

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

## Evaluation des kardialen Phänotyps und des Ubiquitin-Proteasom-Systems in *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mäusen

### Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Sophia Maron  
aus Oldenburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.06.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Eschenhagen**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. R. Bähring**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Blankenberg**

*für meinen Sohn Mats, der von Anfang an dabei war*

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Struktur und Funktion der Lamine	1
1.2	Laminopathien	4
1.3	Dilatative Kardiomyopathie	10
1.4	Das Ubiquitin-Proteasom-System	12
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1	Materialien	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Chemikalien mit Risiko (R)- und Sicherheits (S)-Sätzen	18
2.1.3	Antikörper	18
2.1.4	Kits	19
2.1.5	Oligonukleotide	19
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.7	Geräte	20
2.1.8	Mausmodelle	21
2.1.8.1	Das Lmna <sup>ΔK32</sup> -Mausmodell	21
2.1.8.2	Das Ub <sup>G76V</sup> -GFP-Mausmodell	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Genotypisierung	23
2.2.2	Organentnahme	25
2.2.3	RNA-Analysen	25
2.2.3.1	RNA-Isolierung	25
2.2.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	25
2.2.3.3	Reverse Transkription	25
2.2.3.4	Quantitative Echtzeit-PCR	26
2.2.4	Proteinanalysen	29
2.2.4.1	Proteinextraktion	29
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.2.4.3	Western Blot-Analyse	30
2.2.4.4	Bestimmung der 20S-Proteasom-Aktivitäten	32
2.2.5	Echokardiographie	33
2.2.6	Isolation von Kardiomyozyten neugeborener Mäuse	35
2.2.7	Behandlung von Kardiomyozyten neugeborener Mäuse mit MG262	36
2.2.8	Statistik	36

# Inhaltsverzeichnis

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
3.1	Genotypisierung .....	37
3.1.1	Genotypisierung der <i>Lmna</i> <sup>ΔK32</sup> -Mauslinie .....	37
3.1.2	Genotypisierung der Ub <sup>G76V</sup> -GFP-Mauslinie .....	37
3.2	Ergebnisse der Untersuchungen der <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> -Mäuse .....	38
3.2.1	Allgemeiner Phänotyp der <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> -Mäuse .....	38
3.2.2	Kardialer Phänotyp der <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> -Mäuse .....	40
3.2.3	mRNA-Analysen in <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> -Mäusen .....	42
3.2.4	Proteinanalysen in <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> -Mäusen .....	43
3.2.5	Bestimmung der 20S Proteasom-Aktivitäten in <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> -Mäusen .....	44
3.2.6	Behandlung der Kardiomyozyten neonataler Mäuse mit MG262 .....	45
3.2.7	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> -Mäuse .....	48
3.3	Ergebnisse der Untersuchungen der <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> -Mäuse .....	49
3.3.1	Allgemeiner Phänotyp der <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> -Mäuse .....	49
3.3.2	Kardialer Phänotyp der <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> -Mäuse .....	50
3.3.3	mRNA-Analysen in <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> -Mäusen .....	54
3.3.4	Proteinanalysen in den <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> -Mäusen .....	56
3.3.5	Bestimmung der 20S Proteasom-Aktivitäten in <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> -Mäusen .....	58
3.3.6	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> -Mäuse .....	60
3.4	Ergebnisse der Untersuchungen der <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> xUb <sup>G76V</sup> -GFP-Mäuse .....	61
3.4.1	Phänotyp der <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> xUb <sup>G76V</sup> -GFP-Mäuse .....	61
3.4.2	Lamin A/C-Analysen in <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> xUb <sup>G76V</sup> -GFP-Mäusen .....	62
3.4.3	Untersuchungen des UPS in <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> xUb <sup>G76V</sup> -GFP-Mäusen .....	64
3.4.4	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> xUb <sup>G76V</sup> -GFP-Mäuse ....	67
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>68</b>
4.1	<i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> - und <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> - Mäuse entwickeln einen schwerwiegenden Phänotyp ....	70
4.2	Gravierende Veränderungen auf molekularer Ebene in <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> - und <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> - Mäusen .....	74
4.3	Das Ubiquitin-Proteasom-System in <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> - und <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> -Mäusen .....	77
4.3.1	Es gibt keinen Hinweis für eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an der Lamin-Degradation in <i>Lmna</i> <sup>ΔK32/ΔK32</sup> -Mäusen .....	77
4.3.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System ist in <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> - und <i>Lmna</i> <sup>+ΔK32</sup> xUb <sup>G76V</sup> -GFP- Mäusen geschwächt .....	79
4.4	Schlussfolgerung .....	82
4.5	Ausblick .....	82

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>98</b>

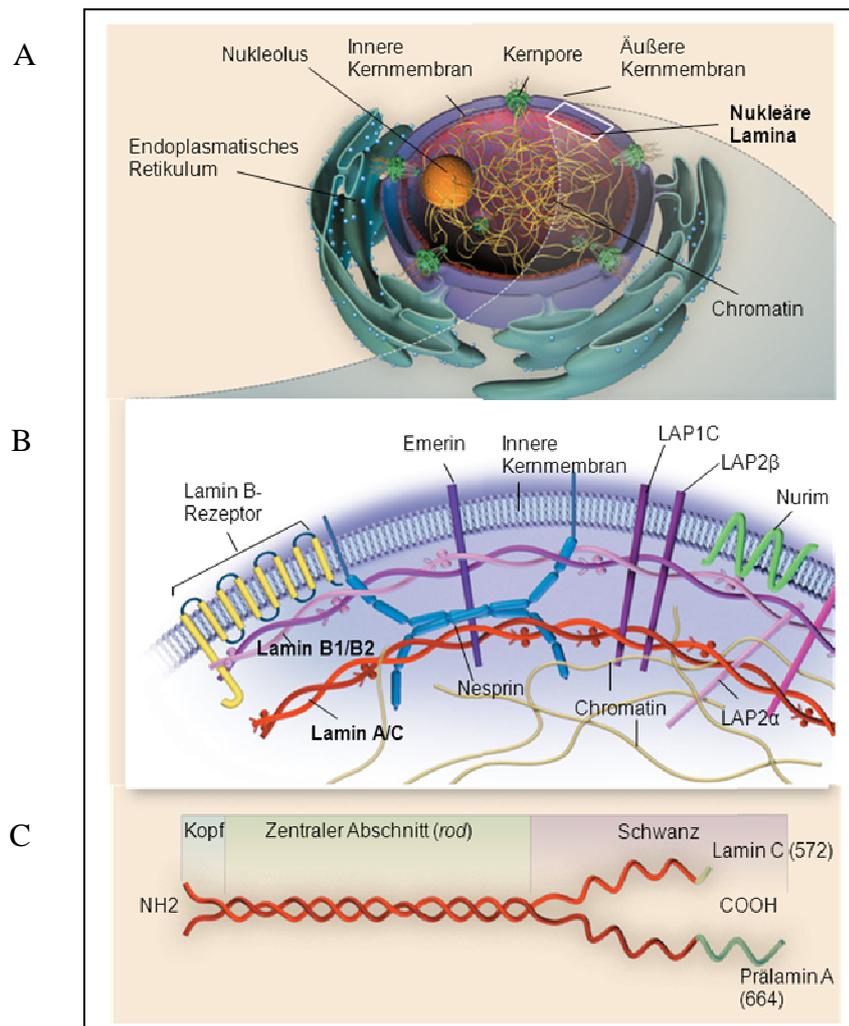
## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Struktur und Funktion der Lamine

Der Zellkern wird in der eukaryotischen Zelle durch die Kernhülle, die aus einer äußeren und einer inneren Kernmembran besteht, begrenzt. Die Kernhülle ist durchsetzt von Kernporen (*nuclear pore complex*, NPC), die die Verbindung und den Austausch zwischen Zyto- und Karyoplasma gewährleisten. Zwischen den Kernmembranen liegt der perinukleäre Raum, der ein funktionelles Äquivalent zum Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) darstellt. Die äußere Kernmembran geht direkt in die Membran des ER über und ist wie diese mit Ribosomen besetzt. Der inneren Kernmembran, die frei von Ribosomen ist und integrale Membranproteine enthält, liegt die nukleäre Lamina an. Diese besteht aus den Laminen, den Typ V Intermediärfilamenten (s. Abb. 1). Typ I-IV der Intermediärfilamente sind im Gegensatz zu den Laminen im Zytoplasma lokalisiert. Charakteristisch für die Intermediärfilamente ist die dreigeteilte Domänenstruktur: Die N-terminale Kopfdomäne, der zentrale stabförmige Abschnitt (*rod*-Domäne) und die C-terminale Schwanzdomäne (s. Abb. 1). Die *rod*-Domäne ist ähnlich wie bei den anderen Intermediärfilamenten aufgebaut und besteht aus 4  $\alpha$ -helikalen Abschnitten (1A, 1B, 2A und 2B), die über kurze *linker*-Sequenzen (L1, L12 und L2) miteinander verbunden sind (Fisher et al. 1986, McKeon et al. 1986). Zwei Monomere bilden eine Doppelwendelstruktur (*coiled-coil*). Aus mehreren *coiled-coil*-Dimeren entstehen die Filamente, die in einer antiparallelen Kopf-zu-Schwanz-Anordnung aufgebaut sind (Stuurman et al. 1998). Der C-Terminus der Lamine enthält ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) und, mit Ausnahme der C-Lamine, eine CaaX-Box (Cystein-aliphatische Aminosäure-aliphatische Aminosäure-C-terminaler Rest), die zusammen für die Direktion zur inneren Kernmembran verantwortlich sind (Nigg et al. 1991). Die Klasse der Typ V Intermediärfilamente besteht bei Säugetieren aus 3 Genen, die für 7 Lamin-Proteine kodieren. Sie werden in A-Typ- und B-Typ-Lamine eingeteilt. Die B-Typ-Lamine bleiben während der Mitose-induzierten Auflösung der nukleären Lamina membrangebunden und werden schon während der Embryogenese in allen Geweben exprimiert. Die A-Typ-Lamine kommen erst in ausdifferenzierten Geweben vor und verteilen sich während der Mitose als lösliche Proteine im Zytoplasma (Röber et al. 1989). Die Gene der B-Typ-Lamine (*LMNB1* und *LMNB2*) kodieren für die Proteine Lamin B1 und B2. Ein zusätzliches Produkt von *LMNB2* ist Lamin B3, das aber nur in männlichen Keimzellen

# Einleitung

vorkommt. Die A-Typ-Lamine, Lamin A, C, A $\Delta$ 10 und C2, entstehen durch alternatives Spleißen des *LMNA*-Gens. Lamin A und C besitzen 566 identische Aminosäuren und unterscheiden sich nur in den C-terminalen Enden. Es gibt dort eine 98 Aminosäuren lange Lamin A-spezifische Region und einen 6 Aminosäuren langen Lamin C-spezifischen Abschnitt (Fisher et al. 1986, s. Abb. 1). Lamin A entsteht durch proteolytische Spaltung von 18 Aminosäuren aus Prälamina A. Bei Lamin A $\Delta$ 10 fehlt im Gegensatz zu Lamin A das Exon 10. Seine Funktion ist noch ungeklärt. Lamin C2 hat eine C2-spezifische Sequenz in Exon 1 und wird, wie Lamin B3, nur in männlichen Keimzellen exprimiert.



**Abbildung 1:** **A**, die Struktur der Kernmembranen mit der nukleären Lamina an der inneren Kernmembran. **B**, die Organisation der nukleären Lamina und der Proteine der inneren Kernmembran. Die Proteine der inneren Kernmembran interagieren mit den Laminen. **C**, die Struktur von Lamin A und C. Die Lamine besitzen eine N-terminale Kopfdomäne, einen zentralen Abschnitt (*rod* Domäne) und eine C-terminale Schwanzdomäne. Lamin A und C sind identisch in der Abfolge ihrer ersten 566 Aminosäuren (in rot). Lamin C hat 6 spezifische C-terminale Aminosäuren. Der Vorgänger von Lamin A, Prälamina A, hat 98 spezifische C-terminale Aminosäuren (in grün). Lamin A entsteht aus Prälamina A durch Abspaltung von 18 C-terminalen Aminosäuren. Abbildung modifiziert nach Garg (2004).

# Einleitung

---

Lamine spielen eine Rolle in der Kernstabilität und -architektur, der Chromatinorganisation, der Genregulation und der Signaltransduktion (Hutchison et al. 2002). Lamine interagieren mit membranständigen Proteinen, wie Emerin, Nesprin und LAP1 (Lamin-assoziiertes Polypeptid), und mit nicht-membranständigen Proteinen, wie LAP2 $\alpha$ , nukleärem Aktin und mit Lamin selbst, und sorgen so für den Erhalt und die Organisation der Kernarchitektur (s. Abb. 1, Gruenbaum et al. 2005). Emerin z.B. ist in seiner Lokalisation von Lamin abhängig: In *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde ein großer Teil des Emerins im Zytoplasma gefunden (Sullivan et al. 1999). Emerin selbst wiederum interagiert mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren. Nesprin bindet Lamin und Emerin und verbindet das Kernskelett mit der nukleären Lamina und über einen Komplex in der Zellmembran mit dem Zytoskelett. Nesprin spielt also eine Rolle bei der Positionierung des Zellkerns (Gruenbaum et al. 2005). MAN1 ist in Verbindung mit Lamin sowohl wichtig für die Erhaltung der Kernarchitektur als auch für die Genregulation, indem es verschiedene Transkriptionsfaktoren bindet (Mansharamani und Wilson 2005). Die Lokalisation von Lamin C ist abhängig vom Vorhandensein von Lamin A: In Lamin A-freien Tumorzelllinien befindet sich Lamin C im Karyoplasma oder im Nukleolus und wird erst nach Transfektion der Zellen mit GFP-Lamin A, zusammen mit diesem, in die nukleäre Lamina integriert (Vaughan et al. 2001). Außerdem sind die Lamine für den Vorgang der Mitose wichtig: Sie spielen eine Rolle bei der Dissoziation und beim Wiederaufbau der Kernhülle. Die Dissoziation wird durch Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen, z.B. der Lamine, der Lamin-assoziierten Proteine und der Proteine des NPC herbeigeführt (Gruenbaum et al. 2003). Durch die Phosphorylierung der Lamine kommt es zur Depolymerisation des Lamin-Netzwerks, was in einer Auflösung der nukleären Lamina und schließlich auch der Kernhülle resultiert. Zudem sind Lamine an der postmitotischen Reorganisation des Kerns und des NPC beteiligt. Bei einem reduzierten Lamingehalt in humanen Zellen konnte eine Instabilität der Kernhülle und eine Umverteilung des NPC mit abnormen Aggregaten gezeigt werden, was zu einem vorzeitigen Zelltod führte (Schirmer et al. 2001). Auch bei der Chromatinorganisation wirken die Lamine mit. So besitzen Lamine eine eigene Chromatin-Bindungsdomäne und sind zudem lokal eng mit Heterochromatin assoziiert (Gruenwald et al. 2003). Außerdem interagieren die Lamine mit einer Vielzahl spezifischer Transkriptionsfaktoren und mit der RNA-Polymerase II und haben so Einfluss auf die Transkription bestimmter Gene. Lamine besitzen ebenfalls eine Funktion in der DNA-Replikation: Man kann beispielsweise beobachten, wie ein Teil des Lamina-ständigen Lamin B1 in der S-Phase von der Kernhülle zu Zentren der DNA-Replikation umverteilt wird (Moir

# Einleitung

et al. 1994). Auch in Prozesse des Zellzyklus sind die Lamine involviert. Durch Interaktion mit dem Retinoblastomprotein (Rb) sind sie an der Regulation des Aus- und Wiedereintritts in den Zellzyklus beteiligt (Mancini et al. 1994). Neben den bekannten Interaktionspartnern von Lamin gibt es weitere, deren Funktionen bisher noch nicht vollständig geklärt sind.

## 1.2 Laminopathien

Bis in die neunziger Jahre wurde an der nukleären Lamina und der Kernhülle hauptsächlich in den Reihen der Zellbiologen geforscht. 1994 identifizierten Bione et al. das für die x-chromosomale Form der 1966 erstmals beschriebenen Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) verantwortliche Gen und nannten das zugehörige Protein Emerin. Kurz darauf wurde entdeckt, dass Emerin in der Kernhülle lokalisiert ist. 1999 berichteten Bonne et al. über eine autosomal-dominante Form der EDMD, die durch Mutationen im *LMNA*-Gen hervorgerufen wird. Seitdem werden immer mehr Erkrankungen in Verbindung mit Mutationen im *LMNA*-Gen oder in Genen der Lamin-assoziierten Integralproteine der inneren Kernmembran gebracht. Diese Krankheiten werden unter dem Begriff Laminopathien zusammengefasst. Obwohl Lamin ubiquitär vorkommt, sind nur bestimmte Gewebe betroffen: Man kann die Laminopathien einteilen in Erkrankungen der quergestreiften Muskulatur, in Lipodystrophie-Syndrome, in periphere Neuropathien und in Syndrome mit vorzeitiger Alterung. Es gibt aber auch Krankheiten mit Überlappungen zwischen diesen Gruppen (Worman und Bonne 2007). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Laminopathien und ihre Symptome.

**Tabelle 1: Übersicht der Laminopathien.** Laminopathien werden durch Mutationen im *LMNA*-Gen verursacht. Bei diesen Erkrankungen sind Herz- und Skelettmuskel, Fettgewebe, periphere Nerven, die Haut- und Knochenstruktur oder Kombinationen dieser Gewebe betroffen. AR = autosomal-rezessiv, AD = autosomal-dominant, XL = x-linked (x-chromosomal).

Erkrankung	Vererbung	Phänotyp	Referenz
Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD)	XL	Gelenkkontrakturen, langsam progrediente Muskelschwäche, kardiale Beteiligung	Emery und Dreifuss 1966 Bione et al. 1994
	AD		Bonne et al. 1999
	AR		Raffaele Di Barletta et al. 2000

# Einleitung

Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ1B (LGMD1B)	AD	Langsam progrediente Schwäche der Schultergürtel- und Beckenmuskulatur, assoziiert mit atrioventrikulären Überleitungsstörungen	Van der Kooi et al. 1996 Muchir et al. 2000
Dilatative Kardiomyopathie (DCM) Typ 1A	AD	DCM mit Reizleitungsstörungen	Fatkin et al. 1999 Bécane et al. 2000
DCM	AD	DCM mit apikalen linksventrikulären Aneurysmen ohne atrioventrikuläre Überleitungsstörung	Forissier et al. 2003
		DCM mit Vorhofflimmern	Sébillon et al. 2003
		<i>non-compaction</i> DCM	Hermida-Prieto et al. 2004
Quadrizepsmyopathie	AD	Langsam progrediente Quadrizepsmyopathie, assoziiert mit DCM und Reizleitungsstörungen	Charniot et al. 2003
Neurogene Variante der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie	AD	Symptome der EDMD kombiniert mit neuropathischen Symptomen	Walter et al. 2005
<i>LMNA</i> -assoziierte kongenitale Muskeldystrophie (L-CMD)	<i>de novo</i>	Axiale Schwäche und Dystrophie der zervikalen und distalen Muskulatur, später proximale Kontrakturen, kardiale Beteiligung	Quijano-Roy et al. 2008
Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 2 (CMT2)	AR	Symmetrische Muskelschwäche und dystrophie v.a. in den distalen unteren Extremitäten, Fußdeformitäten und Gehstörung	De Sandre-Giovannoli et al. 2002
	AD	CMT2 assoziiert mit Kardiomyopathie und Leukonychie	Goizet et al. 2004
	AD	CMT2 assoziiert mit Myopathie	Benedetti et al. 2005

## Einleitung

Familiäre partielle Lipodystrophie vom Dunnigan-Typ	AD	Fehlen des subkutanen Fettgewebes, Acanthosis nigricans, Akkumulation von Fettgewebe in Gesicht und Nacken, insulinresistenter Diabetes mellitus	Shackleton et al. 2000
Kombination von Muskeldystrophie, DCM und partieller Lipodystrophie	AD	Symptome der EDMD und der LGMD1B kombiniert mit DCM und partieller Lipodystrophie	Garg et al. 2002 van der Kooi et al 2002
Mandibuloakrale Dysplasie	AR	Postnatale Wachstumsretardierung, Mandibula- und Claviculadysplasie, Kopfdeformierung	Novelli et al. 2002
Generalisierte Lipoatrophie, insulinresistenter Diabetes mellitus, Leukomelanodermische Papeln, Steatosis hepatis und Kardiomyopathie	<i>de novo</i>	Verlust des subkutanen Fettgewebes, insulinresistenter Diabetes mellitus, leukomelanodermische Papeln, Steatosis hepatis und Kardiomyopathie	Caux et al. 2003
Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom	AD	Vorzeitiges Altern, Kleinwuchs, Hautdystrophie, Osteoporose, verzögerte Zahnbildung, Arteriosklerose, Koronare Herzkrankheit	De Sandre-Giovannoli et al. 2003
Atypisches Werner'sches Syndrom	AD	Sklerodermie-ähnliche Haut, Katarakt, vorzeitig gealterte Gesichtszüge, Arteriosklerose, subkutane Kalzifizierung	Chen et al. 2003
Restriktive Dermopathie	<i>de novo</i>	Früher letaler Verlauf im Säuglingsalter, intrauterine Wachstumsretardierung, sklerotische Haut, Claviculahypoplasie, Lungenhypoplasie	Navarro et al. 2004
Kombination aus Progerie, Arthropathie und Sehnenverkalkung	AR	Symptome einer Progerie, Gelenkdegeneration und Sehnenverkalkung	Van Esch et al. 2006

# Einleitung

---

---

Herz-Hand-Syndrom vom slowenischen Typ	AD	Kardiale Reizleitungsstörungen, Tachyarrhythmien, DCM und Brachydaktylie	Renou et al. 2008
--	----	--	-------------------

Die EDMD gehört zu den Erkrankungen der quergestreiften Muskulatur und ist charakterisiert durch eine Symptomtrias aus Gelenkkontrakturen, die in der frühen Kindheit beginnen und deren Progression sehr variabel ist, einer langsam progredienten Muskelschwäche und einer kardialen Beteiligung (Bonne et al. 2000). In diese Gruppe der Laminopathien gehören außerdem die DCM Typ 1A, die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 1B, die Quadrizepsmyopathie und eine *LMNA*-assoziierte Form der kongenitalen Muskeldystrophie (L-CMD). Die L-CMD wurde 2008 von Quijano-Roy et al. beschrieben. Sie untersuchten 15 Kinder zwischen 3 und 10 Jahren, mit verschiedenen *de novo*-Mutationen im *LMNA*-Gen. Diese zeigten einen Phänotyp wie bei einer schweren Form der EDMD, allerdings traten die Symptome bereits im ersten Lebensjahr auf. Die Patienten zeigten eine starke Dystrophie, v.a. der proximalen oberen und der distalen unteren Extremitäten, einen Halteverlust des Kopfes, Fußdeformitäten und einen steifen Rücken (s. Abb. 2). Der frühe Beginn, die rasche Progression der Symptome und die erhöhten Kreatinkinasekonzentrationen, die bei allen Patienten festgestellt wurden, sind charakteristisch für kongenitale Muskeldystrophien. Deshalb werden die von Quijano-Roy et al. beschriebenen Erkrankungen als L-CMD bezeichnet.

# Einleitung



**Abbildung 2: Patient mit einer schweren Form der LMNA-assoziierten kongenitalen Muskeldystrophie (L-CMD) im Alter von 2 (a-c) und 7 Jahren (d-e).** 1a, es zeigten sich diffuse Muskeldystrophien, v.a. der proximalen oberen und der distalen unteren Extremitäten. 1b, zu erkennen ist der steife Rücken und der Halteverlust des Kopfes. 1c, man erkennt die stark ausgeprägte Wadenmuskulaturdystrophie und Fußdeformität. 1d, 1e, in *follow-up*-Beobachtungen konnte man eine starke thorakale Hyperlordose, Kniekontrakturen und distale Kontrakturen feststellen. Abbildung von Quijano-Roy et al. (2008).

Die Pathophysiologie der Laminopathien konnte bisher nicht vollständig verstanden werden. Es gibt mehrere Hypothesen, die versuchen, die Entstehungsmechanismen der Erkrankungen zu erklären: Die Strukturmodell-Hypothese beschreibt die wichtigste Funktion der nukleären Lamina als die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Zellen, insbesondere der Zellen, die mechanischem Stress ausgesetzt sind. Die durch die Mutationen im *LMNA*-Gen veränderte Struktur der Lamin-Polymere kann die Interaktion mit den Proteinen der Kernhülle herabsetzen und so zu einer Disorganisation der nukleären Lamina führen. Durch gestörte Interaktion mit Nesprin, dem Protein, das eine wichtige Rolle bei der Positionierung des Zellkerns spielt, kann die Integrität der gesamten Zelle verloren gehen. Der Stress, dem die Muskelzelle während einer Kontraktion ausgesetzt ist, kann aufgrund der geschwächten Struktur der nukleären Lamina und des Zellkerns in einer Deformierung und Apoptose der Zelle resultieren (Broers et al. 2006). In Studien konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Lamin eine Instabilität der gesamten Zelle bewirkt. In embryonalen Fibroblasten von *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen eine signifikant schwächere Kernhüllenstruktur. Die Zellen der *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäuse rupturierten bei mechanischem Stress schneller als die der *Lmna*<sup>+/+</sup>-Mäuse (Broers et al. 2004). Dieses Strukturmodell kann also viele Aspekte bei der Entstehung der Krankheiten des quergestreiften Muskels erklären.

# Einleitung

---

Die Genexpressionshypothese versucht in erster Linie die Entstehung der Lipodystrophie-Syndrome zu erklären. Die Adipogenese wird von verschiedenen Proteinen reguliert, unter anderem von SREBP1 (*sterol regulatory element-binding protein*), PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor*) und vom Rb. Während Rb für den Arrest des Zellzyklus zuständig ist, spielt PPAR $\gamma$  bei der Differenzierung von Adipozyten eine zentrale Rolle und bewirkt zugleich, dass verschiedene Adipozyten-spezifische Gene exprimiert werden. PPAR $\gamma$  wiederum wird von SREBP1 aktiviert. SREBP1 wurde als Interaktionspartner von Lamin identifiziert, wobei scheinbar Prälamina A, und nicht reifes Lamin A, der Bindungspartner ist. In Fibroblasten von Patienten mit familiärer partieller Lipodystrophie vom Dunnigan-Typ, Mandibuloakraler Dysplasie und atypischem Werner'schen Syndrom akkumuliert Prälamina A an der Kernhülle, was zu einer Umverteilung von SREBP1, ebenfalls an die Kernhülle, führt. Es steht also weniger SREBP1 zur Verfügung, um PPAR $\gamma$  zu aktivieren, was in einer Inhibition der Adipogenese resultiert (Capanni et al. 2005). Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen von SREBP1 und Diabetes mellitus Typ II gezeigt werden (Sewter et al. 2002). Auch bei einem Verlust der Rb-Funktion durch A-Typ-Lamindefekte erwartet man Störungen in der Adipogenese (Cole et al. 2004). Das Genexpressionsmodell könnte den Verlust von Fettgewebe erklären, ist aber schwer für die Erklärung der Fettakkumulation im Nackenbereich anzuwenden. Zusätzlich interagiert Lamin sowohl mit Chromatin, als auch mit der RNA-Polymerase II, was bei einer veränderten Affinität von Lamin zu diesen Bindungspartnern zu Störungen in der Genexpression führen kann.

Die Hypothese der Zellproliferation basiert auf einem Funktionsverlust des Rb bei einer LMNA-Mutation. Rb spielt eine zentrale Rolle in Zellzyklus-, Proliferations- und Differenzierungsprozessen, indem es die E2F-Transkriptionsfaktoren reguliert. In Skelettmuskelstammzellen konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung von Lamin und Rb wichtig für die Differenzierung der Zelle ist. Im Falle eines mutierten A-Typ-Lamins wurde die Differenzierung inhibiert, da die Lamin-vermittelte, für die Zelldifferenzierung notwendige Sequestrierung von Rb zu sogenannten Kernflecken (*nuclear speckles*) ausblieb (Muralikrishna et al. 2001). Außerdem konnte in Zellen von *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine geringere Zellzyklusrate und eine verringerte Konzentration von Rb festgestellt werden. Fibroblasten von Hutchinson-Gilford-Progerie-Patienten hingegen zeigten eine abnormal hohe

# Einleitung

---

Zellzyklusrate, aber auch eine gesteigerte Apoptoserate, was zu einer vorzeitigen Zellalterung führte (Bridger et al. 2004).

Keines dieser Modelle allein kann jedoch die Pathophysiologie aller Laminopathien erklären. Kombiniert man die Aussagen der Hypothesen, kann man die Entstehungsmechanismen der Erkrankungen zwar besser beschreiben, aber noch ist das Verständnis der Pathophysiologie der Laminopathien nicht ausreichend geklärt.

## 1.3 Dilatative Kardiomyopathie

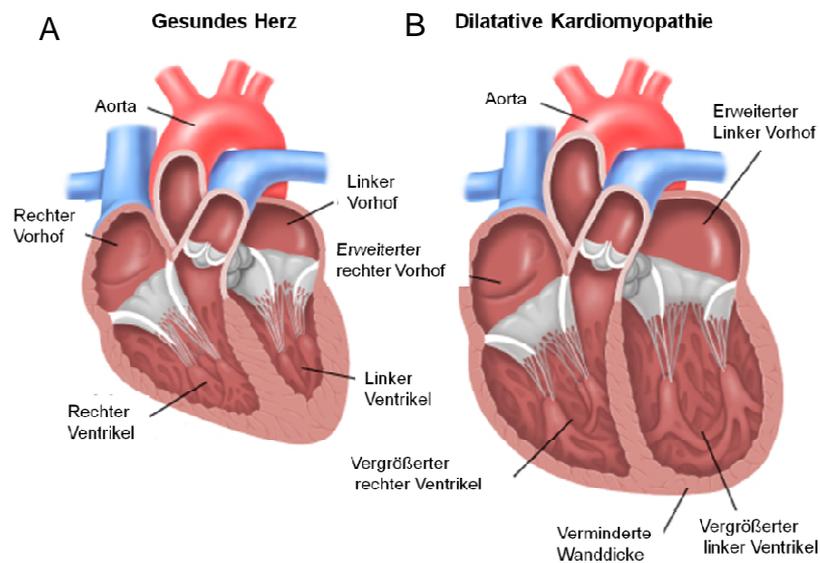
Eine kardiale Beteiligung im Rahmen von Laminopathien äußert sich häufig in Form einer DCM. Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Herzmuskels, assoziiert mit mechanischer und/oder elektrischer Dysfunktion, die üblicherweise, aber nicht zwingend, zu einer Hypertrophie oder Dilatation des Herzens führen und denen unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen, die häufig genetisch sind (Maron et al. 2006). Man kann sie anhand ihres Phänotyps einteilen (s. Tab. 2). Hierbei unterscheidet man zwischen der dilatativen, der hypertrophen, der restriktiven, der arrhythmogenen rechtsventrikulären und der unklassifizierten Kardiomyopathie. Davon abgegrenzt werden die spezifischen Kardiomyopathien, die mit kardialen oder systemischen Erkrankungen assoziiert sind. Beispiele hierfür sind die ischämische, die hypertensive, die entzündliche, die metabolische oder die peripartale Kardiomyopathie.

**Tabelle 2: Einteilung der Kardiomyopathien, modifiziert nach Richardson et al. (1996).**

<b>Kardiomyopathie</b>	<b>Pathophysiologie</b>
Dilatative Kardiomyopathie	Ventrikeldilatation und reduzierte Kontraktilität eines oder beider Ventrikel
Hypertrophe Kardiomyopathie	Links- und/oder rechtsventrikuläre Hypertrophie, die bei der hypertroph-obstruktiven Kardiomyopathie asymmetrisch ist und das interventrikuläre Septum betrifft
Restriktive Kardiomyopathie	Restriktive Füllung und verringerte diastolische Größe eines oder beider Ventrikel bei normaler oder nahezu normaler systolischer Funktion und Ventrikelwanddicke
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	Progressive Degeneration des rechtsventrikulären Myokards mit Ersatz durch Fett- und Bindegewebe
Unklassifizierte Kardiomyopathie	Kardiomyopathien, die nicht in die anderen Kategorien einzuordnen sind

# Einleitung

Die DCM ist gekennzeichnet durch die Erweiterung eines oder beider Ventrikel in Kombination mit einer systolischen Funktionsstörung mit einer reduzierten Ejektionsfraktion (EF) bzw. einer verminderten linksventrikulären Verkürzungsfraction (*fractional shortening*, FS; Dec und Fuster 1994; s. Abb. 3). Bei der DCM kommt es häufig zu einer Abnahme der Wanddicke bei gleichzeitiger Hypertrophie der Myozyten. Die Klappenstruktur ist normal, aber die Ventrikelvergrößerung führt oft zu einer funktionellen Klappeninsuffizienz. Mikroskopisch sieht man eine unterschiedlich ausgeprägte Kardiomyozytenhypertrophie und interstitielle Fibrosierungen.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der DCM.** A, man sieht ein gesundes Herz mit normaler Ventrikelgröße; B, es ist eine ausgeprägte Dilatation der Vorhöfe und Ventrikel zu sehen. Abbildung modifiziert nach [www.medcardiology.com](http://www.medcardiology.com).

Die DCM kann symptomlos sein oder sich als klinisches Bild der Herzinsuffizienz manifestieren. Rhythmusstörungen sind häufig, und der plötzliche Herztod kann in jedem Stadium der Erkrankung auftreten. Die Prävalenz der DCM in den westlichen Industrienationen wird auf 36 Erkrankungen pro 100000 Einwohner und die Inzidenz auf 5-8 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100000 Einwohner geschätzt (Dec und Fuster 1994). Da aber viele Patienten asymptomatisch sind, wird vermutet, dass sogar bis zu 14% der mittelalten und älteren Bevölkerung Kriterien einer DCM aufweisen (Devereux et al. 2001). Die DCM kann genetisch, viral, immunologisch oder toxisch bedingt sein oder mit einer kardiovaskulären Erkrankung assoziiert sein, bei der der Grad der myokardialen Dysfunktion nicht durch das Ausmaß des ischämischen Schadens oder durch die abnorme Vor- bzw. Nachlast erklärbar ist. Außerdem werden ca. 50% der DCM als idiopathische DCM

# Einleitung

---

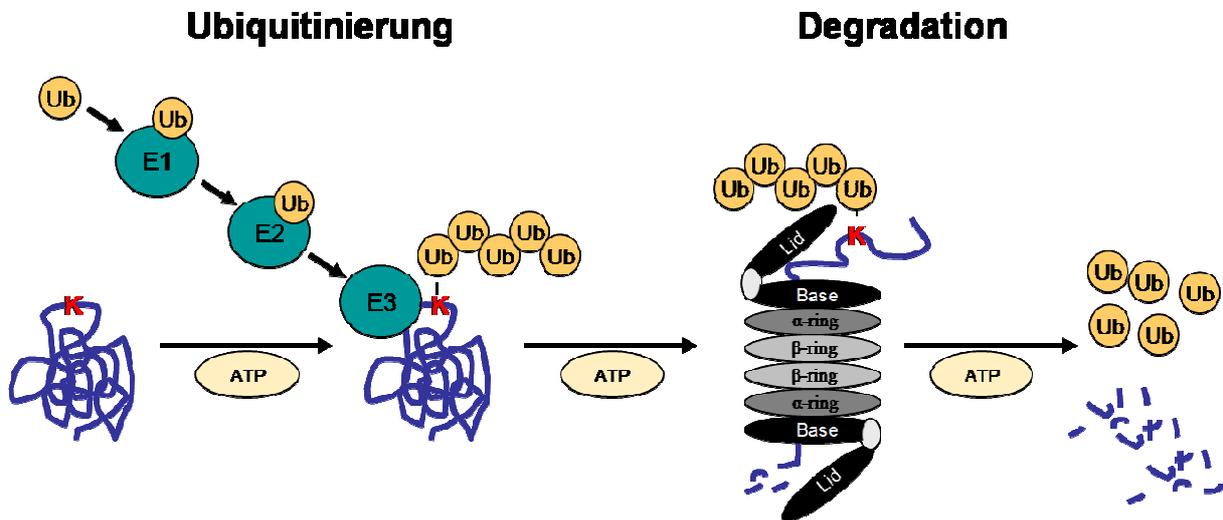
bezeichnet, bei der die Ursache nicht bekannt ist (Richardson et al. 1996; Felker et al. 2000). Da aber gerade die Entdeckung einer genetischen Ursache genaue Untersuchungen des Patienten und seiner Familienmitglieder erfordert, bekommen viele Patienten mit genetischer DCM initial die Diagnose einer idiopathischen DCM. In verschiedenen epidemiologischen Studien wird der Anteil an familiär-bedingter DCM mit 20-35% angegeben (Michels et al. 1992; Goerss et al. 1995; Grunig et al. 1998). Diese unterschiedlichen Zahlen sind durch die verschiedenen Definitionen einer familiär-bedingten DCM erklärbar und davon abhängig, ob nur Verwandte 1. Grades oder auch entferntere und/oder asymptomatische Familienmitglieder eingeschlossen wurden.

## 1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Erste Experimente mit dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell, die in Paris durchgeführt wurden, deuteten darauf hin, dass das mutierte Lamin dieser Mäuse instabil ist und schnell abgebaut wird. In den eukaryotischen Zellen gibt es drei bedeutende Qualitätskontrollsysteme für Proteine: Die Chaperone, die die Proteinfaltung und -stabilisierung unterstützen, die Lysosomen, die zum einen die Mehrheit der Membran- und extrazellulären Proteine durch Endozytose und zum anderen zytosolische Proteine und Organellen mittels Autophagie abbauen, und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das als das bedeutendste proteolytische System der Zelle zytosolische, nukleäre und myofibrilläre Proteine degradiert. Außerdem ist das UPS regulatorisch an biologischen Prozessen wie Zellproliferation, Stressadaptation und dem programmierten Zelltod beteiligt (Mearini et al. 2008). Der Proteinabbau durch das UPS ist durch zwei aufeinanderfolgende Schritte charakterisiert: Die Markierung des Substrats durch Polyubiquitinierung und der anschließende Abbau dieses markierten Proteins durch das 26S-Proteasom. Die als Markierung wirkende Konjugation von Ubiquitin an das Protein findet wiederum in drei Schritten statt: Als erstes aktiviert das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) in einer ATP-abhängigen Reaktion das Ubiquitin. Dann übertragen unterschiedliche Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) das Ubiquitin vom E1-Enzym auf das Substrat. Das Ubiquitin wird daraufhin im dritten Schritt über sein Lysin 48 (K48) kovalent durch die Ubiquitin-Ligase (E3) an das Protein gebunden. Es gibt über 100 verschiedene E3-Ligasen, die immer substratspezifisch sind. Die Polyubiquitinketten entstehen, indem aktivierte Ubiquitin-Moleküle an K48-Reste von vorhergehenden Ubiquitin-Molekülen gebunden werden. Diese Polyubiquitinketten werden dann vom 26S-Proteasom erkannt und das Protein in seinem

# Einleitung

Inneren abgebaut. Hierbei werden die Polyubiquitinketten in einzelne Ubiquitin-Moleküle hydrolysiert, die dann in einem neuen Abbauvorgang wiederverwertet werden können (s. Abb. 4).

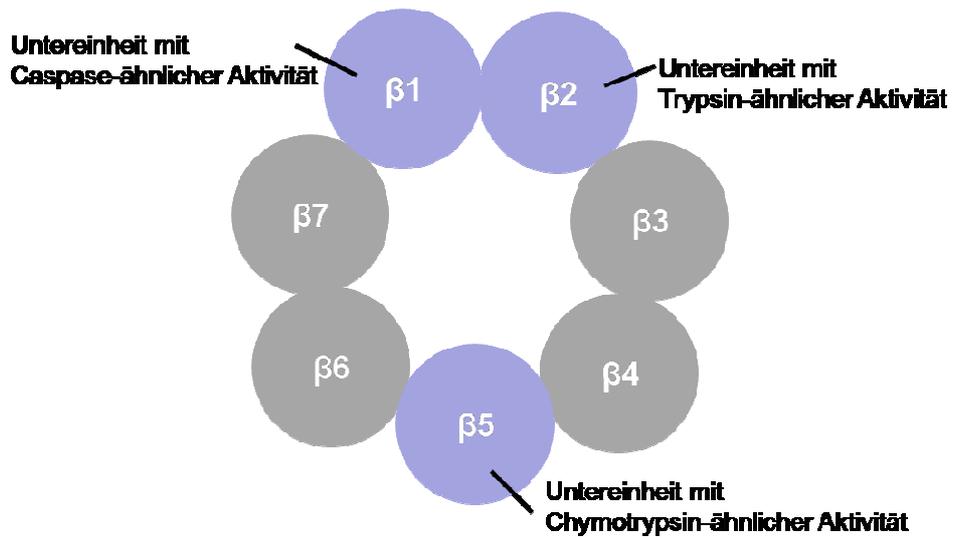


**Abbildung 4: Schematische Darstellung des UPS.** Die Polyubiquitinierung des Proteins, die für den nachfolgenden Abbau durch das 26S-Proteasom notwendig ist, erfolgt in 3 Schritten: 1. die ATP-abhängige Aktivierung von Ubiquitin (Ub) durch das E1-Enzym (Ubiquitin-aktivierendes Enzym), 2. die Übertragung von Ubiquitin auf das Substrat durch das E2-Enzym (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) und 3. die kovalente Bindung von Ubiquitin über Lysin 48 (K48) an das Protein durch die E3-Ubiquitin-Ligase. Das 26S-Proteasom degradiert das Protein anschließend zu kleinen Peptiden und die Polyubiquitinketten werden zu einzelnen Ubiquitin-Molekülen hydrolysiert. Abbildung nach Carrier et al. (2010).

Das eukaryotische 26S-Proteasom besteht aus einer 19S-Bindungskomponente und einem 20S-Komplex, der die proteolytische Aktivität besitzt. Der regulatorische 19S-Komplex besteht aus mindestens 19 verschiedenen Untereinheiten, die in eine Deckel- (*lid*) und eine Basisuntereinheit (*base*) eingeteilt sind (Mearini et al. 2008). Der 19S-Komplex erkennt, bindet, deubiquitiniert und entfaltet die Proteine und reguliert außerdem die Öffnung des 20S-Komplexes, so dass das Protein in das Innere der 20S-Einheit gelangt. Die Enden des 20S-Komplexes können jeweils durch eine 19S-Einheit verschlossen werden. Die zylinderförmige 20S-Einheit besteht aus 4 Ringen, den äußeren  $\alpha$ - und den inneren  $\beta$ -Ringen. Jeder Ring wiederum besteht aus 7 Untereinheiten. Die proteolytische Aktivität sitzt in den Untereinheiten der  $\beta$ -Ringe. Die Caspase-ähnliche Aktivität der  $\beta$ 1-Untereinheit spaltet hinter sauren oder kleinen hydrophoben Aminosäuren, die Trypsin-ähnliche Aktivität der  $\beta$ 2-Untereinheit hinter basischen und kleinen hydrophoben Aminosäuren und die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der  $\beta$ 5-Untereinheit schneidet hinter hydrophoben Resten, unabhängig von ihrer Größe (s. Abb. 5).

# Einleitung

---



**Abbildung 5: Der  $\beta$ -Ring mit seinen Untereinheiten.** Man erkennt die  $\beta 1$ -Untereinheit mit der Caspase-ähnlichen Aktivität, die  $\beta 2$ -Untereinheit mit der Trypsin-ähnlichen Aktivität und die  $\beta 5$ -Untereinheit mit der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität.

Alle drei Aktivitäten können mithilfe von fluorogenen Substraten, die spezifisch gespalten werden, gemessen werden. Bei der Spaltung wird ein Fluoreszenzreporter frei, dessen Fluoreszenz dann bestimmt werden kann. Außerdem ist es möglich, die Aktivitäten mit reversiblen oder irreversiblen Inhibitoren zu hemmen, um dann die Konsequenzen dieser Hemmung, z.B. die Akkumulation eines Proteins, zu analysieren.

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die  $LMNA^{\Delta K32}$ -Mutation wurde in einem Patienten mit  $LMNA$ -assoziierter kongenitaler Muskeldystrophie identifiziert (Quijano-Roy et al. 2008). In Paris wurde eine Mauslinie entwickelt, die diese Mutation in ihrem  $Lmna$ -Gen trägt. Bis jetzt wurde dort in erster Linie der allgemeine Phänotyp untersucht. Dabei wurden niedrigere Lamin A und C Protein-Konzentrationen in den homozygoten Mäusen als in den Wildtyp (WT) -Mäusen beobachtet. Die Tatsache, dass sich die Lamin A und C mRNA-Konzentrationen nicht zwischen den Mausstämmen unterschieden, lässt vermuten, dass die mutierten Lamin A und C Proteine schnell und quantitativ abgebaut werden. Da das UPS das Hauptabbausystem für missgefaltete und mutierte Proteine in der eukaryotischen Zelle darstellt, liegt es nahe, dass das UPS für den Abbau der mutierten Lamine in den homozygoten (und heterozygoten) Mäusen verantwortlich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Punkte sowohl in den homozygoten als auch den heterozygoten Lamin <sup>$\Delta K32$</sup> -Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen untersucht werden:

- Erfassung des kardialen Phänotyps *in vivo* mittels Echokardiographie
- Analyse der Lamin A und C mRNA- und Protein-Konzentrationen
- Evaluation des UPS auf Ubiquitinierungs- und Degradations-Ebene und mittels UPS-Reportermäusen

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bis-Lösung (29:1)	Bio-Rad
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Sigma
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
AmpliTaq Gold <sup>®</sup> -Polymerase	Applied Biosystems
Aqua ad iniectabilia (doppelt destilliertes Wasser)	Baxter GmbH
Benzoyl-Valyl-Glycyl-Arginyl-7-Amino-4-Methylcoumarin (Bz-Val-Gly-Arg-AMC)	Biomol
Benzyloxycarbonyl-Leucyl-Leucyl-Glutamyl- $\beta$ -Naphthylamid (Z-Leu-Leu-Glu- $\beta$ NA)	Biomol
Bromphenolblau	Merck
<i>Complete mini-proteases inhibitor cocktail</i>	Roche Diagnostics
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Applied Biosystems
Enthaarungscreme	Asid Bonz
Difco <sup>™</sup> Trypsin 250	Becton Dickinson
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
<i>Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)</i> mit 4.5 g/l Glukose und ohne Pyruvat	Gibco
Ethidiumbromid	Fluka
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fetales Rind- oder Kalbserum (FBS oder FCS)	Biochrom
<i>Gene Ruler<sup>™</sup> 100 bp</i> DNA-Leiter	Fermentas
Glycerol	Merck
Glycin	Roth
<i>Hank's balanced salt solution (HBSS)</i> , Calcium/Magnesium frei	Gibco

# Material und Methoden

---

Pferdeserum	Biochrom
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Isofluran	Abbott
Isotonische 0.9% Natriumchlorid-Lösung	Baxter GmbH
Kollagenase Typ III	Worthington
Laminin	Roche Diagnostics
<i>Loading dye</i> (Ladepuffer), 6x	Fermentas
M199 mit <i>Earl's</i> Salz und L-Glutamin	Gibco
Methanol	J. T. Baker
MG262	Biomol
Milchpulver	Roth
NaCl	J. T. Baker
NaF	Merck
NaOH	Merck
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom
Phosphokreatin	Calbiochem
Phosphokreatinkinase	Sigma
Ponceau S	Serva
<i>Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems
<i>Precision Plus Protein Standard<sup>™</sup></i>	Bio-Rad
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Roth
Succinyl-Leucyl-Leucyl-Valyl-Tyrosyl-7-Amino-4-Methylcoumarin (SUC-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC)	Calbiochem
<i>SuperSignal<sup>®</sup> West Dura extended duration substrate</i>	Pierce
<i>TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Trizma <sup>®</sup> Base	Sigma
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Ultraschall Kontaktgel	Caesar & Loretz

# Material und Methoden

---

## 2.1.2 Chemikalien mit Risiko (R)- und Sicherheits (S)-Sätzen

Acrylamid/Bis-Lösung	R: 23/24/25-45-46-48	S: 36/37/39-45-60
ATP	R: -	S: 22-24/25
APS	R: 8-22-36/37/38-42/43	S: 22-24-26-37
Bromphenolblau	R: -	S: 22-24/25
DMSO	R: 36/37/38	S: 23-26-36
DTT	R: 22-36/37/38	S: 26-36
Ethidiumbromid	R: 23-68	S: 36/37-45
EDTA	R: 36-52/53	S: 26-61
Glycin	R: -	S: 22-24/25
Methanol	R: 11-23/24/25-39	S: 7-16-36/37-45
NaF	R: 25-32-36/38	S: 22-36-45
NaOH	R: 35	S: 26-37/39-45
PBS	R: -	S: 22-24/25
Ponceau S	R: 36/37/38-51/53	S: 2-25-26-29/56-37-46-57-60-64
SDS	R: 22-36/38	S: 22-24/25
TEMED	R: 11-20/22-34	S: 16-26-36/37/39-45-60
Trizma <sup>®</sup> Base	R: 36/37/38	S: 26-36

## 2.1.3 Antikörper

Anti- $\alpha$ -Actinin, monoklonal	Sigma
Anti-GFP (FL), polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Lamin A/C, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ubiquitin (FK2), monoklonal	Enzo life sciences
Anti- <i>rabbit</i> IgG	Sigma and Dianova
Anti- <i>mouse</i> IgG	Dianova

# Material und Methoden

---

## 2.1.4 Kits

<i>Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit</i>	Sigma
<i>SV Total RNA Isolation Kit</i>	Promega
<i>SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR</i>	Invitrogen

## 2.1.5 Oligonukleotide

Alle Primer und Sonden wurden mithilfe der *Primer Express*-Software oder des Primer3-Programms, online konstruiert und anschließend von der MWG Biotech AG käuflich erworben.

## 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser	Schott Duran
<i>Blotting</i> -Papier (Whatman 3MM)	Schleicher & Schuell
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG
Falcon-Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co.
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt AG & Co.
Latexhandschuhe	Paul Hartmann AG
<i>Multiple well</i> -Platten (96- <i>well</i> )	Sarstedt AG & Co.
Nitrilhandschuhe	Ansell
Nitrocellulosemembran (Protran® BA 85)	Schleicher & Schuell
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co.
Pipettenspitzen (für 10, 100 und 1000 µl Pipetten)	Sarstedt AG & Co.
Serologische Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Sarstedt AG & Co.
Serologische Pipetten (10 ml, weite Spitze)	Becton Dickinson
Sterile Filter (0,22 µm)	Sarstedt AG & Co.
Zellkulturflasche (T75)	Sarstedt AG & Co.
Zellkulturplatten (12 <i>well</i> )	Nalge Nunc International
Zellschaber	Sarstedt AG & Co.
Zellsieb	Becton Dickinson

# Material und Methoden

---

## 2.1.7 Geräte

<i>Accu-jet</i> -Pipettierhilfe	Brand GmbH
Analysenwaage (GENIUS)	Sartorius AG
<i>Blotting</i> -System ( <i>Mini Trans-Blot</i> <sup>®</sup> <i>cell</i> )	Bio-Rad
<i>Chemie Genius</i> <sup>2</sup> <i>Bio imaging</i> -System mit <i>Gene Tools</i> Software	Syngene
Chirurgische Instrumente	Karl Hammacher GmbH
Eismaschine	Scotsman
Elektrophorese-System ( <i>Mini-PROTEAN</i> <sup>®</sup> <i>3 electrophoresis cell</i> )	Bio-Rad
Inkubator ( <i>Hera cell</i> 240)	Heraeus Instruments
Magnetrührer (IKAMAG <sup>®</sup> RCT)	Janke & Kunkel GmbH
Mikroplattenleser (Tecan Safire <sup>2</sup> )	Tecan
Mikrozentrifuge (5415 R)	Eppendorf AG
Mikrowelle	Sharp
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
PCR-Zykler ( <i>GeneAmp</i> <sup>®</sup> <i>PCR System</i> <i>9700</i> )	Applied Biosystems, Thermo Hybaid
pH-Meter	Knick GmbH
Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf AG
Reinstwassersystem (Milli-Q plus)	Millipore
Präzisionswaage ( <i>Precision Advanced</i> )	Ohaus
Rektalthermometer	Physitemp
Spannungsgerät ( <i>power supply</i> )	Bio-Rad
Spektrophotometer ( <i>Smart Spec</i> <sup>™</sup> 3000)	Bio-Rad
Sterilwerkbank (Lamin Air HS 12)	Heraeus Instruments
<i>Taqman ABI Prism</i> 7900HT Sequenz Detektionssystem mit der ABI 7900HT SDS 2.2-Software	Applied Biosystems
<i>Tissue Lyser</i>	Qiagen
Thermomixer komfort	Eppendorf AG
Tragbare Waage (Scout <sup>™</sup> Pro)	Ohaus

# Material und Methoden

---

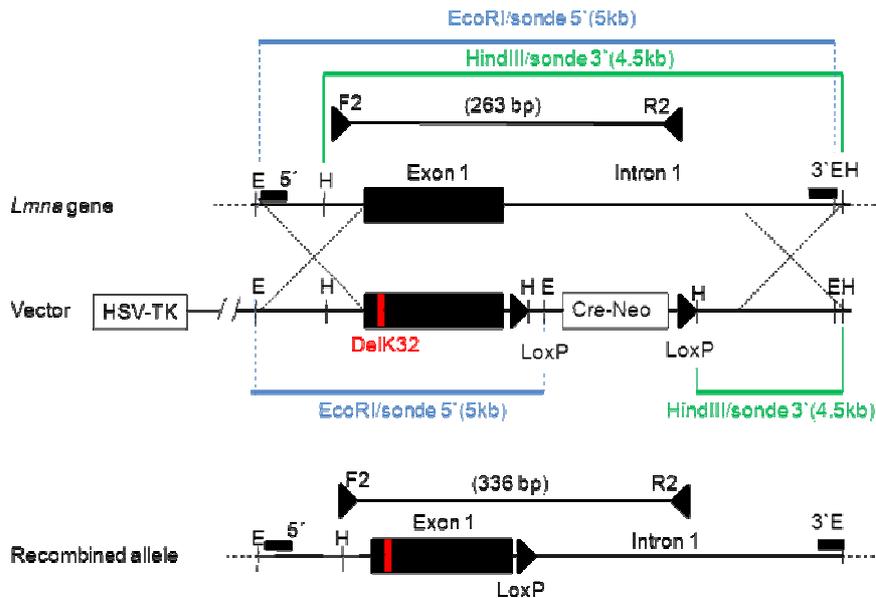
Ultraschallgerät (Visual Sonics Vevo 770 <sup>®</sup> ) mit einer 30-MHz Schallkopffrequenz	Visual Sonics
Vortexer (Vibrofix VF1)	Janke & Kunkel GmbH
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Eppendorf AG

## 2.1.8 Mausmodelle

### 2.1.8.1 Das *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mausmodell

Das durch homologe Rekombination generierte *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mausmodell wurde von Gisèle Bonne und Anne Bertrand des Myologie-Instituts der Pierre et Marie Curie Universität in Paris entwickelt. Bei diesem Mausmodell liegt eine Deletion des Lysins an Position 32 im Exon 1 des *Lmna*-Gens vor (s. Abb. 6). Zur Generierung der Mauslinie wurde ein Maus-BAC-Klon (*bacterial artificial chromosome*), der Exon 1 und Intron 1 des *Lmna*-Gens enthält, mithilfe des Restriktionsenzym NsiI in einen *pGEM*<sup>®</sup>-*T Easy*-Vektor kloniert. Die Deletion des Lysins 32 wurde durch PCR-Mutagenese erreicht, wobei auch eine XhoI-Restriktionsschnittstelle in Intron 1 eingebracht wurde. Als Selektionsmarker wurden eine sich selbst ausschneidende Cre-Neo-Resistenzkassette (Bunting et al. 1999), flankiert von zwei *loxP*-Stellen, und eine HSV-TK-Kassette (Herpes simplex Virus-Thymidinkinase) hinzugefügt. Der *Targeting*-Vektor wurde mithilfe des Restriktionsenzym NsiI linearisiert und anschließend in 129/SvJ embryonale Stammzellen (ES) injiziert. Die homologe Rekombination wurde durch Neomycin-Resistenz und Ganciclovir-Sensitivität überprüft. Nach Identifizierung homolog rekombinanter ES-Zellklone mittels *Southern Blot*, wurden positive ES-Zellklone in C57BL/6-Blastozysten injiziert und diese anschließend in scheinchwangere Mäuse implantiert. Männliche chimäre Nachkommen wurden im nächsten Schritt mit weiblichen C57BL/6-Mäusen verpaart. Während der Vererbung durch die männliche Keimbahn deletierte sich die Cre-Neo-Resistenzkassette durch die Aktivierung der Cre-Rekombinase in den Spermien selbst (Bunting et al. 1999). Die heterozygoten Nachkommen dieser Verpaarung, identifiziert durch *Southern Blot*, wurden dann untereinander gekreuzt, um homozygote Mäuse mit der ΔK32-Mutation zu erhalten.

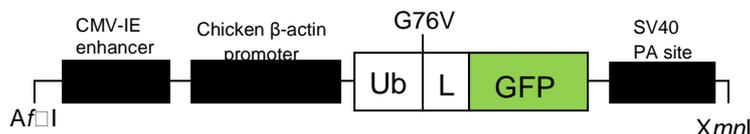
# Material und Methoden



**Abbildung 6: Generierung des *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mausmodells.** Die Deletion des Lysins 32 des *Lmna*-Gens wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erzielt. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von der Arbeitsgruppe Gisèle Bonne (Paris).

## 2.1.8.2 Das *Ub*<sup>G76V</sup>-GFP-Mausmodell

Das *Ub*<sup>G76V</sup>-GFP-Mausmodell wurde freundlicherweise von Nico Dantuma (Mikro- und Tumorbologie Zentrum, Karolinska Institut, Stockholm) zur Verfügung gestellt. Dieses Mausmodell wurde entwickelt, um die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems *in vivo* beurteilen zu können. Es exprimiert ein *Ub*<sup>G76V</sup>-GFP-Reporterprotein, das aus einer N-terminalen Ubiquitin-Mutante besteht (*Ub*<sup>G76V</sup>), welche kovalent mit einem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) verbunden ist. Die Expression dieses Fusionsproteins steht unter der Kontrolle eines Cytomegalievirus *immediate-early* (CMV-IE) *Enhancer* und eines  $\beta$ -Aktin-Promotors (s. Abb. 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des transgenen Konstrukts der *Ub*<sup>G76V</sup>-Mäuse.** Das Transgen enthält den CMV-IE *Enhancer*, den  $\beta$ -Aktin-Promotor, das *Ub*<sup>G76V</sup>-GFP-Fusionsprotein und das SV40 Polyadenylationssignal. Restriktionsschnittstellen sind dargestellt. Die Abbildung ist modifiziert nach Lindsten et al. (2003).

# Material und Methoden

---

Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Transkripte konnten in verschiedenen Geweben gefunden werden, vor allem aber in Skelettmuskel, Herz, Hoden und Kleinhirn. Das N-terminale Ubiquitin-Molekül dient als Akzeptor für Polyubiquitin-Ketten, wobei die G76V-Substitution des Ubiquitins vor dem Abbau durch zelluläre Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen schützt. Dies führt zu einer effizienten Ubiquitinierung mit nachfolgendem proteasomalen Abbau des Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Fusionsproteins. Unter normalen Bedingungen war somit keine GFP-Fluoreszenz unter einem Fluoreszenz-Mikroskop in Kryoschnitten von Geweben adulter Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse sichtbar. Nach Behandlung mit verschiedenen Proteasom-Inhibitoren kam es hingegen zu einer deutlichen Akkumulation des Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Reporterproteins in Fibroblasten und neonatalen Kardiomyozyten. Nach intraperitonealer Injektion des Proteasom-Inhibitors MG262 (5 µmol/kg) in adulte Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse zeigte sich eine detektierbare GFP-Fluoreszenz in Leber, Dünndarm, Pankreas, Nieren und in geringerer Ausprägung auch in Lunge und Milz. In Hirn, Herz und Skelettmuskel konnten keine fluoreszierenden Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop gefunden werden (Lindsten et al. 2003).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Genotypisierung

Die genomische DNA wurde aus Schwanzbiopsien der Mäuse entsprechend der Anleitung des *Extract-N-Amp<sup>TM</sup> Tissue* PCR-Kits isoliert und im Heizblock mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert. Mit der PCR können selektiv Abschnitte der DNA vervielfacht werden. Die Produkte eines Zyklus fungieren als Ausgangsstoffe des nächsten, was eine exponentielle Vervielfältigung möglich macht. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird die DNA bei 94 °C denaturiert und in zwei Einzelstränge getrennt. Als Nächstes erfolgt die Primerhybridisierung (*primer annealing*), bei der sich die Oligonukleotide bei ihrer primerspezifischen Temperatur an die Einzelstränge der DNA anlagern. Im letzten Schritt, der Elongation, werden die neuen Stränge mit freien Nukleotiden durch die DNA-Polymerase verlängert. Wir benutzten für die Genotypisierung eine *Touchdown*-PCR. Hierbei wurde die Spezifität der Primer-Bindung durch zyklusweise Annäherung der *Annealing*-Temperatur mit 1°C pro Zyklus an die zu erwartende Schmelztemperatur des Primers erhöht. Die PCR-Einstellungen und die verwendeten Primer sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet.

# Material und Methoden

Tabelle 3: PCR-Einstellungen für die Genotypisierung

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Min:Sek)	Zyklen
Initiale	94	5:00	1
Denaturierung			
Denaturierung	94	0:30	} 11
Annealing 1	s. Tabelle 4	0:30	
Elongation	72	1:00	
Denaturierung	94	0:30	} 24
Annealing 2	s. Tabelle 4	0:30	
Elongation	72	1:00	
Finale Elongation	72	7:00	1
Lagerung	4	undefiniert	

Tabelle 4: Primer für die Genotypisierung

Mauslinie	Primername	Primersequenz (5`-3`)	AT 1/2 (°C)
Lmna <sup>ΔK32</sup>	Lamin delK32-F	CAAAGTGCGTGAGGAGTTCA	60→55
	Lamin delK32-R	TGACAGCATAGGCCCTGTCAC	
Ub <sup>G76V</sup> -GFP	TG5-1 (s)	CCTACAGCTCCTGGGCAACGT	65→60
	Ub/G76V/-2	TCGACCAAGCTTCCCCACCAC	

AT: Annealing-Temperatur

Die amplifizierte DNA wurde auf ein 1%iges Agarosegel (hergestellt mit 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer), das mit Ethidiumbromid versetzt wurde, aufgetragen. Ethidiumbromid diente dabei dem späteren Sichtbarmachen der Banden, da es in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Als Größenstandard wurde der *Gene Ruler<sup>TM</sup> 100 bp* DNA-Leiter benutzt. Die Detektion der Banden erfolgte mithilfe des *Chemie Genius<sup>2</sup> Bio Imaging-Systems*.

# Material und Methoden

---

## 2.2.2 Organentnahme

Die Organentnahme wurde von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org 370). Die Mäuse wurden unter CO<sub>2</sub>-Narkose durch Dekapitation getötet und anschließend gewogen. Nach einer medianen Thorakotomie und folgender Durchtrennung des Zwerchfells wurde das Herz entnommen, in 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, abgetrocknet und gewogen. Nach Abtrennung der Atrien wurde das Ventrikelgewicht bestimmt. Die Ventrikel wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Zusätzlich wurden für die Bestimmung des Lungen-/Körpergewicht-Quotienten auch die Lungenflügel entnommen, gespült und gewogen. Für die weiteren Experimente wurden die gefrorenen Ventrikel mit einem Stahlmörser in flüssigem Stickstoff zermahlen, und drei Portionen (für RNA-Isolierung, Proteinanalysen und eine Reserveportion) bis zum Gebrauch bei -80 °C eingefroren.

## 2.2.3 RNA-Analysen

### 2.2.3.1 RNA-Isolierung

Zu 30-80 mg gefrorenem Ventrikelpulver (s. 2.2.2) wurden 175 µl Lysepuffer des *SV Total RNA Isolation*-Kits gegeben und anschließend im *Tissue Lyser* homogenisiert. Entsprechend der Anleitung des Kits wurde die RNA extrahiert und die isolierte RNA dann bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmungen der isolierten RNA-Proben erfolgten mit dem NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer. Die RNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit A<sub>260</sub> entspricht 40 µg RNA/ml. Der Absorptionsquotient A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> sollte für eine reine RNA etwa 1,9 - 2,1 sein.

### 2.2.3.3 Reverse Transkription

Entsprechend der Anleitung des *SuperScript™ III First-Strand Synthesis Systems* für RT-PCR wurden 100 ng RNA mithilfe von Oligo(dT)-Primern in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Die Oligo(dT)-Primer binden an den Poly-A-*Stretch* der mRNA, so dass eine vorrangige Umschreibung von mRNA erfolgt. Am Ende der Reaktion lag die cDNA in 20 µl Reaktionsgemisch gelöst vor.

## 2.2.3.4 *Quantitative Echtzeit-PCR*

Die mRNA-Expressionen wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RTq-PCR) mit der durch reverse Transkription entstandenen cDNA mit dem *TaqMan® ABI Prism® 7900HT sequence detection*-System bestimmt. Bei dieser Methode finden Detektion und Quantifizierung des Amplifikationsprodukts in Echtzeit statt. Man kann relative Angaben über die Menge an mRNA bzw. cDNA eines Gens in einer Probe machen. Eine Möglichkeit der Messung besteht darin, für jedes Gen eine fluorogene Sonde (*probe*) zu konstruieren (s. Abb. 8), die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) markiert ist, während das 3'-Ende einen *Quencher*-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethylrhodamin, TAMRA) trägt. Wird die intakte Sonde durch ultraviolettes Licht angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch den *Quencher* aufgrund seiner räumlichen Nähe unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde spezifisch mit dem komplementären Abschnitt des Matrizenstranges zwischen dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer. In der Extensionsphase hydrolysiert die im Reaktionsansatz enthaltene Polymerase (AmpliTaQ Gold®) aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die an die Zielsequenz hybridisierte Sonde. Durch die daraus resultierende Aufhebung der räumlichen Nähe zwischen Reporter und *Quencher* kommt es nach Anregung durch ultraviolettes Licht zu einer messbaren Fluoreszenz, die entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts mit jedem PCR-Zyklus ansteigt und in Echtzeit während des gesamten PCR-Laufs aufgezeichnet werden kann (s. Abb. 8). Durch die statistische Anlagerung der Sonde und Primer ist die Geschwindigkeit des Anstiegs der Fluoreszenz direkt proportional zur Expression des entsprechenden Gens. Zur Quantifizierung kann der Zeitpunkt während des Laufes bestimmt werden, zu dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (*threshold*) übersteigt (Ct-Wert). Da bei jedem Zyklus der PCR eine Verdoppelung der Zielsequenzen stattfindet, gilt: Expression [Gen X] ist proportional zu  $2^{-Ct}$ -Wert.

Die andere Möglichkeit der Quantifizierung ist die Nutzung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® *Green* (s. Abb. 8). Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs ansteigt. Diese wird am Ende der Elongation in jedem Zyklus gemessen. Nach abgelaufener PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wird die DNA durch kontinuierliche Temperaturerhöhung denaturiert, dadurch SYBR® *Green* freigesetzt und eine Abnahme der Fluoreszenz registriert. Die doppelsträngige DNA von

# Material und Methoden

spezifischen PCR-Produkten hat einen höheren Schmelzpunkt als unspezifisch entstehende Primerdimere und kann dadurch als solche erkannt werden. Die Höhe des *Peaks* der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des entstandenen PCR-Produkts.

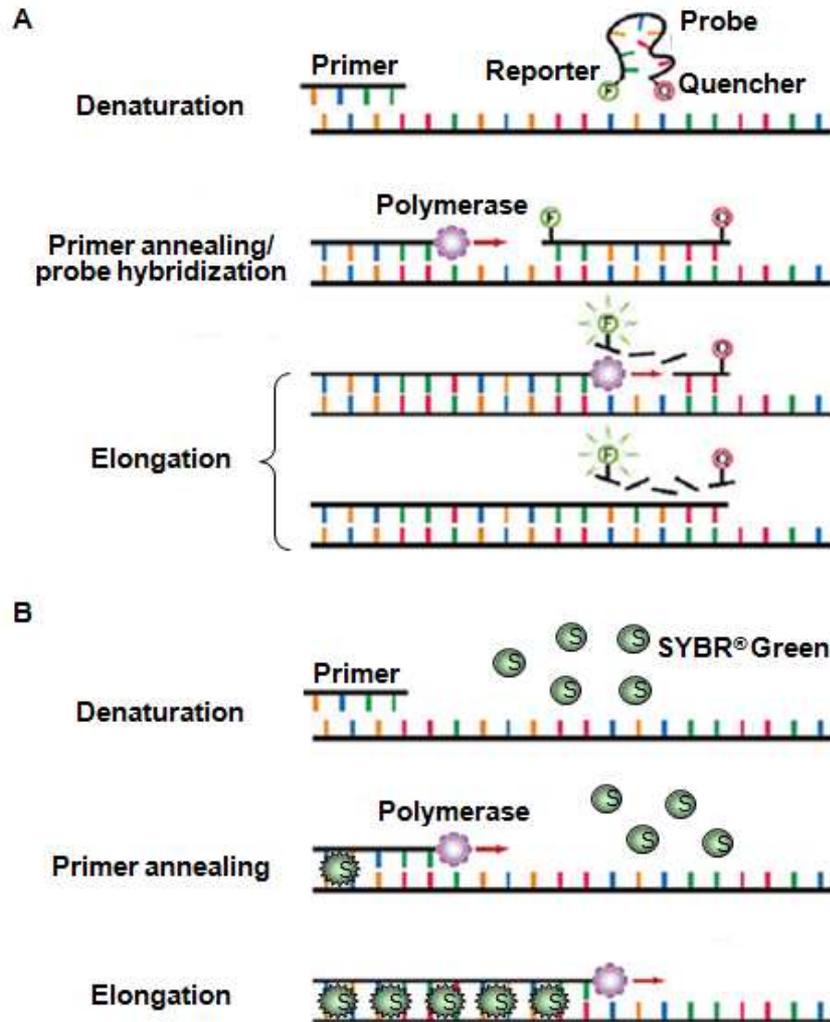


Abbildung 8: Quantitative RT-PCR mit spezifischen *TaqMan*®-Sonden (A) oder *SYBR*® Green (B). Modifizierte Abbildung der Takara Bio USA Webseite.

Als endogene Kontrollen für die RTq-PCRs wurden Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) oder GalphaS verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA auszugleichen (Primer und Sonden s. Tab. 5). Für die quantitative Bestimmung der WT- und mutierten Lamin mRNA wurde die entsprechende cDNA 1:10 verdünnt und mithilfe des dazugehörigen Primerpaares und der Sonde, aufgelistet in Tabelle 6, und dem *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* amplifiziert. Tabelle 7 zeigt das verwendete PCR-Programm.

# Material und Methoden

Tabelle 5: GAPDH- und GalphaS-Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR

Primer/Sonde	Primer/Sonden-Sequenz (5'-3')
GAPDH-F	ATGTTCCAGTATGACTCCACTCAGC
GAPDH-R	GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA
GAPDH-Sonde	AAGCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA
GalphaS-F	CAAGGCTCTGTGGGAGGAT
GalphaS-R	CGAAGCAGGTCCTGGTCACT
GalphaS-Sonde	GCTGATTGACTGTGCCAGTACTTCCT

Tabelle 6: Primer und Sonden der *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mauslinie für die quantitative RT-PCR

Mauslinie	Primer/Sonde	Primer/Sonden-Sequenz (5'-3')
<i>Lmna</i> <sup>ΔK32</sup>	Lamin delK-F	GCCAGCTCTACCCCCTGT
	Lamin delK-R	CAGACTCAGTGATGCGAAGG
	Lamin WT Sonde	TGCAGGAGAAGGAGGACCTGC
	Lamin <i>mutant</i> Sonde	CTGCAGGAGGAGGACCTGCAGG

Tabelle 7: PCR-Programm für die quantitative RT-PCR unter Benutzung der relativen Quantifizierung und des *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix*

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Min:Sek)	Zyklen										
Schritt 1	50	02:00	1										
Schritt 2	95	10:00	1										
Schritt 3	<table style="display: inline-table; border: none;"> <tr> <td style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">{</td> <td style="padding: 0 10px;">95</td> <td style="padding: 0 10px;">}</td> </tr> <tr> <td style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">{</td> <td style="padding: 0 10px;">60</td> <td style="padding: 0 10px;">}</td> </tr> </table>	{	95	}	{	60	}	<table style="display: inline-table; border: none;"> <tr> <td style="padding: 0 10px;">00:15</td> <td style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 10px;">01:00</td> <td style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> </tr> </table>	00:15	}	01:00	}	45
{	95	}											
{	60	}											
00:15	}												
01:00	}												

Für die quantitative Bestimmung der mRNA-Konzentration von Gesamt-Lamin, GFP,  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC wurde ebenfalls 1:10 verdünnte cDNA eingesetzt und mithilfe spezifischer Primer (s. Tab. 8) und dem *Power SYBR*® *Green PCR Master Mix* amplifiziert. Die PCR-Einstellungen sind in Tabelle 9 zu sehen.

# Material und Methoden

**Tabelle 8: Primer-Sequenzen für die quantitative Bestimmung der Gesamt-Lamin, Ub<sup>G76V</sup>-GFP,  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC mRNA-Konzentrationen**

Name	Primer	Primer-Sequenz
Lamin	Lamin delK32-F	CTCCTCCCACTCATCCCAGTC
	Lamin delK32-R	AGCCTTTAGGGTGAAGCTTCG
Ub <sup>G76V</sup> -GFP	Ub <sup>G76V</sup> -GFP-F	AGAACGGCATCAAGGTGAAC
	Ub <sup>G76V</sup> -GFP-R	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG
$\alpha$ -MHC	$\alpha$ -MHC-F	CTCAAGCTCATGGCTACACTCTTCTC
	$\alpha$ -MHC-R	AGAGCAGACACTGTTTGGGAAGGA
$\beta$ -MHC	$\beta$ -MHC-F	GACCAGACCCCAGGCAAGGG
	$\beta$ -MHC-R	GCCAACTTTCCTGTTGCCCC

**Tabelle 9: Das PCR-Programm für die quantitative RT-PCR mittels absoluter Quantifizierung und dem *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix***

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Min:Sek)	Zyklen
Schritt 1	95	10:00	1
Schritt 2	95	00:15	45
	60	01:00	
Schritt 3	95	00:15	1
	60	00:15	
	95	00:15	

Die Messungen wurden für jede Probe in Triplikaten durchgeführt. Die Ct-Werte der endogenen Kontrollen (GAPDH oder GalphaS) wurden von den Ct-Werten der Lamin-Proben subtrahiert ( $\Delta$ Ct). Der Mittelwert aller  $\Delta$ Ct-Werte der WT-Mäuse wurde von jedem einzelnen  $\Delta$ Ct-Wert subtrahiert, das Ergebnis war der  $\Delta\Delta$ Ct-Wert.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  zeigte dann die relative Menge an mRNA in jeder Probe.

## 2.2.4 Proteinanalysen

### 2.2.4.1 Proteinextraktion

Für die Bestimmung der 20S-Proteasom-Aktivität wurde zu 10-80 mg gefrorenem Ventrikelpulver (je nach Herzgröße) das 5-fache Volumen in Mikrolitern des Lysepuffers (1 Tablette *complete mini-proteases inhibitor cocktail* aufgelöst in 10 ml *Aqua ad iniectabilia*)

# Material und Methoden

---

gegeben und anschließend im *tissue lyser* homogenisiert. Um Zell- und Kernmembranen zu zerstören, wurden die Proben dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und aufgetaut und anschließend für 30 Minuten (min) bei 4 °C und 13200 rpm (*rounds per minute*; Umdrehungen pro min) zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und die Proteinkonzentration (s. 2.2.4.2) bestimmt. Auf das *Pellet* wurden 80% des 4-fachen Volumens in Mikrolitern der ursprünglichen Ventrikelpulver-Menge (d.h. bei 40 mg Ventrikelpulver 128 µl) Lysepuffer (3% SDS, 30 mM *tris base*, pH 8,8, 5 mM EDTA, 30 mM NaF, 10% Glycerol) gegeben, hiernach im *tissue lyser* homogenisiert und für 10 min bei Raumtemperatur und 13200 rpm zentrifugiert. Diese Lysate wurden für Western Blot-Analysen verwendet.

## **2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die *Bradford*-Methode benutzt. Der Farbstoff *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue G-250* bildet in saurer Lösung mit kationischen und hydrophoben Seitenketten von Proteinen Komplexe. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich hierbei, verbunden mit einer Farbänderung von rot zu blau, von 470 nm nach 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zu 5 µl des Überstandes der Proteinproben wurden 795 µl 0,1 M NaOH gegeben. Nach Zugabe von 200 µl des Farbstoffes und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Subtraktion der Absorptionswerte einer Leer-Probe (800 µl 0,1 M NaOH und 200 µl Farbstoff) und der Vergleich mit einer Standardkurve (Immunglobulin G) ermöglichten eine relative Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Messung wurde für jede Probe doppelt durchgeführt.

## **2.2.4.3 Western Blot-Analyse**

Western Blot bezeichnet die Übertragung (engl. *blotting*) von Proteinen auf eine Trägermembran. Vor dem eigentlichen Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix entsprechend seiner Größe, Ladung oder anderer Eigenschaften aufgetrennt. Hierbei wird das zu untersuchende Proteingemisch in einem Polyacrylamid-Gel mit optimaler Acrylamid-Konzentration in Proteinbanden aufgetrennt. Danach wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, und die Proteine wandern aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften und können

# Material und Methoden

mithilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Anschließend können die Proteinbanden durch Detektion sichtbar gemacht werden. Es wurden 10 µg Proteinlysate mit Lämmli-Puffer (2% SDS, 10% Glycerol, 10 mM *Tris base*, pH 6,8, 100 mM DTT und 0,01% Bromphenol Blau) versetzt und dann bei 95 °C für 5 min denaturiert. Das Gemisch wurde auf ein 10%iges Polyacrylamid-Gel (Sammelgel: 125 mM *Tris base*, pH 6,8, 5% Acrylamid/Bis (29:1), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,08% TEMED, Trenngel: 375 mM *Tris base*, pH 8,8, 10% Acrylamid/Bis (29:1), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,03% TEMED) aufgetragen und die Proteine zunächst bei 80 V für 10 min und anschließend bei 150 V für ca. 100 min im *Mini Protean 3 Elektrophorese*-System in einem Puffer (25 mM *Tris base*, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) mittels Elektrophorese aufgetrennt. Hierbei wurde der *Precision Plus Protein Standard<sup>TM</sup>* als Molekulargewichtsmarker benutzt. Im nächsten Schritt wurden die Proteine bei 300 mA für 120 min in einem Transfer-Puffer (50 mM *Tris base*, 380 mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol) im *Mini Trans-Blot cell*-System auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Danach wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt, um die transferierten Proteine sichtbar zu machen. Nach dreimaligem Waschen mit einem TBS-T-Puffer (100 mM *Tris base*, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) wurde die Membran in 5%iger Milchlösung (Milchpulver gelöst in TBS-T-Puffer) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt und dann mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert (s. Tab. 10). Nach erneutem dreimaligen Waschen im TBS-T-Puffer wurde für 1 Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach einem letzten Waschdurchgang in TBS-T-Puffer wurde die Membran entsprechend der Anleitung des Kits mit *SuperSignal<sup>®</sup> West Dura* behandelt, das entstandene chemilumineszierende Signal mit dem *Chemie Genius<sup>2</sup> Bio Imaging*-System detektiert und anschließend mit der *Gene Tools Software* quantifiziert.

**Tabelle 10: Antikörper (AK) für die Western Blot-Analysen.** Die ersten AK wurden in TBS-T-Puffer gelöst, die zweiten AK in 5%iger Milchlösung.

<b>Protein</b>	<b>1.AK</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>2.AK</b>	<b>Verdünnung</b>
Lamin A/C	Anti-Lamin	1:2000	anti- <i>rabbit</i> IgG	1:6000
Ubiquitinierte Proteine	Anti-Ubiquitin	1:50000	anti- <i>mouse</i> IgG	1:20000
GFP	Anti-GFP	1:2000	anti- <i>rabbit</i> IgG	1:10000

# Material und Methoden

## 2.2.4.4 Bestimmung der 20S-Proteasom-Aktivitäten

Wie schon in der Einleitung beschrieben, beinhaltet das 20S-Proteasom 3 Peptidase-Aktivitäten: Die Chymotrypsin-Trypsin- und Caspase-ähnliche Aktivität. Alle Aktivitäten können bestimmt werden, indem die durch enzymatische Spaltung von fluorogenen Substraten entstehende Fluoreszenz gemessen wird (s. Abb. 9).



**Abbildung 9: Enzymatische Reaktion während der Degradation durch das 20S-Proteasom.** Um die verschiedenen Aktivitäten des 20S-Proteasoms zu messen, wurden fluorogene Substrate verwendet, bestehend aus Aminosäureketten (AS-AS) und einem Fluoreszenzreporter (FR). Durch enzymatische Spaltung durch eine spezifische Peptidase wurde der Fluoreszenzreporter freigesetzt und somit seine Fluoreszenz messbar.

Die Methode zur Messung der 20S-Proteasom-Aktivitäten wurde adaptiert nach Ludwig et al. (2005). 30 µg des Proteinlysats (s. 2.2.4.1) wurden in einem Inkubationspuffer (225 mM Tris-HCl, pH 8,2, 45 mM KCl, 7,5 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,1 mM DTT), der ein ATP-regenerierendes System (6 mM ATP, 5 mM Phosphokreatin, 0,2 U Phosphokreatinkinase) und ein spezifisches fluorogenes Substrat (s. Tab. 11) enthält, für 1 Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert.

**Tabelle 11: Fluorogene Substrate, die zur Messung der 20S-Aktivität des Proteasoms verwendet wurden.**

20S-Aktivität	Fluorogene Substrat	Konzentration (µM)
Chymotrypsin-ähnliche Aktivität	Succinyl-Leucyl-Leucyl-Valyl-Tyrosyl-7-Amino-4-Methylcoumarin (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC)	60
Trypsin-ähnliche Aktivität	Benzoyl-Valyl-Glycyl-Arginyl-7-Amino-4-Methylcoumarin (Bz-Val-Gly-Arg-AMC)	20
Caspase-ähnliche Aktivität	Benzyloxycarbonyl-Leucyl-Leucyl-Glutamyl-β-Naphtylamid (Z-Leu-Leu-Glu-βNA)	200

Die durch die Fluoreszenzreporter 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) oder β-Naphtylamid (β-NA) entstandene Fluoreszenz wurde im *TECAN Safire<sup>2</sup>*-Mikroplattenleser bei einer Exzitationswellenlänge von 380 nm für AMC und 350 nm für β-NA und einer Emissionswellenlänge von 460 nm für AMC und 450 nm für β-NA gemessen. Jede Probe

## Material und Methoden

---

wurde in Triplikaten gemessen, und der Mittelwert der Leer-Probe (Inkubationspuffer und H<sub>2</sub>O) wurde vom Mittelwert des Triplikats jeder Probe subtrahiert.

### 2.2.5 Echokardiographie

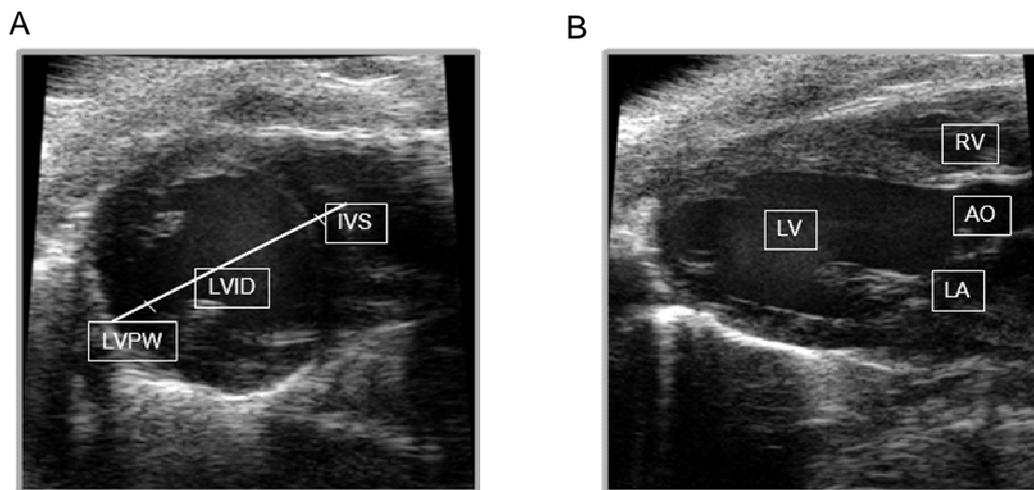
Für die transthorakale Echokardiographie wurde der *Visual Sonics Vevo 770*<sup>®</sup>-Sonograph mit einer Schallkopffrequenz von 30 MHz benutzt. Eine Narkose der Mäuse wurde durch Inhalation von Isofluran erreicht, zunächst in einer geschlossenen Kammer mit einer Konzentration von 3% und während der Ultraschalluntersuchung über eine Gesichtsmaske mit einer Konzentration von 1,8-2%. Die Mäuse wurden auf dem Rücken liegend auf einer beheizten Platte fixiert, und für die Überwachung der Herzfrequenz mit EKG-Elektroden an den Extremitäten versehen. Die Brust wurde mit Enthaarungscreme und einem Wattestäbchen enthaart. Dann wurde die Maus in Linksseitenlage gebracht und Kontaktgel auf die Brust aufgetragen. Im zweidimensionalen EKV<sup>TM</sup>-Modus (EKG-basierte Kilohertz-Visualisierung) wurden Aufnahmen von der parasternalen kurzen Achse auf Höhe der mittleren Papillarmuskeln und von der parasternalen Längsachse gemacht (s. Abb. 10). Zusätzlich wurden die Ventrikeldurchmesser und die Ventrikelwanddicken im M-Mode (M für *motion*) beurteilt. Hierbei erzeugt der Schallkopf einen einzigen Strahl, der mit hoher Pulsrepetitionfrequenz (1000-5000/s) und daher sehr hoher zeitlicher Auflösung (< 1 ms) arbeitet. Reflektierende Strukturen dieses eindimensionalen Strahles werden auf dem Bildschirm entlang der vertikalen Achse dargestellt, horizontal sieht man die Zeitachse. Es wurde während der Untersuchung durch Anpassung der volatilen Anästhesie darauf geachtet, dass sich die Herzfrequenz der Mäuse weitestgehend im physiologischen Bereich befand. Alle Untersuchungsdaten wurden digital gespeichert und im Anschluss ausgewertet. Der linksventrikuläre Durchmesser (*left ventricular internal diameter*, LVID), die Vorderwanddicke (*anterior wall thickness*, AWTh), die Hinterwanddicke (*posterior wall thickness*, PWTh) und die endokardiale (ENDO) und epikardiale (EPI) Fläche wurden jeweils in der Enddiastole (d) und -systole (s) bestimmt. Aus den gemessenen Werten wurden verschiedene Parameter (s. Tab. 12) rechnerisch ermittelt.

# Material und Methoden

**Tabelle 12: Rechnerisch ermittelte Parameter der Echokardiographie.** 1,05 entspricht der spezifischen Dichte des Myokards, t steht für die repräsentative myokardiale Wanddicke, gebildet aus dem Mittelwert der linksventrikulären enddiastolischen Vorder- und Hinterwanddicke.

Parameter	Abkürzung	Formel	Einheit
Linksventrikuläre Verkürzungsfraction ( <i>fractional shortening</i> )	FS	$[(LVIDd - LVIDs) / LVIDd] \times 100$	%
Linksventrikuläre Masse	LVM	$1,05 \times [(5/6 \times EPI d \times (LVIDd + t)) - (5/6 \times ENDOd \times LVIDd)]$	mg
Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction ( <i>fractional area shortening</i> )	FAS	$[(ENDOd - ENDOs) / ENDOd] \times 100$	%
Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen	LVEDV	$5/6 \times LVIDd \times ENDOd$	mm <sup>3</sup>
Linksventrikuläres endsystolisches Volumen	LVESV	$5/6 \times LVIDs \times ENDOs$	mm <sup>3</sup>
Ejektionsfraction	EF	$((LVEDV - LVESV) / LVEDV) \times 100$	%

Alle Messungen erfolgten *offline* mit dem entsprechenden Vevo-Auswertungsprogramm. Der Untersucher war bezüglich des Genotyps verblindet.



**Abbildung 10: Echokardiographische Aufnahme einer WT-Maus.** **A:** Darstellung der parasternalen kurzen Achse auf Höhe der Papillarmuskeln, LVPW= Hinterwand des linken Ventrikels, LVID= linksventrikulärer Durchmesser, IVS= interventrikuläres Septum; **B:** Aufnahme der parasternalen Längsachse. LV= linker Ventrikel, LA= linker Vorhof, AO= Aorta, RV= rechter Ventrikel.

# Material und Methoden

---

## 2.2.6 Isolation von Kardiomyozyten neugeborener Mäuse

Kardiomyozyten neugeborener Mäuse (*neonatal mouse cardiomyocytes*; NMCM) wurden aus mindestens 19 1-4 Tage alten Mäusen nach einem abgewandelten Protokoll von Laugwitz et al (2005) isoliert. Die Organentnahme wurde von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org 366). Die neonatalen Mäuse wurden durch Dekapitation getötet und anschließend thorakotomiert. Die Herzen wurden zügig entnommen und in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier *Hank's balanced salt solution* (HBSS), welche auf Eis stand, gewaschen. Anschließend wurden anhängendes Gewebe und Blutgefäße mit mikrochirurgischen Scheren entfernt, das Herz in 4 Teile geschnitten und erneut in HBSS gewaschen. Es wurde ein Vorverdau mit Trypsin angesetzt. Die Herzfragmente wurden hierfür über Nacht bei 4 °C in 0,5 mg/ml Trypsin-HBSS inkubiert. Nachdem der Ansatz aufgewärmt wurde, folgten fünf Durchgänge eines Verdaus mit 240 U/ml Kollagenase II in HBSS für jeweils 9 min bei 37 °C. Die Zellen wurden in vorgekühltem Kulturmedium (DMEM:M199 3:1, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 1 mM HEPES, 10% Pferdeserum, 5% FCS, pH 7,4) gesammelt und anschließend bei 600 rpm zweimal (8 und 5 min) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und jedes *Pellet* in 37 °C warmen Kulturmedium resuspendiert. Die Suspensionen wurden in 20-25 ml Kulturmedium vereinigt. Zur ersten Aufreinigung wurde die gesamte Zellsuspension in eine T75-Zellkulturflasche pipettiert und für 75 min bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 10%igen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Kardiomyozyten konnten so durch ihre langsamere Anheftung im Vergleich zu Nicht-Kardiomyozyten (z.B. Fibroblasten) angereichert werden (*preplating*). Dieser Aufreinigungsvorgang wurde nach 75 min wiederholt. Die Suspension mit den nicht-angehefteten Zellen, also hauptsächlich Kardiomyozyten, wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und zweimal bei 320 rpm 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer nach Verdünnung mit Kulturmedium und Anfärbung mit Trypanblau ermittelt. Da Trypanblau nur abgestorbene Zellen anfärbt, konnte so die Lebendzellichte bestimmt werden. Die NMCM wurden auf eine Laminin-beschichtete (0,01 mg/ml in 1x PBS) 12-well-Platte mit einer Dichte von  $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und vor der weiteren Behandlung bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 10%igen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre für 4 Tage im Kulturmedium inkubiert.

## **2.2.7 Behandlung von Kardiomyozyten neugeborener Mäuse mit MG262**

Zur Inhibition des UPS wurden die NMCM mit dem reversiblen Proteasom-Inhibitor MG262 behandelt. Nach 4 Tagen Inkubation im Kulturmedium (s. 2.2.6) wurde das Medium verworfen und die NMCM mit 4  $\mu$ M MG262 für 2 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Proteine extrahiert und Western Blot-Analysen durchgeführt.

## **2.2.8 Statistik**

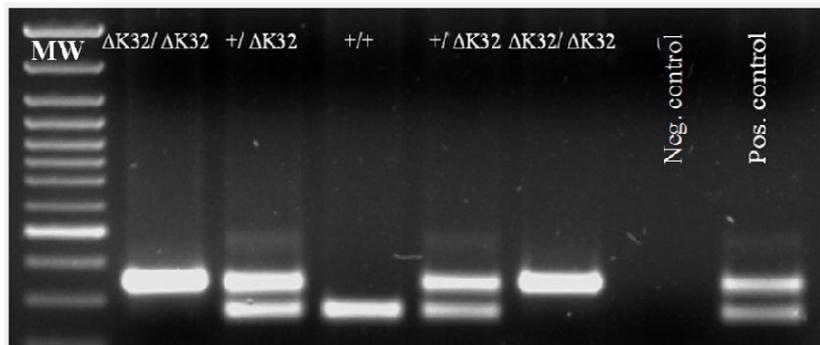
Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetisches Mittel  $\pm$  der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt, berechnet aus den Einzelwerten (n). Die statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten *Student's-t-test* beim Vergleich zweier Gruppen ermittelt. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet und als solcher gekennzeichnet.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Genotypisierung

#### 3.1.1 Genotypisierung der *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mauslinie

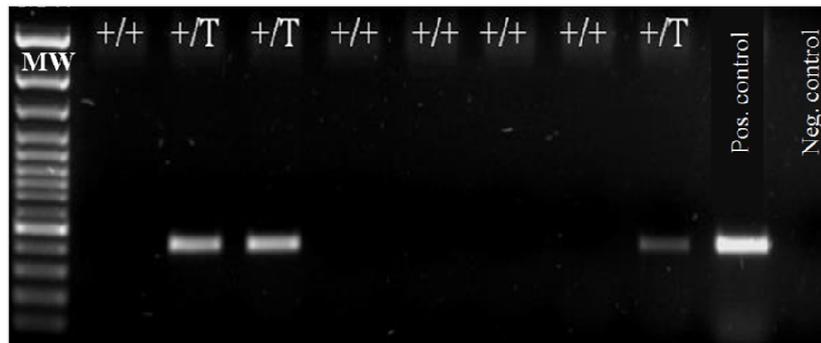
Die Genotypen der homozygoten (*Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>) und heterozygoten (*Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>) *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mäuse und der entsprechenden WT-Mäuse wurden mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien mittels PCR bestimmt. Es wurden Primer verwendet, die spezifisch für Abschnitte in Exon 1 und Intron 1 des *Lmna*-Gens waren. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Die Proben der WT-Mäuse mit zwei WT-Allelen zeigten eine Bande bei 257 bp, die PCR-Produkte der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse mit zwei mutierten Allelen wiesen eine Bande bei 336 bp auf und heterozygote *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>-Mäuse beide PCR-Fragmente (s. Abb. 11). Nach Deletion der Cre-Neo-Resistenzkassette verblieb eine loxP-Sequenz in der DNA, was zu einem 79 bp größeren PCR-Fragment in den homo- und heterozygoten Mäusen führte.



**Abbildung 11: Genotypisierungs-PCR.** Beispielhafte Abbildung eines Agarosegels (1%) zur Darstellung der PCR-Produkte. +/+ steht für die WT-Maus, +/ΔK32 für die heterozygote und ΔK32/ΔK32 für die homozygote Maus. MW steht für den 100 bp-Leiter.

#### 3.1.2 Genotypisierung der Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Mauslinie

Die Genotypen der transgenen Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse und ihrer korrespondierenden WT-Mäuse wurden mittels PCR mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien ermittelt. Hierfür wurden Primer benutzt, die spezifisch für das Transgen waren. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Das erwartete 400 bp große Fragment wurde nur in den transgenen Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen amplifiziert. Bei den WT-Mäusen zeigte sich keine Bande.



**Abbildung 12: Genotypisierungs-PCR.** Beispielhafte Abbildung eines Agarosegels (1%) zur Darstellung der PCR-Produkte. +/+ steht für die WT-Maus und +/T für die transgene Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Maus. MW steht für den 100 bp-Leiter.

## 3.2 Ergebnisse der Untersuchungen der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse

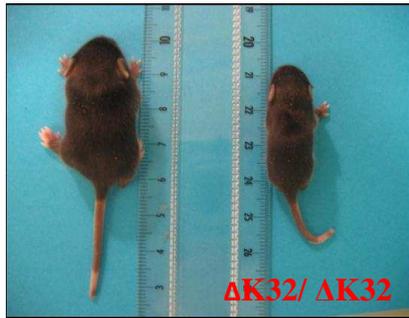
Das *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mausmodell, entwickelt in Paris, ist ein durch homologe Rekombination generiertes Mausmodell. Die *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mutation, also die Deletion des Lysins an Position 32 im *Lmna*-Gen, ist in Exon 1 lokalisiert. Zunächst werden im Folgenden die Ergebnisse der Untersuchungen an den homozygoten (*Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>) Mäusen vorgestellt.

### 3.2.1 Allgemeiner Phänotyp der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse

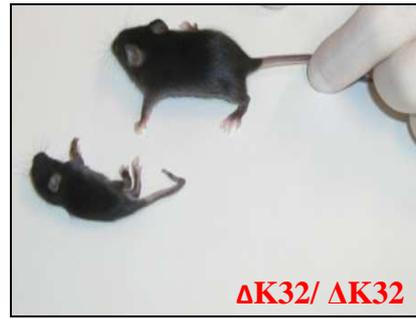
Die *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse waren bei ihrer Geburt in den meisten Fällen nicht von ihren WT-Geschwistern zu unterscheiden. Nur wenige wiesen schon zu diesem Zeitpunkt eine geringere Körpergröße auf. Ab dem 5. Tag war eine starke Verzögerung in der Wachstumskurve der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse zu beobachten. An Tag 12 waren die *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse 40% leichter und kleiner als die WT-Mäuse (s. Abb. 13 und 14). Das Körpergewicht überstieg nie 4 g, im Vergleich dazu wogen die 2 Wochen alten WT-Mäuse durchschnittlich 6 g. Außerdem hatten die *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse einen kürzeren, gekrümmten Schwanz (s. Abb. 13 B) und wirkten sehr schwach. Die jungen *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse konnten zwar laufen, zeigten hierbei aber eine deutliche Verzögerung gegenüber den WT-Mäusen.

# Ergebnisse

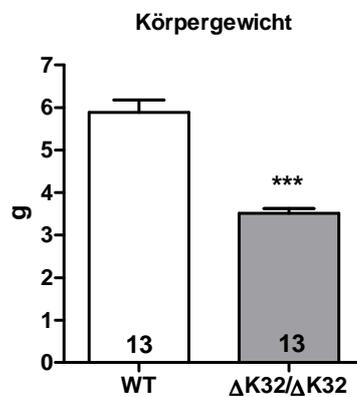
A



B

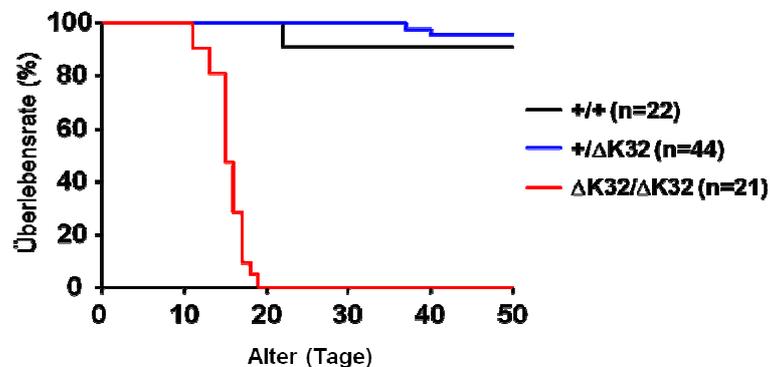


**Abbildung 13: Darstellung von 12 Tage alten Mäusen.** A, links sieht man eine WT-Maus mit 4,5 cm Körperlänge; rechts ist eine 3,5 cm lange  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Maus abgebildet. B, oben im Bild dargestellt, eine WT-Maus. Unten sieht man eine  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Maus mit ihrem kurzen, gekrümmten Schwanz. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von der Arbeitsgruppe Gisèle Bonne (Paris).



**Abbildung 14: Statistische Auswertung des Körpergewichts von 12-15 Tage alten Mäusen, \*\*\*p<0,001.**

Die Überlebensdauer der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse war deutlich geringer als die der WT-Mäuse. Nach 15 Tagen war die Hälfte der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse gestorben, an Tag 19 waren alle tot (s. Abb. 15).



**Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve der  $Lmna^{\Delta K32}$ -Mauslinie.** Die schwarze Kurve steht für die WT-Mäuse, die blaue Kurve für die  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäuse und die rote Kurve zeigt das Überleben der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse.

# Ergebnisse

## 3.2.2 Kardialer Phänotyp der $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse

Sowohl das Herz- als auch das Ventrikelgewicht (*heart weight*, HW; *ventricle weight*, VW) waren bei den  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen mit  $21,8 \pm 2,7$  mg bzw.  $17,7 \pm 0,7$  mg signifikant niedriger als bei den WT mit  $37,7 \pm 2,5$  mg bzw.  $31,7 \pm 2,2$  mg. Hinsichtlich HW/Körpergewicht (*bodyweight*; BW) und VW/BW wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt (s. Abb. 16).

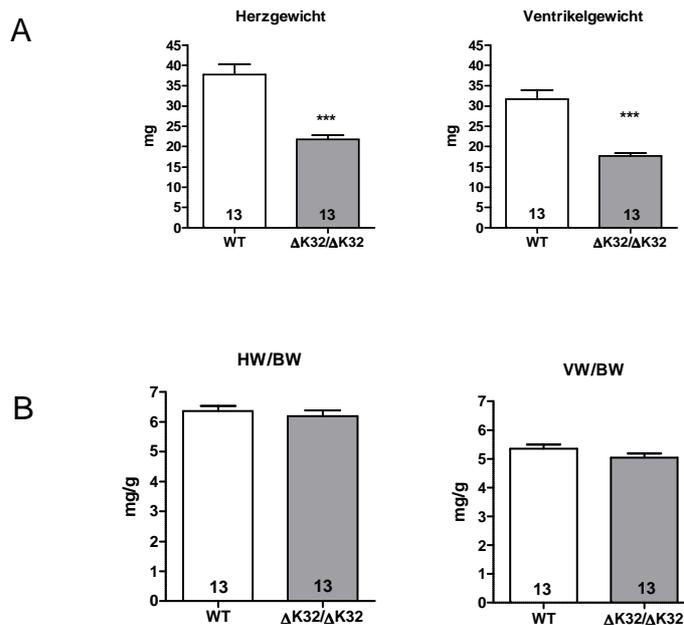


Abbildung 16: Statistische Auswertung des Herz- und Ventrikelgewichts (A), sowie von HW/BW und VW/BW (B) der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen, \*\*\* p<0,001.

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden an zwei Wochen alten WT- (n=10) und  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen (n=9) durchgeführt. Die Herzfrequenz der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse befand sich annähernd im physiologischen Bereich. Es zeigte sich eine 20 bzw. 24% geringere Vorder- bzw. Hinterwanddicke in den  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen (s. Abb. 17).

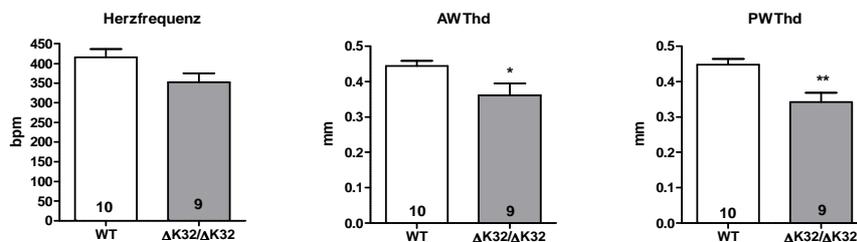


Abbildung 17: Statistische Auswertung der Herzfrequenz und der diastolischen (d) Vorder (AWTh)- und Hinterwanddicke (PWTh) von WT- und  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen, \* p<0,05, \*\* p<0,01.

# Ergebnisse

Auch die linksventrikuläre Masse (LVM) war mit  $16,5 \pm 1,0$  mg bei den  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen deutlich geringer als bei den korrespondierenden WT-Mäusen ( $30,9 \pm 2,4$  mg), wohingegen beim LVM zu BW-Verhältnis kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte (s. Abb. 18).

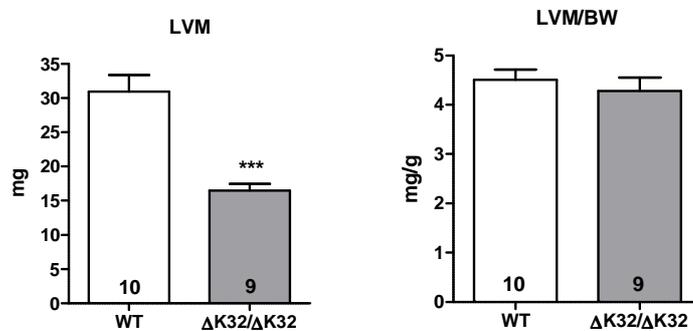


Abbildung 18: Statistische Auswertung der linksventrikulären Masse (LVM) und LVM/BW, \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die echokardiographische Auswertung ergab sowohl für die FS, FAS als auch für die EF keine Unterschiede zwischen den  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ - und WT-Mäusen. Beide Gruppen zeigten mit einer FS  $>30\%$ , einer FAS von  $>45\%$  und einer EF  $>55\%$  eine normale Herzfunktion (s. Abb. 19).

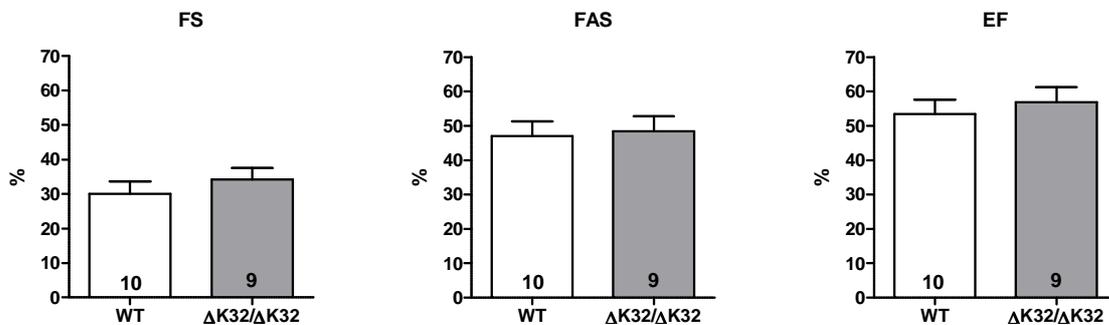


Abbildung 19: Statistische Auswertung der linksventrikulären Verkürzungsfraction (FS), der linksventrikulären Flächenverkürzungsfraction (FAS) und der Ejektionsfraction (EF) von WT- und  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ - Mäusen.

# Ergebnisse

## 3.2.3 mRNA-Analysen in *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen

Die Gesamt-Lamin mRNA-Konzentration wurde in 12-16 Tage alten *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und WT-Mäusen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Als endogene Kontrolle wurde GalphaS verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA auszugleichen. Die mRNA-Konzentration von Gesamt-Lamin unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant (s. Abb. 20).

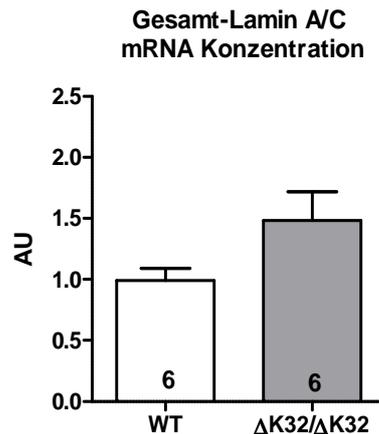
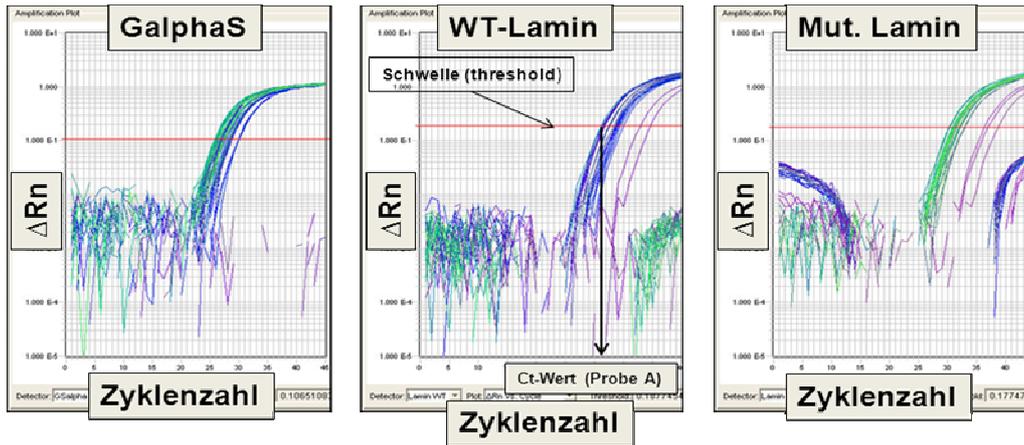


Abbildung 20: Statistische Auswertung der Gesamt-Lamin mRNA-Konzentration von *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und WT-Mäusen.

Um quantitativ die Konzentration von WT-Lamin mRNA im Vergleich zu mutierter Lamin mRNA bestimmen zu können, wurden spezifische Sonden entwickelt (s. 2.2.3.4). Die erste Sonde war komplementär zu einem Abschnitt der WT-RNA und lagerte sich somit an diese an, wohingegen sich die zweite Sonde komplementär an den entsprechenden Abschnitt der mutierten RNA, in der das Lysin an Position 32 deletiert war, anlagerte. Die mRNA-Konzentrationen wurde mittels RTq-PCR mit spezifischen Primern und Sonden bestimmt. Hierfür wurde mRNA bzw. cDNA aus 12-16 Tage alten *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und WT-Mäusen (jeweils n=4) verwendet. Abbildung 21 zeigt die Amplifikationskurven dieses Versuchs. Man erkennt deutlich, dass die WT-Lamin mRNA nur von dem Assay der WT-Mäusen amplifiziert wurde, wohingegen in den Proben der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse ausschließlich mutierte Lamin mRNA amplifiziert wurde. Die blauen gespaltenen Kurven, die rechts in der Abbildung 21 zu sehen sind, entstanden durch unspezifische Bindungsreaktion der Sonde mit der mRNA.

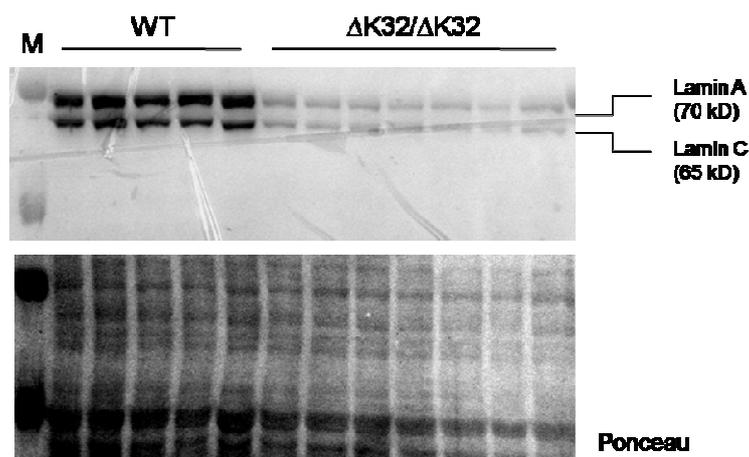
# Ergebnisse



**Abbildung 21:** Die mRNA-Amplifikationskurven der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und WT-Mäuse. ΔRn: Quotient der Emissionsintensitäten des Reporterfarbstoffs und eines Referenzfarbstoffs (ROX). Ct-Wert: die Zykluszahl, an dem die Reporter-Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert (*threshold*) oberhalb des Ausgangswerts erreicht. Links ist die Amplifikationskurve von GalphaS zu sehen, in der Mitte die der WT-Lamin mRNA und rechts die der mutierten Lamin mRNA. Die blaue Kurven entsprechen der mRNA der WT-Mäuse, die grüne Kurven stellen die mRNA der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse dar.

## 3.2.4 Proteinanalyse in *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen

Die Ventrikel wurden aus 12-16 Tage alten *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und WT-Mäusen entnommen, die Proteine extrahiert und anschließend per Western Blot analysiert. Hierzu wurde ein spezifischer Antikörper gegen Lamin A/C benutzt. Die zu erwartenden Banden zeigten sich bei 70 kD für Lamin A und bei 65 kD für Lamin C (s. Abb. 22). Die Protein-Konzentrationen von Lamin A und C waren in den *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen um 80% niedriger als in den WT-Mäusen (s. Abb. 23).



**Abbildung 22:** Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Lamin A und C. Die Banden zeigten sich bei 70 kD für Lamin A und 65 kD für Lamin C. Darunter ist das zugehörige Ponceau-Bild zu sehen. M bezeichnet die Spur des Größenmarkers.

# Ergebnisse

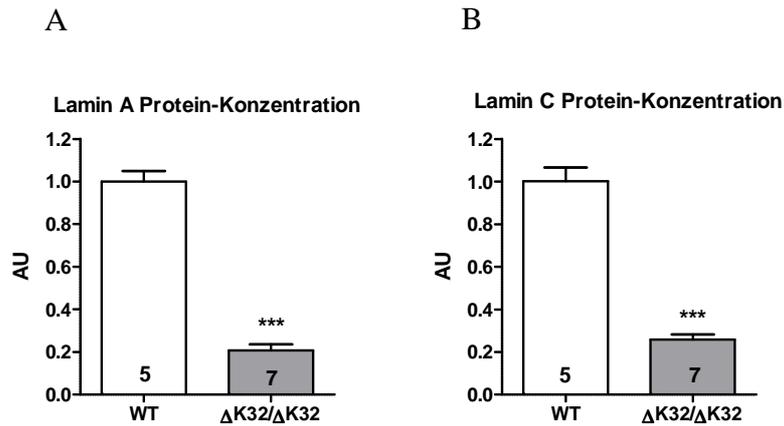


Abbildung 23: Statistische Auswertung der Lamin A Protein-Konzentrationen (A) und der Lamin C Protein-Konzentrationen (B). Es wurde normalisiert auf Ponceau, \*\*\*  $p < 0,001$ . AU: Arbitrary unit (willkürliche Einheit)

### 3.2.5 Bestimmung der 20S Proteasom-Aktivitäten in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen

Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität wurde in den zytosolischen Proteinlysaten 12-16 Tage alter WT- (n=4) und  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse (n=7) bestimmt. Die  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse zeigten eine im Trend ( $p=0,06$ ) niedrigere Chymotrypsin-ähnliche Aktivität als die korrespondierenden WT-Mäuse (s. Abb. 24).

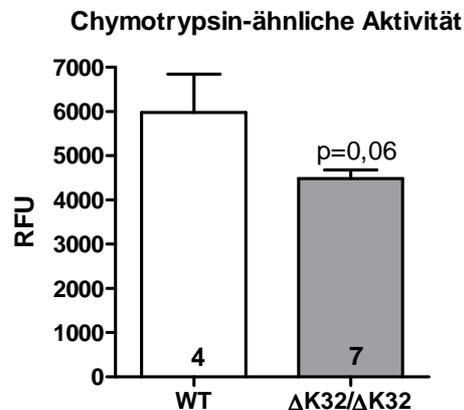


Abbildung 24: Statistische Auswertung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ - und WT-Mäusen. RFU: relative Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units)

Die Trypsin-ähnliche Aktivität wurde in 12-16 Tage alten  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ - und WT-Mäusen (jeweils n=4) bestimmt. Die Aktivität unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht (s. Abb. 25).

# Ergebnisse

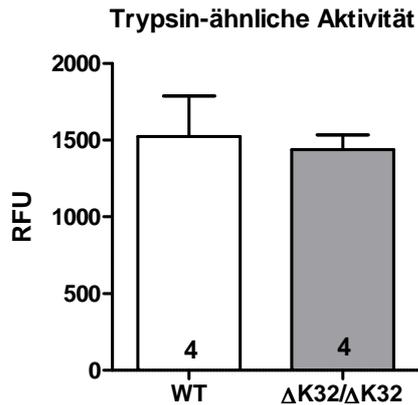


Abbildung 25: Statistische Auswertung der Trypsin-ähnlichen Aktivität in *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> - und WT-Mäusen.

Die Caspase-ähnliche Aktivität konnte auch nach mehrmaligen Versuchen nicht ausgewertet werden, da sich die Messwerte zum Teil im Negativbereich befanden.

### 3.2.6 Behandlung von Kardiomyozyten neugeborener Mäuse mit MG262

Um festzustellen, ob das Proteasom am Abbau des mutierten Lamins in den *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäusen beteiligt war, wurden Kardiomyozyten neugeborener Mäuse für 2 Stunden mit 4  $\mu$ M MG262 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Anschließend wurden die Proteine extrahiert und Western Blot-Analysen durchgeführt, um eine mögliche Stabilisierung der Lamin-Konzentrationen zu erkennen. Es bestätigte sich die um 80% niedrigere Lamin A/C Protein-Konzentration bei den *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäusen im Vergleich zu den korrespondierenden WT-Mäusen (s. 3.2.4). Allerdings zeigte die Behandlung mit MG262 keinen stabilisierenden Effekt auf die Lamin A/C Protein-Konzentrationen (s. Abb. 26 und 27).

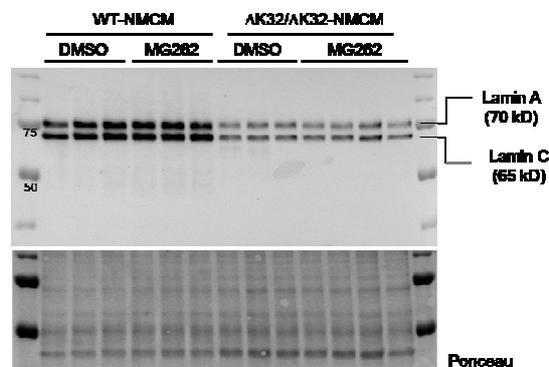


Abbildung 26: Western Blot von WT- und *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -NMCM mit einem spezifischen Antikörper gegen Lamin A und C. Die NMCM wurden mit MG262 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Die Banden zeigten sich bei 70 kD für Lamin A und 65 kD für Lamin C.

# Ergebnisse

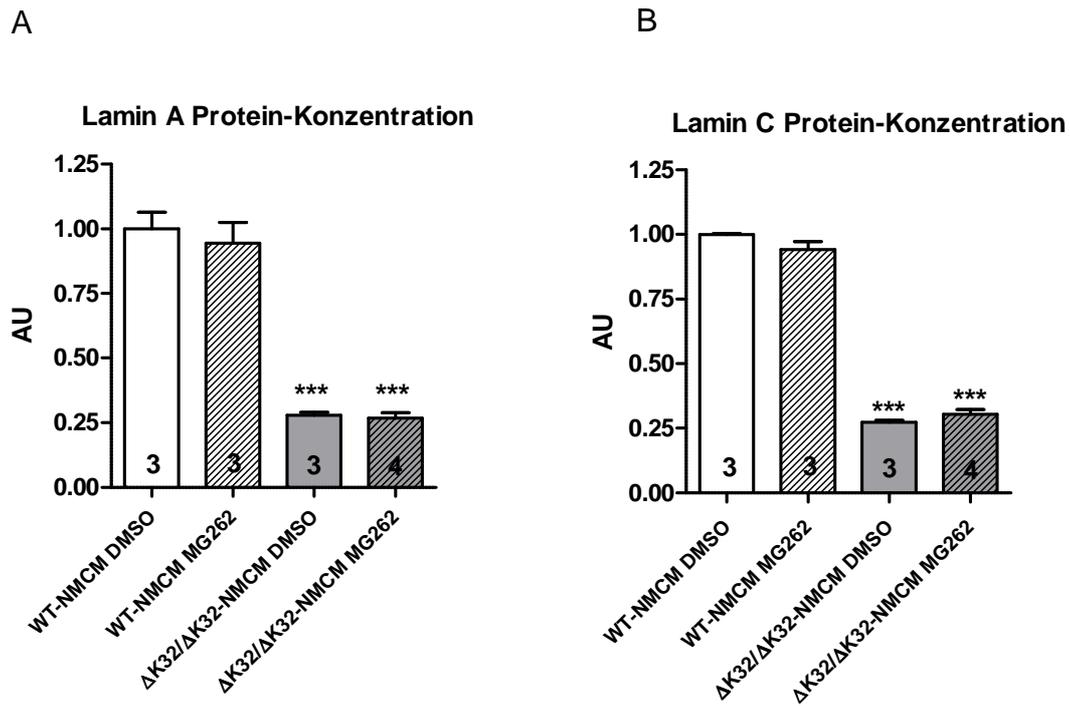


Abbildung 27: Statistische Auswertung der Lamin A Protein-Konzentrationen (A) und Lamin C Protein-Konzentrationen (B) in WT- und  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -NMCM. Es wurde normalisiert auf Ponceau, \*\*\*  $p < 0,001$  gegen den entsprechenden WT.

Da eine Proteasominhibition mit einer Akkumulation ubiquitiniertes Proteine einhergeht, wurde ein Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen diese durchgeführt, um die Wirkung des MG262 zu bestätigen. Die MG262-Behandlung führte zu einem Anstieg der ubiquitinierten Proteine um 140% in den WT-NMCM und um 240% in den  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -NMCM (s. Abb. 28 und 29). Unter Normalbedingungen (DMSO) zeigte sich eine 2,2-fach höhere Konzentration von ubiquitinierten Proteinen in den  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -NMCM im Vergleich zu den WT-NMCM, was auf ein von vornherein geschwächtes UPS hinweist. Auch in  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -NMCM wurden 2-fach höhere Konzentrationen von ubiquitinierten Proteinen als in den WT-NMCM gefunden, ebenfalls ohne Stabilisierung der Lamin Protein-Konzentration.

# Ergebnisse

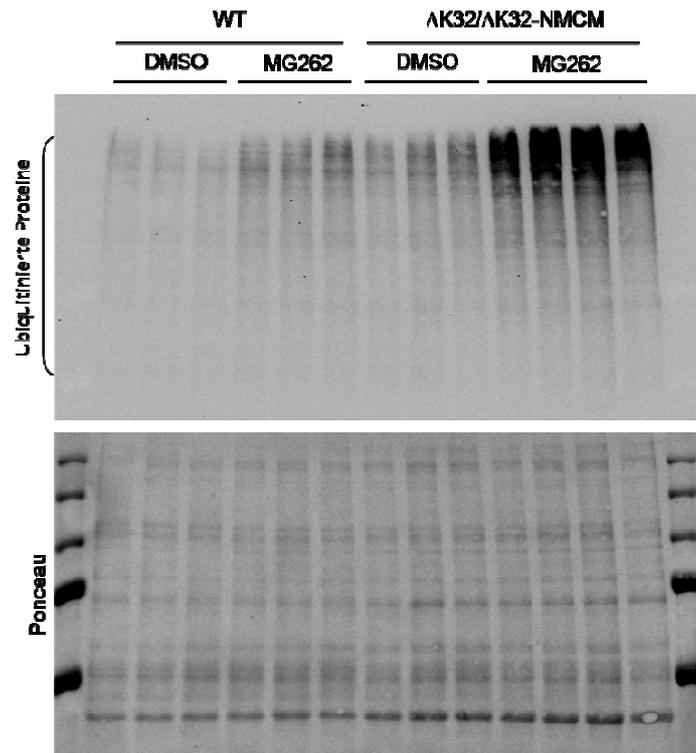


Abbildung 28: Western Blot von WT- und *Lmna*<sup>AK32/ΔK32</sup>-NMCM mit einem spezifischen Antikörper gegen ubiquitinierte Proteine. Die NMCM wurden mit MG262 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt.

Konzentration ubiquitiniertes Proteine

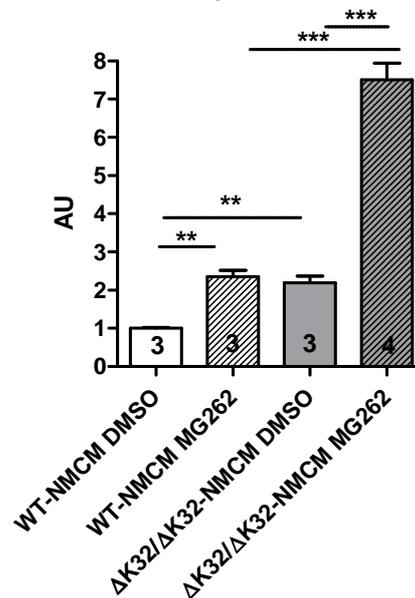


Abbildung 29: Statistische Auswertung der Konzentration ubiquitiniertes Proteine in WT- und *Lmna*<sup>AK32/ΔK32</sup>-NMCM. Es wurde normalisiert auf Ponceau, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

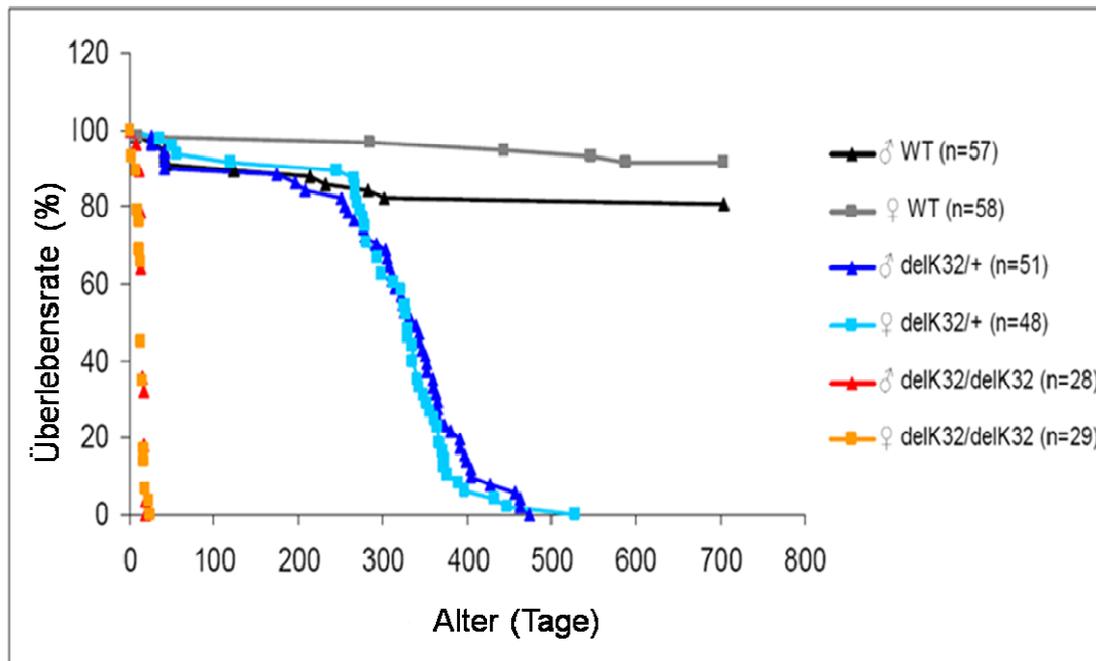
## 3.2.7 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse

- Alle *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse waren kleiner und leichter als die WT-Mäuse und starben nach spätestens 19 Tagen.
- Die Echokardiographie von *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen zeigte eine normale LV-Funktion.
- Die Lamin A/C Protein-Konzentration war in den *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen 80% geringer als in den WT-Mäusen, während sich die Lamin A/C mRNA-Konzentration zwischen den beiden Gruppen nicht unterschied.
- Die Hemmung des Proteasoms in *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen zeigte keinen stabilisierenden Effekt auf Lamin.
- Die Konzentration ubiquitinerter Proteine stieg in den *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen nach Hemmung des Proteasoms deutlich stärker an als in den WT-Mäusen.

## 3.3 Ergebnisse der Untersuchungen der $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse

### 3.3.1 Allgemeiner Phänotyp der $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse

Die  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse entwickelten sich zunächst genau wie die WT-Mäuse. Ab einem Alter von 300 Tagen (42 Wochen) begannen die  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse zu versterben. Mit 380 Tagen (54 Wochen) waren 50% der  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse tot, die Älteste wurde 525 Tage (75 Wochen) alt (siehe Abb. 30).



**Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve der  $Lmna^{\Delta K32}$ -Mauslinie.** Die blaue und die türkisfarbene Kurve zeigen das Überleben der  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse. Die rote und die orangefarbene Kurve stehen für die  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse, die schwarze und die graue Kurve für die WT-Mäuse. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe von Gisèle Bonne (Paris).

Da im Alter von 54 Wochen die Hälfte der  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse verstorben war, wählten wir dieses Alter als einen Zeitpunkt für unsere Untersuchungen. Zusätzlich untersuchten wir die Mäuse im Alter von 16 und 32 Wochen, um den Zeitpunkt des Erstauftretens von Symptomen eingrenzen zu können.

Bezüglich des Körpergewichts waren zu allen 3 Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen  $Lmna^{+\Delta K32}$ - und WT-Mäusen festzustellen. Allerdings erkannte man eine Tendenz zu einem niedrigeren Körpergewicht bei den  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen im Alter von 32 und 54 Wochen (s. Abb. 31).

# Ergebnisse

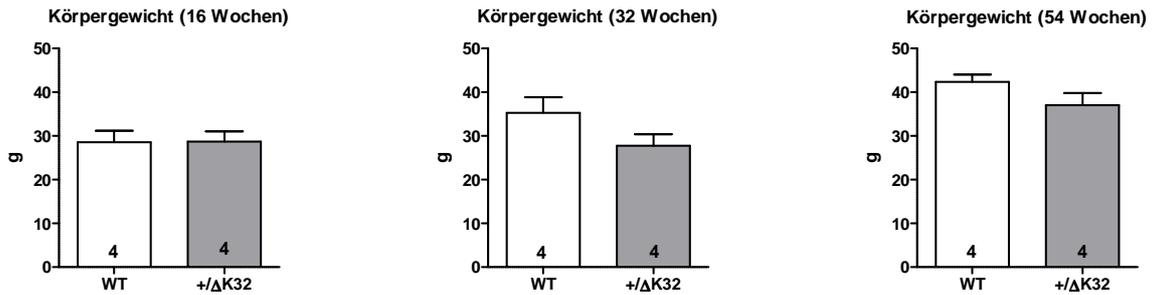


Abbildung 31: Statistische Auswertung des Körpergewichts von 16, 32 und 54 Wochen alten WT- und  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen.

## 3.3.2 Kardialer Phänotyp der $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse

Bei der graphischen Darstellung von HW und VW zeigt sich ein ähnliches Bild wie beim Körpergewicht. Im Alter von 16 Wochen zeigte sich kein signifikanter Unterschied des HW und VW zwischen WT- und  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen, im Alter von 32 Wochen gab es eine Tendenz zu geringeren HW und VW bei den  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen und mit 54 Wochen waren HW und VW der  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse signifikant niedriger (s. Abb. 32).

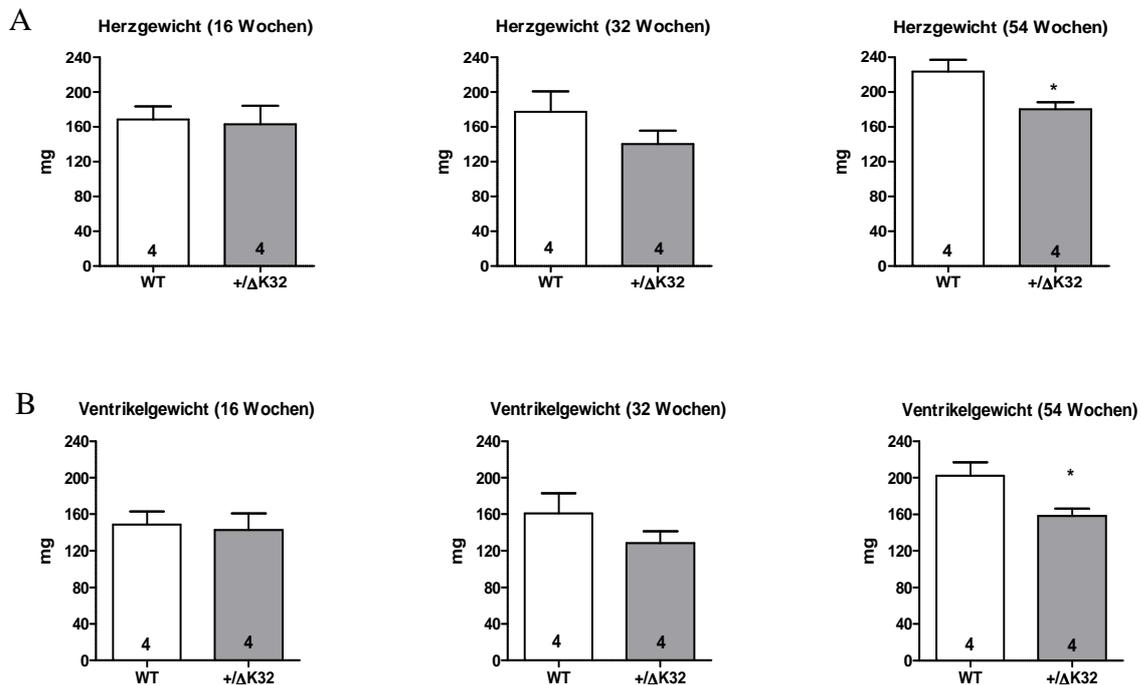


Abbildung 32: Statistische Auswertung von HW (A) und VW (B) von 16, 32 und 54 Wochen alten WT- und  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen, \*  $p < 0,05$ .

HW/BW und VW/BW unterschieden sich zu keinem der drei Zeitpunkte zwischen WT- und  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen (s. Abb. 33).

# Ergebnisse

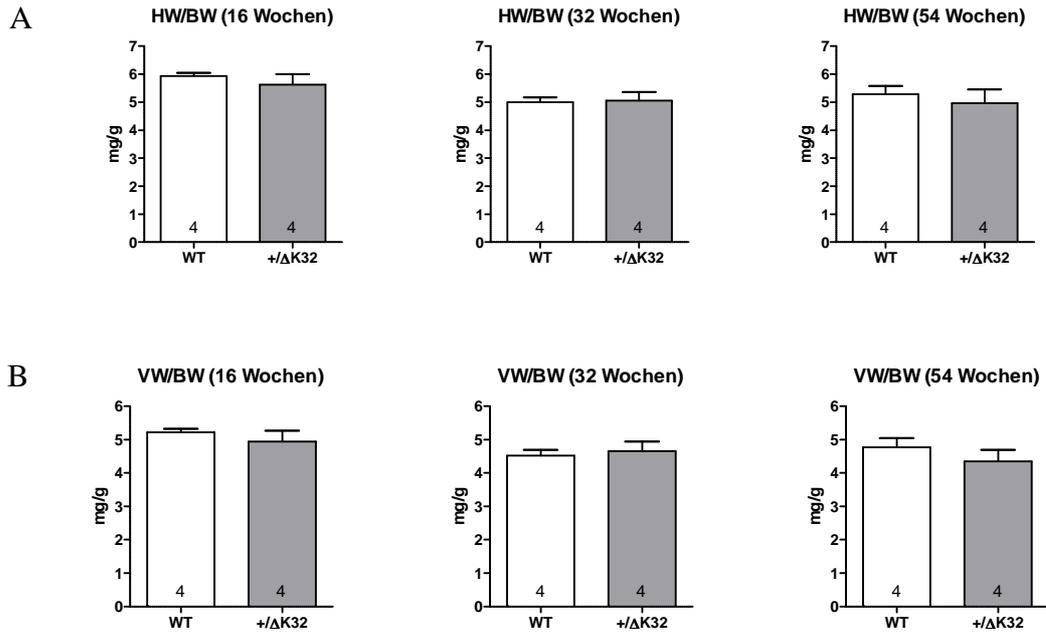


Abbildung 33: Statistische Auswertung von HW/BW (A) und VW/BW (B) von 16, 32 und 54 Wochen alten WT- und *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen.

Sowohl die Vorder- als auch die Hinterwanddicke zeigten bei den *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen im Verlauf eine Abnahme. Bei den 54 Wochen alten Mäusen war sowohl die Vorder- als auch die Hinterwand der *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse 30% dünner als bei den WT-Mäusen (s. Abb. 34).

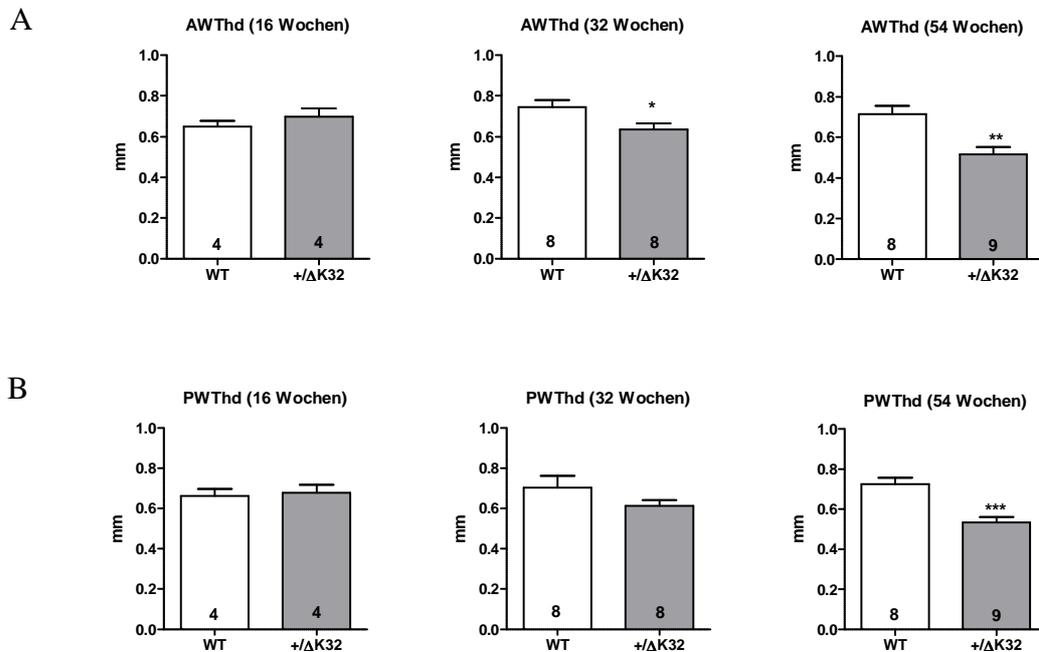


Abbildung 34: Statistische Auswertung der Vorder- (AWThd) und Hinterwanddicke (PWThd) von 16, 32 und 54 Wochen alten WT- und *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

# Ergebnisse

Der linksventrikuläre Durchmesser war bei den den 54 Wochen alten  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen endsystolisch 50% größer und enddiastolisch 14% größer als bei den WT-Mäusen (s. Abb. 35).

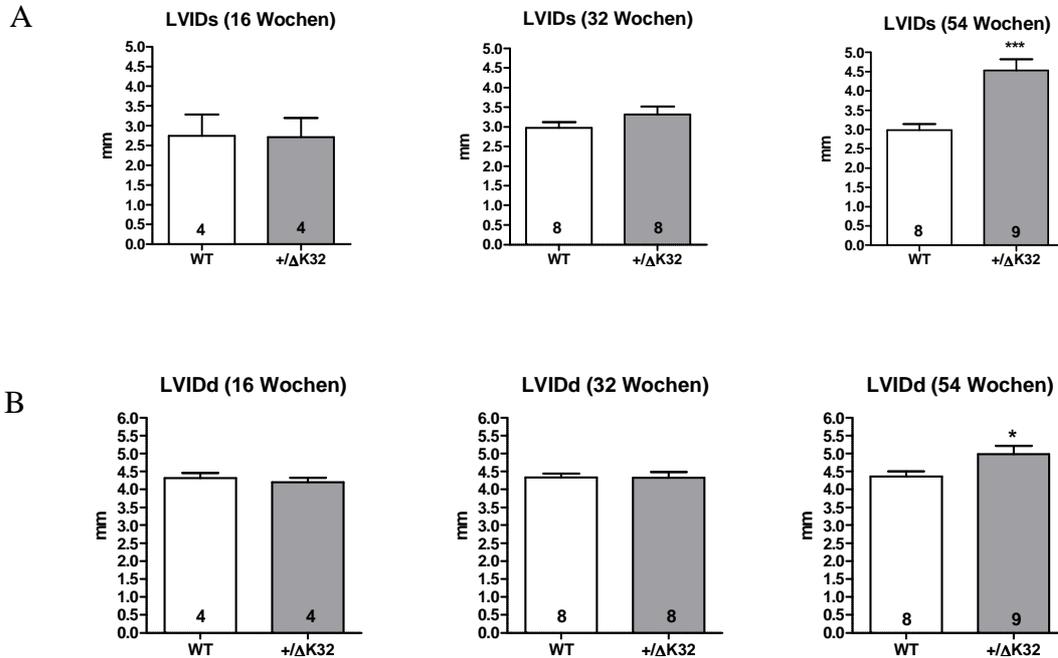


Abbildung 35: Statistische Auswertung des endsystolischen (A) und enddiastolischen (B) linksventrikulären Durchmessers von 16, 32 und 54 Wochen alten WT- und  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p > 0,001$ .

Die 16 Wochen alten  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse zeigten eine normale Herzfunktion, bestimmt durch FS, FAS und EF. Im Alter von 32 Wochen war jedoch bereits eine signifikante Abnahme der FS und FAS um jeweils 20% im Vergleich zu den WT-Mäusen zu erkennen. Die 54 Wochen alten  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse hatten nur noch eine FS von  $9,6 \pm 2,2\%$  (70% weniger als die WT-Mäuse), eine FAS von  $21,8 \pm 4,0\%$  (54% weniger als die WT-Mäuse) und eine EF von  $29,3 \pm 4,2\%$  (45% weniger als die WT-Mäuse; s. Abb. 36).

# Ergebnisse

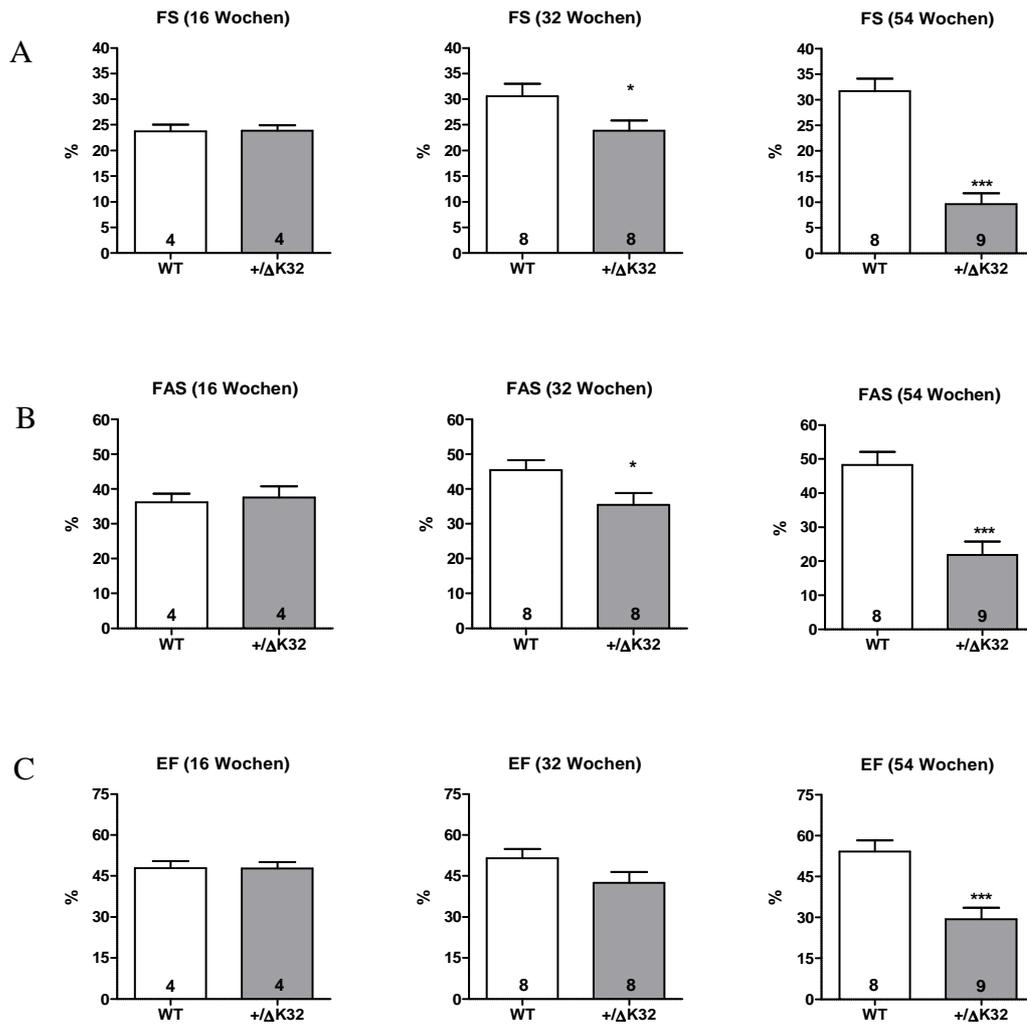
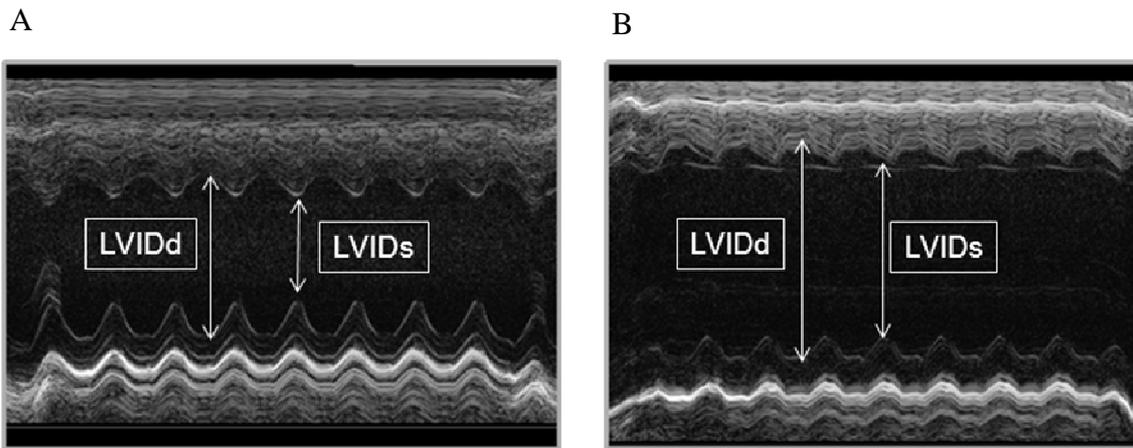


Abbildung 36: Statistische Auswertung der FS, FAS und EF von 16, 32 und 54 Wochen alten Mäusen, \*\*\*  $p < 0,001$ .

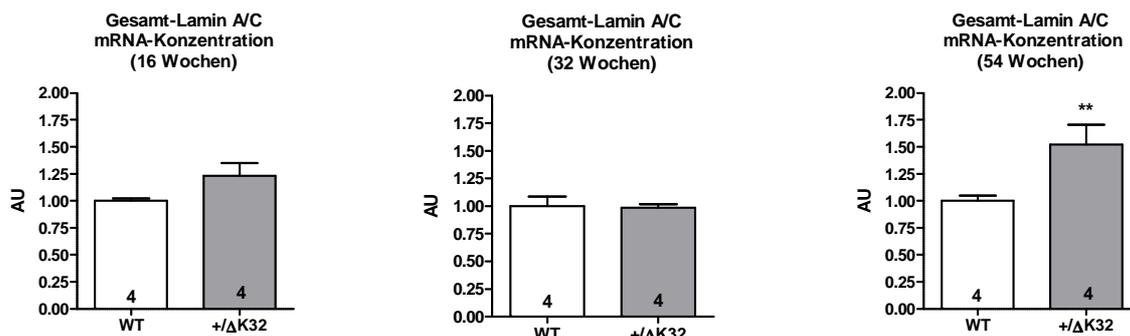
In den echokardiographischen Aufnahmen im M-Mode konnte man die Dilatation der Herzen der 54 Wochen alten Mäusen und die eingeschränkte Beweglichkeit der Ventrikelwände deutlich erkennen (s. Abb. 37).



**Abbildung 37: Beispiele echokardiographischer Aufnahmen im M-Mode von 54 Wochen alten Mäusen.** **A**, zu sehen ist das Herz einer WT-Maus mit normaler Ventrikelwanddicke, Ventrikeldurchmesser und gesunden Wandbewegungen; **B**, das Herz einer *Lmna*<sup>+/-ΔK32</sup>-Maus. Deutlich zu sehen ist die Dilatation des Ventrikels, die ausgedünnten Ventrikelwände und die eingeschränkte Beweglichkeit der Wände.

### 3.3.3 mRNA-Analysen in *Lmna*<sup>+/-ΔK32</sup>-Mäusen

Die Gesamt-Lamin mRNA-Konzentration wurde in 16, 32 und 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/-ΔK32</sup>- und WT-Mäusen (jeweils n=4) mittels RTq-PCR bestimmt. Bei den 16 und 32 Wochen alten Tieren war kein Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. Die 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/-ΔK32</sup>-Mäuse hatten eine um 50% höhere Gesamt-Lamin mRNA-Konzentration als die WT-Mäuse (s. Abb. 38).



**Abbildung 38: Statistische Auswertung der ventrikulären Gesamt-Lamin mRNA-Konzentration von 16, 32 und 54 Wochen alten Mäusen, \*\*p<0,01.**

Die Bestimmung der WT-Lamin mRNA- und der mutierten Lamin mRNA-Konzentrationen wurde mittels RTq-PCR und spezifischen Primern und Sonden durchgeführt. Hierfür wurde mRNA bzw. cDNA von 32 Wochen alten *Lmna*<sup>+/-ΔK32</sup>- und WT-Mäusen und 2 Wochen alten *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen (jeweils n=4) verwendet. Die *Lmna*<sup>+/-ΔK32</sup>-Mäuse hatten, wie erwartet, eine um 50% geringere WT-Lamin mRNA-Konzentration als die WT-Mäuse (s. Abb. 39).

# Ergebnisse

Die  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäuse hatten eine um 60% geringere mutierte Lamin mRNA-Konzentration als die  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse (s. Abb. 39). Wir hätten auch hier eine 50% geringere Konzentration erwartet. Der größere Unterschied in der Konzentration kann durch das unterschiedliche Alter der verglichenen Mäuse erklärbar sein. Die  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse starben alle mit spätestens 3 Wochen, so dass kein Vergleich mit älteren Tieren möglich war.

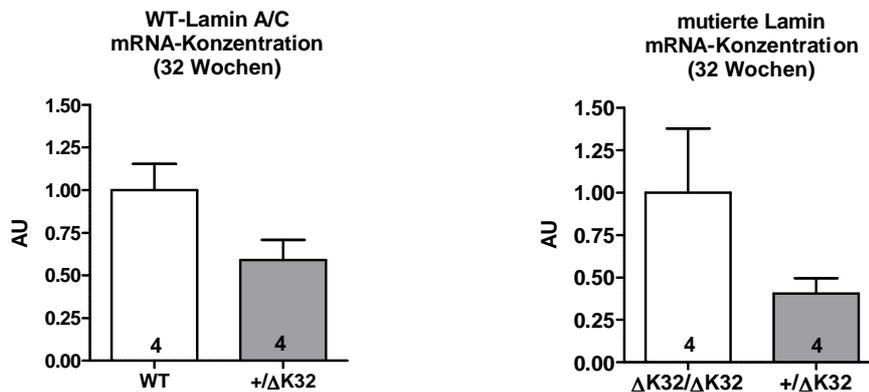


Abbildung 39: Statistische Auswertung der WT-Lamin und mutierten Lamin mRNA-Konzentrationen von 32 Wochen alten  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen bzw. 2 Wochen alten  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen.

Außerdem untersuchten wir die mRNA-Konzentrationen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC (*myosin heavy chain*) als Marker des kontraktiven Apparates des Herzens. Die Konzentrationen wurden in 32 und 54 Wochen alten WT- und  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen (jeweils n=4) bestimmt. Während im Alter von 32 Wochen noch kein Unterschied der mRNA-Konzentrationen zwischen den Gruppen festgestellt wurde, zeigte sich in den 54 Wochen alten  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen eine um 45% niedrigere  $\alpha$ -MHC- und eine 7-fach erhöhte  $\beta$ -MHC mRNA-Konzentration als in den WT-Mäusen (s. Abb. 40).

# Ergebnisse

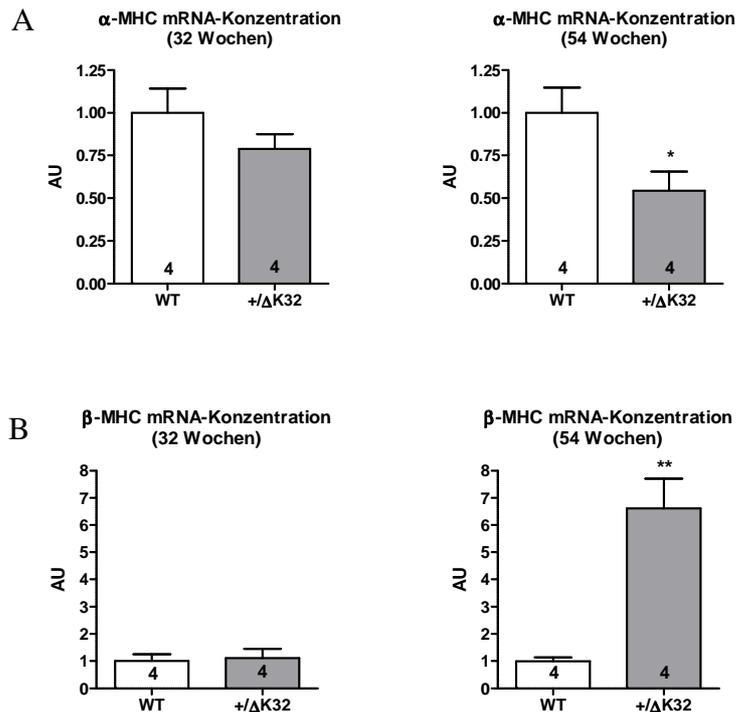
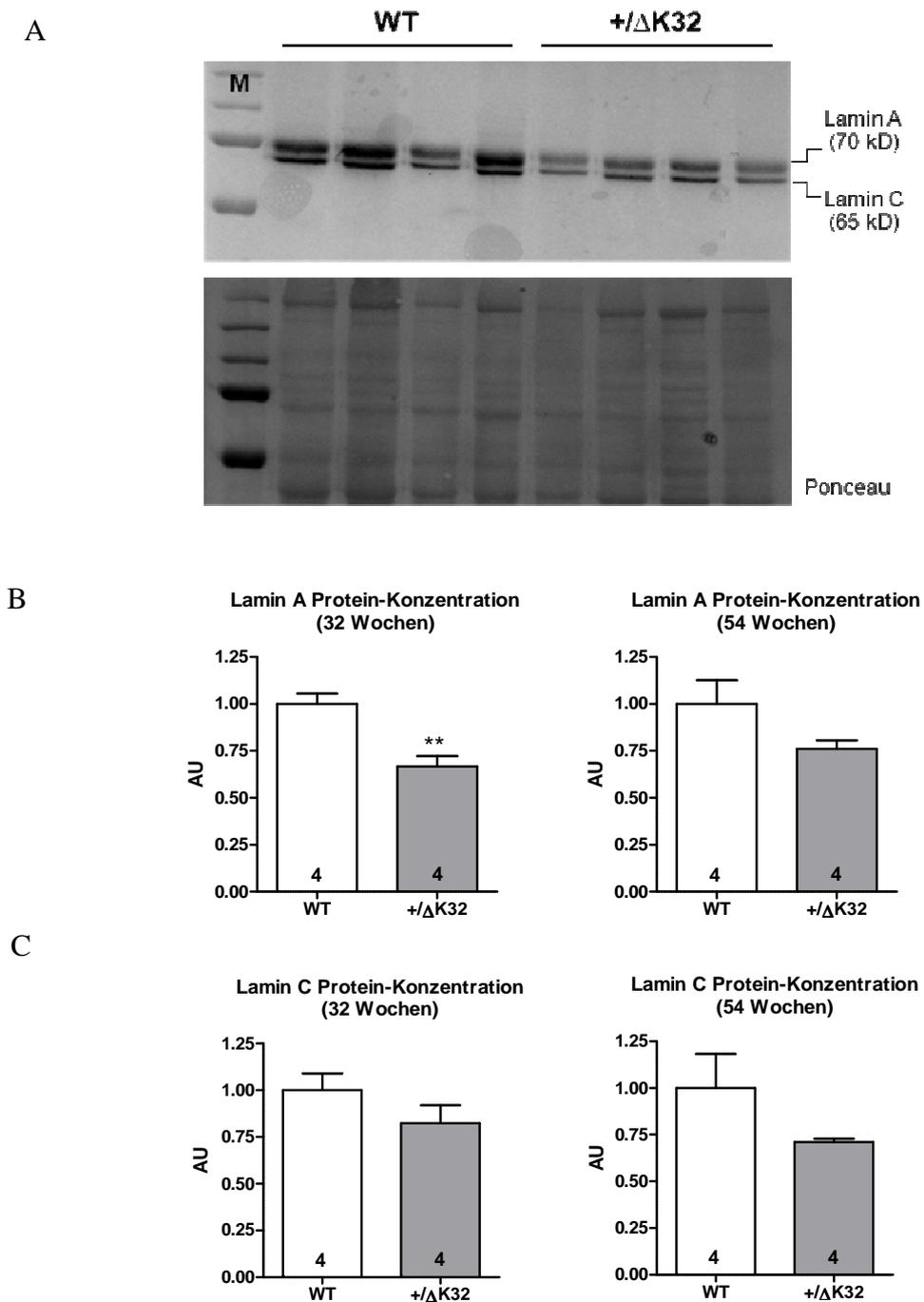


Abbildung 40: Statistische Auswertung der  $\alpha$ - (A) und  $\beta$ -MHC (B) mRNA-Konzentrationen von 32 und 54 Wochen alten Mäusen, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$ .

### 3.3.4 Proteinanalysen in den $Lmna^{+/ΔK32}$ -Mäusen

Die Ventrikel wurden aus  $Lmna^{+/ΔK32}$ - und WT-Mäusen (jeweils  $n=4$ ) entnommen, die Proteine extrahiert und anschließend per Western Blot analysiert. Hierzu wurde ein spezifischer Antikörper gegen Lamin A/C benutzt. Die zu erwartenden Banden zeigten sich bei 70 kD für Lamin A und bei 65 kD für Lamin C (s. Abb. 41 A). Es zeigte sich eine um 33% geringere Lamin A Protein-Konzentration in den 32 Wochen alten  $Lmna^{+/ΔK32}$ -Mäusen als in den WT-Mäusen. Im Alter von 54 Wochen unterschied sich die Konzentration zwischen  $Lmna^{+/ΔK32}$ - und WT-Mäusen hingegen nicht signifikant (s. Abb. 41 B). In Experimenten, die parallel in Paris von der Arbeitsgruppe von Gisèle Bonne durchgeführt wurden, bestätigten sich diese Ergebnisse. Die Lamin C Protein-Konzentration zeigte keinen Unterschied zwischen 32 Wochen alten  $Lmna^{+/ΔK32}$ - und WT-Mäusen. Dies könnte aber durch einen Auswertungsfehler bedingt sein, da die zwei auszuwertenden Banden sehr nah beieinander liegen (s. Abb. 41).

# Ergebnisse



**Abbildung 41: A, Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Lamin A und C. Die Banden zeigten sich bei 70 kD für Lamin A und 65 kD für Lamin C, M bezeichnet die Spur des Größenmarkers. Statistische Auswertung der Lamin A Protein-Konzentration (B) und der Lamin C Protein-Konzentration (C) von 32 und 54 Wochen alten Mäusen.**

# Ergebnisse

Zusätzlich wurde die Konzentration ubiquitinerter Proteine mittels spezifischer Antikörper in den jeweiligen Altersgruppen bestimmt. Sowohl in den 16, 32 als auch den 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen zeigte sich eine Tendenz zu höheren Konzentrationen im Vergleich zu den WT-Mäusen, jedoch ohne signifikanten Unterschied (s. Abb. 42). Interessanterweise zeigte sich insbesondere eine Zunahme der ubiquitinerter Proteine mit niedrigen Molekulargewichten, während die Konzentration von Proteinen mit höheren Molekulargewichten eher abnahm.

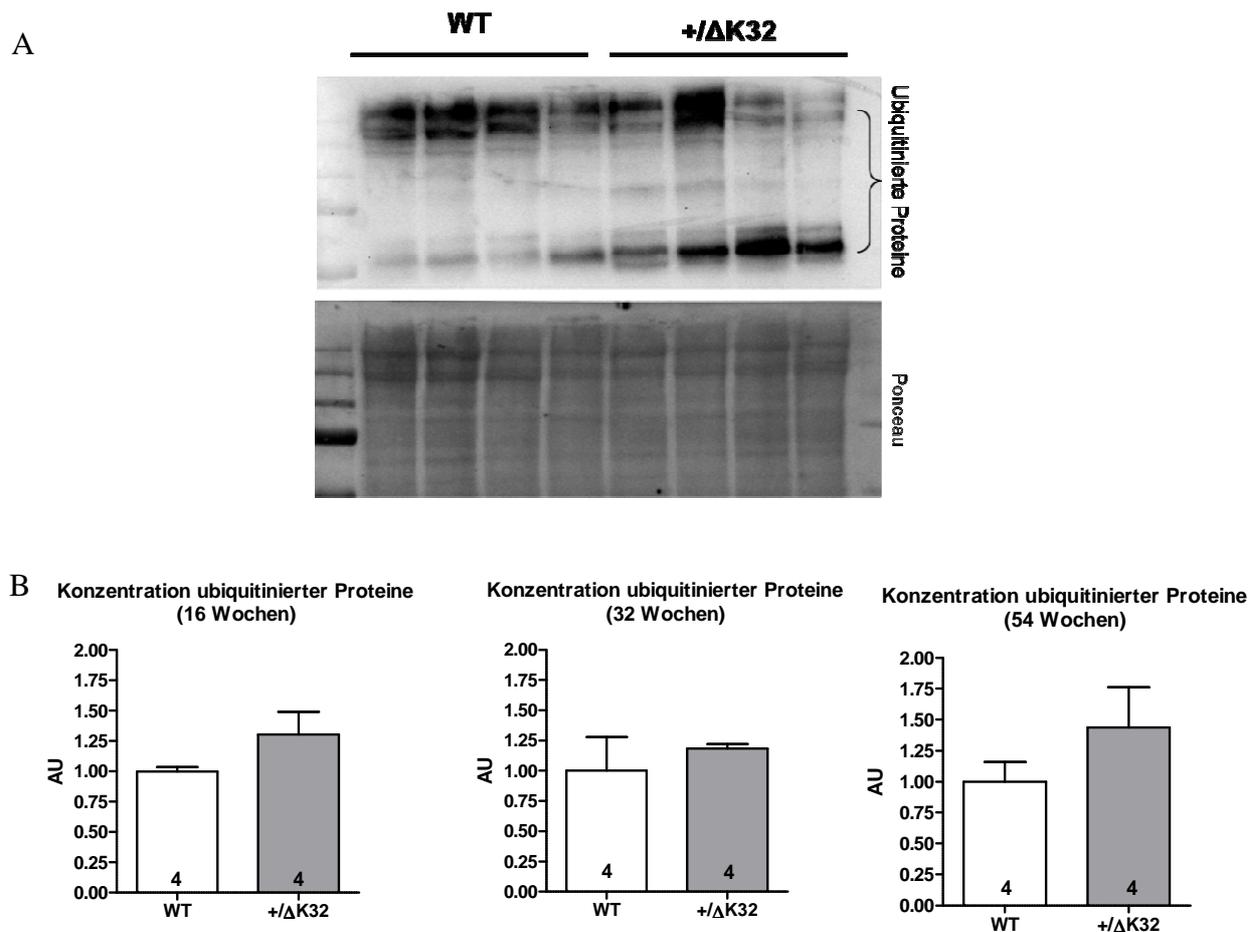


Abbildung 42: A, Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen ubiquitinierte Proteine. B, statistische Auswertung der Konzentration ubiquitinerter Proteine von 16, 32 und 54 Wochen alten Mäusen.

### 3.3.5 Bestimmung der 20S Proteasom-Aktivität in *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen

Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (CT-Aktivität) wurde in den zytosolischen Proteinlysaten von 16, 32 und 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>- und WT-Mäusen (jeweils n=4) bestimmt. Zusätzlich bekamen wir aus Paris Proben von 4 *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen, die sich im Endstadium (46-75 Wochen alt) befanden, und von 5 ebenso alten WT-Mäusen. Die

# Ergebnisse

Ergebnisse waren in allen Altersgruppen identisch. Es zeigte sich eine Tendenz zu einer höheren CT-Aktivität in den *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen, jedoch ohne Signifikanz (s. Abb. 43).

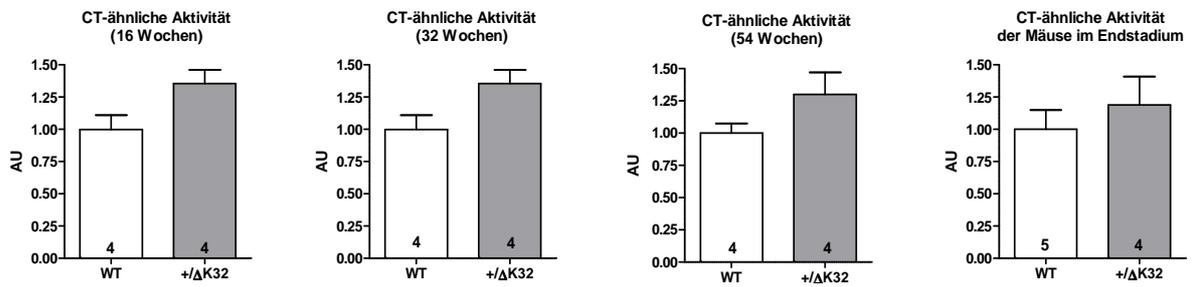


Abbildung 43: Statistische Auswertung der CT-ähnlichen Aktivitäten der 16, 32 und 54 Wochen alten Mäuse und der Mäuse im Endstadium.

## 3.3.6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse

- Die *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse entwickelten sich hinsichtlich Größe und Gewicht ähnlich wie die WT-Mäuse. Im Alter von 54 Wochen waren 50% der *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse tot.
- Ab einem Alter von 32 Wochen nahm die kardiale LV-Funktion der *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen ab. Mit 54 Wochen zeigten sie eine deutlich reduzierte kardiale Funktion und eine beginnende Dilatation des linken Ventrikels.
- Die *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse hatten geringere Lamin A/C Protein-Konzentrationen als die WT-Mäuse bei gleichen Lamin A/C mRNA-Konzentrationen. In den 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen waren die mRNA-Konzentrationen sogar höher als in den WT-Mäusen.
- In den *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen zeigte sich eine Tendenz zu höheren Konzentrationen ubiquitiniertes Proteine und höherer CT-ähnlichen Aktivität als in den WT-Mäusen.

## 3.4 Ergebnisse der Untersuchungen der $Lmna^{+/\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse

Für diese Arbeit wurden die Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse mit  $Lmna^{\Delta K32}$ -Mäusen gekreuzt, um in der entstandenen  $Lmna^{\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mauslinie die Aktivität des UPS *in vivo* beurteilen zu können (s. Abb. 44). Bei Beeinträchtigung der Funktion des UPS kommt es zu einer messbaren Akkumulation des GFP-Reporters. Für die Untersuchungen der  $Lmna^{\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Linie wurden 24 Wochen alte Mäuse gewählt. Es wurden Proben von Mäusen verwendet, die heterozygot ( $Lmna^{+/\Delta K32}$ ) für die Lamin-Mutation waren und positiv für das Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Transgen.

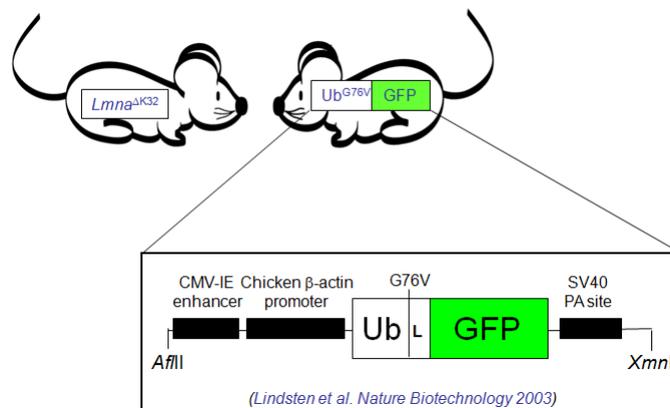


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Kreuzung der  $Lmna^{\Delta K32}$ -Mauslinie mit der Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Mauslinie.

### 3.4.1 Phänotyp der $Lmna^{+/\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse

Die  $Lmna^{+/\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse unterschieden sich phänotypisch nicht von den  $Lmna^{+/+}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen. BW, HW und VW waren bei den  $Lmna^{+/\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen im Vergleich zu den  $Lmna^{+/+}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen nicht verändert. Ebenso zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich HW/BW und VW/BW (s. Abb. 45). Zusammengefasst zeigten sich bei den  $Lmna^{+/\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen, genau wie bei den jüngeren  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen, keine offensichtlichen phänotypischen Unterschiede zu den WT-Mäusen.

# Ergebnisse

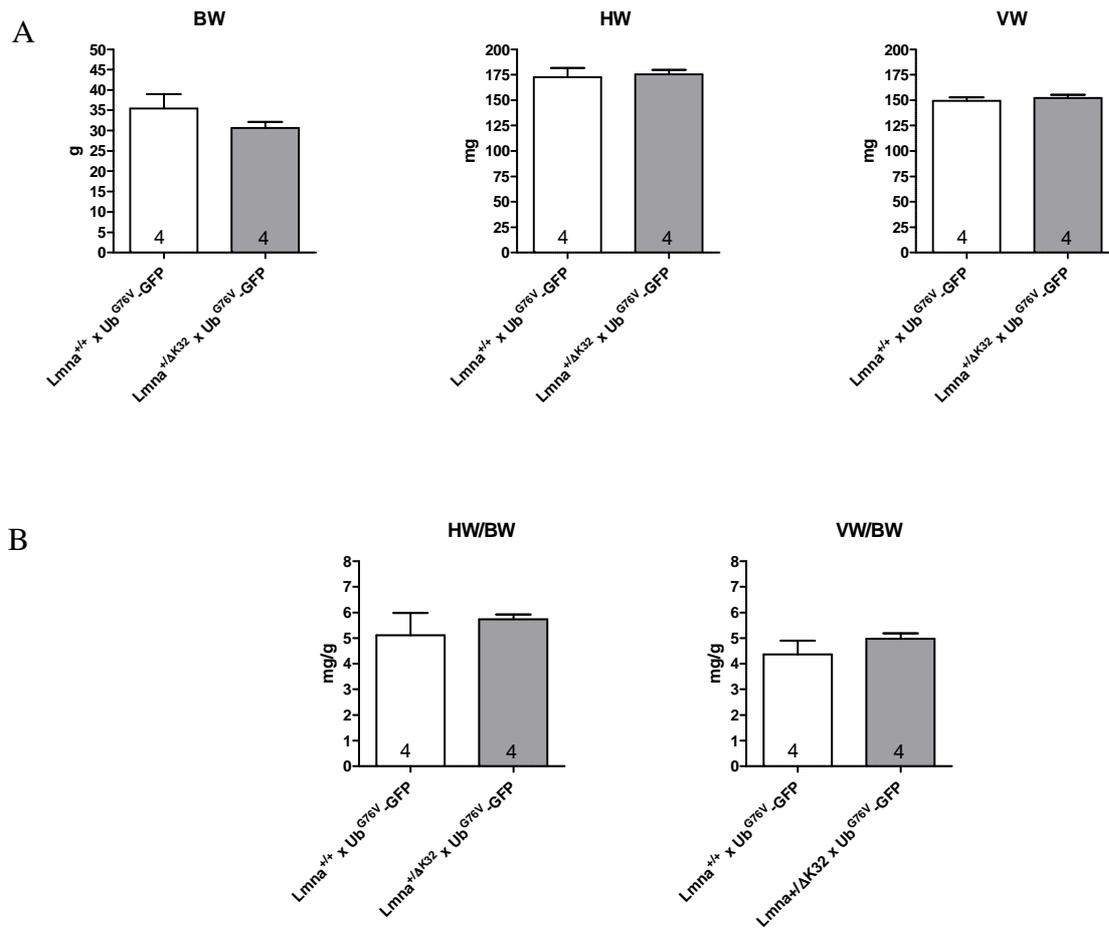


Abbildung 45: Statistische Auswertung des BW, HW und VW (A) und von HW/BW und VW/BW (B) von 24 Wochen alten Mäusen.

### 3.4.2 Lamin A/C-Analysen in $Lmna^{+/\Delta K32} \times Ub^{G76V}\text{-GFP}$ -Mäusen

Die Gesamt-Lamin mRNA-Konzentration wurde in 24 Wochen alten  $Lmna^{+/\Delta K32} \times Ub^{G76V}\text{-GFP}$ - und  $Lmna^{+/+} \times Ub^{G76V}\text{-GFP}$ -Mäusen (jeweils n=4) mittels RTq-PCR bestimmt. Die  $Lmna^{+/\Delta K32} \times Ub^{G76V}\text{-GFP}$ -Mäuse zeigten eine nahezu signifikante (p=0,06) um 50% erhöhte Lamin mRNA-Konzentration im Vergleich zu  $Lmna^{+/+} \times Ub^{G76V}\text{-GFP}$ -Mäusen (s. Abb. 46). Es zeigte sich somit ein vergleichbares Ergebnis wie bei den 54 Wochen alten  $Lmna^{+/\Delta K32}\text{-}$ Mäusen.

# Ergebnisse

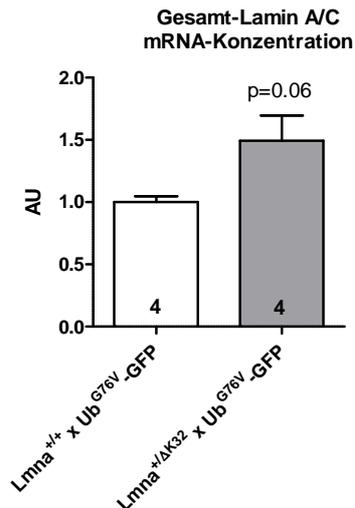


Abbildung 46: Statistische Auswertung der Gesamt-Lamin A/C mRNA-Konzentration.

Die Proteine wurden mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Lamin A/C per Western Blot analysiert. Die Lamin A/C Protein-Konzentrationen unterschieden sich statistisch nicht zwischen *Lmna*<sup>+/-ΔK32</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP- und *Lmna*<sup>+/+</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen (s. Abb. 47).

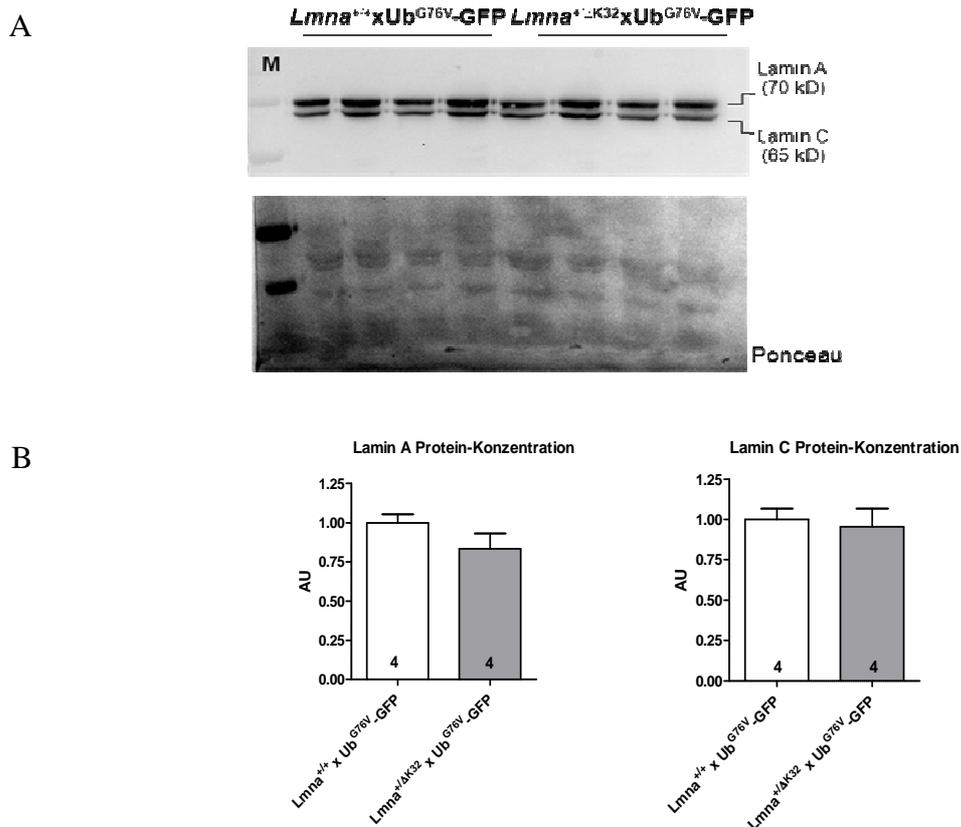


Abbildung 47: A, Western Blot von 24 Wochen alten *Lmna*<sup>+/+</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP- und *Lmna*<sup>+/-ΔK32</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen. Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen Lamin A/C benutzt. Banden zeigten sich bei 70 kD für Lamin A und 65 kD für Lamin C. M bezeichnet die Spur des Größenmarkers. B, Statistische Auswertung der Lamin A/C Protein-Konzentrationen. Es wurde normalisiert auf Ponceau.

# Ergebnisse

## 3.4.3 Untersuchungen des UPS in $Lmna^{+\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen

Die CT-Aktivität wurde in den zytosolischen Proteinlysaten 24 Wochen alter  $Lmna^{+\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP- und  $Lmna^{+/+}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse (jeweils n=4) bestimmt. Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt (s. Abb. 48).

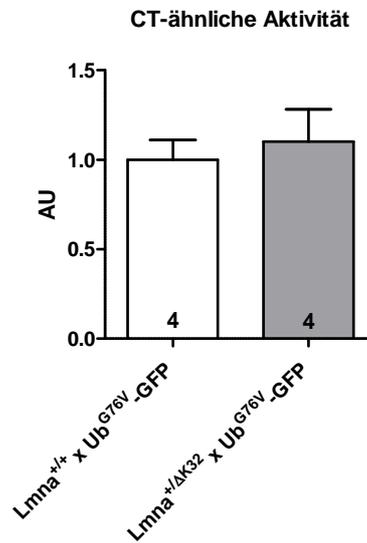
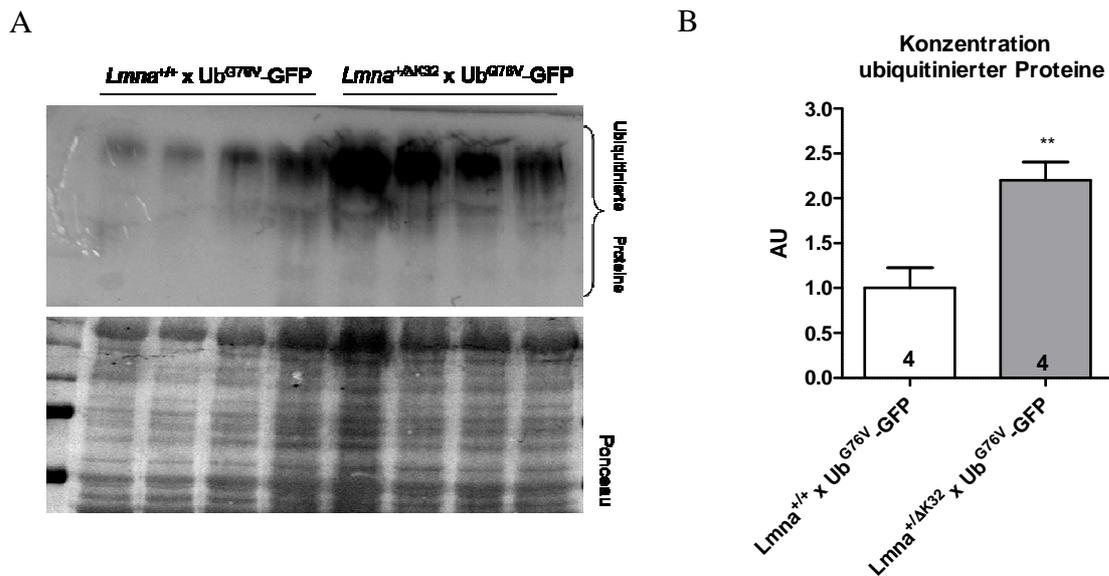


Abbildung 48 Statistische Auswertung der CT-ähnlichen Aktivität von 24 Wochen alten  $Lmna^{+\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP und  $Lmna^{+/+}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen.

Außerdem wurde die Konzentration ubiquitinerter Proteine mittels Western Blot bestimmt. Hierfür wurde ein spezifischer Antikörper benutzt und die Proben der  $Lmna^{+\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP und  $Lmna^{+/+}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse (jeweils n=4) analysiert. Die  $Lmna^{+\Delta K32}$  xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse hatten eine 2,2-fach höhere Konzentration ubiquitinerter Proteine als die  $Lmna^{+/+}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäuse (s. Abb. 49). Es zeigte sich somit ein deutlich stärkerer Anstieg bei den  $Lmna^{+\Delta K32}$ xUb<sup>G76V</sup>-GFP- als bei den  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen.

# Ergebnisse



**Abbildung 49: A, Western Blot von 24 Wochen alten Mäusen.** Es wurde ein Antikörper gegen ubiquitinierte Proteine benutzt. B, Statistische Auswertung der Konzentration ubiquitiniertes Protein. Es wurde normalisiert auf Ponceau, \*\*  $p < 0,01$ .

Zusätzlich wurde die Ub<sup>G76V</sup>-GFP Protein-Konzentration per Western Blot analysiert, um die Situation des UPS *in vivo* zu beurteilen. Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen Ub<sup>G76V</sup>-GFP benutzt. Die zu erwartende Bande zeigte sich bei 37 kD. Die Ub<sup>G76V</sup>-GFP Protein-Konzentration war in den *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen 60% höher als in den *Lmna*<sup>+/+</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen (s. Abb. 50). Um auszuschließen, dass die Erhöhung der Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Konzentration schon auf Transkriptionsebene stattfand, wurde die Ub<sup>G76V</sup>-GFP mRNA-Konzentration mittels RTq-PCR gemessen. Hierbei zeigte sich zwar eine Tendenz zu einer höheren Konzentration in den *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen im Vergleich zu den *Lmna*<sup>+/+</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen, erreichte aber keine statistische Signifikanz (s. Abb. 50).

# Ergebnisse

A

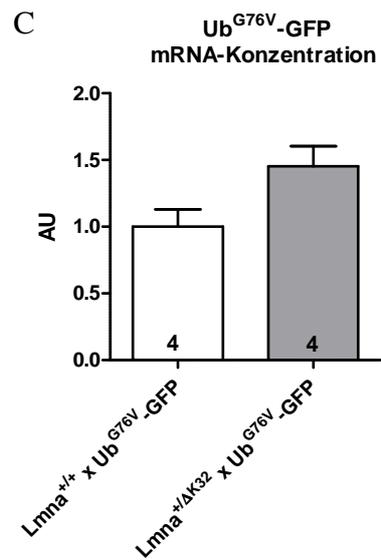
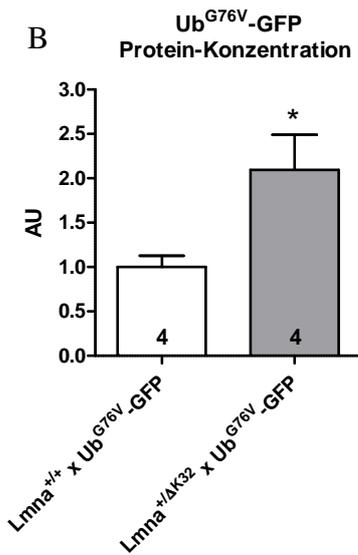
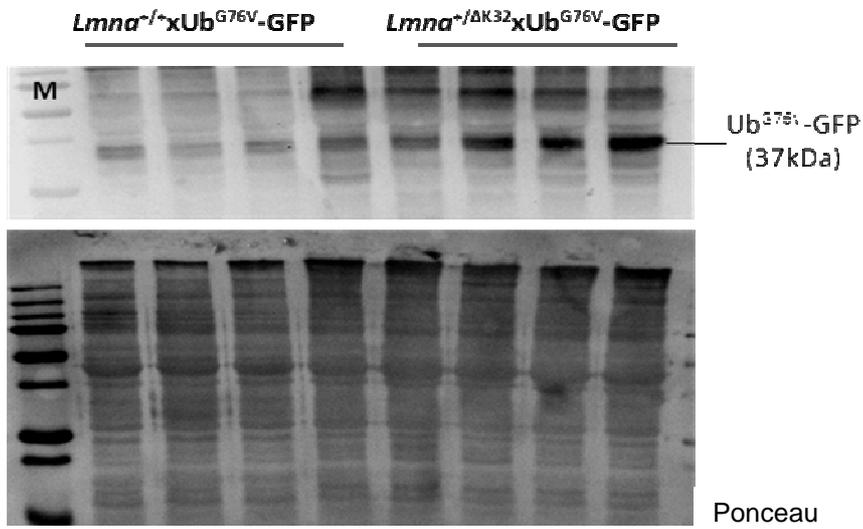


Abbildung 50: A, Western Blot von 24 Wochen alten Mäusen. Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen Ub<sup>G76V</sup>-GFP benutzt. Die Bande zeigte sich bei 37 kD. Statistische Auswertung der Ub<sup>G76V</sup>-GFP Protein-Konzentration (B) und der Ub<sup>G76V</sup>-GFP mRNA-Konzentration (C). Es wurde normalisiert auf Ponceau, \* p<0,05.

# Ergebnisse

---

## 3.4.4 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der $Lmna^{+\Delta K32}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäuse

- Die 24 Wochen alten  $Lmna^{+\Delta K32}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäuse entwickelten sich ähnlich wie die  $Lmna^{+/+}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäuse und unterschieden sich hinsichtlich Größe und Gewicht nicht.
- Die Lamin A/C Protein-Konzentrationen unterschieden sich nicht zwischen  $Lmna^{+\Delta K32}xUb^{G76V}$ -GFP- und  $Lmna^{+/+}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäusen, während die Lamin A/C mRNA-Konzentrationen in den  $Lmna^{+\Delta K32}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäusen 50% höher als in den  $Lmna^{+/+}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäusen waren.
- Die Konzentration ubiquitiniertes Proteine war in den  $Lmna^{+\Delta K32}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäusen 2,2-fach höher als in den  $Lmna^{+/+}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäusen. Die CT-Aktivität unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen.
- Die  $Ub^{G76V}$ -GFP Protein-Konzentration war in den  $Lmna^{+\Delta K32}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäusen 60% höher als in den  $Lmna^{+/+}xUb^{G76V}$ -GFP-Mäusen, während hinsichtlich der  $Ub^{G76V}$ -GFP mRNA Konzentration kein signifikanter Unterschied gemessen wurde.

## 4 DISKUSSION

Als Laminopathien wird eine heterogene Gruppe von Krankheiten bezeichnet, die durch Mutationen in den Genen der Lamine und der Lamin-assoziierten Integralproteine der inneren Kernmembran hervorgerufen werden. Es gibt Erkrankungen, die die quergestreifte Muskulatur, das Fettgewebe, periphere Nerven, Haut- und Knochenstrukturen oder Kombinationen dieser Gewebe betreffen (Worman und Bonne 2007). Zur Gruppe der Laminopathien der quergestreiften Muskulatur gehört die 2008 von Quijano-Roy et al. beschriebene *LMNA*-assoziierte Form der kongenitalen Muskeldystrophie (L-CMD). Das *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mausmodell weist eine von den in L-CMD-Patienten identifizierten Mutationen auf, so dass Untersuchungen an dieser Mauslinie zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Laminopathien, insbesondere der L-CMD, beitragen können.

Initiale Experimente an dem *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mausmodell, die von der Arbeitsgruppe Gisèle Bonne in Paris durchgeführt wurden, zeigten deutlich niedrigere Lamin A und C Proteinkonzentrationen in den homozygoten Mäusen als in den WT-Mäusen, während sich die Lamin A und C mRNA-Konzentrationen nicht unterschieden. Dies führte zu der Annahme, dass mutierte Lamine posttranslational schnell und quantitativ abgebaut werden. Das UPS ist das Hauptabbausystem für missgefaltete und mutierte Proteine in der eukaryotischen Zelle, so dass wir die Hypothese aufstellten, dass mutiertes Lamin durch das UPS degradiert wird. Hierfür untersuchten wir zum einen die Aktivitäten des UPS in WT-, *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>-Mäusen, zum anderen inhibierten wir das UPS, um eine Stabilisierung der Lamin-Proteine zu erreichen, und bestimmten die Konzentrationen polyubiquitinerter Proteine. Nach Hemmung des UPS kam es zu keiner Stabilisierung des Lamins, so dass wir keine Hinweise auf eine Beteiligung dieses Systems am Lamin-Abbau haben. Allerdings stellten wir überraschend höhere Konzentrationen ubiquitinerter Proteine in den *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>-Mäusen als in den WT-Mäusen fest, was auf eine Schwächung des UPS hindeutet. Zudem zeigte sich in dem gekreuzten Reportermausmodell eine deutliche Akkumulation von Ub<sup>G76V</sup>-GFP in den *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup> x Ub<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen, was ebenfalls für eine Beeinträchtigung des UPS spricht.

Die Veränderungen in den Lamin A/C Proteinkonzentrationen, gemessen von der o.g. Arbeitsgruppe in Paris, wurden zu Beginn dieser Arbeit nur in homozygoten Mäusen festgestellt, so dass wir zum einen diese Ergebnisse reproduzieren, zum anderen die

## Diskussion

---

Konzentrationen in heterozygoten Mäusen verschiedener Altersklassen messen wollten. Die Ergebnisse in *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen zeigten, wie erwartet, eine deutlich reduzierte Lamin A/C Proteinkonzentration bei gleichen Lamin A/C mRNA-Konzentrationen. In den *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>-Mäusen stellten wir im Alter von 32 Wochen ebenfalls niedrigere Lamin A/C Proteinkonzentrationen als in den WT-Mäusen bei gleichen Lamin A/C mRNA-Konzentrationen fest. In den 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>-Mäusen wurden hingegen keine Unterschiede der Lamin A/C Proteinkonzentrationen gemessen, während die Lamin A/C mRNA-Konzentrationen höher als in den WT-Mäusen waren. Diese Ergebnisse mit Nachweis einer Stabilisierung der Lamin A/C Proteinkonzentrationen im Alter bestätigten sich zeitgleich in Paris. Im gekreuzten Reportermausmodell zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>-Mäusen. Die 24 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup><sub>xUb<sup>G76V</sup></sub>-GFP-Mäuse zeigten gleiche Lamin A/C Proteinkonzentrationen und höhere Lamin A/C mRNA-Konzentrationen. Das führte uns zu der Annahme, dass die Erkrankung im gekreuzten Reportermodell möglicherweise schneller progredient verläuft.

Eine kardiale Beteiligung, insbesondere in Form einer DCM, ist ein häufiges Phänomen in Rahmen von Laminopathien. Auch einige der L-CMD Patienten zeigten kardiale Funktionseinschränkungen, so dass wir die Hypothese aufstellten, dass auch die *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>-Mäuse einen kardialen Phänotypen entwickeln. Die *Lmna*<sup>+/ΔK32</sup>-Mäuse zeigten bei zunächst normaler Herzfunktion im Verlauf tatsächlich Veränderungen und Funktionseinschränkungen im Sinne einer beginnenden DCM. In Paris wurden zudem parallel Mäuse untersucht, die älter als die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse waren. Diese zeigten sogar das Vollbild einer DCM. Die *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse wiesen allerdings keine kardialen Funktionseinschränkungen auf. Man muss aber erwähnen, dass sie einen so schwerwiegenden Phänotyp entwickelten, dass alle Mäuse nach drei Wochen starben. Man kann mutmaßen, dass sie, wenn sie ein höheres Alter erreicht hätten, ebenfalls einen kardialen Phänotyp entwickelt hätten.

## 4.1 $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ - und $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäuse entwickeln einen schwerwiegenden Phänotyp

Die  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse entwickelten innerhalb von zwei Wochen einen ausgeprägten Phänotyp. Sie waren auffällig kleiner und leichter als die WT-Mäuse, zeigten postnatale Skelettmuskelreifungsdefekte, Gangstörungen und eine drastische Reduktion des weißen Fettgewebes (*white adipose tissue*, WAT; Bertrand et al. eingereicht bei *Human Molecular Genetics*). Diese Charakteristika wurden ebenfalls in L-CMD-Patienten beschrieben (Quijano-Roy et al. 2008). Zudem hatten die  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse ein geringeres Herz- und Ventrikelgewicht im Vergleich zu den WT-Mäusen, jedoch passend zu ihrem ebenfalls geringeren Körpergewicht. Die  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse verstarben alle innerhalb von 19 Tagen, wobei die Todesursache nicht eindeutig geklärt werden konnte. Die Auswertung der Echokardiographie von zwei Wochen alten Mäusen zeigte zwar eine normale Herzfunktion, allerdings müsste zum Ausschluss letaler Herzrhythmusstörungen eine kontinuierliche EKG-Aufzeichnung bis zum Eintreten des Todes durchgeführt werden. Bei dieser Untersuchungsmethode ist jedoch die geringe Größe der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse ein limitierender Faktor. Es wäre auch möglich, dass die Muskeldystrophie im Sinne einer respiratorischen Insuffizienz zum Tode führte. Im Rahmen der Obduktion einer  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Maus konnten makroskopisch jedoch keine auf die Todesursache hinweisenden Auffälligkeiten an Herz und Lunge festgestellt werden. In histologischen Untersuchungen in Paris wiederum konnten in  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen kardiale Veränderungen in Form einer geringeren Kardiomyozytengröße mit elongierten Zellkernen gegenüber den WT-Mäusen gezeigt werden.

Sullivan et al. untersuchten 1999 Lamin-defiziente Mäuse. Die  $Lmna^{-/-}$ -Mäuse entwickelten mit ca. 2-3 Wochen die ersten Symptome. Sie waren ebenfalls deutlich leichter als die korrespondierenden WT-Mäuse, zeigten starke Wachstumsverzögerungen und einen steifen Gang mit gespreizten Hinterbeinen. Die  $Lmna^{-/-}$ -Mäuse starben in einem Alter von 8 Wochen. Eine mögliche Erklärung für das frühere Versterben der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse im Vergleich zu den  $Lmna^{-/-}$ -Mäusen kann ein negativer Einfluss des mutierten Lamins auf seine Interaktionspartner sein. Einer dieser Interaktionspartner ist das *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP1; Lloyd et al. 2002). SREBP1 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle in der Adipogenese, Adipozytendifferenzierung und Cholesterollhomöostase spielt (Kim et al. 1996). In Paris wurde gezeigt, dass in  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen SREBP1 zusammen mit dem mutierten Lamin in Form von nukleären Flecken akkumulierte.

## Diskussion

---

Außerdem war die mRNA seiner Zielgene, wie z.B. *Acc2*, dem Gen für die Acetyl-CoA-Carboxylase, oder *Pparg*, dem Gen für PPAR $\gamma$ , herunter reguliert. Diese Untersuchungen wurden in der Leber durchgeführt, da das WAT, wie oben erwähnt, drastisch reduziert war. Es ist aber wahrscheinlich, dass die Funktion von SREBP1 auch dort beeinträchtigt ist, was die geringe Menge an WAT erklären könnte. In einem Modell mit transgenen Mäusen, die kein WAT besaßen (Moitra et al. 1998), starben die transgenen Mäuse zwar früher als die WT-Mäuse, aber nach 30 Wochen war die Überlebensrate noch größer als 50%, so dass die starke Reduktion des WAT in den *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäusen nicht alleine für das frühe Sterben im Alter von 2 Wochen verantwortlich sein kann. Zusätzlich wurden in Paris bei den *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäusen deutlich verminderte Serumglukosekonzentrationen gemessen. Wir gehen von einer annähernd normalen Nahrungsaufnahme aus, da die *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäuse in der Obduktion, genau wie die WT-Mäuse, mit Milch gefüllte Mägen hatten und zu Lebzeiten, so weit beurteilbar, ein normales Trinkverhalten beobachtet wurde. Die Dysfunktion von SREBP1 scheint eine Rolle in der Entwicklung dieser Hypoglykämien zu spielen, die Ausprägung ist aber vermutlich nur in Verbindung mit anderen durch den negativen Effekt des mutierten Lamins beeinträchtigten Interaktionspartnern hinreichend zu erklären. Bis jetzt ist es nicht gelungen, die eindeutige Todesursache der *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäuse zu benennen. Wir gehen davon aus, dass die Störungen im Energiestoffwechsel, kombiniert mit Skelettmuskeldystrophien und möglicherweise auch mit einer kardialer Beteiligung ein frühes Versterben hervorrufen. Die Beeinträchtigung der Interaktionspartner durch das mutierte Lamin scheint verantwortlich dafür zu sein, dass die *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäuse früher sterben als die *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäuse, mit ihrem ähnlichen Phänotyp, so dass weitere Experimente sich auf andere Interaktionspartner von Lamin und ihre Funktion in *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäusen konzentrieren bzw. die Dysfunktion von SREBP1 noch genauer beleuchten sollten.

Mindestens drei Erkrankungen aus der Gruppe der Laminopathien weisen eine DCM als ein zentrales Merkmal auf: die autosomal dominante Form EDMD (Bonne et al. 1999), die LGMD1B (Muchir et al. 2000) und die DCM Typ 1A (Fatkin et al. 1999). Mutationen im *LMNA*-Gen scheinen für 6-8% der familiären Kardiomyopathien verantwortlich zu sein (Taylor et al. 2003, Tintelen et al. 2007). Auch *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten im Alter von 4-6 Wochen eine ausgeprägte DCM mit linksventrikulärer Dilatation und Funktionsstörung (Nikolova et al. 2004). Da die *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen mit unseren *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäusen vergleichbaren Phänotyp aufweisen und sich ähnlich entwickeln, kann man annehmen, dass

# Diskussion

---

die  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse, wenn sie ein solches Alter erreichten, ebenfalls an einer DCM erkranken würden. In den  $Lmna^{-/-}$ -Mäusen wurde eine reduzierte Kontraktilität einzelner Kardiomyozyten festgestellt (Nikolova et al. 2004). Ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen unserer  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse wären daher Kontraktionsmessungen in Kardiomyozyten, um zu sehen, ob dort ebenfalls Funktionseinschränkungen vorliegen, zumal bereits eine veränderte Struktur dieser Zellen nachgewiesen wurde (s. o.). Auch bei dieser Methode könnte der frühe Todeszeitpunkt der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse problematisch sein, da für eine Zellisolation ein minimales Alter von 4 Wochen notwendig ist. Allerdings könnte man aus  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -NMCM künstliches Herzmuskelgewebe (*Engineered Heart Tissue*, EHT) herstellen, um daran Kontraktionsmessungen durchzuführen.

Die  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäuse entwickelten sich zunächst normal. Sie unterschieden sich weder hinsichtlich ihrer Größe noch ihres Körpergewichts von den WT-Mäusen. Ihr Gangbild und ihre Bewegungen waren unauffällig. Ab einem Alter von 32 Wochen konnten wir bei den  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen erste kardiale Auffälligkeiten mit einer leicht eingeschränkten linksventrikulären Funktion beobachten ohne Dilatation des linken Ventrikels. Mit 54 Wochen zeigten die  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäuse das Bild einer beginnenden DCM mit milde dilatierten Ventrikeln und einer deutlich eingeschränkten LV-Funktion (FS von  $9,6 \pm 2,2\%$ , FAS von  $21,8 \pm 4,0\%$ , EF von  $29,3 \pm 4,2\%$ ). In Paris wurden außerdem Mäuse im Alter über 54 Wochen untersucht. Diese Mäuse zeigten das Vollbild einer DCM mit hochgradig eingeschränkter LV-Funktion und deutlicher Dilatation des linken Ventrikels.  $Lmna^{+/-}$ -Mäuse zeigten bis zu dem von Nikolova et al. (2004) untersuchten Zeitpunkt von 8 Wochen keine echokardiographischen Auffälligkeiten. Allerdings beobachteten Nikolova et al. bereits eine abnorme Sarkomer-Kontraktion und Störungen im  $Ca^{2+}$ -Transport in den  $Lmna^{+/-}$ -Mäusen. Die Ergebnisse von Experimenten mit  $Lmna^{+/-}$ -Mäusen höheren Alters wurden 2008 von Wolf et al. vorgestellt: Es wurden echokardiographische Untersuchungen von 10 und 62 Wochen alten Mäusen ausgewertet. Während die 10 Wochen alten Mäuse eine normale Herzfunktion aufwiesen und sich nicht von den WT-Mäusen unterschieden, hatten die 62 Wochen alten  $Lmna^{+/-}$ -Mäuse dilatierte Ventrikel und eine stark reduzierte FS. Sowohl die echokardiographischen Befunde als auch das Alter, zu dem diese auftraten, waren vergleichbar mit denen der  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäuse. Allerdings zeigten die  $Lmna^{+/-}$ -Mäuse eine deutlich längeres Überleben als die  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäuse. Es verstarben nur zwei  $Lmna^{+/-}$ -Mäuse (im Alter von 52 und 55 Wochen) innerhalb des Untersuchungszeitraums (Wolf et al. 2008),

## Diskussion

---

wohingegen alle  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse innerhalb von 72 Wochen verstarben. Chandar et al. (2009) untersuchten ebenfalls  $Lmna^{+/-}$ -Mäuse und zeigten, dass nach zwei Jahren nur 20% dieser Mäuse an einer kardialen Ursache verstarben. Man kann also sagen, dass  $Lmna^{+/-}$ - und  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse einen ähnlichen Zeitpunkt des Auftretens der Symptome zeigten, aber die Erkrankungen in den  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen mit einer deutlich stärkeren Progredienz verlaufen. Eine Erklärung hierfür kann ein dominant-negativer Effekt des mutierten Lamins sein.

Interessanterweise zeigten in anderen Mausmodellen mit Mutationen im  $Lmna$ -Gen, die vergleichbar mit unserem  $Lmna^{\Delta K32}$ -Modell waren, nur die homozygoten und nicht die heterozygoten Mäuse einen symptomatischen Phänotyp (Arimura et al. 2005, Mounkes et al. 2005). Es scheint so zu sein, dass im  $Lmna^{\Delta K32}$ -Modell eine Haploinsuffizienz des  $Lmna$ -Genprodukts ausreicht, um Veränderungen in Zellen hervorzurufen und sogar ein dominant-negativer Effekt des mutierten Lamins vorliegt, während dies in anderen Mausmodellen nicht der Fall ist. Weitere Experimente sollten die Unterschiede zwischen diesen Mutationen, bei denen nur die homozygoten Mäusen eine DCM entwickeln, und der  $Lmna^{\Delta K32}$ -Mutation bzw. der  $Lmna^{-/-}$ -Mutation, bei denen auch die heterozygoten Mäuse an einer DCM erkranken, näher beleuchten. Dies kann dazu beitragen, die pathophysiologischen Mechanismen bei der Entstehung der DCM im Rahmen einer Laminopathie besser zu verstehen.

Von den L-CMD Patienten erkrankte keiner an einer DCM (Quijano-Roy et al. 2008). Allerdings war der älteste beschriebene Patient lediglich 20 Jahre alt. In weiteren *follow-up*-Beobachtungen sollte man besonderen Wert auf die mögliche Entwicklung einer DCM legen. Von den 15 untersuchten Patienten wiesen vier eine kardiale Beteiligung in Form von Arrhythmien auf, die allerdings nur bei einem Patienten symptomatisch waren. Im Alter von 10 Wochen zeigten 62% der  $Lmna^{+/-}$ -Mäuse Arrhythmien oder Reizleitungsstörungen in Form von Bradykardien oder Atrioventrikular (AV)-Knoten-Blockierungen. Elektrokardiographische Untersuchungen von 62 Wochen alten  $Lmna^{+/-}$ -Mäusen belegten eine Persistenz der Arrhythmien und Reizleitungsstörungen, aber keinen Progress im Alter (Wolf et al. 2008). In einem 7 Jahre alten L-CMD Patienten wurde ebenfalls eine AV-Blockierung nachgewiesen (Quijano-Roy et al. 2008). In Paris wurden bisher keine Hinweise auf Arrhythmien oder Reizleitungsstörungen in  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäusen gefunden. Dennoch sollten in Zukunft weitere Experimente, die ein kontinuierliches EKG-Monitoring über ein längeres Zeitintervall und histologische Untersuchungen der Zellen des Reizleitungssystems beinhalten, durchgeführt werden.

## 4.2 Gravierende Veränderungen auf molekularer Ebene in *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>-Mäusen

Western Blot-Analysen zeigten eine um 80% geringere Lamin A und C Protein-Expression in den *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen als in den WT-Mäusen. In immunhistochemischen Färbungen von *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Zellen verschiedener Gewebe, durchgeführt in Paris, sah man Akkumulationen von Lamin A und C in Form von nukleären Flecken im Nukleoplasma, anstatt der normalen Anordnung entlang der inneren Kernmembran. Sowohl bei den *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>-Mäusen als auch bei den WT-Mäusen zeigte sich in immunhistochemischen Färbungen eine Anordnung von Lamin A und C als nukleäre Lamina entlang der inneren Kernmembran. Die Intensität der Färbung war bei den *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>-Mäusen allerdings geringer. Die 32 Wochen alten *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>-Mäuse wiesen geringere Lamin A und C Proteinkonzentrationen als die WT-Mäuse auf, während sich mRNA-Konzentrationen von Lamin A und C nicht zwischen *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-, *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>- und WT-Mäusen unterschieden. Aktuell steht kein Antikörper zur Verfügung, der im Western Blot spezifisch das ΔK32-Lamin detektiert, weshalb man bei der reduzierten Protein-Expression der *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>-Mäuse nicht zwischen mutiertem und WT-Lamin unterscheiden kann. Es scheint aber so zu sein, dass das WT-Lamin die nukleäre Lamina der *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>-Mäuse formt und das mutierte Lamin möglicherweise rasch abgebaut wird. In Paris wird derzeit daran gearbeitet, mithilfe von Massenspektrometrie das Verhältnis von WT- und mutiertem Lamin bestimmen zu können.

Der N-Terminus von Lamin ist notwendig für die Dimerisierung und die anschließende Anordnung als nukleäre Lamina (Strelkov et al. 2004). Da die ΔK32-Mutation im N-Terminus von Lamin lokalisiert ist, könnte dies der Grund für die Akkumulation von Lamin als Kernflecken in den *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen sein. Zudem zeigten sich in Experimenten, die in Paris durchgeführt wurden, Heterochromatinakkumulationen im Kernzentrum in den *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen. Ein Vergleich mit anderen Mausmodellen, die Mutationen im *Lmna*-Gen tragen, sieht man, dass ein abnormer Aufbau der nukleären Lamina und Störungen in der Heterochromatinanordnung ein genereller Aspekt der Laminopathien zu sein scheinen (s. Tab. 13).

# Diskussion

**Tabelle 13:** Vergleich verschiedener Mausmodelle mit *Lmna*-Mutationen hinsichtlich des Aufbaus der Kernhülle und der Lamin Proteinkonzentration

Mutation	Lamin Protein-konzentration	Todeszeitpunkt	Anordnung des Kernhüllenkomplexes	Referenz
$\Delta K32/\Delta K32$	reduziert	2-3 Wochen	Lamin als nukleäre Flecken, anstelle der nukleären Lamina und Heterochromatinakkumulation im Nukleoplasma	Bonne et al. (nicht veröffentlicht)
-/-	nicht vorhanden	8 Wochen	Lamin nicht vorhanden, Heterochromatinausdünnung	Sullivan et al. (1999)
L530P/L530P	reduziert	4-5 Wochen	Herniationen der Membranen	Mounkes et al. (2003)
N195K/N195K	reduziert	12-16 Wochen	Irreguläre Heterochromatinanordnung mit Kontaktverlust zu Lamin	Mounkes et al. (2005)
H222P/H222P	unverändert	4-13 Wochen	Normale Lamin-Anordnung, irreguläre Heterochromatinanordnung	Arimura et al. (2005)

Die Heterochromatinlokalisierung und -architektur sind wichtige Faktoren in der Transkriptionsregulation (Felsenfeld 1996, Lomvardas et al. 2002). Es ist also denkbar, dass eine reduzierte Lamin A und C Proteinkonzentration und abnorme Anordnungen der nukleären Lamina ein frühes Versterben bedingen. Entsprechend der Genexpressionshypothese (s. 1.2) können diese Veränderungen in einer Pathologie der Zellen resultieren.

Die nukleäre Lamina ist eng assoziiert mit dem NPC. Es ist wahrscheinlich, dass es eine direkte Interaktion zwischen Lamin und dem NPC-Protein Nup153, einer peripheren Komponente des NPC, gibt (Smythe et al. 2000). In Paris sah man in Experimenten Nup153 in den *Lmna* <sup>$\Delta K32/\Delta K32$</sup> -Mäusen im Zytoplasma dislokalisiert, in *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäusen fehlte Nup153 an einem Pol der nukleären Membran vollständig (Sullivan et al. 1999), und in Hautfibroblasten von FPLD-Patienten zeigte sich in Immunfluoreszenzanalysen ein reduziertes Nup153-Signal (Vigouroux et al. 2001). Dies zeigt, dass Lamin essentiell für einen regelrechten Aufbau des NPC ist.

## Diskussion

---

Desmin, ein muskelspezifisches Intermediärfilament, umspinnt die Myofibrillen auf Höhe der Z-Scheibe und verbindet das Zytoskelett mit dem Zellkern. Nikolova et al. (2004) nehmen an, dass eine Zerstörung des Desminnetzwerks in Kardiomyozyten von *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer reduzierten Funktion dieser Zellen und damit zu einer Funktionseinschränkung des linken Ventrikels führen kann. Tatsächlich zeigte sich in *Lmna*<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten von zwei Wochen alten Mäusen eine deutliche Desorganisation der Desmin-Filamente mit Abtrennung der Filamente von der Kernhülle. Bemerkenswert ist, dass in diesem Alter noch keine kardiale Funktionseinschränkung der *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäuse vorlag (s.o.). Unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop sahen Nikolova et al. einen ungeordneten Aufbau der Z-Scheiben und eine uneinheitliche Färbung der Myofibrillen mit Bildung von Konglomeraten. Die Desmin mRNA- und Proteinkonzentrationen unterschieden sich nicht von denen der WT-Mäusen. Ein ähnliches Bild mit Diskontinuitäten in der Desmin-Anordnung konnte man in Kardiomyozyten von *Lmna*<sup>N195K/N195K</sup>-Mäusen beobachten (Mounkes et al. 2005). Desmin-Filamente interagieren an den Kernporen mit Lamin B (Lockard und Bloom 1993). *In vitro*-Studien deuten darauf hin, dass Lamin A die Bindungsaffinität zwischen Desmin und Lamin B erhöht (Georgatos und Blobel 1987). Durch die Lamin A-Defizienz der *Lmna*<sup>-/-</sup>-Mäuse würde man bereits eine herabgesetzte Bindung zwischen Lamin B und Desmin erwarten. Zusätzlich könnte mechanischer Stress, hervorgerufen durch die Verformung der Kernhülle, die Muskelkontraktion und die Dilatation des linken Ventrikels, die Störung der Lamin B-Desmin-Interaktion verstärken und die Integrität der gesamten Zelle stören. Ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Experimente könnte also sein, den Aufbau des Desmin-Netzwerk und seine Interaktion mit Lamin B in *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>-Mäusen näher zu untersuchen. Nesprin, ein Protein der inneren Kernmembran, das wichtig für die Positionierung des Zellkerns in der Zelle ist (s. 1.1) interagiert mit Lamin A (Gruenbaum et al. 2005). Eine Störung dieser Bindung könnte die Funktion von Nesprin herabsetzen und die Integrität der Zelle ebenfalls beeinträchtigen. Dies in unseren Mäusen zu untersuchen, könnte zusätzliche interessante Ergebnisse hervorbringen. Entsprechend der Strukturmodell-Hypothese (s. 1.2) könnten eine gestörte Interaktion von Desmin bzw. Nesprin und Lamin und die reduzierte Funktion dieser Proteine die Pathologie der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und *Lmna*<sup>+ΔK32</sup>-Mäuse erklären.

Ein fetales Expressionsmuster von Genen, die für Proteine des Zytoskeletts kodieren, ist typisch für viele Formen der Kardiomyopathie (Schwartz et al. 1992, Barrans et al. 2002). Hierzu gehören z.B. β-MHC und ANF (*atrial natriuretic factor*). In 32 Wochen alten Tieren

# Diskussion

---

moderater LV-Funktionseinschränkung war die  $\beta$ -MHC mRNA-Expression zwischen  $Lmna^{+/\Delta K32}$ - und WT-Mäusen unverändert, während sich in den 54 Wochen alten  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen mit stark eingeschränkter Funktion und bereits beginnender Dilatation des linken Ventrikels eine 7-fach erhöhte Expression von  $\beta$ -MHC mRNA zeigte. Hier liegt also eine Korrelation zwischen dem Grad der kardialen Funktionseinschränkung und der  $\beta$ -MHC mRNA-Konzentration vor.

## 4.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ - und $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen

### 4.3.1 Es gibt keinen Hinweis für eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an der Lamin-Degradation in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen

Die zwei Wochen alten  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse zeigten eine deutliche niedrigere Lamin A/C Proteinkonzentration als die WT-Mäuse, während sich die Lamin A/C mRNA-Konzentrationen nicht unterschieden. Dies führte uns zu der Annahme, dass Lamin A und C der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse in einem posttranslationalen Prozess degradiert werden. Für den Proteinabbau in der eukaryotischen Zelle sind hauptsächlich zwei Systeme verantwortlich: Das Ubiquitin-Proteasom-System und die Autophagie in den Lysosomen. Das UPS degradiert zytosolische, nukleäre und myofibrilläre Proteine. 80-90% der intrazellulären Proteine werden durch das UPS abgebaut, insbesondere Proteine mit einer geringen Halbwertszeit (Zheng et al. 2009). Lamin A hat eine Halbwertszeit von 36 Stunden und Lamin C von 31 Stunden (nach Abschluss dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe bestimmt). Das UPS könnte also in den Vorgang der Lamin A/C Degradation involviert sein. Außerdem ist das UPS regulatorisch an der Zellproliferation, Stressadaptation und dem Zelltod beteiligt (Mearini et al. 2008). Dysregulationen des UPS sind bei vielen Erkrankungen, wie z.B. bei Autoimmunerkrankungen (Wang et Maldonado 2006), neurodegenerativen Erkrankungen (Bedford et al. 2008) oder bei degenerativen Muskelerkrankungen (Attaix et al. 2005) bekannt. Auch bei kardialen Erkrankungen, wie DCM oder hypertropher Kardiomyopathie (HCM), wurden Veränderungen des UPS nachgewiesen (Predmore et al. 2010, Schlossarek et al. 2011). Wir haben die Aktivitäten des UPS mithilfe von fluorogenen Substraten, die spezifisch gespalten werden, gemessen. Die Aktivitäten waren in den  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen tendenziell erniedrigt, jedoch ohne Signifikanz. In weiteren Experimenten wurden neonatale Mauscardiomyozyten (NMCM) isoliert und die Konzentration polyubiquitiniertes Proteine bestimmt. Sie zeigte sich in  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -NMCM erhöht im Vergleich zu WT-NMCM. Diese Konzentrationserhöhung und die tendenziell erniedrigte CT-Aktivität sprechen, anders

# Diskussion

---

als erwartet, eher für eine Schwächung des UPS. Akkumulierung ubiquitinerter Proteine ist aber ein häufiges Phänomen bei Erkrankungen, wie z.B. der DCM (Weekes et al. 2003, Birks et al. 2008, Mearini et al. 2008), und nicht zwangsläufig mit einer Beeinträchtigung des UPS verbunden. Im Gegenteil, erhöhte Konzentrationen ubiquitinerter Proteine sind sogar in vielen Fällen mit einer erhöhten proteosomalen Aktivität assoziiert (Birks et al. 2008, Mearini et al. 2008, Powell et al. 2008). Die Gleichgewichtskonzentration ubiquitinerter Proteine resultiert jedoch aus zahlreichen Faktoren und zeigt die degradative Kapazität des Proteasoms nicht direkt *in vivo* an.

Zur Überprüfung einer möglichen Beteiligung des UPS in den Vorgang der Lamin A und C Degradation bei *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäusen, haben wir *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>- und WT-NMCM mit dem Proteasom-Inhibitor MG262 behandelt, der reversibel die CT- und Caspase-ähnliche Aktivität des UPS hemmt. Bei einer Beteiligung der CT-Aktivität am Lamin A und C Abbau hätten wir eine Stabilisierung der Lamin A/C Protein-Konzentration erwartet. Es zeigte sich unter Behandlung mit MG262 jedoch kein stabilisierender Effekt auf die Lamin A und C Protein-Konzentration, so dass wir schlussfolgern, dass die CT- und Caspase-ähnliche Aktivität des UPS nicht an der Lamin A und C Degradation beteiligt zu sein scheinen. Um auszuschließen, dass die Trypsin-Aktivität hieran beteiligt ist, sollte man diese in weiteren Experimenten mit einem spezifischen Inhibitor hemmen und den Effekt auf die Lamin A und C Protein-Konzentration beobachten. Nach Abschluss dieser Arbeit wurden in unserer Arbeitsgruppe die Halbwertszeiten von Lamin A und C bestimmt, die mit 36 bzw. 31 Stunden deutlich höher als erwartet waren. Die Behandlung des UPS mit MG262 haben wir für 2 Stunden durchgeführt, so dass man in Kenntnis der Halbwertszeit anzweifeln muss, dass es möglich ist, in dieser kurzen Zeitspanne einen stabilisierenden Effekt zu erreichen. Das Experiment müsste für eine eindeutige Aussage mit deutlich längerer Behandlungszeit wiederholt werden. Wir können also lediglich sagen, dass es zu diesem Zeitpunkt keinen Hinweis auf eine Beteiligung des UPS an der Lamin A/C Degradation gibt.

In weiteren Untersuchungen sollten andere proteolytische Systeme, wie z.B. die Lysosomen, hinsichtlich einer Beteiligung am Lamin A und C Abbau überprüft werden. Hierfür könnte man NMCM mit dem Lysosomen-Inhibitor Bafilomycin behandeln und den Effekt auf die Lamin A und C Protein-Konzentration überprüfen. Denkbar wäre auch, dass kein posttranslatinaler Prozess, sondern vielmehr eine reduzierte Translationseffizienz der Grund für die niedrige Protein-Konzentration der *Lmna*<sup>ΔK32/ΔK32</sup>-Mäuse bei gleicher mRNA-

# Diskussion

Konzentration im Vergleich zu den WT-Mäusen ist. Dies zu überprüfen, wäre ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Experimente.

## 4.3.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System ist in *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>- und *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>xUb<sup>G76V</sup>-GFP-Mäusen geschwächt

Bei den *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen stellten wir im Alter von 16 und 32 Wochen gleiche Lamin A und C mRNA-Konzentrationen wie bei den WT-Mäusen fest, während die 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse signifikant erhöhte mRNA-Konzentrationen aufwiesen. Die Protein-Konzentration war in den 16 und 32 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen niedriger als in den WT-Mäusen, während die 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse keinen Unterschied zeigten. Tabelle 14 gibt eine schematische Übersicht der Lamin A/C mRNA-Konzentrationen, der Lamin A/C Protein-Konzentrationen, der CT-Aktivitäten und der Konzentration ubiquitiniertes Proteine.

**Tabelle 14:** Veränderungen der Lamin A/C mRNA- und Protein-Konzentrationen, der UPS-Aktivitäten und der ubiquitinierten Proteine in *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen

Alter der <i>Lmna</i> <sup>+/<math>\Delta</math>K32</sup> -Mäuse	16 Wochen	32 Wochen	54 Wochen
Lamin A/C mRNA-Konzentration	=	=	↑
Lamin A/C Protein-Konzentration	↓	↓	=
CT-Aktivität	↑	↑	↑
Ubiquitinierte Proteine	↑	↑	↑

Zusammenfassend kann man sagen, dass die 54 Wochen alten *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäuse, die bereits einen ausgeprägten Phänotyp mit einer Dilatation und deutlichen Dysfunktion des linken Ventrikels zeigten, erhöhte mRNA- und stabilisierte Protein-Konzentrationen von Lamin A und C aufwiesen.

Erklärend hierfür könnten zwei Mechanismen sein: Das UPS könnte bei den *Lmna*<sup>+/ $\Delta$ K32</sup>-Mäusen am Vorgang der Lamin A und C Degradation beteiligt sein und bei diesen älteren Mäusen in eine Art Sättigungszustand geraten, so dass das mutierte Lamin A und C nicht mehr effizient abgebaut werden kann. Zusätzlich könnte bei diesen Mäusen, die sich im Endstadium ihrer Erkrankung befinden, kompensatorisch die Transkription erhöht sein, so

## Diskussion

---

dass mehr Lamin A und C entstehen, wobei dann das WT-Lamin in Form der nukleären Lamina für eine erhöhte Stabilität der Zelle sorgt und die Progression des Funktionsverlustes der Kardiomyozyten verlangsamen könnte.

Um zu überprüfen, ob das UPS bei den  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen verändert ist, bestimmten wir die CT-Aktivität. Sie war in allen drei Altersgruppen in den  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen tendenziell erhöht im Vergleich zu den WT-Mäusen (s. Tab. 14). Sarikas et al. (2005) zeigten, dass ein trunkiertes kardiales Myosin-bindendes Protein C (cMyBP-C) sowohl durch das UPS abgebaut wird, als auch seine Funktion beeinträchtigt. Es wäre auch bei unseren  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen denkbar, dass das UPS das mutierte Lamin A und C degradiert und dieser Vorgang im Laufe der Zeit die Funktion des UPS herabsetzt, was die Stabilisierung der Lamin A und C Protein-Konzentrationen bei den 54 Wochen alten  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen erklären könnte. Die Konzentration ubiquitinerter Proteine zeigte sich in den  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen ebenfalls tendenziell erhöht (s. Tab. 14). Bei den  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen zeigte sich somit eine erhöhte CT-Aktivität in Kombination mit einer erhöhten Konzentration ubiquitinerter Proteine. Wie oben beschrieben ist dies ein häufig beobachtetes Phänomen. Man sollte jedoch bedenken, dass die Substrate, die für die Aktivitätsmessung des Proteasoms verwendet werden, sehr klein sind und Ubiquitin-unabhängig abgebaut werden, weshalb auch die Aktivitätsmessung nicht die *in vivo*-Situation des UPS darstellt.

Lindsten et al. stellten 2003 ein Reportermausmodell vor, das die Beurteilung des UPS *in vivo* erlaubt. Diese Mäuse exprimieren ein GFP-markiertes Proteasomsubstrat (s. 2.1.8.2). Bei einer Beeinträchtigung der UPS-Funktion kommt es zu einer messbaren Akkumulation des GFP-Reporters. Wir kreuzten diese Ubiquitin-GFP-Reportermauslinie mit unserer  $Lmna^{\Delta K32}$ -Mauslinie und untersuchten 24 Wochen alte Mäuse, die heterozygot für die  $\Delta K32$ -Mutation waren und das Ubiquitin-GFP-Transgen in sich trugen. Interessanterweise zeigte sich bei den 24 Wochen alten  $Lmna^{+/\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP-Mäusen hinsichtlich der Lamin A und C mRNA- und Proteinkonzentration ein ähnliches Bild wie bei den 54 Wochen alten  $Lmna^{+/\Delta K32}$ -Mäusen: Die mRNA-Konzentration war tendenziell höher als in den WT-Mäusen, während die Proteinkonzentration keinen Unterschied zwischen  $Lmna^{+/\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP- und WT-Mäusen zeigte. Außerdem stellten wir eine tendenziell erhöhte CT-Aktivität und eine signifikant erhöhte Konzentration ubiquitinerter Proteine fest (s. Tab. 15).

## Diskussion

**Tabelle 15:** Veränderungen der Lamin A/C mRNA- und Protein-Konzentrationen, UPS-Aktivitäten und ubiquitinierten Proteine in  $Lmna^{+\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen

Lamin A/C mRNA-Konzentration	↑
Lamin A/C Protein-Konzentration	=
CT-Aktivität	↑
Ubiquitinierte Proteine	↑

Zudem beobachteten wir überraschenderweise eine starke Akkumulation des  $Ub^{G76V}$ -GFP Proteins, was für eine Beeinträchtigung des UPS spricht. Es wäre möglich, dass die Kreuzung mit der transgenen Mauslinie die Progression der Erkrankung der  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse derart beschleunigt, dass sich die 24 Wochen alten  $Lmna^{+\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP-Mäuse bereits in einem vergleichbaren Zustand wie die 54 Wochen alten  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse befinden. Leider haben wir bei diesen Mäusen die kardiale Funktion echokardiographisch nicht evaluiert, so dass wir hinsichtlich des Vorliegens einer DCM bei diesen Mäusen keine Aussage treffen können. Es ist aber sicher, dass das UPS in den  $Lmna^{+\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP-Mäusen beeinträchtigt ist. Wenn man davon ausgeht, dass sich die 24 Wochen alten Mäuse schon im Endstadium ihrer Erkrankung befinden, könnte man auch hier die oben genannte Erklärung anwenden, dass das mutierte Lamin durch das UPS abgebaut wird, aber auch seine Funktion beeinträchtigt, was die Akkumulation des GFP begründen würde. In weiteren Experimenten sollte man sich auf die Evaluation der gekreuzten  $Lmna^{+\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP-Mäuse konzentrieren. Die Untersuchung der kardialen Funktion dieser Mäuse, ihr Todeszeitpunkt und die Untersuchung des UPS inklusive der Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG262 in älteren  $Lmna^{+\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP-Mäusen sind interessante Ansatzpunkte für weitere Experimente. Zudem könnte die Evaluation des UPS in gekreuzten Mäusen, die homozygot für die  $\Delta K32$ -Mutation sind, neue Erkenntnisse bringen und endgültig klären, ob bei den  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäusen das UPS verändert ist.

## 4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann man sagen, dass der schwerwiegende Phänotyp der Mäuse, die eine  $\Delta K32$ -Mutation tragen, durch einen dominant-negativen Effekt des mutierten Proteins bedingt zu sein scheint. Es gibt einige Hinweise darauf, dass das mutierte Lamin seine Interaktionspartner negativ beeinflusst. Es bleibt aber offen, welche gestörte Interaktion die tragende pathophysiologische Rolle spielt und die endgültige Klärung bedarf weiterer Experimente. Zudem erscheint die Tatsache, dass  $Lmna^{+\Delta K32}$ -Mäuse an einer DCM erkranken, besonders, da heterozygote Mäuse vergleichbarer Mausmodelle keinen pathologischen Phänotyp aufwiesen. Es bleibt zu klären, was diese Mutation von scheinbar vergleichbaren Mutationen hinsichtlich der Pathophysiologie unterscheidet. Wir haben bisher keinen Hinweis darauf, dass das UPS am Vorgang der Lamin A/C Degradation beteiligt ist. Allerdings muss man diese Ergebnisse kritisch betrachten, da sich nach Abschluss dieser Arbeit zeigte, dass Lamin eine deutlich längere Halbwertszeit als angenommen aufweist. Es wäre also möglich, dass das UPS nicht lange genug mit dem Proteasom-Inhibitor behandelt wurde. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass das UPS in den heterozygoten Mäusen und in den gekreuzten Reportermausen beeinträchtigt ist.

## 4.5 Ausblick

Das  $Lmna^{\Delta K32}$ -Mausmodell scheint ein gutes Modell zu sein, um die Pathophysiologie der Laminopathien, insbesondere der L-CMD, eingehender zu untersuchen, da die Mäuse phänotypisch die charakteristischen Merkmale einer Laminopathie, wie z.B. die Entwicklung einer DCM und Veränderung des weißen Fettgewebes zeigen. Ergebnisse unter Anwendung dieses Mausmodells weisen darauf hin, dass man bei Patienten mit L-CMD in Zukunft ein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung einer DCM legen sollte. Wir konnten die Todesursache der  $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ -Mäuse leider nicht feststellen, einige Punkte jedoch als ursächlich ausschließen. In Zukunft können Experimente, die sich mit metabolischen Störungen beschäftigen und insbesondere die SREBP1-Funktion näher beleuchten, weitere Erkenntnisse bringen. Zudem sollte weiter an den Interaktionen von Lamin und seinen Partnern geforscht werden, um bessere Aussagen hinsichtlich des offensichtlichen, dominant-negativen Effekts des mutierten Lamins treffen zu können. Außerdem wird momentan an einer Quantifizierung des Verhältnisses von mutiertem und WT-Protein in den heterozygoten Mäusen mittels Massenspektrometrie gearbeitet, was wichtige Erkenntnisse hinsichtlich des

## Diskussion

---

molekularen Phänotypes bringen wird. Zudem sollten die Experimente mit Hemmung des UPS mit längeren Behandlungszeiten wiederholt werden, um eine definitive Aussage über die Beteiligung des UPS an der Lamin Degradation treffen zu können. Die genauere Untersuchung der gekreuzten  $Lmna^{\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP-Mauslinie sollte ebenfalls ein zentraler Punkt weiterer Experimente sein, da wir nachgewiesen haben, dass das UPS in  $Lmna^{+/\Delta K32} \times Ub^{G76V}$ -GFP-Mäusen geschwächt ist.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Laminopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten, die durch Mutationen in den Genen der Lamine und Lamin-assoziierten Proteine hervorgerufen werden. Obwohl Lamin ubiquitär vorkommt, sind nur bestimmte Gewebe, wie die quergestreifte Muskulatur oder das Fettgewebe, betroffen. Eine kardiale Beteiligung, meist in Form einer DCM, ist häufig. Quijano-Roy et al. beschrieben 2008 die *LMNA*-assoziierte Form der kongenitalen Muskeldystrophie, L-CMD. Das in Paris entwickelte *Lmna*<sup>ΔK32</sup>-Mausmodell weist eine der in L-CMD-Patienten identifizierten Mutationen auf. Erste Experimente mit den homozygoten Mäusen dieser Mauslinie ergaben deutlich niedrigere Lamin A/C Protein-Konzentrationen als in den WT-Mäusen bei gleichen mRNA-Konzentrationen. Dies führte zu der Annahme, dass mutierte Lamine posttranslational schnell und quantitativ abgebaut werden. Das UPS ist das Hauptabbausystem für missgefaltete und mutierte Proteine in der eukaryotischen Zelle, so dass wir die Hypothese aufstellten, dass mutiertes Lamin durch das UPS degradiert wird. Wir analysierten die Lamin A/C mRNA- und Protein-Konzentrationen in heterozygoten Mäusen verschiedenen Alters und erfassten den kardialen Phänotyp der homo- und heterozygoten Mäuse mittels Echokardiographie. Die homozygoten Mäuse zeigten phänotypisch ähnliche Charakteristika wie L-CMD-Patienten. Sie starben trotz einer echokardiographisch erfassten normalen kardialen Funktion innerhalb von drei Wochen. Wir konnten keine Hinweise finden, dass das UPS in homozygoten Mäusen an der Degradation von Lamin A/C beteiligt ist. Jedoch war die nach Abschluss dieser Arbeit bestimmte Halbwertszeit von Lamin länger als erwartet, weshalb das UPS eventuell nicht lange genug mit dem Proteasom-Inhibitor behandelt wurde. Es bleibt somit offen, weshalb die homozygoten Mäuse so früh versterben und welches proteolytische System für den schnellen Abbau des mutierten Lamins verantwortlich ist. Die heterozygoten Mäuse entwickelten ab einem Alter von 8 Monaten eine DCM und verstarben daraufhin innerhalb kurzer Zeit. Die Lamin A/C Protein-Konzentrationen waren bei den heterozygoten Mäusen initial reduziert, während bei älteren Mäusen mit bereits beginnender DCM im Vergleich zu WT-Mäusen kein Unterschied gemessen wurde. Wir konnten zeigen, dass das UPS in heterozygoten Mäusen geschwächt ist. Besonders deutlich wurde dies in den mit einem UPS-Reportermausmodell gekreuzten Mäusen. Die Evaluation des gekreuzten Modells sollte in zukünftigen Experimenten ein zentraler Punkt sein. Zudem weisen die echokardiographischen Ergebnisse der heterozygoten Mäuse darauf hin, dass bei Patienten mit L-CMD in Kontrolluntersuchungen ein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung einer DCM gelegt werden sollte.

# Abkürzungsverzeichnis

---

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
%	Prozent
Abb	Abbildung
AD	autosomal-dominant
AK	Antikörper
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
AR	autosomal-rezessiv
AT	<i>Annealing</i> -Temperatur
AU	Arbitrary unit (willkürliche Einheit)
AWTh	Vorderwanddicke
β-NA	β-Naphtylamid
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BW	Körpergewicht
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CMT2	Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 2
CMV	Cytomegalievirus
cMyBP-C	kardiales Myosin-bindendes Protein C
CT-Aktivität	Chymotrypsin-ähnliche Aktivität
d	enddiastolisch
DCM	dilatative Kardiomyopathie
EDMD	Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie
EF	Ejektionsfraktion

# Abkürzungsverzeichnis

---

EKG	Elektrokardiogramm
ENDO	endokardiale Fläche
EPI	epikardiale Fläche
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated</i> Kinase
ES	embryonale Stammzellen
FAS	linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction
FR	Fluoreszenzreporter
FS	linksventrikuläre Verkürzungsfraction
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HSV-TK	Herpes simplex Virus-Thymidinkinase
HW	Herzgewicht
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K32	Lysin 32
K48	Lysin 48
kD	Kilodalton
LAP1	Lamin-assoziiertes Polypeptid
L-CMD	<i>LMNA</i> -assoziierte kongenitale Muskeldystrophie
LGMD1B	Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ1B
LV	linker Ventrikel
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVID	linksventrikuläre Durchmesser
LVM	linksventrikuläre Masse

# Abkürzungsverzeichnis

---

MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
MLC	<i>Myosin light chain</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NLS	Kernlokalisationsignal
nm	Nanometer
NMCM	Neonatale Mauskardiomyozyten
NPC	Kernporenkomplex
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPAR $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
PWTh	Hinterwanddicke
Rb	Retinoblastomprotein
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RTq-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SREBP1	<i>sterol regulatory element-binding Protein 1</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VW	Ventrikelgewicht
WAT	weißes Fettgewebe
WT	Wildtyp
XL	X-chromosomal

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacène E, Fromes Y, Toussaint M, Mura AM, Keller DI, Amthor H, Isnard R, Malissen M, Schwartz K, Bonne G. (2005) Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet.* 155-69.
- Attaix D, Ventadour S, Codran A, Béchet D, Taillandier D, Combaret L. (2005) The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem.* 173-86.
- Barrans JD, Allen PD, Stamatiou D, Dzau VJ, Liew CC. (2002) Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol.* 2035-43.
- Bécane HM, Bonne G, Varnous S, Muchir A, Ortega V, Hammouda EH, Urtizbera JA, Lavergne T, Fardeau M, Eymard B, Weber S, Schwartz K, Duboc D. (2000) High incidence of sudden death with conduction system and myocardial disease due to lamins A and C gene mutation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1661-6.
- Bedford L, Hay D, Devoy A, Paine S, Powe DG, Seth R, Gray T, Topham I, Fone K, Rezvani N, Mee M, Soane T, Layfield R, Sheppard PW, Ebendal T, Usoskin D, Lowe J, Mayer RJ. (2008) Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J Neurosci.* 8189-98.
- Benedetti S, Bertini E, Iannaccone S, Angelini C, Trisciani M, Toniolo D, Sferrazza B, Carrera P, Comi G, Ferrari M, Quattrini A, Previtali SC. (2005) Dominant LMNA mutations can cause combined muscular dystrophy and peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1019-21.
- Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D. (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 323-7.
- Birks EJ, Latif N, Enesa K, Folkvang T, Luong le A, Sarathchandra P, Khan M, Ovaa H, Terracciano CM, Barton PJ, Yacoub MH, Evans PC. (2008) Elevated p53 expression is associated with dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 472-80.
- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizbera JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 285-8.

# Literaturverzeichnis

---

- Bonne G, Mercuri E, Muchir A, Urtizberea A, Bécane HM, Recan D, Merlini L, Wehnert M, Boor R, Reuner U, Vorgerd M, Wicklein EM, Eymard B, Duboc D, Penisson-Besnier I, Cuisset JM, Ferrer X, Desguerre I, Lacombe D, Bushby K, Pollitt C, Toniolo D, Fardeau M, Schwartz K, Muntoni F. (2000) Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol.* 170-80.
- Bridger JM and Kill IR. (2004) Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Exp Gerontol.* 717-724
- Broers JL, Peeters EA, Kuijpers HJ, Endert J, Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, and Ramaekers FC. (2004) Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet* 2567-2580.
- Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ. (2006) Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev.* 967-1008.
- Bunting M, Bernstein KE, Greer JM, Capecchi MR, Thomas KR. (1999) Targeting genes for self-excision in the germ line. *Genes Dev.* 1524-8.
- Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, Wehnert M, Cenni V, Maraldi NM, Squarzone S, and Lattanzi G. (2005) Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 1489-1502.
- Carrier L, Schlossarek S, Willis MS, Eschenhagen T. (2010) The ubiquitin-proteasome system and nonsense-mediated mRNA decay in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 330-8.
- Caux F, Dubosclard E, Lascols O, Buendia B, Chazouillères O, Cohen A, Courvalin JC, Laroche L, Capeau J, Vigouroux C, Christin-Maitre S. (2003) A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins a and c with generalized lipodystrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1006-13.
- Chandar S, Yeo LS, Leimena C, Tan JC, Xiao XH, Nikolova-Krstevski V, Yasuoka Y, Gardiner-Garden M, Wu J, Kesteven S, Karlsdotter L, Natarajan S, Carlton A, Rainer S, Feneley MP, Fatkin D. (2010) Effects of mechanical stress and carvedilol in lamin A/C-deficient dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 573-82.
- Charniot JC, Pascal C, Bouchier C, Sébillon P, Salama J, Duboscq-Bidot L, Peuchmaurd M, Desnos M, Artigou JY, Komajda M. (2003) Functional consequences of an LMNA mutation associated with a new cardiac and non-cardiac phenotype. *Hum Mutat.* 473-81.
- Chen L, Lee L, Kudlow BA, Dos Santos HG, Sletvold O, Shafeghati Y, Botha EG, Garg A, Hanson NB, Martin GM, Mian IS, Kennedy BK, Oshima J. (2003) LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet.* 440-5.

# Literaturverzeichnis

---

- Cole KA, Harmon AW, Harp JB, and Patel YM. (2004) Rb regulates C/EBPbeta-DNA-binding activity during 3T3-L1 adipogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 349-354
- Cutler DA, Sullivan T, Marcus-Samuels B, Stewart CL, Reitman ML. (2002) Characterization of adiposity and metabolism in Imna-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 522-7.
- De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, Szepetowski P, Hammadouche T, Vandenberghe A, Stewart CL, Grid D, Lévy N. (2002) Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet.* 726-36.
- De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Lévy N. (2003) Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science.* 5628-2055.
- Dec GW, and Fuster N (1994) Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1564-1575
- Devereux RB, Roman, MJ, Paranicas, M (2001) A population-based assessment of left ventricular systolic dysfunction in middle-aged and older adults: The Strong Heart study. *Am Heart J* 141-439.
- Emery AE, Dreifuss FE. (1966) Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 338-42.
- Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Mühle G, Johnson W, McDonough B. (1999) Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med.* 1715-24.
- Felker GM, Thompson RE, Hare JM (2000) Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1077-1084.
- Felsenfeld G. (1996) Chromatin unfolds. *Cell.* 13-9.
- Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G. (1986) cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6450-4.
- Forissier JF, Bonne G, Bouchier C, Duboscq-Bidot L, Richard P, Wisnewski C, Briault S, Moraine C, Dubourg O, Schwartz K, Komajda M. (2003) Apical left ventricular aneurysm without atrio-ventricular block due to a lamin A/C gene mutation. *Eur J Heart Fail.* 821-5.

# Literaturverzeichnis

---

- Garg A, Speckman RA, Bowcock AM. (2002) Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene. *Am J Med.* 549-55.
- Garg A. (2004) Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med.* 1220-34.
- Georgatos SD, Blobel G. (1987) Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 117-25.
- Goerss, JB, Michels, VV, Burnett, J, et al. (1995) Frequency of familial dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* O:2
- Gruenbaum Y, Goldman RD, Meyuhas R, Mills E, Margalit A, Fridkin A, Dayani Y, Prokocimer M, Enosh A. (2003) The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol.* 1-62.
- Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. (2005) The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21-31.
- Grunig, E, Tasman, JA, Kucherer, H, et al. (1998) Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 31-186.
- Hermida-Prieto M, Monserrat L, Castro-Beiras A, Laredo R, Soler R, Peteiro J, Rodríguez E, Bouzas B, Alvarez N, Muñiz J, Crespo-Leiro M. (2004) Familial dilated cardiomyopathy and isolated left ventricular noncompaction associated with lamin A/C Gene Mutations *Am J Cardiol.* 50-4.
- Hutchison CJ. (2002) Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 848-58.
- Kim JB, Spiegelman BM. (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 1096-107.
- Lindsten K, Menéndez-Benito V, Masucci MG, Dantuma NP. (2003) A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat Biotechnol.* 897-902.
- Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S. (2002) A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet.* 7-769.
- Lockard VG, Bloom S. (1993) Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 303-9.
- Lomvardas S, Thanos D. (2002) Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. *Cell.* 261-71.
- Ludwig A, Friedel B, Metzkwow S, Meiners S, Stangl V, Baumann G, Stangl K. (2005) Effect of statins on the proteasomal activity in mammalian endothelial and vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 520-6.

# Literaturverzeichnis

---

- Mancini MA, Shan B, Nickerson JA, Penman S, Lee WH. (1994) The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 418-22.
- Mansharamani M, Wilson KL. (2005) Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J Biol Chem.* 13863-70.
- Maron BJ, Towbin, JA, Thiene, G, et al. (2006) Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113-1807.
- McKeon FD, Kirschner MW, Caput D.(1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature.* 463-8.
- Mearini G, Schlossarek S, Willis MS, Carrier L. (2008) The ubiquitin-proteasome system in cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta.* 749-63.
- Michels, VV, Moll, PP, Miller, FA, et al. (1992) The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326-77.
- Moir RD, Montag-Lowy M, Goldman RD. (1994) Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol.* 1201-12.
- Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C (1998) Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* 3168-81.
- Mounkes LC, Kozlov S, Hernandez L, Sullivan T, Stewart CL. (2003) A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature.* 298-301.
- Mounkes LC, Kozlov SV, Rottman JN, Stewart CL. (2005) Expression of an LMNA-N195K variant of A-type lamins results in cardiac conduction defects and death in mice. *Hum Mol Genet.* 2167-80.
- Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K. (2000) Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet.* 1453-9.
- Muralikrishna B, Dhawan J, Rangaraj N, and Parnaik VK. (2001) Distinct changes in intranuclear lamin A/C organization during myoblast differentiation. *J Cell Sci* 4001-4011.

# Literaturverzeichnis

---

- Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Geneviève D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P, Faivre L, Verloes A, Van Essen T, Flori E, Hennekam R, Beemer FA, Laurent N, Le Merrer M, Cau P, Lévy N. (2004) Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet.* 2493-503.
- Nigg EA, Baeuerle PA, Lührmann R. (1991) Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms. *Cell.* 15-22.
- Nikolova V, Leimena C, McMahon AC, Tan JC, Chandar S, Jogia D, Kesteven SH, Michalicek J, Otway R, Verheyen F, Rainer S, Stewart CL, Martin D, Feneley MP, Fatkin D. (2004) Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest.* 357-69.
- Novelli G, Muchir A, Sangiuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, Capon F, Sbraccia P, Federici M, Lauro R, Tudisco C, Pallotta R, Scarano G, Dallapiccola B, Merlini L, Bonne G. (2002) Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet.* 426-31.
- Petrich BG, Molckentin JD, Wang Y. (2003) Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination. *FASEB J.* 749-51.
- Powell SR, Samuel SM, Wang P, Divald A, Thirunavukkarasu M, Koneru S, Wang X, Maulik N. (2008) Upregulation of myocardial 11S-activated proteasome in experimental hyperglycemia. *J Mol Cell Cardiol.* 618-21.
- Predmore JM, Wang P, Davis F, Bartolone S, Westfall MV, Dyke DB, Pagani F, Powell SR, Day SM. (2010) Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation.* 997-1004.
- Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bönnemann CG, Jeannet PY, Colomer J, Clarke NF, Cuisset JM, Roper H, De Meirleir L, D'Amico A, Ben Yaou R, Nascimento A, Barois A, Demay L, Bertini E, Ferreira A, Sewry CA, Romero NB, Ryan M, Muntoni F, Guicheney P, Richard P, Bonne G, Estournet B. (2008) De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 177-86.
- Raffaele Di Barletta M, Ricci E, Galluzzi G, Tonali P, Mora M, Morandi L, Romorini A, Voit T, Orstavik KH, Merlini L, Trevisan C, Biancalana V, Housmanowa-Petrusewicz I, Bione S, Ricotti R, Schwartz K, Bonne G, Toniolo D. (2000) Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 1407-12.
- Renou L, Stora S, Yaou RB, Volk M, Sinkovec M, Demay L, Richard P, Peterlin B, Bonne G. (2008) Heart-hand syndrome of Slovenian type: a new kind of laminopathy. *J Med Genet.* 666-71.

# Literaturverzeichnis

---

- Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. (1996) 2. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 841-2.
- Röber RA, Weber K, Osborn M. (1989) Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development*. 365-78.
- Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg KS, Eschenhagen T, Zolk O. (2005) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res*. 33-44.
- Schirmer EC, Guan T, Gerace L. (2001) Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol*. 479-89.
- Schlossarek S, Carrier L. (2011) The ubiquitin-proteasome system in cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol*. 190-5.
- Schwartz K, Boheler KR, de la Bastie D, Lompre AM, Mercadier JJ. (1992) Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload. *Am J Physiol*. 364-9.
- Sébillon P, Bouchier C, Bidot LD, Bonne G, Ahamed K, Charron P, Drouin-Garraud V, Millaire A, Desrumeaux G, Benaïche A, Charniot JC, Schwartz K, Villard E, Komajda M. (2003) Expanding the phenotype of LMNA mutations in dilated cardiomyopathy and functional consequences of these mutations. *J Med Genet*. 560-7.
- Sewter C, Berger D, Considine RV, Medina G, Rochford J, Ciaraldi T, Henry R, Dohm L, Flier JS, O'Rahilly S, and Vidal-Puig AJ. (2002) Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes* 1035-1041.
- Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN, Gregory S, O'Rahilly S, Trembath RC. (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet*. 153-6.
- Smythe C, Jenkins HE, Hutchison CJ. (2000) Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *EMBO J*. 3918-31.
- Steeg P. (2003) Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*. 55-63.
- Strelkov SV, Schumacher J, Burkhard P, Aebi U, Herrmann H. (2004) Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *J Mol Biol*. 1067-80.

# Literaturverzeichnis

---

- Stuurman N, Heins S, Aebi U. (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.* 42-66.
- Taylor MR, Fain PR, Sinagra G, Robinson ML, Robertson AD, Carniel E, Di Lenarda A, Bohlmeier TJ, Ferguson DA, Brodsky GL, Boucek MM, Lascor J, Moss AC, Li WL, Stetler GL, Muntoni F, Bristow MR, Mestroni L (2003) Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. *J Am Coll Cardiol.* 771-80.
- Van der Kooi AJ, Ledderhof TM, de Voogt WG, Res CJ, Bouwsma G, Troost D, Busch HF, Becker AE, de Visser M. (1996) A newly recognized autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with cardiac involvement. *Ann Neurol.* 636-42.
- Van der Kooi AJ, Bonne G, Eymard B, Duboc D, Talim B, Van der Valk M, Reiss P, Richard P, Demay L, Merlini L, Schwartz K, Busch HF, de Visser M. (2002) Lamin A/C mutations with lipodystrophy, cardiac abnormalities, and muscular dystrophy. *Neurology.* 620-3.
- Van Esch H, Agarwal AK, Debeer P, Fryns JP, Garg A. (2006) A homozygous mutation in the lamin A/C gene associated with a novel syndrome of arthropathy, tendinous calcinosis, and progeroid features. *J Clin Endocrinol Metab.* 517-21.
- Van Tintelen JP, Hofstra RM, Katerberg H, Rossenbacker T, Wiesfeld AC, du Marchie Sarvaas GJ, Wilde AA, van Langen IM, Nannenberg EA, van der Kooi AJ, Kraak M, van Gelder IC, van Veldhuisen DJ, Vos Y, van den Berg MP (2007) High yield of LMNA mutations in patients with dilated cardiomyopathy and/or conduction disease referred to cardiogenetics outpatient clinics. *Am Heart J.* 1130-9.
- Vaughan A, Alvarez-Reyes M, Bridger JM, Broers JL, Ramaekers FC, Wehnert M, Morris GE, Whitfield WGF, Hutchison CJ. (2001) Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci.* 2577-90.
- Vigouroux C, Auclair M, Dubosclard E, Pouchelet M, Capeau J, Courvalin JC, Buendia B. (2001) Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci.* 4459-68.
- Walter MC, Witt TN, Weigel BS, Reilich P, Richard P, Pongratz D, Bonne G, Wehnert MS, Lochmüller H. (2005) Deletion of the Lmna initiator codon leading to a neurogenic variant of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 40-4.
- Wang J, Maldonado MA. (2006) The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol.* 2006 255-61.
- Weekes J, Morrison K, Mullen A, Wait R, Barton P, Dunn MJ. (2003) Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics.* 208-16.
- Wolf CM, Wang L, Alcalai R, Pizard A, Burgon PG, Ahmad F, Sherwood M, Branco DM, Wakimoto H, Fishman GI, See V, Stewart CL, Conner DA, Berul CI, Seidman CE,

# Literaturverzeichnis

---

Seidman JG. (2008) Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. *J Mol Cell Cardiol.* 293-303.

Worman HJ, Bonne G. (2007) "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res.* 2121-33.

Zheng Q, Li J, Wang X. (2009) Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 127-142.

# Danksagung

---

## 8 DANKSAGUNG

Für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Thomas Eschenhagen bedanken. Danke für Ihre jederzeit offene Tür, für Ihre Diskussionsbereitschaft und für die schnelle Korrektur dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Lucie Carrier für die Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit. Ich danke Dir für Deine motivierende Begleitung und den steten Glauben an mich.

Mein größter Dank geht an Dr. Saskia Schlossarek für die großartige Betreuung und Hilfe bei dieser Arbeit. Danke, für Deine Engelsgeduld bei der Einführung in die Labortechniken. Danke dafür, dass Du immer da und auch nach Feierabend noch erreichbar warst und dafür, dass Du einfach die beste Korrekturleserin bist.

Außerdem möchte ich mich bei Birgit Geertz für die große Unterstützung bei der Echokardiographie bedanken.

Bei Dr. Gisèle Bonne, Dr. Anne Bertrand und Marie-Elodie Cattin des Institut de Myologie der Université Pierre et Marie Curie, Paris möchte ich mich für die freundliche Kollaboration bedanken.

Allen Mitgliedern der AG Carrier gilt mein Dank für die herzliche Aufnahme in ihre Mitte. Ich danke Euch, dass Ihr mich, gerade während meiner Schwangerschaft, so toll unterstützt habt.

Allen meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir schon mein Leben lang das wunderbare Gefühl geben, immer bedingungslos hinter mir zu stehen.

Meinen Geschwistern danke ich dafür, dass wir zu einem so tollen Team geworden sind. Es tut gut, dass es Euch gibt.

Kristen, an Dich geht mein Dank für unsere langjährige, tiefe Freundschaft, für Deine immer währende Unterstützung und für so manche Babysitterstunde.

Katharina, Dir danke ich für unsere einzigartige Freundschaft, dafür, dass ich mich über jeden noch so kleinen Punkt dieser Arbeit mit Dir austauschen durfte und dafür, dass Du mich wirklich immer ohne Worte verstehst. Jeder Mensch braucht eine Katha.

Karsten, ich danke Dir, dass Du an meiner Seite bist. Danke dafür, dass Du mich sein lässt wie ich bin und mich in jeder Hinsicht bestärkst und unterstützt. Und nicht zuletzt Danke für unseren sensationell tollen Sohn.

# Erklärung

---

## 9 ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....