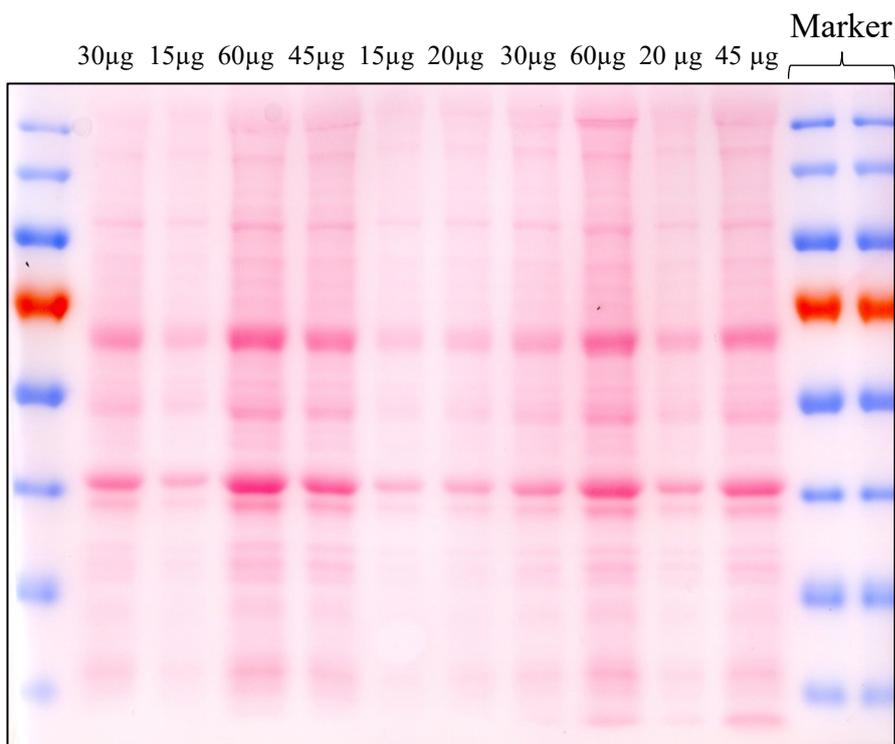


Abbildung 12: Proteinexpression in Herzmuskelgewebe, im Vergleich zu Abbildung 11 Reihenfolge der Proteinmassen geändert

### 3.3.7 Primärantikörper

Die Primärantikörper wurden in Blocklösung (5 % Milchpulver-Lösung) angesetzt (siehe Tabelle 3). Primärantikörper sind spezifische Antikörper, die gezielt an bestimmte Antigene auf den Membranen binden (Ni, Xu, & Gallagher, 2016). Der Ansatz der Antikörper in der Milchpulver-Lösung kann bis zu fünfmal verwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die Trägermembranen wurden passend zugeschnitten, je nachdem wie viele Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden sollten, und vollständig mit der jeweiligen Antikörper-Lösung bedeckt. Die Inkubationszeit umfasste stets 12 bis 16 Stunden, wobei die Membranen in der Antikörper-Milchpulverlösung auf einen Wippschüttler bei 4°C gelagert wurden.

Vor dem nächsten Schritt wurden die Membranen bei Raumtemperatur 4 x 15 Minuten mit Wasch-Puffer gewaschen, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren.

Tabelle 3: Primärantikörper

Primärantikörper	Produkt-nummer	Firma	Wirt	Verdünnung
Anti-BAG3	10599-1-AP	Proteintech®	Kaninchen	1:100 000
Anti-BNIP3L/Nix	#12396	Cell Signaling Technology®	Kaninchen	1:500
Anti-Desmin	M076029-2	DAKOPATTS, Agilent	Maus	1:1000
Anti-FLNc d16-20		Van der Ven et al., Institut für Zellbiologie der Universität Bonn	Kaninchen	1:10 000
Anti-HSPB5	ab13496	Abcam	Maus	1:8000
Anti-HSPB6	ab184161	Abcam	Kaninchen	1:10 000
Anti-HSPB7	ab150390	Abcam	Kaninchen	1:5000
Anti-HSPB8	ab96837	Abcam	Kaninchen	1:500
Anti-HSP70/HSP72	ADI-SPA-810-D	Enzo® Life Sciences	Maus	1:1000
Anti-LC3	0231-100/LC3-5F10	Nanotools Antikörpertechnik	Maus	1:1000
Anti-MUL1	PA5-29550	ThermoFisher Scientific	Kaninchen	1:1000
Anti-Pan-Actin	#4968	Cell Signaling Technology®	Kaninchen	1:1000
Anti-PINK1	#6946	Cell Signaling Technology®	Kaninchen	1:250
Anti-p62	610832	BD Biosciences	Maus	1:500
Anti-SOD2/ MnSOD	ab13533	Abcam	Kaninchen	1:10 000
Anti-Ubiquitin	Z0458	DAKO	Kaninchen	1:500
Anti-WIP1	ST1505	Merck Millipore	Maus	1:250

### 3.3.8 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4) wurden in Blocklösung (5 % Milchpulver-Lösung) angesetzt und die Membranen damit vollständig bedeckt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einen Wippschüttler.

Sekundärantikörper bestehen aus einem Antikörper, welcher fähig ist, am passenden Primärantikörper zu binden, und aus einem signalbildenden Molekül (Meerrettichperoxidase). (Ni et al., 2016)

*Tabelle 4: Sekundärantikörper*

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
Ziege IgG anti-Kaninchen Konjugation: HRP	111-035-144	Dianova	1:5000
Ziege IgG anti-Maus Konjugation: HRP	115-035-146	Dianova	1:5000

HRP=Meerrettichperoxidase

Nach der Inkubationszeit des Sekundärantikörpers wurden die Membranen erneut mit Waschpuffer 4 x 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Membranen 15 Minuten mit PBS gewaschen.

### 3.3.9 Signaldetektion

In der vorliegenden Arbeit wurden 2 semiquantitative Entwicklungsmethoden angewendet. Es sollte zunächst die Methode eines ECL-Imagers zum Einsatz kommen. Einige Antikörper konnten damit allerdings nicht ausreichend sichtbar gemacht werden und zeigten eine zu schwache, nicht auswertbare Intensität (siehe Abbildung 13). Aus diesem Grund wurde bei diesen Antikörpern auf die klassische Methode der Fotochemie mit Hilfe eines Röntgenfilms zurückgegriffen (siehe Tabelle 5). Die Überlegung die Western Blots komplett mit der Methode der Fotochemie zu wiederholen, wurde verworfen, da nur begrenzt Herzmuskelgewebe der Patienten zur Verfügung stand. Für beide Methoden wurden entweder ECL oder Plus-ECL verwendet (siehe Tabelle 5),

wobei Plus-ECL ein stärkeres Signal hervorruft. Die Inkubationszeit der Membranen mit ECL oder Plus-ECL betrug 5 Minuten.

*Tabelle 5: Entwicklungsmethoden*

<b>Primärantikörper</b>	<b>Entwicklungsmethode</b>	<b>ECL</b>	<b>Plus-ECL</b>
Anti-BAG3	ECL-Imager	X	
Anti-BNIP3L/Nix	Fotochemie		X
Anti-Desmin	ECL-Imager		X
Anti-FLNc d16-20	ECL-Imager	X	
Anti-HSPB5	ECL-Imager	X	
Anti-HSPB6	ECL-Imager	X	
Anti-HSPB7	ECL-Imager	X	
Anti-HSPB8	ECL-Imager		X
Anti-HSP70/HSP72	ECL-Imager		X
Anti-LC3	Fotochemie		X
Anti-MUL1	Fotochemie		X
Anti-Pan-Actin	Fotochemie, ECL-Imager		X
Anti-PINK1	Fotochemie		X
Anti-p62	Fotochemie		X
Anti-SOD2/ MnSOD	ECL-Imager	X	
Anti-Ubiquitin	Fotochemie		X
Anti-WIP1	Fotochemie		X

Die verwendeten Methoden der Signaldetektion der Protein-Antikörper-Komplexe basieren auf dem **Meerrettichperoxidase-Luminol-System**. Der Sekundärantikörper besitzt eine Bindungsstelle für den Primärantikörper und ist mit der Meerrettichperoxidase verknüpft (Ni et al., 2016). ECL und Plus-ECL sind Luminol- und Peroxid-Reagenzien. In Gegenwart von Meerrettichperoxidase und Peroxid wird Luminol oxidiert. Dabei wird Energie in Form von Licht emittiert. Die Emission findet statt, bis das oxidierte Luminol zerfällt und wieder in den Grundzustand übergeht. (Alegria-Schaffer et al., 2009) Die Licht-Emissionen wurden mit ECL-Imager oder Fotochemie detektiert.

### 3.3.9.1 ECL-Imager

Für die Signaldetektion mit dem ECL-Imager (ChemoCam; Firma: Intas Science Imaging Instruments GmbH; Artikelnummer: CC5590) wurden die Membranen nach der Inkubation mit ECL oder ECL-Plus auf eine Platte aufgelegt, mit einer Folie bedeckt, damit sie nicht austrocknen, und im Gerät unter der Kamera positioniert. Die Aufnahmezeit betrug 45 Minuten.

### 3.3.9.2 Fotochemie

Bei der Detektion der Lichtemission mittels Röntgenfilm wurde eine lichtundurchlässige Röntgenkassette benötigt, in welche die Membranen in einer durchsichtigen Folie eingelegt wurden. Dies erfolgte ebenfalls kurz nach der 5-minütigen Exposition mit ECL oder Plus-ECL. In einem Dunkelraum wurden die Röntgenfilme in der Kassette auf den Membranen positioniert und unterschiedlich lange (abhängig vom Antikörper und Wiederverwendung des Antikörpers) der Lichtexposition ausgesetzt. Danach erfolgte die Entwicklung der Röntgenfilme mit folgendem Gerät und folgenden Materialien: Entwickler (Curix 60), Röntgenfilme (CL-Xposure™ Film, 18 x 24 cm) und Entwickler-Substanzen (Unimatic-D, Unimatic-F).

### 3.3.10 Vergleich der Entwicklungsmethoden Fotochemie und ECL-Imager

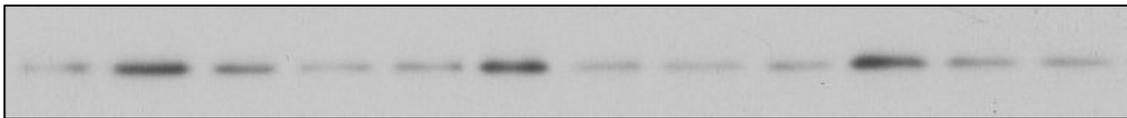
Tabelle 6: Vergleich der Entwicklungsmethoden

	Fotochemie	ECL-Imager
<b>Empfindlichkeit bei der Signaldetektion</b>	<b>empfindlicher</b>	<b>weniger empfindlich</b>
<b>Standardisierung des Arbeitsablaufs</b>	<b>schwieriger</b>	<b>einfacher</b>
<b>Arbeits- und Zeitaufwand</b>	<b>aufwändiger</b>	<b>zeitsparend</b>

In Abbildung 14 ist dieselbe Membran wie in Abbildung 13 dargestellt. Für die Darstellung der Abbildung 13 wurde der ECL-Imager als Entwicklungsmethode verwendet. Für die Darstellung der Abbildung 14 wurde die Membran gestrippt und die Entwicklungsmethode der Fotochemie verwendet. Da es sich um dieselbe Membran handelt, sind die Versuchsbedingungen identisch und man erkennt im direkten Vergleich, dass sich die WB-Banden, die mit der Fotochemie entwickelt wurden, stärker abbilden als bei der Entwicklung mittels ECL-Imager.



*Abbildung 13: p62-Proteinbanden entwickelt mittels ECL-Imager*



*Abbildung 14: p62-Proteinbanden entwickelt mittels Fotochemie*

Vorteile vom ECL-Imager dahingegen sind, dass die Methode zeitsparend ist, weil das Gerät viele Funktionen übernimmt und den Ablauf erleichtert, und dass das Gerät, durch z.B. Voreinstellungen der Aufnahmezeiten und kontinuierliche Aufnahme der Signalabgabe, eine Standardisierung des Arbeitsablaufes ermöglicht. Bei der Fotochemie läuft dies manuell und in mehreren Prozessen hintereinander ab und die Signalintensität der Membranen lässt nach, wenn mehrere Entwicklungen für unterschiedliche Belichtungszeiten hintereinander erfolgen.

Wie in Tabelle 6 dargestellt haben beide Entwicklungsmethoden Vor- und Nachteile. Für viele Antikörper kann, durch ausreichende Signalintensität, der ECL-Imager gleichwertig zur Fotochemie eingesetzt werden. Da die Standardisierungsmöglichkeiten und der Arbeits- und Zeitaufwand beim ECL-Imager günstiger sind, empfiehlt es sich, in diesen Fällen die Entwicklung mit dem ECL-Imager durchzuführen. Befinden sich unter den ausgewählten Antikörpern allerdings solche, mit nicht ausreichender Signalstärke für den ECL-Imager, sollte man einheitlich für alle Antikörper auf die Fotochemie zurückgreifen.

### 3.3.11 Ladekontrolle

Um eine gleichmäßige Proteinbeladung der Gele zu erreichen, wurde eine Proteinmessung (siehe 3.3.2) durchgeführt. Um die gleichmäßige Proteinbeladung zu kontrollieren, wurde bei jedem Western Blot ein *housekeeping* Protein mitbestimmt. *Housekeeping* Proteine können mit spezifischen Antikörpern detektiert werden und als Ladekontrolle dienen. Die Bandenstärke der verschiedenen Proben sollte annähernd gleich sein. (Zeeck, 2013) In dieser Arbeit wurde dafür Pan-Actin ausgewählt, weil es wird im Herzmuskel annähernd gleichmäßig exprimiert wird (Vandekerckhove, Bugaisky, & Buckingham, 1986). Wenn *housekeeping proteins* zur Normalisierung verwendet werden, muss nachgewiesen werden, dass die Expression der Proteine durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird. (Mishra, Tiwari, & Gomes, 2017, p. 8) Bei der Western Blot Analyse, die zur Etablierung und zum Qualitätsnachweis meiner Methode diente (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12) wurde neben dem Anfärben der Membran mit Ponceau-Farbstoff auch das *housekeeping protein* Pan-Actin dargestellt (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Abbildung 15 zeigt die Proteinmassen in aufsteigender Reihenfolge und die jeweils nebeneinander aufgetragenen Proteinmengen sind identisch und bilden sich gleich ab. Größere Proteinmengen führen zu einer stärkeren Bande. In Abbildung 16 wurden die Proteinmassen, im Vergleich zu Abbildung 15, in veränderter Reihenfolge aufgetragen. Eine identische Proteinmengen-Beladung bildet sich gleich ab unabhängig von der Lage auf der Membran (siehe Abbildung 16).

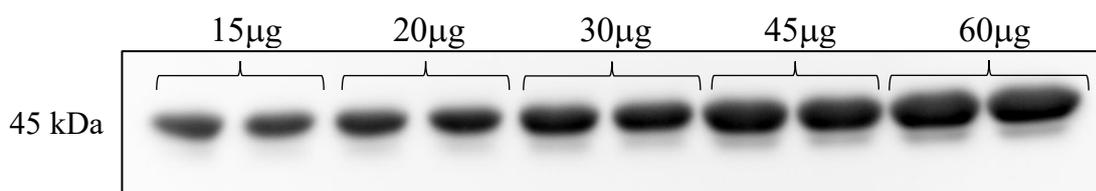


Abbildung 15: Haushaltsprotein Pan-Actin, Proteinmassen in aufsteigender Reihenfolge

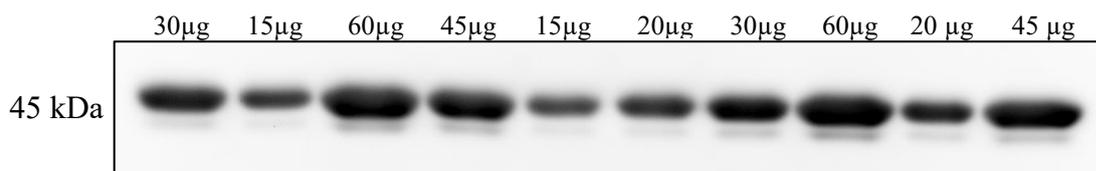


Abbildung 16: Haushaltsprotein Pan-Actin, Die Proteinmassen wurden im Vergleich zu Abbildung 15 in veränderter Reihenfolge aufgetragen.

### 3.3.12 Stripping

Um auf den Membranen noch weitere Proteine nachweisen zu können, gibt es die Möglichkeit des Strippings. Dabei werden die Bindungen beider Antikörper (Primär- und Sekundärantikörper) rückgängig gemacht und die Bindungsstellen sind somit wieder für neue Antikörper frei.

Zunächst wurde die Membran 3 x 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und danach mit Stripping-Puffer 2 x 30 Minuten inkubiert. Dann erfolgte erneut ein Waschen der Membran mit Waschpuffer für 3 x 10 Minuten und das Blocken der Membran mit 5 % Milchpulver-Lösung für 1 Stunde. Nach diesem Schritt wurde die Membran mit dem erwünschten Primärantikörper über Nacht inkubiert und am nächsten Tag wurde nach dem gleichen Schema vorgegangen wie bereits unter 3.3.8 Sekundärantikörper und 3.3.9 Signaldetektion beschrieben.

### 3.3.13 Auswertung

#### 3.3.13.1 Quantifizierung

Die mittels Fotochemie entwickelten Röntgenfilme wurden eingescannt. Die vom ECL-Imager entwickelten Proteinbanden lagen direkt in digitaler Form vor. Es wurden jeweils Proteinbanden mit geeigneter Belichtungszeit gewählt. Geeignet bedeutet, dass weder eine Über- noch Unterbelichtung vorliegen sollte, da dies zu einer fehlerhaft veränderten Darstellung der quantitativen Verhältnisse der Banden untereinander führen kann. Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurde *ImageJ* verwendet. Als Bildgröße wurden einheitlich 8-bit gewählt. Von den erhaltenen Zahlenwerten der Zielproteine wurde der gemessene Wert für den *background* abgezogen, um *background*-Störungen zu reduzieren.

#### 3.3.13.2 Normalisierung

Der erhaltene Zahlenwert nach der Quantifizierung wurde zur Normalisierung durch die Ladekontrolle Pan-Actin geteilt. Zur Standardisierung dieses Prozesses wurde eine Excel-Tabelle verwendet:  $[\text{Zielprotein-background}] / \text{Pan-Actin}$ .

### 3.3.13.3 Statistische Analysen

Zur Erstellung der Graphiken und zur statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism 9 für macOS, Version 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) verwendet.

Für den Vergleich der Proteinexpressionen der Subgruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen wurde eine *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* durchgeführt.

Für den Vergleich der klinischen Herzinsuffizienzparameter der Subgruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen wurde ebenfalls eine *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* durchgeführt.

Für die Korrelation der Proteinexpression mit klinischen Parametern wurde ein Pearson Korrelationstest mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinexpressionen im Herzmuskelgewebe von Kindern untersucht. Bei Western Blot Analysen handelt es sich um eine semiquantitative Methode (Alegria-Schaffer et al., 2009). Die erhaltenen Zahlenwerte müssen aufgrund der semiquantitativen Western Blot Methode nicht als exakte Werte, sondern als Tendenzwerte in Relation zueinander gesehen werden.

In der Ponceau-Färbung stellt sich unspezifisch das komplette Proteinbandenmuster dar (siehe Abbildung 17). Abbildung 17 zeigt das Proteinverteilungsmuster von Herzmuskelgewebe der Patienten P9, P16, P17, P13 und P8 auf einer mit Ponceau-Farbstoff angefärbten PVDF-Membran. Das Bandenmuster von P8 zeigte sich deutlich abweichend zu den übrigen Bandenmustern und das Bandenmuster von P13 dichter geladen als die übrigen Bandenmuster. P8 und P13 wurden deshalb als Ausreißer identifiziert und bei der statistischen Auswertung der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen nicht berücksichtigt.



Abbildung 17: Proteinverteilungsmuster von Herzmuskelgewebe; P8 und P13 sind Ausreißer

#### 4.1.1 Vergleich der klinischen Parameter für Herzinsuffizienz der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen

Die klinischen Daten der Patienten P1 - P17 sind in Tabelle 1 dargestellt. Im Folgenden werden die Analysen (siehe Tabelle 7 und Abbildung 18) der klinischen Parameter Alter bei Biopsie, Dauer der Herzinsuffizienz, höchster BNP-Wert und niedrigster EF-Wert der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen gezeigt.

Bei der HCM Gruppe [78,5 % (Mittelwert) +/- 12,92 % (Standardabweichung SD)] wurden signifikant höhere EF-Werte gemessen als bei der DCM Gruppe (21,83 % +/- 9,042 %) und als bei der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen (50,40 % +/- 14,05 %).

Für die klinischen Parameter Alter bei Biopsie, Dauer der Herzinsuffizienz und höchster BNP-Wert ergab sich für die Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen kein signifikanter Unterschied. Insgesamt zeigten sich große SD-Werte, welche die Heterogenität der Gruppen widerspiegeln.

Tabelle 7: Statistische Analysen zum Vergleich der klinischen Parameter der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen; p-Wert und Signifikanz nach ordinary one-way ANOVA

Klinische Parameter	Mittelwert (M)			Standardabweichung (SD)			p-Wert	signifikant (*)/ nicht signifikant (ns)
	DCM	HCM	Weitere*	DCM	HCM	Weitere <sup>°</sup>		
<b>Alter bei Biopsie (Monate)</b>	73,50	151,8	71,80	79,39	92,29	82,38	0,3069	ns
<b>Dauer der Herzinsuffizienz (Monate)</b>	25,50	73,25	68,80	25,24	62,98	77,97	0,3550	ns
<b>Höchster BNP-Wert (pg/ml)</b>	6224	1526	5005	4239	1367	3985	0,1709	ns
<b>Niedrigster EF-Wert (%)</b>	21,83	78,50	50,40	9,042	12,92	14,05	<0,0001	****

<sup>°</sup>Weitere/ andere Herzerkrankungen

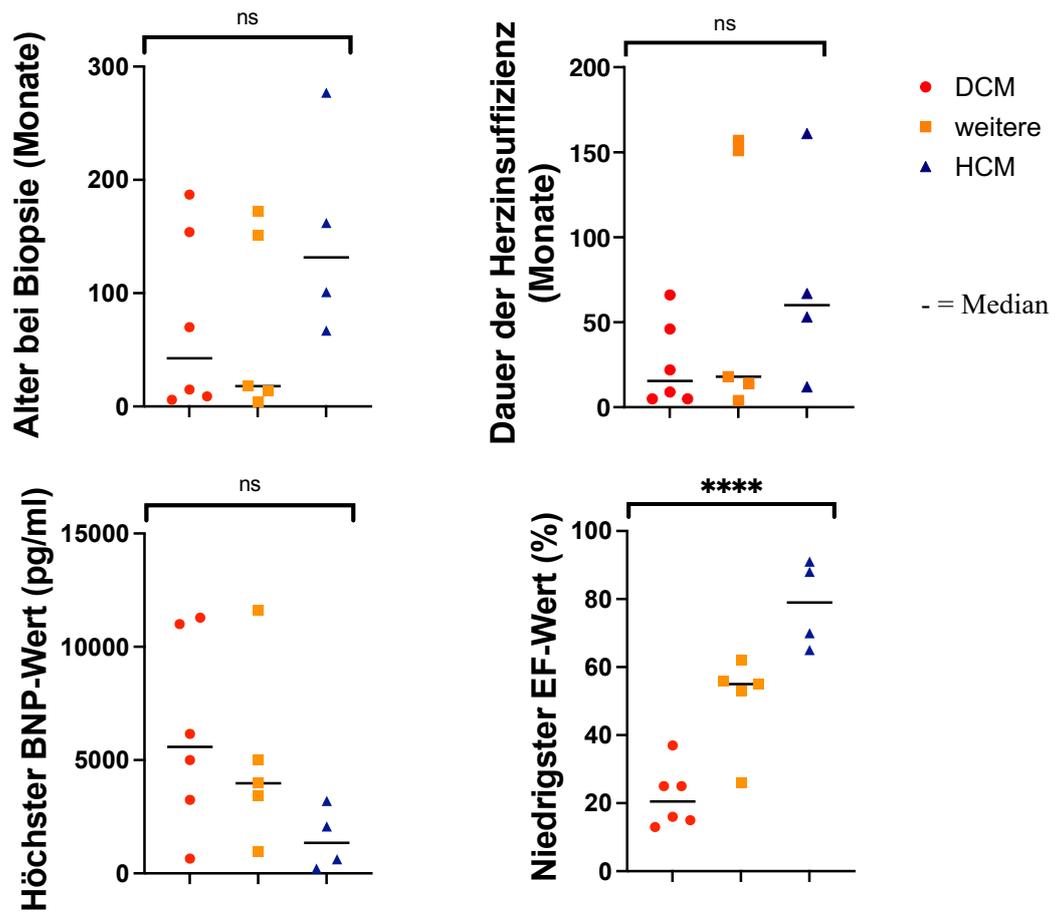


Abbildung 18: Box-Plots der klinischen Daten

#### 4.1.2 Vergleich der Proteinexpressionen in den unterschiedlichen Subgruppen (DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen)

Im Folgenden werden die Proteinexpressionen der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen miteinander verglichen. Da, aufgrund limitierter Anzahl der Geltaschen (n=10 oder n=15), nicht alle Patientenproben in einem Western Blot untersucht werden konnten, mussten für jedes Protein jeweils drei Western Blots durchgeführt werden. Als Vergleich diente das Gewebe des Patienten P9, welches auf jedem Western Blot zweimal aufgetragen wurde. Die im Folgenden dargestellten WB-Trägermembranen werden von links nach rechts als **WB-A** (P12, P9, P7, P14, P15, P9), **WB-B** (P9, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P10, P11, P12, P7, P9) und **WB-C** (P9, P16, P17, P13, P8, P9) bezeichnet.

Wie in Abbildung 20 beispielhaft beschriftet, wird über den Box-Plots die Signifikanz der *ordinary one-way ANOVA* („ANOVA“) und unter den Box-Plots die Signifikanz des *tukey's multiple comparisons tests* („tukey's Test“) gezeigt. Bei Letztgenanntem sind nur die signifikanten Unterschiede beschriftet und keine Angabe bedeutet keine Signifikanz.  $P \leq 0,05$  wird mit einem Sternchen (\*) und  $P \leq 0,01$  mit zwei Sternchen (\*\*) gekennzeichnet.

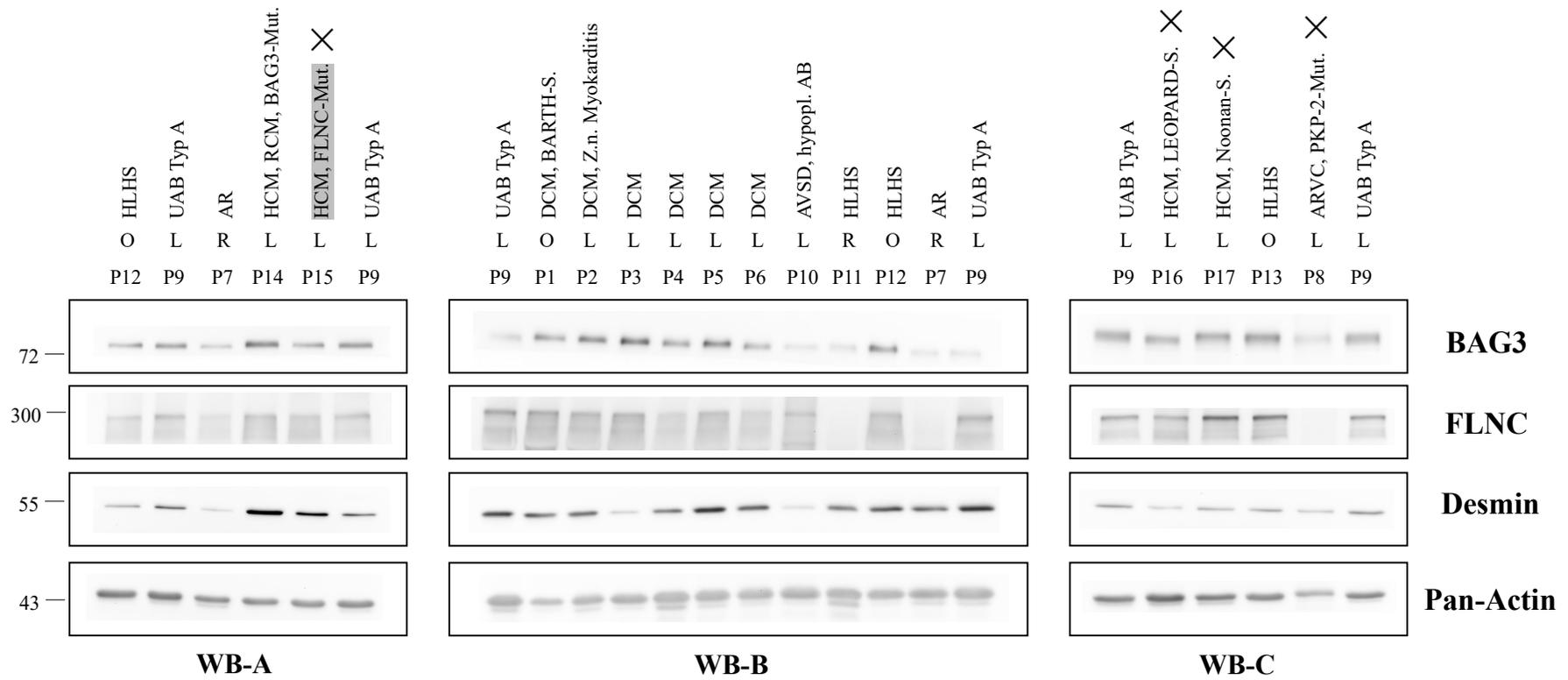


Abbildung 19: Proteinexpression von Sarkomerproteinen

AR=Abstoßungsreaktion, hypopl. AB=hypoplastischer Aortenbogen, L=linker Ventrikel, Mut.=Mutation, O=ohne Angabe oder weitere Lokalisation, R=rechter Ventrikel, S.=Syndrom, UAB= unterbrochener Aortenbogen, X= Myektomie

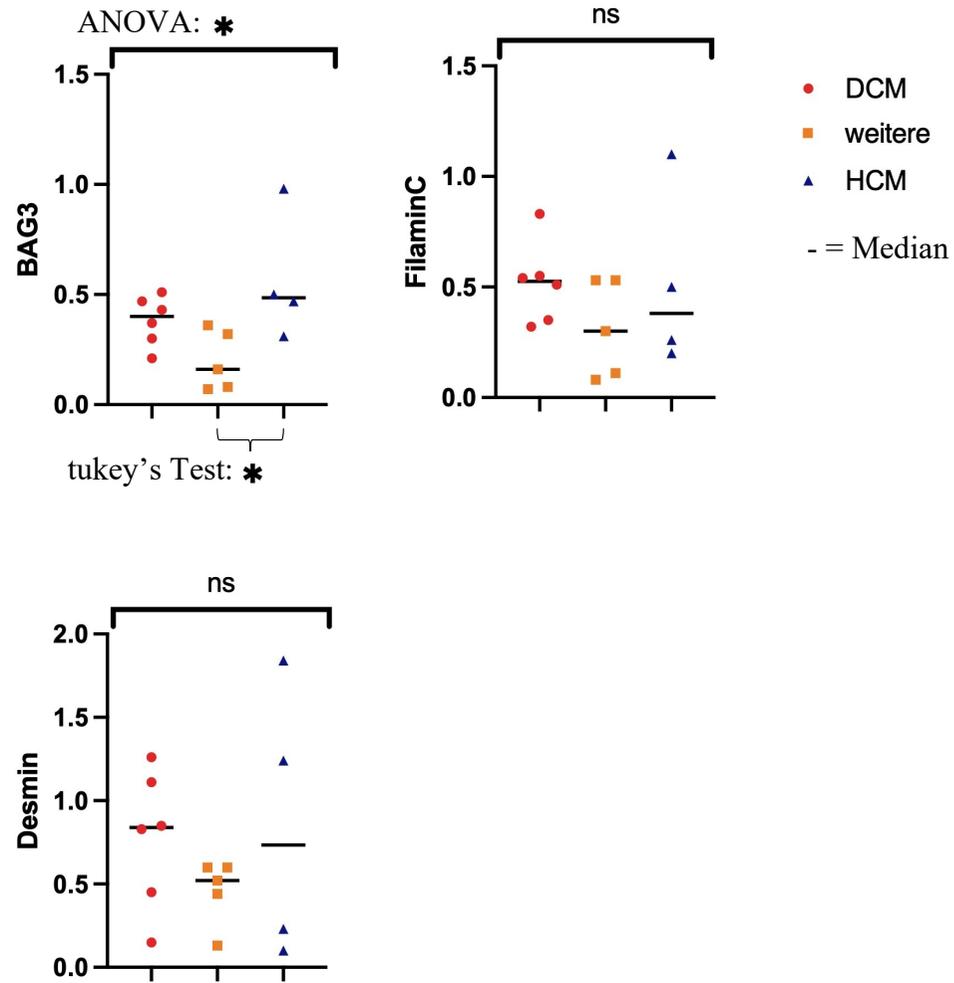


Abbildung 20: Box-Plots zum Vergleich der Proteinexpression von Sarkomerproteinen

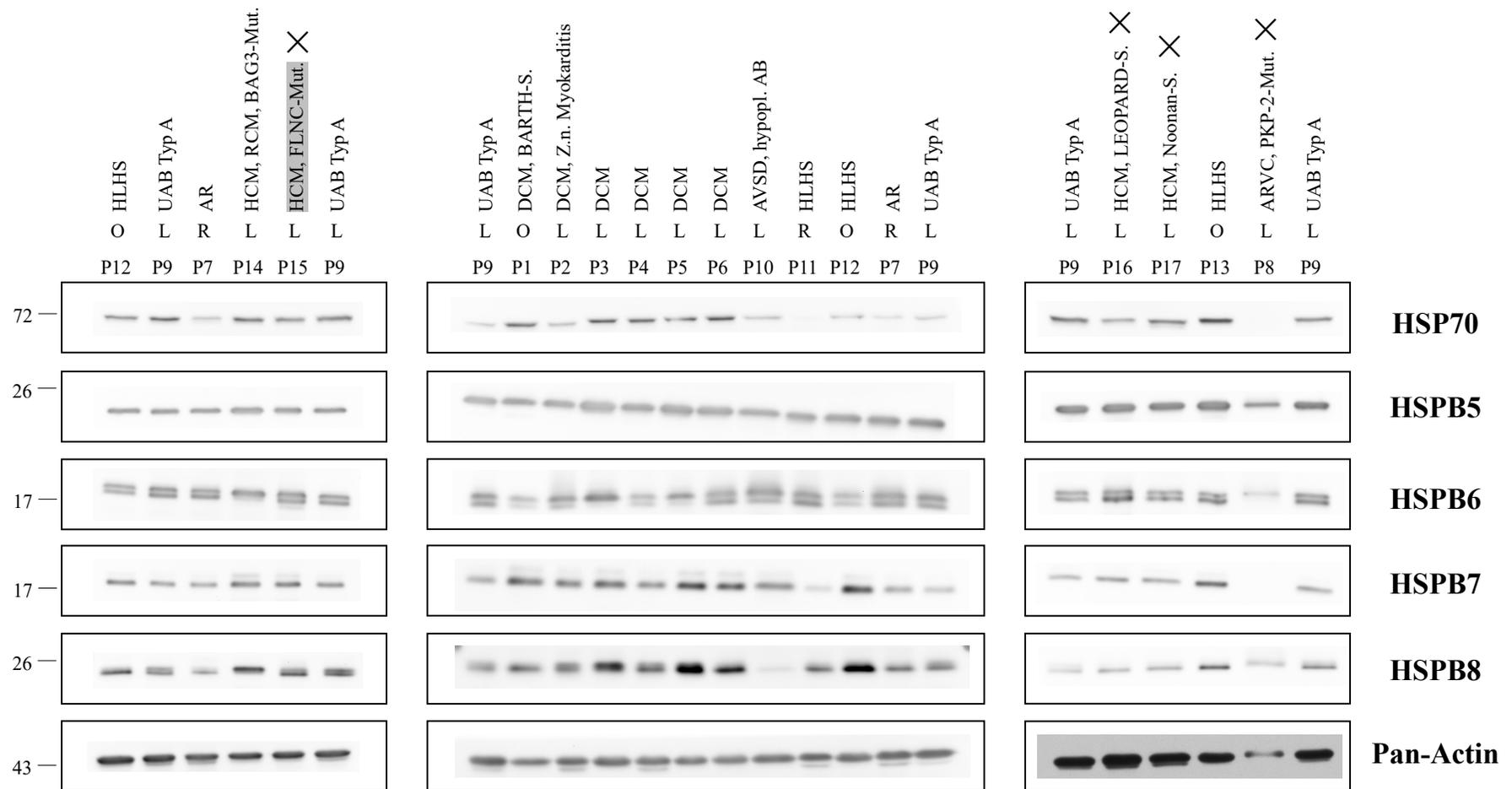


Abbildung 21: Proteinexpression von Hitzeschockproteinen

AR=Abstoßungsreaktion, hypopl. AB=hypoplastischer Aortenbogen, L=linker Ventrikel, Mut.=Mutation, O=ohne Angabe oder weitere Lokalisation, R=rechter Ventrikel, S.=Syndrom, UAB= unterbrochener Aortenbogen, X= Myektomie

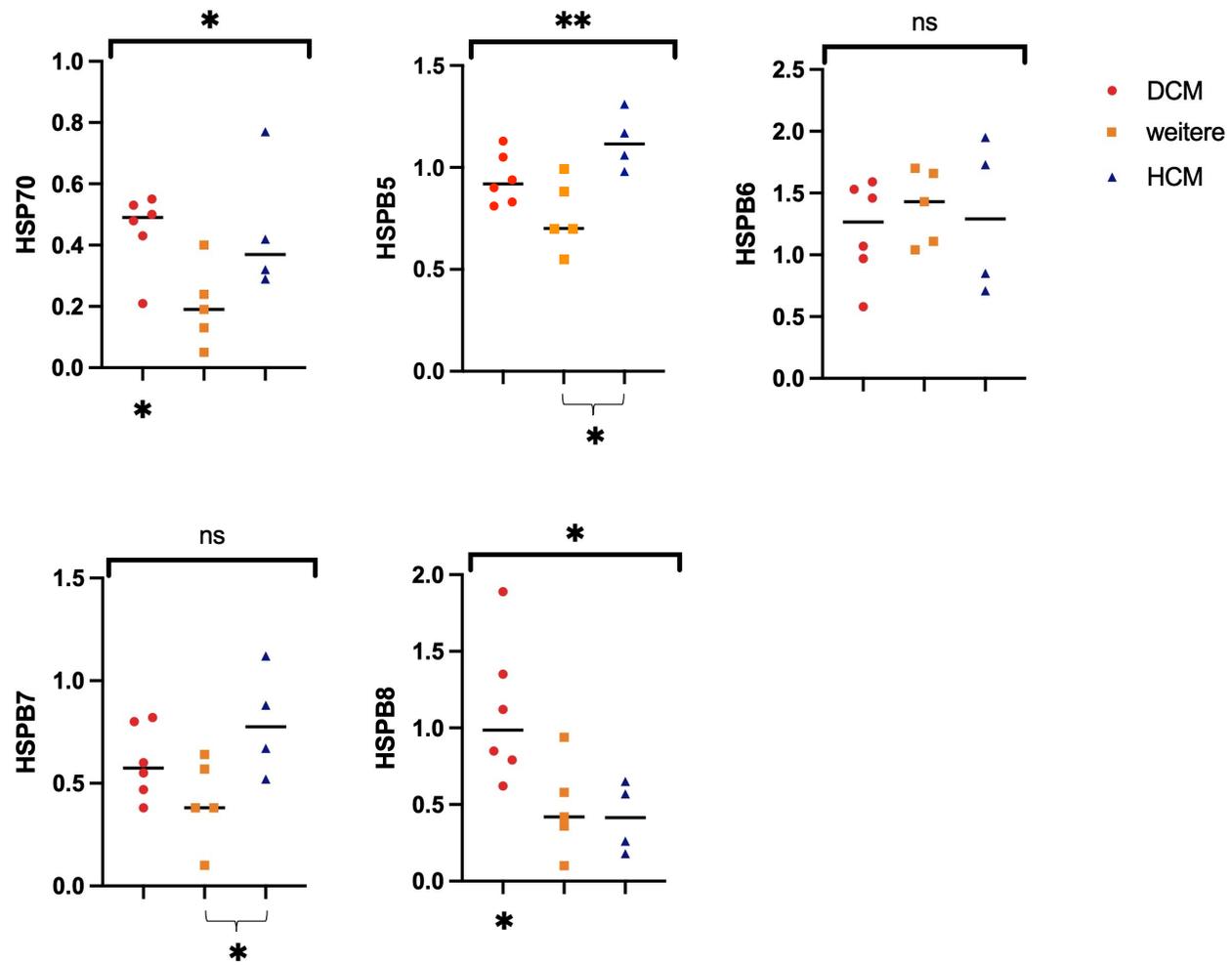


Abbildung 22: Box-Plots zum Vergleich der Proteinexpression von Hitzeschockproteinen

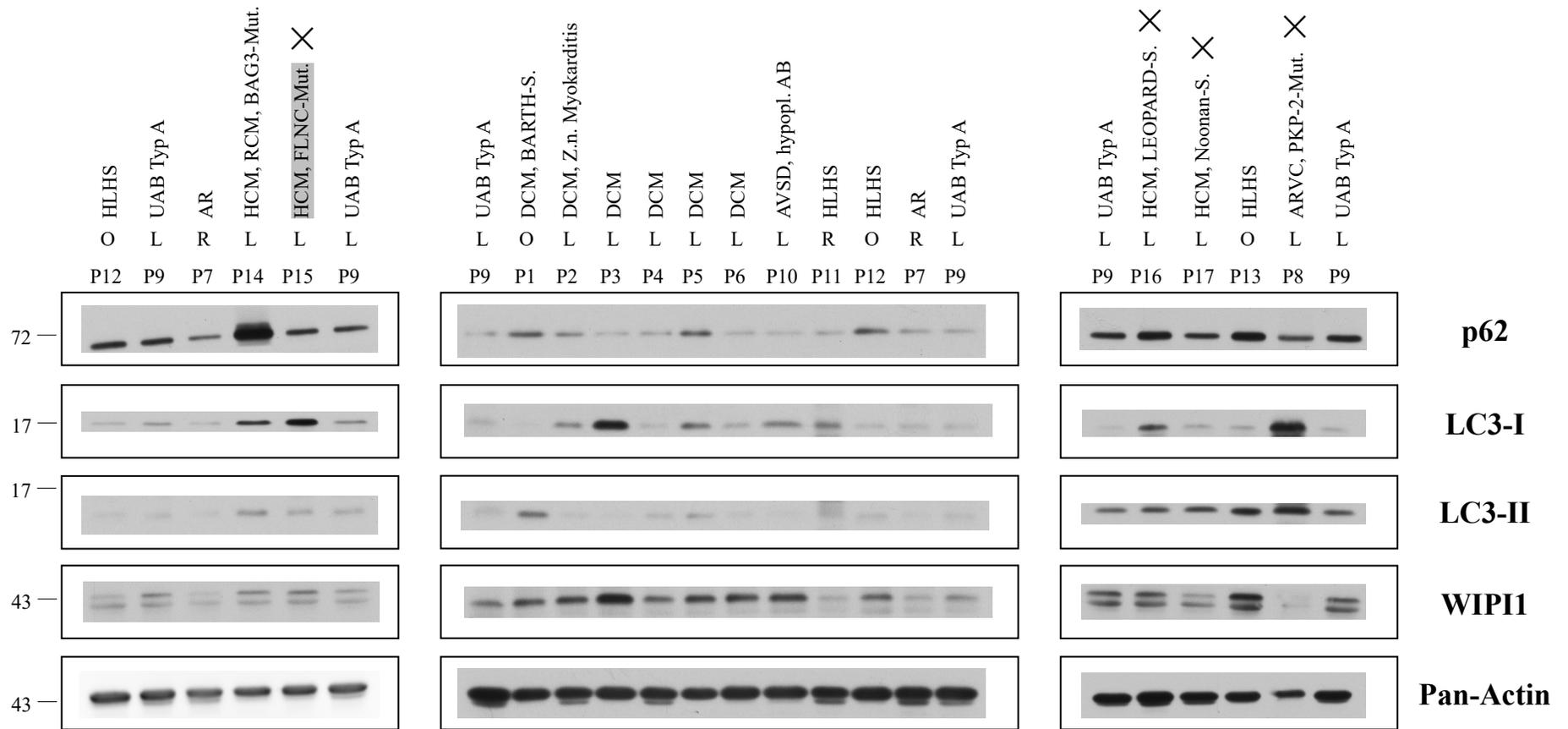


Abbildung 23: Proteinexpression von Autophagieproteinen

AR=Abstoßungsreaktion, hypopl. AB=hypoplastischer Aortenbogen, L=linker Ventrikel, Mut.=Mutation, O=ohne Angabe oder weitere Lokalisation, R=rechter Ventrikel,

S.=Syndrom, UAB= unterbrochener Aortenbogen, X= Myektomie

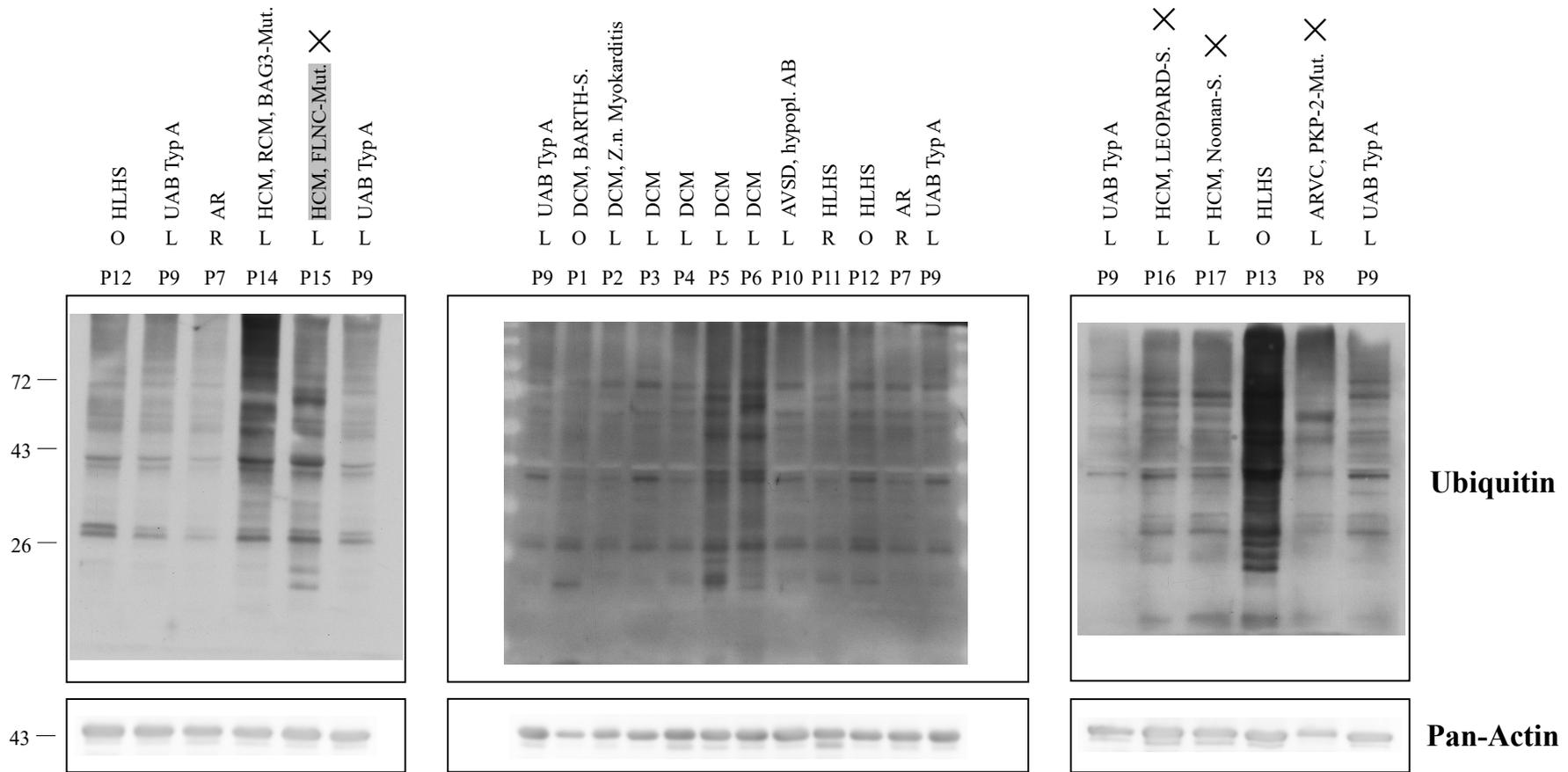


Abbildung 24: Proteinexpression des Autophagieproteins Ubiquitin

AR=Abstoßungsreaktion, hypopl. AB=hypoplastischer Aortenbogen, L=linker Ventrikel, Mut.=Mutation, O=ohne Angabe oder weitere Lokalisation, R=rechter Ventrikel, S.=Syndrom, UAB= unterbrochener Aortenbogen, X= Myektomie

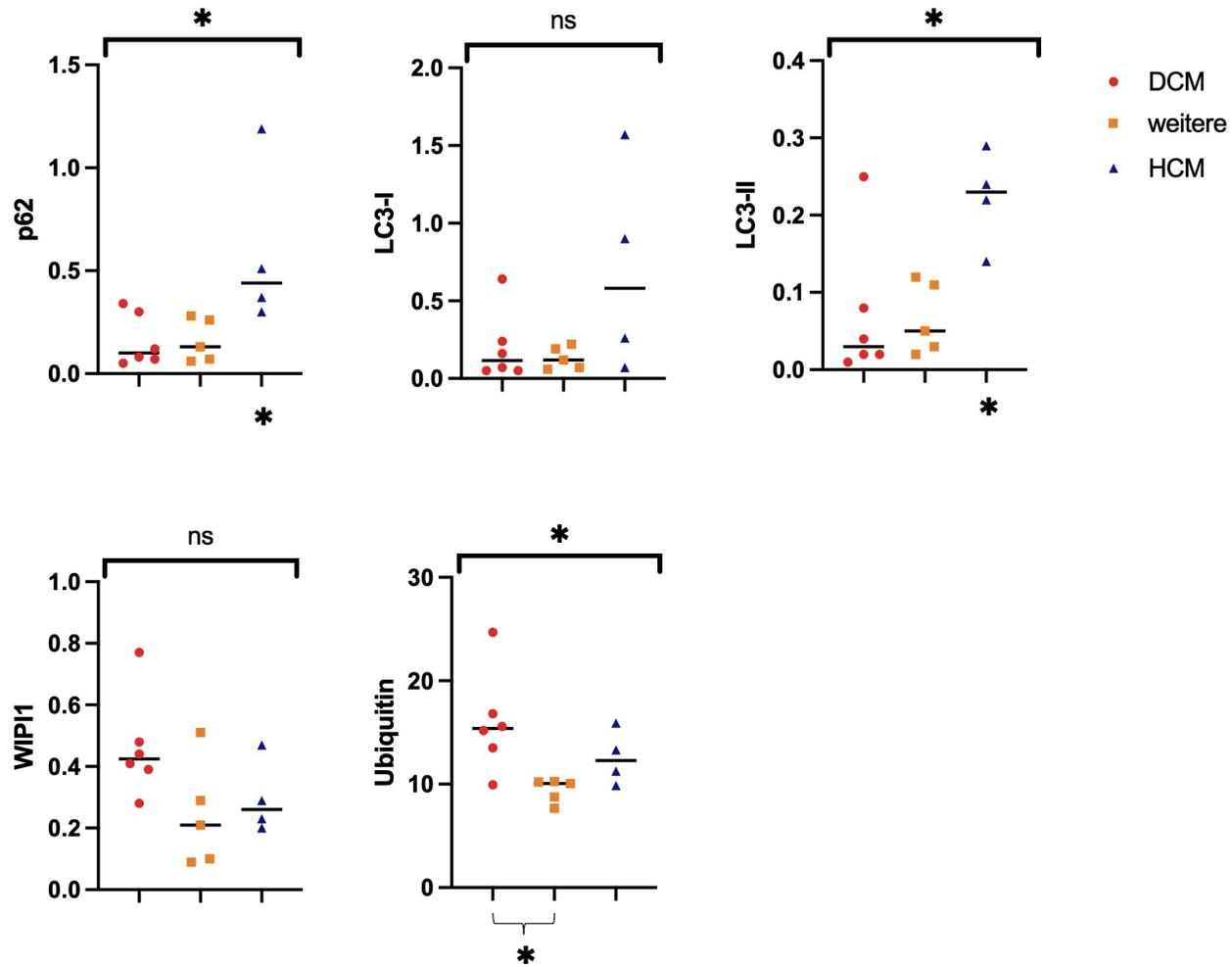


Abbildung 25: Box-Plots zum Vergleich der Proteinexpression von Autophagieproteinen

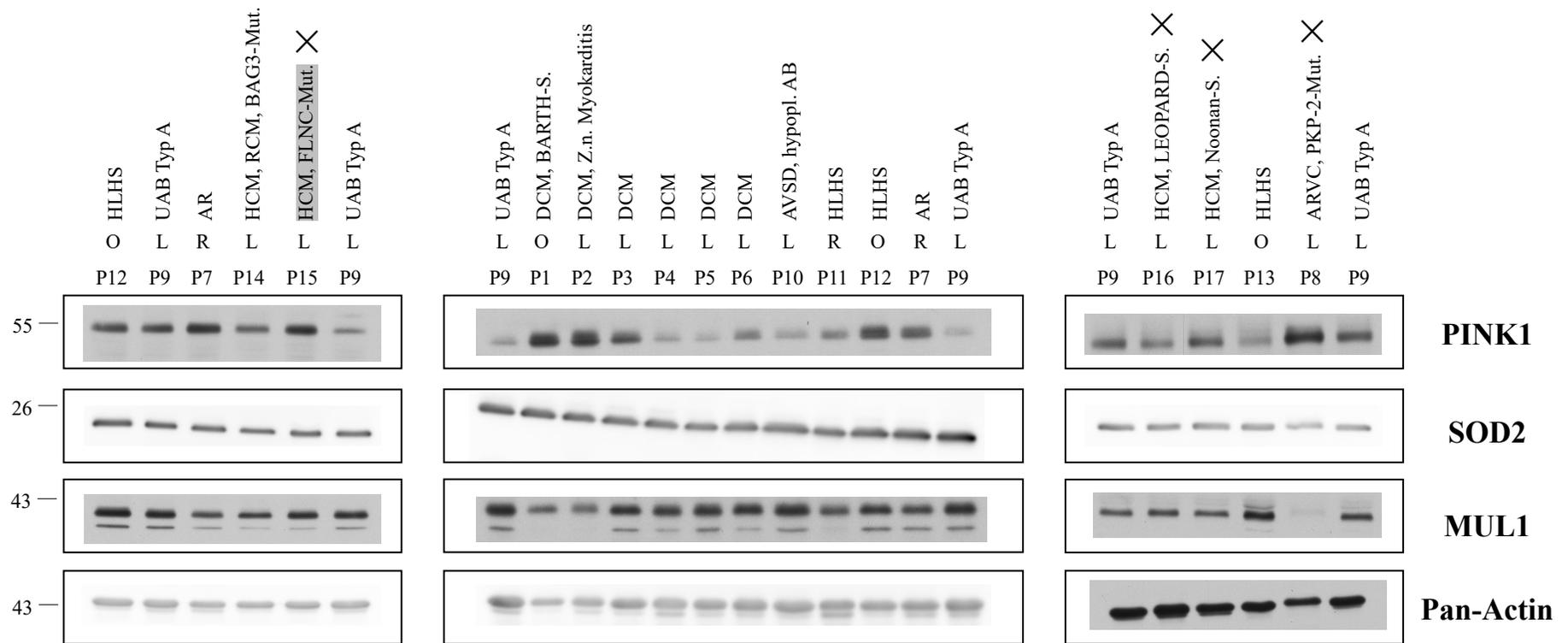


Abbildung 26: Proteinexpression von Mitophagieproteinen

AR=Abstoßungsreaktion, hypopl. AB=hypoplastischer Aortenbogen, L=linker Ventrikel, Mut.=Mutation, O=ohne Angabe oder weitere Lokalisation, R=rechter Ventrikel, S.=Syndrom, UAB= unterbrochener Aortenbogen, X= Myektomie

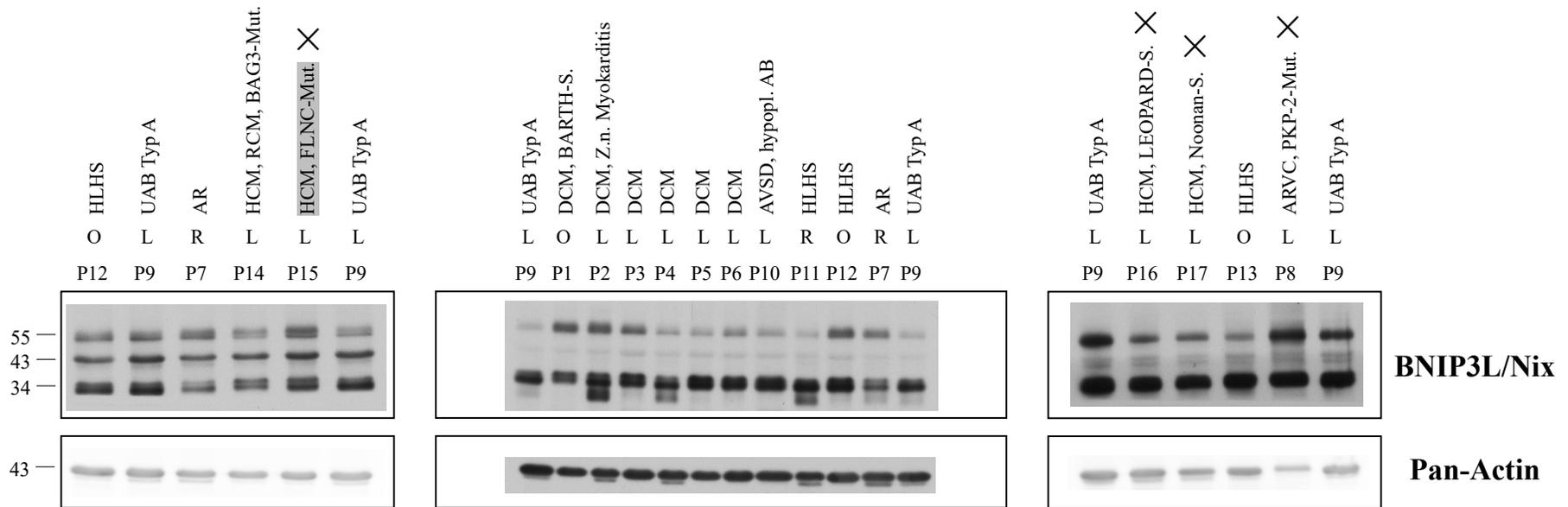


Abbildung 27: Proteinexpression des Mitophagieproteins BNIP3L/Nix

AR=Abstoßungsreaktion, hypopl. AB=hypoplastischer Aortenbogen, L=linker Ventrikel, Mut.=Mutation, O=ohne Angabe oder weitere Lokalisation, R=rechter Ventrikel, S.=Syndrom, UAB= unterbrochener Aortenbogen, X= Myektomie

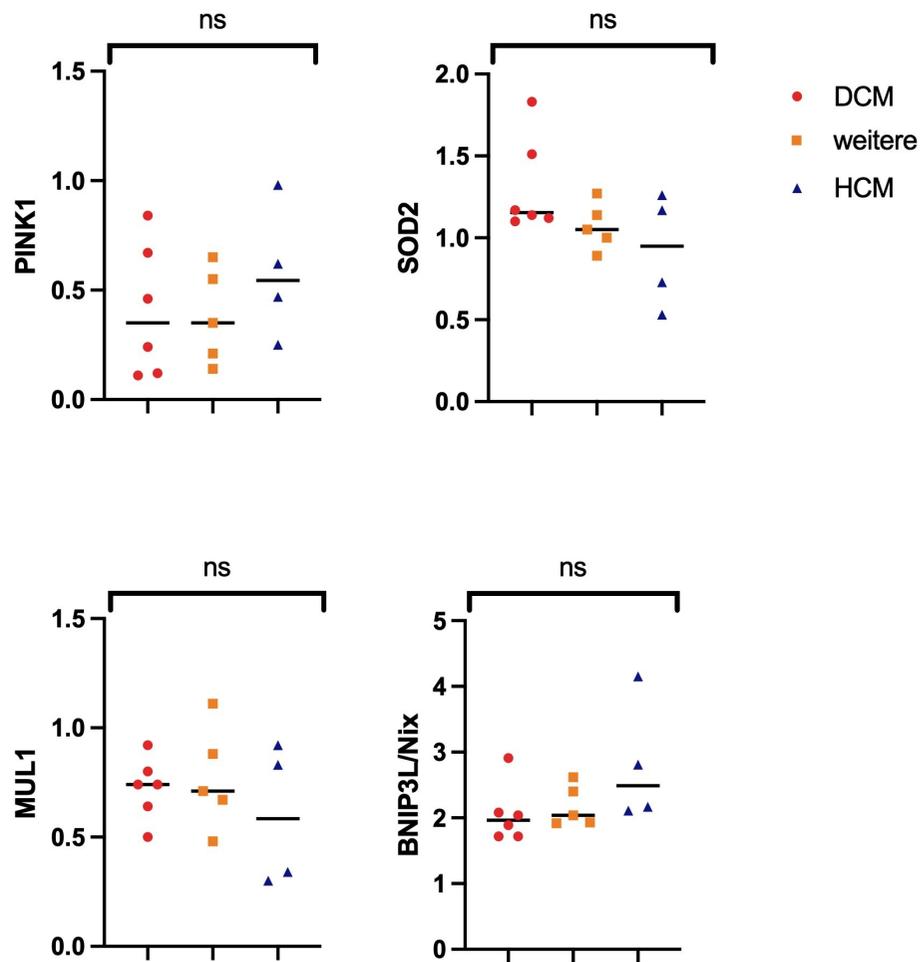


Abbildung 28: Box-Plots zum Vergleich der Proteinexpression von Mitophagieproteinen

Für BAG3 ergaben sich bei der *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* signifikant höhere Proteinexpressionen der HCM-Gruppe im Vergleich zur Gruppe der weiteren Herzerkrankungen, was für eine Blockierung der CASA bei der HCM-Gruppe spricht. Optisch stellte sich die Proteinexpression der DCM-Gruppe im Vergleich zur Gruppe der weiteren Herzerkrankungen erhöht dar. Im *tukey's multiple comparisons test* konnte dafür keine Signifikanz ermittelt werden.

Für FLNC und Desmin ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen.

Für HSP70 ergab sich ein signifikanter Unterschied bei der *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* zwischen den Gruppen DCM, HCM und anderen Herzerkrankungen. Die Proteinexpression der DCM-Gruppe zeigte sich gegenüber der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen und gegenüber der HCM-Gruppe erhöht. Dies ist ein Hinweis auf mechanischen Zellstress und eine hochregulierte CASA bei der DCM-Gruppe.

Für HSPB5 ergaben sich bei der *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* signifikant höhere Proteinexpressionen der HCM-Gruppe gegenüber der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen. Dies steht im Kontrast mit dem optischen Eindruck, welcher allenfalls einen kleinen Unterschied vermuten lässt.

Für HSPB6 ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen.

Für HSPB7 ergab sich ein kein signifikanter Unterschied bei der *ordinary one-way ANOVA* zwischen den Gruppen DCM, HCM und anderen Herzerkrankungen. Es zeigte sich allerdings im nachfolgend durchgeführten *tukey's multiple comparisons test* eine signifikant erhöhte Proteinexpression der HCM-Gruppe gegenüber der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen. Optisch stellte sich die Proteinexpression der DCM-Gruppe erhöht dar im Vergleich zur Gruppe der weiteren Herzerkrankungen. Insgesamt spricht dies für vermehrten mechanischen Zellstress bei den Kardiomyopathie-Gruppen (HCM und DCM) im Vergleich zur Gruppe der weiteren Herzerkrankungen.

Für HSPB8 ergab sich bei der *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* eine signifikant höhere Proteinexpression der DCM-Gruppe gegenüber der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen und gegenüber der HCM-Gruppe. Dies spricht für eine Induktion und Dysregulation der CASA bei der DCM-Gruppe.

Für p62 ergab sich bei der *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* eine signifikant höhere Proteinexpression der HCM-Gruppe gegenüber der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen und gegenüber der DCM-Gruppe, was auf eine defekte CASA bei der HCM-Gruppe hindeutet. Es muss allerdings beachtet werden, dass sich die Proteinexpression des Patienten P9 bei WB-B deutlich niedriger darstellt als bei WB-A und WB-C. Wenn man demzufolge davon ausgeht, dass bei WB-B alle Banden der Proteinexpression geringer dargestellt sind, könnte dies das Ergebnis, der im Vergleich hohen Proteinexpression der HCM-Gruppe, beeinflusst haben.

LC3-I und LC3-II können zwar mit einem Antikörper (Anti-LC3) gleichzeitig in einem Western Blot detektiert werden, aber wenn die LC3-II-Signalintensität höher ist im Vergleich zu LC3-I, kann nicht zwangsläufig davon ausgegangen werden, dass die Autophagie gesteigert ist, da LC3-II im Western Blot empfindlicher ist als LC3-I. Zur Beurteilung der Autophagie sollte die Expression von LC3-II zwischen verschiedenen Proben analysiert werden. (Noboru Mizushima & Yoshimori, 2007) Da bei der LC3-II-Erhöhung viele Faktoren eine Rolle spielen können, ist es wichtig, die Ergebnisse nicht isoliert, sondern zusammen mit anderen Autophagie-Markern zu betrachten. Für LC3-I ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen. Bei der HCM-Gruppe zeigte sich optisch eine Erhöhung der Proteinexpression von LC3-I gegenüber der DCM-Gruppe und der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen, welche auf eine defekte CASA bei der HCM-Gruppe hinweist. Für LC3-II ergab sich bei der *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* eine signifikant höhere Proteinexpression der HCM-Gruppe gegenüber der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen und gegenüber der DCM-Gruppe, was ebenfalls für eine defekte CASA bei der HCM-Gruppe spricht. Es muss allerdings beachtet werden, dass sich die Proteinexpression des Patienten P9 bei WB-C deutlich höher darstellt als bei WB-A und WB-B, was dieses Ergebnis verstärkt haben könnte.

Für WIPI1 ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen. Optisch stellte sich die Proteinexpression der DCM-Gruppe erhöht dar im Vergleich zur HCM-Gruppe und Gruppe der weiteren Herzerkrankungen. Dies deutet auf eine CASA-Induktion bei der DCM-Gruppe hin.

Für Ubiquitin ergab sich bei der *ordinary one-way ANOVA* gefolgt von einem *tukey's multiple comparisons test* eine signifikant höhere Proteinexpression der DCM-Gruppe gegenüber der Gruppe der weiteren Herzerkrankungen. Optisch stellte sich die Proteinexpression der HCM-Gruppe leicht erhöht dar im Vergleich zur Gruppe der weiteren Herzerkrankungen. Dieses Ergebnis deutet auf eine beeinträchtigte/dysregulierte CASA bei der DCM- und HCM-Gruppe im Vergleich zur Gruppe der weiteren Herzerkrankungen hin.

Für PINK1, SOD2, MUL1 und BNIP3L/Nix ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen.

Tabelle 8: Statistische Analysen zum Vergleich der Proteinexpressionen von DCM, HCM und weiteren Herzerkrankungen; p-Wert und Signifikanz nach ordinary one-way ANOVA

	Protein	Mittelwert (M)			Standardabweichung (SD)			p-Wert	signifikant (*)/ nicht signifikant (ns)
		DCM	HCM	Weitere <sup>o</sup>	DCM	HCM	Weitere <sup>o</sup>		
<b>Sarkomerproteine</b>	<b>BAG3</b>	0,382	0,565	0,198	0,112	0,289	0,135	0,032	*
	<b>FilaminC</b>	0,517	0,515	0,310	0,182	0,411	0,218	0,402	ns
	<b>Desmin</b>	0,775	0,853	0,458	0,413	0,833	0,195	0,466	ns
<b>Hitzeschockproteine</b>	<b>HSP70</b>	0,450	0,450	0,202	0,125	0,221	0,131	0,041	*
	<b>HSPB5</b>	0,943	1,130	0,764	0,126	0,143	0,172	0,010	**
	<b>HSPB6</b>	1,200	1,310	1,388	0,396	0,621	0,305	0,779	ns
	<b>HSPB7</b>	0,603	0,798	0,414	0,177	0,261	0,210	0,057	ns
	<b>HSPB8</b>	1,103	0,415	0,480	0,464	0,230	0,310	0,018	*
<b>Autophagieproteine</b>	<b>p62</b>	0,160	0,593	0,160	0,127	0,408	0,104	0,023	*
	<b>LC3-I</b>	0,202	0,700	0,132	0,228	0,680	0,071	0,087	ns
	<b>LC3-II</b>	0,070	0,223	0,066	0,092	0,062	0,046	0,011	*
	<b>WIPI1</b>	0,462	0,298	0,240	0,165	0,121	0,172	0,092	ns
	<b>Ubiquitin</b>	15,950	12,590	9,392	4,895	2,629	1,144	0,029	*
<b>Mitophagieproteine</b>	<b>PINK1</b>	0,407	0,580	0,380	0,303	0,307	0,218	0,533	ns
	<b>SOD2</b>	1,312	0,923	1,070	0,296	0,349	0,144	0,114	ns
	<b>MUL1</b>	0,723	0,598	0,770	0,143	0,323	0,237	0,539	ns
	<b>BNIP3L/Nix</b>	2,060	2,810	2,182	0,444	0,948	0,313	0,160	ns

<sup>o</sup>Weitere Herzerkrankungen

## 4.2 Darstellung von besonderen Einzelfällen

Im Folgenden werden zwei Fälle dargestellt, bei denen eine Einzelbetrachtung von besonderem Interesse ist.

### 4.2.1 Herzmuskelgewebe mit einer Mutation im FLNC-Gen (p.Ala2430Val)

Der Patient P15 (m) hatte mit 23 Jahren, zum Zeitpunkt der Myektomie aus dem linken Ventrikel, im Vergleich zu den anderen untersuchten Patienten, das höchste Alter. Seit 12 Monaten lag, zum Zeitpunkt der Myektomie, eine leichte belastungsabhängige Herzinsuffizienz vor (NYHA I). Der Patient litt an einer HCM und passend dazu zeigte sich mit 70 % ein hochnormaler EF-Wert. Der BNP-Wert lag mit 628 pg/ml im pathologischen Bereich, ist aber, im Vergleich zu den anderen Patienten, ein verhältnismäßig niedriger Wert. Eine Exom-Sequenzierung ergab, als Ursache der HCM, eine Mutation im FLNC-Gen (p.Ala2430Val).

Bei der WB-Analyse des Herzmuskelgewebes ergab sich im Vergleich keine relevante Veränderung der Proteinexpression von BAG3 und FLNC. Es zeigten sich die Autophagiemarker LC3-I deutlich und LC3-II und WIPI1 leicht erhöht. Ebenfalls erhöht waren Ubiquitin, HSPB7 und HSPB8. HSPB5 und HSPB6 zeigten sich leicht erhöht. Das Strukturprotein Desmin war deutlich erhöht. Bei den Mitophagieproteinen ergab sich nur für BNIP3L/Nix eine erhöhte Proteinexpression. Die restlichen untersuchten mitochondrialen Marker zeigten keine relevante Veränderung. Wie unter 5.6 im Einzelnen erläutert, sprechen die Ergebnisse für eine überforderte und dysregulierte CASA.

### 4.2.2 Herzmuskelgewebe mit Mitochondriopathie bei Barth-Syndrom

Der Patient P1 (m) war bei der Herztransplantation 6 Monate alt und litt an einer DCM. Das Gewebe entstammt der Herzspritze. Zum Zeitpunkt der Transplantation bestand seit 5 Monaten eine Herzinsuffizienz. Es zeigte sich mit 6161 pg/ml ein deutlich erhöhter BNP-Wert und mit einem EF-Wert von 25 % eine deutlich beeinträchtigte Herzfunktion. Folgende Mutation konnte mittels Genomanalyse (Exom-Sequenzierung) gefunden

werden: TAZ C280C>G BARTH. Das Barth-Syndrom eine seltene (weltweit 1/300.000-400.000 Lebendgeburten) und X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, welcher eine Mutation im TAZ-Gen zugrunde liegt. Es kommt zu Störungen des Phospholipids Cardiolipin und dadurch zur Mitochondriopathie. Typisch für das Barth-Syndrom ist eine früh einsetzende Kardiomyopathie. (Sabbah, 2021)

P62, LC3-II, HSP70 und PINK1 wurden beim Patienten P1 im Western Blot erhöht detektiert. FLNC und HSPB7 zeigten sich leicht erhöht. Wie unter 5.7.1 im Einzelnen erläutert, weisen die Ergebnisse auf vermehrten Zellstress mit einer hochregulierten und gleichzeitig überforderten und blockierten Mitophagie hin.

#### 4.3 Vergleich der Proteinexpression im rechten und linken Ventrikel

Wir haben untersucht, ob es einen Unterschied der Proteinexpression zwischen rechtem und linkem Ventrikel der Herzmuskelproben gibt, um, insbesondere für zukünftige Studien, festzustellen, ob Herzmuskelproben unterschiedlicher Lokalisationen genutzt werden können. Hierfür wurde das Herzmuskelgewebe vom rechten und linken Ventrikel von zwei Patienten (P9 und P10) miteinander verglichen (siehe Abbildung 29). Die Patienten wiesen ähnliche klinische Parameter, wie Alter, EF-Wert und BNP-Wert, auf. Beide Patienten hatten eine angeborene Fehlfunktion des Herzens. P9 litt an einem unterbrochenen Aortenbogen (UAB) Typ A und P10 litt an einem atrioventrikulären Septumdefekt (AVSD) und hypoplastischen Aortenbogen (hypopl. AB). Als Entwicklungsmethode wurde der ECL-Imager verwendet.

Tabelle 9 zeigt die semiquantitativen Werte der WB-Analyse zum Vergleich der Proteinexpression vom rechten und linken Ventrikel. Wie unter 3.3.13.1 beschrieben, wurde zur Normalisierung durch die Ladekontrolle Pan-Actin geteilt. Dabei bedeutet ein erhaltener Zahlenwert von 1, dass der semiquantitative Zahlenwert des Zielproteins identisch ist mit dem semiquantitativen Zahlenwert der Ladekontrolle.

In der Analyse zeigte sich bei den meisten Proteinexpressionen eine sehr große Streuung, sodass hier keine sicheren Aussagen gemacht werden können. Als Tendenz lässt sich ableiten, dass sich zum Teil starke Unterschiede der Proteinexpressionen zwischen

rechtem und linkem Ventrikel feststellen lassen. Zum Beispiel zeigte sich für den linken Ventrikel, im Vergleich zum rechten Ventrikel, bei beiden Patienten eine deutlich höhere Proteinexpression der Autophagiemarker HSPB7, HSPB8 und BAG3 (siehe Abbildung 30).

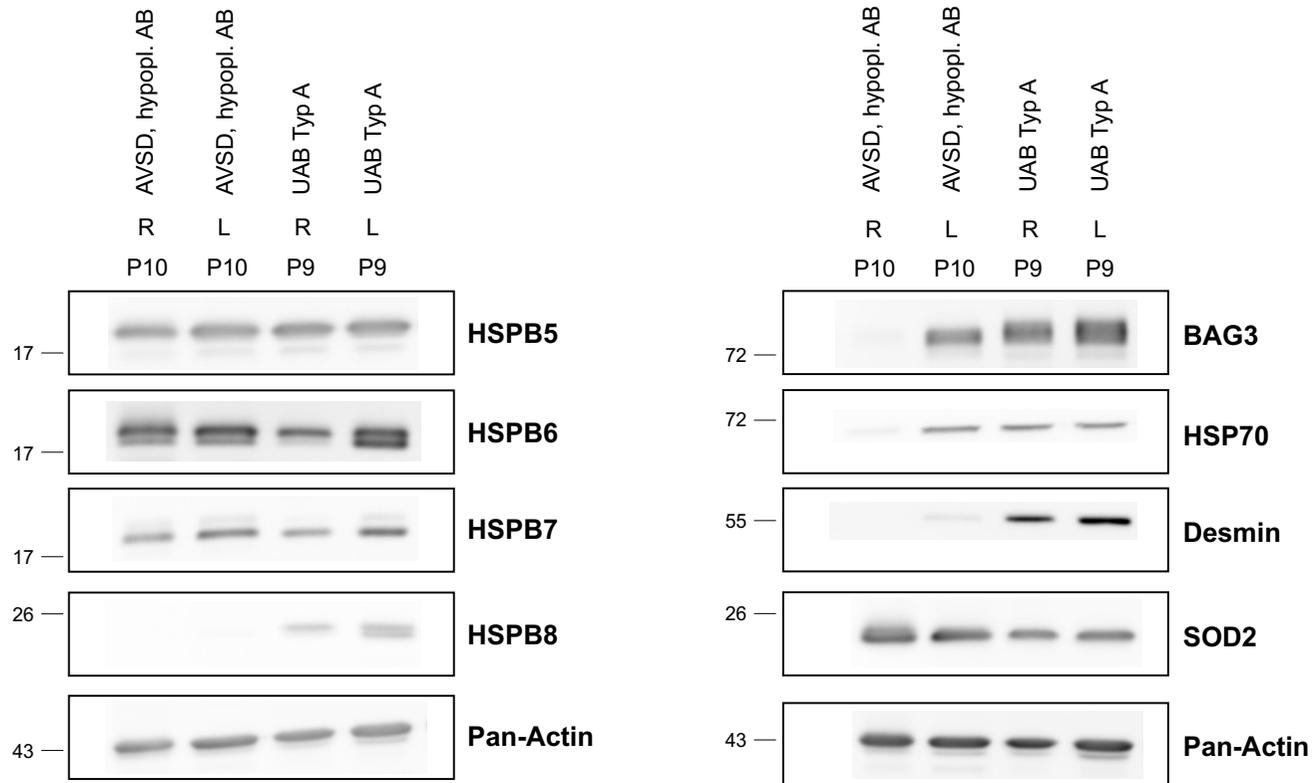


Abbildung 29: Vergleich der Proteinexpression im rechten und linken Ventrikel bei zwei Patienten

Lokalisationen: R=rechter Ventrikel, L=linker Ventrikel; AVSD=Atrioventrikulärer Septumdefekt; hypopl. AB=hypoplastischer Aortenbogen; UAB= unterbrochener Aortenbogen

Tabelle 9: Vergleich der Proteinexpression rechter und linker Ventrikel; semiquantitative Werte der WB-Analyse

<b>Protein/ Antikörper</b>	<b>P9 rechts</b>	<b>P9 links</b>	<b>P10 rechts</b>	<b>P10 links</b>
<b>HSPB5</b>	0,68	0,60	0,48	0,56
<b>HSPB6</b>	1,57	2,34	2,47	2,04
<b>HSPB7</b>	0,90	1,35	1,48	1,71
<b>HSPB8</b>	0,26	0,42	0,01	0,03
<b>BAG3</b>	1,32	1,41	0,18	0,95
<b>HSP70</b>	0,85	0,67	0,19	0,87
<b>Desmin</b>	0,45	0,52	0,01	0,05
<b>SOD2</b>	0,62	0,56	1,04	0,86

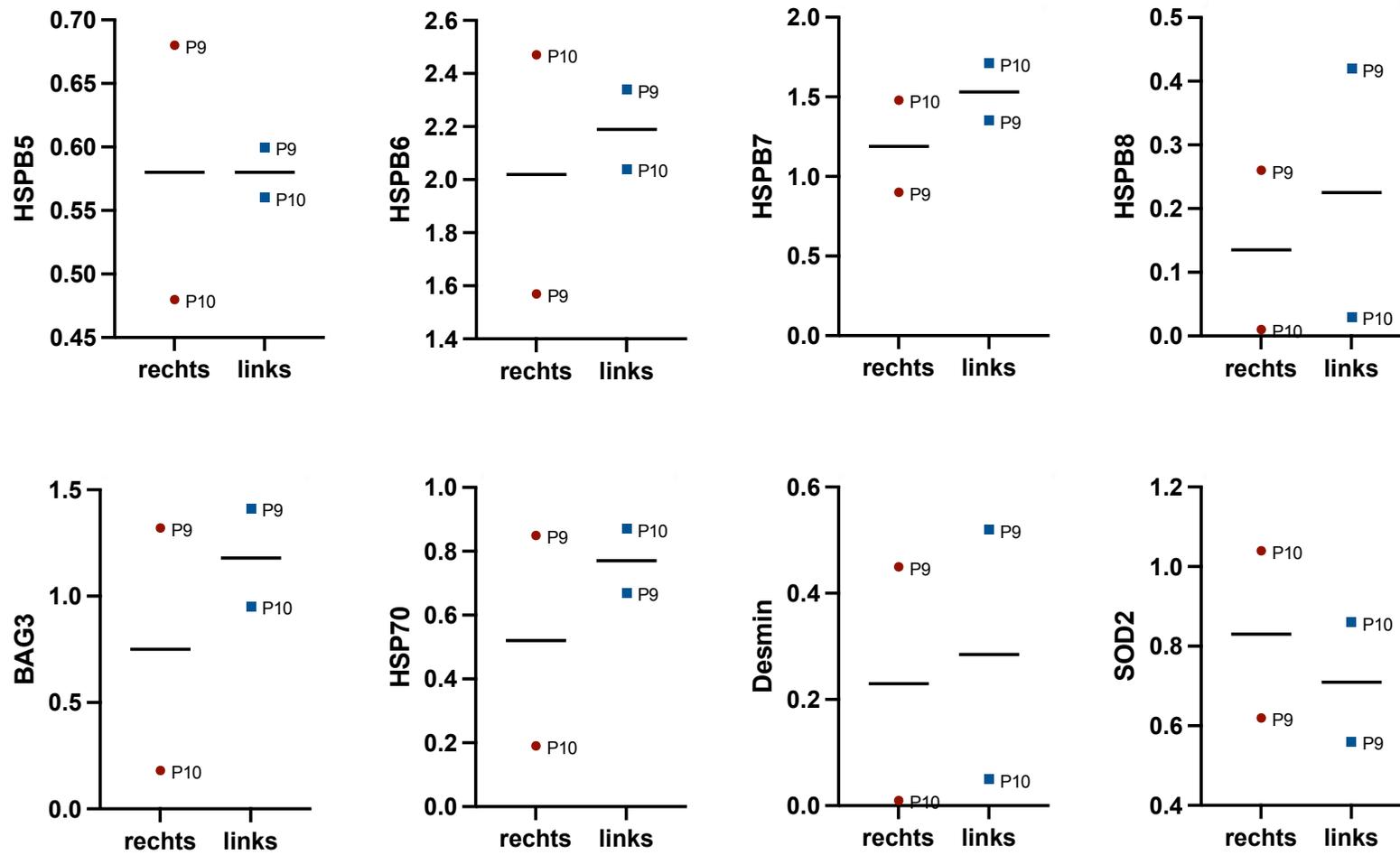


Abbildung 30: Box-Plots Vergleich der Proteinexpression rechter und linker Ventrikel

#### 4.4 Korrelation der Proteinexpression mit klinischen Parametern

Um den statistischen Zusammenhang zwischen den klinischen Daten Alter bei Biopsie, Dauer der Herzinsuffizienz, höchster BNP-Wert und niedrigster EF-Wert (Tabelle 1) und den semiquantitativen Werten der Proteinexpression zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen (Pearson Korrelationstest) der Patienten P2-P6 durchgeführt. Alle Patienten hatten eine DCM und das untersuchte Gewebe war aus dem linken Ventrikel.

Für Alter bei Biopsie, Dauer der Herzinsuffizienz und höchster BNP-Wert ergab die Korrelationsanalyse mit den Proteinexpressionen keine signifikanten Unterschiede, weshalb diese Ergebnisse hier nicht weiter dargestellt werden. Die Korrelationsanalyse vom niedrigsten EF-Wert und der Proteinexpression ergab für LC3-I und WIPI1 eine signifikante positive Korrelation (siehe Abbildung 31). Verhältnismäßig niedrige EF-Werte zeigten eine verhältnismäßig niedrige Proteinexpression von LC3-I und WIPI1, während verhältnismäßig hohe EF-Werte eine verhältnismäßig hohe Proteinexpression von LC3-I und WIPI1 zeigten. Diese Befunde sprechen für einen bereits fortgeschrittenen Proteinuntergang bei niedrigen EF-Werten und werden unter 5.3 näher erläutert.

*Tabelle 10: Pearson Korrelationstest des niedrigsten EF-Wertes mit der Proteinexpression*

<b>Protein/ Antikörper</b>	<b>r-Wert</b>	<b>p-Wert</b>	<b>signifikant (*)/ nicht signifikant (ns)</b>
<b>BAG3</b>	0,6306	0,2540	ns
<b>FilaminC</b>	0,5142	0,3755	ns
<b>Desmin</b>	-0,4433	0,4546	ns
<b>HSP70</b>	0,5010	0,3899	ns
<b>HSPB5</b>	-0,001568	0,9980	ns
<b>HSPB6</b>	0,4050	0,4989	ns
<b>HSPB7</b>	0,4025	0,5017	ns
<b>HSPB8</b>	0,3785	0,5298	ns
<b>p62</b>	0,04840	0,9384	ns
<b>LC3-I</b>	0,9668	0,0072	**
<b>LC3-II</b>	-0,08448	0,8926	ns
<b>WIPI1</b>	0,9538	0,0118	*
<b>Ubiquitin</b>	0,4075	0,4959	ns
<b>PINK1</b>	0,1353	0,8282	ns
<b>SOD2</b>	-0,4773	0,4162	ns
<b>MUL1</b>	0,5120	0,3779	ns
<b>BNIP3L/Nix</b>	-0,04917	0,9374	ns

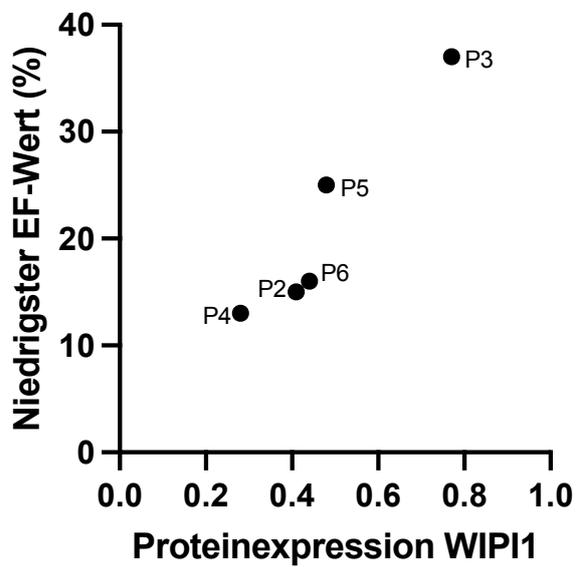
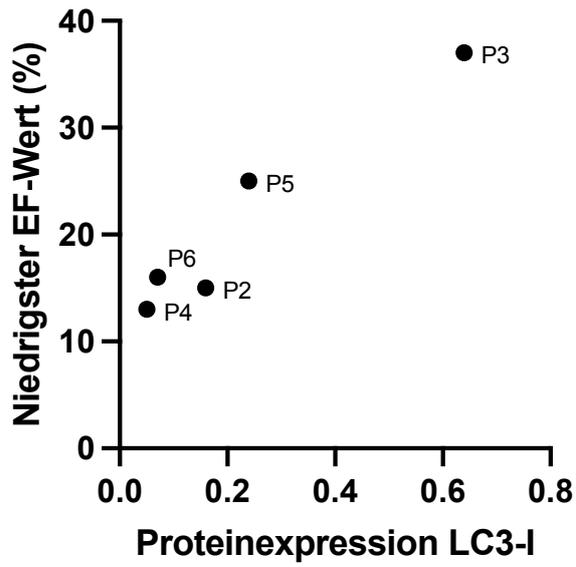


Abbildung 31: Korrelationsanalyse des niedrigsten EF-Wertes mit den Proteinexpressionen von LC3-I und WIP1;  $r$ - und  $p$ -Wert und Signifikanz nach Pearson Korrelationstest (siehe Tabelle 10)

## 5 Diskussion

Pro Jahr erkrankt 1 von 100 000 Kindern an einer Kardiomyopathie (CM). Liegt eine symptomatische Kardiomyopathie vor, müssen 40% der betroffenen Kinder zum Überleben eine Herztransplantation erhalten oder sterben innerhalb von 2 Jahren nach Diagnosestellung. (Lipshultz et al., 2019) Kardiomyopathien können in genetische und erworbene Formen unterteilt werden (Maron et al., 2006). Die Klassifikation der Kardiomyopathie erfolgt bisher nach überwiegend klinischen Parametern und bildgebenden Methoden. Es werden eine DCM, HCM, RCM und ARVC unterschieden (Richardson et al., 1996). DCMs sind dabei die häufigste Form der symptomatischen Kardiomyopathien. Zu den wichtigsten Ursachen der DCM gehören Myokarditis, peripartale Kardiomyopathie, Hypertension, Drogenabusus und HIV-Infektion. Häufig kann allerdings keine spezifische Ursache gefunden werden und man muss von einer idiopathischen Genese ausgehen (ca. 50%). (Ciarambino et al., 2021) Bei der Myokarditis liegt häufig eine virale Infektion als Ursache vor, wobei u.a. Coxsackie-B-Viren eine wichtige Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass möglicherweise Autophagosomen für die Virusreplikation der Coxsackie-B3-Viren genutzt werden könnten. (Zhai et al., 2015) Solche Einflüsse auf die Autophagie sollten weiter erforscht werden, weil sie bei der Gesamtbewertung von autophagischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen können. HCMs sind die häufigsten vererbten Kardiomyopathien und eine wichtige Ursache für den plötzlichen Herztod bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen (Ciarambino et al., 2021; Rupp et al., 2019; Towbin, 2014). Verschiedene Mutationen können zu genetischen Kardiomyopathien führen (Rupp et al., 2019; Zheng et al., 2022). Häufig sind Gene betroffen, die für Sarkomer Proteine und Proteine der Sarkomer-Sarkolemm-Verbindung, wie zum Beispiel Desmin oder FLNC, kodieren (Rupp et al., 2019; Towbin, 2014).

Die Pathologie von Kardiomyopathien ist noch nicht ausreichend verstanden (Lipshultz et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb zu Grunde liegende pathologische Prozesse, die zu einer Kardiomyopathie führen, untersucht werden. In der quergestreiften Muskulatur, und insbesondere im Herzmuskel, fallen durch die starke mechanische Belastung ständig fehlgefaltete Proteine an, die durch Autophagieprozesse abgebaut werden (Arndt et al., 2010; Höhfeld et al., 2021; H. Li et al., 2022). Dies ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Integrität der Z-Scheiben und der physiologischen

Muskelkontraktilität (Arndt et al., 2010; Höhfeld et al., 2021). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es Unterschiede in den Autophagie-Prozessen zwischen den wichtigsten Subgruppen von Kardiomyopathien im Kindesalter (DCM und HCM) und im Vergleich zu weiteren Herzerkrankungen gibt. Dabei wurde die Proteinexpression von Autophagieproteinen semiquantitativ mit Hilfe von Western Blot Analysen untersucht. Diese etablierte Methode eignet sich, durch ihre Empfindlichkeit und Spezifität bei der Detektion von Proteinen (Gilda et al., 2015), gut zur Beantwortung der Fragestellung. Nachteile sind der hohe Arbeitsaufwand und die Störungsanfälligkeit der Methode. Weitere Nachteile und Probleme werden unter 5.8.3 diskutiert.

Besonders wichtig für die Funktion der quergestreiften Muskulatur ist eine besondere Form der Autophagie: die spannungsinduzierte Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) (Arndt et al., 2010). BAG3 ist ein Multifunktionsprotein mit besonderem Stellenwert in der CASA (Klimek et al., 2017). Neue Ergebnisse von Yerabandi et al. (2022) zeigen, dass bei einer BAG3 P209L-Mutation nicht die Interaktion von BAG3 mit anderen Proteinen des CASA-Komplexes und somit nicht die Bildung des CASA-Komplexes beeinträchtigt ist, sondern der Transport zu den Autophagosomen gestört zu sein scheint und die Fähigkeit von BAG3 als Nukleotid-Austauschfaktor für zum Beispiel HSP70 zu agieren. In der Folge bilden sich toxische Aggresome, welche die Verfügbarkeit von CASA-Komponenten reduzieren. (Yerabandi et al., 2022) Kimura et al. (2021) haben gezeigt, dass ein wesentlicher krankheitsverursachender Prozess bei Kardiomyopathien die Aggregationseigenschaft von mutierten Proteinen sein kann. Dies wurde an Mäusen mit Überexpression des menschlichen BAG3P209L untersucht (Kimura et al., 2021). Eine reduzierte Mobilität von dem mutierten Autophagieregulator BAG3 in den Proteinaggregaten führte zu einer Abschwächung der Proteostasefunktion von BAG3 und zu einem beeinträchtigten Autophagiefluss. Dadurch entstand ein Teufelskreis mit fortschreitender Beeinträchtigung der Autophagie. Schließlich kam es zu einem Zerfall der Myofibrillenarchitektur und zum Zusammenbruch der Proteinhomöostase der Muskelzellen. (Kimura et al., 2021) Dabei wurde eine Assoziation von BAG3-Mutationen mit familiären DCMs nachgewiesen (Knezevic et al., 2015; Liu, Sun, Zhang, Tang, & Xu, 2021; Norton et al., 2011). Interessanterweise konnte man auch bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz (NYHA IV) und normalem BAG3-Genotyp eine Reduktion der BAG3-Proteinexpression feststellen, was verdeutlicht, dass BAG3

unabhängig von der Ursache eine wichtige Rolle beim Progress von Herzinsuffizienz spielt. (Knezevic et al., 2015) Dabei korreliert eine Reduzierung von BAG3 bei der menschlichen Herzinsuffizienz mit einer verringerten Fähigkeit der Myofilamente zur Krafterzeugung (Fmax) (Martin et al., 2021).

Myofibrilläre Myopathien (MFM) umfassen eine Gruppe angeborener Muskelerkrankungen (Skelettmuskulatur und/ oder Herzmuskulatur) mit gemeinsamen histologischen Besonderheiten wie myofibrilläre Zerstörung und abnorme Proteinaggregate. Diverse Genmutationen von Z-Banden-Proteinen, wie zum Beispiel BAG3-, FLNC- oder Desmin-Mutationen, können einzeln oder auch in Kombination Ursache einer MFM sein. (Fichna, Maruszak, & Żekanowski, 2018) Chevessier et al. (2015) konnten an Mäusen mit FLNC-Mutation zeigen, dass Läsionen im Sarkomer neben Proteinaggregaten vermutlich bereits präklinisch wesentlich zur Pathogenese der MFM beitragen. Dabei kam es unter akuter anstrengender Muskelbelastung zu einem deutlichen Anstieg von pathologischen Strukturen (sarkomere Läsionen, Proteinaggregate) und nachfolgend zu zunehmender Muskelschwäche durch Verlust der mechanischen Stabilität der Z-Scheiben. Dabei geht man davon aus, dass initial Abbaumechanismen wie CASA durch die Beseitigung von mutiertem FLNC zu einer Kompensierung führen. Im Verlauf kommt es wahrscheinlich durch eine zunehmende Überlastung von CASA zu einer deutlichen Zunahme der Krankheitsaktivität. (Chevessier et al., 2015)

## 5.1 Kohorte

Bei kindlichen Kardiomyopathien fehlen systematische Untersuchungen an humanem Gewebe (Lipshultz et al., 2019; Rupp et al., 2019). In dieser Studie konnte eine verhältnismäßig große Kohorte untersucht werden mit Berücksichtigung, dass es sich um humanes Gewebe handelt. Bisher wurden überwiegend Untersuchungen am Tiermodell, Zellreihen oder Untersuchungen von Einzelfällen durchgeführt (Arndt et al., 2010; Diofano et al., 2020; Kostera-Pruszczyk et al., 2015).

In Kooperation mit dem „Kinderherzzentrum und Zentrum für angeborene Herzfehler der Justus-Liebig-Universität“ in Gießen wurde eine Datenbank zur Erfassung von

Herzmuskelproben aufgebaut. Herzmuskelgewebe von Kindern wurde aus explantierten Herzen nach Herztransplantation (n=14) oder im Rahmen von Myektomien (n=4) entnommen. Von allen Proben wurden unfixierte Gewebsanteile kryokonserviert. Es wurden 17 Patienten im Alter von 2 Monaten bis 23 Jahren untersucht. 71% davon waren männlich. 35 % der Patienten hatten eine DCM, 24 % eine HCM und 41 % eine andere Form einer Herzerkrankung wie zum Beispiel HLHS. Genetische Befunde liegen von 35% der Patienten vor. Ein Großteil des Gewebes wurde retrospektiv untersucht und daher standen bei diesen Patienten keine genetischen Befunde zur Verfügung. Die klinischen Daten wurden retrospektiv aus der Datendank erhoben.

Die Berechtigung zur Durchführung der Studie wurde von der Justus-Liebig-Universität Gießen erteilt (Ethikvotum Nummer: 258/16).

## 5.2 Erhöhte EF-Werte bei der HCM-Gruppe und erniedrigte EF-Werte bei der DCM-Gruppe

Die EF (Ejektionsfraktion) ist ein Maß für die systolische Funktion eines Ventrikels. Die LVEF (Linksventrikuläre Ejektionsfraktion) wird am häufigsten mit Hilfe der Echokardiografie des Herzens bestimmt und berechnet sich wie folgt:  $LVEF: [\text{Schlagvolumen (SV)} / \text{Enddiastolisches Volumen (EDV)}] \times 100$ . (Kosaraju et al., 2021) Bei der HCM-Gruppe wurden signifikant höhere EF-Werte gemessen im Vergleich zur DCM-Gruppe und zur Gruppe der weiteren Herzerkrankungen. Dieses Ergebnis ist gut vereinbar mit der pathologischen Hämodynamik der HCMs. HCMs haben zwar eine hohe Auswurfleistung durch den verdickten Herzmuskel, aber die Ventrikelfüllung ist durch den verdickten Ventrikel eingeschränkt (Christian Prinz, 2011; Ciarambino et al., 2021). Somit ist die prozentuale EF hoch, obwohl im systemischen Kreislauf nur ein geringes Blutvolumen durch die reduzierte Ventrikelfüllung ankommt. Dagegen kommt es bei der DCM-Gruppe, aufgrund der pathologischen Dilatation des linken Ventrikels (Ciarambino et al., 2021), zu erniedrigten EF-Werten.

### 5.3 Korrelation der Proteinexpression mit klinischen Parametern

Wir untersuchten anhand von Korrelationsanalysen den statistischen Zusammenhang zwischen den klinischen Daten Alter bei Biopsie, Dauer der Herzinsuffizienz, höchster BNP-Wert, niedrigster EF-Wert und den semiquantitativen Werten der Proteinexpression. Die Patienten P2-P6 wurden ausgewählt, weil diese einheitlich an einer DCM litten und Gewebe aus dem linken Ventrikel des explantierten Herzens entnommen wurde. Da es sich bei den ermittelten Werten der Proteinexpression um semiquantitative und nicht exakte Zahlenwerte handelt, kann die Korrelationsanalyse nur als Trend betrachtet werden, was das Ziel dieser Untersuchung war. Für Alter bei Biopsie, Dauer der Herzinsuffizienz und höchster BNP-Wert ergab die Korrelationsanalyse mit den Proteinexpressionen keine signifikanten Werte. Dies ist vermutlich durch die geringe Stichprobe und hohe Heterogenität der Proben zu erklären. Die Korrelationsanalyse vom niedrigsten EF-Wert und der Proteinexpression ergab für LC3-I und WIPI1 eine signifikante Korrelation. Die Pathologie bei der DCM führt im Verlauf zu einer Erniedrigung der EF (Verdonschot et al., 2021). Verhältnismäßig niedrige EF-Werte zeigten eine verhältnismäßig niedrige Proteinexpression von LC3-I und WIPI1, während verhältnismäßig hohe EF-Werte eine verhältnismäßig hohe Proteinexpression von LC3-I und WIPI1 zeigten. Diese Befunde lassen am ehestens darauf schließen, dass bei niedrigen EF-Werten, und damit fortgeschrittener Herzinsuffizienz, bereits viele Muskelfasern zerstört wurden und der Proteinhaushalt schon weit geschädigt ist und bereits viele Proteine untergegangen sind. Bei sehr kleiner Stichprobe ist die Aussagekraft allerdings limitiert. Untersuchungen größerer Kohorten wären sinnvoll und könnten in Zukunft neue Erkenntnisse bringen.

#### 5.4 Veränderte CASA in Herzmuskelzellen bei DCM und HCM im Vergleich zu weiteren Herzerkrankungen

Protein	Proteinexpression bei der DCM	Proteinexpression bei der HCM
BAG3	↑	↑↑
FilaminC	↔	↔
Desmin	↔	↔
HSP70	↑↑	↔
HSPB5	↔	↑↑
HSPB6	↔	↔
HSPB7	↑	↑↑
HSPB8	↑↑	↔
p62	↔	↑↑
LC3-I	↔	↑
LC3-II	↔	↑↑
WIPI1	↑	↔
Ubiquitin	↑↑	↑
PINK1	↔	↔
SOD2	↔	↔
MUL1	↔	↔
BNIP3L	↔	↔

Abbildung 32: Zusammenfassung veränderter Proteinexpressionen bei DCM und HCM im Vergleich zu weiteren Herzerkrankungen

Legende:

↑ = erhöht

↑↑ = signifikant erhöht

↔ = unverändert

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in den Autophagie-Prozessen zwischen den verschiedenen Subgruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen gibt. Abbildung 32 zeigt eine Zusammenfassung des Vergleichs der Proteinexpressionen im WB. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Autophagieproteine eine große Rolle bei der Pathologie von Herzinsuffizienz spielen. Wir konnten zeigen, dass Autophagieproteine im WB unterschiedliche *Steady-State*-Level zeigen. Hier muss man beachten, dass immer ein Ist-Zustand gemessen wird und keine Dynamik. Die pathologischen Prozesse müssen in zukünftigen Studien noch genauer untersucht werden.

#### 5.4.1 Dysregulation von CASA bei der DCM

DCMs sind mit 55 % die häufigste symptomatische Form der Kardiomyopathien (Prävalenz in Population mit Herzinsuffizienz 1:250-400) und gekennzeichnet durch eine pathologische Erweiterung und damit einhergehenden Funktionsbeeinträchtigung einer oder beider Ventrikel (Ciarambino et al., 2021; Towbin, 2014). Unter den Patienten mit DCM, welche in dieser Arbeit untersucht worden, befanden sich ein Patient mit Z.n. nach Myokarditis, ein Patient mit Barth-Syndrom und zugrunde liegender Mutation im TAZ-Gen und vier Patienten mit idiopathischer Genese der DCM. Insgesamt zeigten sich große SD-Werte der klinischen Parameter Alter bei Biopsie, Dauer der Herzinsuffizienz und höchster BNP-Wert, welche die Heterogenität der DCM-Gruppe widerspiegeln. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur HCM-Gruppe und Gruppe der weiteren Herzerkrankungen ergab sich für den niedrigsten EF-Wert, wie unter 5.2 näher beschrieben wurde.

Bei der DCM fallen, durch mechanischen Zellstress bei Funktionsbeeinträchtigung der Ventrikel durch die pathologische Dilatation, viele beschädigte Proteine an (Ciarambino et al., 2021; Höhfeld et al., 2021; Towbin, 2014). Zu Beginn kann dies durch eine Induktion der Autophagie kompensiert werden. Im Verlauf übersteigt das Verhältnis der beschädigten Proteine die Autophagie-Reserven der Zelle und es kommt zu einer überforderten Autophagie-Maschinerie. Es sammelt sich immer mehr beschädigtes Protein an, was zunehmend zu einer Dysregulation der Autophagie führt, welche wiederum pathologische Prozesse aggraviert und es entsteht ein Teufelskreis (Höhfeld et al., 2021).

In unserer Studie konnten wir bei explantierten Herzmuskelproben von Patienten mit DCM eine erhöhte Proteinexpression von BAG3, HSP70, HSPB7, HSPB8, WIPI1 und Ubiquitin feststellen. Die erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen spricht für vermehrten Zellstress (Collier & Benesch, 2020). HSPB7 ist wichtig für den Funktionserhalt von FLNC und könnte hochreguliert sein, als Versuch der Zelle die Funktion des Strukturproteins FLNC zu erhalten (Juo et al., 2016). Die Erhöhung der Proteinexpression von WIPI1 spricht für eine Autophagie-Induktion bei der DCM (Proikas-Cezanne et al., 2015). BAG3, HSPB8 und Ubiquitin sind wichtige Proteine des Multikomponenten-Chaperon-Komplexes zur Einleitung der CASA (Klimek et al., 2017;

Pattingre & Turtoi, 2022) und die gesteigerte Expression weist auf einen verminderten Abbau dieser Proteine durch CASA hin.

Zusammenfassend sind die Befunde vereinbar mit einer überforderten und infolgedessen dysregulierten CASA bei explantierten Herzmuskelproben von Patienten mit DCM.

#### 5.4.2 Defekte CASA bei der HCM

HCMs sind die häufigsten vererbten Kardiomyopathien (Prävalenz 1:500) und gekennzeichnet durch eine Hypertrophie vor allem des linken Ventrikels (Ciarambino et al., 2021; Rupp et al., 2019). In der vorliegenden Kohorte wurden vier Patienten mit HCM verursacht durch Proteinmutationen untersucht. Bei einem Patienten mit BAG3-Pro209Leu-Mutation konnten wir die erhöhten Proteinexpressionen von p62, LC3-I, WIPI1, Ubiquitin und sHSPs reproduzieren und damit eine Dysregulation der Autophagie bestätigen (Schänzer et al., 2018). Erstmals untersucht wurde in der vorliegenden Studie ein Patient mit Mutation im FLNC-Gen (p.Ala2430Val) (Schänzer et al., 2021), welcher unter 5.6 näher beschrieben wird. Weiterhin wurden ein Patient mit Mutation im Gen PTPN11 c.1391G>C, welche mit dem Leopard-Syndrom assoziiert ist, und ein Patient mit Mutation im Gen Raf-1 C770C>T, welche mit dem Noonan-Syndrom assoziiert ist, untersucht. Das Noonan-Syndrom ist ein komplexes und heterogenes Syndrom mit autosomal-dominantem Erbgang, welches, neben z.B. Kleinwuchs und weit auseinander stehenden Augen, häufig zu Herzfehlern, wie HCMs, führt. Das Leopard-Syndrom wird auch als Variante des Noonan-Syndroms angesehen und führt neben angeborenen Herzfehlern typischerweise zu Fehlbildungen der Haut (Lentiginose). (Allen & Sharma, 2022) Insgesamt zeigten sich große SD-Werte der klinischen Parameter Alter bei Biopsie, Dauer der Herzinsuffizienz und höchster BNP-Wert, welche die Heterogenität der HCM-Gruppe widerspiegeln. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur DCM-Gruppe und Gruppe der weiteren Herzerkrankungen ergab sich für den niedrigsten EF-Wert, wie unter 5.2 näher beschrieben wurde.

In der HCM-Gruppe zeigte sich eine erhöhte Proteinexpression von BAG3, HSPB5, HSPB7, p62, LC3-I, LC3-II und Ubiquitin. Die erhöhte Gesamtproteinmenge von Ubiquitin deutet darauf hin, dass markierte Proteine nicht effizient abgebaut werden können (Riley et al., 2010) und die Erhöhung von sHSPs (HSPB5 und HSPB7) spricht

für vermehrten Zellstress. Der gemeinsame Anstieg von LC3-I und LC3-II weist auf eine blockierte CASA hin (Noboru Mizushima & Yoshimori, 2007; Runwal et al., 2019; Tanida et al., 2005). Da p62 und BAG3 während der Autophagie mit abgebaut werden, weist die erhöhte Proteinexpression beider Proteine ebenfalls auf eine defekte CASA hin (Arndt et al., 2010; Klimek et al., 2017; Lippai & Löw, 2014). Es entsteht eine Art Teufelskreis. Denn eine Ansammlung von p62 führt, über eine Aktivierung von mTORC1, zu einer weiteren Unterdrückung der Autophagie (Duran et al., 2011). Bezüglich der BAG3-Erhöhung muss beachtet werden, dass dieses Ergebnis durch den Patienten mit der BAG3 Pro209Leu-Mutation beeinflusst wird, welcher die mit Abstand höchste Proteinexpression von BAG3 zeigte. Durch die Mutation im BAG3-Gen, sammelt sich besonders viel dysfunktionales BAG3-Protein an, was die Autophagie umso mehr beeinträchtigt.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine defekte CASA bei explantierten Herzmuskelproben von Patienten mit HCM.

## 5.5 Unterschiedliche Proteinexpression im rechten und linken Ventrikel

Knyazeva et al. (2018) haben gezeigt, dass die Genexpression von Proteinen im Herzmuskel bei der linksventrikulären Hypertrophie nicht nur zwischen verschiedenen Zeiten des kardialen Remodelings unterschiedlich ist, sondern sich auch zwischen rechtem und linkem Ventrikel und interventrikulärem Septum unterscheidet (Knyazeva et al., 2018). Wir haben am Beispiel von zwei Patienten untersucht, ob es einen Unterschied der Proteinexpression zwischen rechtem und linkem Ventrikel gibt, um, insbesondere für zukünftige Studien, festzustellen, ob man Herzmuskelproben unterschiedlicher Lokalisationen miteinander vergleichen kann. Proben von zwei explantierten Herzen wurden ausgewählt, weil die Patienten ähnliche klinische Parameter (Alter, EF-Wert und BNP-Wert) zeigten. Beide Patienten litten an einer angeborenen Fehlfunktion des Herzens.

Die Aussagekraft ist bei sehr kleiner Stichprobe limitiert, dennoch lassen sich Tendenzen ableiten. Im linken Ventrikel zeigte sich eine höhere Proteinexpression der Autophagiemarker (HSPB7, HSPB8 und BAG3). Dies könnte in Zusammenhang mit der größeren mechanischen Belastung des linken Ventrikels stehen. Die Proteinexpression des Strukturproteins Desmin war im linken Ventrikel marginal höher im Vergleich zum rechten Ventrikel. Im Gegensatz dazu stellte sich die Proteinexpression des mitochondrialen Markers SOD2 im rechten Ventrikel höher dar. Untersuchungen größerer Kohorten und zudem Untersuchungen unterschiedlicher Bereiche des linken Ventrikels bezüglich Heterogenität von Proteinexpressionen wären sinnvoll und könnten in Zukunft neue Erkenntnisse bringen.

Zusammenfassend zeigten sich zum Teil starke Unterschiede der Proteinexpressionen zwischen rechtem und linkem Ventrikel und in zukünftigen Untersuchungen wäre es sinnvoll, für den Vergleich verschiedener Herzen die gleiche Lokalisation zu wählen.

## 5.6 HCM bedingt durch neue Mutation im FLNC-Gen (p.Ala2430Val)

Ein, in dieser Studie untersuchter, männlicher Patient litt an einer HCM und die Myektomie erfolgte im Alter von 23 Jahren. Das Alter bei Biopsie war das höchste aller untersuchten Patienten. Zum Zeitpunkt der Myektomie lag seit 12 Monaten eine leichte belastungsabhängige Herzinsuffizienz (NYHA I) vor. Der höchste BNP-Wert zeigte sich, im Vergleich zu den anderen Patienten, moderat erhöht und der niedrigste EF-Wert lag im oberen Normbereich. (siehe Tabelle 1) Eine Exom-Sequenzierung ergab eine neue Mutation im FLNC-Gen (p.Ala2430Val). Herzmuskelgewebe von einem Patienten mit dieser Mutation wurde bisher noch nicht analysiert und die zugrunde liegenden pathologischen Prozesse waren deshalb unklar (Schänzer et al., 2021).

Bei der WB-Analyse zeigten sich die Autophagiemarker LC3-I deutlich und LC3-II und WIPI1 leicht erhöht. Dies ist ein Hinweis auf eine CASA-Induktion und durch Anhäufung von beschädigtem FLNC im Verlauf überforderten und damit dysregulierten und defekten CASA (Proikas-Cezanne et al., 2015; Runwal et al., 2019; Tanida et al., 2005) (siehe Abbildung 5). Ebenfalls hindeutend auf eine überforderte Autophagie sind die erhöhte Gesamtmenge an Ubiquitin (Riley et al., 2010) und eine erhöhte Menge an Hitzeschockproteinen, wie dem CASA-Protein HSPB8 (Collier & Benesch, 2020; Klimek et al., 2017). HSPB6 zeigte sich leicht erhöht. HSPB7 ist essenziell für den Funktionserhalt von FLNC (Juo et al., 2016). Dies könnte die Ursache für die hochregulierte Proteinexpression von HSPB7 bei dem Patienten mit Mutation im FLNC-Gen sein. In unseren Ergebnissen zeigte sich zwar keine erhöhte Proteinexpression von FLNC, aber eine pathologische Umverteilung und Anhäufung von beschädigtem FLNC zu Ungunsten von funktionalem FLNC ist dennoch naheliegend. HSPB5 war leicht und das Strukturprotein Desmin deutlich erhöht. HSPB5 ist wichtig für den Funktionserhalt von Desmin und verhindert unter physiologischen Bedingungen eine pathologische Aggregation (Perng et al., 1999). Die erhöhte Desmin-Proteinexpression stellt einen weiteren Hinweis auf eine überforderte und dysregulierte Autophagie (CASA) dar (Singh et al., 2020). Des Weiteren konnte bei dem Patienten mit FLNC-Mutation eine erhöhte Proteinexpression von BNIP3L/Nix festgestellt werden. Dies deutet auf eine hochregulierte Mitophagie hin (Yoo & Jung, 2018).

## 5.7 Regulation der Mitophagieproteine bei DCM, HCM und weiteren Herzerkrankungen

Herzmuskelgewebe ist ständig aktiv und hat einen vergleichsweise hohen Energiebedarf. Die Mitochondrien sind, als Energielieferanten, im Herzmuskelgewebe besonders zahlreich. (Iglewski et al., 2010) Sowohl zu viele als auch zu wenige Mitochondrien können einen zellulären Schaden verursachen. Deshalb ist es von Bedeutung, dass Synthese und Abbau dieser Zellorganellen im Gleichgewicht stehen. (Iglewski et al., 2010; Russell et al., 2004) Der Begriff Mitophagie beschreibt den selektiven autophagischen Abbau von Mitochondrien. (Tolkovsky, 2009) Mitophagie wird in Situationen von Zellstress, z.B. Hypoxie, hochreguliert (Yoo & Jung, 2018) zur mitochondrialen Qualitätskontrolle. Beschädigte Mitochondrien müssen abgebaut und aussortiert werden, um die Zell-Homöostase beibehalten zu können (A. Li et al., 2022). Es wurde gezeigt, dass mitochondriale Dysfunktionen eine entscheidende Beteiligung in der Pathophysiologie von kardialen Erkrankungen haben (A. Li et al., 2022; Solaini, Baracca, Lenaz, & Sgarbi, 2010). Mitochondriale Dysfunktionen stehen in Zusammenhang mit kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz, Atherosklerose und Ischämie-Reperfusionsschäden (A. Li et al., 2022) und eine physiologische Mitophagie kann Arrhythmien vermindern (Y. Yang et al., 2020). Mitophagie könnte in Zukunft als therapeutisches Ziel kardiovaskulärer Erkrankungen bedeutsam sein (A. Li et al., 2022; Y. Yang et al., 2020). Dabei könnten BAG-Proteine, wie zum Beispiel BAG3, durch ihre Bindungs-Fähigkeit an viele verschiedene Proteine, wichtig werden als Ansatzpunkt für Autophagie- und Mitophagie-Regulatoren (Pattingre & Turtoi, 2022).

Für die Mitophagieproteine PINK1, SOD2, MUL1 und BNIP3L/Nix, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen. Allerdings zeigte sich eine hohe Standardabweichung der Proteinexpression innerhalb der 3 Gruppen. Ursächlich kommt dabei in Betracht, dass mitochondriale Proteine sehr sensible Parameter sind, weil Mitochondrien sehr empfindlich auf zellulären Stress, wie zum Beispiel Hypoxie, reagieren (Solaini & Harris, 2005; Sulkshane et al., 2021) und aus diesem Grund alle untersuchten Herzen eine Dysregulation der Mitophagie aufweisen könnten.

Interessanterweise konnte im Herzgewebe von einem Patienten mit einer mitochondrialen Erkrankung eine gestörte Mitophagie gezeigt werden (siehe 5.7.1). Bei dem Patienten mit BAG3-Pro209Leu-Mutation zeigten sich Hinweise auf eine beeinträchtigte Mitophagie, was zusätzlich zur Pathogenese der HCM beitragen könnte (Schänzer et al., 2018).

### 5.7.1 DCM bei mitochondrialer Erkrankung bei Barth-Syndrom

Der Patient war bei der Herztransplantation 6 Monate alt und die Dauer der Herzinsuffizienz betrug 5 Monate. Es zeigte sich mit 6161 pg/ml ein deutlich erhöhter BNP-Wert und mit einem EF-Wert von 25 % eine deutlich beeinträchtigte Herzfunktion. Klinisch lag eine DCM vor. Es wurde Gewebe der Herzspitze untersucht und folgende Mutation konnte mittels Genomanalyse (Exom-Sequenzierung) gefunden werden: TAZ C280C>G. Diese Mutation im TAZ-Gen ist assoziiert mit einem Barth-Syndrom. Das TAZ-Gen exprimiert für die Transacylase Tafazzin, welche für die Verarbeitung von Cardiolipin entscheidend ist. Bei Störungen im TAZ-Gen kommt es demzufolge auch zu Störungen des Phospholipids Cardiolipin, welches die Struktur und Funktion von Mitochondrien und damit die ATP-Produktion wesentlich beeinflusst. Da in der Herzmuskulatur besonders viele Mitochondrien zur Energiegewinnung benötigt werden, kommt es beim Barth-Syndrom typischerweise zu einer früh einsetzenden Kardiomyopathie. Weitere typische Manifestationen sind Skelettmuskelmyopathien, ein geschwächtes Immunsystem und Wachstumsverzögerungen. Das Barth-Syndrom ist eine seltene Erkrankung (weltweit bei 1/300.000-400.000 Lebendgeburten), wird X-chromosomal rezessiv vererbt und führt ohne Behandlung meist bereits im Säuglingsalter zum Tod. (Sabbah, 2021) Die Erkrankung ist ein gutes Beispiel, warum es wichtig ist, die Pathophysiologie hinter Kardiomyopathien zu verstehen. Denn dies ermöglicht neue Therapiemöglichkeiten, welche die Lebenserwartung und -qualität von Patienten deutlich steigern könnten. Eine, sich in Studien vielversprechend darstellende, neuartige potenzielle Therapieoption beim Barth-Syndrom ist Elamipretid, welches helfen kann, die ATP-Synthese in den Mitochondrien und damit die Herzfunktion zu verbessern. (Sabbah, 2021)

P62, LC3-II, HSP70 und PINK1 wurden bei dem Patienten erhöht detektiert. FLNC und HSPB7 zeigten sich leicht erhöht. Der erhöhte p62-Spiegel kann ein Hinweis auf eine blockierte Autophagie sein (Klionsky et al., 2012). Erhöhtes LC3-II kann auf eine

Induktion der Autophagosomenbildung oder auf eine blockierte Autophagie hinweisen (Noboru Mizushima & Yoshimori, 2007) und erhöhtes HSP70 ist ein Hinweis auf Zellstress mit Hochregulierung von Proteinneufaltung und/ oder -abbau (Carra et al., 2017; Collier & Benesch, 2020). FLNC kann als Strukturprotein erhöht sein bei gestörter und überforderter Autophagie (Ulbricht et al., 2013) und/ oder bei Hochregulation der Synthese zum Beispiel unter Hypoxie (X. Yang et al., 2019). Die gleichzeitige Erhöhung von HSPB7, welches wichtig ist für den Funktionserhalt von FLNC, kann auf eine gesteigerte Interaktion von HSPB7 mit FLNC hinweisen (Juo et al., 2016). Eine Erhöhung von PINK1 weist auf eine Induktion von Mitophagie hin (Yoo & Jung, 2018). Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf vermehrten Zellstress mit einer hochregulierten und gleichzeitig überforderten und blockierten Autophagie, und im speziellen Mitophagie, hin.

## 5.8 Limitationen der Studie

### 5.8.1 Kohorte

Kardiomyopathien sind seltene Erkrankungen bei Kindern. Bisher wurden noch keine Studien zur Proteinexpression bei kindlichen Kardiomyopathien durchgeführt. In Gießen werden durch das Kinderherzzentrum der JLU verhältnismäßig viele Fälle vorgestellt (Rupp et al., 2019). Postmortales Gewebe ist für Proteinanalysen ungeeignet, weil es peri- und postmortem zügig zu einer Degradierung des Proteoms kommt. Aus diesem Grund verwendeten wir nur Gewebe, welches von Biopsien und/ oder Transplantationen stammt. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit konnte Herzmuskelgewebe von 17 Patienten untersucht werden, was in Bezug auf seltene Kardiomyopathien eine große Kohorte darstellt. Allerdings zeigte sich eine große Heterogenität der Kohorte mit unterschiedlichen genetischen Befunden. Entsprechend zeigte sich auch eine hohe Variabilität der klinischen Parameter, wie zum Beispiel Alter bei Gewebsentnahme, Dauer der Herzinsuffizienz und Ursache der Herzinsuffizienz, was zu Unterschieden in der Proteinexpression führen kann. Beispielsweise war der jüngste Patient in dieser Arbeit bei Gewebsentnahme 2 Monate alt und der älteste Patient 23 Jahre alt. In zukünftigen Studien wäre es interessant, Patienten mit ähnlichen klinischen Parametern zu gruppieren und Unterschiede innerhalb und zwischen diesen Gruppen zu analysieren.

Von 35% der untersuchten Patienten wurden genetische Analysen durchgeführt. Ein Großteil der Patientendaten wurde retrospektiv erhoben und der Ethikantrag hat zunächst keine weiteren genetischen Untersuchungen des Gewebes beinhaltet. Früher gehörten genetische Analysen nicht zum Standard der Abklärung von kindlichen Kardiomyopathien. Dies hat sich in den letzten Jahren durch verbesserte Paneldiagnostik geändert (Rupp et al., 2019) und könnte zu entscheidenden neuen Erkenntnissen bezüglich zugrunde liegender Mutationen führen, wie durch Rupp et al. (2019) gezeigt wurde. In dieser Studie hatten 42 % von 36 untersuchten Patienten mit HCM im Alter von 0 bis 18 Jahren eine zugrundeliegende Mutation in kardialen Sarkomerproteinen (Rupp et al., 2019). Dieses Ergebnis ähnelt dem von Morita et al. (2008), welches Mutationen in Sarkomerproteinen bei 54 % von 84 HCM-Patienten mit Krankheitssymptomen vor dem 15. Lebensjahr zeigte (Morita et al., 2008). Im Vergleich

zu HCMs spielen genetische Mutationen bei DCMs eine geringere, aber dennoch nicht zu unterschätzende Rolle. Millat et al. (2011) untersuchten 105 DCM-Fälle und es wurde bei 19% eine genetische Mutation nachgewiesen. In der aktuellen Literatur wird der Ertrag von positiven Gentests bei HCMs bei 30-60% und bei DCMs bei 20-30% beschrieben (Vogiatzi et al., 2022).

### 5.8.2 Kontrollen

Eine wesentliche Schwäche der Studie ist das Fehlen von gesundem Kontrollgewebe. Alle untersuchten Patienten litten an einer Herzinsuffizienz. Biopsien von gesunden Probanden sind ethisch nicht vertretbar und postmortales Gewebe eignet sich nicht zur Untersuchung von Proteinen. Aus diesem Grund verwendeten wir die Gruppe der weiteren Herzerkrankungen, also die nicht zur DCM- und HCM-Gruppe zählenden Patienten, als Kontrollgruppe. Es ist gut denkbar, dass die Herzinsuffizienz an sich, unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache, zu pathologischen Veränderungen der Proteinkonzentrationen führen kann. Zum Beispiel zeigt sich bei mikroskopischen Untersuchungen, dass Kardiomyopathien eine gesteigerte Autophagie mit p62-Akkumulationen im Vergleich zu gesunden Herzen haben (van der Klooster et al., 2021).

### 5.8.3 Methode

Beim Vergleich der Sub-Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen wurden mehr Patienten untersucht als mittels eines WBs, aufgrund limitierter Anzahl der Geltaschen, realisiert werden konnte. Aus diesem Grund haben wir die Analysen in 3 Durchgängen durchgeführt. Ein genauer Vergleich der Ergebnisse verschiedener WBs ist streng genommen nicht möglich, weil die Methode sehr anfällig für minimale Abweichungen im Herstellungsprozess der WBs ist. Tendenzen können dennoch zwischen Ergebnissen verschiedener WBs erkannt werden. Dies stand in der vorliegenden Arbeit im Fokus. Als optischer Vergleichspatient diente der Patient P9.

Wie sensibel die Methode ist, zeigt sich dadurch, dass es selbst innerhalb eines WBs zu Abweichungen der Ergebnisse durch unterschiedliche Störfaktoren kommen kann. Als Beispiele sollen die Proteinexpressionen des Patienten P9 von Ubiquitin (siehe

Abbildung 24, WB-C) und HSPB8 (siehe Abbildung 21, WB-C) genannt werden. In diesen Fällen stellt sich die Proteinexpression des Patienten P9 auf der gleichen Trägermembran eines WBs unterschiedlich dar. Es fällt auf, dass dies bei beiden Beispielen die 1. Proteinbande betrifft. Es ist denkbar, dass an dieser Stelle zum Beispiel die Antikörperbindung aufgrund eines Randeffekts erschwert ist (abcam, 2022). Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, die WBs, wenn möglich, 2-3mal zu wiederholen, um zu ergründen, inwieweit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Dies konnte für dieses Projekt nicht für alle Proteine realisiert werden, da aufgrund des Probenmaterials, Herzmuskelgewebe, nur begrenzt Gewebe zur Verfügung stand und sehr sparsam gearbeitet werden musste.

Eine 100-prozentige Standardisierung ist bei WB nicht möglich. Es gibt viele Störfaktoren in dem langen Arbeitsprozess. Dennoch sollte der Prozess so weit wie möglich standardisiert werden und zum Beispiel nur eine Entwicklungsmethode verwendet werden. In dieser Arbeit wurde durch die Verwendung von 2 Entwicklungsmethoden allerdings ein Vergleich dieser beiden ermöglicht (siehe Signaldetektion).

Eine Quantifizierung bei semiquantitativer WB-Methode ist streng genommen nicht möglich. Um dennoch alle Auswertungsmöglichkeiten auszuschöpfen, führten wir quantitative Analysen durch und erhielten aufgrund der semiquantitativen WB-Methode semiquantitative Zahlenwerte, welche als Tendenzen und nicht als absolute Zahlenwerte gesehen werden müssen. Diese Methode wird häufig in wissenschaftlichen Arbeiten angewandt.

## 5.9 Ausblick

Als Ausblick für die Zukunft ist es empfehlenswert, genetische Analysen bei allen Patienten durchzuführen, um mehr zu erfahren über genetische Mutationen als Ursache von Kardiomyopathien. Die WB-Ergebnisse sollten validiert werden mit Hilfe von zum Beispiel Proteinexpressionen und Verteilungsmuster an Gewebeschnitten mittels Immunfluoreszenz- oder Immunhistochemie-Analysen. Dadurch wird eine Untersuchung unterschiedlicher Zellkompartimente und eine Korrelation mit der Morphologie, zum Beispiel Fibrose, Zellgröße und Störung der Sarkomerstruktur, möglich. So können unter anderem pathologische Verteilungsmuster bei identischer Proteinmenge aufgedeckt werden.

Nach der anfänglichen Definition der Zielproteine durch WB-Analysen könnte in Zukunft eine empfindlichere und quantitativere Validierung der Ergebnisse durch ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) geplant werden, sofern Antikörper verfügbar sind (wie z. B. für BAG3: <https://www.abcam.com/human-bag3-elisa-kit-ab227900.html>). Eine quantitativere WB-Analyse wäre auch mittels Verwendung der LI-COR Odyssey Infrarot WB-Technik möglich.

Weitere molekulare Analysen, wie die RT-qPCR, stellen für zukünftige Studien eine interessante Untersuchungsmethode dar. Die RT-qPCR ist eine quantitative Methode der RNA-Analyse (Bustin, Benes, Nolan, & Pfaffl, 2005). Warum es sinnvoll ist, WB-Analysen vor RNA-Analysen durchzuführen, soll im Folgenden erläutert werden. Zum einen stellen Proteine das Endprodukt der Genexpression dar, weshalb es sinnvoll ist, dieses zunächst näher zu untersuchen und zum anderen ist RNA anfälliger für den Abbau, wenn sie aus Gewebeproben isoliert wird.

Proteomic Analysen, zum Beispiel Massenspektrometrie, sind inzwischen die Methode der Wahl zur Untersuchung von Proteinen auch in der Muskulatur (Barbarics et al., 2021; Deshmukh et al., 2021). WBs sind dennoch wichtig zur Validierung der Befunde. Die *single-cell proteomic analysis* ermöglicht es, das Proteom einzelner Zellen zu untersuchen, was einen viel detaillierteren Einblick gibt in komplexe biologische Prozesse als die Untersuchung einer ganzen Zellpopulation (Nicin et al., 2021; Pham, Tyagi, Wang, & Guo, 2021).

Weitere Forschungsmöglichkeiten könnten zum Beispiel humane pluripotente Stammzellen sein, die spezifische, mit Kardiomyopathie assoziierte, Mutationen tragen (Brodehl et al., 2019; Jaffré et al., 2019). Außerdem stellt das *in-vivo*-Modell der Knockout-Zebrafische eine interessante Forschungsrichtung dar (Diofano et al., 2020). Diofano et al. (2020) fanden Hinweise darauf, dass *in vivo* die Penetranz von BAG3-Mutationen und damit die Ausprägung von kardialen Erkrankungen durch genetische Kompensationen entscheidend beeinflusst werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Herzinsuffizienz im Kindesalter kann durch Kardiomyopathien verursacht werden. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen, die zu einem Funktionsverlust der Herzmuskelzellen führen, sind noch nicht ausreichend verstanden. Insbesondere zu Kardiomyopathien im Kindesalter liegen bisher nur wenige Daten vor. Untersuchungen von Herzmuskelgewebe von Patient/innen mit einer Kardiomyopathie sind daher wichtig, um Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zu erweitern. In der vorliegenden Arbeit wurden Herzmuskelproben aus dem Kinderherzzentrum und Zentrum für angeborene Herzfehler der Justus-Liebig-Universität Gießen aus dem Zeitraum 2016 bis 2018 untersucht. Klinische Parameter wurden anhand einer Datenbank des Kinderherzzentrums und Instituts für Neuropathologie erhoben. Ziel der Arbeit war es, Proteinexpressionen im Herzmuskel mit Hilfe der Western Blot (WB) Methode zu analysieren, wobei insbesondere die Proteine untersucht wurden, die bei autophagischen Prozessen eine Rolle spielen. In der quergestreiften Muskulatur wird der Abbau von beschädigten Proteinen insbesondere durch eine Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) reguliert. Beim Herzmuskel spielt sie durch die hohe und dauerhafte Kontraktilitätsleistung eine besondere Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde an Herzmuskelgewebe aus explantiertem Gewebe oder von Myektomien untersucht, ob es Unterschiede in den Autophagie-Prozessen zwischen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen, wie zum Beispiel hypoplastisches Linksherzsyndrom, gibt. Dafür wurde Gewebe von 17 Patienten im Alter von 2 Monaten bis 23 Jahren (71 % männlich) untersucht. 35 % der Patienten hatten eine DCM, 24 % eine HCM und 41 % eine weitere Form einer Herzerkrankung. Mit der WB Analyse lassen sich die Autophagie assoziierten Proteine in den Proben gut darstellen. Insgesamt zeigte sich eine hohe Variabilität der Expressionsmuster. Wir konnten dennoch eindeutige Tendenzen feststellen. Bei der DCM sind die Befunde vereinbar mit einer überforderten und infolgedessen dysregulierten CASA im Vergleich zu Patienten mit weiteren Herzerkrankungen. Bei der HCM sprechen die Ergebnisse für eine defekte CASA. Interessanterweise konnten wir eine Korrelation einzelner Autophagieproteine (LC3-I und WIPI1) mit dem niedrigsten EF-Wert nachweisen. Eine Besonderheit ist die Analyse eines Patienten mit einer, bisher als nicht sicher pathogen beschriebenen, Mutation im FLNC Gen (p.Ala2430Val), sowie eines Patienten mit mitochondrialer Erkrankung (Mutation im TAZ-Gen, TAZ C280C>G

BARTH, Barth-Syndrom) und die erneute Analyse eines Patienten mit BAG3 Pro209Leu-Mutation, welche bisherige Ergebnisse bestätigte. Eine große Limitation der Studie ist das Fehlen von Kontrollgewebe gesunder Probanden. Zusammenfassend konnte erstmalig an Gewebe von kindlichen Kardiomyopathien gezeigt werden, dass Autophagieproteine eine große Rolle bei der Pathogenese von Herzinsuffizienzen spielen und unterschiedlich stark reguliert werden. Die Befunde müssen mit weiteren Methoden, wie Immunfluoreszenzfärbungen, validiert werden. Neuere Methoden, wie zum Beispiel Massenspektrometrie, können dabei helfen, eine größere Anzahl von Proteinen zu untersuchen.

## 7 Summary

Heart failure in childhood can be caused by cardiomyopathies. The underlying pathomechanisms that lead to a loss of function of the heart muscle cells are not fully understood. In particular, there is little data available on paediatric cardiomyopathies. Studies of heart muscle tissue from patients with cardiomyopathy are therefore important to expand diagnostic and therapeutic options. In the present study, myocardial samples from patients of the Pediatric Heart Centre and Centre for Congenital Heart Defects at the Justus Liebig University Giessen from 2016 to 2018 were examined. Clinical parameters were collected using the database of the Pediatric Heart Centre and the Institute of Neuropathology. The aim of the work was to analyse protein expressions in cardiac muscle using the Western Blot (WB) method with a particular interest in proteins that play a role in autophagic processes. In striated muscle the degradation of damaged proteins is regulated in particular by chaperone-assisted selective autophagy (CASA). In cardiac muscle, this process plays a key role in tissue homeostasis due to the high and sustained contractility performance. In the present study, myocardial tissue from explanted tissue or from myectomies was used to investigate whether there are differences in autophagy processes between DCM, HCM and other heart diseases, such as hypoplastic left heart syndrome. Tissue from 17 patients aged 2 months to 23 years (71% male) was examined. 35 % of the patients had DCM, 24 % had HCM and 41 % had another form of heart disease. WB analysis provides a good way to visualize and estimate the levels of autophagy-associated proteins in the samples. Although there was an overall high variability in protein levels, we were able to identify clear tendencies. In DCM, the findings are consistent with an overloaded and consequently dysregulated CASA compared to patients with other cardiac diseases. In HCM, the findings are in favour of a defective CASA. Interestingly, we were able to demonstrate a correlation of individual autophagy proteins (LC3-I and WIPI1) with the lowest EF value. A special feature is the analysis of a patient with a mutation in the FLNC gene (p.Ala2430Val), previously described as not certainly pathogenic, as well as a patient with mitochondrial disease (mutation in the TAZ gene, TAZ C280C>G BARTH, Barth syndrome) and the re-analysis of a patient with BAG3 Pro209Leu mutation, which confirmed previous results. A major limitation of the study is the lack of control tissue from healthy patients. In summary, it has been shown for the first time in tissue from paediatric cardiomyopathies

that autophagy proteins play a major role in the pathogenesis of heart failure and that they are differentially regulated. The findings need to be validated with further methods such as immunofluorescence staining. Additional methods such as mass spectrometry could help to investigate a larger number of proteins.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
AR	Abstoßungsreaktion
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosintriphosphat
AVSD	Atrioventrikulärer Septumdefekt
BAG3	Bcl-2-assoziiertes Athanogen 3
BNIP3L	BNIP3-like=BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like
BNP	Brain natriuretic Peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
CASA	Chaperon-assistierte selektive Autophagie
CHDH	Cholindehydrogenase
CHIP	C-terminus of Hsc70-interacting Protein
Ca.	Circa
CM	Kardiomyopathie
CMA	Chaperone-mediated autophagy
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion (Auswurfraction)
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
FLNC	FilaminC
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HLHS	Hypoplastisches Linksherzsyndrom
HSP	Hitzeschockprotein
Hypopl. AB	Hypoplastischer Aortenbogen
KDA	Kilodalton
SHSPs	Kleine Hitzeschockproteine ( <i>small heat shock proteins</i> )
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3B
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVNC	Left ventricular noncompaction
M	Molare Masse

MFM	Myofibrilläre Myopathie
Min	Minuten
MFN	Mitofusin
MUL1	Mitochondriale E3 Ubiquitin Ligase 1
NCM	Nicht-Kardiomyopathie
Nix	NIP3-like protein X
NYHA	New York Heart Association (Klassifikation der Herzinsuffizienz)
PBS	Phosphate Buffered Solution
PINK1	PTEN induzierte Kinase 1
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumdodecylsulfat
SOD2	Superoxiddismutase 2
SQSTM1	Sequestosome 1
Std	Stunde(n)
SV	Schlagvolumen
SYNPO2	Synaptopodin-2
TAZ	Transkriptioneller Koaktivator mit PDZ-bindendem Motiv
UAB	Unterbrochener Aortenbogen
VDAC1	Voltage-dependent anion channel-1
WB	Western Blot
WIPI1	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1
YAP	Yes-assoziiertes Protein

## 9 Darstellungs- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifikation von Kardiomyopathien modifiziert nach Maron et al. (2006); LVNC=linksventrikuläre Noncompaction-Kardiomyopathie .....	3
Abbildung 2: Grundstruktur der quergestreiften Muskulatur modifiziert nach Mao and Nakamura (2020) .....	6
Abbildung 3: CASA beschädigter Proteine (z.B. FilaminC) modifiziert nach Klimek, Kathage, Würdehoff, and Höhfeld (2017) .....	9
Abbildung 4: BAG3 und Hitzeschockproteine und ihre Rolle in der CASA; <b>A:</b> Multikomponenten-Chaperon-Komplexe modifiziert nach Rauch et al. (2017); <b>B:</b> Interaktionen der sHSPs, Quellen: Klimek et al. (2017), Perng et al. (1999), Juo et al. (2016), Fang, Bogomolovas, Trexler, and Chen (2019); <b>C:</b> Wichtige Funktionen des Co-Chaperons BAG3 in der Autophagie im quergestreiften Muskel .....	13
Abbildung 5: Regulation von CASA-assoziierten Proteinen.....	16
Abbildung 6: Lokalisation von FLNC in der Z-Scheibe modifiziert nach Fürst et al. (2013).....	19
Abbildung 7: Bedeutungen der Proteinexpression von FLNC und Desmin.....	21
Abbildung 8: Erkennung von Mitochondrien bei der Mitophagosomenbildung modifiziert nach Y. Yang et al. (2020) und Yoo and Jung (2018) .....	24
Abbildung 9: Proteinmessung an Herzmuskelgewebe .....	32
Abbildung 10: Proteinmessung an Skelettmuskelgewebe .....	32
Abbildung 11: Proteinexpression in Herzmuskelgewebe, Proteinmassen in aufsteigender Reihenfolge.....	36
Abbildung 12: Proteinexpression in Herzmuskelgewebe, im Vergleich zu Abbildung 11 Reihenfolge der Proteinmassen geändert.....	36
Abbildung 13: p62-Proteinbanden entwickelt mittels ECL-Imager .....	42
Abbildung 14: p62-Proteinbanden entwickelt mittels Fotochemie .....	42
Abbildung 15: Haushaltsprotein Pan-Actin, Proteinmassen in aufsteigender Reihenfolge .....	43
Abbildung 16: Haushaltsprotein Pan-Actin, Die Proteinmassen wurden im Vergleich zu Abbildung 15 in veränderter Reihenfolge aufgetragen.....	43
Abbildung 17: Proteinverteilungsmuster von Herzmuskelgewebe; P8 und P13 sind Ausreißer.....	46

Abbildung 18: Box-Plots der klinischen Daten .....	49
Abbildung 19: Proteinexpression von Sarkomerproteinen .....	51
Abbildung 20: Box-Plots zum Vergleich der Proteinexpression von Sarkomerproteinen .....	52
Abbildung 21: Proteinexpression von Hitzeschockproteinen.....	53
Abbildung 22: Box-Plots zum Vergleich der Proteinexpression von Hitzeschockproteinen .....	54
Abbildung 23: Proteinexpression von Autophagieproteinen.....	55
Abbildung 24: Proteinexpression des Autophagieproteins Ubiquitin .....	56
Abbildung 25: Box-Plots zum Vergleich der Proteinexpression von Autophagieproteinen .....	57
Abbildung 26: Proteinexpression von Mitophagieproteinen .....	58
Abbildung 27: Proteinexpression des Mitophagieproteins BNIP3L/Nix .....	59
Abbildung 28: Box-Plots zum Vergleich der Proteinexpression von Mitophagieproteinen .....	60
Abbildung 29: Vergleich der Proteinexpression im rechten und linken Ventrikel bei zwei Patienten.....	68
Abbildung 30: Box-Plots Vergleich der Proteinexpression rechter und linker Ventrikel .....	70
Abbildung 31: Korrelationsanalyse des niedrigsten EF-Wertes mit den Proteinexpressionen von LC3-I und WIPI1; r- und p-Wert und Signifikanz nach Pearson Korrelationstest (siehe Tabelle 10).....	72
Abbildung 32: Zusammenfassung veränderter Proteinexpressionen bei DCM und HCM im Vergleich zu weiteren Herzerkrankungen .....	78

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten und Laborparameter der Patienten .....	27
Tabelle 2: Myokardiales Gewebe der Patienten .....	29
Tabelle 3: Primärantikörper .....	38
Tabelle 4: Sekundärantikörper .....	39
Tabelle 5: Entwicklungsmethoden.....	40
Tabelle 6: Vergleich der Entwicklungsmethoden.....	41
Tabelle 7: Statistische Analysen zum Vergleich der klinischen Parameter der Gruppen DCM, HCM und weitere Herzerkrankungen; p-Wert und Signifikanz nach ordinary one-way ANOVA .....	48
Tabelle 8: Statistische Analysen zum Vergleich der Proteinexpressionen von DCM, HCM und weiteren Herzerkrankungen; p-Wert und Signifikanz nach ordinary one-way ANOVA .....	64
Tabelle 9: Vergleich der Proteinexpression rechter und linker Ventrikel; semiquantitative Werte der WB-Analyse.....	69
Tabelle 10: Pearson Korrelationstest des niedrigsten EF-Wertes mit der Proteinexpression .....	71

## 11 Literaturverzeichnis

- abcam. (2022). Leitfaden zu Ladekontrollen.
- Alegria-Schaffer, A., Lodge, A., & Vattem, K. (2009). Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol*, *463*, 573-599. doi:10.1016/s0076-6879(09)63033-0
- Allen, M. J., & Sharma, S. (2022). Noonan Syndrome. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., . . . Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol*, *20*(2), 143-148. doi:10.1016/j.cub.2009.11.022
- Baechler, B. L., Bloemberg, D., & Quadriatero, J. (2019). Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation. *Autophagy*, *15*(9), 1606-1619. doi:10.1080/15548627.2019.1591672
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A., & Kelly, J. W. (2008). Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science*, *319*(5865), 916-919. doi:10.1126/science.1141448
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, *353*(6294), aac4354. doi:10.1126/science.aac4354
- Barbarics, B., Eildermann, K., Kaderali, L., Cyganek, L., Plessmann, U., Bodemeyer, J., . . . Bohnenberger, H. (2021). Proteomic mapping of atrial and ventricular heart tissue in patients with aortic valve stenosis. *Sci Rep*, *11*(1), 24389. doi:10.1038/s41598-021-03907-3
- Bardag-Gorce, F., Francis, T., Nan, L., Li, J., He Lue, Y., French, B. A., & French, S. W. (2005). Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life Sci*, *77*(20), 2594-2602. doi:10.1016/j.lfs.2005.04.020
- Bartlett, B. J., Isakson, P., Lewerenz, J., Sanchez, H., Kotzebue, R. W., Cumming, R. C., . . . Finley, K. D. (2011). p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy*, *7*(6), 572-583. doi:10.4161/auto.7.6.14943
- Begay, R. L., Tharp, C. A., Martin, A., Graw, S. L., Sinagra, G., Miani, D., . . . Taylor, M. R. (2016). FLNC Gene Splice Mutations Cause Dilated Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci*, *1*(5), 344-359. doi:10.1016/j.jacbts.2016.05.004
- Bresciani, G., da Cruz, I. B., & González-Gallego, J. (2015). Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem*, *68*, 87-130. doi:10.1016/bs.acc.2014.11.001
- Briknarová, K., Takayama, S., Homma, S., Baker, K., Cabezas, E., Hoyt, D. W., . . . Ely, K. R. (2002). BAG4/SODD Protein Contains a Short BAG Domain \*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(34), 31172-31178. doi:10.1074/jbc.M202792200
- Brodehl, A., Ebbinghaus, H., Deutsch, M. A., Gummert, J., Gärtner, A., Ratnavadivel, S., & Milting, H. (2019). Human Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes as Models for Genetic Cardiomyopathies. *Int J Mol Sci*, *20*(18). doi:10.3390/ijms20184381
- Brodehl, A., Gaertner-Rommel, A., & Milting, H. (2017). FLNC (Filamin-C): A New(er) Player in the Field of Genetic Cardiomyopathies. *Circ Cardiovasc Genet*, *10*(6). doi:10.1161/circgenetics.117.001959
- Brodehl, A., Gaertner-Rommel, A., & Milting, H. (2018). Molecular insights into cardiomyopathies associated with desmin (DES) mutations. *Biophys Rev*, *10*(4), 983-1006. doi:10.1007/s12551-018-0429-0
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*, *34*(3), 597-601. doi:10.1677/jme.1.01755

- Carra, S., Alberti, S., Arrigo, P. A., Benesch, J. L., Benjamin, I. J., Boelens, W., . . . Tanguay, R. M. (2017). The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. *Cell Stress Chaperones*, 22(4), 601-611. doi:10.1007/s12192-017-0787-8
- Chen, R.-H., Chen, Y.-H., & Huang, T.-Y. (2019). Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 80. doi:10.1186/s12929-019-0569-y
- Chevessier, F., Schuld, J., Orfanos, Z., Plank, A. C., Wolf, L., Maerkens, A., . . . Schröder, R. (2015). Myofibrillar instability exacerbated by acute exercise in filaminopathy. *Hum Mol Genet*, 24(25), 7207-7220. doi:10.1093/hmg/ddv421
- Christian Prinz, M. F., Detlef Hering, Dieter Horstkotte, Lothar Faber. (2011). Diagnostik und Therapie bei hypertropher Kardiomyopathie. *Deutsches Ärzteblatt*.
- Ciarambino, T., Menna, G., Sansone, G., & Giordano, M. (2021). Cardiomyopathies: An Overview. *Int J Mol Sci*, 22(14). doi:10.3390/ijms22147722
- Collier, M. P., & Benesch, J. L. P. (2020). Small heat-shock proteins and their role in mechanical stress. *Cell Stress Chaperones*, 25(4), 601-613. doi:10.1007/s12192-020-01095-z
- Cui, Y. (2020). Optimization of blocking conditions for fluorescent Western blot. *Anal Biochem*, 593, 113598. doi:10.1016/j.ab.2020.113598
- Dalkilic, I., Schienda, J., Thompson, T. G., & Kunkel, L. M. (2006). Loss of FilaminC (FLNc) Results in Severe Defects in Myogenesis and Myotube Structure. *Molecular and Cellular Biology*, 26(17), 6522. doi:10.1128/MCB.00243-06
- Deretic, V. (2010). Autophagy in infection. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 252-262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.009>
- Deshmukh, A. S., Steenberg, D. E., Hostrup, M., Birk, J. B., Larsen, J. K., Santos, A., . . . Wojtaszewski, J. F. P. (2021). Deep muscle-proteomic analysis of freeze-dried human muscle biopsies reveals fiber type-specific adaptations to exercise training. *Nat Commun*, 12(1), 304. doi:10.1038/s41467-020-20556-8
- Diofano, F., Weinmann, K., Schneider, I., Thiessen, K. D., Rottbauer, W., & Just, S. (2020). Genetic compensation prevents myopathy and heart failure in an in vivo model of Bag3 deficiency. *PLoS Genet*, 16(11), e1009088. doi:10.1371/journal.pgen.1009088
- Duran, A., Amanchy, R., Linares, Juan F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., . . . Diaz-Meco, Maria T. (2011). p62 Is a Key Regulator of Nutrient Sensing in the mTORC1 Pathway. *Molecular Cell*, 44(1), 134-146. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.038
- Ehsan, M., Jiang, H., K, L. T., & Gehmlich, K. (2017). When signalling goes wrong: pathogenic variants in structural and signalling proteins causing cardiomyopathies. *J Muscle Res Cell Motil*, 38(3-4), 303-316. doi:10.1007/s10974-017-9487-3
- Fang, X., Bogomolovas, J., Trexler, C., & Chen, J. (2019). The BAG3-dependent and -independent roles of cardiac small heat shock proteins. *JCI Insight*, 4(4). doi:10.1172/jci.insight.126464
- Fichna, J. P., Maruszak, A., & Żekanowski, C. (2018). Myofibrillar myopathy in the genomic context. *J Appl Genet*, 59(4), 431-439. doi:10.1007/s13353-018-0463-4
- Fuchs, M., Poirier, D. J., Seguin, S. J., Lambert, H., Carra, S., Charette, S. J., & Landry, J. (2009). Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J*, 425(1), 245-255. doi:10.1042/bj20090907
- Fürst, D. O., Goldfarb, L. G., Kley, R. A., Vorgerd, M., Olivé, M., & van der Ven, P. F. M. (2013). Filamin C-related myopathies: pathology and mechanisms. *Acta neuropathologica*, 125(1), 33-46. doi:10.1007/s00401-012-1054-9
- Gal, J., Ström, A. L., Kwinter, D. M., Kilty, R., Zhang, J., Shi, P., . . . Zhu, H. (2009). Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *J Neurochem*, 111(4), 1062-1073. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06388.x

- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U., & Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO Journal*, 28(7), 889-901. doi:<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.29>
- Gilda, J. E., Ghosh, R., Cheah, J. X., West, T. M., Bodine, S. C., & Gomes, A. V. (2015). Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMS). *PloS one*, 10(8), e0135392-e0135392. doi:10.1371/journal.pone.0135392
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3-12. doi:<https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Goldfarb, L. G., & Dalakas, M. C. (2009). Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest*, 119(7), 1806-1813. doi:10.1172/jci38027
- Gómez, J., Lorca, R., Reguero, J. R., Morís, C., Martín, M., Tranche, S., . . . Coto, E. (2017). Screening of the Filamin C Gene in a Large Cohort of Hypertrophic Cardiomyopathy Patients. *Circ Cardiovasc Genet*, 10(2). doi:10.1161/circgenetics.116.001584
- Grumati, P., & Dikic, I. (2018). Ubiquitin signaling and autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 293(15), 5404-5413. doi:10.1074/jbc.TM117.000117
- Hinton, R. B., & Ware, S. M. (2017). Heart Failure in Pediatric Patients With Congenital Heart Disease. *Circ Res*, 120(6), 978-994. doi:10.1161/circresaha.116.308996
- Höhfeld, J., Benzing, T., Bloch, W., Fürst, D. O., Gehlert, S., Hesse, M., . . . Warscheid, B. (2021). Maintaining proteostasis under mechanical stress. *EMBO Rep*, 22(8), e52507. doi:10.15252/embr.202152507
- Homma, S., Iwasaki, M., Shelton, G. D., Engvall, E., Reed, J. C., & Takayama, S. (2006). BAG3 Deficiency Results in Fulminant Myopathy and Early Lethality. *The American Journal of Pathology*, 169(3), 761-773. doi:10.2353/ajpath.2006.060250
- Igarashi, R., Yamashita, S.-I., Yamashita, T., Inoue, K., Fukuda, T., Fukuchi, T., & Kanki, T. (2020). Gemcitabine induces Parkin-independent mitophagy through mitochondrial-resident E3 ligase MUL1-mediated stabilization of PINK1. *Scientific reports*, 10(1), 1465-1465. doi:10.1038/s41598-020-58315-w
- Iglewski, M., Hill, J. A., Lavandero, S., & Rothermel, B. A. (2010). Mitochondrial Fission and Autophagy in the Normal and Diseased Heart. *Current Hypertension Reports*, 12(6), 418-425. doi:10.1007/s11906-010-0147-x
- Jaffré, F., Miller, C. L., Schänzer, A., Evans, T., Roberts, A. E., Hahn, A., & Kontaridis, M. I. (2019). Inducible Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Reveal Aberrant Extracellular Regulated Kinase 5 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Signaling Concomitantly Promote Hypertrophic Cardiomyopathy in RAF1-Associated Noonan Syndrome. *Circulation*, 140(3), 207-224. doi:10.1161/circulationaha.118.037227
- Jefferies, J. L., Blaxall, B., Towbin, J., & Robbins, J. (2016). *Cardioskeletal Myopathies in Children and Young Adults*. San Diego, UNITED STATES: Elsevier Science & Technology.
- Johansen, T., & Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7(3), 279-296. doi:10.4161/auto.7.3.14487
- Juo, L. Y., Liao, W. C., Shih, Y. L., Yang, B. Y., Liu, A. B., & Yan, Y. T. (2016). HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles. *J Cell Sci*, 129(8), 1661-1670. doi:10.1242/jcs.179887
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., . . . Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *Embo j*, 19(21), 5720-5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720

- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 117(Pt 13), 2805-2812. doi:10.1242/jcs.01131
- Karmouch, J., Protonotarios, A., & Syrris, P. (2018). Genetic basis of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*, 33(3), 276-281. doi:10.1097/hco.0000000000000509
- Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Lüdecke, L., Tapia, V. E., Orfanos, Z., . . . Höhfeld, J. (2017). The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(1), 62-75. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.007>
- Kimura, K., Ooms, A., Graf-Riesen, K., Kuppusamy, M., Unger, A., Schuld, J., . . . Hesse, M. (2021). Overexpression of human BAG3(P209L) in mice causes restrictive cardiomyopathy. *Nat Commun*, 12(1), 3575. doi:10.1038/s41467-021-23858-7
- Klimek, C., Kathage, B., Wördehoff, J., & Höhfeld, J. (2017). BAG3-mediated proteostasis at a glance. *J Cell Sci*, 130(17), 2781-2788. doi:10.1242/jcs.203679
- Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., . . . Zuckerbraun, B. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 8(4), 445-544. doi:10.4161/auto.19496
- Knezevic, T., Myers, V. D., Gordon, J., Tilley, D. G., Sharp, T. E., 3rd, Wang, J., . . . Feldman, A. M. (2015). BAG3: a new player in the heart failure paradigm. *Heart Fail Rev*, 20(4), 423-434. doi:10.1007/s10741-015-9487-6
- Knyazeva, A., Krutikov, A., Golovkin, A., Mishanin, A., Pavlov, G., Smolina, N., . . . Kostareva, A. (2018). Time- and Ventricular-Specific Expression Profiles of Genes Encoding Z-Disk Proteins in Pressure Overload Model of Left Ventricular Hypertrophy. *Front Genet*, 9, 684. doi:10.3389/fgene.2018.00684
- Koch, A., & Singer, H. (2003). Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and adolescents. *Heart*, 89(8), 875-878. doi:10.1136/heart.89.8.875
- Kosaraju, A., Goyal, A., Grigorova, Y., & Makaryus, A. N. (2021). Left Ventricular Ejection Fraction. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Kostera-Pruszczyk, A., Suszek, M., Płoski, R., Franaszczyk, M., Potulska-Chromik, A., Pruszczyk, P., . . . Rędowicz, M. J. (2015). BAG3-related myopathy, polyneuropathy and cardiomyopathy with long QT syndrome. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 36(6), 423-432. doi:10.1007/s10974-015-9431-3
- Kraft, C., Peter, M., & Hofmann, K. (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature Cell Biology*, 12(9), 836-841. doi:10.1038/ncb0910-836
- Kuusisto, E., Suuronen, T., & Salminen, A. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(1), 223-228. doi:10.1006/bbrc.2000.4107
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0
- Law, Y. M., Hoyer, A. W., Reller, M. D., & Silberbach, M. (2009). Accuracy of plasma B-type natriuretic peptide to diagnose significant cardiovascular disease in children: the Better Not Pout Children! Study. *J Am Coll Cardiol*, 54(15), 1467-1475. doi:10.1016/j.jacc.2009.06.020
- Leber, Y., Ruparelia, A. A., Kirfel, G., van der Ven, P. F., Hoffmann, B., Merkel, R., . . . Fürst, D. O. (2016). Filamin C is a highly dynamic protein associated with fast repair of myofibrillar microdamage. *Hum Mol Genet*, 25(13), 2776-2788. doi:10.1093/hmg/ddw135

- Li, A., Gao, M., Liu, B., Qin, Y., Chen, L., Liu, H., . . . Gong, G. (2022). Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Cell Death Dis*, 13(5), 444. doi:10.1038/s41419-022-04906-6
- Li, H., Zhang, L., Zhang, L., & Han, R. (2022). Autophagy in striated muscle diseases. *Front Cardiovasc Med*, 9, 1000067. doi:10.3389/fcvm.2022.1000067
- Lippai, M., & Löw, P. (2014). The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *BioMed Research International*, 2014, 832704. doi:10.1155/2014/832704
- Lipshultz, S. E., Cochran, T. R., Briston, D. A., Brown, S. R., Sambatakos, P. J., Miller, T. L., . . . Wilkinson, J. D. (2013). Pediatric cardiomyopathies: causes, epidemiology, clinical course, preventive strategies and therapies. *Future Cardiol*, 9(6), 817-848. doi:10.2217/fca.13.66
- Lipshultz, S. E., Law, Y. M., Asante-Korang, A., Austin, E. D., Dipchand, A. I., Everitt, M. D., . . . Colan, S. D. (2019). Cardiomyopathy in Children: Classification and Diagnosis: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 140(1), e9-e68. doi:10.1161/cir.0000000000000682
- Liu, L., Sun, K., Zhang, X., Tang, Y., & Xu, D. (2021). Advances in the role and mechanism of BAG3 in dilated cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*, 26(1), 183-194. doi:10.1007/s10741-019-09899-7
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Manley, S., Williams, J. A., & Ding, W.-X. (2013). Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 238(5), 525-538. doi:10.1177/1535370213489446
- Mao, Z., & Nakamura, F. (2020). Structure and Function of Filamin C in the Muscle Z-Disc. *Int J Mol Sci*, 21(8). doi:10.3390/ijms21082696
- Maries, L., & Manitiu, I. (2013). Diagnostic and prognostic values of B-type natriuretic peptides (BNP) and N-terminal fragment brain natriuretic peptides (NT-pro-BNP). *Cardiovasc J Afr*, 24(7), 286-289. doi:10.5830/cvja-2013-055
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., . . . 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(14), 1807-1816. doi:10.1161/circulationaha.106.174287
- Martin, T. G., Myers, V. D., Dubey, P., Dubey, S., Perez, E., Moravec, C. S., . . . Kirk, J. A. (2021). Cardiomyocyte contractile impairment in heart failure results from reduced BAG3-mediated sarcomeric protein turnover. *Nat Commun*, 12(1), 2942. doi:10.1038/s41467-021-23272-z
- Mathew, R., Karp, C. M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H. Y., . . . White, E. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*, 137(6), 1062-1075. doi:10.1016/j.cell.2009.03.048
- McKenna, W. J., Maron, B. J., & Thiene, G. (2017). Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circ Res*, 121(7), 722-730. doi:10.1161/circresaha.117.309711
- Millat, G., Bouvagnet, P., Chevalier, P., Sebbag, L., Dulac, A., Dauphin, C., . . . Rousson, R. (2011). Clinical and mutational spectrum in a cohort of 105 unrelated patients with dilated cardiomyopathy. *European Journal of Medical Genetics*, 54(6), e570-e575. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.07.005>
- Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics*, 14(11), 1037-1053. doi:10.1080/14789450.2017.1388167

- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21(22), 2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542-545. doi:10.4161/auto.4600
- Moreau, K., Luo, S., & Rubinsztein, D. C. (2010). Cytoprotective roles for autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 206-211. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.002>
- Morita, H., Rehm, H. L., Menesses, A., McDonough, B., Roberts, A. E., Kucherlapati, R., . . . Seidman, C. E. (2008). Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. *N Engl J Med*, 358(18), 1899-1908. doi:10.1056/NEJMoa075463
- Nakamura, F., Song, M., Hartwig, J. H., & Stossel, T. P. (2014). Documentation and localization of force-mediated filamin A domain perturbations in moving cells. *Nature Communications*, 5(1), 4656. doi:10.1038/ncomms5656
- Nakaso, K., Yoshimoto, Y., Nakano, T., Takeshima, T., Fukuhara, Y., Yasui, K., . . . Nakashima, K. (2004). Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: possible mechanisms and the role in Lewy body formation in Parkinson's disease. *Brain Res*, 1012(1-2), 42-51. doi:10.1016/j.brainres.2004.03.029
- Ni, D., Xu, P., & Gallagher, S. (2016). Immunoblotting and Immunodetection. *Curr Protoc Immunol*, 114, 8.10.11-18.10.36. doi:10.1002/cpim.10
- Nicin, L., Abplanalp, W. T., Schänzer, A., Sprengel, A., John, D., Mellentin, H., . . . Dimmeler, S. (2021). Single Nuclei Sequencing Reveals Novel Insights Into the Regulation of Cellular Signatures in Children With Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, 143(17), 1704-1719. doi:10.1161/circulationaha.120.051391
- Norton, N., Li, D., Rieder, Mark J., Siegfried, Jill D., Rampersaud, E., Züchner, S., . . . Hershberger, Ray E. (2011). Genome-wide Studies of Copy Number Variation and Exome Sequencing Identify Rare Variants in *BAG3* as a Cause of Dilated Cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 88(3), 273-282. doi:10.1016/j.ajhg.2011.01.016
- Pattingre, S., & Turtoi, A. (2022). BAG Family Members as Mitophagy Regulators in Mammals. *Cells*, 11(4). doi:10.3390/cells11040681
- Perng, M. D., Cairns, L., van den IJssel, P., Prescott, A., Hutcheson, A. M., & Quinlan, R. A. (1999). Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *Journal of Cell Science*, 112(13), 2099-2112. Retrieved from <https://jcs.biologists.org/content/joces/112/13/2099.full.pdf>
- Pham, T., Tyagi, A., Wang, Y. S., & Guo, J. (2021). Single-cell proteomic analysis. *WIREs Mech Dis*, 13(1), e1503. doi:10.1002/wsbm.1503
- Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Dönnies, P., & Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *Journal of Cell Science*, 128(2), 207-217. doi:10.1242/jcs.146258
- Rauch, J. N., Tse, E., Freilich, R., Mok, S.-A., Makley, L. N., Southworth, D. R., & Gestwicki, J. E. (2017). BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 429(1), 128-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.013>
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., . . . Nordet, P. (1996). Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93(5), 841-842. doi:10.1161/01.cir.93.5.841
- Riley, B. E., Kaiser, S. E., Shaler, T. A., Ng, A. C. Y., Hara, T., Hipp, M. S., . . . Kopito, R. R. (2010). Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress response pathway: a potential role for protein

- aggregation in autophagic substrate selection. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 537-552. doi:10.1083/jcb.201005012
- Rosa, J. P., Raslova, H., & Bryckaert, M. (2019). Filamin A: key actor in platelet biology. *Blood*, 134(16), 1279-1288. doi:10.1182/blood.2019000014
- Runwal, G., Stamatakou, E., Siddiqi, F. H., Puri, C., Zhu, Y., & Rubinsztein, D. C. (2019). LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Sci Rep*, 9(1), 10147. doi:10.1038/s41598-019-46657-z
- Rupp, S., Felimban, M., Schänzer, A., Schranz, D., Marschall, C., Zenker, M., . . . Hahn, A. (2019). Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy in children. *Clin Res Cardiol*, 108(3), 282-289. doi:10.1007/s00392-018-1354-8
- Russell, L. K., Mansfield, C. M., Lehman, J. J., Kovacs, A., Courtois, M., Saffitz, J. E., . . . Kelly, D. P. (2004). Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res*, 94(4), 525-533. doi:10.1161/01.Res.0000117088.36577.Eb
- Sabbah, H. N. (2021). Barth syndrome cardiomyopathy: targeting the mitochondria with elamipretide. *Heart Fail Rev*, 26(2), 237-253. doi:10.1007/s10741-020-10031-3
- Savarese, M., Sarparanta, J., Vihola, A., Jonson, P. H., Johari, M., Rusanen, S., . . . Udd, B. (2020). Panorama of the distal myopathies. *Acta Myol*, 39(4), 245-265. doi:10.36185/2532-1900-028
- Schänzer, A., Rupp, S., Gräf, S., Zengeler, D., Jux, C., Akintürk, H., . . . Hahn, A. (2018). Dysregulated autophagy in restrictive cardiomyopathy due to Pro209Leu mutation in BAG3. *Mol Genet Metab*, 123(3), 388-399. doi:10.1016/j.ymgme.2018.01.001
- Schänzer, A., Schumann, E., Zengeler, D., Gulatz, L., Maroli, G., Ahting, U., . . . van der Ven, P. F. M. (2021). The p.Ala2430Val mutation in filamin C causes a "hypertrophic myofibrillar cardiomyopathy". *J Muscle Res Cell Motil*, 42(2), 381-397. doi:10.1007/s10974-021-09601-1
- Singh, S. R., Kadioglu, H., Patel, K., Carrier, L., & Agnetti, G. (2020). Is Desmin Propensity to Aggregate Part of its Protective Function? *Cells*, 9(2). doi:10.3390/cells9020491
- Smith, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*, 1, 41-55. doi:10.1385/0-89603-062-8:41
- Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G., & Sgarbi, G. (2010). Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6), 1171-1177. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.011>
- Solaini, G., & Harris, David A. (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochemical Journal*, 390(2), 377-394. doi:10.1042/BJ20042006
- Stankiewicz, M., Nikolay, R., Rybin, V., & Mayer, M. P. (2010). CHIP participates in protein triage decisions by preferentially ubiquitinating Hsp70-bound substrates. *Febs j*, 277(16), 3353-3367. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07737.x
- Sulkshane, P., Ram, J., Thakur, A., Reis, N., Kleifeld, O., & Glickman, M. H. (2021). Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia. *Redox Biol*, 45, 102047. doi:10.1016/j.redox.2021.102047
- Sweeney, H. L., & Hammers, D. W. (2018). Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(2). doi:10.1101/cshperspect.a023200
- Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D. F., Karbowski, M., & Youle, R. J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol*, 191(7), 1367-1380. doi:10.1083/jcb.201007013

- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., & Kominami, E. (2005). Lysosomal Turnover, but Not a Cellular Level, of Endogenous LC3 is a Marker for Autophagy. *Autophagy*, 1(2), 84-91. doi:10.4161/auto.1.2.1697
- Tannous, P., Zhu, H., Johnstone, J. L., Shelton, J. M., Rajasekaran, N. S., Benjamin, I. J., . . . Hill, J. A. (2008). Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(28), 9745-9750. doi:10.1073/pnas.0706802105
- Tissot, C., Singh, Y., & Sekarski, N. (2018). Echocardiographic Evaluation of Ventricular Function-For the Neonatologist and Pediatric Intensivist. *Frontiers in pediatrics*, 6, 79-79. doi:10.3389/fped.2018.00079
- Tolkovsky, A. M. (2009). Mitophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1793(9), 1508-1515. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.03.002
- Towbin, J. A. (2014). Inherited cardiomyopathies. *Circ J*, 78(10), 2347-2356. doi:10.1253/circj.cj-14-0893
- Ulbricht, A., Eppler, Felix J., Tapia, Victor E., van der Ven, Peter F. M., Hampe, N., Hersch, N., . . . Höhfeld, J. (2013). Cellular Mechanotransduction Relies on Tension-Induced and Chaperone-Assisted Autophagy. *Current Biology*, 23(5), 430-435. doi:10.1016/j.cub.2013.01.064
- Ungelenk, S., Moayed, F., Ho, C.-T., Grousl, T., Scharf, A., Mashaghi, A., . . . Bukau, B. (2016). Small heat shock proteins sequester misfolding proteins in near-native conformation for cellular protection and efficient refolding. *Nature Communications*, 7(1), 13673. doi:10.1038/ncomms13673
- van der Klooster, Z. J., Seppehrkhoy, S., Dooijes, D., Te Rijdt, W. P., Schuiringa, F., Lingeman, J., . . . Vink, A. (2021). P62-positive aggregates are homogenously distributed in the myocardium and associated with the type of mutation in genetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med*, 25(6), 3160-3166. doi:10.1111/jcmm.16388
- van der Ven, P. F., Ehler, E., Vakeel, P., Eulitz, S., Schenk, J. A., Milting, H., . . . Fürst, D. O. (2006). Unusual splicing events result in distinct Xin isoforms that associate differentially with filamin c and Mena/VASP. *Exp Cell Res*, 312(11), 2154-2167. doi:10.1016/j.yexcr.2006.03.015
- Vandekerckhove, J., Bugaisky, G., & Buckingham, M. (1986). Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J Biol Chem*, 261(4), 1838-1843.
- Verdonschot, J. A. J., Merlo, M., Dominguez, F., Wang, P., Henkens, M., Adriaens, M. E., . . . Heymans, S. R. B. (2021). Phenotypic clustering of dilated cardiomyopathy patients highlights important pathophysiological differences. *Eur Heart J*, 42(2), 162-174. doi:10.1093/eurheartj/ehaa841
- Verdonschot, J. A. J., Vanhoutte, E. K., Claes, G. R. F., Helderma-van den Enden, A., Hoeijmakers, J. G. J., Hellebrekers, D., . . . Brunner, H. G. (2020). A mutation update for the FLNC gene in myopathies and cardiomyopathies. *Hum Mutat*, 41(6), 1091-1111. doi:10.1002/humu.24004
- Vidal, R., Wagner, J. U. G., Braeuning, C., Fischer, C., Patrick, R., Tombor, L., . . . Sauer, S. (2019). Transcriptional heterogeneity of fibroblasts is a hallmark of the aging heart. *JCI Insight*, 4(22). doi:10.1172/jci.insight.131092
- Vogiatzi, G., Lazaros, G., Oikonomou, E., Lazarou, E., Vavuranakis, E., & Tousoulis, D. (2022). Role of genetic testing in cardiomyopathies: A primer for cardiologists. *World J Cardiol*, 14(1), 29-39. doi:10.4330/wjc.v14.i1.29
- Wehner, G. J., Jing, L., Haggerty, C. M., Suever, J. D., Leader, J. B., Hartzel, D. N., . . . Fornwalt, B. K. (2020). Routinely reported ejection fraction and mortality in clinical practice: where does the nadir of risk lie? *Eur Heart J*, 41(12), 1249-1257. doi:10.1093/eurheartj/ehz550
- Welsch, U., & Deller, T. (3. Auflage 2010). *Lehrbuch Histologie*: Elsevier GmbH Urban & Fischer.

- Westerlind, A., Wähler, H., Lindstedt, G., Lundberg, P. A., & Holmgren, D. (2004). Clinical signs of heart failure are associated with increased levels of natriuretic peptide types B and A in children with congenital heart defects or cardiomyopathy. *Acta Paediatr*, 93(3), 340-345. doi:10.1080/08035250410022756
- Yang, X., Shi, Y., Zhang, L., Liu, H., Shao, Y., & Zhang, S. (2019). Overexpression of filamin c in chronic intermittent hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis is a potential cardioprotective target for obstructive sleep apnea. *Sleep and Breathing*, 23(2), 493-502. doi:10.1007/s11325-018-1712-9
- Yang, Y., Li, T., Li, Z., Liu, N., Yan, Y., & Liu, B. (2020). Role of Mitophagy in Cardiovascular Disease. *Aging Dis*, 11(2), 419-437. doi:10.14336/ad.2019.0518
- Yerabandi, N., Kouznetsova, V. L., Kesari, S., & Tsigelny, I. F. (2022). The role of BAG3 in dilated cardiomyopathy and its association with Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Acta Myol*, 41(2), 59-75. doi:10.36185/2532-1900-071
- Yoo, S. M., & Jung, Y. K. (2018). A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Mol Cells*, 41(1), 18-26. doi:10.14348/molcells.2018.2277
- Yuan, S. M. (2018). Cardiomyopathy in the pediatric patients. *Pediatr Neonatol*, 59(2), 120-128. doi:10.1016/j.pedneo.2017.05.003
- Yun, J., Puri, R., Yang, H., Lizzio, M. A., Wu, C., Sheng, Z.-H., & Guo, M. (2014). MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin. *eLife*, 3, e01958-e01958. doi:10.7554/eLife.01958
- Zeeck, C. (2013). Western Blot Eine Einführung zu den Prinzipien mit hilfreichen Tipps. Retrieved from <https://docs.abcam.com/pdf/events/German-WB-Webinar-15-Jan.pdf> (abgerufen am 29.03.21)
- Zhai, X., Bai, B., Yu, B., Wang, T., Wang, H., Wang, Y., . . . Zhong, Z. (2015). Coxsackievirus B3 Induces Autophagic Response in Cardiac Myocytes in vivo. *Biochemistry (Mosc)*, 80(8), 1001-1009. doi:10.1134/s0006297915080052
- Zhang, H., Amick, J., Chakravarti, R., Santarriaga, S., Schlanger, S., McGlone, C., . . . Page, Richard C. (2015). A Bipartite Interaction between Hsp70 and CHIP Regulates Ubiquitination of Chaperoned Client Proteins. *Structure*, 23(3), 472-482. doi:<https://doi.org/10.1016/j.str.2015.01.003>
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. A., Tan, Y. S., Baek, J. H., Wesley, J. B., . . . Semenza, G. L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*, 283(16), 10892-10903. doi:10.1074/jbc.M800102200
- Zheng, M., Huang, H., Zhu, X., Ho, H., Li, L., & Ji, X. (2022). Clinical genetic testing in four highly suspected pediatric restrictive cardiomyopathy cases. *BMC Cardiovasc Disord*, 22(1), 240. doi:10.1186/s12872-022-02675-w
- Zhou, Y., Chen, Z., Zhang, L., Zhu, M., Tan, C., Zhou, X., . . . Chen, J. (2020). Loss of Filamin C Is Catastrophic for Heart Function. *Circulation*, 141(10), 869-871. doi:10.1161/circulationaha.119.044061
- Zschirnt, M., Thul, J., Akintürk, H., Valeske, K., Schranz, D., Skrzypek, S., . . . Rupp, S. (2020). Aetiology and 30-Year Long-Term Outcome of Children with Cardiomyopathy Necessitating Heart Transplantation. *J Pers Med*, 10(4). doi:10.3390/jpm10040251

## 12 Anhang

### 12.1 WB-Protokolle

#### 12.1.1 Vorbereiten der Gele

1. Glasplatten mit Ethanol (70 %) reinigen,  
Verwendung von 1,5 mm Abstandshalterplatten und Probenkämme
2. Gele in 50 ml Falcon Rörchen vorbereiten und blasenfrei in Gelschalen pipettieren
3. Für die bestmögliche Darstellung je nach Proteingröße sollten unterschiedlich prozentuierte Gele vorbereitet werden: große Proteine (ca. 100kDa) 8 %, mittelgroße Proteine (ca. 60 kDa) 10 % oder 12 %, kleine Proteine (ca. 20 kDa) 15 % Gele.

#### Zusammensetzung der Trenngele

	1 x	2 x	1 x	2 x	1 x	2 x
Acrylamidgel	8 %	8 %	12 %	12 %	15 %	15 %
Dest. Wasser (ml)	4,65	9,3	3,5	7	2,4	4,8
Lower Puffer (pH8.8)(ml)	2,6	5,2	2,6	5,2	2,6	5,2
30% Acrylamid (ml)	2,7	5,4	4	8	5,03	10,05
10% APS (µl)	100	200	100	200	100	200
TEMED (µl)	5	10	5	10	5	10

4. Bedecken der Gele mit Isopropanol (100 %), bis sie polymerisiert sind
5. Isopropanol abgießen und mit Whatman-Papier das restliche Isopropanol in dem oberen Teil der Gelschale entfernen
6. Sammelgel darauf pipettieren und saubere Probenkämme schnell in das Gel stecken, bevor dieses polymerisiert

### Zusammensetzung der Sammelgele

	1 x	2 x
Acrylamidgel	8 % o. 12 % o. 15 %	8 % o. 12 % o. 15 %
Wasser (ml)	3,05	6,1
Upper Puffer (pH6.8)(ml)	1,3	2,6
30% Acrylamid (ml)	0,65	1,3
10% APS ( $\mu\text{l}$ !!)	50	100
TEMED ( $\mu\text{l}$ !!)	5	10

7. Mindestens 30 min warten für eine vollständige Polymerisation

#### 12.1.2 Proteinkonzentrationsmessungen nach Lowry

1. Elisa-Platte (96er Well) verwenden
2. Alle Messungen in Zweiergruppen doppelt anfertigen und Doppelwert für den reinen Laemmli-Puffer bestimmen (Leerwert)
3. Reagenz S (DC<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent S, Bio-RAD Laboratories) und Reagenz A (DC<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent A, Bio-RAD Laboratories) zusammengeben und vorsichtig mischen:  
Lösung A' = Lösung A 1 ml + Lösung S 20  $\mu\text{l}$
4. Pipettieren von 25  $\mu\text{l}$  Lösung A' in jeden benötigten Well der Elisa-Platte
5. Darauf jeweils 5  $\mu\text{l}$  Proteinlysate bzw. 5  $\mu\text{l}$  Laemmli-Puffer (für den Leerwert) pipettieren
6. Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Reagenz B (DC<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent B, Bio-RAD Laboratories) mit Mehrkanalpipette
7. 15 min Inkubationszeit im Dunkeln bei RT
8. Messen der Proteinkonzentration mit einem Plattenleser (z.B. TriStar LB 941); Wellenlänge von 750 nm

#### 12.1.3 Vorbereitung der Proteinlysate

1. Probenpuffer vorbereiten (kurz vor Gebrauch):  
800  $\mu\text{l}$  Probenpuffer 4 x + 200  $\mu\text{l}$  1 % Bromphenolblau + 50  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol
2. 1 Teil Probenpuffer mit 3 Teilen Proteinlysate zusammengeben

Bis zur Verwendung bei -20 °C lagern

3. **Denaturieren der Proben** für 5 min bei 95 °C direkt vor dem Beladen

#### 12.1.4 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese

1. Vorbereiten von 1 x Laufpuffer aus 10 x Laufpuffer, für eine Gelkammer (2 Gele) 1100 ml und für beide Gelkammern (4 Gele) 2000 ml 1 x Laufpuffer verwenden
2. Laufpuffer bis zur Markierung auffüllen, muss **innerhalb** der Gelkammern bis zum oberen Rand aufgefüllt werden
3. Probenkämme der Gele im Laufpuffer herausnehmen und ggf. Taschen reinigen
4. Proteinmarker (=Größenstandard) 7 µl und Proteinproben (nach der Proteinkonzentrationsmessungs-Kalkulationstabelle) vorsichtig in die Geltaschen pipettieren, **die gleiche Proteinmenge** z.B. 30 µg für alle Proteinproben verwenden
5. Gelelektrophorese mit 80 V starten und auf 130 V hochdrehen, wenn die Proben im Trenngel sind
6. Proteine ungefähr 1 bis 2 Std wandern lassen und die Gelelektrophorese rechtzeitig stoppen, wenn das Gel durchlaufen wurde

#### 12.1.5 Übertragung (Blotting) auf die Trägermembran - Wet-Blotting-Verfahren

1. PVDF-Membran und *Whatman*-Papier zuschneiden (6 für jede Membran: 3 für die Oberseite, 3 für die Unterseite): **5,5\*8,5 cm<sup>2</sup>**
2. 1x Wet-Transferpuffer ansetzen:
  - 50 ml (25 ml für 2 Gele) Transferpuffer 10 x für 4 Gele
  - 100 ml (50 ml für 2 Gele) Methanol (Reagenzienqualität)
  - 350 ml (175 ml für 2 Gele) destilliertes Wasser
3. Gele aus Gelelektrophoresesystem herausnehmen und Sammelgel entfernen
4. Äquilibrieren des *Whatman*-Papiers und des Gels in 1 x Transferpuffer für ca. 15 min
5. Äquilibrieren der PVDF-Membran in Methanol für 1 min
6. Gel-Membran-Filterpapier-Sandwich im 1 x Wet-Transferpuffer herstellen:  
3 x *Whatman*-Papier (Filterpapier), Membran, Gel und wieder 3 x *Whatman*-Papier; Gel und Membran möglichst passgenau aufeinander fixieren

7. Gel-Membran-Filterpapier-Sandwich eingebettet in 2 Vlies in eine Transfer-Kassette einlegen
8. Zum Errichten der Transferzelle sind die Kassetten im Transfer-Tank (1 - 2 Transfer-Kassetten pro Tank) zu platzieren, Gel soll in Richtung Kathode und die Membran in Richtung Anode zeigen
9. 1 x Wet-Transferpuffer in die Transfer-Tanks geben und als Schutz vor Überhitzung: Kühlakku und Magnetrührer
10. Stromversorgung anschließen: Bei einem Transfer-Tank (1 - 2 Gele) 250 mA und bei zwei Transfer-Tanks (3 - 4 Gele) 500 mA für 2 Std anlegen
11. Membran herausnehmen
12. **Blocken** der Membran mit einer Blocklösung (5 % Milchpulver-Lösung oder 1 % BSA-Lösung) mindestens 1 Std bei RT auf einem Wippschüttler

#### 12.1.6 Antikörper-Inkubation

1. **Inkubieren des Primärantikörpers** in Blocklösung (5 % Milchpulver-Lösung) über Nacht bei 4 °C auf einem Wippschüttler (nicht mehr als 5 ml verwenden)
2. Membranen 3 – 4 x 15 min bei RT mit Waschpuffer waschen
3. **Inkubieren des Sekundärantikörpers mit Peroxidase** in Blocklösung (5 % Milchpulver-Lösung) mindestens 1 Std auf Wippschüttler bei RT
4. Membranen 3 – 4 x 15 min bei RT mit Waschpuffer waschen
5. Membranen 15 min mit 1 x PBS waschen

#### 12.1.7 Entwicklung und Dokumentation

1. Für die Peroxidase-Reaktion ECL oder ECL-Plus vorbereiten und 2 - 4 ml auf eine Membran (auf einer extra Folie) pipettieren und abdunkeln; 5 min inkubieren

##### ECL-Imager

2. ECL/ ECL-Plus vorsichtig abtropfen lassen und die Membranen auf eine Platte auflegen und mit einer durchsichtigen Folie bedecken
3. Im ECL-Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH) unter der Kamera positionieren; Aufnahmezeit: 45 min

##### Fotochemie

2. Röntgenkassette (CARL ROTH®) mit durchsichtiger Folie auslegen

3. ECL/ ECL-Plus vorsichtig abtropfen lassen und die Membranen in die Folie in der Röntgenkassette legen
4. In einem Dunkelraum die Röntgenfilme (Thermo Scientific) in der Röntgenkassette positionieren und je nach Antikörper unterschiedlich lange einwirken lassen
5. Die Röntgenfilme mit dem Curix 60-Entwickler (AGFA - Healthcare N.V.) entwickeln

#### 12.1.8 Verfahren zum Strippen der Membran

1. Membranen 3 x 10 min mit Waschpuffer waschen
2. Membranen mit Stripping-Puffer 2 x 30 min bei RT auf Wippschüttler inkubieren
3. Membranen 3 x 10 min mit Waschpuffer waschen
4. **Blocken** der Membran mit 5 % Milchpulver-Lösung für 1 Std
5. Antikörper-Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper und Entwickeln nach oben beschriebenem Schema

## 12.2 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen

### **APS 10 %:**

1 g Ammoniumpersulfat zu 10 ml Wasser

### **Bromphenolblau 1 %:**

1 g der in Wasser löslichen Natriumform von Bromphenolblau in 100 ml Wasser;

**Mischen** durch Vortexen bis die Lösung vollständig gelöst ist

### **BSA-Lösung 1 %:**

1 % BSA in Wasch-Puffer

### **Laemmli-Puffer:**

**100 ml**

10 mmol/l Tris-Hydrochlorid pH 7,5 157,6 mg

(M: 157,60 g/mol)

2mmol/l EGTA (M: 380,35 g/mol) 76,07 mg

20 mmol/l Natriumfluorid (41,99 g/mol) 83,98 mg

2 % SDS 2 g in 98 g Puffer

bei Raumtemperatur aufbewahren

### **Laufpuffer 10 x:**

**2 Liter**

0,25 mol/l Tris Base (M: 121,1 g/mol) 60,6 g

1,92 mol/l Glycin (M: 75,07 g/mol) 288 g

1 % SDS 20 g

Wasser hinzufügen bis 2 l;

pH ca. 8,3 (nicht messen)

### **Lower Puffer 4 x:**

**4 °C**

1,5 mol/l Tris Base (M: 121,1 g/mol) 18,17 g

Wasser hinzufügen bis 60 ml

pH 8,8 einstellen (ca. 8 ml 5 mol/l HCl)

0,4 % SDS (20 %) 2 ml

Wasser hinzufügen bis **100 ml**

(1 - 2 Monate bei 4 °C haltbar)

**Milchpulver-Lösung 5 %:**

100 ml Wasch-Puffer + 5 g Milchpulver

**PBS 20 x:**

1 l / 2 l

Natriumchlorid NaCl (M: 58,44 g/mol) 160 g / 320 g

Kaliumchlorid KCl (M: 74,55 g/mol) 4 g / 8 g

Dinatriumhydrogenphosphat Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
wasserfrei (M: 141,96 g/mol) 28,8 g / 57,6 g

Kaliumdihydrogenphosphat KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
(M: 136,09 g/mol) 4,8 g / 9,6 g

Auf 900 ml bzw. 1900 ml mit

Wasser dest. auffüllen, lösen

pH auf 7,4 einstellen, auffüllen auf

1 l bzw. 2 l

**Probenpuffer 4 x:**

40 ml 10 % SDS

16 ml 1 mol/l Tris pH 6,8

20 ml Glycerol 100 %

19 ml dest. Wasser;

Lagerung von jeweils 800 µl bei -20 °C

**Stripping-Puffer mild:**

**100 ml**

200 mmol/l Glycin; pH 2,5 1,5 g

0,05 % Tween 20 50 µl

Lösen Sie Glycin in ca. 70 ml Wasser, stellen Sie den pH-Wert mit 1 mol/l HCl auf 2,5 ein (benötigt 10-15 ml), geben Sie 50 µl Tween 20 hinzu und füllen Sie auf 100 ml auf.

**Transferpuffer-Wet 10 x:**

0,25 mol/l Tris Base (M: 121,1 g/mol)

1,92 mol/l Glycin (M: 75,07 g/mol)

**10 Liter**

303 g

1440 g

Wasser hinzufügen bis 10 l

pH-Wert muss nicht eingestellt werden

**Upper Puffer 4 x:**

0,5 mol/l Tris Base (M: 121,1 g/mol)

4 °C

6,06 g

Wasser hinzufügen bis 50 ml

pH 6,8 einstellen

(ca. 9,5 ml 5 mol/l HCl)

0,4 % SDS (20 %)

2 ml

Wasser hinzufügen bis **100 ml**

(1 - 2 Monate bei 4 °C haltbar)

**Wasch-Puffer:**

1 x PBS und 0,1 % TWEEN® - 20

### 12.3 Verwendete Chemikalien

<b>APS</b>	Ammonium persulfate BioChemica; Firma: AppliChem Panreac ITW Companies, Artikelnummer: A1142
<b>Bromphenolblau</b>	Na-Salz; Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: A512.1
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin, „Albumin Fraktion V endotoxin“; Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: CP84.2
<b>DC-Protein-Reagenzienpaket</b>	Firma: Bio-RAD Laboratories; Artikelnummer: 500-0116; beinhaltet: <b>Reagenz A</b> (DC™ Protein Assay Reagent A), Artikelnummer: Cat. #500-0113; <b>Reagenz B</b> (DC™ Protein Assay Reagent B), Artikelnummer: Cat. #500-0114; <b>Reagenz S</b> (DC™ Protein Assay Reagent S), Artikelnummer: Cat. #500-0115
<b>Dinatriumhydrogenphosphat Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: P030.2
<b>ECL</b>	Pierce™ ECL Western Blotting Substrate; Firma: Thermo Scientific; Artikelnummer: 32106
<b>ECL-Plus</b>	Western Lightning <sup>R</sup> Plus-ECL; Firma: PerkinElmer; Artikelnummer: NEL105001EA
<b>EGTA</b>	Firma: AppliChem Panreac ITW Companies; Artikelnummer: A0878,0100
<b>Entwickler-Substanz (Fotochemie): Unimatic-D</b>	Firma: Calbe Chemie GmbH; Artikelnummer: REF 10091
<b>Entwickler-Substanz (Fotochemie): Unimatic-F</b>	Firma: Calbe Chemie GmbH; Artikelnummer: REF 10094
<b>Ethanol</b>	absolute; Firma: SIGMA-ALDRICH®; Artikelnummer: 32205-1L-M
<b>Glycerin/ Glycerol</b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: 7533.1

<b>Glycin</b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: 3908.2
<b>Kaliumchlorid KCl</b>	Firma: SIGMA-ALDRICH®; Artikelnummer: P9541-500G
<b>Kaliumdihydrogenphosphat KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Firma: MERCK; Artikelnummer: 1.04873.1000
<b>Mercaptoethanol</b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: 4227.3
<b>Methanol</b>	Firma: SIGMA-ALDRICH®; Artikelnummer: 32213-1L-M
<b>Milchpulver</b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: T145.2
<b>Natriumchlorid NaCl</b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: 3957.1
<b>Natriumfluorid</b>	Firma: MERCK; Artikelnummer: 1.06449.0250
<b>Ponceau S-Lösung</b>	0,1 % Ponceau + 5 % acetic acid; Firma: Sigmaaldrich; Artikelnummer: P-7170
<b>Proteinmarker</b>	PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Firma: Thermo-Scientific; Artikelnummer: 26617
<b>Proteinmarker oberer Wertbereich</b>	Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder; Firma: Thermo-Scientific; Artikelnummer: 26625
<b>Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1)</b>	Gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 30 % Acrylamidstamm-Lösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1; Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: 3029.1
<b>Salzsäure/ HCl</b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: T134.1
<b>SDS</b>	ultra-pure, ≥99,5 %; Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: 2326.2
<b>TEMED</b>	Firma: AppliChem Panreac ITW Companies; Artikelnummer: A1148,0100
<b>Tris-Base</b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: 4855.2
<b>Tris-Hydrochlorid</b>	Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: 9090.3
<b>TWEEN®-20 for molecular biology</b>	Firma: PanReac AppliChem ITW Reagents; Artikelnummer: A4974,0100

<b>2-Propanol</b>	Firma: SIGMA-ALDRICH®; Artikelnummer: 33539-2,5L-M
-------------------	---

#### 12.4 Verwendete Geräte, Softwares und Verbrauchsmaterialien

<b>AccuBlock™</b>	Digital Dry Bath, Firma: Labnet International Inc.
<b>BD Falcon™ Tubes</b>	Firma: BD Biosciences; Artikelnummer: 352054
<b>CELLSTAR® TUBES - 15ml</b>	Firma: greiner bio-one; Artikelnummer: 188 271
<b>CELLSTAR® TUBES - 50ml</b>	Firma: greiner bio-one; Artikelnummer: 227 261
<b>Curix 60-Entwickler</b>	Firma: AGFA - Healthcare N.V.; Artikelnummer: 9462/106
<b>Dispergier-Gerät</b>	T10 basic ULTRA-TURRAX; Firma: IKA; Artikelnummer: 3420000
<b>ECL-Imager</b>	ChemoCam; Firma: Intas Science Imaging Instruments GmbH; Artikelnummer: CC5590; <b>Computer-Programm: Chemostar</b>
<b>Elisa-Platte</b>	MICROPLATE 96er Well, Firma: greiner bio-one, Artikelnummer: 655101
<b>GraphPad Prism</b>	Prism 9 for macOS, Version 9.3.1 (350)
<b>Homogenisator</b>	Precellys 24 lysis & homogenization; Firma: Bertin Instruments; Artikelnummer: P000669-PR240-A
<b>Homogenisator-Keramik-Kügelchen</b>	„Bulk Beads for 500 preps“, 1,4mm Zirconium oxide beads (325g), precellys; Firma: Bertin Technologies; Artikelnummer: KT03961-1-103.BK
<b>ImageJ</b>	Name: ImageJ.app, Version: 1.51
<b>Magnetrührer</b>	MR Hei-Mix S; Firma: Heidolph
<b>Mikroröhre 2ml mit Verschluß für Homogenisator</b>	Firma: SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co; Artikelnummer: 72.694
<b>Mini-PROTEAN® Tetra System</b>	Firma: Bio-RAD; Artikelnummer: 1658006FC

<b>Mini Trans Blot Module für Wet-Transfer</b>	Firma: Bio-RAD; Artikelnummer: 1703935
<b>PVDF- Membran</b>	Firma: Thermo-Scientific; Artikelnummer: #88518
<b>Pipette - PIPETBOY 2</b>	Firma: INTEGRA; Artikelnummer: 155000
<b>Pipette - Pipetman 2µl</b>	Firma: GILSON®; Artikelnummer: F144801
<b>Pipette - Pipetman 10µl</b>	Firma: GILSON®; Artikelnummer: F144802
<b>Pipette - Pipetman 20µl</b>	Firma: GILSON®; Artikelnummer: F123600
<b>Pipette - Pipetman 100µl</b>	Firma: GILSON®; Artikelnummer: F123615
<b>Pipette - Pipetman 200µl</b>	Firma: GILSON®; Artikelnummer: F123601
<b>Pipette - Pipetman 1000µl</b>	Firma: GILSON®; Artikelnummer: F123602
<b>Pipette - Research plus 200µl, Mehrkanalpipette</b>	Firma: Eppendorf; Artikelnummer: 3122000051
<b>Pipette Serological; sterile</b>	CELLSTAR®; Firma: greiner bio-one; Artikelnummer: 607 180
<b>Pipettenspitzen epT.I.P.S.® Standard/Bulk 2 - 200µl</b>	Firma: Eppendorf AG; Artikelnummer: 0030 000.870
<b>Pipettenspitzen Gel-Saver II Tip - 200µl</b>	Firma: STAR LAB; Artikelnummer: I1022-0000
<b>Pipettenspitzen - 20µl farblos</b>	Firma: SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co; Artikelnummer: 70.1114
<b>Pipettenspitzen - 200µl gelb</b>	Firma: SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co; Artikelnummer: 70.760.012
<b>Pipettenspitzen - 1000µl blau</b>	Firma: SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co; Artikelnummer: 70.762.010
<b>Plattenleser</b>	TriStar LB941; Firma: Berthold Technologies; Artikelnummer: TriStar LB 941; Programm: MikroWin2010
<b>Reagiergefäß - 1,5ml SafeSeal</b>	Firma: SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co; Artikelnummer: 72.706.400
<b>Reagiergefäß - 2,0ml SafeSeal</b>	Firma: SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co; Artikelnummer: 72.695.400

<b>Röntgenfilme</b>	CL-Xposure™ Film; 18 x 24 cm; Firma: Thermo Scientific; Artikelnummer: 34089
<b>Röntgenkassette</b>	18x24cm; Firma: CARL ROTH®; Artikelnummer: X265.1
<b>Schüttel- und Mischgerät</b>	Duomax 1030; Firma: Heidolph
<b>Stromgerät</b>	MP-3AP; Firma: Major Science
<b>Ultraschall Sonifier</b>	Firma: Sonoplus Bandelin; Artikelnummer: 3665
<b>Vortexmischer</b>	IKA® MS 3 basic; Firma: IKA®-Works Wilmington Inc.; Artikelnummer: NC28405
<b>Whatman™ Gel Blot paper</b>	GB003; Firma: GE Healthcare Life Sciences; Artikelnummer: 10426892
<b>Zentrifuge</b>	Heraeus Fresco 17 Zentrifuge; Firma: Thermo Scientific

## 13 Publikationsnachweis

Teile der Doktorarbeit wurden publiziert und auf Fachtagungen vorgestellt:

### Originalartikel:

Anne Schänzer, **Elisabeth Schumann**, Diana Zengeler, Lisann Gulatz, Giovanni Maroli, Uwe Ahting, Anke Sprengel, Sabine Gräf, Andreas Hahn, Christian Jux, Till Acker, Dieter O. Fürst, Stefan Rupp, Julia Schuld, Peter F. M. van der Ven: The p.Ala2430Val mutation in filamin C causes a "hypertrophic myofibrillar cardiomyopathy". *Journal of Muscle Research and Cell Motility* (42) 2021, 381-397, doi.org/10.1007/s10974-021-09601-1

### Abstracts und Fachtagungen:

**E. Schumann**, L. Gulatz, D. Zengeler, Sabine Gräf, S. Rupp, A. Schänzer: Gestörte kardiale Autophagie bei einer Kardio-Skelettalen Myofibrillären Myopathie im Kindesalter aufgrund einer BAG3 (Pro209Leu) Mutation, 24. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V., Göttingen, Session: ePoster-Sitzung V "Muskeldystrophien und Myotone Dystrophien" 10.05.2019, *Nervenheilkunde* 2019, 38 (05): 305, DOI:10.1055/s-0039-1685097

A. Schänzer, **E. Schumann**, D. Zengeler, J. Schuld, L. Gulatz, G. Maroli, S. Gräf, U. Ahting, A. Hahn, A. Nemeth, D. Fürst, S. Rupp, P. van der Ven: P.81 Mutation in Z-disk associated protein filamin C (p.Ala2430Val) causes myofibrillar hypertrophic cardiomyopathy, Abstract, *Neuromuscular Disorders* 2019, Volume 29, Supplement 1, 64, DOI:https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.06.110

**Elisabeth Schumann**, Anne Schänzer, Diana Zengeler, Lisann Gulatz, Giovanni Maroli, Uwe Ahting, Anke Sprengel, Sabine Gräf, Andreas Hahn, Christian Jux, Till Acker, Dieter O. Fürst, Stefan Rupp, Julia Schuld, Peter F. M. van der Ven: The p.Ala2430Val mutation in the Z-disc and intercalated disc protein filamin C causes a hypertrophic "myofibrillar cardiomyopathy" (Kurzvortrag), Science Day 2019 der Justus-Liebig-Universität Gießen am 01.11.2019 in Gießen

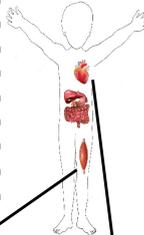
## Gestörte kardiale Autophagie bei einer Kardio-Skelettalen Myofibrillären Myopathie im Kindesalter aufgrund einer BAG3 (Pro209Leu) Mutation

E. Schumann<sup>1</sup>, L. Gulatz<sup>1</sup>, D. Zengeler<sup>3</sup>, Sabine Gräf<sup>1</sup>, S. Rupp<sup>2</sup>, A. Schänzer<sup>1</sup>

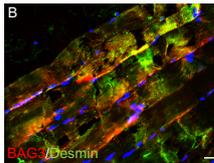
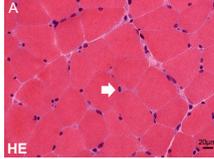
<sup>1</sup>Institut für Neuropathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, 35392 Gießen, <sup>2</sup>Kinderkardiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, 35392 Gießen, <sup>3</sup>CeGaT GmbH, 72076 Tübingen

**Einführung:** Herzmuskel und Skelettmuskel zeigen im Aufbau viele Gemeinsamkeiten (Abb.1). Daher gibt es Erkrankungen, bei denen Herz- und Skelettmuskel betroffen sind (Kardio-Skelettale Myopathien).

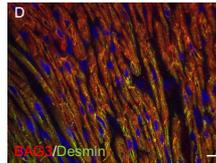
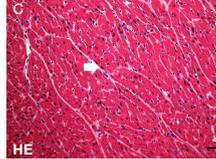
Physiologisch kommt es in der quergestreiften Muskulatur bei Muskelkontraktion zur Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen, welche durch Autophagieprozesse abgebaut werden. BAG3 ist an den Z-Scheiben lokalisiert (Abb.1 B, D) und ein wichtiger Ko-Faktor dieser Chaperon-unterstützten selektiven Autophagie (CASA) von fehlgefalteten Proteinen in quergestreiften Muskelzellen. Mutationen im BAG3 Gen können zu einer Myofibrillären Myopathie (MFM) mit Ablagerungen von Z-Band Proteinen in der Muskelzelle im Kindes- und Erwachsenenalter führen.



### Skelettmuskel

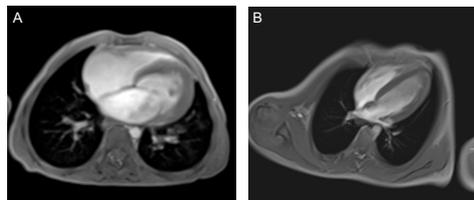


### Herzmuskel



**Abb. 1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der quergestreiften Muskulatur Skelettmuskel (A, B) und Herzmuskel (C, D), Zellkerne (◆)**  
HE-gefärbte Kryostatanschnitte (A, C) quer angeschnittener Muskelfasern mit randständigem Zellkern im Skelettmuskel und zentralständigem Zellkern im Herzmuskel, Doppelimmunfluoreszenzfärbung (B, D) mit Antikörpern gegen BAG3 und Desmin zeigt eine Ko-Lokalisation auf den Z-Bändern und im Herzen zusätzlich auf den Glanzstreifen.

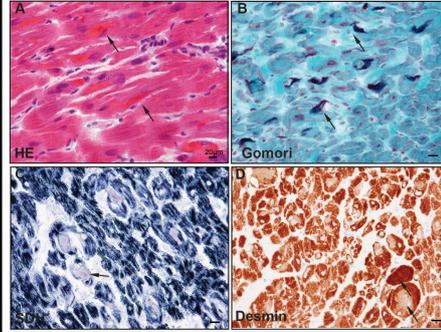
**Material und Methoden:** Ein Kind entwickelte eine restriktive Kardiomyopathie (RCM) (Abb. 2) aufgrund einer Mutation im BAG3-Gen (Pro209Leu). Der Junge ist das zweite Kind gesunder, nicht-konsanguiner Eltern. Da sich die körperliche Ausdauer des Patienten nach der Herztransplantation im Alter von 8 Jahren nicht wie erwartet verbesserte und die nächtliche Hypoventilation mit respiratorischer Insuffizienz anhielt, wurde daraufhin eine neurologische Untersuchung durchgeführt, die eine leichte Skoliose und proximale Muskelschwäche zeigte. Die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten ein myopathisches Muster und Zeichen einer demyelinisierenden/ axonalen Polyneuropathie. Wir untersuchten Gewebe aus dem explantierten Herzen (HTX) im Vergleich zu HTX-Gewebe von 3 Kontrollen: Hypoplastisches Linksherz (C1), Unterbrochener Aortenbogen Typ A (C2), Abstoßungsreaktion nach HTX (C3) und einem Patienten mit einer FLNC-Mutation.



**Abb. 2: Kardiales MRT** des Kindes mit BAG3 Mutation zeigt eine ausgeprägte Kardiomyopathie mit Verdickung der Ventrikelwand (A) im Vergleich zu einem gesunden Kind (B)

**Zusammenfassung:** Eine Mutation im BAG3-Pro209Leu ist assoziiert mit einer Kardio-Skelettalen Myopathie im Kindesalter, wobei die Kardiomyopathie im Vordergrund steht. Eine gestörte Autophagie trägt vermutlich zur Entwicklung der ausgeprägten Kardiomyopathie bei.

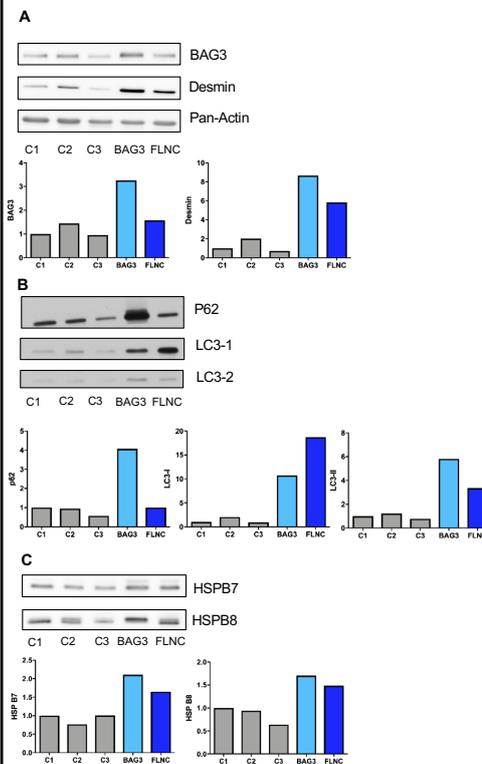
**Ergebnisse:** Das kardiale Gewebe zeigt morphologische Veränderungen einer Kardiomyopathie (Abb. 3A) mit Akkumulation von Z-Band Proteinen (B, C, D) vereinbar mit einer MFM.



**Abb. 3 Histologische Untersuchungen des Herzmuskels des Patienten mit BAG3 (Pro209Leu)-Mutation:** Intrazytoplasmatische Proteinaggregate sind in den enzymatischen Färbungen (A, B, C) und in der Immunhistochemie (D) sichtbar. Antikörper gegen Desmin zeigen positive und negative Einschlüsse (D).

**Western Blot (WB) Analysen:** BAG3 und Desmin sind wichtige Strukturproteine der Muskelfasern und sind bei MFM in den Zellen aggregiert. BAG3 spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Makroautophagie (CASA) in Abhängigkeit der Chaperone HSPB7 und HSPB8. p62 und LC3 können eine gesteigerte oder gestörte Autophagie anzeigen. Von LC3 gibt es 2 Formen LC3-I (im Zytoplasma) und LC3-II (membranegebunden), wobei eine Erhöhung von LC3-II auf vermehrte Autophagosomen hinweist. Die WB Analysen des Herzwesens des Patienten im Vergleich zu den Kontrollen zeigen eine Hochregulation von BAG3 und Desmin (Abb. 4A), von p62, LC3 I und II (Abb. 4B) und von HSPB7 und HSPB8 (Abb. 4C). Bei dem Patienten mit der FLNC-Mutation sind vor allem LC3-1 und Desmin hochreguliert.

### Abb. 4



Mit freundlicher  
Unterstützung von:



## The p.Ala2430Val mutation in filamin C causes a "hypertrophic myofibrillar cardiomyopathy"

Anne Schänzer<sup>1</sup> · Elisabeth Schumann<sup>1</sup> · Diana Zengeler<sup>2</sup> · Lisann Gulatz<sup>1</sup> · Giovanni Maroli<sup>3</sup> · Uwe Ahting<sup>4</sup> · Anke Sprengel<sup>5</sup> · Sabine Gräf<sup>1</sup> · Andreas Hahn<sup>6</sup> · Christian Jux<sup>5</sup> · Till Acker<sup>1</sup> · Dieter O. Fürst<sup>7</sup> · Stefan Rupp<sup>5</sup> · Julia Schuld<sup>7</sup> · Peter F. M. van der Ven<sup>7</sup>

Received: 3 April 2020 / Accepted: 26 February 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

### Abstract

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) often leads to heart failure. Mutations in sarcomeric proteins are most frequently the cause of HCM but in many patients the gene defect is not known. Here we report on a young man who was diagnosed with HCM shortly after birth. Whole exome sequencing revealed a mutation in the *FLNC* gene (c.7289C > T; p.Ala2430Val) that was previously shown to cause aggregation of the mutant protein in transfected cells. Myocardial tissue from patients with this mutation has not been analyzed before and thus, the underlying etiology is not well understood. Myocardial tissue of our patient obtained during myectomy at the age of 23 years was analyzed in detail by histochemistry, immunofluorescence staining, electron microscopy and western blot analysis. Cardiac histology showed a pathology typical for myofibrillar myopathy with myofibril disarray and abnormal protein aggregates containing BAG3, desmin, HSPB5 and filamin C. Analysis of sarcomeric and intercalated disc proteins showed focally reduced expression of the gap junction protein connexin43 and Xin-positive sarcomeric lesions in the cardiomyocytes of our patient. In addition, autophagy pathways were altered with upregulation of LC3-II, WIPI1 and HSPB5, 6, 7 and 8. We conclude that the p.Ala2430Val mutation in *FLNC* most probably is associated with HCM characterized by abnormal intercalated discs, disarray of myofibrils and aggregates containing Z-disc proteins similar to myofibrillar myopathy, which supports the pathological effect of the mutation.

**Keywords** Filamin C · Hypertrophic cardiomyopathy · Autophagy · Myofibrillar myopathy · BAG3

Julia Schuld and Peter F. M. van der Ven have contributed equally to the manuscript.

✉ Anne Schänzer  
anne.schaenzer@patho.med.uni-giessen.de

- <sup>1</sup> Institute of Neuropathology, Justus Liebig University, Arndstr.16, 35392 Giessen, Germany
- <sup>2</sup> Center for Genomics and Transcriptomics (CeGat) GmbH, Tübingen, Germany
- <sup>3</sup> Department of Cardiac Development and Remodeling, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany
- <sup>4</sup> Institute of Human Genetics, Technical University of Munich (TUM), Munich, Germany
- <sup>5</sup> Pediatric Heart Center, Justus Liebig University, Giessen, Germany
- <sup>6</sup> Department of Child Neurology, Justus Liebig University, Giessen, Germany
- <sup>7</sup> Department of Molecular Cell Biology, Institute for Cell Biology, University of Bonn, Bonn, Germany

### Introduction

Inherited cardiomyopathies (CM) are genetic disorders that can be classified by clinical symptoms and morphological changes. They include dilated cardiomyopathy (DCM), hypertrophic cardiomyopathy (HCM), restrictive cardiomyopathy (RCM), arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) and left ventricular non-compaction cardiomyopathy (LVNC) (Lipshultz et al. 2019; Towbin 2014; Yacoub 2014). Macroscopically, HCM is characterized by left ventricular hypertrophy, and histologically by cardiomyocyte hypertrophy, myofibril disarray and nuclear changes accompanied by interstitial fibrosis and small vessel disease with thickening of smooth muscle cells (Hughes 2004). HCM is the most common form in young children and is associated with a high risk of sudden death, and heart transplantation is often necessary (Lipshultz et al. 2013; McKenna et al. 2017). The most common causes of HCM are mutations in genes encoding

Published online: 12 March 2021

Springer

structural components of the muscle sarcomere and genes causing multisystemic disorders (Ehsan et al. 2017; Force et al. 2010; Rupp et al. 2018). Recent studies identified mutations in *FLNC*, the gene encoding filamin C (FLNc) as an important cause of hypertrophic cardiomyopathy (Begay et al. 2016; Brodehl et al. 2013; Brodehl et al. 2017; Ehsan et al. 2017; Gómez et al. 2017; Valdés-Mas et al. 2014). FLNc is highly expressed in striated muscles, and is involved in mechanical stabilization of the contractile apparatus (Leber et al. 2016; Thompson et al. 2000). FLNc mediates interaction with myotilin (van der Ven et al. 2000b), the striated muscle specific Xin actin-binding repeat-containing proteins (XIRPs) Xin and XIRP2 (van der Ven et al. 2006; Kley et al. 2013a) and many other proteins (for a review see: Mao and Nakamura 2020). In cardiomyocytes FLNc is localized at Z-discs and intercalated discs (IDs) (van der Ven et al. 2000a, 2006). Dependent on the type of mutation, a dysfunction of FLNc can cause skeletal myopathies with or without cardiomyopathy or isolated cardiomyopathy. The initially identified mutations in *FLNC* were associated with myofibrillar myopathy (MFM), a skeletal myopathy characterized by adult onset of proximal muscle weakness accompanied by cardiac abnormalities in one third of the patients. Additional patients with *FLNC* mutations can present distal myopathies, emphasizing the large variability of clinical and genetic phenotypes. Characteristic histological features of skeletal muscle biopsies are disintegration of myofibrils with protein aggregates and Z-disc pathology (Fürst et al. 2013; Gemelli et al. 2019; Kley et al. 2007, 2012, 2013b; Miao et al. 2018; Olivé et al. 2013; Selcen 2011; Zhang et al. 2018). Patient mimicking knock-in mice with altered function of FLNc develop a skeletal myopathy which increases after exercise, underlining the role of FLNc in mechanical stabilization of myofibrils and Z-discs (Chevessier et al. 2015; Schuld et al. 2020). In a zebrafish model, mutation of *FLNC* causes altered sarcomeric structure (Ruparelia et al. 2012). In addition, a distal myopathy without protein aggregates can occur (Duff et al. 2011), demonstrating the high variability in the clinical phenotype of mutations in *FLNC*. *FLNC* mutations can also lead to different type of cardiomyopathies in children and adults. *FLNC*-linked cases of RCM, DCM, HCM and ARVC were described (Ader et al. 2019; Begay et al. 2016; Brodehl et al. 2016, 2017; Cui et al. 2018; Karmouch et al. 2018; Kiselev et al. 2018; Schubert et al. 2018; Valdés-Mas et al. 2014). For a complete list of *FLNC* variations found in the human population see the recent review by Verdonschot et al. (2020). The analyses of myocardial tissue from patients with cardiomyopathy due to *FLNC* mutations revealed a large variability in the morphological phenotype. Dependent on the variant of the mutation, protein aggregates, absence of FLNc at the Z-discs or

a non-specific pathology were observed (Brodehl et al. 2016; Hall et al. 2020; Kiselev et al. 2018; Schubert et al. 2018; Tucker et al. 2017; Valdés-Mas et al. 2014).

The present study reports on a young man with HCM since birth due to a mutation in *FLNC* (c.7289C>T; p.Ala2430Val). This genetic variant of *FLNC* was recently detected in several HCM patients (Gómez et al. 2017; Valdés-Mas et al. 2014). Since myocardial tissue from a patient with this mutation has not been analyzed before, the etiology of the disease is not known. We performed a detailed histological examination of the cardiac muscle and analyzed autophagic pathways to find out if altered autophagy may add to the pathology of this severe form of HCM. We compared the findings with explanted cardiac tissue from young patients: two patients with congenital heart malformation, one patient with rejection reaction and one patient with HCM due to a *BAG3* (p.Pro209Leu) mutation, in which we recently described severe HCM with dysregulated autophagy (Schänzer et al. 2018). Our data show that a detailed analysis of the cardiac tissue might be helpful for a more precise diagnosis and better understanding of the cause of the disease, and to guide genetic analysis. This might eventually lead to new therapeutic strategies.

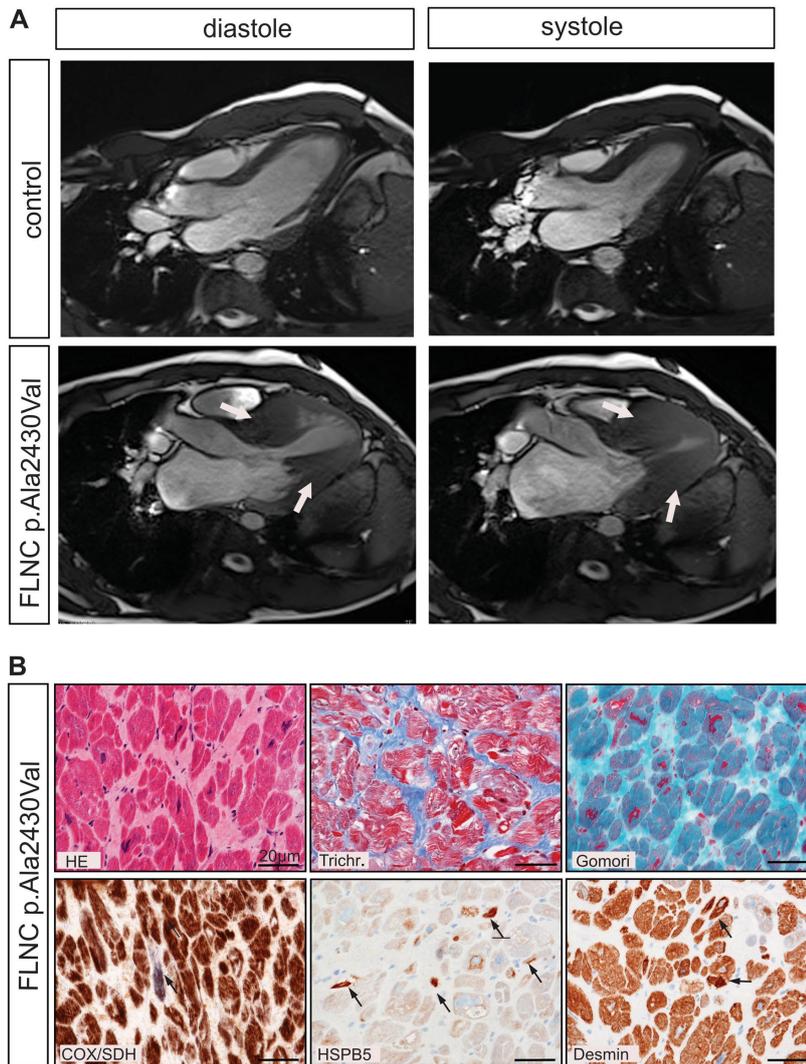
## Methods

### Patient

We report on a young man who was diagnosed with HCM at 1 month of age. A septal myectomy was performed at the age of 23 years and the cardiac tissue was analyzed in detail. For reference, cardiac tissue was obtained from explanted hearts from patients who underwent heart transplantation: a 4-month-old child with hypoplastic left heart syndrome (C1), an 18-month-old child with interrupted aortic arch type A (C2) and a 15-year-old child with acute rejection reaction after heart transplantation at the age of 2 years (C3). In addition, we analyzed myocardial tissue from the explanted heart from an 8-year-old patient with HCM caused by a mutation in *BAG3* (p.Pro209Leu) that we recently described (Schänzer et al. 2018) (Supplemental Table 1).

### Genetic analysis

Genetic analyses of the patient's DNA, extracted from leukocytes via panel diagnostics for known HCM-associated genes, did not identify any mutation. The results of our histological examination stimulated us to perform whole exome sequencing (WES) in order to search pathogenic variants in genes known to be associated with MFM. WES was performed by CeGaT (Center for Genomics and Transcriptomics, Tübingen, Germany). DNA was extracted from cardiac



**Fig. 1** Magnetic resonance imaging reveal indications for HCM in the *FLNC* p.Ala2430Val patient. **a** Diasystolic and systolic magnetic resonance images (MRI) of the heart of the patient at the age of 22 years and an 18-year-old healthy man (control) in the 3-chamber view. In the patient, the left ventricle shows a severe hypertrophy (arrows). Additionally, a left ventricular outflow tract (LVOT) obstruction is present. **b** Histochemical and immunohistochemical analysis of cardiac tissue from our patient obtained during myectomy

from the LVOT at the age of 23 years. The cardiomyocytes showed moderate increased variation of diameter with hypertrophic fibers and fibers with polymorphic nuclei (haematoxylin and eosin, HE). Masson trichrome (Trichr) stain revealed interstitial fibrosis (blue). Gomori trichrome staining did not detect noticeable inclusions. COX/SDH revealed few COX negative fibers (arrow). Immunohistochemical analysis detected pathologic cytoplasmic inclusions containing HSPB5 and desmin in several cardiomyocytes (arrows)

muscle using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Coding and flanking intronic regions were enriched using the Agilent in solution technology and sequenced using the Illumina HiSeq2500/4000 system. Illumina bcl2fastq2 was used to demultiplex sequencing reads. Adapter removal was performed with Skewer. The trimmed reads were mapped to the human reference genome (hg19) using the Burrows Wheeler Aligner. Reads mapping to more than one location with identical mapping score were discarded. Read duplicates that likely result from PCR amplification were removed. The remaining high-quality sequences were used to determine sequence variants (single nucleotide changes and small insertions/deletions). The variants were annotated based on several internal as well as external databases.

### Cardiac muscle analysis

#### Cardiac muscle morphology

Unfixed cardiac tissue was snap frozen and 6 µm cryosections were stained with hematoxylin and eosin (HE), cytochrome oxidase (COX) and succinate dehydrogenase (SDH) and Gomori trichrome. Three µm thick paraffin sections were stained with Masson trichrome. Immunohistochemical analysis was performed on cryosections and paraffin sections using a Bench Mark XT automatic staining platform (Ventana, Heidelberg, Germany) with the primary antibodies listed in Supplemental Table 2. The sections were examined at a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with a CCD camera.

Immunofluorescence staining was performed on cryosections using antibodies listed in Supplemental Table 1 (Fürst et al. 1988; Traub et al. 1994; van der Ven et al. 2000a, 2006). As secondary antibodies goat-anti-mouse IgA-Alexa488 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), goat-anti-mouse IgG1-Cy3, and goat-anti rabbit Ig-Alexa647 (both from Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) were applied.

The sections were mounted with Fluoromount-G mounting medium (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany), and slides were analyzed using a confocal laser scanning microscope (LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany).

#### Transmission electron microscopy (TEM)

Small cardiac tissue samples were fixed with 6% glutaraldehyde/0.4 M phosphate buffered saline (PBS) and processed with a Leica EM TP tissue processor. From the resin embedded tissue 1–2 µm semithin sections were cut and stained with toluidine blue. For electron microscopy, ultrathin

sections were contrasted with 3% lead citrate trihydrate using a Leica EM AC20 automatic contrasting system and the Ultrastain kit II. Sections were examined using a Zeiss EM 109 transmission electron microscope equipped with a Slowscan-2K-CCD camera.

#### Determination of protein expression in heart tissue

Unfixed heart tissue samples were lysed in 10 mM Tris HCl pH 7.5, 2% SDS, 2 mM EGTA, 20 mM NaF and homogenized using a mechanical homogenizer (T10 Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Germany) and a Sonopuls ultrasound sonifier (Bandelin, Berlin, Germany). Protein concentration was determined using the DC protein assay (Bio-Rad, Munich, Germany). Equal total protein amounts (30 µg of each sample) were loaded on an SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF-membrane (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany, #88518) and analyzed using the primary antibodies listed in Supplemental Table 1. Protein amounts were quantified by densitometric measurement of integrated band intensities using ImageJ/Fiji (Schindelin et al. 2012) and normalized to the levels of the house-keeping gene (pan-actin).

#### Analysis of mitochondrial enzyme activities

The activities of citrate synthase and the complexes I (NADH-CoQ reductase), II (succinate CoQ oxidoreductase), II + III (succinate cytochrome *c* reductase) and IV (cytochrome *c* oxidase) were measured using snap frozen cardiac tissue by spectrophotometric analysis. The activities were measured against noncollagen protein (NCP) and the activity of citrate synthase which is taken as mitochondrial marker enzyme.

## Results

### Clinical investigations showed a hypertrophic cardiomyopathy

The patient was the first child of non-consanguineous parents, without any familial history of cardiac disease. At 1 month of age, he presented a systolic heart murmur and echocardiography showed typical features of HCM. At the age of 4 months, a left ventricular outflow tract obstruction was present with a maximum gradient of 36 mm Hg. The progress of the CM was slow until he was 14 years of age. No ventricular tachycardia or syncope occurred. At 21 years of age, an increased gradient in the left ventricular outflow tract (LVOT) was noted (115 mm Hg). Compared

to an 18 year old healthy man, cardiac magnetic resonance images (MRI) of our patient showed a severe left ventricular hypertrophy with a LVOT obstruction (Fig. 1a). Brain derived natriuretic peptide (BNP) was elevated up to 465 pg/ml (norm: 0–29 pg/ml). A resection of muscle mass in the LVOT was performed and the LVOT gradient decreased 15 mm Hg. Skeletal muscles were clinically not involved and were tested by neurological examination and electrophysiological methods. All results were in the normal range. The creatine kinase level was normal. A skeletal muscle biopsy was not performed.

#### Cardiac histology and immunohistochemistry revealed features of a myofibrillar myopathy with protein accumulation

Histological analysis of cardiac tissue of the patient with *FLNC* mutation revealed a slight myocardial hypertrophy (diameter: 10–31  $\mu\text{m}$ ; mean = 17  $\mu\text{m}$ ) (Kunkel et al. 1978) and interstitial fibrosis (Fig. 1b) (Supplemental Table 4). Gomori trichrome staining, which is helpful for detecting myofibrillar disarray and cytoplasmic aggregates in MFMs, revealed no obvious abnormalities, while few isolated fibers were negative upon cytochrome oxidase (COX) staining. Notably, immunohistochemical analysis revealed cytoplasmic inclusions containing HSPB5 and desmin (Fig. 1b). These findings were compared with the patient with the *BAG3* mutation and C3. Both, histochemical and immunohistochemical analysis revealed that the cytoplasmic inclusions were even more frequent and larger in the *BAG3* mutated cardiomyocytes. Such cytoplasmic inclusions were not observed in cardiomyocytes from patient C3 (Supplemental Fig. 1).

#### Whole exome sequencing of the cardiac muscle focusing on MFMs-associated genes reveals an *FLNC* variant prone to aggregation

A genetic analysis of a panel of 28 sarcomeric genes did not reveal an underlying etiology for HCM. The cardiac histology consistent with MFMs, prompted us to perform whole exome sequencing (WES) of cardiac muscle tissue with focus on genes associated with MFMs, and we found the *FLNC* variant c.7289C>T; p.Ala2430Val. No other relevant variations were observed. The complete list of variations is presented as supplementary data (Supplemental Table 3). The mother and a brother, both healthy and without any cardiac symptoms, did not carry the mutation. DNA from the father was not available, which made it impossible to establish whether the mutation is a de novo mutation.

#### Alterations in sarcomeres and intercalated discs in the *FLNC* mutant cardiac tissue

##### *FLNC* mutant cardiomyocytes show disorganized Z-discs

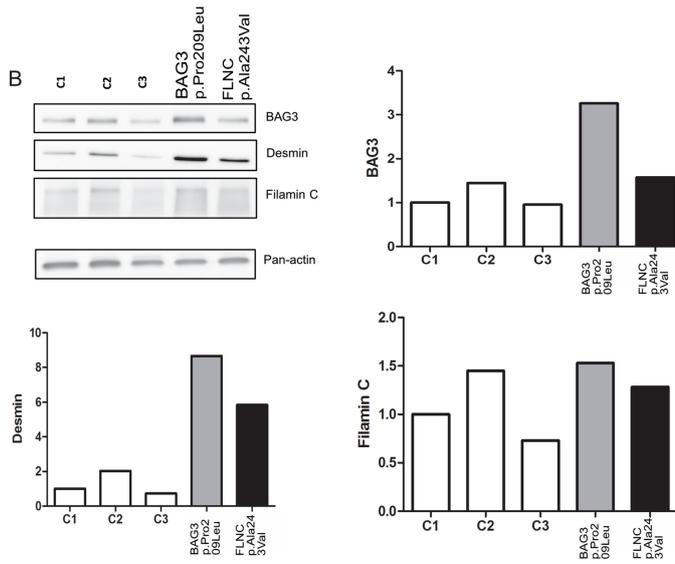
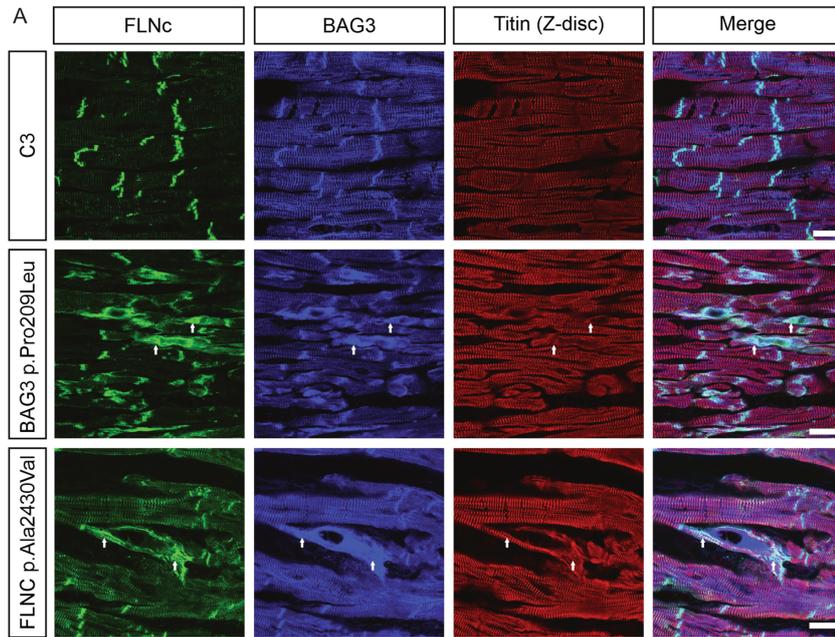
Immunolocalization studies in cardiac tissue from C3 revealed a normal distribution of *FLNC* and *BAG3* in the Z-disc region and IDs. By contrast, cardiomyocytes from the *FLNC* and *BAG3* patients showed a disrupted myofibrillar architecture and a partial colocalization of *FLNC* and *BAG3* in sarcoplasmic inclusions (arrows in Fig. 2a). This pathology was more severe in the cardiomyocytes of the *BAG3* patient: *BAG3* was distributed in an irregular pattern and was partly diminished at the Z-discs. In cardiomyocytes of the *FLNC* patient, *FLNC* staining of the Z-discs appeared stronger (Fig. 2a). Western blots revealed no obvious alteration of *FLNC* expression in cardiac tissue of the *FLNC* patient, pointing to a redistribution of *FLNC*. Likewise, the *FLNC* expression level was not altered in the *BAG3* patient compared to the C1–C3. By contrast, desmin levels were strongly increased in the *FLNC* patient, although to a lower extent than in the *BAG3* patient. When compared to C1–C3, *BAG3* expression was not altered in the *FLNC* patient, but it was lower than in the *BAG3* patient (Fig. 2b).

##### *FLNC* mutant cardiomyocytes contain myofibrillar lesions and *FLNC*- and *Xin*-containing inclusions

Immunolocalization of the muscle damage marker *Xin* in cardiac tissue from C3 showed normal co-expression of *FLNC*, *Xin* and desmin at IDs (Fig. 3). In the *FLNC* mutant tissue *Xin* was focally reduced at the IDs, while also *Xin* containing myofibrillar lesions were observed (Fig. 3). In tissue from the *BAG3* patient *Xin* localization at the IDs was severely altered and many cardiomyocytes contained large aggregates co-expressing *FLNC*, *Xin* and desmin (Fig. 3). Although less frequently, similar abnormalities were also observed in cardiomyocytes from the *FLNC* patient (Fig. 3).

##### Reduced expression of the gap junction protein connexin 43 in *FLNC* mutant cardiac tissue

While the gap junction protein Cx43 and *FLNC* showed a regular colocalization at the IDs in C3, Cx43 was focally reduced in the cardiomyocytes of the *FLNC* and *BAG3* patients, especially in the *FLNC* patient (arrows in Fig. 4). Furthermore, several myofibrillar lesions were observed (arrowheads). In the *BAG3* patient tissue this phenomenon was accompanied by additional irregularities of the IDs (Fig. 4).



**Fig. 2** Immunodetection of FLNc and BAG3 in *FLNC* mutant cardiac tissue. **a** Immunolocalization of FLNc and BAG3 reveal in both, the *FLNC* p.Ala2430Val and *BAG3* p.Pro209Leu patient, disruptions of the myofibrillar architecture that were not observed in C3. Both proteins are partly co-expressed in cytoplasmic inclusions (arrows), with a stronger pathology in the cardiomyocytes of the *BAG3* patient. Note the altered distribution of FLNc with increased expression at the Z-discs in the *FLNC* mutant cardiac tissue. Anti-titin was used to localize Z-discs. Bars: 20  $\mu$ m. **b** Western blot analysis shows that in cardiomyocytes of the *FLNC* patient total levels of BAG3 and FLNc were not altered compared to C1–C3, and lower compared to the *BAG3* patient. Desmin was strongly increased compared to C1–C3, but less prominent than in the *BAG3* patient

#### Ultrastructural analysis reveals myofibrillar disarray with ID and Z-disc pathology in the *FLNC* mutant cardiac tissue

Light microscopy of toluidine blue stained semi thin sections from Epon embedded myocardial tissue from the *FLNC* patient revealed a focal disarrangement of IDs (Fig. 5a). In cross sections a moderately increased variation of cardiomyocyte diameter and some irregularly shaped nuclei were observed (Fig. 5b). Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy of tissue from the *FLNC* patient revealed focally disturbed sarcomeres with partly widened or diminished Z-discs (Fig. 5c, d), while focal accumulation of Z-disc-like material was often observed close to irregular Z-discs (Fig. 5e). The myocardium showed disorganized myofibrils (Fig. 5f) with dilated intermyofibrillar spaces (Fig. 5f) with lipofuscin granules and rough-surfaced endoplasmic reticulum (Fig. 5g). Some mitochondria were swollen and damaged, and had irregular cristae (Fig. 5i). Frequent autophagosomes indicative for enhanced macroautophagy were also observed (Fig. 6j). Furthermore, several IDs were focally disarranged (arrows) (Fig. 5k). Ultrastructural analysis of C3 is shown in Supplemental Figure 2.

#### Altered autophagy in *FLNC* mutant cardiac tissue cardiac tissue

##### Autophagic markers LC3 and WIPI are upregulated in *FLNC* mutant cardiac tissue

Analysis of the cardiac expression of autophagy markers in C3 showed no expression of microtubule-associated protein light chain (LC3), LAMP2 or p62 (Fig. 6a). By contrast, several cardiomyocytes of the *BAG3* and *FLNC* patient contained large LC3-positive inclusions, and increased level of the lysosomal marker LAMP2. In addition, p62-positive inclusions were visible in *FLNC* mutant tissue but less compared to *BAG3* mutant tissue (Fig. 6a). Western blotting revealed (when compared to C1–C3), increased expression of LC3-I in *FLNC* mutant

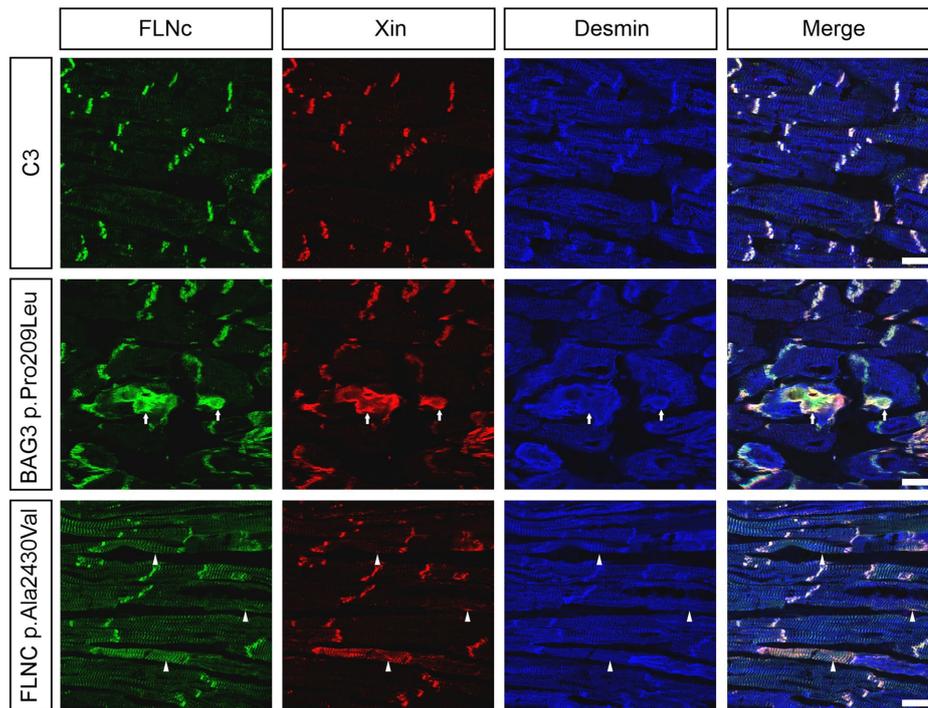
cardiac tissue, and a lower amount of WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1 (WIPI1, a marker of nascent autophagosomes), but not of p62 (Fig. 6b, c). In addition, the level of ubiquitinated proteins was higher in the *FLNC* mutant tissue compared to C1–C3, but lower compared to *BAG3* mutant tissue, suggesting a possible dysfunction of both autophagy and the ubiquitin protease system (UPS) in cardiomyocytes from both patients (Fig. 6b, c).

##### Upregulation of small heat shock proteins HSPB5, HSPB6, HSPB7 and HSPB8 in *FLNC* mutant cardiac tissue

Western blot experiments of small heat shock proteins (sHSPs) showed upregulation of HSPB6, HSPB7 and HSPB8 in the *FLNC* patient compared to C1–C3, whereas the *BAG3*-associated chaperone HSP70 was not altered (Fig. 7a, b). Furthermore, and consistent with the presence of HSPB5 containing aggregates in cardiac sections, HSPB5 was slightly upregulated in the *FLNC* patient compared to C1–C3, but to a lesser extent than in the *BAG3* patient (Fig. 7a, b). These results are consistent with an upregulation of autophagy pathways involving chaperone-mediated autophagy in *FLNC* mutant cardiac tissue.

##### Mitochondrial function is not severely affected in the *FLNC* mutant cardiac tissue

Enzymatic staining revealed few COX negative cardiomyocytes in the *FLNC* mutant heart, suggestive for an impairment of mitochondrial function (Fig. 1b). Analysis of mitophagy quality control markers PINK1 and BNIP3L (also known as NIX), revealed slightly elevated BNIP3L levels in *FLNC* mutant tissue compared to both *BAG3* mutant and C1–C3, indicating disturbed mitophagy. By contrast, PINK1 expression was not altered (Fig. 7b). Mitochondrial markers SOD2 and MUL1 were not changed in the *FLNC* patient, indicating no gross alterations in the number of mitochondria or the presence of dysfunctional mitochondria compared to C1–C3 (Fig. 7d, e). This was confirmed by biochemical analyses of respiratory chain complexes of cardiac tissue from our *FLNC* patient: complex I 0.15 U/U CS activity (normal 0.09–0.22), complex II + III 0.18 U/U CS activity (normal 0.06–0.10) and complex IV 1.69 U/U CS activity (normal 0.6–1.30). Citrate synthase activity (206 U/U gNCP) was not severely altered compared to normal range (250–350 U/U gNCP).



**Fig. 3** Immunolocalization of FLNc, Xin and desmin in cardiac tissue. Cardiac tissue from patient C3 shows co-expression of FLNc with Xin and desmin at the IDs. In tissue from the *BAG3* p.Pro209Leu patient the Xin staining pattern is altered at the IDs and

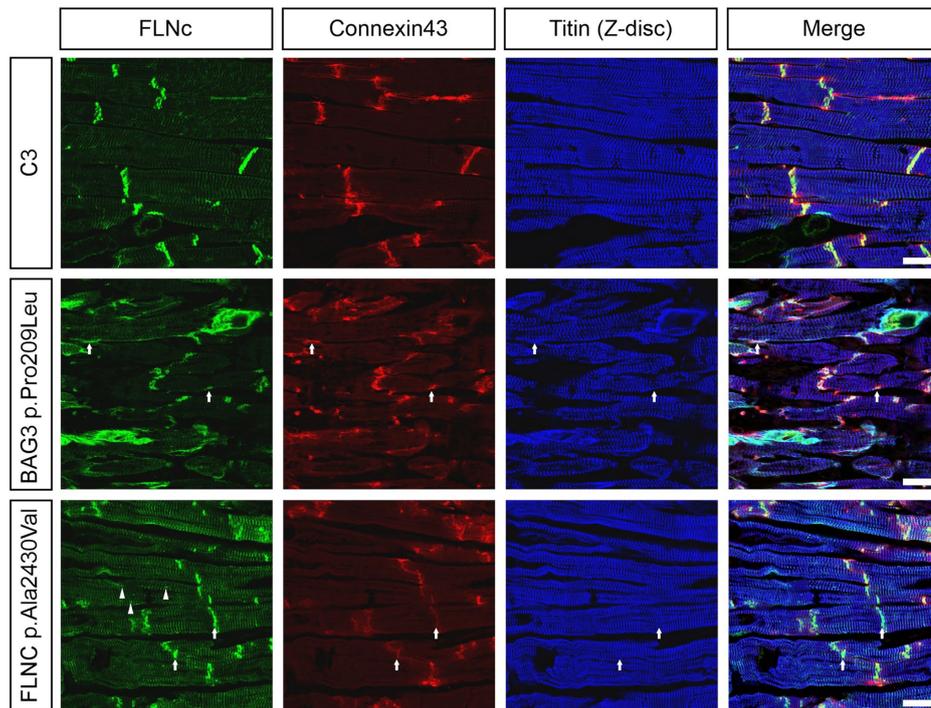
aggregates co-expressing FLNc, Xin and desmin are present (arrows). In the *FLNC* p.Ala2430Val patient tissue Xin is focally reduced at the ID. Furthermore, the protein is localized together with FLNc in sarcomeric lesions (arrowheads). Bars: 20  $\mu$ m

## Discussion

FLNc is the filamin isoform predominantly expressed in striated muscle cells. It is important for normal muscle function by interacting with a plethora of ID, Z-disc and sarcolemmal proteins (Fujita et al. 2012; Fürst et al. 2013). Various mutations in the *FLNC* gene are associated with a broad clinical spectrum of myopathies and cardiomyopathies involving skeletal and/or cardiac muscle (Verdonschot et al. 2020). The complete loss of FLNc protein results in fetal death in mouse embryos and severe cardiomyopathy in adult mice, respectively (Zhou et al. 2020).

The first mutation identified in *FLNC* was shown to cause MFM (Vorgerd et al. 2005). MFMs are mainly caused by mutations in Z-disc-associated proteins and show a high variability of clinical phenotype. Protein aggregates and myofibrillar disarray are morphological

hallmarks (Claeys et al. 2008, 2009; Kley et al. 2016; Schröder and Schoser 2009). A substantial subgroup of patients with MFM due to *FLNC* mutations develop accompanying cardiac abnormalities and cardiomyopathies (Kley et al. 2007). Furthermore, variations in *FLNC* are associated with a variety of cardiomyopathies or sudden cardiac death (Ader et al. 2019; Begay et al. 2016; Cui et al. 2018; Hall et al. 2020). Recently, *FLNC* mutations causing a new form of familial HCM were described (Brodehl et al. 2017; Gómez et al. 2017; Valdés-Mas et al. 2014), but the etiology of the disease remains unclear. In general, truncating mutations that lead to nonsense-mediated decay of the mRNA and haploinsufficiency cause DCM and arrhythmias, while missense variants that lead to misfolding of the protein lead to HCM and cardiomyopathies associated with MFM (reviewed in Verdonschot et al. 2020). Our patient, who developed HCM



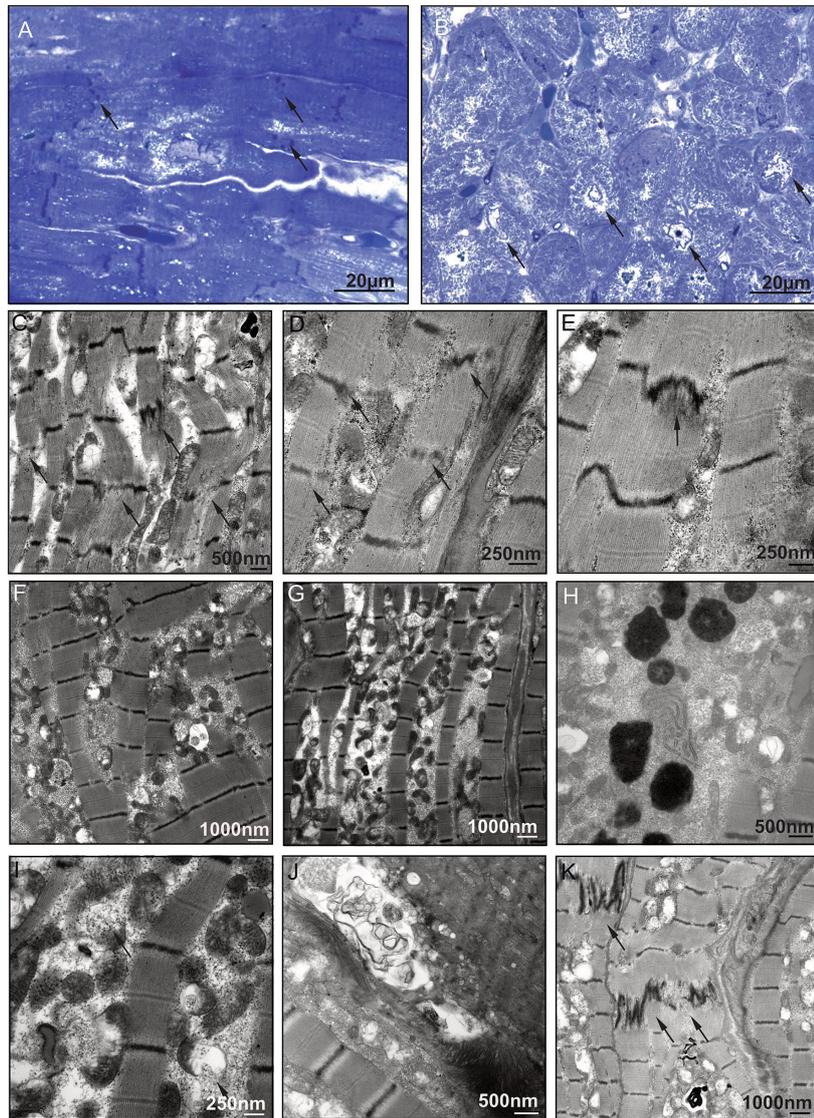
**Fig. 4** Immunolocalization of FLNc and connexin43 in cardiac tissue. Immunofluorescence staining with antibodies against FLNc, Cx43 and a Z-disc epitope of titin of the tissue from C3 shows regular co-expression of Cx43 with FLNc at IDs. In tissue of the *FLNC* p.Ala2430Val patient Cx43 is focally highly reduced (arrows in

center panel). Note the presence of lesions in the *FLNC* patient (arrowheads). In the *BAG3* p.Pro209Leu tissue Cx43 expression is focally reduced with additional irregularity of IDs, while several aggregates co-expressing FLNc and Cx43 occur (arrows in lower panel). Bars: 20  $\mu$ m

shortly after birth, carries a missense mutation in *FLNC* (c.7289C>T; p.Ala2430Val) that was identified before in HCM families. Prediction tools classified this mutation in Ig-like domain 22 as "tolerated" (SIFT), "possibly damaging" (PolyPhen-2) or "deleterious" (Condel) (Gómez et al. 2017; Valdés-Mas et al. 2014). The allele frequency is very low in control cohorts [Human Genome Mutation Database: 0.0002; Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed): 0.00013; The Genome Aggregation Database (gnomAD): 0.00010; NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server 0.00016; Exome Aggregation Consortium (ExAC) 0.00009]. Functional studies showed a clear proneness of the mutant, but not the wildtype protein, to aggregate upon transient expression in muscle cells (Valdés-Mas et al. 2014). This is a strong indication that this variant probably is misfolded. The structure of Ig-like

domain 22 of human FLNc was established by solution NMR by T. Tomizawa et al., and deposited in the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/2D7P>), but not published elsewhere. The domain structure, and analysis by DSSP (Define Secondary Structure of Proteins) (Kabsch and Sander 1983; Touw et al. 2015) indicate a fold typical for Ig-like domains of the filamins with several  $\beta$ -strands forming a  $\beta$ -barrel structure. The p.Ala2430Val mutation is located in the center of  $\beta$ -strand B (Fig. 8a), with the mutated alanine located on the surface of the Ig-like domain (Fig. 8b). Its small, non-polar alanine side chain is well exposed (Fig. 8c), and in the mutant variant the larger hydrophobic side chain of valine might have greater difficulties solubilizing in an aqueous environment.

Although there are many *FLNC*-associated cardiomyopathy patients, reports about cardiomyocyte morphology



are extremely rare. Cardiomyocytes from patients with p.Ala1539Thr or p.Gly2151Ser mutations revealed myofibrillar disarray and protein aggregates (Valdés-Mas et al. 2014). Cytoplasmic inclusions or loss of Z-discs were

described in RCM due to other *FLNC* mutations (Brodehl et al. 2016; Kiselev et al. 2018). The detailed analyses of cardiac morphology in our *FLNC* patient revealed features of MFM with myofibrillar disarray, Z-disc pathology and

**Fig. 5** Alteration of the myocardial structures with Z-disc and ID pathology in cardiac tissue from the *FLNC* p.Ala2430Val patient. **a, b** Semithin sections of Epon embedded myocardial tissue stained with toluidine blue. Shown is a longitudinal (**a**) and a cross section (**b**) with focal disarrangement of IDs (**a** arrows), moderately increased variation of cardiomyocyte diameter and irregularly shaped nuclei (**b** arrows). **c–k**: Transmission electron microscopy of ultrathin sections. Z-discs are focally widened and partly diminished (**c, d** arrows), while Z-disc-like material is often accumulated close to irregularly shaped Z-discs (**e** arrow). Frequent disorganized myofibrils (**f**) with dilated intermyofibrillar spaces (**g**) often contained accumulated lipofuscin granules and rough-surfaced endoplasmic reticulum (**h**), swollen and damaged mitochondria with destroyed cristae (**i** arrows). Frequent autophagosomes indicate enhanced macroautophagy (**j**). IDs often showed a focally disarranged structure (**k** arrows)

protein aggregates containing Z-disc-associated proteins including FLNc, HSPB5, desmin and BAG3 distinctive from other CM. Clinical data and histomorphological features supported the pathological effect of this mutation.

In the human heart a major portion of FLNc is localized in IDs. These structures link neighboring cardiomyocytes to each other and play an important role in transmitting action potentials, chemical signals and mechanical force from cell to cell, thus enabling continuous contractile activity of the heart. IDs contain desmosomes, fascia adherens and gap junctions (Severs 2000). Connexin 43 (Cx43) is a major gap junction protein highly expressed in the heart (Saffitz et al. 2000). Maintenance and sufficient turnover of Cx43 are important for normal cell-to-cell communication. In our *FLNC* patient Cx43 expression was reduced and ID morphology was altered. Even stronger alterations of Cx43 expression were noted in our *BAG3* patient. In line with this, a recent study demonstrated the significance of BAG3 for Cx43 homeostasis and turnover in cardiomyocytes (Ghaseemi Tahrir et al. 2019). Notably, altered Cx43 expression and/or localization were observed before in arrhythmogenic cardiomyopathy patients (Noorman et al. 2013) (Fidler et al. 2009) (Severs et al. 2006) including some patients carrying a mutation in FLNc (Hall et al. 2020). Cardiac tissue from patients with ACM due to *FLNC* mutations also showed other specific changes in the distribution of ID proteins such as desmoplakin and SAP97 that were not observed in patients with different causes of ARVC (Hall et al. 2020).

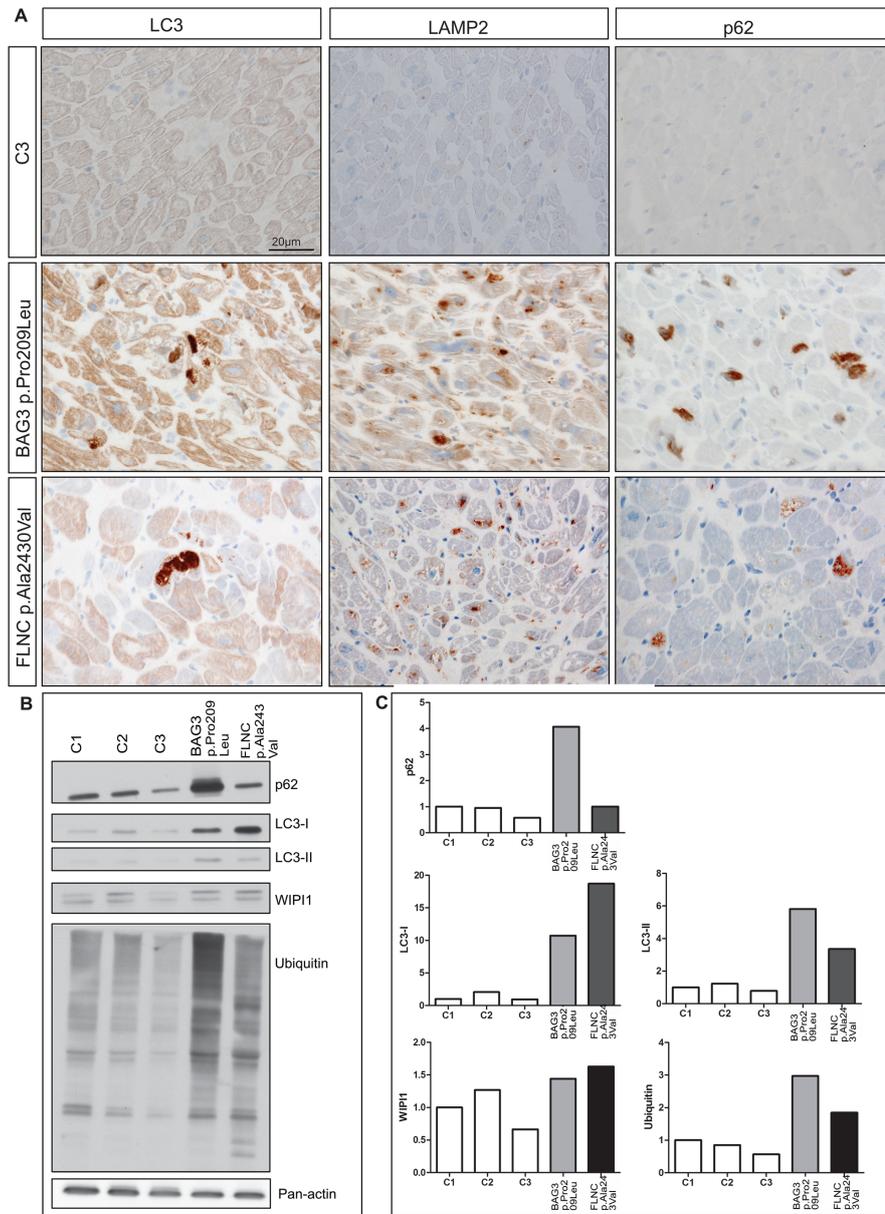
Although the precise biological function of FLNc is not entirely clear, it is plausible that mutant FLNc may influence the mechanical stability of Z-discs and IDs by virtue of its multiple interactions (Fürst et al. 2013; Schuld et al. 2020). Analysis of the structure of the mutation-containing Ig-like domain 22 revealed an exposed localization of the Ala2430 side chain. The larger side chain of valine might result in subtle changes of domain structure or solubility or even ablation of the association with the ligands in this region of the protein such as  $\gamma$ - and  $\delta$ -sarcoglycan, NRAP, calstarcins, titin, IGFN1 or Ky-protein (Baker et al. 2010; Beatham et al.

2004; Labeit et al. 2006; Lu et al. 2003; Thompson et al. 2000), reviewed in (Mao and Nakamura 2020). It cannot be excluded that interaction with other, more aminoterminally or carboxyterminally binding interaction partners such as myotilin (domains 19–21) and the XIRPs (domain 20) is affected.

Among the FLNc interaction partners, Xin and XIRP2 play a role in muscle development and repair (Eulitz et al. 2013). Xin is a biomarker of skeletal and cardiac muscle damage caused by diseases or biomechanical strain (Nilsson et al. 2013). Skeletal muscles of human patients and mouse models with *FLNC* mutation, exhibit Z-disc pathology and myofibrillar lesions, the number and size of which increased upon exercise (Chevessier et al. 2015). Xin-containing lesions were also found in mouse cardiac muscle after aortic banding, indicating that, pressure overload induces cardiac remodeling involving both IDs and sarcomeres (Kebir et al. 2016). The occurrence of Xin-positive lesions in the heart of our *FLNC* patient is in line with these data, and indicates that such lesions can occur in the human heart. Further studies are necessary to investigate whether the reduced Cx43 expression combined with Xin-positive lesions is specific for the *FLNC* p.Ala2430Val mutation or a more general feature of *FLNC*-associated cardiomyopathies or even other hypertrophic cardiomyopathies.

Mechanical strain associated with muscle contractions damages the proteins involved. Damaged proteins are degraded in an ordered manner, mostly by autophagic processes. In the case of FLNc this occurs, at least in part, via CASA (Arndt et al. 2010). Dysregulation of autophagy leads to disturbed cellular functions, and in skeletal muscles to myopathy (Chevessier et al. 2015; Kley et al. 2013b; Ruparelia et al. 2016). Recently, we also detected dysregulated autophagy in the heart of a child with MFM due to a p.Pro209Leu mutation in *BAG3*, a co-chaperone of HSP70 and key regulator of autophagy (Schänzer et al. 2018). In the current report, we show increased expression of LC3 and upregulation of its lipidated form LC3-II. This indicates increased autophagosome formation. This might be the result of their increased production or of blockage of lysosomal fusion (Levine and Kroemer 2008). These phenomena were also found in our *BAG3* patient. The strong upregulation of the ubiquitin binding receptor p62 in this patient was not found in the *FLNC* patient, suggesting that the LC3-independent pathway is less affected in *FLNC* mutated cardiomyocytes.

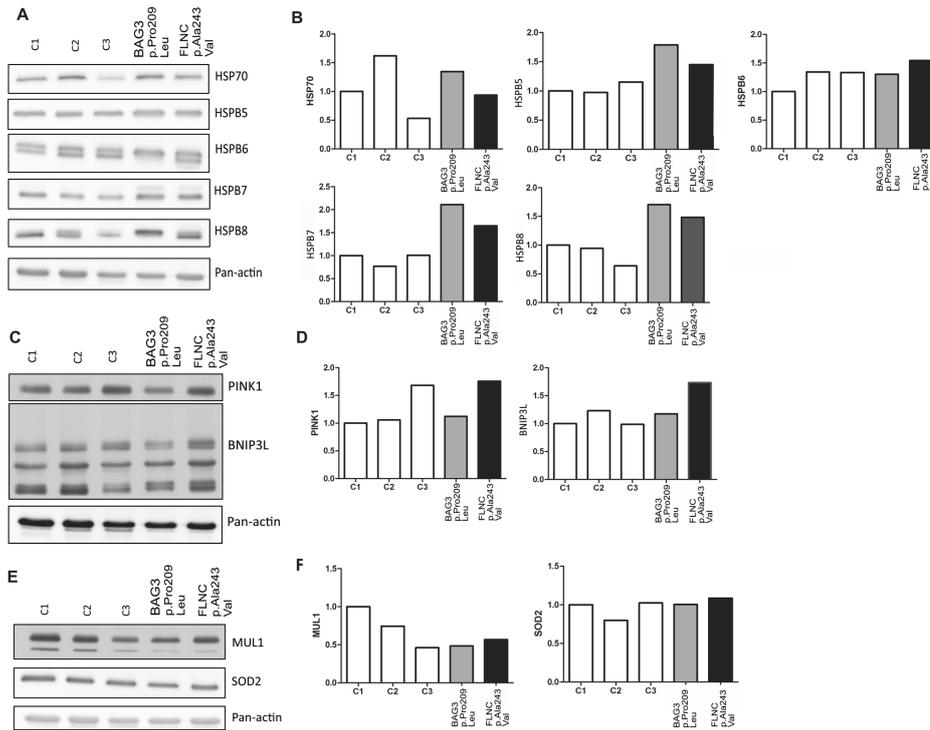
Further important proteins in this context are small heat shock proteins (sHSPs) that function as molecular chaperones and play an essential role in the functional maintenance by preventing aggregation of misfolded proteins (Carra et al. 2017; Golenhofen et al. 2004) (Sun and MacRae 2005). The FLNc ligand HSPB7 is highly expressed in cardiac muscle and has an essential role for cardiac development and



**Fig. 6** Immunohistochemistry and western blotting for monitoring autophagy. **a** Especially in *FLNC* mutant tissues immunohistochemical staining reveals many cardiomyocytes with strongly increased immunoreactivity for LC3, that were not observed in C3. In both patients, LAMP2 staining was increased compared to C3. p62 immunoreactivity was visible in several cardiomyocytes of the *FLNC* patient, but less compared to the *BAG3* mutant tissue. **b** Western blot analysis of total levels of p62, LC3, WIPI1 and ubiquitinated proteins. **c** Densitometric quantification of the results shown in panel **b** revealed highly increased expression of LC3-I and slightly increased expression of LC3-II and WIPI1 in the cardiac tissue of the *FLNC* patient, when compared to C1–C3. Furthermore, total levels of ubiquitinated proteins were considerably higher in the *FLNC* patient than in the controls. By contrast, p62 was not increased

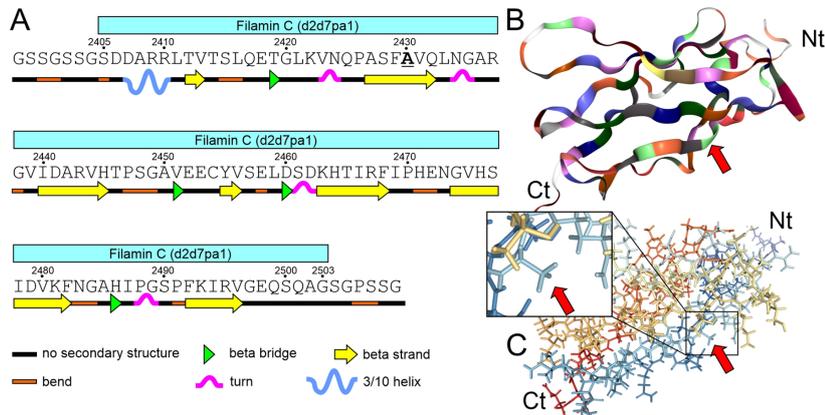
functional maintenance (Golenhofen et al. 2004; Juo et al. 2016). Mice deficient for HSPB7 develop a myopathy with sarcomere disarray and FLNc-positive aggregates (Juo et al. 2016). In the *FLNC* patient, the expression of not only HSPB7, but also HSPB5, HSPB6 and HSPB8 is increased, whereas the *BAG3*-associated HSP70 is not. These findings may indicate increased turnover of misfolded or non-functional proteins including FLNc by autophagy.

Mitochondrial pathology has been implicated as a pathological feature in skeletal muscles of MFM patients (Reimann et al. 2003; Vincent et al. 2016). In the heart, mitochondrial quality control plays a major role in avoiding cardiac cell injury and disease (Chen et al. 2010; Tahrir



**Fig. 7** Analysis of sHSPs and mitochondrial control proteins by western blotting. **a**, **b** HSPB6, HSPB7 and HSPB8 are increased in the *FLNC* patient compared to C1–C3, whereas HSP70 was not altered. Consistent with the observation of HSPB5-positive aggregates in the cardiac tissue, HSPB5 showed slight upregulation in the *FLNC* patient compared to controls but less than in the *BAG3* patient. **c**, **d**

The marker of mitochondrial quality control BNIP3L was slightly elevated in the *FLNC* patient compared to the *BAG3* patient and C1–C3, indicating disturbed mitophagy. PINK1 was not altered in the *FLNC* patient. **e**, **f** Mitochondrial markers SOD2 and MUL1 were not altered in the *FLNC* patient indicating no alteration of number or functionality of mitochondria compared to C1–C3



**Fig. 8** Structure of FLNc Ig-like domain 22 and localization of the mutation. **a** Sequence of the construct used for analysis of FLNc domain 22. The secondary structure elements identified by DSSP are depicted underneath the sequence. The blue bar indicates the actual sequence of FLNc Ig-like domain 22. The mutated alanine is underlined and printed bold. **b** Solution structure of human FLNc domain

22. Residues are shown in specific colors. The red arrow points at the mutated Ala2430. **c** Ball and stick view of the figure shown in **b**. The arrow points at the side chain of the mutated alanine. The area containing Ala2430 is shown enlarged in the inset. Note that its side-chain is exposed at the surface of the  $\beta$ -barrel. All data were obtained from <https://www.rcsb.org/structure/2D7P>

et al. 2017, 2019; Yussman et al. 2002). While in our *FLNC* patient the mitochondrial quality control protein BNIP3L (Ney 2015) was slightly increased, the mitochondrial multifunctional E3 ubiquitin ligase MUL1 and mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2) were not altered when compared to the three other cases without MFM features. Only few COX negative cardiomyocytes and few mitochondria with disturbed morphology were observed. Furthermore, biochemical analysis did not reveal a major pathology of the mitochondria in *FLNC* mutant cardiac tissue, indicating that the p.Ala2430Val mutation does not cause severe mitochondrial dysfunction.

### Study limitations

We are aware that the fact that we could analyze just a single patient with the p.Ala2340Val mutation is a clear limitation of our study. Although this variant was found in other HCM patients, no families with the variant are known. Therefore, firm evidence for its association with HCM is lacking. We could, however, not detect a mutation in known HCM genes, and WES did not identify other mutations that might be linked to a cardiac disease. Nevertheless, we cannot completely exclude that variants of other genes might play a role in the early onset and the severe phenotype of the disease in our patient.

Deeper analyses of the underlying pathophysiological processes are desirable, but difficult since we could only analyze single patients for every specific mutation. Especially non-fixed myocardial tissue specimens from patients with rare genetic disorders like an *FLNC* mutation, but also from healthy individuals is hardly available, which makes the collection and interpretation of data more difficult. For this reason, we might not have analyzed the most appropriate "control" tissue.

Postmortem tissue often shows severe structural alterations and is not suitable for morphological and molecular analysis. Animal studies and in vitro assays in rare genetic disorders often do not sufficiently replicate the human phenotype, making the analysis of human cardiac tissue an important element for understanding the pathology of the disease. Therefore, we here compared myocardial tissue from two patients with mutations in genes associated with MFM with three patients with a cardiac disease of another etiology and found that the pathology in the *FLNC* patient is distinct from that observed in other patients.

### Conclusion

The present study reports on a young man with HCM since early after birth. Our detailed studies underline that a *FLNC* p.Ala2430Val mutation is most likely causative for the

disease. Screening for putative disease-causing mutations in large cohorts of patients often makes interpretation of new variants in diagnosis of cardiomyopathies rather difficult and *FLNC* variations were found in 4.2% of healthy controls (Cui et al. 2018; Verdonschot et al. 2020). Our study shows that comprehensive analyses of heart muscle tissue can help to find the correct diagnosis and may guide genetic analysis especially in cases of de novo mutations or when analysis of family members is not feasible. Furthermore, a detailed analysis of the cardiac tissue could be helpful for understanding the cause of disease, and for the development of new therapeutic strategies.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10974-021-09601-1>.

**Acknowledgements** The authors thank the patients for their cooperation and permission to publish the data. The authors thank Hannah Schlierbach, Kerstin Leib and Babette Bockmühl for excellent technical assistance. This work was funded by the Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. (Sc22/11) and the German Research Foundation (DFG, FOR2473 to D.O.F.).

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no conflicts of interest.

**Ethical approval** This work was approved by the ethical committee of the University of Giessen, and written informed consent was obtained from all patients.

## References

- Ader F et al (2019) *FLNC* pathogenic variants in patients with cardiomyopathies: prevalence and genotype-phenotype correlations. *Clin Genet* 96:317–329. <https://doi.org/10.1111/cge.13594>
- Arndt V et al (2010) Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol* 20:143–148. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.022>
- Baker J et al (2010) Identification of a Z-band associated protein complex involving KY, *FLNC* and IGFN1. *Exp Cell Res* 316:1856–1870. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.027>
- Beatham J, Romero R, Townsend SK, Hacker T, van der Ven PF, Blanco G (2004) Filamin C interacts with the muscular dystrophy KY protein and is abnormally distributed in mouse KY deficient muscle fibres. *Hum Mol Genet* 13:2863–2874. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh308>
- Begay RL et al (2016) *FLNC* gene splice mutations cause dilated cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci* 1:344–359. <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2016.05.004>
- Brodehl A et al (2013) The novel desmin mutant p. A120D impairs filament formation, prevents intercalated disk localization, and causes sudden cardiac death. *Circ Cardiovasc Genet* 6:615–623. <https://doi.org/10.1161/circgenetics.113.000103>
- Brodehl A et al (2016) Mutations in *FLNC* are associated with familial restrictive cardiomyopathy. *Hum Mutat* 37:269–279. <https://doi.org/10.1002/humu.22942>
- Brodehl A, Gaertner-Rommel A, Milting H (2017) *FLNC* (filamin C): a new(er) player in the field of genetic cardiomyopathies. *Circ Cardiovasc Genet*. <https://doi.org/10.1161/circgenetics.117.001959>
- Carra S et al (2017) The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. *Cell Stress Chaperones* 22:601–611. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0787-8>
- Chen Y, Lewis W, Diwan A, Cheng EH, Matkovich SJ, Dorn GW 2nd (2010) Dual autonomous mitochondrial cell death pathways are activated by Nix/BNip3L and induce cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:9035–9042. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914013107>
- Chevessier F et al (2015) Myofibrillar instability exacerbated by acute exercise in filaminopathy. *Hum Mol Genet* 24:7207–7220. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv421>
- Claeys KG et al (2008) Electron microscopy in myofibrillar myopathies reveals clues to the mutated gene. *Neuromuscul Disord* 18:656–666. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.06.367>
- Claeys KG et al (2009) Differential involvement of sarcomeric proteins in myofibrillar myopathies: a morphological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 117:293–307. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0479-7>
- Cui H et al (2018) Mutation profile of *FLNC* gene and its prognostic relevance in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Genet Genomic Med* 6:1104–1113. <https://doi.org/10.1002/mgg3.488>
- Duff RM et al (2011) Mutations in the N-terminal actin-binding domain of filamin C cause a distal myopathy. *Am J Hum Genet* 88:729–740. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.04.021>
- Ehsan M, Jiang H, Thomson KL, Gehmlich K (2017) When signaling goes wrong: pathogenic variants in structural and signaling proteins causing cardiomyopathies. *J Muscle Res Cell Motil* 38:303–316. <https://doi.org/10.1007/s10974-017-9487-3>
- Eulitz S et al (2013) Identification of Xin-repeat proteins as novel ligands of the SH3 domains of nebulin and nebulin and analysis of their interaction during myofibril formation and remodeling. *Exp Cell Res* 24:3215–3226. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-04-0202>
- Fidler LM, Wilson GJ, Liu F, Cui X, Scherer SW, Taylor GP, Hamilton RM (2009) Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations. *J Cell Mol Med* 13:4219–4228. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00438.x>
- Force T et al (2010) Research priorities in hypertrophic cardiomyopathy: report of a Working Group of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 122:1130–1133. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.950089>
- Fujita M et al (2012) Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant *zacro*. *Dev Biol* 361:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.008>
- Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K (1988) The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol* 106:1563–1572. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.5.1563>
- Fürst DO, Goldfarb LG, Kley RA, Vorgerd M, Olive M, van der Ven PF (2013) Filamin C-related myopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 125:33–46. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1054-9>
- Gemelli C et al (2019) A novel mutation in the N-terminal actin-binding domain of filamin C protein causing a distal myofibrillar myopathy. *J Neurol Sci* 398:75–78. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.019>
- Ghasemi Tahrir F, Gupta M, Myers V, Gordon J, Cheung JY, Feldman AM, Khalili K (2019) Role of Bcl2-associated athanogene

- 3 in turnover of gap junction protein, connexin 43, in neonatal cardiomyocytes. *Sci Rep* 9:7658. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44139-w>
- Golenhofen N, Perng MD, Quinlan RA, Drenckhahn D (2004) Comparison of the small heat shock proteins alphaB-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and cvHSP in heart and skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 122:415–425. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0711-z>
- Gómez J et al (2017) Screening of the filamin C gene in a large cohort of hypertrophic cardiomyopathy patients. *Circ Cardiovasc Genet*. <https://doi.org/10.1161/circgenetics.116.001584>
- Hall CL et al (2020) Filamin C variants are associated with a distinctive clinical and immunohistochemical arrhythmogenic cardiomyopathy phenotype. *Int J Cardiol* 307:101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.09.048>
- Hughes SE (2004) The pathology of hypertrophic cardiomyopathy. *Histopathology* 44:412–427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01835.x>
- Juo LY, Liao WC, Shih YL, Yang BY, Liu AB, Yan YT (2016) HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles. *J Cell Sci* 129:1661–1670. <https://doi.org/10.1242/jcs.179887>
- Kabsch W, Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22:2577–2637. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211>
- Karmouch J, Protonotarios A, Syrris P (2018) Genetic basis of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 33:276–281. <https://doi.org/10.1097/hco.0000000000000509>
- Kebir S et al (2016) Sarcomeric lesions and remodeling proximal to intercalated disks in overload-induced cardiac hypertrophy. *Exp Cell Res* 348:95–105. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.008>
- Kiselev A et al (2018) De novo mutations in FLNC leading to early-onset restrictive cardiomyopathy and congenital myopathy. *Hum Mutat* 39:1161–1172. <https://doi.org/10.1002/humu.23559>
- Kley RA et al (2007) Clinical and morphological phenotype of the filamin myopathy: a study of 31 German patients. *Brain* 130:3250–3264. <https://doi.org/10.1093/brain/awm271>
- Kley RA et al (2012) Pathophysiology of protein aggregation and extended phenotyping in filaminopathy. *Brain* 135:2642–2660. <https://doi.org/10.1093/brain/aww200>
- Kley RA et al (2013a) A combined laser microdissection and mass spectrometry approach reveals new disease relevant proteins accumulating in aggregates of filaminopathy patients. *Mol Cell Proteomics* 12:215–227. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023176>
- Kley RA, van der Ven PF, Olivé M, Höhfeld J, Goldfarb LG, Fürst DO, Vorgerd M (2013b) Impairment of protein degradation in myofibrillar myopathy caused by FLNC/filamin C mutations. *Autophagy* 9:422–423. <https://doi.org/10.4161/auto.22921>
- Kley RA, Olivé M, Schröder R (2016) New aspects of myofibrillar myopathies. *Curr Opin Neurol* 29:628–634. <https://doi.org/10.1097/wco.0000000000000357>
- Kunkel B, Lapp H, Kober G, Kaltenbach M (1978) Light-microscopic evaluation of myocardial biopsies. *Cardiomyopathy and myocardial biopsy*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 62–70
- Labeit S et al (2006) Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol* 362:664–681. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.077>
- Leber Y et al (2016) Filamin C is a highly dynamic protein associated with fast repair of myofibrillar microdamage. *Hum Mol Genet* 25:2776–2788. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw135>
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Lipshultz SE et al (2013) Risk stratification at diagnosis for children with hypertrophic cardiomyopathy: an analysis of data from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. *Lancet* 382:1889–1897. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61685-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61685-2)
- Lipshultz SE et al (2019) Cardiomyopathy in children: classification and diagnosis: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 140(1):29–e68. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000682>
- Lu S, Carroll SL, Herrera AH, Ozanne B, Horowitz R (2003) New N-RAP-binding partners alpha-actinin, filamin and Krp1 detected by yeast two-hybrid screening: implications for myofibril assembly. *J Cell Sci* 116:2169–2178. <https://doi.org/10.1242/jcs.00425>
- Mao Z, Nakamura F (2020) Structure and function of filamin C in the muscle Z-disc. *Int J Mol Sci* 21(8):2696. <https://doi.org/10.3390/ijms21082696>
- McKenna WJ, Maron BJ, Thiene G (2017) Classification, epidemiology, and global burden of cardiomyopathies. *Circ Res* 121:722–730. <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.309711>
- Miao J, Su FF, Liu XM, Wei XJ, Yuan Y, Yu XF (2018) A case report: a heterozygous deletion (2791\_2805 del) in exon 18 of the filamin C gene causing filamin C-related myofibrillar myopathies in a Chinese family. *BMC Neurol* 18:79. <https://doi.org/10.1186/s12883-018-1078-4>
- Ney PA (2015) Mitochondrial autophagy: origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta* 1853:2775–2783. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.022>
- Nilsson MI et al (2013) Xin is a marker of skeletal muscle damage severity in myopathies. *Am J Pathol* 183:1703–1709. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.010>
- Noorman M et al (2013) Remodeling of the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 10:412–419. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2012.11.018>
- Olivé M, Kley RA, Goldfarb LG (2013) Myofibrillar myopathies: new developments. *Curr Opin Neurol* 26:527–535. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328364d6b1>
- Reimann J, Kunz WS, Vielhaber S, Kappes-Horn K, Schröder R (2003) Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29:45–51
- Ruparelia AA, Zhao M, Currie PD, Bryson-Richardson RJ (2012) Characterization and investigation of zebrafish models of filamin-related myofibrillar myopathy. *Hum Mol Genet* 21:4073–4083. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds231>
- Ruparelia AA, Oorschot V, Ramm G, Bryson-Richardson RJ (2016) FLNC myofibrillar myopathy results from impaired autophagy and protein insufficiency. *Hum Mol Genet* 25:2131–2142. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw080>
- Rupp S et al (2018) Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy in children. *Clin Res Cardiol* 108:282–289. <https://doi.org/10.1007/s00392-018-1354-8>
- Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA (2000) Connexin expression and turnover: implications for cardiac excitability. *Circ Res* 86:723–728. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.7.723>
- Schänzer A et al (2018) Dysregulated autophagy in restrictive cardiomyopathy due to Pro209Leu mutation in BAG3. *Mol Genet Metabol* 123:388–399. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.01.001>
- Schindelin J et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schröder R, Schofer B (2009) Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. *Brain Pathol* 19:483–492. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00289.x>
- Schubert J, Tariq M, Geddes G, Kindel S, Miller EM, Ware SM (2018) Novel pathogenic variants in filamin C identified in pediatric restrictive cardiomyopathy. *Hum Mutat* 39:2083–2096. <https://doi.org/10.1002/humu.23661>

- Schuld J et al (2020) Homozygous expression of the myofibrillar myopathy-associated p.W2710X filamin C variant reveals major pathomechanisms of sarcomeric lesion formation. *Acta Neuropathol Commun* 8:154. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01001-9>
- Selcen D (2011) Myofibrillar myopathies. *Neuromuscul Disord* 21:161–171. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.12.007>
- Severs NJ (2000) The cardiac muscle cell. *BioEssays* 22:188–199. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-1878\(200002\)22:2%3c188::aid-bies10%3e3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-1878(200002)22:2%3c188::aid-bies10%3e3.0.co;2-t)
- Severs NJ et al (2006) Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies. *Adv Cardiol* 42:228–242. <https://doi.org/10.1159/000092572>
- Sun Y, MacRae TH (2005) The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J* 272:2613–2627. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04708.x>
- Tahrir FG, Knezevic T, Gupta MK, Gordon J, Cheung JY, Feldman AM, Khalili K (2017) Evidence for the role of BAG3 in mitochondrial quality control in cardiomyocytes. *Cell Physiol* 232:797–805. <https://doi.org/10.1002/jcp.25476>
- Tahrir FG, Langford D, Amini S, Mohseni Ahooyi T, Khalili K (2019) Mitochondrial quality control in cardiac cells: mechanisms and role in cardiac cell injury and disease. *J Cell Physiol* 234:8122–8133. <https://doi.org/10.1002/jcp.27597>
- Thompson TG et al (2000) Filamin 2 (FLN2): a muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol* 148:115–126. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.1.115>
- Touw WG, Baakman C, Black J, te Beek TA, Krieger E, Joosten RP, Vriend G (2015) A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Res* 43:D364–368. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1028>
- Towbin JA (2014) Inherited cardiomyopathies. *Circ J* 78:2347–2356
- Traub O et al (1994) Immunohistochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur J Cell Biol* 64:101–112
- Tucker NR et al (2017) Novel mutation in FLNC (filamin C) causes familial restrictive cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. <https://doi.org/10.1161/circgenetics.117.001780>
- Valdés-Mas R et al (2014) Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Commun* 5:5326. <https://doi.org/10.1038/ncomms6326>
- van der Ven PF, Obermann WM, Lemke B, Gautel M, Weber K, Fürst DO (2000a) Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of gamma-filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation. *Cell Motil Cytoskeleton* 45:149–162. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0169\(200002\)45:2%3c149::aid-cm6%3e3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0169(200002)45:2%3c149::aid-cm6%3e3.0.co;2-g)
- van der Ven PF et al (2000b) Indications for a novel muscular dystrophy pathway. Gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J Cell Biol* 151:235–248. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.235>
- van der Ven PF et al (2006) Unusual splicing events result in distinct Xin isoforms that associate differentially with filamin c and Mena/VASP. *Exp Cell Res* 312:2154–2167. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.03.015>
- Verdonschot JAJ et al (2020) A mutation update for the FLNC gene in myopathies and cardiomyopathies. *Hum Mutat* 41:1091–1111. <https://doi.org/10.1002/humu.24004>
- Vincent AE et al (2016) Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy. *Neuromuscul Disord* 26:691–701. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.08.004>
- Vorgerd M et al (2005) A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet* 77:297–304. <https://doi.org/10.1086/431959>
- Yacoub MH (2014) Decade in review—cardiomyopathies: cardiomyopathy on the move. *Nat Rev Cardiol* 11:628–629. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.157>
- Yussman MG et al (2002) Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy. *Nat Med* 8:725–730. <https://doi.org/10.1038/nm719>
- Zhang YT, Pu CQ, Ban R, Liu HX, Shi Q, Lu XH (2018) Clinical, pathological, and genetic features of two Chinese cases with filamin C myopathy. *Chin Med J* 131:2986–2988. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.247208>
- Zhou Y et al (2020) Loss of filamin C is catastrophic for heart function. *Circulation* 141:869–871. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.119.044061>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 14 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Berlin/ 12.11.2023

---

Unterschrift

## 15 Danksagung

Ein besonders großes Dankeschön möchte ich als Erstes an meine Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Anne Schänzer aussprechen. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können. Ich danke hiermit auch allen anderen Mitarbeitern im Diagnostik-Labor am Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Till Acker für die Möglichkeit der Erstellung meiner Dissertation an diesem Institut. Vielen Dank insbesondere auch an Hannah Schlierbach, dass ich mich mit kurzfristigen Anliegen und Fragen immer an dich wenden konnte. Zur Erstellung meiner Western Blots habe ich einen Großteil meiner Arbeitszeit im Forschungslabor am Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gearbeitet und möchte mich herzlich bei dem Laborleiter und unterstützendem Betreuer meiner Arbeit Herrn PD Dr. Attila Németh und dem ganzen Forschungs-Team bedanken. Ich habe mich als Teil des Teams immer sehr wohl gefühlt und schätze die große Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde, sehr. Ganz besonders möchte ich mich bei Sabine Gräf für die großartige Unterstützung und für all das Wissen bedanken, was du mir über Western Blots beigebracht hast. Für die tolle Zusammenarbeit, ohne die dieses Projekt und meine Dissertation nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Kinderherzzentrums der JLU Gießen bedanken. Ein besonders großer Dank gilt dabei meinem unterstützendem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Stefan Rupp. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. med. Anke Sprengel bedanken für die Zusammenstellung und Übermittlung der klinischen Parameter der Patienten. Ebenfalls für die großartige Zusammenarbeit möchte ich mich beim Institut für Zellbiologie bei der Abteilung für molekulare Zellbiologie der Universität Bonn bedanken. Namentlich möchte ich hier insbesondere Herrn Prof. Dr. Dieter Fürst, Herrn Dr. Peter van der Ven und Frau Dr. Julia Kreuzberg nennen. Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der DGM (Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V.), Förderungskennzeichen: SC22-11.

„Man sieht nur mit dem *Herzen* gut. Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar.“ (Zitat aus „Der kleine Prinz“ von Antoine de Saint-Exupéry) Hiermit möchte ich mich bei meiner Familie (Mama, Papa, Maria und Piese), meinen Freunden (insbesondere Lisa und Lena) und meinem Freund Kevin bedanken. Danke, dass ihr mich immer unterstützt und an meiner Seite seid.