UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

Charakterisierung von mit Hypertropher Kardiomyopathie-assoziierten FHL2-Varianten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Aileen Schwalm

aus Bremen

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.02.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. A. Schwoerer

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Für meine Familie

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 4

2 Abkürzungsverzeichnis 7

3 Einleitung 12

3.1 Klassifikation der Kardiomyopathien 12

3.2 Epidemiologie und Klinik der Hypertrophen Kardiomyopathie 13

3.3 Makroskopie und Histologie der HCM 14

3.4 Klinische Pathophysiologie der HCM 16

3.5 Molekulare Pathophysiologie der HCM 17

3.6 Muskel-LIM-Proteine 20

3.7 FHL2 und seine Interaktionspartner 21

3.8 FHL2 und Titin 27

3.9 Zielsetzung und Bedeutung dieser Arbeit 29

4 Material und Methoden 30

4.1 Screening 30

4.2 Zur Arbeit der Plasmid-Konstruktion 31

4.2.1 Amplifikation der FHL2-cDNA 31

4.2.2 PCR 32

4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese 34

4.2.4 DNA-Gelextraktion 34

4.2.5 Vektor pEF5/FRT/V5-D-TOPO 35

4.2.6 Herstellung chemisch-kompetenter TOP 10 E.coli 36

4.2.7 Transformation chemisch kompetenter E.coli–Bakterien TOP 10/BL 21 37

4.2.8 Vereinzelung von Bakterienklonen und Flüssigungskultur 37

4.2.9 Plasmidisolation mittels Minipräparation 38

4.2.10 Plasmidisolation mittels Maxi-Präparationen 38

4.2.11 Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen 39

4.2.12 FastDigest Enzyme 39

4.2.13 Sequenzierungen 41

4.2.14 Mutagenese-PCR 41

4.2.15 Vektor dsAAV-CMVenh-MLC260-EGFP 45

4.2.16 Ligation von DNA-Fragmenten 46

4.2.17 Vektor pGex-5x-1 47

4.3 Zur Arbeit mit rekombinanten Proteinen 48

4.3.1 Herstellung rekombinanter Proteine 48
4.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford 50
4.3.3 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) 51
4.3.4 Coomassie-Färbung 52
4.3.5 Western Blot 53
4.4 Zur Arbeit mit neonatalen Maus-Kardiomyozyten 54
4.4.1 Tierhaltung und Genehmigung 54
4.4.2 Organentnahme 54
4.4.3 Trypsinverdau der Herzen 54
4.4.4 Das Zählen und Ausplattieren von NMCM 56
4.4.5 Kultivierung und Transduktion der NMCM 56
4.4.6 Quantifizierung 57
4.4.7 Immunfluoreszenz 57
4.5 Herstellung und Transduktion von künstlichem Herzgewebe 58
4.6 Statistische Auswertung 60
5 Ergebnisse 61
5.1 Screening 61
5.1.1 Patientengeschichte zu Mutation c.512C>T 63
5.1.2 Patientengeschichte zu Mutation c.530G>A 64
5.1.3 Patientengeschichte zu Mutation c.559G>T 65
5.2 Klonierungen für die Virusproduktion 66
5.3 Analyse von FHL2-AAV6-transfizierten Maus-Kardiomyozyten 71
5.3.1 Expressionsanalyse 71
5.3.2 Zelluläre Lokalisation von nativem Fhl2 72
5.3.3 Zelluläre Lokalisation der FHL2-Varianten 73
5.3.4 Transduktion von künstlichem Herzgewebe 75
5.3.5 Lokalisation von FHL2-Varianten in EHTs 76
5.4 Klonierungen für die Produktion rekombinanter Proteine 78
5.5 Herstellung rekombinanter Proteine 81
6 Diskussion 83
6.1 FHL2-SNPs 83
6.2 Bedeutung der „missense“-Mutationen hinsichtlich der Familiengeschichten 84
6.3 Bedeutung der „missense“-Mutationen hinsichtlich der normalen FHL2-Funktion 86
6.3.1 FHL2 als antihypertropher Faktor 88
6.3.2 Interaktion zwischen FHL2 und Titin 89
6.3.3 FHL2-Lokalisation in kardialen Myofibrillen 91

7 Zusammenfassung 94

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 96

8.1 Abbildungsverzeichnis 96

8.2 Tabellenverzeichnis 101

9 Verwendete Substanzen und Lösungen 104

9.1 Substanzen 104

9.2 Lösungen 107

9.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte 109

10 Literaturverzeichnis 111

12 Danksagung 119

13 Lebenslauf 120

14 Eidesstattliche Erklärung 121

2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAV6	Adeno-assoziierter Virus 6, (*„adeno-associated virus 6")*
Abb.	Abbildung
ACT	Aktivator von CREM im Hoden, ("*activator of CREM in testis"*)
A	Adenosin
AMVM	adulte Maus-Ventrikelkardiomyozyten
ANP	Atriales Natridiuretisches Peptid, *("atrial natriuretic peptide")*
ARA55	Androgenrezeptor-assoziiertes Protein 55, (*"androgen receptor-associated protein 55")*
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
EB	*"beating embryoid bodies"*
BL 21	E.coli-Stamm
bp	Basenpaar
BNP	"*Brain Natriuretic Peptide"*
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca^{2+}	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA, ("*complementary deoxyribonucleic acid*")
cMyBP-C	kardiales, *"cardiac"* Myosin-bindendes Protein C-Gen
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CPB	Kardiopulmonaler Bypass*, ("cardiopulmonary bypass")*
CREM	*"cAMP response element modulator"*
C	Cytosin
CK	Kreatininkinase
DCM	Dilatative Kardiomyopathie, *("dilated cardiomyopathy")*
DMEM	"*Dulbecco's Modified Eagle Medium"*, Nährmedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungsverzeichnis

dsDNA	Doppelstrang-DNA *(“double strand DNA“)*
E.coli	Escherichia coli
ECL	Elektrochemilumineszenz
ERK	“*extracellular signal-regulated kinase”*
et al.	et alteri
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsions-Kinase
Fc-Fragment	Teil des Antikörpers, *(“crystalline fragment”)*
FCS	fötales Kälberserum, *(“fetale bovine serum”)*
FHC	Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie, (*“familial hypertrophic cardiomyopathy”)*
FHL	“*four-and-a-half-LIM-protein”*
FHL2	“*four-and-a-half-LIM-protein 2”*
G	Guanin
g	Gramm
ggf.	gegebenfalls
Gln	Glutamin
h	Stunde
HBSS	“*Hank’s Balanced Salt Solution“*
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie, *(“hypertrophic cardiomyopathy“)*
HNOCM	Hypertrophe Nicht-Obstruktive Kardiomyopathie, *(“hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy“)*
HOCM	Hypertrophe Obstruktive Kardiomyopathie, *(“hypertrophic obstructive cardiomyopathy“)*
Homeodomain	Region eines Proteins, die für eine Homeobox kodiert
HW/BW	“*heart weight/body weight”*
ICD	Implantierbarer Kardioverter/Defibrillator
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
ISH	In-situ-Hybridisierung
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
KI	*knock-in*
KMP	Kardiomyopathien
KO	*knock-out*

L	Liter
LacZ-Gen	Gen, das für das Enzym ß-Galaktosidase kodiert
LB	"*lysogeny broth",* komplexes Nährmedium
Leu	Leucin
LIM	in den Proteinen Lin-11, Isl-1, Mec-3 erstmals beschriebene Domäne
LMO	"*LIM-only proteins"*
LV	linker Ventrikel
M	Molar
Map-Kinase	*"mitogen-activated protein"*-Kinase
MDA	Megadalton
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minute
MLP	Muskel-LIM-Protein
ml	Milliliter
mM	Mmol/Liter
mmol	Millimol
MM-CK	Muskel-Isoform der Kreatin-Kinase
mN	Millinewton
MOI	Anzahl der Viruspartikel pro Zelle, *(„multiplicity of infection")*
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, Puffer
mRNA	Boten-RNA, *("messenger RNA")*
Mut	Mutant
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MyBPC3	Myosin-bindendes Protein C-Gen
MYH7	β-Myosin-schwere-Kette-Gen
N2B	Region des Titins
N2BA	Region des Titins
NaOH	Natriumhydroxid
nf	*non failing*
NHLBI	"*National Heart, Lung, and Blood Institute"*
nm	Nanometer
Nr.	Nummer

NMCM	Neonatale Maus-Kardiomyozyten *("neonatal mouse cardiac myocytes")*
NRCM	Neonatale Ratten-Kardiomyozyten *("neonatal rat cardiac myocytes")*
NYHA	„*New York Heart Association*"
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, *("phosphate buffered saline")*
PBS	Proteinbiosynthese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion, *("polymerase chain reaction")*
PEVK	Prolin-Glutamat-Valin-Lysin-Region des Titins
Pmol	Pikomol
POX	Peroxidase
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
R	Arginin
$RbCl_2$	Rubidiumchlorid
rcf	Relative Zentripetalbeschleunigung, *("relative centrifugal force")*
RhoA	"*Ras homolog gene family, member A"*
RNA	Ribonukleinsäure, ("ribonucleic acid")
ROCK	"*Rho-associated coiled-coil containing kinases"*
rpm	*Rounds per minute*
RT	Reverse Transkriptase
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
sek	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat, *("sodium dodecyle sulfate")*
SiRNA	"*small interfering RNA"*
SK	Sphingosin-Kinase
SNPs	Einzel-Nukleotid-Polymorphismen, *("single nucleotide polymorphisms")*
S.O.C.	"*super optimal broth (SOB) with catabolite repression"*
SRF	*Serum Response Factor*
T	Thymin

Abkürzungsverzeichnis

TAE	Puffer-Mix aus Tris Base, Essigsäure und EDTA
TAC	"*transverse aortic constriction"*
TBS-T	"*Tris-Buffered Saline"* + Tween 20
Thr	Threonin
Tm	Schmelztemperatur *("melting temperature")*
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TOP 10 F'-Zellen	E.coli-Stamm
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV-Licht	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
V	Valin
WHO	*World Health Organization*
WT	Wildtyp

3 Einleitung

Herzkreislauferkrankungen gehören neben Malignomen zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität weltweit. Betrachtet man die Mortalität der kardiovaskulären Erkrankungen, sind diese mit bis zu 30% aller Todesfälle die führende Todesursache (WHO 2013). Vor allem in den Industrienationen sind etwa 70 bis 80% aller Todesfälle bei über den 75-Jährigen auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen (Lloyd-Jones, Adams et al. 2010). Diese sind hauptsächlich Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz oder Herzinfarkt, deren zugrundeliegende Erkrankung in der Regel die Arteriosklerose ist. Doch neben diesen, vor allem im Alter auftretenden Erkrankungen gibt es weitere kardiovaskuläre Erkrankungen, die auch junge Menschen betreffen. Zu diesen zählen die Kardiomyopathien (KMP).

3.1 Klassifikation der Kardiomyopathien

Ursprünglich wurden nach Bridgen und Goodwin alle subakuten oder chronisch verlaufenden Herzmuskelerkrankungen unklarer Genese zu den Kardiomyopathien gezählt. Doch schon bald erwies sich diese Einteilung als unzureichend und man führte neben der Einteilung der „primären“, rein das Herz betreffenden Kardiomyopathien, die „sekundären“ Kardiomyopathien ein. Zu diesen gehören die Erkrankungen, bei denen das Herz im Rahmen eines systemischen Erkrankungsprozess oder einzelner Organerkrankungen im Verlauf mitbetroffen ist, auch wenn der Zusammenhang zwischen der Grunderkrankung und der Herzerkrankung noch nicht vollständig geklärt ist (Maron, Towbin et al. 2006). Laut WHO-Report von 1995 werden die vier Untergruppen der Kardiomyopathien eingeteilt in die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), die Dilatative (DCM), die Restriktive und die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (Richardson, McKenna et al. 1996).

Neben der Einteilung nach der Ätiologie der Herzmuskelerkrankung können die Kardiomyopathien auch nach Hämodynamik und Morphologie eingeteilt werden. Gegenstand dieser Arbeit ist die HCM, bei der neben der muskulären Stenose der ventrikulären Ausflussbahnen der verdickte, nicht-dilatierte linke Ventrikel mit hyperdynamischer Kammer auffällt, ohne dass dieser auf andere kardiale oder systemische Erkrankungen zurückzuführen ist (Remmele, Buss et al. 1999, Marian 2010).

3.2 Epidemiologie und Klinik der Hypertrophen Kardiomyopathie

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine der häufigsten genetisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Prävalenz der HCM auf ungefähr 1:500 der jungen Erwachsene geschätzt wird (Maron, Gardin et al. 1995). Am häufigsten werden junge Erwachsene symptomatisch, die Erkrankung kann jedoch in jedem Alter auftreten. Männer und Frauen erkranken in etwa gleich häufig, Frauen erkranken meist früher. Grundsätzlich betrifft diese Erkrankung alle Altersgruppen. Eine besondere Bedeutung wird der HCM bei Säuglingen und Kleinkindern zugeschrieben, da hier die meisten Todesfälle innerhalb des ersten Lebensjahres auftreten und das Risiko eines plötzlichen Herztodes umso größer ist, je früher die Symptome auftreten (Remmele, Buss et al. 1999).

Der klinische Schweregrad der Erkrankung ist variabel, sowohl beim Vergleich verschiedener Familien miteinander als auch beim Vergleich betroffener Patienten einer Familie untereinander. Die Klinik der Patienten ist heterogen: Mehr als die Hälfte der Patienten zeigt keine oder nur sehr leichte kardiovaskuläre Symptome wie Brustschmerz oder Dyspnoe. Dyspnoe ist das bei bis zu 90% der Patienten führende Symptom, das vor allem die Konsequenz diastolischer Dysfunktion ist. Des weiteren können jedoch auch pektanginöse Beschwerden, Palpitationen, ventrikuläre Arrhythmien bis hin zu ventrikulären Tachykardien mit Schwindel, Präsynkopen und Synkopen, sowie Symptome der Herzinsuffizienz bei Patienten allen Alters auftreten (Erdmann 2011). Elektrokardiographisch sind tiefe Q-Wellen in den Ableitungen II, III, aVF und V_6, tiefe S-Wellen in den rechten präkordialen Ableitungen, ST-Strecken-Veränderungen, sowie linksventrikuläre Hypertrophie nachweisbar. Gefürchtet ist vor allem der plötzliche Herztod. Dieser kann potentiell bei allen Patienten auftreten, ist jedoch gehäuft bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen zu finden. Oft ist der plötzliche Herztod die erste klinische Manifestation. Die HCM ist deshalb auch mit bis zu 50% der Fälle die häufigste Ursache für den plötzlichen Herztod junger Menschen und Athleten (Braunwald et al. 2001). Die Inzidenz des plötzlichen Herztodes wird auf ungefähr 1% pro Jahr bei Erwachsenen mit HCM geschätzt, und auf 2-4% bei Kindern und Jugendlichen (Elliott und McKenna 2004). 10–15% aller HCM-Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine dilatative Kardiomyopathie. Trotz allem ist für die meisten Patienten die HCM eine relativ benigne Erkrankung; die geschätzte jährliche Mortalitätsrate liegt bei 0,7% (Cannan, Reeder et al. 1995).

3.3 Makroskopie und Histologie der HCM

Makroskopisch fällt bei der HCM primär das Herzgewicht mit einem Dreifachen des Normalen auf, bezogen auf Alter, Geschlecht und Körpergröße. Die Angaben schwanken dabei zwischen 350 und 1250 g. Als auffälligste makroskopische Veränderung imponiert die Hypertrophie des interventrikulären Septums, gelegentlich auch die Verdickung der Kammerwände bei eher kleinem Ventrikellumen (Abb. 1) Die asymmetrische Septumhypertrophie kommt in bis zu 95% aller Fälle vor. Häufig ist diese im gesamten trabekulären Septum zu finden, oft auch in den subvalvulären, mittleren oder apikalen Anteilen und nur selten in den mittleren ventrikulären linken Ventrikelwänden oder im Apex des Herzens. Des weiteren sind subaortale Obstruktionen des linken Ausflusstrakts zu finden, die auf Ventralverlagerungen der Papillarmuskeln und Mitralsegel, sowie auf Veränderungen der Mitralklappen in Form von Verlängerung der Sehnenfäden und Anlegen der Mitralsegel an den Septumwulst zurückzuführen sind (Doerr, Seifert et al. 2000).

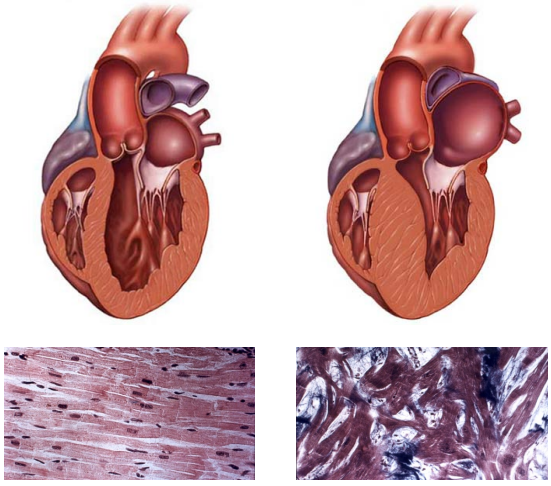


Abb. 1: Makroskopischer und mikroskopischer Vergleich eines normalen Herzens (links) und eines mit hypertropher Kardiomyopathie (rechts). Deutlich werden beim Herz mit Hypertropher Kardiomyopathie vor allem die interventrikuläre Septumhypertrophie und das verkleinerte Ventrikellumen. Abbildungen angepasst von der Webseite der Mayokliniken (www.mayoclinic.org) und Geisterfer-Lowrance et al. 1990.

Histologisch betrachtet imponiert die HCM durch drei Phänomene: Faserhypertrophien, Muskelfaserfehlverläufe und interstitielle Fibrose. Die Muskelfaserhypertrophie ist unregelmäßig ausgebildet, die Zellen sind mit Durchmessern von bis zu 40 µm oft stark vergrößert, die Kerne der Myozyten sind atypisch geformt, hyperchromatisch und haben häufig einen aufgehellten perinukleären Hof, der auf eine Degeneration hinweist. Kennzeichnend für eine HCM ist außerdem der Muskelfaserfehlverlauf. Abnorme, stumpfwinklige Verzweigungen der Myozyten oder Muskelfasern dominieren das mikroskopische Bild. Dieser Muskelfaserfehlverlauf ist vor allem im mittleren Septumanteil und im linken Ventrikel nachweisbar. Dieser Fehlverlauf ist für die HCM jedoch nicht pathognomonisch, sondern auch in Herzen mit angeborenen Herzfehlern oder erworbenen Herzerkrankungen bekannt. Für die Diagnose einer HCM ist nach Experimenten von Maron und Roberts et al. in transversal geschnittenen Gewebeproben eine Desorganisation des Gewebes von über 5% mit einer Sensitivität von 90% notwendig (Maron, Sato et al. 1979). Zusammenfassend kann

man sagen, dass nicht allein das Vorliegen eines Faserfehlverlaufs, sondern dessen Ausmaß für eine HCM charakteristisch ist. Zur Entstehung der Faserfehlverläufe gibt es noch keine allgemein anerkannte Entstehungsursache. Es wird angenommen, dass diese eine lokale Störung im Kontraktionsablauf ist. Neben den hypertrophierten Muskelzellen und den Faserfehlverläufen ist außerdem Fibrose beschrieben. Diese ist vor allem zu den plexiformen Fibrosetypen zu zählen, die bei der HCM besonders im Septumbereich signifikant stärker ausgeprägt ist. Das Auftreten ist eng mit dem Faserfehlverlauf assoziiert, da vor allem in diesen Regionen die Fibrose am ausgedehntesten zu finden ist. Auch die Ursache der Fibrose ist noch nicht geklärt: Man nimmt an, dass die Degeneration der hypertrophierten Muskelzellen mit anschließender *Replacement*-Fibrose nicht der alleinige Grund sein kann, da eine Korrelation der Fibrose mit der Septum- bzw. Wanddicke nicht besteht. Man vermutet eine gesteigerte Kollagensynthese mit Fibrosebildung aufgrund lokal gestörter Kontraktionsabläufe im Myokard. Des weiteren findet man bei Patienten mit Ausflusstraktobstruktion gehäuft lokale Zirkulationsstörungen mit fleckförmigen Fibrosen um das Narbengewebe (Doerr, Seifert et al. 2000).

Bei vielen Patienten liegen klinische, hämodynamische, elektrokardiografische oder morphologische Hinweise auf eine Myokardischämie vor. Diese Hinweise lassen sich mit einer Abnahme der kleinen Arteriolen pro Myokardfläche, sowie auch ihrer Volumendichte erklären, was insbesondere auf den Septumbereich zutrifft. Diese intramyokardialen, dysplastischen Arterien mit verbreiterter Media, teils intakter, teils aufgesplitterter Lamina elastica interna und externa sind jedoch nicht spezifisch für die HCM, sondern auch bei anderen Erkrankungen beschrieben. Auffällig ist, dass das Vorkommen fleckförmiger Fibrose mit dem Auftreten dysplastischer Arterien assoziiert ist, so dass hier die Annahme eines pathogenetischen Zusammenhangs der intramyokardialen Gefäßdysplasien für die Minderperfusion des Herzens gestützt wird (Doerr, Seifert et al. 2000).

Elektronenmikroskopisch erkennt man vor allem Veränderungen der Zellkontakte, sowie der Zellorganellen der Myozyten selbst. In den Faserfehlverläufen sind deutlich abnorme Anordnungen der Myozyten und atypische Zellverzweigungen mit seitlicher Nexusbildung zu erkennen. Die Myofibrillen zeigen unterschiedliche Breiten, unterschiedliche Verlaufsrichtungen und abnorme Überkreuzungen. Betroffenes Zytoskelett-Bestandteil ist vor allem das Desmin, das physiologischerweise für die Ausrichtung der Myofilamente und die Koordination ihrer Kontraktion zuständig ist. In gesunden Herzen ist dieses netzförmig um die Z-Streifen, die Glanzstreifen und Myofibrillen angeordnet und verbindet Z-Streifen untereinan-

der, sowie diese mit der Kernmembran und anderen Zellorganellen. Selektive Veränderungen der Desminfilamente sind ausschließlich in den veränderten Faserzügen nachweisbar. Glanzstreifen und Z-Streifen sind weniger deutlich anfärbbar (Doerr, Seifert et al. 2000).

3.4 Klinische Pathophysiologie der HCM

Die Herzaktion bei Patienten mit HCM ist in der Systole sowie in der Diastole gestört. Die Systole der HCM ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Kontraktion und eine dadurch resultierende normale bis erhöhte Ejektionsfraktion. Etwa 25% der Personen mit HCM zeigen zusätzlich eine intrakavitäre Obstruktion im Ausflusstrakt in Ruhe (daher der ältere Begriff der Hypertrophen Obstruktiven Kardiomyopathie, HOCM), die sich unter Provokation verstärken kann (Maron, Olivotto et al. 2003, Elliott, Gimeno et al. 2006, Maron, Olivotto et al. 2006). Im Verlaufe der Erkrankung verschlechtert sich die Kontraktionskraft häufig. Man nimmt an, dass die Ursache dafür die zunehmende Fibrose ist, die als Folge der Myokardischämie aufgrund der dysplastischen Arterien auftritt. Es entwickelt sich eine Wandverdünnung, eine verminderte Ejektionsfraktion und somit ein erhöhtes enddiastolisches Volumen, das zu einer Ventrikeldilatation führen kann. Für die HCM ist eine frühe, rasche Ejektionsphase ohne Obstruktion charakteristisch, in der bis zu 60% des Volumens ausgetrieben werden. Unterhalb der Aortenklappe kommt es dann zu einer Obstruktion durch die Vorwärtsbewegung der Mitralsegel mit Anlegung an den Septumwulst. Durch diese Obstruktion ändert sich der Blutfluss; die Leerungsphase wird langsamer, der linke Ventrikel muss nun gegen die Obstruktion bei gleichzeitiger Druckerhöhung in der Kammer und Druckabfall hinter der Obstruktion anpumpen. Es kommt in der späten Systole zu einer Regurgitation der Mitralsegel und ein Teil des Schlagvolumens verlässt den linken Ventrikel ortho- oder retrograd nach Eintritt der Obstruktion.

Während der Diastole kommt es zu einer erschwerten Füllung der linken Herzkammer, da durch das hypertrophierte Septum der Ventrikel stark eingeengt ist und die Kammerwände vermindert dehnbar sind. Dies führt zu einer linksventrikulären enddiastolischen Druckerhöhung bei verringertem enddiastolischen Volumen. Im Zuge dessen kommt es zu einer gestörten Relaxation des Ventrikels, die die frühdiastolische Füllungsphase verlängert und die Druckabnahme im linken Vorhof verzögert. Auch hier resultiert eine systolische Belastung des Vorhofs, so dass dieser nun mit hohem Druck in den Ventrikel pumpen muss. Da das enddiastolische Volumen bereits in Ruhe um bis zu 30% verringert ist, muss der Ventrikel einen stärkeren systolischen Druck aufbauen, um ein genügendes Schlagvolumen aufbringen zu können. Unter Belastung bedeutet dies, dass das erforderte Herzzeitvolumen nicht

über das Schlagvolumen, sondern nur über die Herzfrequenz erhöht werden kann (Doerr, Seifert et al. 2000). Siehe hierzu auch die folgende Abbildung.

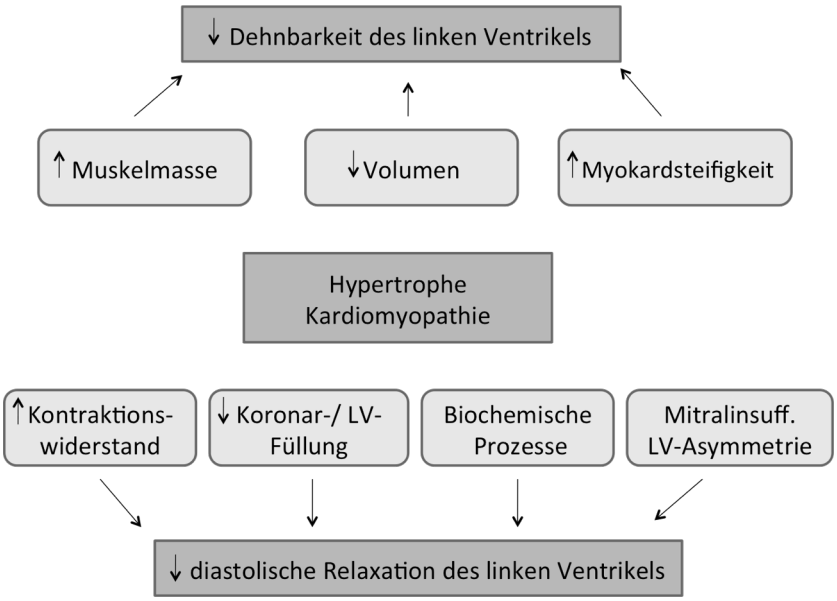


Abb. 2: Der Pathomechanismus der HCM. Verminderte Dehnbarkeit des LV durch vermehrte Muskelmasse, verringertes Volumen und pathologische Myokardsteifigkeit. Verminderte diastolische Relaxation des linken Ventrikels durch erhöhten Kontraktionswiderstand, verminderte Koronar- und linksventrikuläre Füllung. Häufig begleitend Mitralinsuffizienz, linksventrikulären Asymmetrie und biochemische Prozesse. Grafik adaptiert nach Doerr, Seifert et al., 2000.

3.5 Molekulare Pathophysiologie der HCM

Die HCM zeigt einen überwiegend autosomal-dominanten Vererbungsmodus. Die Penetranz ist bei jungen Menschen inkomplett, mit zunehmendem Alter der Patienten erreicht sie jedoch nahezu 100%. Etwa die Hälfte aller Patienten mit HCM haben erkrankte Verwandte ersten Grades, so dass es sich um die erbliche Form der HCM handelt. Zusätzlich wurde bislang ein einzelner autosomal-rezessiver Erbgang nachgewiesen (Maron und Bonow 1987). Bei der anderen Hälfte der Patienten handelt es sich um so genannte „sporadische“ *de-novo*-Mutationen. Dabei spielen spontane Neumutationen, rezessive Erbgänge und nicht-genetische Ursachen wahrscheinlich eine Rolle (Alcalai, Seidman et. al, 2008). Des weiteren wurden von Forissier et al. Fälle beschrieben, in denen Patienten Träger von zur HCM führenden Mutationen waren, die somatischen Zellen der Eltern beim Screening keine, die Keimzellen der Mütter jedoch eben jene Mutationen aufwiesen. Wahrscheinlich sind solche Keimbahn-Mosaike für einige Fälle der HCM verantwortlich (Forissier, Richard et al. 2000).

Der HCM liegen Einzelmutationen in Genen zugrunde, die häufig für verschiedene kontraktile Proteine des kardialen Sarkomers kodieren. Deswegen wird die HCM auch als Krankheit des Sarkomers klassifiziert. Die Suche nach Mutationen, die zur HCM führen, läuft nun schon seit über zwei Jahrzehnten, denn 1989 wurde der erste Genlokus identifiziert, der für die HCM verantwortlich ist (Jarcho et al. 1989, Seidman und Seidman 2001). Bis heute sind mehr als 470 verschiedene Mutationen auf mindestens 10 Genen gefunden (Schlossarek, Mearini et al. 2011, Friedrich und Carrier 2012).

Etwa 82% der zur HCM führenden Mutationen betreffen die Gene *MYH7* und *MYBPC3*, die für die β-Myosin-schwere-Kette (*MYH7*), beziehungsweise das Myosin-bindende Protein C (*MYBPC3*) kodieren (Richardson, McKenna et al. 1996). Die meisten Mutationen in *MYBPC3*, ein großes sarkomerisches Protein mit spezifischen Myosin-, Titin- und Aktin-Bindungseigenschaften, führen zur Unterbrechung des Leserasters, nachfolgend zu verkürzten Proteinen und einer resultierenden HCM (Carrier 2007). Die wesentlich seltener mutierten Gene kodieren das Troponin T sowie Troponin I, das α-Tropomyosin, regulatorische und essentielle Myosin-leichte-Ketten sowie Titin, α-Aktin, die α-Myosin-schwere-Ketten und Proteine der LIM-Familie (Maron, McKenna et al. 2003, Marian 2010).

Protein	**Gen**	**Anzahl der Mutationen**
β-Myosin heavy chain	*MYH7*	218
Cardiac myosin-binding protein	*cMyBPC*	185
Cardiac Troponin T	*TNNT2*	36
Cardiac Troponin I	*TNNI3*	30
α-Tropomyosin	*TPM1*	12
Regulatory myosin light chain	*MYL2*	10
Cardiac α-Actin	*ACTC1*	7
Essential myosin light chain	*MYL3*	5
α-Aktinin 2	*ACTN2*	4
Four-and-a-half-LIM-protein 1	*FHL1*	3
Muscle LIM protein	*CSRP3*	3
Muscle RING-finger protein 1	*TRIM63*	3
Myozenin 2 (Calsarcin 1)	*MYOZ2*	2
Nexilin	*NEXN*	2

Telethonin	*TCAP*	2
Titin	*TTN*	2
Vinculin	*VCL*	2
α-Myosin heavy chain	*MYH6*	1
Obscurin	*OBSCN*	1
Cardiac Troponin C	*TNNC1*	1

Tabelle 1: Bekannte Mutationen in Genen der sarkomerischen Proteine, die zur Hypertrophen Kardiomyopathie führen. Angegeben sind Gen, Protein, sowie Anzahl der bekannten Mutationen (Schlossarek, Mearini et al. 2011).

Es ist zu diskutieren, inwiefern Genmutationen zu solch tiefgreifenden Veränderungen des Myokards und zu funktionellen Konsequenzen führen können. Die deutliche Klinik von HCM-Patienten mit heterozygoter Mutation lässt vermuten, dass das mutierte Allel dominant ist und eine Haploinsuffizienz vorliegt. Dieses ist beispielsweise für HCM-Patienten mit Mutationen im *MYBPC3*-Gen nachgewiesen (Marston, Carrier et al. 2011). Die Frage, warum die Mutation sich dominant durchsetzt, lässt sich durch zwei mögliche Hypothesen erklären. Entweder führt die Mutation einerseits dazu, dass das entsprechende Protein oder die mutierte cDNA instabil ist oder nicht gebildet und andererseits dazu, dass ein fehlerhaftes Produkt entsteht, das rasch abgebaut wird. In beiden Fällen wäre das mutierte Gen ein funktionelles Nullallel (Vosberg 1998, Marston, Carrier et al. 2011). Da jedoch in einzelnen beschriebenen Fällen Mutationen in *MYH7*, welches für die ß-Myosin-schweren-Kette kodiert, asymptomatisch waren, ist nicht sicher, ob diese Nullallel-Hypothese auf die HCM anwendbar ist (Nishi, Kimura et al. 1995). Eine alternative Erklärung zur Entstehung der HCM ist die sogenannte dominant-negative Wirkung. Diese beschreibt das Phänomen, dass die Anwesenheit mutierter Proteine im Zusammenspiel mit anderen Proteinstrukturen zu Fehlfunktionen des ganzen Proteinkomplexes führen könnte. Diese Erklärung lässt sich mit Experimenten bestärken, die gezeigt haben, dass sowohl mutierte Myosin-Filamente, als auch mutierte Troponin T-Proteine veränderte Eigenschaften bezüglich der Kontraktilität und Motilität aufweisen (Vosberg 1998).

Obwohl nun eine Vielzahl von HCM-hervorrufenden Mutationen in verschiedenen Genen beschrieben ist, sind nur etwa bei zwei Dritteln der HCM-Patienten bekannte Mutationen nachzuweisen (Marian 2010). Deshalb ist anzunehmen, dass andere Gen-Mutationen existieren müssen, die es zu identifizieren gilt. Diese Idee ist die Grundlage der vorliegenden Doktorarbeit: die Entdeckung neuer HCM-Krankheitsgene. Deshalb untersuchten wir das

Genom von Patienten mit diagnostizierter HCM, welche in vorangegangenen Untersuchungen keine Mutationen in den bekannten Genen *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* oder *MYL2* gezeigt hatten. 2012 erfolgte dann in selber Kohorte die Suche nach Mutationen im Genom von *FHL1* als Krankheitsgen zur Entwicklung der isolierten HCM durch Friedrich et al. Es zeigte sich, dass mutierte FHL1-Proteine als *„poison peptides“* zu Hypertrophie, diastolischer Dysfunktion und gesteigerter Kontraktilität führen. In vorliegender Arbeit konzentrierten wir uns anschließend auf das Screening des *FHL2*-Gens. Die Annahme, dass Mutationen im *FHL2*-Gen eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der HCM spielen könnten, ist nicht unbegründet. Zum einen ist bekannt, dass Mutationen in *FHL2* mit der Entwicklung einer DCM assoziiert sind, zum anderen spielen FHL2-Proteine im Herzen eine wichtige Rolle, da sie mit wichtigen Strukturproteinen des Herzmuskels, mit metabolischen Enzymen, sowie diversen Transkriptionsfaktoren interagieren und ihnen somit eine pathogene Rolle denkbar zuzuschreiben wäre (Lange, Auerbach et al. 2002, Matsumoto, Hayashi et al. 2005).

3.6 Muskel-LIM-Proteine

Das FHL2-Protein gehört zu den LIM-Proteinen. Diese cysteinreichen Proteine beinhalten alle eine oder mehrere LIM-Domänen, die aus zwei tandemartig wiederholten Zink-Fingern bestehen und als Protein-Protein-Interaktionsdomänen funktionieren. Die Anzahl dieser Domänen in den LIM-Proteinen wird zur Subklassifikation benutzt. Drei Subgruppen werden unterschieden: die LIM-*homeodomaine* Proteine, die wichtig für die Entwicklung neuronaler, endokriner und skelettaler Strukturen in Wirbeltieren sind, spezifisch funktionelle LIM-Proteine, sowie die LIM-*only* Proteine (LMO), die in der Entwicklung der Skelettmuskulatur und der Strukturerhaltung des Myokards eine wichtige Rolle spielen. Eine spezifische Subklasse der LMO-Proteine ist die Familie der FHL2-Proteine, die viereinhalb LIM-Domänen enthalten. In dieser Familie sind bislang FHL1, FHL2, FHL3, FHL4 sowie ACT und ARA55 im Menschen bekannt, die alle zell- und gewebespezifisch exprimiert werden und Regulatoren der Transkription und Signaltransduktion sind (Kong, Shelton et al. 2001).

Name	**Expressionsmuster**	**Funktion**
FHL1	Skelettmuskulatur, Fokaladhäsion	Myogenese
FHL2	Myokard, Downregulation im Rhabdomyosarkom	Kardiogenese, Koaktivator des Androgenrezeptors
FHL3	Skelettmuskulatur	Myogenese

FHL4	Hoden	Spermatogenese
ACT	Hoden	Aktivierung der Transkription durch CREM und CREB
ARA55	Prostata	Koaktivator des Androgenrezeptors

Tabelle 2: Auflistung der Familie der four-and-a-half-LIM-Proteine. Angabe von Name, Expression und Funktion (Kong, Shelton et al. 2001).

3.7 FHL2 und seine Interaktionspartner

Das *four-and-a-half-LIM*-Protein 2 (FHL2), das wohl bislang am meisten untersuchte der FHL-Proteine, spielt neben der Rolle als Regulator der Genexpression, der Zytoarchitektur, der Zelladhäsion und Signaltransduktion zusätzlich eine entscheidende Schlüsselrolle in der spezifischen Differenzierung und der Regulation des Herzwachstums. *FHL2* liegt auf Chromosom 2q12–q14 und besitzt acht Exons, von denen die ersten drei nicht-kodierend sind. Das Gen wird in ein Transkript von 1,5 kb transkribiert und in ein Protein von 279 Aminosäuren translatiert. Das Protein ist etwa 32 kDa schwer und besitzt einen isoelektrischen Punkt von ca. 7,2.

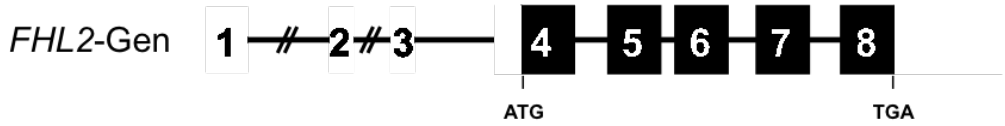


Abb. 3: Schemadarstellung *FHL2*. Exons sind nummeriert. Kodierende Regionen sind als schwarze, nichtkodierende Regionen sind als graue Kästchen dargestellt. ATG markiert das Startcodon der Translation, TGA das Stopcodon.

FHL2 wird vor allem im Herzen, aber auch in geringen Anteilen in anderen Organen wie zum Beispiel in der Skelettmuskulatur, Plazenta und Ovar exprimiert. In Milz, Thymus, Haut und in den peripheren Leukozyten ist keine Expression festzustellen (Kong, Shelton et al. 2001). In Immunfluoreszenz-Versuchen zum Nachweis der Lokalisation fand sich kein Nachweis für FHL2 im Zytoplasma oder im Nukleus der Myozyten, sondern ausschließlich im Sarkomer. Hier zeigte sich eine deutliche Querstreifung des Sarkomers, FHL2 bindet hier zum einen deutlich an der I-Bande und zum anderen abgeschwächter an der M-Bande des Sarkomers (Granzier et al 2009).

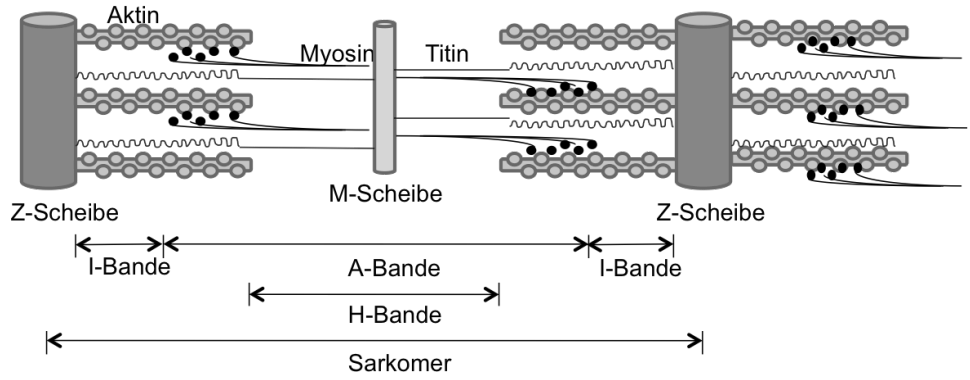


Abb. 4: Aufbau des Sarkomers und Interaktion der Hauptbestandteile. Neben Aktin und Myosin spielt auch das Strukturprotein Titin eine wichtige Rolle im Zusammenspiel der M- und Z-Scheibe. Frei adaptiert aus Physiologie, Klinke, Pape, Kurtz, Silbernagl, Thieme.

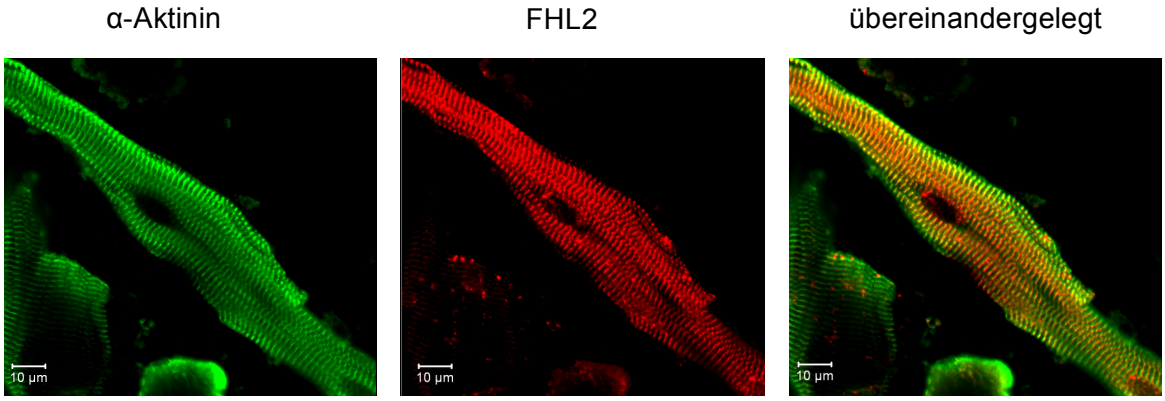


Abb. 5: Immunfluoreszenz an adulten Kardiomyozyten von WT-Mäusen. Linkes Bild IF mit α-Aktinin-Primärantikörpern und Sekundärantikörper Alexa488, mittleres Bild mit FHL2-Antikörpern und Sekundärantikörper Cy3, sowie rechts beide übereinandergelegt. Es zeigt sich eine deutliche Ko-Lokalisation beider Proteine. Nichtpublizierte Daten der AG Carrier.

Die Bedeutung von *FHL2* als Marker kardiogener Zellen wurde unter anderem von der Arbeitsgruppe um Kong et al. gezeigt. In *Northern Blots* zeigte sich eine *FHL2*-Expression schon ab dem 7. Embryonaltag, die auch im Verlauf der Herzentwicklung nachweisbar war. Durch *In-situ*-Hybridisierung (ISH) transversal geschnittener adulter kardialer Ventrikel mit markierten antisense FHL2-Sonden zeigte sich deutlich die Anwesenheit von FHL2 in freien Ventrikelwänden und besonders ausgeprägt im Ventrikelseptum. Des weiteren war FHL2 in bestimmten embryonalen Entwicklungsstadien in undifferenzierten Zellen anderer Gewebe, sowie auch in adulten Geweben zu finden, doch war die Expression hier minimal im Vergleich zum starken kardialen Signal (Kong, Shelton et al. 2001).

Analysen in homozygoten *Fhl2-knock-out*-Mäusen (*KO*) durch die Arbeitsgruppe um Chu et al. zeigten, dass der homozygote *KO* von *Fhl2* weder zu einem nachweisbaren kardialen Phänotyp führte, noch zu einer überschießenden hypertrophen kardialen Reaktion auf akute Druckbelastung. Dies legt die Vermutung nahe, dass *FHL2* für die normale Herzentwicklung und Herzfunktion nicht notwendig ist (Chu, Bardwell et al. 2000). In weiteren Mausmodellen mit *Fhl2*-Wildtyp-(*Fhl2*$^{+/+}$*),* heterozygoten (*Fhl2*$^{+/-}$), sowie homozygoten Nullmäusen (*Fhl2*$^{-/-}$) zeigten sich auch hier keine Unterschiede der embryonalen Herzentwicklung oder auf histologischer Ebene. Intraperitoneale Isoprenalin-Applikationen (28 mg/ml per 25 g Körpergewicht per Minipumpe) zeigten in *Fhl2*$^{-/-}$-Mäusen gesteigerte Hypertrophiezeichen auf diesen chronischen adrenergen Stress. Es ergab sich ein signifikant höheres Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis der *Fhl2*$^{-/-}$-Mäuse gegenüber den *Fhl2*$^{+/+}$-Mäusen. Die Tatsache, dass Fhl2 vor allem in der Embryonalentwicklung und hier besonders ausgeprägt im Ventrikelseptum nachzuweisen ist, sowie auch die massive Hypertrophie-Reaktion auf chronischen Stress machen deutlich, dass FHL2 möglicherweise eine ausschlaggebende Rolle in der Herzphysiologie spielen könnte (Kong, Shelton et al. 2001).

Betrachtet man die verschiedenen bekannten FHL2-Interaktionspartner, wird deutlich, dass FHL2 eine multifunktionelle Rolle einnimmt. Mehr als 50 verschiedene Interaktionspartner aus verschiedenen Funktionsklassen sind bekannt. Diese sind beispielsweise Integrin-Rezeptoren, große Strukturproteine wie α-Aktinin, Aktin und Titin, Transkriptionsfaktoren wie die Androgenrezeptoren oder ACT, der Aktivator von *cAMP-responsive element modulator* (CREM), ein wichtiges Protein der Spermatogenese-Regulation und SRF, der *serum response factor*, der als Transkriptionsfaktor eine regulierende Rolle in der Genexpression für Zellwachstum und -Differenzierung einnimmt. Zusätzlich zeigen sich weitere wichtige Interaktionen mit Splicingfaktoren oder Enzymen wie ERK2, die Adenylylzyklase, die Kreatinkinase und die Phosphofruktokinase (Johannessen, Moller et al. 2006).

In Bezug auf die Zytoarchitektur und die Zelladhäsion interagiert FHL2 mit mehreren unterschiedlichen Interaktionspartnern. Samson et al. untersuchten beispielsweise die Interaktion von FHL2 mit verschiedenen Integrin-Rezeptoren, die an der Zell-Adhäsionsseite der Peripherie von Z-Scheiben sitzen. Diese sind sowohl für die Verbindung der Zellen mit der extrazellulären Matrix, als auch für die Signaltransduktion der Zellen untereinander bedeutend. Obwohl in Experimenten mit *FHL2*-Überexpression keine Veränderung der Zelldurchlässigkeit oder des Zellverbandes feststellbar war, wurde davon ausgegangen, dass FHL2 eine Rolle in der Stabilisierung der Myozyten spiele (Samson, Smyth et al. 2004). Park et al. un-

tersuchten, ob die Abwesenheit von FHL2, das an die α- und β-Untereinheiten der Integrin-Moleküle der extrazellulären Matrix bindet, die Organisation dieser beeinträchtigt. In mesenchymalen Stammzellen, die entweder aus *Fhl2*-WT- oder *Fhl2-KO* Mäusen stammten, zeigte sich, dass die *KO*-Zellen im Gegensatz zu den WT-Zellen kaum in der Lage waren, ein extrazelluläres Netzwerk aufzubauen. Durch Zugabe von Retroviren, die für myc-getaggtes humanes FHL2 kodierten, konnte durch resultierende Expression von rekombinantem FHL2-Proteinen die fehlerhafte Matrix in den *KO*-Zellen zum Teil wiederhergestellt werden (Park, Will et al. 2008).

Die Arbeitsgruppe um Renger konzentrierte sich auf die Interaktion von FHL2 mit ß-Catenin. ß-Catenin funktioniert als zytoplasmatisches Ankerprotein, das an E-Cadherine gebunden ist und im Komplex mit ß-Catenin über Adhärens-Verbindungen den Kontakt zum Zytoskelett herstellt. Des weiteren besitzt ß-Catenin Funktionen in der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen und spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Herzentwicklung (Renger et al. 2013). Studien von Baurand et al. zeigten, dass die Herunterregulierung von ß-Catenin zur milden Form einer kardialen Hypertrophie des adulten Herzens führt (Baurand, Zelarayan et al. 2007). Renger et al. zeigten zusätzlich, dass FHL2 mit ß-Catenin interagiert und ß-Catenin-abhängige Transkription in kardialen Zellen verstärkt. Renger et al. konnten zeigen, dass *FHL2*-Überexpression die nukleare Translokation von *ß-Catenin* hochreguliert und dies ebenfalls dafür spricht, dass FHL2 zellspezifische Ko-Aktivatoren und Ko-Inhibitoren rekrutiert, um die ß-Catenin-gesteuerte Transkription kardialer Zellen zu beeinflussen (Renger et al., 2013).

Purcell et al. entdeckten die Interaktion von FHL2 mit der MAP-Kinase ERK2. Diese Kinase ist für einen der drei großen MAP-Kinase-Wege zuständig, deren Aktivatoren vor allem die beiden Kinasen MEK1 und MEK sind. Der MEK1/2-ERK1/2-Kinaseweg gilt als wichtiger Signalweg für das hypertrophe kardiale Wachstum. Die Potenz der Transkription von *ERK2* und dadurch auch das Genprodukt selbst sind durch FHL2 vermindert, wodurch *FHL2* als Inhibitor der MEK1/2-ERK1/2-Kinasewege wirkt. Diese Tatsache lässt vermuten, dass FHL2 in gesunden Herzen einer kardialen Hypertrophie entgegenwirken könnte und dass diese Funktion durch Mutationen im *FHL2*-Gen verlorengehen könnte, was wiederum die wichtige Rolle von FHL2 in der Herzphysiologie betont (Purcell, Darwis et al. 2004).

Okamoto, Li et al. untersuchten den Effekt von ROCK, *Rho-associated coiled-coil containing kinases*, im Hinblick auf die Interaktion mit FHL2 als „Hypertrophie-Hemmer“. Diese

Proteinkinasen werden durch Angiotensin II-aktiviertes RhoA, ein kleines GTPase-Protein der *Ras homolog gene family, member A*, aktiviert und regulieren die *downstream*-Effekte von RhoA auf das Aktin-Zytoskelett. Durch pharmakologische Inhibition von ROCK zeigte sich, dass diese bei der Pathogenese von verschiedenen kardiovaskulären Krankheiten wie zerebraler und koronaren Vasospasmen, als auch arterieller Hypertension oder kardialer Hypertrophie eine regulative Aufgabe einnehmen. In *ROCK2*-defizienten Mäusen zeigten Okamoto et al. eine *Fhl2*-Hochregulation mit konsekutiver Hemmung von SRF und ERK, sowie eine verminderte kardiale Hypertrophie-Entwicklung als Antwort auf Angiotensin II- und TAC-Stimulation. Die „transverse aortic constriction" (TAC) ist eine häufig genutzte Methode, um eine Druck-induzierte kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz hervorzurufen. Der Knockdown von *Fhl2* in *ROCK2*-defizienten Mäusen konnte diesen antihypertrophen Effekt interessanterweise aufheben.

Die Arbeitsgruppe um Hojajev et al. evaluierte den Einfluss von FHL2 auf Calcineurin-Signalwege. Dass der Calcineurin-NFAT-Pfad bei ß-adrenerger, Isoprenalin-induzierter Hypertrophie aktiviert ist (Saito et al, 2000) und sich der Weg mittels Calcineurin-Inhibition suffizient blockieren lässt (Wilkins, Molkentin et al., 2004), ist bekannt. Hojajev et al. behandelten *Fhl2*-WT- und *Fhl2-KO*-Mäuse mit Isoprenalin und analysierten diverse NFAT-Zielgene. Die Isoprenalin-Stimulation von *Fhl2*-WT-Mäusen zeigte eine Verdopplung der Fhl2-Proteine wie auch gleichsam erhöhte *Fhl2*-Transkripte im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit Kochsalz stimuliert worden war. In *Fhl2-KO*-Mäusen zeigte sich nach Isoprenalin-Stimulation für 7 Tage ein signifikanter Anstieg des Quotienten aus Herz-/Körpergewicht im Vergleich zu den WT-Mäusen, in den Kontrollgruppen zeigte sich keine Veränderung. Im Vergleich der basalen mRNA-Level von *BNP* und *Rcan1.4*, zwei bekannten Zielgenen des Calcineurin-NFAT-Pfades, zeigte sich in *Fhl2-KO*-Mäusen ein signifikanter Anstieg der Genexpression beider Gene nach Isoprenalin-Stimulation im Vergleich zum WT. Des weiteren zeigte sich, dass der Knockdown von *Fhl2* zu einer vermehrten Calcineurin-induzierten Aktivierung bestimmter Promoter von NFAT-Zielgenen führt und eine Überexpression von *Fhl2* diese Aktivierung verhindern kann. So kann man davon ausgehen, dass *FHL2* den Calcineurin-Pfad inhibieren und somit, zumindest teilweise, hypertrophes Wachstum blockieren kann. Auch dieses Ergebnis spricht für eine *FHL2*-Beteiligung an der Regulation von hypertrophen Signalkaskaden (Hojayev et al. 2009).

Den Einfluss von FHL2 auf fokale Adhäsionsstrukturen, die für die Verbindung von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) mit Integrinen notwendig sind, untersuchte die Gruppe um

Park et al. In *FHL2-KO*-Zellen zeigte sich verglichen mit *FHL2*-WT-Zellen, dass ERK1- und ERK2-Phosphorylierungen und Aktivierung der ERK-Kinasen vermehrt zu messen waren, welche einerseits durch Wachstumsfaktoren und andererseits Integrin-vermittelt sind. Eine Re-Expression von *FHL2* in *FHL2-KO*-Zellen verhinderte diese Integrin-vermittelte Phosphorylierung, genauso wie die verstärkte Kinase-Aktivität selbst. Die Integrin-vermittelte ERK-Aktivierung wird durch die Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) katalysiert, deren Aktivierung selbst durch Bindungen von Integrin-Molekülen mit Matrix-Proteinen initiiert wird. Gabriel et al. konnten feststellen, dass FHL2 mit fokalen Adhäsionskinasen (FAK) Komplexe bildet und so interagiert (Gabriel, Mildenberger et al. 2004). Die Tatsache, dass fokale Adhäsionen auch in der Abwesenheit von FHL2 gebildet werden, spricht laut Park dafür, dass FHL2 nicht hauptsächlich an der Rekrutierung der FAKs für Integrin-Bindungen verantwortlich ist. Zusammenfassend zeigt sich der Einfluss von FHL2 auf die Integrin-vermittelte ERK-Aktivierung und dass der KO zu veränderten Integrin-/FAK-Signalwegen führt. Weiterführend zeigten sich in Immunfluoreszenz-Färbungen in *FHL2-KO*-Zellen Beeinträchtigungen der fokalen Adhäsionsmuster und des Aufbaus der extrazellulären Matrix (Park, Will et al. 2008).

Sun et al. untersuchten FHL2 im Zusammenspiel mit der Kinase Sphingosin, deren Produkt Sphingosin-1-Phosphat als intrazellulärer *„second messenger“* wichtige Aufgaben in biologischen Prozessen wie der Regulation des Zellwachstums, -proliferation und -apoptose, sowie der Calcium-Homöostase übernimmt. Es zeigte sich, dass die Überexpression der zwei verschiedenen Isoformen der Kinase, *SK1* und *SK2*, entweder zu vermehrtem Zellüberleben und Verhinderung der Apoptose (*SK1*) oder, im Gegensatz dazu, zu unterdrücktem Zellwachstum und verstärkter Apoptose (*SK2*) führte. Diese Phänomene führten zu der Annahme, dass die Kinase als interner Sensor fungieren kann, der über das Schicksal einer Zelle entscheidet. In verschiedenen Versuchen stellte sich heraus, dass FHL2 und SK1 im Zytoplasma ko-lokalisiert sind, und FHL2 hemmende Eigenschaften gegenüber der SK-1 besitzt, und so SK1-vermittelte anti-apoptotische Effekte verhindert (Sun, Yan et al. 2006).

Die Arbeitsgruppe um Robert et al. zeigte weiterführend, dass das SK-Produkt Aminophospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten ein potenter Stimulator der kardialen Hypertrophie ist und zugleich zur Aktivierung der ERK1 und 2 beiträgt, welche, wie oben beschrieben vermehrt in *Fhl2-KO*-Zellen zu beobachten waren (Robert, Tsui et al. 2001).

3.8 FHL2 und Titin

FHL2 als Interaktionspartner des elastischen Riesenfilaments Titin, das größte und eine der wichtigsten Proteine des Sarkomers, das für dessen Zusammenhalt und mechanische Eigenschaften zuständig ist, wurde durch mehrere Arbeitsgruppen untersucht. Titin ist nach Aktin und Myosin der dritte Bestandteil des Sarkomers. Es ist etwa 3,6 MDa schwer und spannt als Polypeptid von der Z-Scheibe zur M-Bande (Abb. 4).

Die Region der I-Bande ist dehnbar und besteht aus tandemartig angeordneten Immunglobulin-ähnlichen proximalen und distalen Segmenten sowie den unregelmäßig angeordneten N2B-Regionen und den PEVK-Elementen. Diese beiden Regionen funktionieren als federnde Elemente. Das C-terminale Ende des Titins ist nicht dehnbar und sitzt in der A-Bande des Titins. Dieser Teil besteht aus sich wiederholenden Regionen und ist vor allem für die Anordnung der dicken Filamente notwendig. Das COOH-Ende sitzt integriert in der M-Scheibe des Sarkomers und besitzt Kinase-Domänen. Wie in den Z-Scheiben, wo sich Titin-Filamente der gegenüberliegenden Sarkomere überlappen, überlappen sich auch Titin-Filamente der gegenüberliegenden Sarkomere in der M-Bande, mit denen sie durch typische Proteine der M-Bande verbunden sind. So entsteht ein zusammenhängendes Protein entlang der Myofibrillen, das vor allem für die passive Spannung, die durch die dehnbare Region in der I-Bande des Titins entsteht, zuständig ist. Durch Spleißen entstehen verschiedene Isoformen des Titins. Drei kardiale Isoformen sind bekannt: N2B, N2BA und FCT. Sie besitzen aufgrund von unterschiedlichen Elementen unterschiedlich elastische Eigenschaften, so ist N2BA ist im Vergleich mit N2B wesentlich dehnbarer. Im linken Ventrikel beispielsweise zeigt sich eine Ko-Expression von N2B und N2BA, wobei das Verhältnis von N2BA zu N2B im linken Ventrikel bei ungefähr 0,6 liegt, während im Atrium fast ausschließlich N2BA exprimiert wird. Die N2B-Regionen können zusätzlich zu ihren elastischen Eigenschaften die Signalwege der kardialen Hypertrophie beeinflussen, während die PEVK-Regionen eher als molekulare Bremser dieser dienen (LeWinter and Granzier 2010).

Es wurde postuliert, dass die Interaktion zwischen Titin, FHL2 und verschiedenen Enzymen der Sicherstellung einer hohen Konzentration an metabolischen Enzymen dient, die für den Energiebedarf der Herzaktion benötigt werden. Diese Enzyme, die Muskel-Isoform der Kreatinkinase (MM-CK), die Adenylylzyklase und die Phosphofruktokinase, sollen direkt an FHL2-Proteine binden. FHL2 wiederum soll als Adaptorprotein an zwei Seiten des Titins, zum einen an der N2B-Region, einer herzspezifischen Insertion der I-Bande, und zum anderen abgeschwächter an der is2-Region der M-Bande des Titins binden. Diese Annahme wurde mit

Antikörper-Versuchen gegen FHL2 und verschiedene Epitope des Titins unterstützt, wo sich deutlich eine Querstreifung des Sarkomers zeigte (Lange, Auerbach et al. 2002). Bovill et al. untersuchten die Veränderung der Lokalisation der FHL2-Proteine in insuffizienten Herzen im Vergleich zu normalen Herzen. In insuffizienten Herzen zeigten sich hohe FHL2-Akkumulationen im Golgi-Apparat und stark verminderte Lokalisation in den Z-Banden, die Bindung von FHL2 mit der Adenylylzyklase, der Muskel-spezifischen Kreatinkinase und der Phosphofruktokinase 2 blieb jedoch erhalten (Bovill, Westaby et al. 2009).

Radke zeigte in *N2B-KO*-Mäusen, dass der *KO* der herzspezifischen N2B-Region zu Veränderungen der Sarkomerstruktur, insbesondere zu einer erhöhten passiven Spannung durch kompensatorische Dehnung der PEVK-Regionen führte. Dies würde ein verkürztes Sarkomer im entspannten Zustand, längerfristig eine reduzierte Herzgröße, sowie eine verminderte diastolische Funktion mit steifem Ventrikel bedeuten. So sei die N2B-Region zwar für die kardiale Entwicklung und Sarkomerogenese verzichtbar, für die trophischen und elastischen Eigenschaften jedoch unerlässlich. Vor allem das reduzierte Herzwachstum, assoziiert mit einem geringeren Fhl2-Protein-Level bei unverändertem *Fhl2*-mRNA-Level und gleichzeitigem Anstieg des Hypertrophie-Markers ANP führte zur Idee, die potenziellen, regulatorischen Weg der Titin-FHL2-Interaktionen in einigen Mutationen tiefgreifender zu untersuchen (Radke, Peng et al. 2007). Die PEVK-Region macht zusammen mit der N2B-Region die dehnbare Region des Titins aus und liegt in der I-Bande des Sarkomers. Auch in *PEVK-KO*-Mäusen zeigte sich eine diastolische Dysfunktion, sowie linksventrikuläre Steife, die mit erhöhten Pulsfrequenzen ausgeglichen wurde. Des weiteren wurden auch systolisch erhöhte linksventrikuläre Volumina mit längerfristig beginnender linksventrikulärer Hypertrophie und einer Erhöhung des Herz-/Körpergewicht-Verhältnis um etwa 10% festgestellt. Die N2B-Elemente in den *PEVK*-KO zeigten sich aufgrund der Eliminierung der elastischen PEVK-Region stärker gedehnt, so dass sich eine erhöhte passive Spannung in den verbleibenden Elementen zeigte und in einer daraus folgenden diastolischen Dysfunktion resultierte. Auffällig war hier, dass die Sarkomerlänge im entspannten Zustand, im Gegensatz zu den *N2B-KO*-Mäusen, nicht verändert war. Die *Fhl1+2*-mRNA-Level zeigten eine etwa 10%ige Erhöhung, während die Proteinlevel um mehr als das Doppelte erhöht waren (Granzier, Radke et al. 2009).

In Studien von Matsumoto et al. zeigte sich, dass Mutationen in den Titin-N2B Regionen sich auf die Bindungsaffinität von FHL2 an Titin auswirkten. Die HCM-assoziierte Titin-Mutation Ser3799Tyr beispielsweise führte zu einer gesteigerten FHL2-Bindung an Titin, während die

DCM-assoziierte Mutation Gln4052Ter zu einem verminderten Bindungsverhalten führte (Matsumoto, Hayashi et al. 2005).

3.9 Zielsetzung und Bedeutung dieser Arbeit

Zusammenfassend kann man sagen, dass bis heute keine Mutationen im *FHL2*-Gen in Bezug auf die HCM bekannt sind, dieses Protein jedoch ein wichtiger Interaktionspartner von großen Strukturproteine wie α-Aktinin, Aktin und Titin, von Rezeptoren wie beispielsweise dem Integrin-Rezeptor, von Transkriptionsfaktoren wie den Androgen-Rezeptoren, ACT oder SRF, Spleißfaktoren oder metabolischen Enzyme im Herzen ist. Wie oben aufgeführt, gibt es deutliche Hinweise, dass *FHL2*-Mutationen mit der Entwicklung einer HCM assoziiert sein könnten. Deshalb soll Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit die Evaluation und die Relevanz einzelner *FHL2*-Punktmutationen sein. Die Ziele lassen sich wie folgt zusammenfassen:

I. Klonierung von humaner *FHL2*-WT-cDNA in einen Flag-markierten Expressionsvektor und einen GST-markierten bakteriellen Expressionsvektor.
II. PCR-geführte Mutagenese des humanen *FHL2*-WT-Plasmids zur Produktion von in HCM-Patienten identifizierten *FHL2*-cDNA-Mutationen.
III. Evaluation der korrekten Expression und Lokalisation der FHL2-Varianten in Mauskardiomyozyten.
IV. Evaluation des Einflusses der FHL2-Varianten im 3D-Modell des künstlichen Herzgewebes.
V. Herstellung rekombinanter FHL2-Proteine in WT-Form und der FHL2-Mutanten in E.coli sowie nachfolgende Analyse mittels Coomassie und Western-Blots.
VI. Durchführung von Titin-Bindungsanalysen der rekombinanten Proteine durch Prof. Dr. Wolfgang Linke vom Institut für Physiologie der Ruhr-Universität Bochum.

4 Material und Methoden

4.1 Screening

Zu Beginn meiner Arbeit war die Sequenzanalyse freundlicherweise bereits von S. Reischmann und Dr. Felix Friedrich aus dem Institut für Experimentelle Pharmakologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt worden. 30 ng der genomischen DNA von peripheren Lymphozyten von 121 Patienten mit nachgewiesener, familiärer hypertropher Kardiomyopathie (FHC) in den fünf kodierenden Regionen des *FHL2* waren mittels PCR auf Mutationen untersucht worden. Die Sequenzen wurden mittels Codon Code Aligner Software® analysiert, die Referenz-Sequenz wurde aus NCBI, NG_008844.2, genommen.

In der genomischen DNA war zuvor in oben genannten Genen *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* und *MYL2* keine Mutation gefunden worden. Diese Indexpatienten wurden aus insgesamt 299 Indexfällen einer Herzinsuffizienz-Kohorte, der *Eurogene Heart Failure* Kohorte, rekrutiert. Die Patienten wurden zuvor neben der Anamneseerhebung und körperlichen Untersuchung mittels EKG und Echokardiografie diagnostiziert. Kriterium der Echokardiografie für eine HCM war eine linksventrikuläre Wanddicke von über 15 mm bzw. über 0,13 mm in Verwandten. Als Kontrollen dienten 262 gesunde Personen. Alle Patientenproben wurden im einvernehmlichen Wissen der Spender und mit der Zustimmung der zuständigen Ethikkommission entnommen.

Für das Screening des *FHL2*-Genoms wurden Primer in 5‘3‘-Richtung benötigt, die in den unten genannten Exons des Genoms binden und in Sequenzierungen mögliche *single nucleotide polymorphism*s (SNPs) bzw. Mutationen aufdecken. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mithilfe der Primer3-Software (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0) gestaltet und von der Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg, Deutschland vollständig synthetisiert. Zur Sequenzierung wurden die Proben zur Analyse an selbige Firma verschickt.

Exon	**Vorwärts (5‘→3‘)**	**Rückwärts (5‘→3‘)**
Exon 4	CCGCCCTAGCTAATGAAAAA	CTTGTGGGCAGAGATCACATT
Exon 5	CAGCAAGAGAAAAGCAGCCTA	GGGCTGATGCAGGAGATGTA
Exon 6	TGCCTAAAATGTACACGTGTTGT	TTTGAAAGAAGGATGGACACC
Exon 7	CACTGGAATGAAAGCGTGTG	CACTGGCCATATGGTTGTGA
Exon 8	CGCACTTATCCCATCGTTTT	GCCTAGGGCGAGTTTTCTCT

Tabelle 3: Auflistung der benutzten Primer beim Screening nach Mutationen im *FHL2*. Angegeben sind die Basenpaare in 5‘3‘-Richtung, wie auch das Ziel-Exon des jeweiligen Primers.

4.2 Zur Arbeit der Plasmid-Konstruktion

4.2.1 Amplifikation der *FHL2*-cDNA

Als Ausgangsmaterial für alle weiteren Klonierungsschritte für die Mutagenese der AAV6-Viren wie auch der rekombinanten Proteine musste die cDNA von *FHL2* amplifiziert werden. Dieses geschah mittels PCR an humaner, kardialer DNA eines gesunden Spenderherzens. Für die Produktion der AAV6-Viren wurden mit den unten genannten Primern neben der *FHL2*-Sequenz die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme von BamHI und BsaBI eingefügt. Des weiteren wurden eine CACC-Sequenz, eine Kozak-Sequenz zur Translations-Initiierung sowie zwei Flag-Tags vor die Sequenz des eigentlichen *FHL2* zur späteren Detektion mittels Western Blots eingebaut (Abb. 6 A).

Auch für die Herstellung der rekombinanten FHL2-Proteine musste als Ausgangsmaterial für alle weiteren Schritte zunächst die cDNA von *FHL2* amplifiziert werden. Mittels Linker-PCR mit den unten genannten Primern wurden vor bzw. hinter die Sequenz des WT-*FHL2* die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und SmaI ins cDNA-Fragment eingefügt. Außerdem wurde auch in diesem Konstrukt eine CACC-Sequenz vor die Sequenz des eigentlichen *FHL2* eingefügt (Abb. 6 B).

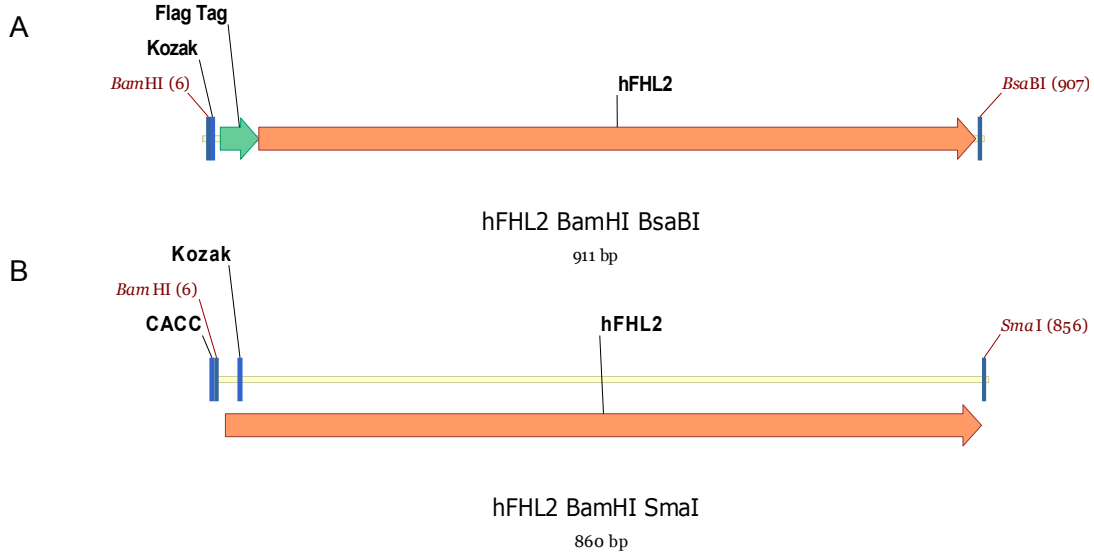


Abb. 6: h*FHL2* cDNA für die Produktion rekombinanter Proteine (A) und für die AAV6-Produktion (B) mit Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme. Aus humaner, kardialer cDNA eines gesunden Spenderherzens wurde mittels Linker-PCR mit den Primern 5’-CACC-BamHI-ATG und 3`-SmaI die h*FHL2*-cDNA mit den BamHI- und SmaI-Schnittstellen bzw. mit den Primern 5’-CACC-BamHI-Kozak-ATG-Flag2 und 3’- BsaBI-*FHL2*

die h*FHL2*-cDNA mit den BsaBI- und BamHI-Schnittstellen amplifiziert. *hFHL2*: humanes *FHL2*, BamHI, SmaI, BamHI und BsaBI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme, Flag-Tag: Flag-Sequenz, Kozak: Kozak-Sequenz.

4.2.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction,* „PCR“) dient der exponentiellen Amplifikation kürzerer DNA-Abschnitte *in vitro*. Diese Reaktion verläuft in mehreren, sich zyklisch wiederholenden Schritten. Die PCR vervielfältigt dabei einen DNA-Abschnitt, der zwischen den sogenannten Primern der Reaktion liegt. Diese sind zwei kurze, komplementäre Oligonukleotide, die an beiden Enden des zu vervielfältigenden Abschnittes der Sequenz liegen. Diesen Schritten, die die Denaturierung, das *Annealing* und die Elongation beinhalten, geht ein längerer Denaturierungsschritt voraus.

Die hier angewendeten PCR wurden als Linker-PCR durchgeführt, denn neben den zur DNA-Matrize homologen Sequenzen enthielten die Primer zusätzlich noch matrizenfremde Motive. Diese Motive sind die Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsendonukleasen, die normalerweise in der DNA nicht schneiden, für anschließende Restriktionen jedoch gebraucht werden. Im Laufe der Arbeit kamen verschiedene Enzyme, Primer und Reaktionsansätze zum Einsatz, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

Oligoname	**Sequenz (5‘→3‘)**	**Tm**
BamHI-h*FHL2*	CACCGGATCCGCATGACTGAGCGCTTTGAC	56 °C
BsaBI-h*FHL2*	CGATTATGATCTCAGATGTCTTTCCCACAGTC	58 °C
SmaI-h*FHL2*	GCCCGGGTCAGATGTCTTTCCCACAG	55°C
BamHI-Flag2-h*FHL2*	CACCGGATCCGCCACCATGGATTATAAAGATCAT-GACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGACT-GAGCGCTTTGACTGC	54 °C

Tabelle 4: Liste der für die Linker-PCR benötigten Primer: Angabe der Sequenz in 5‘3‘-Richtung sowie der Schmelztemperatur.

Reagenzien	**Menge**
5x Puffer	4 µl
2,5 mM dNTPs	1,6 µl
5‘-CACC-BamHI-Kozak-ATG-Flag2	0,4 µl
3’BsaBI-*FHL2*	0,4 µl

PrimeStar Polymerase	0,2 µl
Humane kardiale cDNA	1 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	20 µl Endvolumen
Endvolumen	20 µl

Tabelle 5: Reaktionsansatz der *Touchdown*-PCR. PCR mit 5'-CACC-BamHI-Kozak-ATG-Flag2- und 3'BsaBI-*FHL2*-Primern für das für die Virenproduktion benötigte cDNA-Konstrukt.

Reagenzien	**Menge**
5x Phusion GC Puffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
5'-CACC-BamHI-ATG	2,5 µl
3'SmaI-h*FHL2*	2,5 µl
Phusion Hotstar Polymerase	0,5 µl
Humane kardiale cDNA	2,5 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	50 µl Endvolumen
Endvolumen	50 µl

Tabelle 6: Reaktionsansatz der *Touchdown*-PCR. PCR mit 5'-CACC-BamHI-ATG und 3'SmaI-h*FHL2*-Primern für das für die Proteinherstellung benötigte cDNA-Konstrukt.

Temperatur	**Zeit**	**Zyklen**
94 °C	5 min	
94 °C	30 s	11 Zyklen
60 °C	30 s	
72 °C	70 s	
94 °C	30 s	24 Zyklen
55 °C	30 s	
72 °C	70 s	
72 °C	15 s	
4 °C	∞	

Tabelle 7: Konditionen der *Touchdown*-PCR: PCR mit 5'-CACC-BamHI-Kozak-ATG-Flag2- und 3'BsaBI-*FHL2*-Primern für das für die Virenproduktion benötigte cDNA-Konstrukt, sowie PCR mit 5'-CACC-BamHI-ATG und 3'SmaI-h*FHL2*-Primern für das für die Proteinherstellung benötigte cDNA-Konstrukt.

1 µl des PCR-Produkts wurden mit 4 µl Ladepuffer versehen und das PCR-Ergebnis mittels Gel-Elektrophorese kontrolliert.

4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Moleküle mit einer Nettoladung wandern im elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit ist dabei abhängig von Feldstärke, Nettoladung sowie dem Reibungskoeffizienten. Moleküle unterschiedlicher Größe wandern unterschiedlich schnell durch ein Gel. Mit Hilfe der Gel-Elektrophorese ist eine Auftrennung der DNA-Fragmente ihrer Größe nach möglich ist. Die DNA kann durch hinzugefügtes Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Als Trägermedium wird Agarose verwendet, in dieser Arbeit fanden ausschließlich 1%ige TAE-Gele Verwendung.

Der Gelschlitten wurde in einen Rahmen eingespannt und ein Kamm mit der gewünschten Anzahl an Taschen eingehängt. Um ein 1% TAE-Agarose-Gel herzustellen, wurden je nach Größe des gebrauchten Gels, z.B. 50 ml 1% TAE-Puffer und 0,5 g Agarose in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt, mit 4 µl/100 ml Ethidiumbromid versehen und in den Schlitten gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Schlitten aus dem Rahmen ausgespannt, in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt und der Kamm aus dem Gel entfernt. Es wurden 20 µl der Proben in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Größenstandard wurden je nach Bedarf eine 100 bp-Leiter oder eine 1 kb-Leiter parallel über das Gel aufgetrennt. Nach dem Laden wurde eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proben für ca. 1 h bei 80-200 V (je nach Größe der Kammer und der Fragmente) aufgetrennt. Die passenden Fragmente wurden im Anschluss aus dem Gel geschnitten und die DNA extrahiert.

4.2.4 DNA-Gelextraktion

Das Prinzip der DNA–Extraktion aus Agarosegelen beruht auf der unterschiedlichen Bindungsfähigkeit von DNA-Fragmenten bei variablen pH- und Salzkonzentrationen. Die Zugabe eines Bindungspuffers mit hoher Salzkonzentration und einem niedrigen pH-Wert zu einem DNA-enthaltenden Agarose-Gelfragment führt zur Verflüssigung des Agarosegels und Bindung der DNA an die Silica-Membran einer Trägersäule. Der Bindungspuffer enthält einen pH-Wert-Indikator, der über seine gelbe Färbung optimale Bindungsbedingungen anzeigt. Die dann folgenden Waschschritte dienen der Reinigung der DNA von Kontaminationen wie z.B. Agarose, Salzen, Enzymen und Oligonukleotiden. Die Elution der gebundenen DNA erfolgt mit destilliertem Wasser.

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction-Kits* nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Gewicht der DNA-Probe wurde ermittelt und zu dem

bestimmten Gelgewicht das Dreifache dieses Gewichtes an QG-Puffer gegeben. Danach wurde die Probe für 10 min bei 50 °C und 550 rpm im Thermoblock schüttelinkubiert. Nachdem sich das Gel durch die Inkubation vollständig gelöst hatte, wurde die Probe vortex-gemischt. Dann wurde zum Ansatz ein Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend erneut vortex-gemischt, 750 µl davon auf die QIAquick-Spin-Säule pipettiert und bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurde mit dem Rest der Lösung analog verfahren. In einem nächsten Schritt wurden 500 µl QG-Puffer auf die Säule gegeben und diese bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert, das Zentrifugat verworfen und im Anschluss eine erneute Zentrifugation für 30 s bei 13000 rpm und Raumtemperatur durchgeführt. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 30 µl Aqua ad iniectabilia direkt auf die Membran der Säule pipettiert. Eine abschließende Zentrifugation zur Elution der DNA aus der Säule wurde für 1 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Der DNA-Gehalt konnte anschließend mittels Nano Drop-Messung ermittelt werden. Im Anschluss an die Gelextraktion wurden die cDNA-Fragmente in den Arbeitsvektor pEF5-TOPO von Invitrogen kloniert (Abb. 7).

4.2.5 Vektor pEF5/FRT/V5-D-TOPO

Der Vektor pEF5/FRT/V5-D-TOPO diente während der Klonierungsschritte als Arbeitsvektor. Dieser Vektor ist Bestandteil des *pEF5/FRT/V5 Directional TOPO Expression Kit* von Invitrogen und dient der direktionalen Klonierung eines *blunt-end* PCR-Produkts in den 5,8 kb großen Expression-Vektor (Abb. 7). Im Folgenden wird der Vektor der zur Vereinfachung pEF5-TOPO genannt.

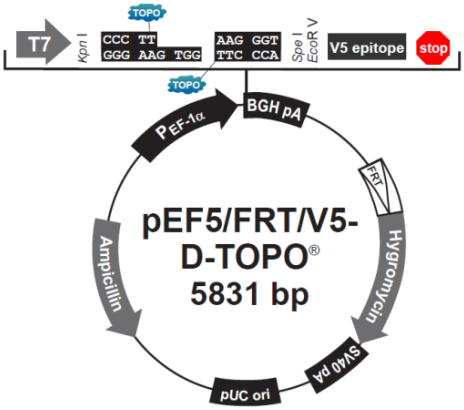


Abb. 7: Der Transport-Vektor pEF5-TOPO. Abbildung aus der Anleitung *pEF5-TOPO Expression Kit* der Firma Invitrogen.

Für die folgenden Klonierungen der PCR-Produkte in den TOPO-Vektor wurde ein Verhältnis des 0,5 bis 2 fachen des PCR-Produkts zum Vektor vorgeschlagen. Wir benutzten bei unseren Klonierungen jeweils ein 1:1-Verhältnis. Der Vektor konnte nach erfolgreicher Klonierung anschließend in TOP 10 E.coli transformiert werden.

4.2.5.1 TOP 10-E.coli und BL 21-E.coli

Bei den verwendeten TOP 10-Zellen handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen E.coli-Stamm, der sich durch seine Überexpression des Lac-Repressor-Gens für *Blue-White-Screening* auszeichnet. Es wurden TOP 10-Zellen (F-mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZDM15 DlacX74 recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG) der Firma Invitrogen verwendet. Diese Bakterien wurden in chemisch kompetenter Form (für Hitzeschock-Transformation geeignet) verwendet. Aufgrund des großen Bedarfes an TOP 10-Zellen wurden diese nach einem eigenen Protokoll vermehrt, Abschnitt hierfür 4.2.6. Bei den im weiteren Verlaufe auch verwendeten Protease-defizienten BL 21-Zellen handelt es sich ebenso um einen kommerziell erhältlichen E.coli-Stamm, der vor allem für die Expression rekombinanter Proteine benötigt wird. Es wurden BL 21-Zellen (E.coli B F-, ompT, hsdS (rB-, mB-), gal, dcm. der Firma GE Healthcare verwendet, die aufgrund des großes Bedarfs nach eigenem Protokoll vermehrt wurden, siehe hierfür das folgende Kapitel.

4.2.6 Herstellung chemisch-kompetenter TOP 10 E.coli

Die benötigten TOP 10 E.coli stellten wir für die eigene Produktion selbst her. Hierfür wurde zunächst eine LB-Agarplatte mit Top 10-Zellen über Nacht im Inkubator bei 37°C angeimpft. Am Folgetag wurden zwei Kolonien gepickt, in jeweils 5 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht schüttelinkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 5 ml der entstandenen Suspension in einen autoklavierten Erlenmeyer-Kolben mit 200 ml LB-Medium überführt und dieser bis zu einer OD_{600} (optische Dichte bei 600 nm Lichtwellenlänge) von 0,4 erneut unter gleichen Bedingungen schüttelinkubiert und anschließend für einige Minuten auf Eis gestellt. Diese Suspension wurde in passende, sterile Zentrifugengefäße gegeben, für 10 min bei 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die entstandenen Pellets anschließend in 60 ml kaltem TFBI auf Eis vollständig resuspendiert. Nach anschließender einstündiger Lagerung der Suspension auf Eis wurden die Kulturen ein weiteres Mal für 10 min, 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in 8 ml TFBII auf Eis resuspendiert. Zuletzt wurden je 200 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.7 Transformation chemisch kompetenter E.coli–Bakterien TOP 10/BL 21

Diese Methode dient dem Einbringen von Fremd-DNA in Bakterienzellen. Die Plasmidlösung wurde zunächst leicht geschüttelt und auf Eis vorgekühlt. Die chemisch kompetenten Bakterien, hier TOP 10, wurden von -80 °C Lagerungstemperatur auf Eis aufgetaut. In das 1,5 ml Aliquot-Reaktionsgefäß mit 20 µl der Bakteriensuspension wurde 1 µl der Plasmidlösung gegeben. Der Reaktionsansatz wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Der folgende Hitzeschock wurde durch Überführen des Reaktionsgefäßes in einen auf 42 °C vorgeheizten Thermoblock für 30 s durchgeführt. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium (*super optimal broth; SOB with catabolite repression*) bei 37 °C wurde das Reaktionsgemisch für 60 min bei 37 °C und 300 rpm schüttelinkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen, auf Raumtemperatur vorgewärmten Agarplatten ausplattiert. Dabei wurden je 50 µl und 200 µl des Reaktionsgemisches auf einer Agarplatte mittels einer aus einer Pasteurpipette geformten dreieckförmigen Plattieröse verteilt und die Agarplatten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.2.8 Vereinzelung von Bakterienklonen und Flüssigungskultur

Um möglichst große Menge an rekombinanten Plasmiden zu erhalten, wurden nach Transformation und Inkubation über Nacht monoklonale Bakterienkulturen von den beimpften Agarplatten gepickt und eine Übernacht-Flüssigkultur angelegt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 12 Stunden wurden die Agarplatten dem Brutschrank entnommen. Um ausschließlich monoklonale Kolonien zu erhalten, wurden nur solche Kolonien weiterverwendet („gepickt“), die klar begrenzt waren, eine runde Form aufwiesen und an keine anderen Kolonien auf der Platte Anschluss hatten. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden die Kolonien vorsichtig von der Platte abgetragen. Für jede neue Kolonie wurde eine neue Pipettenspitze verwendet. Zur Vermehrung der Bakterien wurden Übernacht-Flüssigkulturen angelegt. Hierfür wurde jeweils eine gepickte Kolonie in 3 ml LB-Medium für eine Minipräparation gegeben. Des weiteren wurden die Übernacht-Kulturen mit 50 µl Ampicillin pro 100 ml LB-Medium versetzt. Die so angelegten Kulturen wurden in sterilen 10 ml *Snapcap*-Behältern für mindestens 12 Stunden bei 37 °C und 100 rpm inkubiert und anschließend entweder in der Minipräparation verwendet oder 0,5 ml der Übernacht-Kultur nach 12 h in einen 2 l Kolben mit 300 ml LB-Medium und Ampicillin gegeben und bei gleichen Konditionen für einen größeren Ansatz (Maxi-Präparation) inkubiert.

4.2.9 Plasmidisolation mittels Minipräparation

Zur Herstellung von Minipräparation wurde das *NucleoSpin Plasmid* Kit von Marcherey-Nagel genutzt. Um die Bakterienzellen zu ernten und kultivieren, wurden 2 ml der gesättigten E.coli-Kultur im LB-Medium der Übernachtkultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 30 s bei 11000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Zur Zell-Lyse wurden 250 µl Puffer A1 in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Zellen wurden durch Vortexen komplett resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer A2 hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden vorsichtig 8 Mal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis das Lysat klar erschien. Nun wurden 300 µl Puffer A3 dazugegeben und wieder vorsichtig 8 Mal invertiert. Zur Klärung des Lysats wurde 5 min bei 11000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Bindung der DNA wurden 750 µl des Überstandes auf die *NucleoSpin Plasmid*-Säule gegeben und für 1 min bei 11000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und im Anschluss der Durchfluss verworfen. 600 µl Puffer A4 wurden auf die Säule gegeben und wieder das Reaktionsgefäß für 1 min bei 11000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein leeres 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt und zur Trocknung der Silica-Membran für 2 min bei 11000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde die *NucleoSpin Plasmid*-Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 50 µl Aqua ad iniectabilia versetzt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation für 1 min bei 11000 g und Raumtemperatur. Nach erfolgreicher Transformation wurde zur Kontrolle ein Restriktionsverdau mit anschließender Kontrollsequenzierung durchgeführt.

4.2.10 Plasmidisolation mittels Maxi-Präparationen

Die Plasmidisolation mittels Maxi-Präparation wurde mithilfe des *NucleoBond Xtra Plasmid Purification* Kit von Marcherey-Nagel durchgeführt. Die 300 ml der Übernachtkultur der Transformation, siehe Kapitel 4.2.7, wurden durch Zentrifugation bei 4500 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand abgegossen, um die Bakterienzellen zu ernten. Zur Re-Suspension wurden 12 ml Puffer RES + RNase gegeben und solange auf- und abpipettiert bis die Suspension vollständig flüssig war. Zur Zell-Lyse wurden 12 ml Puffer LYS zur Suspension gegeben, 5 mal vorsichtig invertiert und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Filter der *Nucleo Bond Xtra*-Säule equilibriert. Zur Neutralisation wurden 12 ml Puffer NEU zur Suspension gegeben und anschließend sofort durch 15-maliges Invertieren gemixt. Die homogene Suspension wurde nach dreimaligem Mixen auf die Filter der *Nucleo Bond Xtra* Säule gegeben und dort gelassen, bis sie den Filter mittels Gravitationskraft durchflossen hatte. Die Säule und der Filter wurden mit 12 ml des Puffer EQU gewaschen, indem diese wieder auf die überstehenden Ränder der Säule gege-

ben wurden. Anschließend wurde der Filter vorsichtig aus der Säule gezogen und verworfen. Nun wurden 25 ml WASH Puffer in die Säule gegeben, um die Säule nochmals zu waschen. Zur Elution der DNA aus der Membran wurden 15 ml ELU Puffer in die Säule gegeben und das Eluat in einem 50 ml Zentrifugengefäß aufgefangen. Zu diesem wurden zum Präzipitieren 10,5 ml Isopropanol gegeben und anschließend gevortext. Die Suspension wurde daraufhin für 60 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zum Waschen und Trocknen der DNA wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, verworfen und die Zentrifugation für 15 min, 5000 rpm und Raumtemperatur wiederholt. Zum Ermitteln des DNA-Gehalts wurde der Nano Drop benutzt. Im Anschluss an die Maxipräparation wurde ein Kontrollverdau zur Verifizierung der gewünschten pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT Sequenz durchgeführt.

4.2.11 Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind prokaryotische Enzyme, die spezifische Sequenzen einer DNA-Doppelhelix, die nur wenige Basenpaare (bp) lang sind, erkennen und in beiden Strängen der Helix an ebenfalls spezifischen Stellen den DNA-Strang hydrolytisch spalten. Bei den Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen Typ II handelt es sich zumeist um Palindrome, die innerhalb der Erkennungssequenz des Enzyms liegen. Restriktionsendonukleasen werden dazu genutzt, DNA-Moleküle in spezifische Fragmente zu zerteilen und zugleich spezifische Enden (überlappende „*sticky ends*“, oder solche ohne Strangüberhang, stumpfe-, also „*blunt ends*“) zu erzeugen, um verschiedene DNA-Fragmente anschließend durch Ligation miteinander verbinden zu können.

Sämtliche DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt. Die Hauptbezugsquelle für Restriktionsendonukleasen waren die FastDigest Enzyme von Fermentas.

4.2.12 FastDigest Enzyme

Name	**Sequenz 5‘→3‘**	**Temperatur**
FastDigest BamHI	GGATCC und CCTAGG	37 °C
FastDigest BsaBI	GATNNNNATC und CTANNNNTAG	65 °C
FastDigest EcoRI	GAATTC und CTTAAG	37 °C
FastDigest NotI	GCGGCCGC und CGCCGGCG	37 °C
FastDigest SmaI	CCCGGG und GGGCCC	37 °C
FastDigest XbaI	TCTAGA und AGATCT	37 °C

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete FastDigest Enzyme der Firma Fermentas. Angegeben sind Name, Sequenz und die benötigte Temperatur. Für alle Enzyme wurde der 10x FastDigest Green Buffer verwendet.

Im Folgenden aufgelistet sind der Ansatz und die Bedingung für die oben beschriebenen Kontrollverdaue pEF5-TOPO-h*FHL2*-Flag2-WT mit BamHI und BsaBI und pEF5-TOPO-*FHL2*-WT mit BamHI und SmaI.

Reagenzien	**Menge**
FastDigest BamHI	1 µl
FastDigest BsaBI	1 µl
10x Green Buffer	2 µl
pEF5-TOPO-h*FHL2*-Flag2-WT	200 ng
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	auf 20 µl
Endvolumen	20 µl
Bedingungen	5 min bei 37 °C ohne BsaBI, dann 5 min bei 65 °C mit BsaBI

Tabelle 9: Ansatz des Kontrollverdaus pEF5-TOPO-h*FHL2*-Flag2-WT mit BamHI und BsaBI.

Reagenzien	**Menge**
FastDigest BamHI	1 µl
FastDigest SmaI	1 µl
10x Green Buffer	2 µl
pEF5-TOPO-*FHL2*-WT	200 ng
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	auf 20 µl
Endvolumen	20 µl
Bedingungen	5 min bei 37 °C

Tabelle 10: Ansatz des Kontrollverdaus von pEF5-TOPO-*FHL2*-WT mit BamHI und SmaI.

Nach erfolgreicher Kontrollrestriktion erfolgte nach Gel-Elektrophorese beider cDNA-Sequenzen und Extraktion aus dem Gel eine Kontrollsequenzierung mit den Primern T7 als Vorwärts- und BGH als Rückwärtsprimer.

4.2.13 Sequenzierungen

Sämtliche verwendeten Primersequenzen wurden mit Hilfe des Online-Programms Primer3 (Steve Rozen/sourceforge.net) erstellt. Die Synthese der Primer erfolgte durch Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland. Für jede zu sequenzierende Probe wurden DNA-Konzentrationen von ungefähr 750 ng total benötigt.

Primername	**Sequenz (5‘ -> 3‘)**
T7 *Forward*	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH *Reward*	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Tabelle 11: Während der Klonierungsschritte verwendeten Sequenzierungsprimer. Angegeben sind Name und Sequenz in 5‘3‘-Richtung.

Nach Bestätigung der richtigen Sequenzen wurden Mini- oder Maxipräparationen der Plasmide angefertigt. Dafür wurden die Plasmide wie in Abschnitt 4.2.7 beschrieben in TOP 10 E.coli transformiert um im Anschluss Maxi- oder Minipräparationen durchzuführen.

4.2.14 Mutagenese-PCR

Nun konnten mit dem *QuickChange II XL site-directed Mutagenesis Kit* von Stratagene die einzelnen Mutationen eingebaut werden. Für dieses wurden bestimmte Primer benötigt, die die gewünschte Mutation enthielten. Diese wurden ebenfalls mithilfe der Internetsoftware Primer3, sowie nach den Richtlinien des Protokolls erstellt. Um Mutationen in DNA-Stränge einzubauen, wurden zwei Kits von Stratagene benutzt: das *Quick Change site-directed mutagenesis Kit* für die Mutagenese von c.512C>T, p.Thr.171Met in den Vektor pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*, und das *Quick Change site-directed mutagenesis Kit XL* derselben Firma für die beiden anderen Mutationen c.530G>A, p.Arg177Gln und c.559G>T, p.Val187Leu in denselben Vektor pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*, sowie jeweils aller drei Mutationen in das pEF5-TOPO-*FHL2*-Konstrukt für die Herstellung der rekombinanten Proteine.

Oligoname	**Sequenz (5‘ -> 3‘)**	**Tm**
FHL2 c.512C>T, vorwärts	GCCCATCACCATGGGAGGGGTCACTTAC	77 °C
FHL2 c.512C<T, rückwärts	GTAAGTGACCCCTCCCATGGTGATGGGC	77 °C
FHL2 c.530G>A,	GGAGGGGTCACTTACCAGGAGCAGCCCTGGC	71 °C

vorwärts		
FHL2 c.530G>A, rückwärts	GCCAGGGCTGCTCCTGGTAAGTGACCCCCTCC	72,1 °C
FHL2 c.559G>T, vorwärts	GGCACAAGGAGTGCTTCTTGTGCACCGCCTGCAG	70,4 °C
FHL2 c.559G>T, rückwärts	CTGCAGGCGGTGCACAAGAAGCACTCCTTGTGCC	70,4 °C

Tabelle 12: Liste der in den Mutagenese-PCRs benutzten Primer. Angegeben sind Name, Sequenz, sowie die Schmelztemperatur (Tm).

Reagenzien	**Menge**
10x Reaktions-Puffer	5 µl
pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT	5,3 ng; 10,6 ng; 26,5 ng
dNTP Mix	1 µl
Primer Mut c.512c>T, *forward*	125 ng
Primer Mut c.512c>T, *reverse*	125 ng
PfuTurbo Polymerase (2,5 U/ µl)	1 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	50 µl Endvolumen
Endvolumen	50 µl

Tabelle 13: Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR für c.512C>T in pEF5-TOPO Flag2-*FHL2*.

Temperatur	**Zeit**	**Zyklen**
95 °C	30 s	
95 °C	30 s	12 Zyklen
60 °C	1 min	
68 °C	8 min	
37 °C	10 min	

Tabelle 14: Konditionen der Mutagenese-PCR für c.512C>T (p.Thr.171Met) in pEF5-TOPO Flag2-*FHL2*.

Reagenzien	**Menge**
10x Reaktions-Puffer	5 µl
pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT	5,3 ng; 10,6 ng; 26,5 ng
dNTP Mix	1 µl
Primer Mut c.530G>A bzw.c.559G>T, *forward*	125 ng

Primer Mut c.530G>A bzw.c.559G>T, *reverse*	125 ng
Quick Solution	3 µl
PfuTurbo Polymerase (2,5 U/ µl)	1 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	50 µl Endvolumen
Endvolumen	50 µl

Tabelle 15: Reaktionsansätze der Mutagenese-PCR für die Mutationen c.530G>A und c.559G>T in pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*.

Temperatur	**Zeit**	**Zyklen**
95 °C	1 min	
95 °C	50 s	18 Zyklen
60 °C	50 s	
68 °C	6,5 min	
68 °C	7 min	
37 °C	10 min	

Tabelle 16: Konditionen der Reaktionsansätze der Mutagenese-PCR für die Mutationen c.530G>A und c.559G>T in pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*.

Reagenzien	**Menge**
10x Reaktions-Puffer	5 µl
pEF5-TOPO-*FHL2*-WT	10 ng; 34 ng
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
Primer *forward* (jeweils)	125 ng
Primer *reverse* (jeweils)	125 ng
Quick Solution	3 µl
PfuTurbo Polymerase (2,5 U/ µl)	1 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	50 µl Endvolumen
Endvolumen	50 µl

Tabelle 17: Reaktionsansätze der Mutagenese-PCR für jeweils c.512C>T, c.530G>A, und c.559G>T in pEF5-TOPO-*FHL2*.

Temperatur	**Zeit**	**Zyklen**
95 °C	1 min	
95 °C	50 s	

60 °C	50 s	18 Zyklen
68 °C	6,5 min	
68 °C	7 min	
37 °C	10 min	

Tabelle 18: Konditionen der Reaktionsansätze der Mutagenese-PCR für jeweils c.512C>T, c.530G>A und c.559G>T in pEF5-TOPO-*FHL2*.

Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 2 min auf Eis gestellt, um auf 37 °C abzukühlen. Für den Verdau der amplifizierten Produkte wurden jeweils 1 µl DpnI Restriktionsenzym (10 U/ µl) des Kits zu jeder Amplifikationsreaktion gegeben. Zum Mischen wurde vorsichtig auf- und abpipettiert, 1 min in der Mikrozentrifuge zentrifugiert und anschließend bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert, um die nicht-mutierte dsDNA zu verdauen. Um im Anschluss die mutierten DNA-Stränge in TOP 10 E.coli zu transformieren wurde mit 1 µl des PCR-Produkts eine Transformation durchgeführt, siehe hierfür Abschnitt 4.2.7.

Im Anschluss an die Mutagenese-PCRs wurden die Plasmide erneut in TOP 10 Zellen transformiert und anschließend Minipräparationen angefertigt, siehe 4.2.9. Kontrollverdaue zeigten die erwarteten Fragmente auf der richtigen Höhe.

Reagenzien	**Menge**
FastDigest BamHI	2,5 µl
FastDigest EcoRV	2,5 µl
10x Fast Digest Puffer	5 µl
pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT/Mut	2,5 µg
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	auf 50 µl
Endvolumen	50 µl
Bedingungen	30 min bei 37 °C

Tabelle 19: Restriktionsverdau von pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-c.512C>T, c.530G>A und c.559G>T.

Reagenzien	**Menge**
FastDigest BamHI	1 µl
FastDigest NotI	1 µl
10x Green Puffer	2 µl
pEF5-TOPO-*FHL2*-WT/Mut	200 ng

aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	auf 20 µl
Endvolumen	20 µl
Bedingungen	5 min bei 37 °

Tabelle 20: Kontrollverdau von pEF5-TOPO-*FHL2*-c.512C>T, -c.530G>A und -c.559G>T.

Anschließende Sequenzierungen mit den bekannten Sequenzierungs-Primern T7 und BGH bestätigten die richtigen Sequenzen. Nun konnte die Ligation in die anschließend benötigten Vektoren durchgeführt werden.

4.2.15 Vektor dsAAV-CMVenh-MLC260-EGFP

Für die Herstellung der AAV6 war es nötig, die gewünschten *FHL2*-Sequenzen in den dsAAV-CMVenh-MLC260-Vektor zu klonieren. Diese Kombination aus AAV und dem CMV-verstärkten Myosin-Leichtketten Promotor (CMV-MLC1.5kb) führt zu einer hohen Transduktions-Effizienz im Herzen. Der Vektor dsAAV-CMVenh-MLC260-EGFP wurde uns freundlicherweise von Dr. Oliver Müller aus Heidelberg zur Verfügung gestellt.

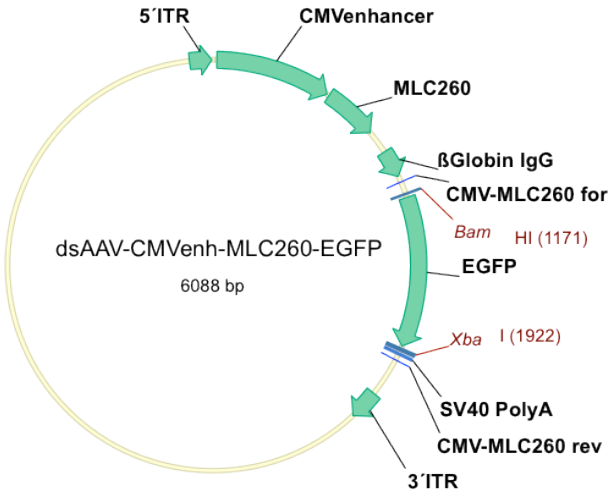


Abb. 8: Der Vektor dsAAV-CMVenh-MLC260-EGFP. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wird EGFP ausgeschnitten und der Vektor linearisiert. 5'ITR: inverse terminale Repetitionen am 5' Ende; CMVenhancer: Verstärker des CMV-Promoters; MLC260: Regulator der Transkription; CMV-MLC260 for: Sequenz für Vorwärts-Sequenzierungsprimer; EGFP: *enhanced green flourescent protein;* BamHI und XbaI: Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

Durch Verdau des Vektors mittels der Restriktionsendonukleasen BamHI und XbaI konnte das EGFP entfernt und der linearisierte Vektor aus dem Gel extrahiert werden. Auch die Inserts Flag2-h*FHL2*-WT, sowie Flag2-h*FHL2*-c.512C>T, -c.530G>A, und -c.559G>T konnten aus dem Vektor pEF5-TOPO-Flag2-h*FHL2* nach Restriktionsverdau geschnitten und aus

dem Gel extrahiert werden. Für die Ligation wurden das linearisierte dsAAV6-CMV-MLC260-Fragment sowie die jeweiligen Inserts mithilfe einer T4-Ligase zusammengefügt. Diese Ligationen geschahen mit zwei unterschiedlichen Verhältnissen (1:3 und 1:5) von Vektor zu Insert, um optimale Ligationsansätze zu erhalten.

Reagenzien	**Menge**
FastDigest BamHI	2,5 µl
FastDigest XbaI	2,5 µl
10x Fast Digest Puffer	5 µl
pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT/Mut	2,5 µg
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	auf 50 µl
Endvolumen	50 µl
Bedingungen	30 min bei 37 °C

Tabelle 21: Restriktionsverdau von pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT/Mut.

Reagenzien	**Menge**
FastDigest BamHI	2,5 µl
FastDigest XbaI	2,5 µl
10x Fast Digest Puffer	5 µl
pdsAAV-CMVenh-MLC260-EGFP	3 µg
Alkalische Phosphatase	3 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	auf 50 µl
Endvolumen	50 µl
Bedingungen	30 min bei 37 °C

Tabelle 22: Restriktionsverdau von pdsAAV-CMV-MLC260-EGFP.

4.2.16 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter einer Ligation versteht man das Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit zumeist überlappenden Enden. Diese wird zumeist mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase durchgeführt. Verwendet wurde hier die T4-DNA-Ligase, ein EC 6.5.1.1-Enzym des Bakteriophagen T4. Dieses ist in der Lage, in DNA-Einzelstrangbrüchen als auch zwischen Fragmenten mit kurzen, komplementären überlappenden Enden die Ausbildung kovalenter Phosphodiester-Brücken zu katalysieren. Die zu ligierenden Fragmente werden mit 3 bis 5-fach molarem Überschuss vom Insert mit 50 ng linearisiertem Vektor ligiert.

Das Vektor-Insert-Verhältnis errechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{Vektor\ (ng)\ \ x\ \ Größe\ des\ Insert\ (kb)}{Vektor\ (kb)}\ \ x\ \ \frac{Insert}{Vektor}\ =\ \ Insert\ (ng)$$

Reagenzien	**Menge**
Insert Flag2-*FHL2*-WT/Mut	26,7 ng ($^{3}/_{1}$ -Verhältnis) 44,5 ng ($^{5}/_{1}$ -Verhältnis)
AAV6-CMVenh-MLC260	50 ng
10x Ligase-Puffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	20 µl Endvolumen
Endvolumen	20 µl
Bedingungen	90 min, 22 °C

Tabelle 23: Ligationsansatz des linearisierten AAV6-CMVenh-MLC260 mit verdautem Flag2-*FHL2*-WT/Mut.

Nach erfolgreicher Kontrollrestriktion und Sequenzierung mit den Primern T7F und BGH wurden die für die AAV6-Produktion in Heidelberg benötigten Vektoren AAV6-CMVenh-MLC260-Flag2-h*FHL2*-WT, sowie die drei Mutanten auf Trockeneis zu Dr. Oliver Müller nach Heidelberg geschickt.

4.2.17 Vektor pGex-5x-1

Auch für die Produktion der rekombinanten Proteine des FHL2 in WT-Form wie auch der drei Mutanten wurde ein spezieller Vektor benötigt. Dieses ist der Vektor pGex-5x-1 mit einer integrierten GST-Sequenz und einer Faktor Xa *Cleavage site*, die für die Produktion der rekombinanten Proteine unerlässlich ist, um das zuvor produzierte GST-FHL2-Fusionsprotein später wieder zu trennen (pGEX-5X-1 *GST Expression Vector*, GE Healthcare). Wie auch bei den oben genannten Klonierungen für die Virenherstellung wurde zunächst das h*FHL2*-WT in den Arbeitsvektor pEF5-Topo-Vektor kloniert, die drei Mutationen h*FHL2*-c.512C>T, -c.530G>A und -c.559G>T mit Hilfe des Mutagenese Kits eingefügt und anschließend die Inserts durch Restriktionsverdau aus dem TOPO-Vektor geschnitten, durch Gel-Elektrophorese getrennt und aus dem Gel eluiert. Anschließend wurde eine Ligation des Vektors pGex-5x-1 mit den jeweiligen Inserts durchgeführt. Auch diese Ligationen gescha-

hen mit zwei unterschiedlichen Verhältnissen (1:3 und 1:5) von Vektor zu Insert, um optimale Ligationsansätze zu erhalten.

Reagenzien	Menge
Insert *FHL2*-WT/Mut	27,9 ng ($^{3}/_{1}$ -Verhältnis) 46,5 ng ($^{5}/_{1}$ -Verhältnis)
pGex-5x-1	50 ng
10x Ligase-Puffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	20 µl Endvolumen
Endvolumen	20 µl
Bedingungen	90 min, 22 °C

Tabelle 24: Ligationsansatz des linearisierten Vektors pGex-5x-1 mit verdautem Insert *FHL2*-WT/Mut.

Nach Kontrollverdau, sowie anschließender erfolgreicher Sequenzierung mit den Primern T7 und BGH konnte die Produktion der rekombinanten Proteine begonnen werden.

4.3 Zur Arbeit mit rekombinanten Proteinen

4.3.1 Herstellung rekombinanter Proteine

Die Herstellung der rekombinanten WT- und mutierten FHL2-Proteine wurde nach dem Protokoll „GST-Fusion-Protein-Aufreinigung mit Hilfe der Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare) und Faktor Xa“ vollzogen (GE Healthcare).

Zur Expression wurden aus der Minipräparation der gewünschten Plasmide, die in BL 21-E.coli-Zellen hochgezogen wurden, eine Flüssigungskultur in 30 ml LB-Medium und 60 µl Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml) hergestellt und in einem autoklavierten Kolben über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am dritten Tag wurde morgens Medium mit 500 ml LB-Medium und 1 ml Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml) vorbereitet, von dem nach Schütteln des fertigen Mediums 1 ml entnommen und in eine Küvette zur Optischen Dichte-Messung (OD) entnommen wurde. Diese Küvette blieb für die Messungen des Tages die „*blank*“-Referenz. Anschließend wurden 10 ml der Übernacht-Kultur überimpft und in die 500 ml vorbereitetes Medium gegeben. Wieder wurden 1 ml entnommen, in eine Küvette gegeben und die „Start“-OD gemessen, bei λ = 600 nm gegen LB-Medium. Die Kultur wurde bei 37 °C schüttelinku-

biert, ca. alle 30 min die OD kontrolliert und bis zu OD-Werten von 0,5 bis 0,6 angezogen. Hierbei war zu beachten, dass die Verdopplungszeit von E.coli im Allgemeinen ca. 20 min beträgt. Anschließend wurden bei gewünschter OD 1 ml Proben entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß „T0“ gegeben. Dieses wurde bei 10000 rpm, 10 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Die Induktion der Lösung geschah bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C nach Zugabe von 5 ml IPTG (Stammlösung: 100 mM entspricht 238,3 mg/10 ml in 500 ml Kultur). Stündlich wurde die OD gemessen und gleichzeitig als Verlaufskontrolle jeweils eine 1 ml Probe abgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (T1-T4) gegeben, für 10 min bei 10000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, die Überstände abgegossen und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Nach 4 h wurden die Bakterienkulturen für 15 min, 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 25 ml vorgekühltes 1x PBS aufgenommen und direkt in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Zum Equibrilieren des Säulenmaterials wurde die Glutathion Sepharose 4B vor der Benutzung gut geschüttelt und 1,33 ml in ein 50 ml Zentrifugengefäß gegeben. Dieses wurde bei 500 rcf für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 10 ml vorgekühltes 1x PBS hinzugegeben. Das Säulenmaterial wurde gewaschen und der Vorgang zweimal wiederholt. Anschließend wurde erneut 1 ml 1x PBS zugegeben, um das Säulenmaterial nicht trocken laufen zu lassen. Anschließend wurden die Proben für jeweils viermal 5 min mit einem Schallkopf und 40% Power in vorgekühlten Gefäßen sonifiziert. Es wurde darauf geachtet, dass die Bakterienkultur nicht zu sehr schäumte, um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden. Die Lösung, die eine gewünschte deutlich bräunliche Trübung aufzeigte, wurde im Anschluss bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet war hell bis weißlich. 1 ml des Überstands wurden entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß („Son“) überführt und bei -20 °C gelagert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Zentrifugengefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Im Batch-Verfahren wurde die sonifizierten Proben auf das Säulenmaterial geben und gut durchgemischt. Anschließend folgte eine Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler. Nach einer Zentrifugation mit 500 rcf bei 4 °C für 10 min wurde erneut 1 ml des Überstands abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß („SN“) gegeben und bei -20 °C gelagert. Der Rest des Überstands wurde in ein neues 50 ml Zentrifugengefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Mit diesem hätte ein erneutes Inkubieren gestartet werden können, wenn das gewünschte Protein nicht gebunden hätte. Das Säulenmaterial wurde mit 1 ml vorgekühltem 1x PBS gewaschen und bei 500 rcf für 10 min bei 4 °C

zentrifugiert. 1ml des Überstands wurden abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß („W1“) gegeben und bei -20 °C gelagert. Der Rest des Überstands wurde in ein neues 15 ml Zentrifugengefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt („W2/W3“). Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Elutionspuffer inkl. 12,5 U Faktor Xa zum Mischen und Resuspendieren des Säulenmaterials sowie eine Übernacht-Inkubation bei 4°C auf dem Rollschüttler.

Am Folgetag wurden die Proben wieder bei 500 rcf und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß („E1“) überführt und bei -80 °C gelagert. 50 µl der Proben wurden für Proteinbestimmung und Western Blot abgenommen. Der Elutionsschritt mit 1 ml Elutionspuffer und Faktor Xa wurde wiederholt und die Proben („E2“) für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler inkubiert. Die Glutathion Sepharose 4B Säule wurde in 1x PBS zur Kontrolle bei 4°C aufbewahrt. Nach Messung der Proteinkonzentration der beiden Eluate mittels Bradford wurden die Vorbereitungen für die Auswertung mittels Coomassie und Western Blot getroffen.

4.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde eine Fertiglösung der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet. Die Messung ist schnell und einfach durchzuführen, hängt aber stark von den Faltungseigenschaften des jeweiligen Proteins ab. Diese Methode (Bradford, 1976) basiert auf der Farbveränderung einer sauren Coomassie Brilliantblau G250-Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der Farbveränderung liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm zugrunde, die bei Proteinbindung erfolgt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption nach dem Lambert-Beer'schen Absorptionsgesetz wurde mit Immunglobulin G (IgG) aus Rinderserum eine Standardreihe erstellt. IgG wurde in einer Konzentration von 1,38 mg/ml in Aqua ad iniectabilia gelöst und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Diese Stamm-Lösung wurde zur Erstellung der Standardreihe in 0,1 M NaOH verdünnt. Die Standardreihe wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Konzentration in µg/ml	**IgG-Standard (1,38 mg/ml) in µl**	**NaOH (0,1 M) in µl**
0	0	800
3,45	2,5	797,5
6,90	5	795

10,35	7,5	792,5
13,80	10	790
20,70	15	785
27,60	20	780
41,60	30	770

Tabelle 25: Pipettierschema für Proteinstandardkurven. Proteinkonzentrations-Messungen nach Bradford.

Es wurden jeweils 5 µl der Proteinprobe zu 795 ml 0,1 M NaOH in Einmalküvetten pipettiert, anschließend mit 200 µl Bradford-Lösung aufgefüllt und gut gemischt. Nach Inkubation für 10 min wurde die Absorption in einem Fotometer (*Smart Spec® 3000*) bei 595 nm gemessen. Aus der Absorption lässt sich nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Proteinkonzentration errechnen. Die Proben wurden in 0,1 M NaOH so verdünnt, dass die gemessenen Absorptionen im mittleren Bereich der Standardkurve lagen und mindestens in Doppelbestimmung gemessen. Im Anschluss wurden die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und das Western-Blotting zur Detektion der FHL2-Proteine als auch die Coomassie-Färbung durchgeführt.

4.3.3 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)-PAGE wurde im Anschluss zur Analyse und Trennung der Proteine durchgeführt. Wir wendeten dieses nach der von Ullrich Laemmli entwickelten Methode an, welches sich insbesondere zur Trennung von Molekülen mit Massen zwischen 5 und 250 kDa eignet. Die PAGE erfolgte mit Trenngelen verschiedener Zusammensetzung und Sammelgelen in Abhängigkeit des zu separierenden Protein-Molekulargewichtes. Für die PAGE wurden 15% Trenngele und Sammelgele nach folgendem Protokoll gegossen.

	12% Trenngel	**15% Trenngel**
Wasser (ml)	4,3	3,55
40% Acrylamid (ml)	4	3,75
1,5 M Tris, pH 8,8 (ml)	2,5	2,5
10% SDS (ml)	0,1	0,1
10% APS (ml)	0,1	0,1
TEMED (ml)	0,004	0,004

	Sammelgel
Wasser (ml)	6,015

40% Acrylamid (ml)	0,64
0,5 M Tris, pH 6,8 (ml)	1,25
10% SDS (ml)	0,05
10% APS (ml)	0,05
TEMED (ml)	0,005

Tabelle 26: Zusammensetzung der für die PAGE benötigten Trenn- und Sammelgele. Angegeben sind Konzentration der Gele, sowie die Zutaten. Angaben in ml.

Zunächst wurde das Trenngel in zuvor vorbereitete Kammern, bestehend aus zwei Glasplatten, gegossen und anschließend das Sammelgel oben hinzugefügt. Bei der Zugabe beider Flüssigkeiten musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen zwischen den Gelen entstanden, anschließend wurde ein Kamm mit der benötigten Anzahl von Taschen in das gegossene Sammelgel eingelegt und die Gele für etwa 30 min zum Aushärten gebracht. Zwischenzeitlich konnten die Protein-Proben in Laemmli-Puffer aufgenommen werden. Die Zusammensetzung erfolgte jeweils mit 2,5 µl 6x Laemmli-Puffer und 3-5 µg Protein, im Anschluss wurde dieses Probengemisch mit destilliertem Wasser zum Erhalt eines Endvolumens von 15 µl aufgefüllt. Nach dieser Vorbereitung wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und nach Entfernung des Kammes aus dem Sammelgel anschließend in die Taschen gegeben. Nun konnte die Gel-Elektrophorese für anfangs 10 min bei 80 V und dann bei 150 V in der Elektrophorese laufen gelassen werden. Die Elektrophorese fand in dem Mini Protean 3 Elektrophorese-System (Bio-Rad) in einem 1x Elektrophorese-Puffer statt. Auf jedem Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (Precision Plus Protein Standard™, Bio-Rad).

4.3.4 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung dient dazu, Proteine in einem Polyacrylamid-Gel mit Coomassie-Blau sichtbar zu machen. Dazu wurden die Gele für 30 min in der Färbelösung (0,2% m/v Coomassie-Brilliantblau G250, 25% Isopropanol, 10% Essigsäure) gelegt und auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gefärbt. Im Anschluss konnte zur Ladekontrolle dieses gefärbte Gel fotografiert werden. Die Entfärbelösung (10% Essigsäure, 30% Methanol) wurde nach Abgießen des Coomassie-Brilliantblau vorsichtig auf die Gele gegeben und diese durch dreimaligen Wechsel nach jeweils etwa 15 min in der Entfärbelösung entfärbt. Die entfärbten Gele wurden in destilliertem Wasser gewaschen und für einige Stunden in einem Vakuum-Geltrockner zwischen Cellophanpapier getrocknet oder anstatt dessen zur direkten Weiterverarbeitung im Western Blot nach nachfolgendem Protokoll behandelt.

4.3.5 Western Blot

Das Western-Blot-Verfahren ist ein Verfahren zur spezifischen Detektion von Proteinen mittels Antikörpern, die gegen geeignete Epitope der nachzuweisenden Proteine gerichtet sind. Zunächst wird die Proteinlösung mit dem Zielprotein in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Proteine nach ihrer Größe getrennt werden. Ein optisch sichtbar markierter, parallel laufender Größenstandard ermöglicht dabei, die Größe des vom Antikörper detektierten Proteins zu bestimmen. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden in einem zweiten Schritt in einem orthogonal zu ihrer ursprünglichen Laufrichtung ausgerichteten Feld aus dem Gel heraus auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert („geblottet"). Hier können sie mit Antikörpern sichtbar gemacht werden, wobei vorher die Membran mit Protein gesättigt werden muss, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu minimieren. Dies geschieht mit Lösungen von fettarmem Milchpulver oder bovinem Serumalbumin (BSA). Nach Inkubation mit einem für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper inkubiert man die Membran erneut, mit einem meist gegen das Fc-Fragment des Primär-Antikörpers gerichteten Sekundär-Antikörper. Dieser ist kovalent an ein Meerrettich-Peroxidase-Molekül gekoppelt. Nach Zugabe eines unter Chemolumineszenz umgesetzten Substrates der Meerrettich-Peroxidase kann die Reaktion und damit mittelbar das Protein durch Schwärzung eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilmes oder durch Messung der kumulativen Lichtemission in einer Dunkelkammer mit einer geeigneten Kamera sichtbar gemacht werden.

Nach der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Coomassie-Färbung, siehe 4.3.3 und 4.3.4, wurde der Protein-Transfer nach der Gelelektrophorese in einer mit Blotpuffer gefüllten Kammer bei 300 mA für 90 min durchgeführt. Im Anschluss wurde der Blot auf einem Orbitalschwenker dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen und für 1 h in 5% Milchpulver geblockt. Nach erneut dreimaligem Waschen wurde der Blot mit dem Primärantikörper anti-FLAG 1:1000 in 1% Milchpulver in 5 ml 1x TBS-T auf einem Rollmischer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Wiederum wurde der Blot dreimalig in 1x TBST gewaschen und mit dem Sekundär-Antikörper anti-Maus 1:6000 für 2 h auf dem Rollmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde der Blot mit ECL-Lösung (Amersham Biosciences) entwickelt. Es wurde so viel Volumen der Lösung auf die Membran gegeben, dass diese den Blot gerade vollständig bedeckte, die benetzte Membran zwischen zwei Kopierfolien gegeben und die Autolumineszenz anschließend in einer Gelfotokammer gemessen.

4.4 Zur Arbeit mit neonatalen Maus-Kardiomyozyten

4.4.1 Tierhaltung und Genehmigung

Es wurden männliche und weibliche Mäuse aus Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendet. Die kardialen Myozyten C57/*BlackSwiss* wurden aus neonatalen (neonatalen Maus-Kardiomyozyten, NMCM) wie von (Pohlmann, Kroger et al. 2007, Vignier, Schlossarek et al. 2009, Friedrich, Wilding et al. 2012) beschrieben, isoliert. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt.

4.4.2 Organentnahme

Für die Isolation von NMCMs wurden die Tiere dekapitiert und thorakotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in gekühltem Calcium- und Bicarbonatfreiem HBSS in 6-*Well*-Platten gelagert und auf Eis gestellt.

4.4.3 Trypsinverdau der Herzen

Nach der Herzentnahme erfolgte die Zellpräparation mit anschließender Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) wurde vor jeder Präparation autoklaviert. Nach Säuberung der Herzen und Abtrennung des Gefäßstiels sowie der Vorhöfe wurden die Herzen in eine neue Kulturschale mit 10 ml kaltem HBSS transferiert und mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere in 4 Teile geschnitten. Mit einer weitlumigen Pipette erfolgte die Überführung der Gewebestücke in ein 200 ml-Zentrifugengefäß, aus dem nach Absetzen der Gewebestücke das HBSS-Medium entfernt und anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit 35 ml Trypsin/HBSS-Arbeitslösung durchgeführt wurde. Diese Lösung wurde vorher aus 19,2 mg Trypsin und 40 ml kaltem HBSS hergestellt und durch einen sterilen 0,2 µm Millipore-Filter filtriert. Die Anzahl der Herzen pro Verdau schwankte zwischen 25 und 30. Anschließend wurde die Lösung im Zentrifugengefäß bei 4 °C über Nacht auf dem Drehschüttler zum Verdau gelagert.

Am zweiten Tag der Isolation von neonatalen Mäusen wurden vor der Weiterarbeit 36 µl Kollagenase in 40 ml HBSS gegeben und bei Raumtemperatur vorbereitet und gelagert. Des weiteren wurden in fünf 15 ml-Zentrifugengefäße jeweils 5 ml sogenanntes *Dark medium* gegeben und auf Eis gestellt. Das restliche *Dark Medium* wurde bei 37 °C gelagert. Aus der

über Nacht verdauten Lösung wurden zunächst 20 ml Trypsin/HBSS-Lösung entnommen und mit einer weitlumigen Pipette in ein 50 ml Zentrifugengefäße gegeben. Zu diesem wurden 20 ml warmes *Light Medium* gegeben und die Suspension bei 37 °C für 3 min geschüttelt. Im Anschluss ließ man das Gewebe sich setzten und der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. 10 ml der vorher vorbereiteten Kollagenase/HBSS-Lösung wurden erneut zu den Zellen gegeben und die Suspension bei 37 °C für 2 min geschüttelt. Auch hier wurde im Anschluss der Überstand abgenommen und verworfen. Für den ersten Verdauungsschritt wurden wieder 5 ml Kollagenase/HBSS-Lösung zum Gewebe hinzugegeben und für 9 min bei 37 °C schütteln gelassen. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, wurde wieder der Überstand abpipettiert und in eines der vorbereiteten 15 ml-Zentrifugengefäße gegeben und auf Eis gestellt. Derselbe Schritt wurde viermal wiederholt, so das nach dem letzten Verdau das restliche Gewebe auf einen Zell-Filter gegeben werden konnte, der vor und auch nach der Filtration mit 2 ml *Dark Medium* gewaschen wurde. Die Überstände der Verdaue wurden in zwei 50 ml-Zentrifugengefäße gepoolt und für 8 min bei 600 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Überstände in zwei neue Zentrifugengefäße gegeben und diese erneut für 5 min bei gleichen Konditionen zentrifugiert. Zu den Pellets wurden jeweils 2 ml *Dark Medium* gegeben und diese durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden vereinigt und die Zentrifugengefäße noch einmal mit *Dark Medium* gewaschen. Das Endvolumen der Lösung betrug in etwa 25 ml. Im zweiten Schritt wurden die Zellen in eine T75-Zellkulturflasche ausplattiert und die Flasche bei 37 °C für 75 min bei 10% CO_2 inkubiert. Dieses Vorplattieren geschah, damit sich die anheftenden Zellen, wie z.B. Fibroblasten, von den langsam anheftenden Kardiomyozyten trennen und die Kardiomyozyten so angereichert werden konnten. Die ungebundenen Zellen der Flasche wurden im Anschluss entfernt und in ein 50 ml-Zentrifugengefäß überführt. Die Flasche wurde vorsichtig mit 5 ml warmen *Dark Medium* gewaschen und erneut bei 37 °C für 75 min bei 10% CO_2 inkubiert. Im letzten Schritt wurden alle ungebundenen Zellen wieder in ein 50 ml-Zentrifugengefäß überführt und die Flasche mit 7,5 ml warmen *Dark Medium* gewaschen, was anschließend zum Zentrifugengefäß hinzugefügt wurde. Erneut wurde dieses bei Raumtemperatur bei 600 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser erneut bei denselben Bedingungen zentrifugiert. Die beiden entstandenen Pellets wurden in 10 ml warmen *Dark Medium* resuspendiert. Im Anschluss konnten die Zellen gezählt werden.

4.4.4 Das Zählen und Ausplattieren von NMCM

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurde ein Zählen der Zellen mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dieses geschah nach vorheriger Verdünnung von 50 µl Zellsuspension mit 150 µl Tryptanblau und 800 µl *Dark Medium.* Da nur tote Zellen durch Tryptanblau angefärbt wurden, ermöglichte diese Färbung die Bestimmung der Lebendzelldichte sowie der Vitalität der Zellen. Um die gesamte Zellzahl der Lösung zu ermitteln wurde folgende Formel angewendet:

$$Mittel\ der\ gezählten\ Zellen\ pro\ Quadrat\ einer\ Neubauer-Zählkammer \times 10000 \times 20\ (Verdünnungsfaktor)\ \times 10\ ml\ Volumen\ = Zellen\ total$$

Während des Zählens und des Vorplattierens wurden die benötigten Kultur-Platte mit 0,3 ml Laminin-PBS-Lösung (10 µg/ml Laminin in PBS) beschichtet und bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten 10% CO_2-Atmosphäre im Brutschrank für 15 min aufbewahrt. Die überschüssige Laminin-Lösung wurde anschließend abgesaugt und die 12-*Well*-Platte noch einmal für 15 min unter der Hood getrocknet. Anschließend wurden die NMCM mit einer Dichte von 330000 Zellen/*Well* ausgesät. Das Gesamtvolumen pro 12-W*ell*-Platte betrug 1 ml.

4.4.5 Kultivierung und Transduktion der NMCM

Am Tag 3 nach Isolierung wurde das Medium gewechselt, indem 0,5 ml des Mediums mit einer weitlumigen Pipettenspitze vorsichtig am Rand abgenommen und durch 0,5 ml vorgewärmtes, frisches *Dark Medium* ersetzt wurde.

An Tag 4 oder 5 wurde neben dem Mediumwechsel gleichzeitig eine Infektion der NMCM mit den AAV6-CMVenh-MLC260-Flag2-*FHL2*-WT und -c.512C>T, -c.530G>A, -c.559G>T sowie dem AAV6-CMVenh-MLC260-EGFP als Positivkontrolle durchgeführt. Eine Titrationskurve mit MOI von 300, 1000, 3000, 10000, 30000, 50000 und 100000 Viruspartikeln pro Zelle wurde mit jedem der drei Viren durchgeführt. Die Titrationskurve dient der Darstellung und Ermittlung der für unsere Versuche effektivsten MOI, indem die Ergebnisse der unterschiedlichen MOI-Benutzungen graphisch miteinander verglichen werden können. Zunächst wurde dafür das komplette *Dark Medium* aus den Zellen entfernt und durch frisches *Dark Medium* ersetzt. Anschließend wurde je nach MOI die bestimmte Menge an Virus direkt ins Medium gegeben. Nach eintägiger Inkubation bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten 10% CO_2-Atmosphäre im Brutschrank wurde eine visuelle Kontrolle der Infektion mittels Fluoreszenz-

mikroskop anhand der GFP-Expression der AAV6-CMVenh-MLC260-EGFP-transduzierten NMCM durchgeführt und das Schlagverhalten, die Morphologie sowie die Konfluenz der NMCM dokumentiert und das Prozedere vor der Ernte wiederholt. Nach 48 Stunden Inkubation konnten die infizierten NMCM geerntet werden. Zunächst wurde das Medium mit dem Virus abpipettiert und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden je *Well* eine Lösung aus 2 ml Kranias-Puffer mit 2 µl DTT hinzugegeben, die Zellen mit dem Zellschaber abgeschabt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dieses konnte bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C gelagert werden.

4.4.6 Quantifizierung

Die Quantifizierung des Proteinsignals wurde mit der GeneTools-Software von Syngene durchgeführt. Das Proteinsignal der Flag-FHL2-Mutationen wurde mithilfe einer Proteinfärbung durch Ponceau oder ein entsprechendes Ladungsprotein normiert und zum FHL2-WT-Proteinlevel relativiert.

4.4.7 Immunfluoreszenz

Proteine in Zellen können mithilfe der Immunfluoreszenz nach vorheriger Behandlung zur Fluoreszenz angeregt und anschließend auf mikroskopischer Ebene betrachtet werden. So können Aussagen über das Vorkommen, die Lokalisation und deren Funktion gemacht werden. Prinzipiell beruht das Prinzip der Immunfluoreszenz auf der Epitoperkennung durch einen Primärantikörper und der speziesspezifischen Bindung eines Sekundärantikörpers, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Alle Versuche wurden in 12-*Well*-Gewebekulturplatten durchgeführt, das Gesamtvolumen betrug 1 ml pro *Well*.

Für die Immunfluoreszenz wurden NMCM verwendet, mit den jeweiligen Viren infiziert und wie oben beschrieben kultiviert. Die NMCM wurden 72 Stunden nach Infektion zunächst dreimalig für 5 min mit 1x PBS vorsichtig gewaschen und im Anschluss mit 1 ml eiskaltem Methanol-Ethanol-Lösung (20%/80%) pro *Well* und 10-minütiger Inkubation bei -20 °C fixiert. Diese Lösung führt zur Präzipitation der Proteine, wodurch die Zellen konserviert werden. Auf die Fixation folgte erneutes dreimaliges Waschen für 5 min mit 1x PBS mit 1 ml pro *Well* und Inkubation des 1x PBS über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde das PBS vorsichtig abgesaugt und 1 ml Lösung A pro *Well* aufgetragen und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben mithilfe einer Pinzette auf ein Stück Parafilm transferiert. Dort erfolgte ein erneutes Waschen der Deckgläschen für 2x 5 min mit jeweils 100 µl Lösung B. Nach Absaugen der Lösung B konnten

auf jedes Deckgläschen 100 µl Primärantikörper gegeben werden, das in Lösung B verdünnt worden war. In diesem Falle waren die hier verwendeten Primärantikörper für natives Fhl2 in NMCM und AMCM jeweils: Anti-Fhl2 1:50 und Anti-cMyBP-C 1:500 (speziell angefertigter Antikörper einer kollaborierenden Arbeitsgruppe) und für transduzierte NMCM Anti-Flag 1:800 und Anti-cMyBP-C 1:10000 (ein weiterer speziell angefertigter Antikörper einer kollaborierenden Arbeitsgruppe) oder Anti-Titin Z-Band 1:200. Für die Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen. Die Primärantikörper-Lösung wurde zur Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur auf den Deckgläschen belassen, bevor diese dann zweimal für 5 min mit 100 µl Lösung B gewaschen wurden, um den ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Daraufhin folgte die lichtgeschützte Inkubation mit den sekundären Antikörpern. Für die native FHL2-Darstellung erfolgte die Bindung der Primärantikörper Anti-Fhl2 durch Alexa Fluor® 488-markiertes Anti-Maus IgG der Ziege (1:600) und Anti-cMyBP-C durch Alexa Fluor® 546-markiertes Anti-Kaninchen IgG der Ziege (1:600). Für die Immunfluoreszenz der FHL2-Mutationen nach Transduktion erfolgte die Anti-Flag-Bindung durch einen mit Alexa Fluor® 488-markierten Anti-Maus IgG der Ziege (1:600) und gegen Anti-Titin durch Alexa Fluor® 546-markiertes Anti-Kaninchen IgG der Ziege (1:600). Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 45 min lichtgeschützt durchgeführt, anschließend wurden die Deckgläschen dreimalig für 5 min mit TBS lichtgeschützt gewaschen. Zusätzlich wurde daraufhin zur Darstellung der Zellkerne TO-PRO®-3 Iodid, das in die DNA des Zellkerns interkaliert und somit der Zellkernfärbung dient, 100 µl in einer Verdünnung von 1:1000 in 1x PBS lichtgeschützt auf die Deckgläschen gegeben, im Dunkeln für 10 min inkubiert und im Anschluss wurden die Deckgläschen lichtgeschützt dreimalig für 5 min mit jeweils 100 µl 1x PBS gewaschen. Beim Eindeckeln der Zellen mit Mowiol 4-88 wurden diese zwischen Objektträger und Deckgläschen (24x60 mm) gebracht, um eine gute Fokussierung zu ermöglichen. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Nach dem Aushärten der Präparate wurden die Fluoreszenzbilder mittels eines konfokalen Carl Zeiss Lasermikroskops sowie des entsprechenden Analyseprogramms (Zeiss LSM 510 META), erstellt. Die Mikroskopie der Fluoreszenzbilder wurde von Herrn Dr. Felix Friedrich vom Institut für Experimentelle Pharmakologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

4.5 Herstellung und Transduktion von künstlichem Herzgewebe

Die Experimente an künstlichem 3D-Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) wurden, wie von Hansen et al. (2010) und Friedrich et al. (2012) beschrieben, von Herrn Dr. Felix Friedrich durchgeführt (Hansen et al. 2010). Zur Herstellung des künstlichen Herzgewebes

wurde auf Eis ein Gemisch (n = 12 für jede *FHL2*-Variante), bestehend aus 5,0 x 10^5 Kardiomyozyten von neonatalen Ratten pro EHT, bovinem Fibrinogen, Aprotinin und DMEM, hergestellt. Im Anschluss wurde in jedes *Well* einer 24-*Well*-Gewebekulturplatte ein Teflon-Platzhalter platziert und 1,6 ml 2%ige Agarose in PBS hinzugegeben. Nachdem die Agarose gehärtet war, wurde der Platzhalter entfernt, so dass eine 12 x 3 x 4 mm Gussformen entstand. Nun konnten Träger aus Silikon in den *Wells* platziert werden, die in jede dieser Gussformen reichten. Für jedes EHT wurden 100 µl des oben genannten Mix mit 3 µl Thrombin gemischt. Zur Transduktion der EHTs wurde außerdem das Virusvolumen des jeweilig benötigten AAV6 direkt in das Gemisch hinzugefügt. Es wurde hier eine MOI von 1000 verwendet. Entsprechend dem hinzugefügten Virusvolumen wurde zusätzlich 2x DMEM hinzugegeben, um die isotonen Konditionen von Fibrinogen und Thrombin zu erhalten, bevor die Lösung in die vorbereiteten *Wells* pipettiert wurde. Bei 37 °C und 7% CO_2-Atmosphäre wurden die Konstrukte nun für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Zellkulturmedium zu jedem *Well* hinzugefügt, um das Ablösen der Konstrukte aus den Agarose-Formen und die Überführung in neue 24-*Well*-Gewebekulturplatten mit jeweils 1,5 ml frischem EHT-Medium zu erleichtern. Dieses Medium, bestehend aus DMEM, 10% Pferdeserum, 2% Hühner-Embryo-Extrakt, 1% P/S, Insulin (10 µl/ml), Tranexam-Säure (400 µmol/l) und Aprotinin (33 µl/ml) wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die EHTs wurden bei 37 °C und 7% CO_2-Atmosphäre im Zellinkubator kultiviert. Um einen Hypertrophie-Effekt durch das im Medium enthaltene Pferdeserum zu verhindern, wurde zwischen Tag 10 und 13 der Serumgehalt zunächst auf 4%, von Tag 13 auf 14 auf 0% bei gleichzeitiger Substitution von Triiodothyronine (T_3) und Hydrocortison gesenkt (Hirt, Sorensen et al. 2012).

An den Tagen 10, 13 und 14 wurden Kontraktilitäts-Messungen der EHTs durchgeführt. Für die videooptische Analyse wurde eine Zellinkubator-Einheit benutzt, die neben verstellbaren CO_2-, Feuchtigkeits- und Temperatur-Werten mit einem für die videooptische Analyse benötigten gläsernen Dach ausgestattet war (Hansen et al. 2010, Friedrich et al. 2012). Diese Software erkennt die aufgezeichneten Kontraktionen und identifiziert die Spitzenwerte für verschiedene Eigenschaften. Als Kriterien für die Auswertung dienten die durchschnittliche Kraft der EHTs, die Kontraktions- und die Relaxationsgeschwindigkeit, die entsprechend der erkannten Kontraktionen errechnet werden konnten.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten als Angaben des Mittelwertes ± Standardfehler. Die Analysen wurden mithilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben, der zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) sowie mithilfe der Bonferroni's oder Dunnett's-Post-Test-Methode durchgeführt. Dies ist den Legenden der Graphen zu entnehmen, die mit der GraphPad Software (Version 5.02, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) erstellt wurden. Ein Wert von $P < 0.05$ wurde als signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Screening

Um die Hypothese zu untersuchen, ob *FHL2* ein weiteres HCM-Krankheitsgen sein könnte, wurden zunächst die Exonbereiche des *FHL2*-Gens von 121 HCM-Patienten, bei denen keine Mutationen in den bekannten Genen HCM *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* oder *MYL2* gefunden worden waren, auf *FHL2*-Mutationen untersucht. Diese Patienten wurden aus 299 HCM-Indexpatienten ausgewählt, die aus der *European Heart Failure Cohort* rekrutiert wurden, welche von der Leduq Foundation unterstützt wird. Diese Screening-Untersuchungen wurden freundlicherweise bereits von Silke Reischmann und Dr. Felix Friedrich aus dem Institut für Experimentelle Pharmakologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Das Ergebnis dieses Screenings ergab 6 Mutationen: 3 „*missense*"-Mutationen (Varianten I-III, c.512C>T in Familie 19170, c.530G>A in Familie 20198 und c.559G>T in Familie 19949) in nicht-verwandten Familien sowie 3 „*silent*"-Mutationen (Varianten IV-VI), von denen 2 Polymorphismen waren, die bereits von Arimura et al. bei der Suche nach Mutationen für dilatative Kardiomyopathien im *FHL2*-Gen entdeckt wurden (Tabelle 27). Die Indexpatienten zeigten eine deutliche Hypertrophie des Septums oder der Hinterwand. Als Kontrolle und Differenzierung zu Polymorphismen wurden Screenings in genomischer DNA von 262 gesunden Probanden durchgeführt.

Variante	Exon	Genveränderung	Aminosäuren	in Kontrollen gefunden
I	7	c.512C>T	p.Thr171Met	keine
II	7	c.530G>A	p.Arg177Gln	in 2 Kontrollen
III	7	c.559G>T	p. Val187Leu	in 1 Kontrolle
IV	7	c.687C>T	p. Asn226Asn	in 1 Kontrolle
V	8	c.804C>T	p.Asp268Asp	auch gefunden von Arimura et. al
VI	8	c.819C>T	p.Pro273Pro	auch gefunden von Arimura et. al

Tabelle 27: Übersicht der im Screening gefundenen Mutationen des *FHL2*-Gens. Angegeben sind Mutation, Lokalisation im Exon, Nukleotidveränderung, resultierender Aminosäureaustausch und Frequenz in Kontrollen. Durchgeführt von S. Reischmann und Dr. F. Friedrich, Institut für Experimentelle Pharmakologie des UKE.

Für die hier vorliegende Arbeit beschäftigte ich mich mit den in der folgenden Tabelle 27 genannten Mutationen I bis III.

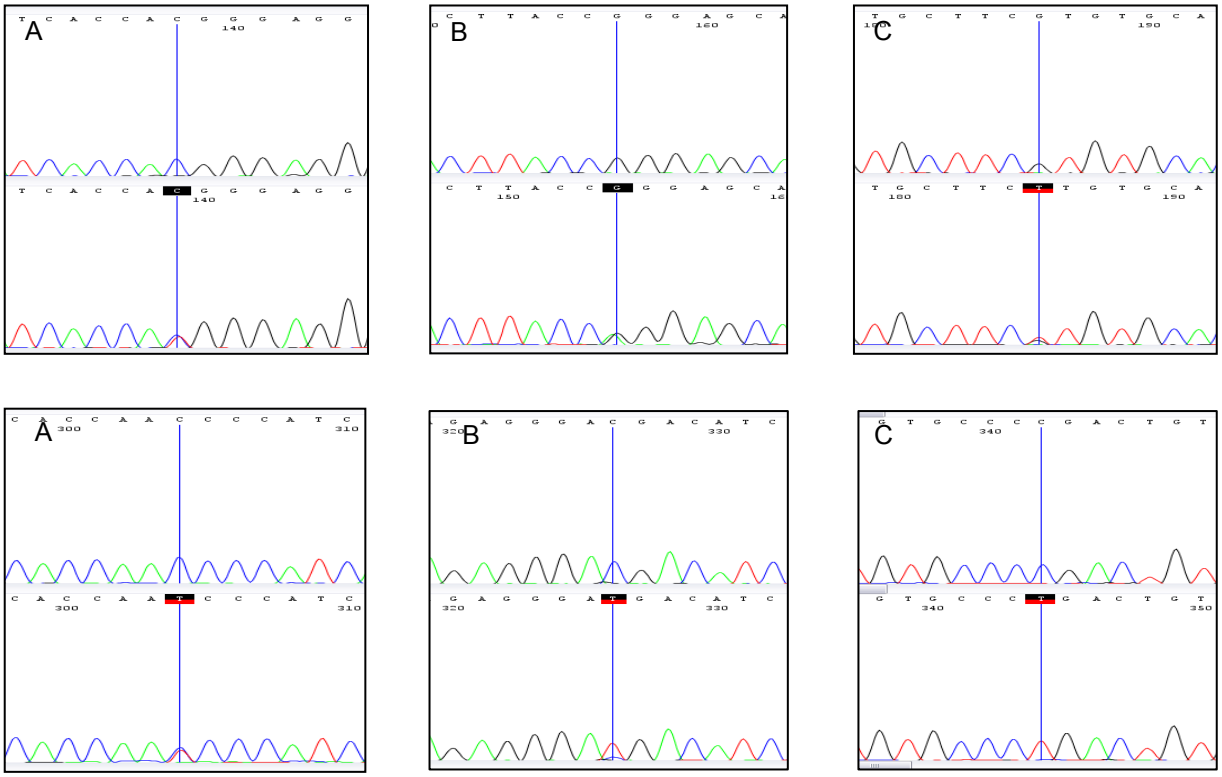


Abb. 9: Darstellung der gefundenen *FHL2*-Mutationen. Die obere Abbildung zeigt die betroffenen Codons und Aminosäuren der oben beschriebenen Mutationen I-III. Angegeben sind die Lokalisation der Aminosäure und die Nukleotidposition. Zusätzlich sind die vier organischen Nukleotidbasen ausgezählt. a) zeigt die Mutation c.512C>T, p.Thr171Met, b) zeigt die Mutation c.530G>A, p.Arg177Gln und c) zeigt die Mutation c.559G>T, p. Val187Leu. Die Mutationsträger sind nicht miteinander verwandt. Die untere Abbildung zeigt die gefundenen drei *FHL2*-Polymorphismen. a) zeigt den Polymorphismus c.678C>T, p. Asn226Asn in Exon 7. b) zeigt den Polymorphismus c.804C>T, p.Asp268Asp in Exon 8. c) zeigt den Polymorphismus c.819C>T, p.Pro273Pro in Exon 8.

Der oben beschriebene Polymorphismus Asn226Asn (Variante IV), der in einer französischen Kontrolle gefunden wurde, sowie die zwei Polymorphismen p.Asp268Asp (Variante V) und p.Pro273Pro (Variante VI), die auch von Arimura et al. 2007 beschrieben worden waren, bezog ich in meine Arbeit nicht weiter ein, da ich davon ausging, dass keine der Mutationen einen Krankheitswert für die HCM darstellen. Die Frequenz der Variante IV wird im NHLBI *exome variant server* mit 126 in 13328 Allelen beschrieben. Der NHBLI *exome variant server* ist ein Projekt des amerikanischen nationalen Gesundheitsinstituts mit dem Ziel, neue Gene aufzudecken, die zu Herz-, Lungen und Erkrankungen des Blutsystems führen, indem Protein-kodierende Regionen des menschlichen Genoms sequenziert und veröffentlich werden.

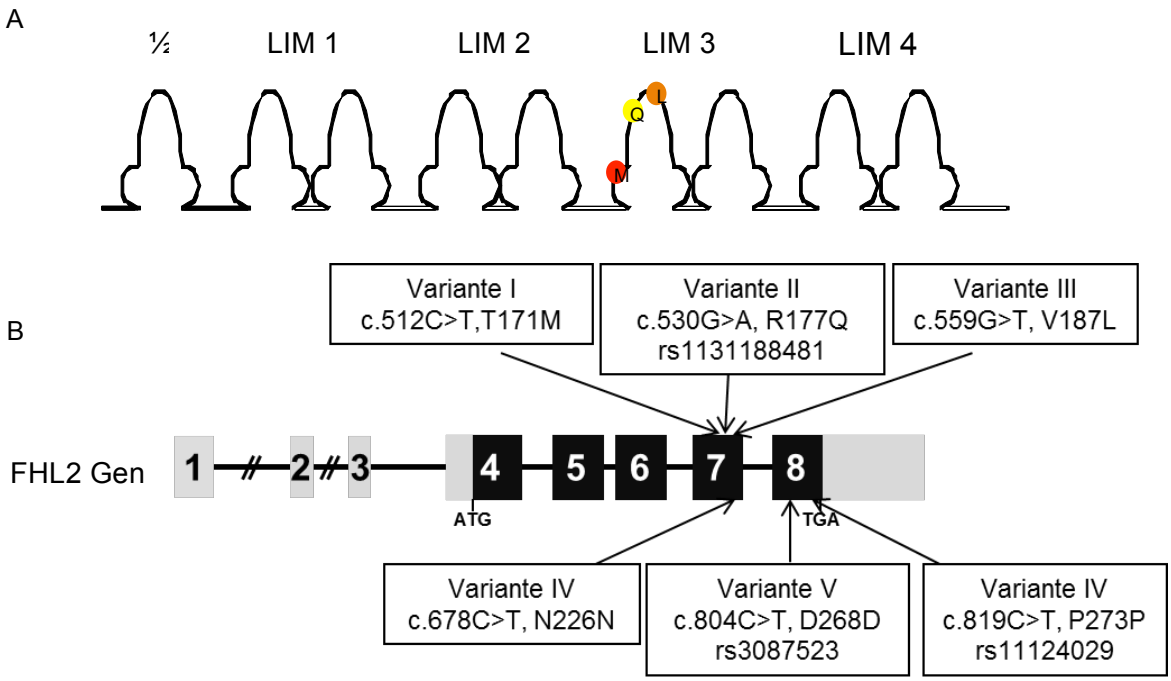


Abb. 10: Schematische Darstellung der strukturellen Anordnung des FHL2-Proteins. A, dargestellt sind die drei gefundenen *„missense“*-Mutationen und deren Lokalisation im *FHL2*-Gen bezüglich der LIM-Domänen. B zeigt sich die Mutations-Lokalisation in Bezug auf das *FHL2*-Genom. Die Kästchen und Zahlen markieren die 8 Exons des *FHL2*. Die Exons 1-3 sind nicht kodierend, Exon 4 bis 8 kodieren, in diesen befinden sich die 6 verschiedenen *FHL2*-Mutationen. Die Pfeile zeigen die Lokalisation der jeweiligen Mutationen in den betroffenen Exons an. ATG = Startcodon, TGA = Stopcodon.

5.1.1 Patientengeschichte zu Mutation c.512C>T

Die erste Mutation (Variante I) ist eine *„missense“*-Mutation mit dem Austausch von c.512C>T im Exon 7. Auf Codon-Ebene führt der Austausch des Cytosins durch Thymin zu einem Austausch des ACG-Codons durch ein ATG-Codon und somit auf Aminosäureebene zu einem Austausch von Threonin zu Methionin an Stelle p171 in der dritten LIM-Domäne des Proteins. Im Screening der deutschen und französischen Kontrollen wurde diese Mutation nicht gefunden.

Diese Mutation zeigte sich in der Index-Patientin im heterozygoten Zustand (Abb. 11, II.5). Die 66-jährige Patientin hatte sich zuvor mit Dyspnoe, Angina pectoris und den Symptomen einer Herzinsuffizienz gemäß NYHA II in der Notaufnahme vorgestellt. Echokardiografisch zeigte sich eine maximale Wanddicke von bis zu 22 mm ohne subaortale Obstruktion. Der Vater der Probandin (I.1) war mit 79 Jahren am Schlaganfall und die Mutter (I.2) mit 78 Jahren am akuten Koronarsyndrom verstorben. Die Probandin hat drei Schwestern sowie einen Bruder, dieser ist bereits verstorben. Eine Schwester (II.4) leidet auch an einer HCM und

bekam bereits einen ICD implantiert. Diese Frau hat drei Kinder. Einer der Söhne (III.2) hat ebenfalls eine HCM und wurde bereits mit einem ICD versorgt, der zweite Sohn als auch die Tochter waren zum Zeitpunkt der Diagnostik gesund (III.1 und III.3). Die andere Schwester der Probandin ist Mutter von vier Töchtern (IV. 2+3+4+5) und einem Sohn (IV.1). In dieser Seite der Familie zeigte sich bisher keine kardiale Erkrankung, jedoch wurde beim Sohn (V.1) der ältesten Tochter eine HCM festgestellt. Interessanterweise wurde bei dem 70-jährigen Ehemann (II.6) der Index-Patientin ebenfalls eine hypertrophe Kardiomyopathie mit NYHA II Stadium diagnostiziert. Auch dieser Patient ist Teilnehmer der Eurogene Studie, wurde jedoch negativ für die Mutation getestet. Beim Sohn der Indexpatientin (III.5) ist eine HCM mit ICD-Indikation bekannt. Klinische oder echokardiografische Daten liegen leider nicht vor, es ist jedoch bekannt, dass seine zwei Kinder bisher symptomfrei sind. Der zweite Sohn (III.2) der Index-Patientin wurde auch in die Eurogene Studie einbezogen. Dieser war klinisch asymptomatisch, doch echokardiografisch ließen sich eine maximale linksventrikuläre Wanddicke von 19 mm und eine subaortale Obstruktion von 34 mmHg nachweisen. Dieser Patient verstarb im Februar 2011 am plötzlichen Herztod. Siehe hierzu den Stammbaum der Familie unter Abb. 11.

Eine *in silico*-Analyse, gestützt durch das *online*-Vorhersage-Programm „*Mutation taster*“ (http://www.mutationtaster.org), klassifiziert diese Mutation mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% als pathogen. Die Mutation könnte das Spleißen der mRNA beeinflussen, wodurch es zu einem Verlust der wichtigen Proteindomänen 3 und 4 kommen könnte. PolyPhen-2, ein weiteres Vorhersage-Programm (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), sagt für diese *FHL2*-Mutation auch einen schädigenden Einfluss mit einer Sensitivität von 0,83 und einer Spezifität von 0,93 voraus.

5.1.2 Patientengeschichte zu Mutation c.530G>A

Die zweite Mutation (Variante II) ist eine *„missense“*-Mutation im Exon 7, die ebenfalls die LIM3 Domäne betrifft. Diese führt auf der Basenebene zu einem Austausch von Guanin zu Adenin, auf Codon-Ebene vom Basentriplett CGG-Codons zu einem CAG-Triplett das anstelle der Aminosäuren Arginin für Glutamin kodiert.

Bei diesem Index-Patienten (III.3) wurde im Alter von 13 Jahren die Diagnose einer HCM gestellt (Abb. 11). Er stellte sich damals außerdem mit muskulären Symptomen wie Achillessehnen-Kontrakturen und einer respiratorischen Insuffizienz aufgrund einer Zwerchfell-Schwäche vor. Die im Verlaufe durchgeführte Muskelbiospie bestätigte die milden neuropa-

thischen Merkmale bei normalen CK-Werten. Mit 19 musste sich der Patient aufgrund einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz und einem begleitenden pulmonalen Ödem einer Herztransplantation unterziehen. Der Bruder des Index-Patienten (III.2) leidet auch an einer HCM, die im Alter von 10 Jahren diagnostiziert wurde. Mit 5 Jahren zeigte er klinisch schon eine Schwäche der Skelettmuskulatur mit Gehschwierigkeiten, die im Verlauf rückgängig waren. Dieser Patient leidet nur noch gelegentlich an Myalgien, hat leichte Schwierigkeiten beim Fersengang und eine Hypophonie. Auch die Mutter (II.2) des Indexpatienten, wie ihr Sohn HCM-Patientin, zeigt diese Mutation im heterozygoten Zustand. Die Schwester (III.1) ist negativ für die Mutation, hat aber wie die Tante (II.1) jeweils echokardiografisch bzw. im Elektrokardiogramm Zeichen eines intermediären Phänotyps mit einer grenzwertigen septalen Hypertrophie. Für ein genetisches Screening war die Tante leider nicht erreichbar. Der Vater des Indexpatienten ist gesund. Des weiteren sollte erwähnt werden, dass in dieser Familie ebenfalls eine Mutation im *FHL1*-Gen entdeckt wurde (Friedrich, Wilding et al. 2012).

Diese Mutation wurde in 2 von 262 Kontrollen gefunden und ist auch im NHBLI *exome variant server* in 201 von 12805 Allelen auffindbar. „*Mutation taster*“ klassifiziert diese Mutation als benigne und als Polymorphismus rs1131188481. Wie bei Variante I könnte es durch die Mutation auch zu Änderungen im Spleißen der mRNA kommen, woraus ein Verlust der Proteindomänen 3 und 4 resultieren könnte. Auch PolyPhen-2 kategorisiert diese Mutation mit einer Sensitivität von 0,91 und einer Spezifität von 0,88 ebenfalls als benigne.

5.1.3 Patientengeschichte zu Mutation c.559G>T

Die dritte Mutation (Variante III) ist ebenfalls eine *„missense“*-Mutation. Diese geht mit dem Austausch von Guanin zu Thymin an Position 559 im Exon 7 einher. Auf Codon-Ebene führt der Austausch des Guanins durch Thymin zu einer Veränderung des Basentripletts von GTG zu TTG. Diese führt auf der Aminosäureebene zu einem Austausch von Valin zu Leucin in LIM-Domäne 3. Bei der Untersuchung der Kontrollpopulation wurde diese Mutation heterozygot in einer deutschen Kontrolle gefunden.

Über den Index-Patienten (II.3) dieser Mutation mit diagnostizierter HCM ist bekannt, dass seine Mutter (I.2) auch Trägerin der Mutation ist, jedoch zum Zeitpunkt der Diagnostik nicht an HCM erkrankt war. Über den Vater des Patienten sind keine Daten zu erheben gewesen. Beide Schwestern des Index-Patienten wurden ebenfalls untersucht. Eine der zwei Schwestern (II.2) ist ebenfalls Trägerin der Mutation, bisher jedoch klinisch gesund.

„Mutation taster“ sagt auch für diese Mutation benigne Eigenschaften vor und stuft diese als Polymorphismus ein. Auch hier sagen Bioinformatik-Analysen Veränderungen in den Spleißstellen voraus, was den Verlust der wichtigen Proteindomänen 3 und 4 bedeuten könnte. PolyPhen-2 sagt ebenfalls für diese *FHL2*-Mutation mit einer Sensitivität von 0,99 und einer Spezifität von 0,15 ebenfalls einen benignen Einfluss voraus.

Die Stammbäume der drei betroffenen Familien zeigen sich wie folgt:

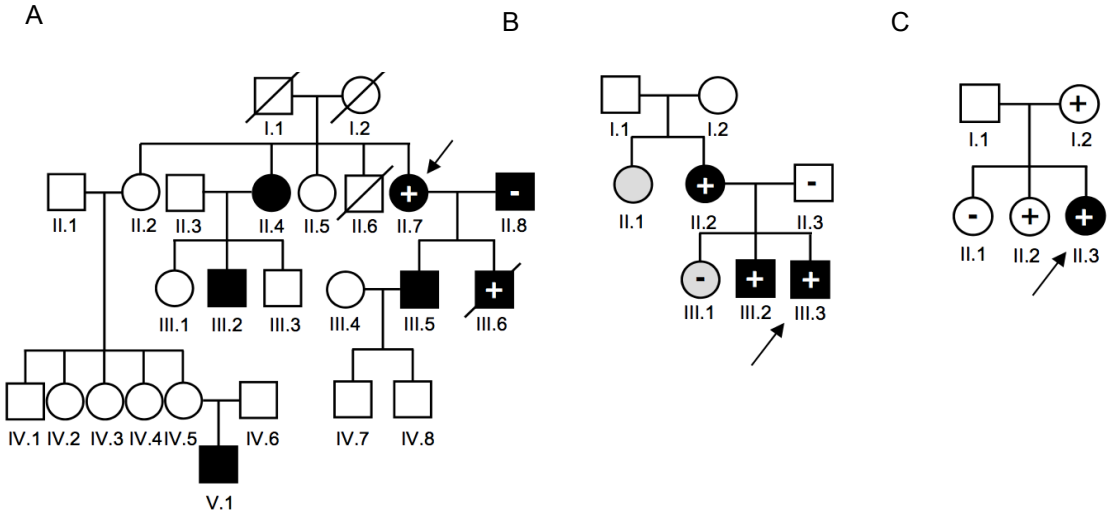


Abb. 11: Stammbäume der in 5.1 beschriebenen Familien. Die *FHL2*-Mutationen zeigten sich in 3 nicht-verwandten Familien aus Spanien, Frankreich und Deutschland. A, Stammbaum der Familie F-003-0036 der Mutation c.512C>T, T171M, B, Stammbaum der Familie F-19949 der Mutation c.530G>A, R177Q und C, Stammbaum der Familie F-20198 der Mutation c.559G>T, V187L. Die römischen Zahlen symbolisieren die Generationen, die arabischen Nummern zählen die Individuen in einer Generation auf. Männliche Individuen sind als Kästchen, die Frauen als Kreise symbolisiert. Individuen mit HCM sind schwarz markiert, nicht-betroffene Individuen sind nicht markiert, Individuen mit intermediärem Phänotyp sind grau markiert. Verstorbene Individuen sind mit einer Diagonalen gekennzeichnet, die Indexpatienten mit einem Pfeil. Individuen, die die jeweilige Mutation tragen sind mit (+), Individuen, bei denen die Mutation ausgeschlossen wurde, sind mit (-) gekennzeichnet. Individuen, die nicht genotypisiert wurden, sind nicht markiert.

5.2 Klonierungen für die Virusproduktion

Um den Einfluss der gefundenen Mutationen zu evaluieren, erfolgte die Herstellung der jeweiligen *FHL2*-Mutante zur AAV6-vermittelten Überexpression in Kardiomyozyten. Zu Beginn meiner experimentellen Arbeit musste die humane *FHL2*-cDNA zur Herstellung von AAV6 mithilfe einer linker-PCR amplifiziert werden. Die PCR wurde als *Touchdown*-PCR gefahren, die entstandene Bande des richtigen Fragments im Anschluss an die Gelelektrophorese aus dem Gel geschnitten und die DNA eluiert (Abb. 14 A). Nun konnte das Fragment in den ge-

wünschten Arbeitsvektor pEF5-TOPO transformiert werden, der sich vor allem für die geplanten Mutagenese-PCRs gut eignete. Der Vektor ist Bestandteil des *pEF5/FRT/V5 Directional TOPO Expression Kit* von Invitrogen und dient der direktionalen Klonierung eines *blunt-end* PCR-Produkts in den 5,8 kb großen Expressions-Vektor. Details zur Verwendung und Handhabung sind dem Kapitel 4.2.5 zu entnehmen.

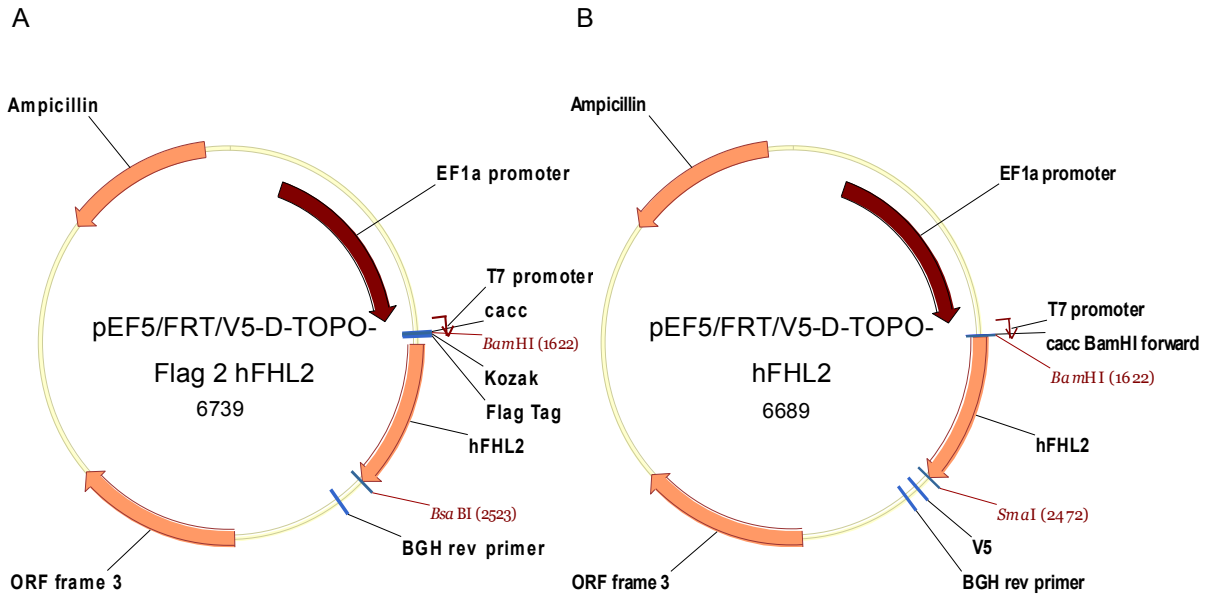


Abb. 12: Vektor pEF5-Topo mit Flag2-*FHL2*-WT-cDNA links. A zeigt das für die Virusherstellung benötigte Vektor-Insert-Konstrukt. B zeigt das für die Proteinherstellung benötigte Vektor-Insert-Konstrukt. h*FHL2*: humanes *FHL2*; Flag Tag: Flag Tag-Sequenz; Kozak: Kozak-Sequenz; BamHI und SmaI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

Im Anschluss durchgeführte Kontrollverdaue bestätigten die gelungenen Transformationen in Top 10-E.coli (Abb. 14 B). Nach Bestätigung der richtigen Sequenzen konnte mit den Mutagenese-PCRs fortgefahren werden. Die Mutationen sollten jeweils in die DNA-Stränge der klonierten Fragmente eingebaut werden. Zunächst wurde nur die Mutagenese-PCR der Mutation c.512C>T, p.Thr171Met direkt im Vektor pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2* durchgeführt und per Kontrollverdau und Sequenzierung bestätigt (Abb. 14). Nun konnten auch jeweils die beiden anderen Mutationen, Mutation c.530G>A, p.Arg177Gln und Mutation c.559G>T, p.Val187Leu (Abb. 14 D) in das Konstrukt pEF5-TOPO-*FHL2* eingebaut werden.

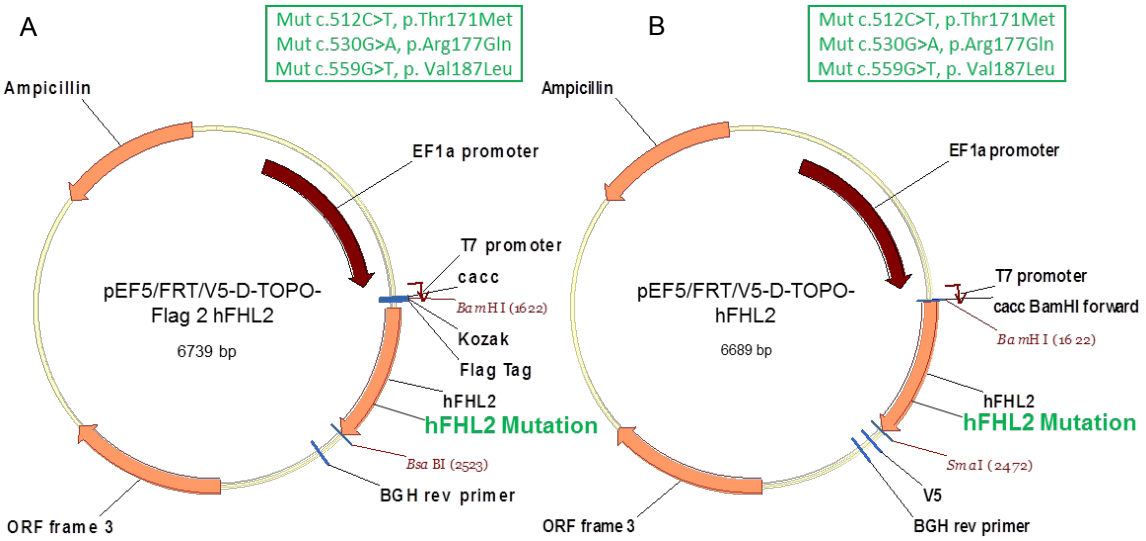


Abb. 13: Vektorkarten. A zeigt den TOPO-Vektor mit dem Insert Flag2-h*FHL2* der drei Mutanten für die Virusproduktion links. B zeigt den TOPO-Vektor mit den gewünschten Mutationen im Inserts für die Proteinherstellung. h*FHL2*: humanes *FHL2*; Flag Tag: Flag Tag-Sequenz; Kozak: Kozak-Sequenz; BamHI, BsaBI und SmaI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

Auch hier wurden zur Kontrolle der Richtigkeit Kontrollverdaue und Sequenzierungen durchgeführt. Details zu den Mutagenese-PCRs und den dafür benötigten Materialien sind dem Kapitel 4.2.14 zu entnehmen.

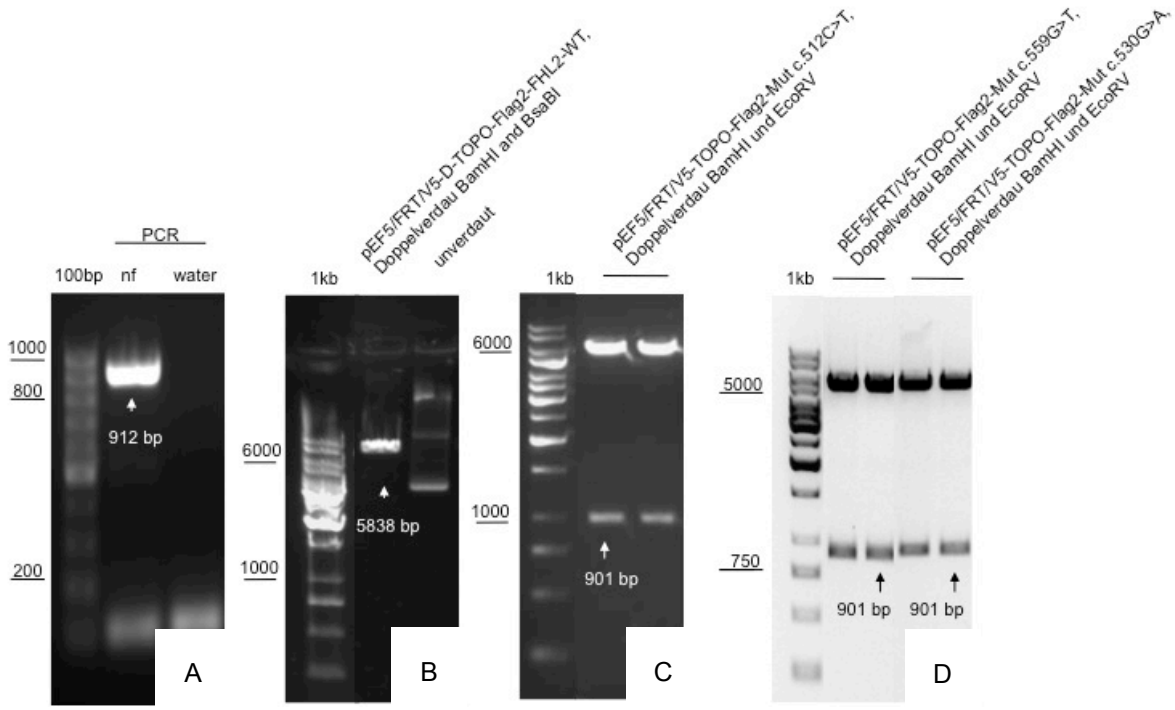


Abb. 14: Gelelektrophorese der *FHL2*-Klonierungen. A, Gelelektrophorese mit erwarteter *FHL2*-Bande nach PCR mit kardialer cDNA eines „non-failing“ (nf), gesunden Spenderherzens, sowie Wasserkontrolle. B, Verdau des Plasmids pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT mit BamHI und BsaBI nach Ligation in den Arbeitsvektor pEF5-TOPO. C, Kontrollverdau von pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-c.512C>T nach Mutagenese-PCR und anschließender Ligation in den genannten Arbeitsvektor. D, Kontrollverdau von pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-c.530G>A und -c.559G>T nach Mutagenese-PCR und Ligation in den o.g. Arbeitsvektor.

Nach Vorliegen aller vier Mutationen konnten nun die Ligation in den für die AAV6-Produktion benötigten Arbeitsvektor dsAAV-CMVenh-MLC260 durchgeführt werden.

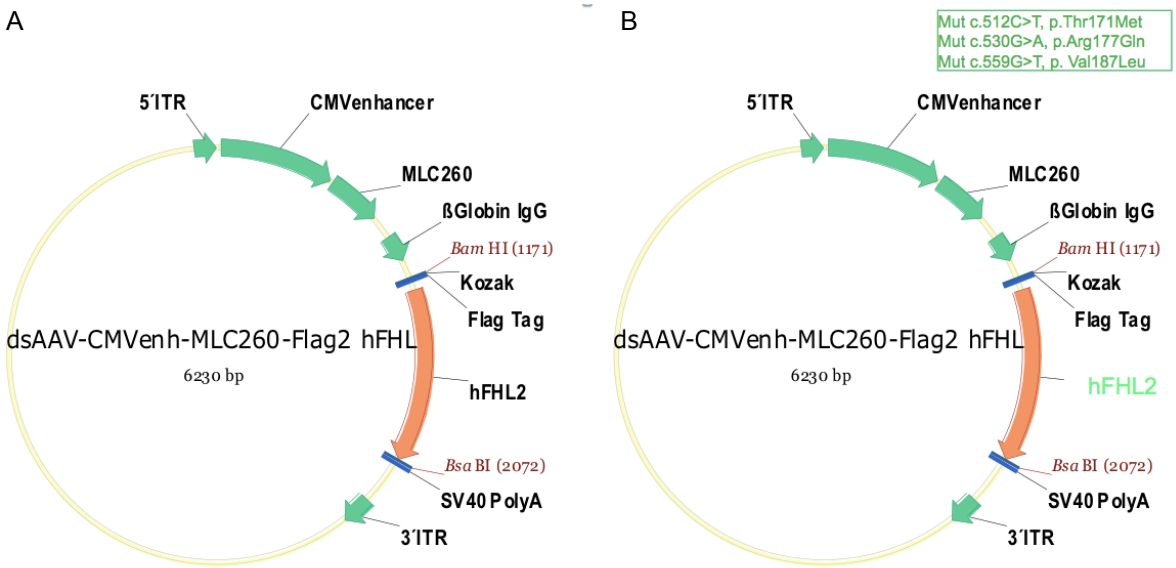


Abb. 15: Zielvektoren für die AAV6-Produktion *FHL2*-Varianten. A, der ligierte Vektor dsAAV-CMVenh-MLC260 mit dem gewünschten Insert Flag2-h*FHL2* des WTs (A), sowie der drei Mutanten (B). CMVenhancer: Verstärker des CMV-Promoters; MLC260: Regulator der Transkription, h*FHL2*: humanes *FHL2*; Flag Tag: Flag Tag-Sequenz; Kozak: Kozak-Sequenz; BamHI und BsaBI: Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

Zunächst wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdau mit den beiden Enzymen BamHI und XbaI aus dem vorliegenden Vektor pdsAAV-CMV-MLC260-EGFP das EGFP geschnitten, der Vektor linearisiert und nach der Gelelektrophorese aus dem Gel eluiert. Auch die vier unterschiedlichen *FHL2*-Fragmente konnten aus dem pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-Vektor geschnitten und ebenfalls aus dem Gel eluiert werden. Im Anschluss wurden jeweils die Ligationen der einzelnen Fragmente mit dem linearisierten und verdauten pdsAAV-CMV-MLC260-Vektor durchgeführt und diese im Nachhinein mittels Restriktionsverdau kontrolliert.

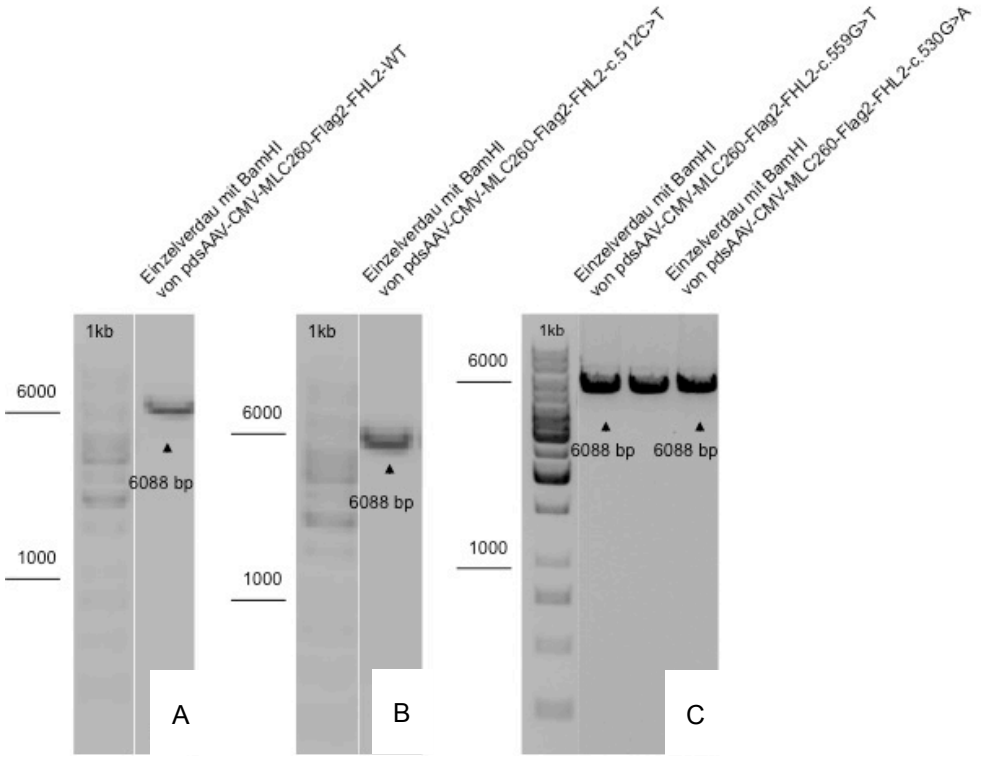


Abb. 16: Gelelektrophorese nach Restriktions-Verdau. A zeigt den Verdau des Plasmids pdsAAV-CMV-MLC260-Flag2-*FHL2*-WT nach Ligation in den genannten Zielvektor. B zeigt den Verdau des Plasmids pdsAAV-CMV-MLC260-Flag2-*FHL2*-c.512C>T nach Ligation in den genannten Zielvektor. C zeigt den Kontrollverdau von Plasmid pdsAAV-CMV-MLC260-Flag2-*FHL2*-c.530G>A sowie -c.559G>T nach Ligation in genannten Zielvektor.

Nach Erhalt der richtigen Ergebnisse durch Sequenzierung wurden die vier Plasmide zu Dr. Oliver Müller nach Heidelberg geschickt, um dort die Viren pdsAAV-CMVenh-MLC260-Flag2-*FHL2*-WT, -c.512C>T, -c.530G>A, -c.559G>T, und einen Virus, pdsAAV-CMVenh-MLC260-GFP, der zur Infektionskontrolle für GFP kodiert, produzieren zu lassen (Muller, Schinkel et al 2008). Nach der Produktion ergaben sich für die oben aufgezählten fünf verschiedenen Viren folgende Titer:

Virus	**Titer**
AAV-CMVenh-MLC260-Flag2-*FHL2*-WT	8,9 x 10 (11) vg/ml
AAV-CMVenh-MLC260-Flag2-*FHL2*-c.512C>T	5,6 x 10(11) vg/ml
AAV-CMVenh-MLC260-Flag2-*FHL2*-c.530G>A	1,93 x 10(12) vg/ml
AAV-CMVenh-MLC260-Flag2-*FHL2*-c.559G>T	3,68 x 10(12) vg/ml
AAV-CMVenh-MLC260-GFP	3,3 x 10(11) vg/ml

Tabelle 28: Liste der von Dr. O. Müller produzierten AAV 6. Angegeben sind die zugehörigen Titer.

5.3 Analyse von *FHL2*-AAV6-transfizierten Maus-Kardiomyozyten

5.3.1 Expressionsanalyse

Für die weitere Arbeit mit den Viren wurden zunächst für die Viren, die den *FHL2*-WT bzw. die c.512C>T-Mutante kodieren, die Expression auf Proteinebene nach Transduktion von Maus-Kardiomyozyten analysiert.. Hierfür wurden neonatale Maus-Kardiomyozyten (NMCM) nach dem im Abschnitt 4.4 genannten Protokoll präpariert und ausplattiert. Im Anschluss wurden diese NMCMs 72 Stunden nach Ausplattieren mit jeweils einem der Viren in unterschiedliche MOIs (300, 1000, 3000, 10000 und 30000) infiziert und nach 48 h bzw. 72 h Infektion nach Protokoll geerntet. In Western Blots konnte veranschaulicht werden, dass für den WT und die c.512C>T-Mutante die MOI von 30000 nach 72 h die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte, so dass mit dieser MOI in folgenden Versuchen mit allen Varianten weitergearbeitet wurde (**Abb. 17**).

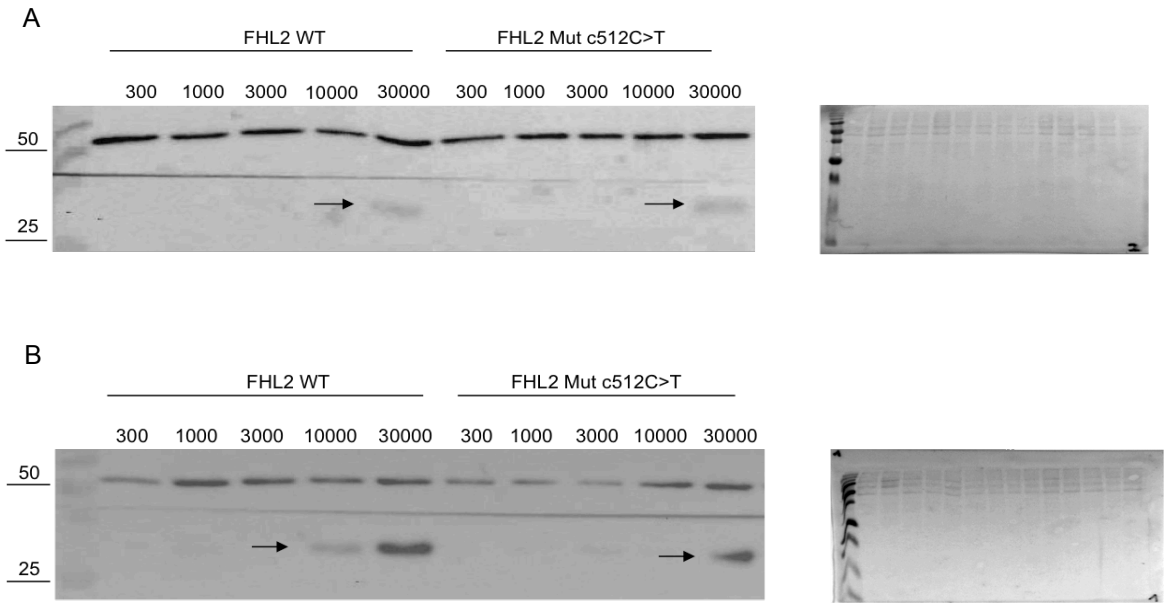


Abb. 17: Proteinsignale der FHL2-Varianten WT und c.512C>T nach 48h bzw. 72h Transduktion von Maus-kardiomyozyten. Kardiomyozyten wurden aus neugeborenen Mäusen isoliert und mit AAV6, die FLAG-markiertes WT-FHL2 oder HCM-assoziierte Mutanten kodieren, mit verschiedenen aufgeführten MOIs transduziert und für 48h (A) und 72h (B) kultiviert. Western Blot gefärbt mit dem FLAG-Antikörper, sowie mit Calsequestrin-Antikörper zur Kontrolle, der FLAG-FHL2-WT oder –c.512C>T detektiert. Ponceaufärbung jeweils rechts, als Ladekontrolle. Der Molekulargewichtsmarker ist angezeigt.

Im Anschluss erfolgte die Durchführung eines repräsentativen Western Blots mit allen Varianten und Quantifizierung aller vier FHL2-Varianten (

Abb. 18). Im Vergleich zum WT zeigte sich kein signifikanter Unterschied im exogenen Proteinsignal der drei Mutanten.

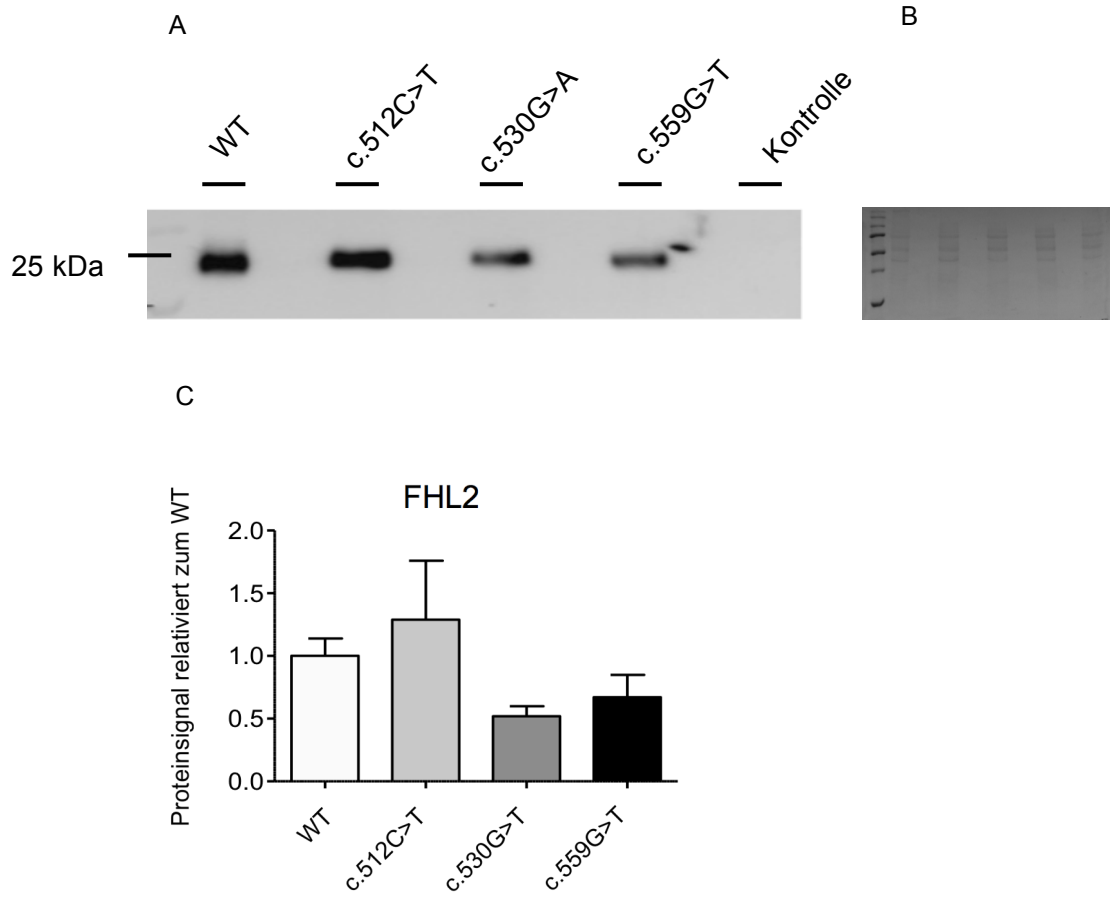


Abb. 18: Proteinsignale der genannten vier FHL2-Varianten nach Transduktion von Mauskardiomyozyten. Kardiomyozyten wurden aus neugeborenen Mäusen isoliert und mit AAV6 (MOI 30 000), die FLAG-markiertes WT-FHL2 oder HCM-assoziierte Mutanten kodieren, transduziert und für 96h kultiviert. A, repräsentativer Western Blot gefärbt mit dem FLAG-Antikörper, der FLAG-FHL2-WT oder -Mutanten detektiert sowie B, der Ponceaufärbung als Ladekontrolle. Der Molekulargewichtsmarker ist angezeigt. C, Proteinsignal der FHL2-Varianten genormt zur Proteinfärbung durch Ponceau und relativiert zum WT-Signal. Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler (n = 6-8). Varianzanalyse (*one-way* ANOVA) mit Dunnett's Post-Test im Vergleich zum WT.

5.3.2 Zelluläre Lokalisation von nativem Fhl2

FHL2 ist nach Literaturangaben an der I- und M-Bande des kardialen Sarkomers lokalisiert. Zur Überprüfung dessen führten wir in NMCMs und in ventrikulären Myozyten adulter Mäuse Immunfluoreszenz-Versuche durch, siehe für die Durchführung Kapitel 4.4.7. In NMCMs zeigte sich ein gestreiftes Muster des nativen Fhl2, das sich im Wechsel mit der gestreiften Anordnung von cMyBP-C in der sarkomerischen A-Bande zeigte. Außerdem zeigten sich

Überlagerungen in die M-Bande, woraus sich die Lokalisation von FHL2 in der I- und M-Bande bestätigen ließ (Abb. 19 A). In AMVMs zeigte sich eine deutliche Ko-Lokalisation mit dem Z-Scheiben-ständigen α-Aktinin (Abb. 19 B).

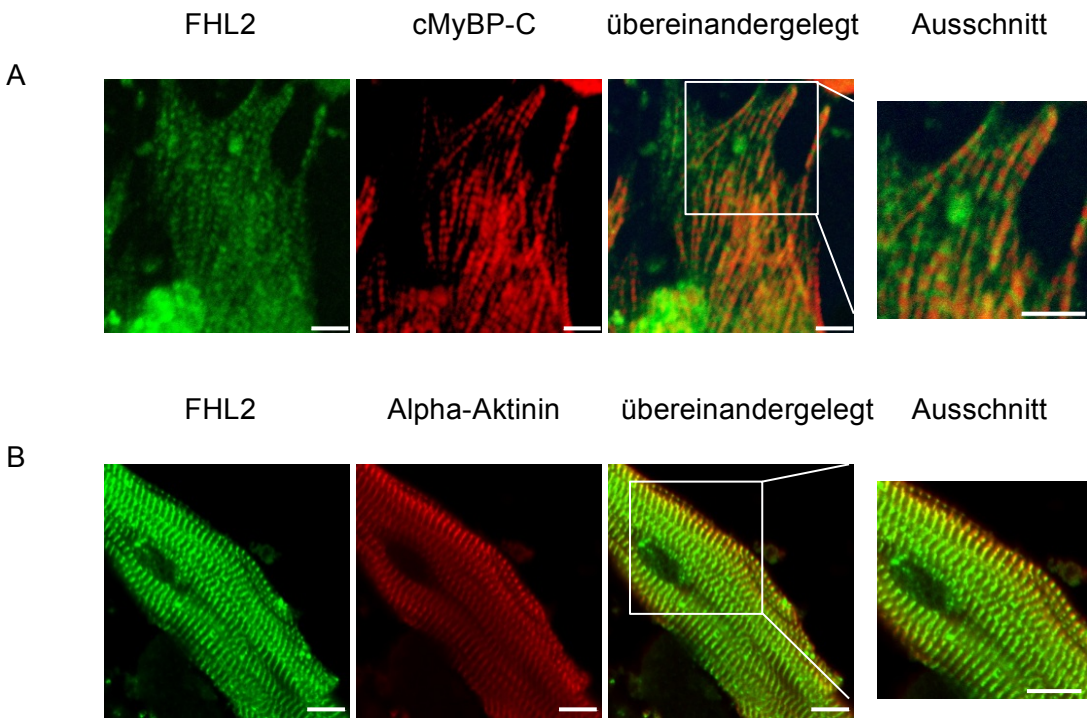


Abb. 19: Zelluläre Lokalisation von nativem FHL2. A zeigt die Ko-Anfärbung des nativen Fhl2 mit cMyBP-C in NMCM, B zeigt die Ko-Anfärbung mit α-Aktinin in AMVMs. Maßstabsleiste entspricht 10 µM.

5.3.3 Zelluläre Lokalisation der FHL2-Varianten

Nach Ermittlung der optimalen Infektions-MOI der AAV6 wurden Lokalisationsanalysen per Immunfluoreszenz durchgeführt, um den Einbau in das kardiale Sarkomer zu überprüfen. Hier zeigte sich für alle 4 FHL2-Varianten ein gestreiftes Muster in Abwechslung mit cMyBP-C, welches in der sarkomerischen A-Bande lokalisiert ist. Es ist also davon auszugehen, dass das exogene FHL2 wie beschrieben an der I-Bande in der Nähe der Z-Scheibe lokalisiert ist. Zudem zeigte es wie das native Fhl2 einen kleinen Überhang in die M-Bande, was für einen adäquaten Einbau des exogenen FHL2 ins Sarkomer spricht (Abb. 20).

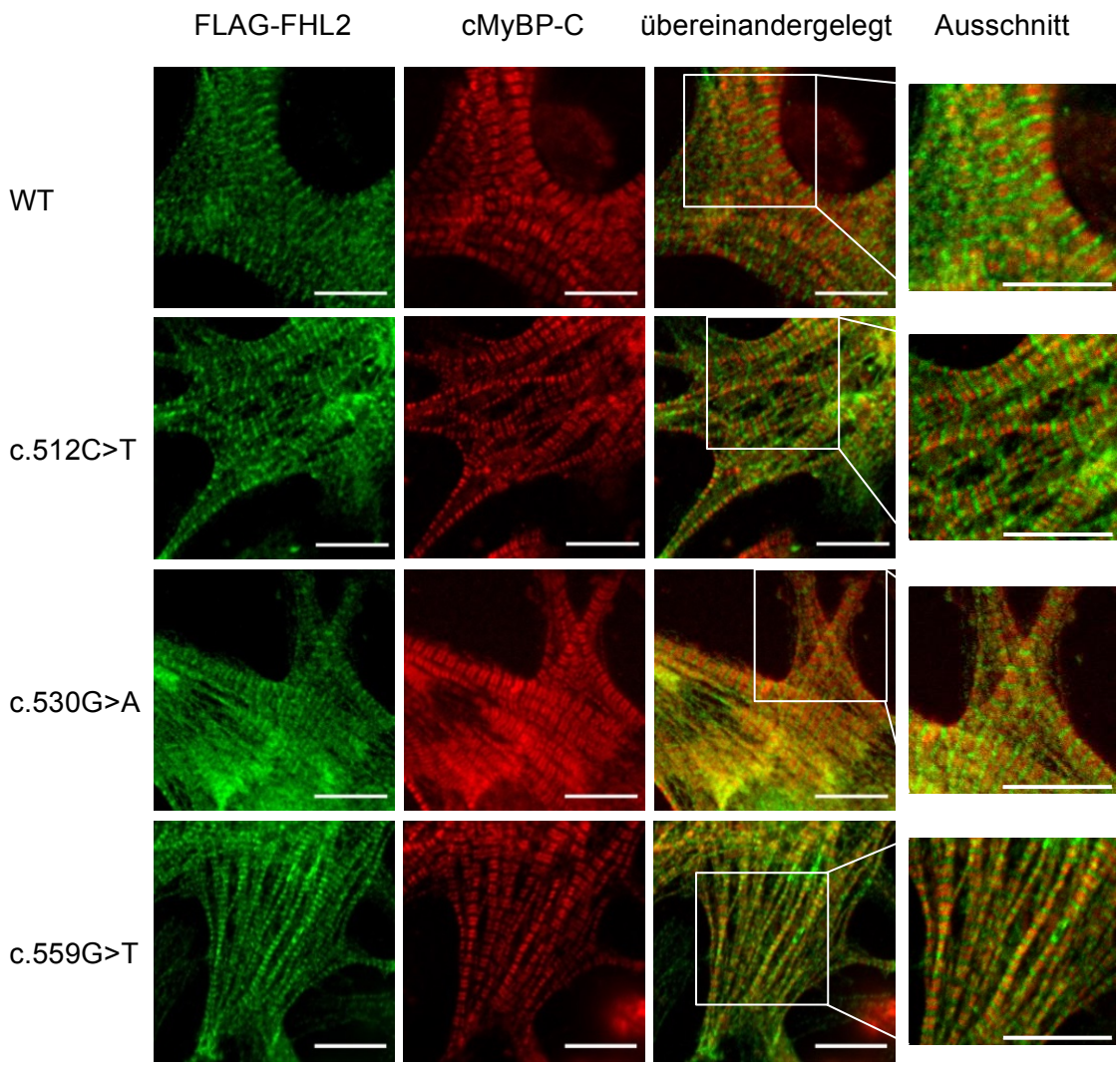


Abb. 20: Sarkomerische Lokalisation von FHL2-WT und -Mutanten nach Transduktion von NMCM. Aufgeführt sind jeweils die Immunfluoreszenz mit Flag-markiertem FHL2, mit cMyBP-C, beide Bilder übereinander gelegt sowie eine Vergrößerung. Maßstableiste entspricht 10 µm. Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt von Dr. Felix Friedrich vom Institut für Experimentelle Pharmakologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Des Weiteren evaluierten wir die Ko-Lokalisation von FHL2 und Titin. Für die Lokalisation von Titin benutzen wir einen Antikörper, der den Z-Scheiben-Anteil von Titin detektiert. Hier zeigten sich sowohl ein gestreiftes Muster mit dem exogenen FHL2 in der M-Bande sowie ein übereinandergelegtes Muster mit dem Titin-Signal in der Z-Scheibe des Sarkomers (Abb. 21).

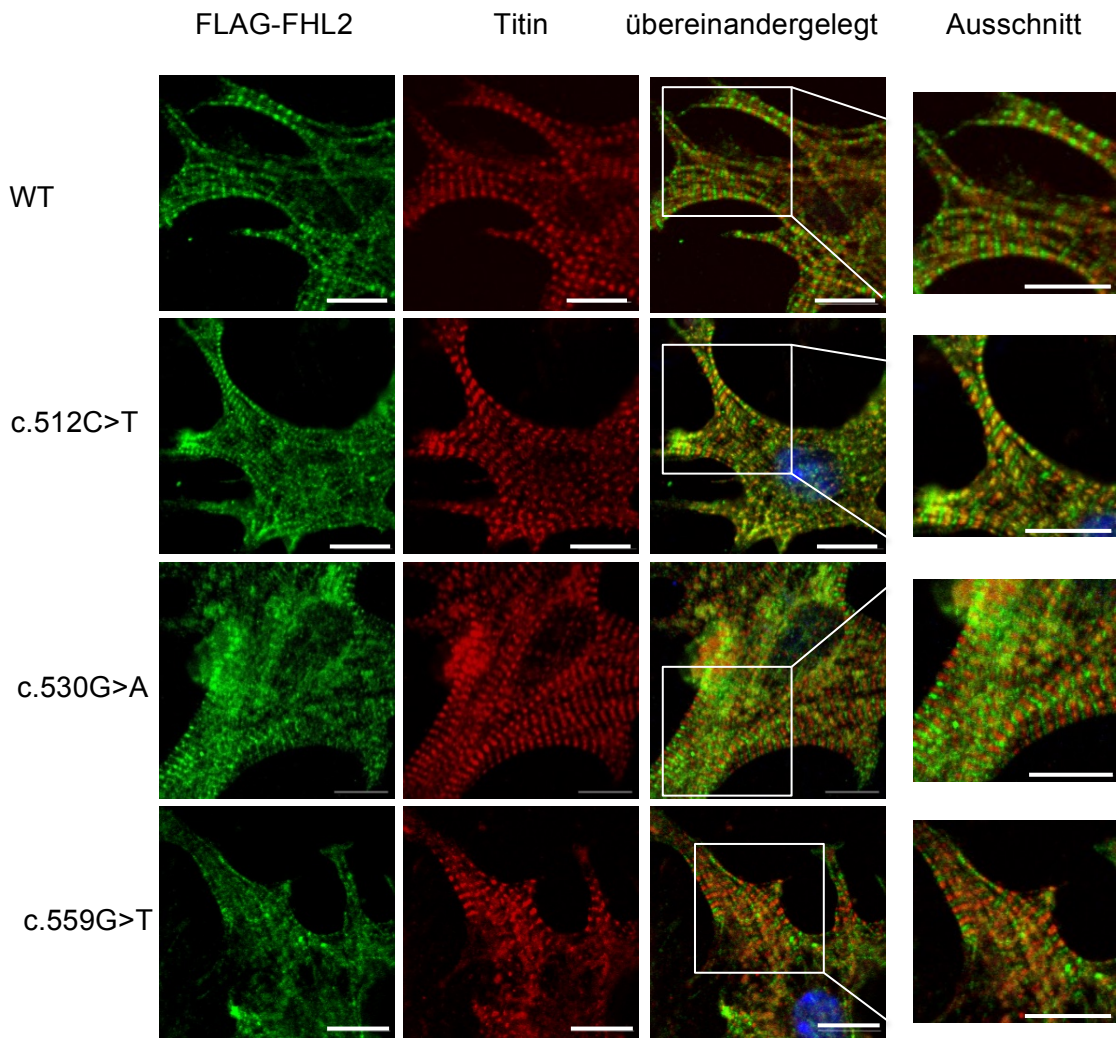


Abb. 21: Sarkomerische Lokalisation von FHL2-WT und -Mutanten nach Transduktion von NMCM. Aufgeführt sind jeweils die Immunfluoreszenz mit Flag-markiertem FHL2, mit Titin sowie beide Bilder übereinandergelegt. Maßstableiste entspricht 10 µm. Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt von Dr. Felix Friedrich vom Institut für Experimentelle Pharmakologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

5.3.4 Transduktion von künstlichem Herzgewebe

Da bekannt ist, dass HCM mit Hyperkontraktilität und diastolischer Dysfunktion einhergeht (Maron et al. 2011), untersuchten wir, ob die humanen FHL2-Varianten nach AAV6-vermitteltem Gentransfer Einfluss auf die Kontraktion in künstlichem Herzgewebe (EHT) zeigen. Die Transduktion der EHTs erfolgte wie im Kapitel „Herstellung und Transduktion von künstlichem Herzgewebe“ beschrieben. Als Kontrolle der Transduktion wurden EHTs parallel mit GFP-kodierenden AAV6 transduziert, so dass der Erfolg der Transduktion durch Fluoreszenzanalyse kontrolliert werden konnte (Abb. 22).

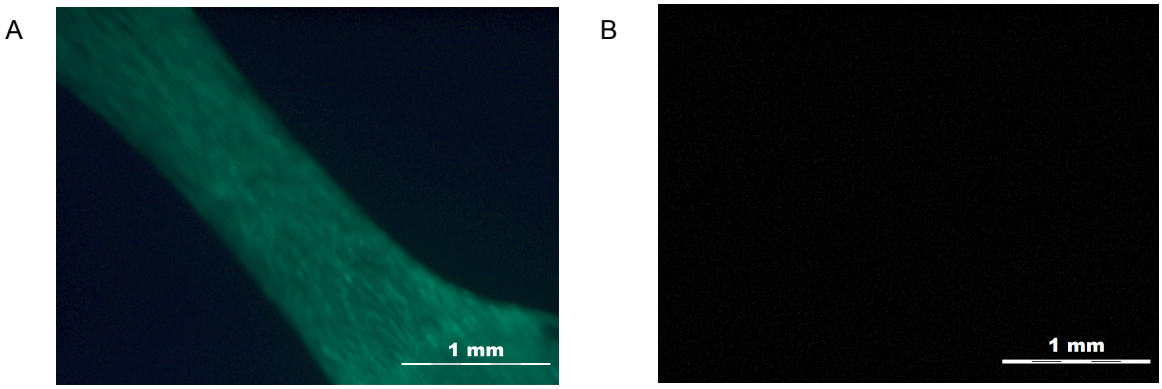
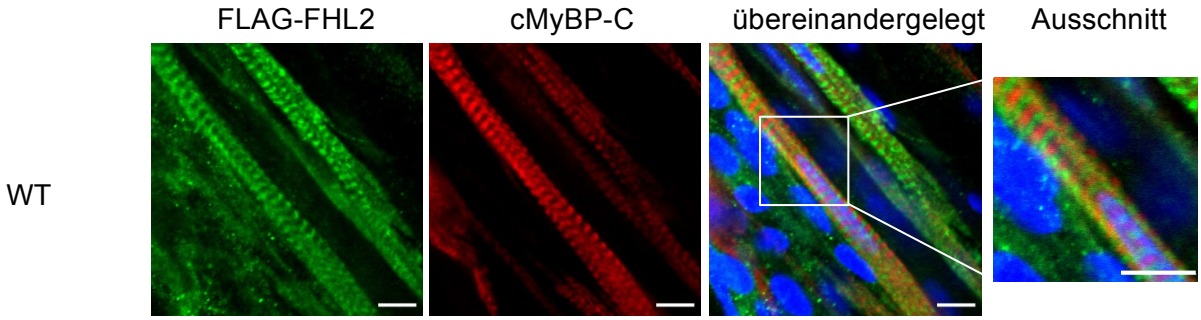


Abb. 22: Transduktionskontrolle der EHTs. A AAV6-GFP-transduziertes EHT und B nicht-transduziertes EHT unter UV-Licht. Maßstableiste entspricht 1 mm.

5.3.5 Lokalisation von FHL2-Varianten in EHTs

Zunächst wurde für die FHL2-Varianten eine Lokalisationsanalyse per Immunfluoreszenz durchgeführt, um den Einbau in das kardiale Sarkomer nach EHT-Transduktion zu überprüfen. Die Immunfluoreszenz wurde nach Protokoll durchgeführt, das im Teil 4.4.7 beschrieben ist. Diese geschah mit der Kombination aus den Primär-Antikörpern gegen Flag-markiertes FHL2 und gegen cMyBP-C. Hierbei zeigte sich, wie der Abb. 23 zu entnehmen ist, in den mit dem WT und den Mutanten transduzierten EHTs ein sich abwechselndes Muster von cMyBP-C und FHL2. Der WT als auch die Mutanten bestätigten die erwartete Lokalisation in der Z-Scheibe/I-Bande. Interessanterweise zeigten sich für die dritte FHL2-Variante, c.559G>T, Doppelbanden (in Abb. 23 mit Doppelpfeil markiert). Dieser Unterschied in der zellulären Lokalisation könnte aus einem technischen Artefakt während der Prozessierung des Gewebes resultieren, da gezeigt werden konnte, dass es bei relaxierten Sarkomeren zu einer korrekten Detektion von FHL2 in der I-Bande kommt, während kontrahierte Sarkomere eher eine Z-Scheiben-Färbung zeigen.



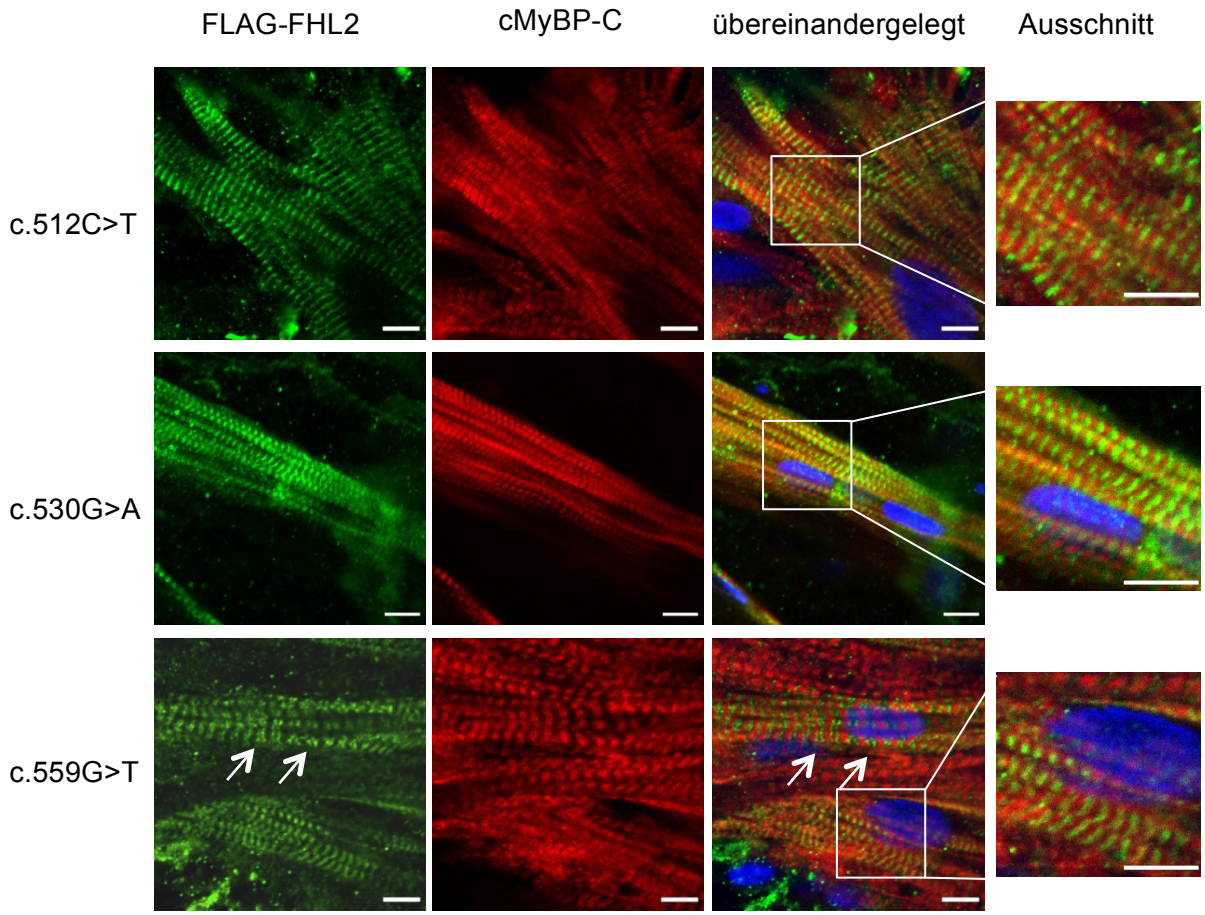


Abb. 23: Immunfluoreszenz von FHL2-transduziert EHTs. Aufgeführt sind jeweils die Immunfluoreszenz mit Flag-getagtem FHL2, mit cMyBP-C sowie beide Bilder übereinander gelegt. Doppelbanden der dritten Mutante sind mit Pfeilen markiert. Maßstableiste entspricht 10 µm. Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt von Dr. Felix Friedrich vom Institut für Experimentelle Pharmakologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

5.3.5.1 Einfluss der Transduktion auf die Kontraktilität der EHTs

Die Kontraktilitätsmessungen (durchgeführt von Dr. Felix Friedrich) fanden an Tag 10, 13 und 14 statt. Die Kontraktilitätsanalyse der transduzierten EHTs wurde hinsichtlich verschiedener Kriterien wie Kraft (in mN), Kontraktions- und Relaxations-Geschwindigkeit (in mN/Sekunde) durchgeführt (Hansen, Eder et al. 2010). In der Analyse an Tag 14 (Daten von Tag 10 und 13 nicht gezeigt) zeigte sich für WT-EHTs kein signifikanter Unterschied bezüglich der Kraftentwicklung, sowie der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich mit nicht-transduzierten Kontroll-EHTs. Zwischen den FHL2-Gruppen war jedoch auffällig, dass die mit c.512C>T-transduzierten EHTs im Vergleich zu WT-transduzierten EHTs eine signifikant höhere Kraft und Kontraktionsgeschwindigkeit zeigten (Abb. 24 A und B).

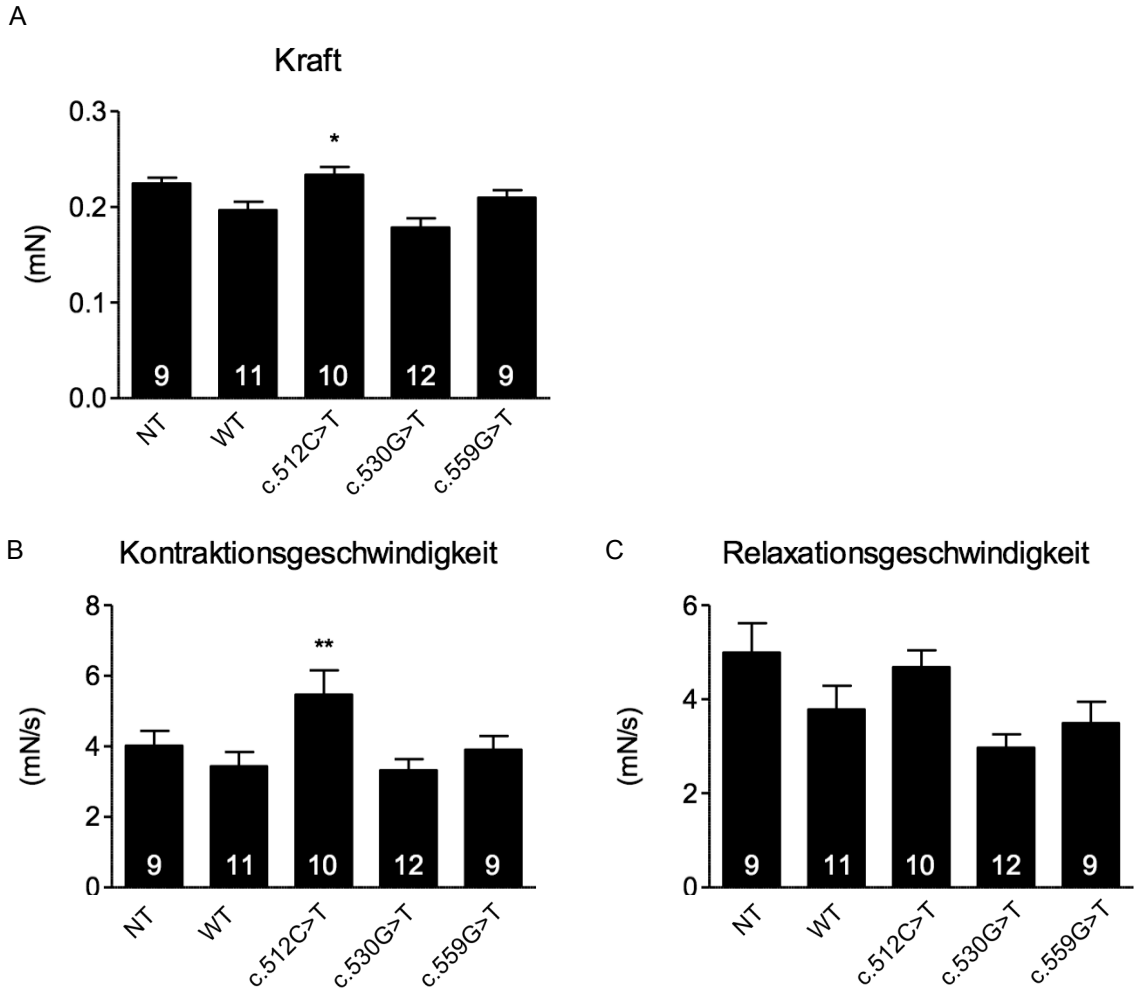


Abb. 24: Messungen der mit FHL2-WT und -Mutanten transduzierten EHTs an Tag 14. Analyse hinsichtlich der aufgeführten Parameter Kraft (A, in mN), Kontraktions-Geschwindigkeit (B, in mN/s), Relaxations-Geschwindigkeit (C, in mN/s). Daten angegeben als Mittelwert ± Standardfehler. N wie in den Balken angegeben. Analyse durch: Varianzanalyse (*one-way* ANOVA), Dunnet's Post-Test im Vergleich zum WT, * p< 0,05, **p>0.01.

5.4 Klonierungen für die Produktion rekombinanter Proteine

Zur Evaluation bezüglich der Interaktionsfähigkeit der FHL2-Varianten mit sarkomerischen Strukturproteinen war die Produktion rekombinanter FHL2-Proteine geplant. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wolfgang Linke von der Abteilung für Kardiovaskuläre Physiologie der Ruhr-Universität Bochum sollten Titin-Bindungs-Essays durchgeführt und die Interaktion der verschiedenen FHL2-Varianten hinsichtlich des Bindungsverhaltens untersucht werden. Für die Herstellung rekombinanter Proteine benötigte ich zunächst die cDNA des *FHL2*, welches wie auch für die AAV6-Produktion mithilfe einer linker-PCR amplifiziert werden konnte. Auch diese PCR wurde als *Touchdown*-PCR gefahren, die Bande des entstandenen Fragments nach der Gelelektrophorese aus dem Gel geschnitten und die DNA eluiert (Abb. 25 A). Auch

dieses Fragment wurde für die weiteren Klonierungsarbeiten in den Arbeitsvektor pEF5-TOPO transformiert (Abb. 25). Details zu diesem sind im Kapitel 4.2.5 zu finden. Kontrollverdaue bestätigten anschließend die gelungenen Transformationen in Top 10-E.coli und das Vorliegen des Plasmids pEF5-TOPO-*FHL2*-WT (23 B).

Für die Klonierung der drei *FHL2*-Mutationen erfolgte wiederum eine Mutagenese-PCR mit dem WT-Plasmid als Matrize. Kontrollverdaue und Sequenzierung bestätigten die erfolgreiche Produktion der gewünschten Plasmide pEF5-TOPO-*FHL2*-c.512C>T, pEF5-TOPO-*FHL2*-c.530G>A und pEF5-TOPO-*FHL2*-c.559G>T (Abb. 25 C). Details zur Durchführung der Mutagenese-PCRs sind dem Kapitel 4.2.14 zu entnehmen.

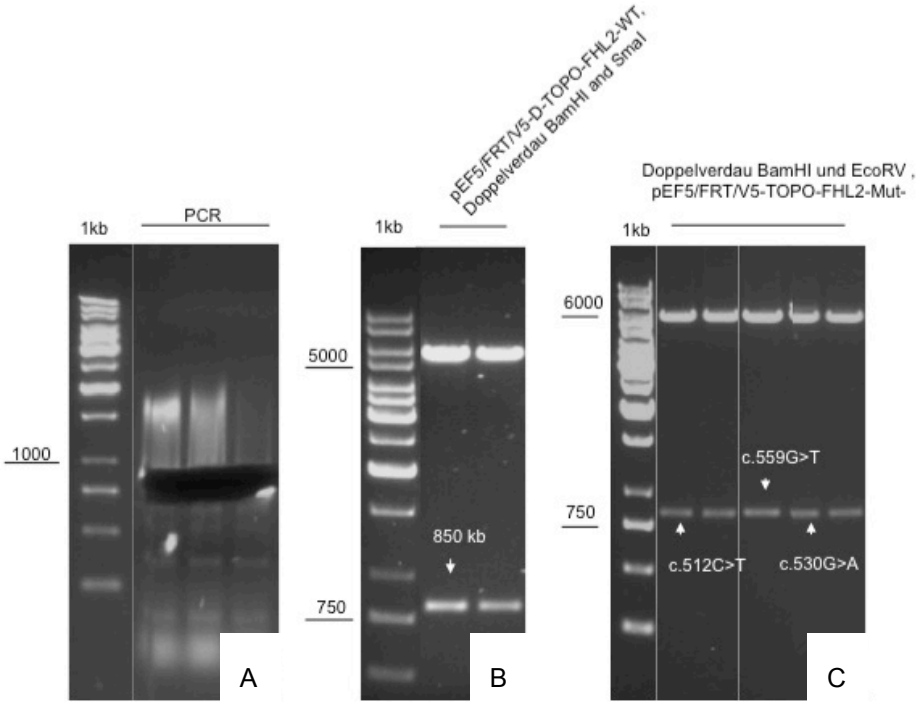


Abb. 25: Gelelektrophorese des durchgeführten Restriktions-Verdaus. A zeigt PCR-Ansätze an der DNA eines gesunden Spenderherzens. B zeigt den Verdau des Plasmids pEF5-TOPO-*FHL2*-WT nach Ligation in den Arbeitsvektor pEF5-TOPO. C zeigt den Kontrollverdau von pEF5-TOPO-*FHL2*-c.512C>T, -c.530G>A und -c.559G>T nach anschließender Ligation in den genannten Arbeitsvektor.

Nach Vorliegen aller vier Varianten mussten im Anschluss die Ligationen der vier verschiedenen *FHL2*-Fragmente in den für die Herstellung rekombinanter Proteine benötigten Zielvektor pGex-5x-1 durchgeführt werden (Abb. 26).

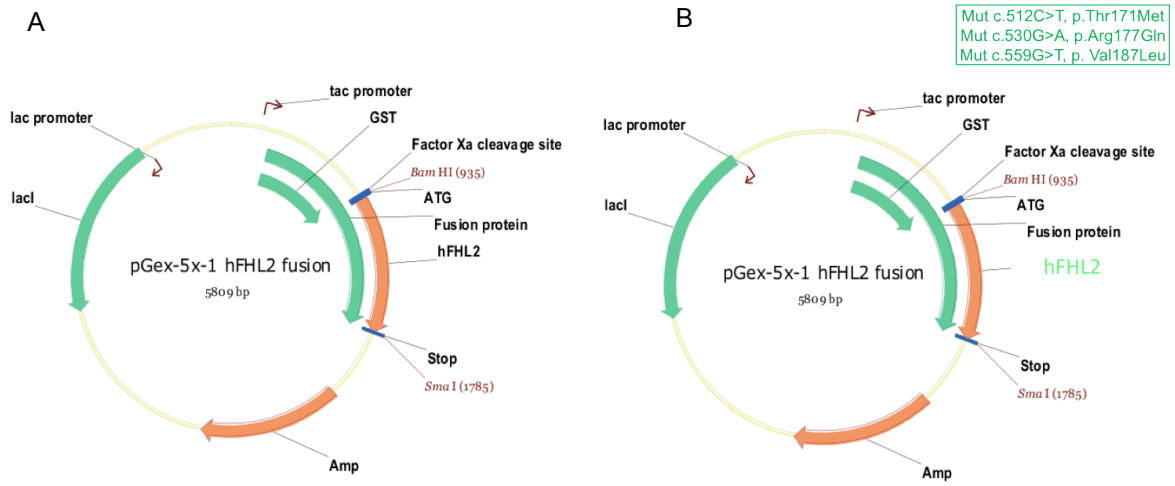


Abb. 26: Legierter Vektor pGex-5x-h*FHL2*-Fusion. A: Vektor mit *FHL2*-WT-cDNA, B Vektor, in den die Mutationen eingefügt wurden. BamHI und SmaI: Sequenz für Schnittstellen der Restriktionsenzyme; Stop: Stop-Kodon; h*FHL2*: humanes *FHL2*; *Factor Xa cleavage site*: Schnittstelle Faktor Xa; GST: Gen für Glutathion-S-Transferase.

Zunächst wurde der Vektor im Restriktionsverdau mit den beiden Enzymen BamHI und SmaI linearisiert und anschließend aus dem Gel eluiert. Auch die vier *FHL2*-Fragmente wurden mit den gleichen Enzymen aus dem Vektor pEF5-TOPO-*FHL2* geschnitten, die DNA eluiert und die Ligationen der einzelnen Fragmente mit dem geöffneten, verdauten Vektor pGex-5x-1 durchgeführt. Anschließende Restriktionsverdaue und Sequenzierungen bestätigten den Erfolg der Ligationen. Nach Erhalt der richtigen Sequenzen konnte mit der Herstellung der rekombinanten Proteine begonnen werden.

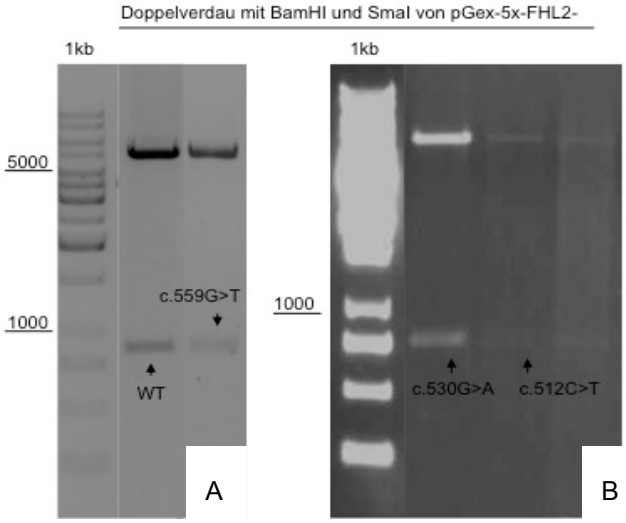
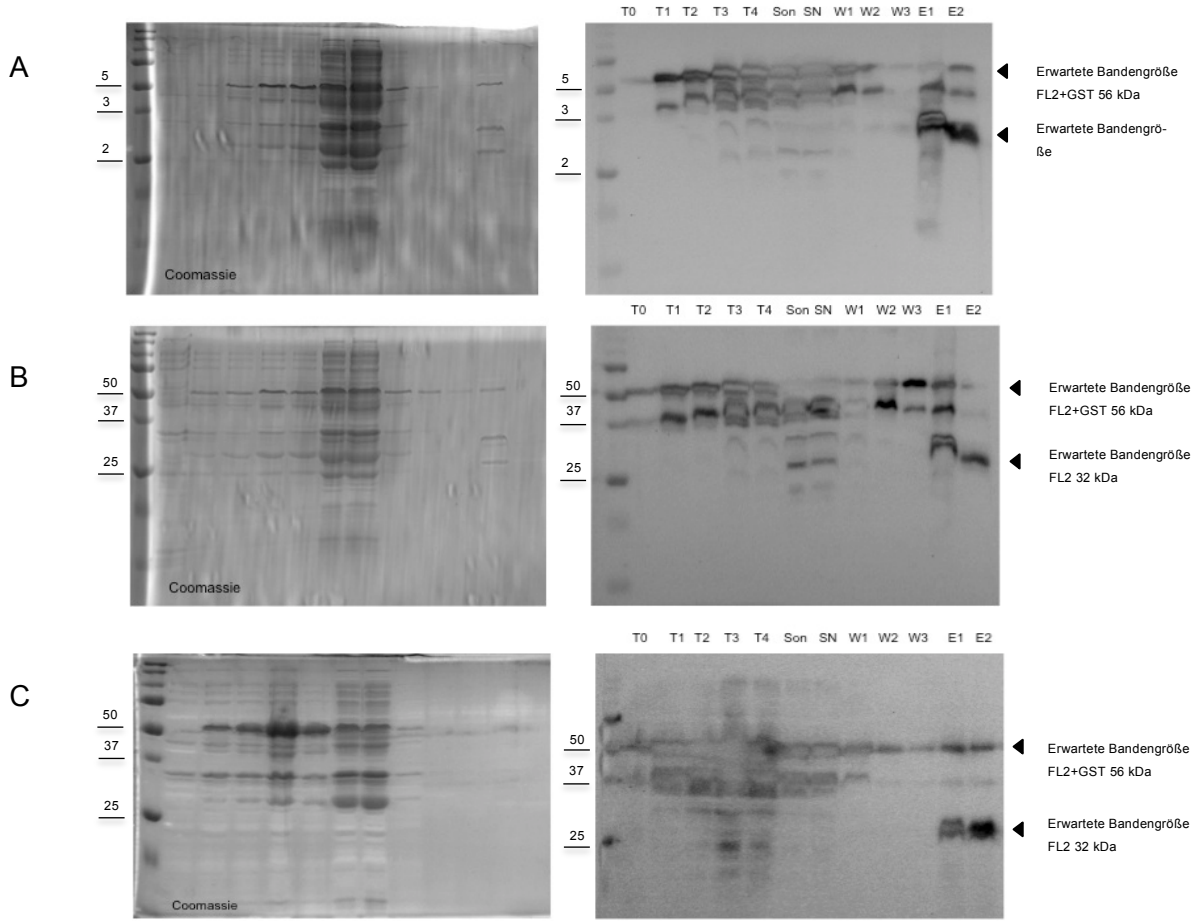


Abb. 27: Gelelektrophorese des durchgeführten Restriktions-Verdaus. A zeigt den Verdau der Plasmide pGex-5x-*FHL2*-WT und –c.512C>T nach Ligation in den genannten Zielvektor. B zeigt den Verdau des Plasmids pGex-5x-*FHL2*-c.530G>A sowie c.559G>T nach Ligation in den genannten Zielvektor.

5.5 Herstellung rekombinanter Proteine

Die Produktion der rekombinanten Proteine erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Zunächst wurde die Proteinkonzentration beider Eluate mittels Bradford-Methode gemessen. Im Anschluss führten wir Western Blots durch, um im Säulenmaterial möglicherweise „hängengebliebene“ produzierte Proteine nachweisbar zu machen. Hierfür wurden 15% Trenngele und Sammelgele gegossen, die Proben vorbereitet und die Gele für anfangs 10 min bei 80 V und dann bei 150 V in der Elektrophorese laufen gelassen. Anschließend wurden die SDS-Gele mit Coomassie gefärbt, ausgewertet und entfärbt.

Die Western Blot-Detektion wurde mit Anti-FHL2 und Anti-Maus Antikörpern durchgeführt. Die erwartete Bandengröße für das Protein bestehend aus FHL2 und GST war 56 kDa, nach Schneiden mit Faktor Xa wurde für FHL2 eine Bandengröße von 32 kDa erwartet. Die Ergebnisse für den WT zeigten ein während der verschiedenen Waschschritte schwächer werdendes Signal, die Mutanten zeigten hier stabile Signale. Das erwartete Endprodukt FHL2 mit der Bandengröße von 32 kDa war in den Eluaten insbesondere für die Mutanten nachweisbar, der WT zeigte diese Bande in E1 und E2 nur schwach (Abb. 28).



D

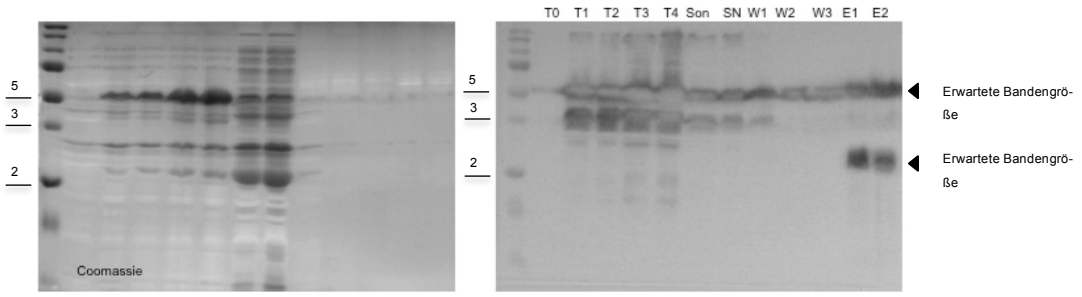


Abb. 28: Coomassie links und Western Blot auf Nitrozellulose rechts. Darstellung der verschiedenen Schritte der Produktion aller vier rekombinanten FHL2-Protein-Varianten. Coomassie mit 12% SDS-Gel. Die Abbildungen zeigen in folgender Reihenfolge A, FHL2-WT, B, FHL2-c.512C>T, C, FHL2-c.530G>A und D, FHL2-c.559G>T. T0: vor Induktion, T1-4: während der Induktion, Son: nach Sonifizierung, SN: nach Bindung am Säulenmaterial. W1-3: Waschschritte, E1+2: Elution 1 und 2. Erwartete Bandengröße: FHL2+GST 56 kDa.

Nach Durchführung der Western Blots führten wir Proteinmessungen nach Bradford durch. Da sich diese bei allen vier Varianten die Proteinkonzentration nach Säulenelution als negativ bzw. nicht messbar darstellte, wurden verschiedene Bedingungen ausprobiert, wie die Induktion bei 22 °C für 6 h, bei 18 °C über Nacht oder auch die Induktion mit 0,1 mM IPTG bei 18 °C über Nacht, anstelle der im Protokoll angegebenen 30 °C für 4 h und 1 mM IPTG. Doch auch in diesen wiederholt durchgeführten Untersuchungen ließ sich jeweils in den Bradford-Messungen kein Protein nachweisen. Auch erneut durchgeführte Sequenzierungen zum Ausschluss veränderter Aminosäure-Sequenzen des GST-*FHL2*-Vektors ergaben keine Unregelmäßigkeiten. Aus der Literatur wie auch durch Austausch mit kollaborierenden Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die Herstellung rekombinanter Proteine häufig aufgrund von Löslichkeitsproblemen misslingt (Kane und Hartley 1991).

In der Fehlersuche in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Friederike Cuello aus unserem Institut ergab sich der Vorschlag, ein von Prof. Cuello kloniertes *FHL2*-Plasmid zu verwenden, das neben dem GST am C-terminalen Ende auch Flag-markiert war. Ihre Erfahrungen mit diesem Plasmid waren, dass die Flag-Markierung die Löslichkeit verbessert, so dass in weiterführenden Experimenten die erneute Proteinproduktion mit diesem *FHL2*-Plasmid verfolgt werden soll, was allerdings nicht Teil dieser Doktorarbeit ist.

6 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Evaluation von *FHL2* hinsichtlich seiner Rolle als neues Krankheitsgen der HCM. Die zu dieser Hypothese führenden Überlegungen beruhten auf Hinweisen aus der Literatur, dass *FHL2* als Interaktionspartner großer Herzmuskelproteine wie Titin und strukturell bedeutenden Ansatzpunkten an I- und M-Banden des Sarkomers, als Interaktionspartner diverser metabolischer Enzyme und in Hypertrophie-Signalwegen wie dem Calcineurin-, ERK- und NFAT-Signalweg eine essentielle Rolle in der Entstehung kardialer Funktion und Hypertrophie spielt.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind folgende:

I. In einer Kohorte von HCM-Patienten konnten sechs *FHL2*-Varianten detektiert werden. Davon waren zwei *„missense“*-Mutationen (c.512C>T, Thr171Met; c.559G>T, Val187Leu), die bisher nicht beschrieben sind. Eine weitere *„missense“*-Mutation (c.530G>A, Arg177Gln) war als SNP berichtet worden, aber bisher nicht mit HCM assoziiert. Weiterhin konnten drei nicht mit HCM-assoziierte „silent“ SNPs (c.678C>T, Asn226Asn; c.804C>T, Asp268Asp; c.819C>T, Pro273Pro) identifiziert werden.
II. Der *FHL2*-WT und die drei *„missense“*-Mutationen (c.512C>T, c.530G>A und c.559G>T) konnten erfolgreich für AAV6-Überexpressionsexperimente kloniert werden.
III. Nach Transduktion und Überexpression der *FHL2*-Varianten in Maus-Kardiomyozyten und künstliches Herzgewebe aus Ratten-Kardiomyozyten ergaben sich keine Unterschiede im Proteinsignal und eine normale sarkomerische Integration.
IV. In Kontraktilitätsanalysen zeigte sich eine Hyperkontraktilität in c.512C>T-transduzierten EHTs im Vergleich zu WT-EHTs.

Diese Ergebnisse deuten an, dass FHL2 ein neues HCM-Krankheitsgen sein könnte. Während unsere Untersuchungen keinen Anhalt für eine verminderte Expression und damit eine mögliche verminderte antihypertrophe Funktion für die drei Varianten ergeben haben, deuten die Untersuchungen im künstlichen Herzgewebe daraufhin, dass die c.512C>T-Variante durch Induktion einer Hyperkontraktilität zum Krankheitsbild der HCM beitragen könnte.

6.1 *FHL2*-SNPs

Von den 6 gefundenen *FHL2*-Mutationen identifizierten wir drei, die zuvor schon beschrieben worden waren: c.678C>T, Asn226Asn, rs137869171; c.804C>T, p.Asp268Asp, rs3087523

und c.804C>T, p.Pro273Pro, rs11124029. Da sie außer in unserer auch schon in anderen Studien in gesunden Kontrollindividuen gefunden worden waren, ist anzunehmen, dass es sich hier wirklich um Polymorphismen handelt, die nicht mit HCM assoziiert sind. Neben diesen SNPs zeigten sich drei weitere Varianten (c.512C>T, c.530G>A und c.559G>T).

6.2 Bedeutung der *„missense“*-Mutationen hinsichtlich der Familiengeschichten

Die drei identifizierten *„missense“-FHL2*-Mutationen (c.512C>T, c.530G>A und c.559G>T) zeigten sich jeweils in Patienten mit HCM, bei denen bisher keine bekannten, zur HCM führenden Genmutationen nachgewiesen worden waren. Es ergab sich, dass alle Träger dieser *FHL2*-Mutationen eine HCM bzw. kardiale Hypertrophiezeichen zeigten und in keiner (Mutation c.512C>T), bzw. in einer (Mutation c.559G>T) oder in zwei (Mutation c.530G>A) Kontrollen der 262 Kontrollpersonen nachweisbar waren. Diese Varianten ließen sich als stabile Proteine in Kardiomyozyten exprimieren und zeigten eine korrekte sarkomerische Integration.

Variante I (c.512C>T) wurde in einer heterozygoten Indexpatientin nachgewiesen, die sich mit einer Septumhypertrophie und subaortaler Obstruktion präsentiert hatte. Klinisch bot die Patientin klassische Symptome einer Herzinsuffizienz gemäß NYHA II. Betrachtet man den Stammbaum der Patientin, zieht sich die Diagnose der HCM durch einen Großteil der Familie. Insbesondere der plötzliche Herztod des zunächst asymptomatischen zweiten Sohnes macht die Bedeutung der frühzeitigen Diagnosestellung und adäquaten Therapie der HCM deutlich. Die Konstellation, dass der für die *FHL2*-Mutation negativ getestete Ehemann der Indexpatientin ebenfalls an einer nachgewiesenen HCM leidet und das Ehepaar zwei gemeinsame, ebenfalls an HCM erkrankte Söhne hat, macht diese Familie für die genetische Grundlagenforschung der HCM-Forschung interessant.

Interessanterweise zeigten sich nach Transduktion in EHTs sowohl eine höhere Kraft als auch eine schnelle Kontraktionsgeschwindigkeit. Diese Hyperkontraktilität ist in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen für HCM-assoziierte *FHL1* und *ANKRD1*-Varianten (Friedrich, Wilding et al. 2012, Crocini, Arimura et al. 2013). Dies steht auch im Einklang mit einer erhöhten Ca^{2+}-Empfindlichkeit der Myofilamente mit verschiedenen Sarkomer-Gen-Mutationen in Human- oder Maus-Modellen der HCM (Morimoto, Yanaga et al. 1998, Kimura 2010, Fraysse, Weinberger et al. 2012, van Dijk, Paalberends et al. 2012) und ist mit einer

verbesserten Kontraktionsfunktion in nativem und künstlichem HCM Maus-Gewebe (Ahmad, Seidman et al. 2005, Cazorla, Szilagyi et al. 2006, Pohlmann, Kroger et al. 2007, Barefield and Sadayappan 2010, Stohr, Friedrich et al. 2013) verbunden. Hyperkontraktilität kann zu höherem linksventrikulären systolischen Druck führen, was häufig bei der menschlichen HCM beobachtet wird (Gersh, Maron et al. 2011).

Gegen Variante II (c.530G>A) als direkte Ursache für eine HCM gibt es mehrere Argumente. Erstens wurde sie (zuletzt als rs1131188481 klassifiziert) in 201/12805 Allelen (Häufigkeit 1,6%) im *NHLBI exome variant server* gefunden und durch Mutation Taster und PolyPhen-2 als gutartiger Polymorphismus klassifiziert. Zweitens wurde sie in einer Familie identifiziert, die zusätzlich eine *FHL1*-Mutation trägt (Friedrich, Wilding et al. 2012). Diese Tatsache macht es schwierig, den eindrücklichen Phänotypen des Patienten ausschließlich der *FHL2*-Mutation zuzuordnen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die *FHL2*-Variante zusätzlich zur *FHL1*-Mutation zu dem ausgeprägten Phänotypen beiträgt. Die *FHL1*-Mutation könnte ebenfalls den Phänotypen erklären oder wenigstens zur Erklärung beitragen. Der Indexpatient dieser Mutation stellte sich neben Symptomen der ausgeprägten Herzinsuffizienz mit muskulären und milden neuropathischen Symptomen vor. Die Diagnose der HCM ging mit dramatischen Konsequenzen in Form einer Herztransplantation im jungen Erwachsenenalter einher. Betrachtet man den Stammbaum des Patienten zeigt sich auch hier in der nahen Verwandtschaft, bei einem Bruder des Patienten, die gleiche Diagnose bei milderem Verlauf der Erkrankung. Auch bei der Mutter, die sich ebenfalls heterozygot für die beschriebene Mutation zeigte, wurde echokardiografisch eine HCM nachgewiesen. Interessant wäre zusätzlich ein genetisches Screenings der Tante, die grenzwertige echokardiografische Messungen zeigt. Schließlich beeinflusste die Expression von Variante II in EHTs nicht die Kontraktilität in EHTs.

Variante III (c.559G>T) zeigte sich heterozygot in einer Patientin, die sich mit septaler Hypertrophie vorgestellt hatte. Ihre Schwester und Mutter, beide ebenfalls heterozygot für diese Mutation, entwickelten bisher keinen Phänotyp. Interessanterweise sagten *in silico*-Analysen für die zweite und dritte Mutation benigne Konsequenzen mit einer Einstufung als Polymorphismus vorher, im Gegensatz zur Variante I, die mit 99% krankheitserregender Konsequenzen als pathogen eingestuft wurde. Variante III wurde nur in 1/262 Kontrollindividuen gefunden, aber nicht im *NHLBI exome variant server*. Allerdings zeigten sich, ähnlich wie bei Variante II, keine Störungen der Kontraktion nach Gentransfer in EHTs. Nichtsdestotrotz könnte

diese Variante trotzdem eine gestörte Funktion zeigen, was bisher in meinen Versuchsaufbauten noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Betrachtet man diese drei Familien mit unterschiedlichen Phänotypen von HCM-Erkrankungen und weitem Spektrum an gebotener Klinik, ist die Bedeutung der genetischen Untersuchung zur Risikoeinschätzung von HCM-Patienten nachvollziehbar. Insbesondere gilt dies auch für Familienmitglieder. Gehen bestimmte Mutationen mit einer erhöhten Inzidenz des plötzlichen Herztods einher, ergäben sich veränderte therapeutische Konsequenzen. In Abhängigkeit von den genetischen Untersuchungen und dem Nachweis bestimmter Genmutationen könnten Risikoabschätzungen vorgenommen werden und eine verbesserte individuelle Therapie initiiert werden. Betrachtet man die Familie, die die c.512C>T-Mutation trägt, stellt sich die Frage, ob der bereits verstorbene Sohn, der sich positiv für die *FHL2*-Mutation zeigte, von einer zügigen primärprophylaktischen ICD-Implantation profitiert hätte. Diese verbesserte individuelle Therapie könnte neben der allgemeinen Lebensstil-Änderung mit einer strengen medikamentösen prophylaktischen Therapie bei entsprechender Klinik einhergehen, ggf. auch mit der großzügigeren Indikationsstellung zur primärprophylaktischen ICD-Implantation.

6.3 Bedeutung der *„missense“*-Mutationen hinsichtlich der normalen *FHL2*-Funktion

Nur wenig ist über *FHL2* hinsichtlich seiner Beteiligung an der Kardiomyopathie-Entstehung bekannt. Bis dato wurde von Arimura et al. 2007 nur eine Mutation beschrieben, die mit DCM assoziiert ist. Die Frage, inwieweit eine Mutation im *FHL2*-Gen zur HCM und zur kardialen Dysfunktion führt, bleibt bislang unbeantwortet. Eine von uns postulierte Hypothese beruht auf der Annahme, dass die „normale“ Funktion des FHL2-Proteins durch Mutation und sich anschließendes verändertes Spleißen und Proteindomänenverlust gestört ist. Betrachtet man die verschiedenen *FHL2*-Mutationen bezüglich dieser Überlegungen, ergeben sich folgende Ergebnisse: Laut bioinformatischer Analyse könnte Variante I (c.512C>T) durch verändertes Spleißen des resultierenden FHL2-Proteins zu einem veränderten und verkürzten Protein führen. Diese strukturellen Veränderungen würden insbesondere die wichtigen LIM-Domänen 3 und 4 betreffen, welche als Interaktions-Region für andere Proteine bedeutsam sind. Es ist davon auszugehen, dass speziell dieser DNA-Bereich einem hohen Selektionsdruck unterlegen ist, da sich diese in Sequenz-Analysen in allen Spezies als hochkonserviert zeigte. Veränderungen des Proteins in dieser Region würde unserer Vermutung

nach die Bindungsfähigkeit von FHL2 als Interaktionspartner für diverse Proteine deutlich einschränken (Johannessen, Moller et al. 2006). Das zugehörige, mutierte FHL2-Protein zeigte in unseren Experimenten eine normale stabile Integration ins Sarkomer. Für Variante II (c.530G>A) gilt bei ebenfalls stabiler Integration ins Sarkomer genauso der Verdacht auf ein verändertes Spleißen des FHL2-Proteins und ggf. eine Strukturveränderung, denn für diese Mutation ergäbe sich auch eine Beeinträchtigung der LIM-Domänen 3 und 4 des FHL2-Proteins. Auch die dritte Variante (c.559G>T) zeigte eine stabile Integration ins Sarkomer. Durch diese Mutation könnte es ebenfalls zu einem Verlust der dritten und vierten LIM-Domäne kommen.

Zu erwähnen ist, dass mithilfe der Verfahren, die im Rahmen dieser Doktorarbeit angewendet wurden (Sequenzierung des kodierenden Genbereichs von genomischer DNA, Klonierung der Varianten mit cDNA), mögliche Effekte durch verändertes Spleißen nicht analysierbar waren. Dass das Spleißen als grundlegender Mechanismus der Genregulation durch Defekte auch zur HCM führen können, ist bekannt und beispielweise für *MYBPC3*-Mutationen beschrieben (Carrier et al. 2012). Es wurden zwei *MYBPC3-missense*-Mutationen des menschlichen Herzmuskels verglichen, wovon die erste für ein *missense*-Protein kodiert und das letzte Nukleotid des Exons 17 betrifft, und die zweite Mutation ebenfalls für ein *missense*-Protein kodiert und in der Mitte dieses Exons lokalisiert ist. Es zeigten sich in der RT-PCR-Analyse für die erste Variante zwei Produkte, nämlich neben der *missense*-mRNA zusätzlich eine kleine Menge an mRNA mit *geskipptem* Exon 17, und für die zweite Variante nur der Nachweis eines Produktes ohne Nachweis eines *exon-skipping*. Somit muss davon ausgegangen werden, dass beim Screening auf cDNA-Ebene Mutationen „übersehen“ werden können, die den Spleiß-Mechanismus beeinflussen können. Zusammengefasst kann man also sagen, dass die Analyse von FHL2 auf kardialer mRNA-Ebene und weiterführender RT-PCR-Analyse von großem Interesse bezüglich der Entdeckung von veränderten Spleiß-Sequenzen sein könnte (Carrier et al. 2012).

Laut bioinformatischer Analyse könnten also die von uns beschriebenen drei Mutationen mit einem Verlust bedeutender LIM-Domänen einhergehen. Dies spricht somit für die Hypothese des „Verlustes der normalen FHL2-Protein-Funktion“. Dies hätte weitreichende Konsequenzen für die native Funktion von FHL2 als Interaktionspartner im Sarkomer, was im Nachfolgenden erläutert wird.

6.3.1 *FHL2* als antihypertropher Faktor

Die Bedeutung von *FHL2* hinsichtlich kardialer Hypertrophie wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Es bestätigte sich wiederholt die Tatsache, dass *Fhl2-KO*-Mäuse basal keinen auffälligen kardialen Phänotypen zeigen. Auch akute Druckzunahme zeigte keine Veränderung hinsichtlich bekannter hypertropher Signalkaskaden. Im Gegensatz dazu führte die chronische Isoprenalin-Applikation zu einer ausgeprägteren kardialen Hypertrophie bei erhöhten ANP-Spiegeln (Chu, Bardwell et al. 2000, Kong, Shelton et al. 2001). Diese Gegebenheiten sprechen dafür, dass vor allem die Art und Dauer der Stimulation ausschlaggebend für die Hypertrophie-Entwicklung ist.

Dass FHL2 ein essentielles kardiales Protein darstellt und insbesondere in Hypertrophie-Kaskaden eine wichtige Position einnimmt, wurde schon mehrfach postuliert (Purcell, Darwis et al. 2004, Hojayev, Rothermel et al. 2012, Okamoto, Li et al. 2013). Als Interaktionspartner verschiedener Proteine ist besonders die regulierende Stellung in den bedeutenden zwei Kaskaden der Hypertrophie, den Calcineurin- und ERK2-Signalwegen, interessant.

So veröffentlichten unlängst Hojayev et al. den Nachweis, dass FHL2 eine Ko-Lokalisation mit Calcineurin aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass in *Fhl2-KO*-Mäusen der Calcineurin/NFAT-Signalpfad der Hypertrophie aktiviert ist. Des weiteren zeigten sich in Isoprenalin-behandelten *Fhl2-KO*-Mäusen eine Hochregulation der *Rcan1.4*- und *BNP*-Transkripte, die direkte Ziele vom NFAT-Signalweg darstellen. Beim siRNA-vermittelten *knockdown* von *FHL2* konnte eine vermehrte Aktivierung von *Rcan1.4*-Promotoren durch Calcineurin und Ionomycin induziert werden. Diese Aktivierung konnte durch Ciclosporin-vermittelte Calcineurin-Inhibition unterdrückt werden. Auf der anderen Seite konnte durch *FHL2*-Überexpression eine verminderte Aktivierung des *Rcan1.4*-Promoters erzielt werden. Dieses führte nach konsekutiver Aktivierung von Calcineurin zu einem verminderten hypertrophen Wachstum in Kardiomyozyten. Diese Interaktionen wurden unter Konditionen mit Calcineurin-Inaktivierung nicht beschrieben (Hojayev, Rothermel et al. 2012). Bezüglich der ERK-Signalwege konnten Purcell et al. belegen, dass *FHL2* eine geringe Affinität für unphosphoryliertes, inaktives ERK und eine hohe Affinität für phosphoryliertes und damit aktives *ERK* aufweist (Purcell, Darwis et al. 2004). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass *FHL2* eine hemmende Rolle auf eine durch β-adrenerge Stimulation induzierte Hypertrophie-Entwicklung hat und die Aktivierung von NFAT-Zielgenen durch Calcineurin-Interaktion inhibiert. Bezüglich der Interaktion der in unserer Studie detektierten FHL2-Varianten mit Calcineurin könnten in Zukunft Ko-Immunopräzipitations-Experimente für FHL2 und Calcineurin

durchgeführt werden. Hierbei wären Unterschiede im Bindungs- und somit vielleicht auch Inhibierungsverhalten der Mutanten im Vergleich zum WT interessant.

Der Effekt von ROCK (*Rho-associated coiled-coil containing kinases*) im Hinblick auf die Interaktion mit *FHL2* als „Hypertrophie-Hemmer“ wurden von Okamoto et al. evaluiert (Okamoto, Li et al. 2013). In *ROCK2*-defizienten Mäusen zeigten sich eine *Fhl2*-Hochregulation mit anschließender Hemmung von SRF und ERK und eine geringere kardiale Hypertrophie als Antwort auf Angiotensin II- und TAC-Stimulation. Nach *knockdown* oder Deletion von *Fhl2* in *ROCK2*-defizienten Mäusen ergab sich interessanterweise ein entgegengesetzter Effekt. Die Autoren vermuten, dass die basale Herzwanddicke und die Größe durch *Fhl2* nicht beeinflusst werden, wohingegen physiologische oder pathophysiologische kardiale Hypertrophie-aktivierende Signal-Wege, wie ERF und ERK, durch *FHL2*-Hochregulation blockiert werden, was somit auch mit den Ergebnissen von Hojayev et al. (Hojayev, Rothermel et al. 2012) einhergeht.

Betrachtet man die bislang publizierten Daten, könnte man vermuten, dass *FHL2*-Mutationen einen Einfluss auf die antihypertrophe Wirkung des Proteins haben könnten. Diese könnte über die verminderte Interaktion mit Calcineurin und ERK vermittelt werden und mit einer reduzierten Hemmung der Hypertrophie-Signalkaskaden-Aktivierung einhergehen. Diese Tatsache könnte bei gleichzeitiger Aktivierung und dann Überwiegen von pro-Hypertrophie-Faktoren in einen HCM-Phänotyp münden. Versuche in diese Richtung laufen zurzeit.

Inwieweit sich Kraft und Kontraktilität nach akuter oder chronischer Hypertrophie-Stimulation bei Expression einer *FHL2*-Mutante entwickeln, bleibt zu evaluieren. Es hatte sich in vorigen Studien gezeigt, dass EHTs durch chronische Phenylephrin-Stimulation bezüglich ihrer Kraftentwicklung, der Verkürzungsfraktion, sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit behindert werden (Hirt, Sorensen et al. 2012). c.512C>T-transduzierte EHTs zeigten schon ohne Stimulation eine höhere Kontraktilität als die WT-EHTs. Für die anderen *FHL2*-Mutanten zeigten sich bezüglich der Kontraktilitätsentwicklung keine Unterschiede.

6.3.2 Interaktion zwischen FHL2 und Titin

Die Interaktion zwischen Titin und FHL2 wurde mehrfach beschrieben (Linke, Rudy et al. 1999, Lange, Auerbach et al. 2002, LeWinter, Wu et al. 2007). Insbesondere die N2B-Domäne des Titins, mit der FHL2 interagiert, ist interessant. Diese Domäne trägt mit ihrem hohen Anteil an elastischen Fasern einen enormen Beitrag zur passiven Spannung der Myo-

fibrillen bei. Radke et al. veröffentlichten, dass die gezielte Deletion der Titin-N2B-Region zur diastolischen Dysfunktion und kardialen Atrophie mit einer gleichzeitigen Reduktion von FHL2-Proteinen in Mäusen führt (Radke, Peng et al. 2007). In *N2b-KO*-Mäusen fehlen die I-Bande-Bindungsseiten für FHL2-Signalkomplexe und somit die Basis für den Proteinkomplex. Eine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Rolle von Titin in Hypertrophie-Signalwegen. Nach Deletion eines anderen elastischen Elements des Titins, der PEVK-Region, zeigten sich in *Pevk-KO*-Mäusen eine kardiale Hypertrophie und diastolische Dysfunktion bei gleichzeitiger Hochregulation von *FHL2* und *FHL1* auf Gen- sowie Proteinebene (Radke, Peng et al. 2007). Die Autoren erklärten sich diese Ergebnisse durch vermehrte Belastung der N2B-Region in *Pevk-KO*-Mäusen bei verminderter diastolischer Dehnbarkeit. Laut ihrer Hypothese könnte diese vermehrte Belastbarkeit zu strukturellen Änderungen in der N2B-Region mit anschließender vermehrter FHL-Proteinbindung führen. Diese Proteinbindung könnte zu Hypertrophie-induzierenden Signalkomplexen führen. Es ist davon auszugehen, dass dies für FHL1 zutrifft, da sich in Studien zeigte, dass *FHL1* mit HCM assoziiert ist und für die Induktion von Hypertrophie verantwortlich ist (Friedrich, Wilding et al. 2012). Für *FHL2* spricht jedoch die Hochregulation zur Kompensation, um die Hypertrophie im PEVK-KO-Mausmodell zu inhibieren.

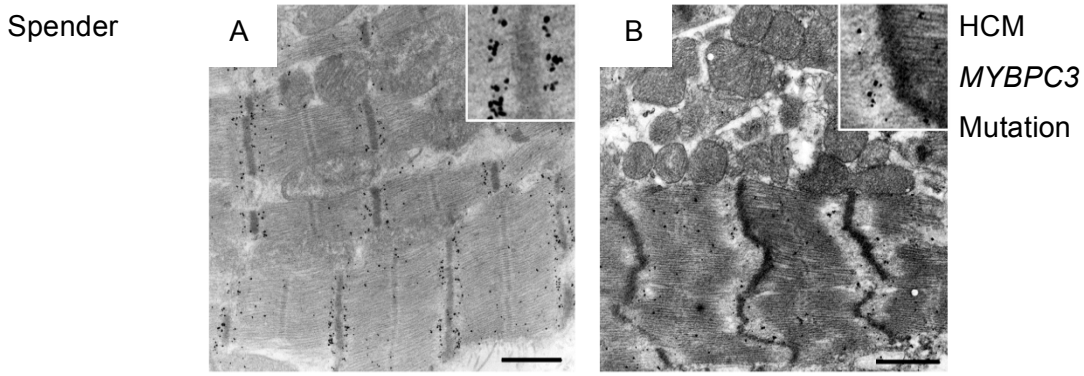
Es wurde berichtet, dass die Interaktion zwischen Titin, FHL2 und verschiedenen Enzymen der Sicherstellung einer hohen Konzentration an metabolischen Enzymen dient, die für den Energiebedarf der Herzaktion benötigt werden. Diese Enzyme, die Muskel-Isoform der Kreatinkinase (MM-CK), die Adenylylzyklase und die Phosphofruktokinase, sollen direkt an FHL2, das hier als Adaptorprotein dient, binden. FHL2 bindet an zwei Seiten des Titins, zum einen an der N2B-Region und zum anderen abgeschwächter an der is2-Region der M-Bande des Titins. Diese Annahme wurde mit Antikörper-Versuchen gegen FHL2 und verschiedene Epitope des Titins unterstützt, wo sich eine deutliche Querstreifung des Sarkomers zeigte (Lange, 2002).

Um die Interaktion zwischen FHL2 und Titin im Detail zu betrachten, wollten wir in bestimmten Untersuchungen das Bindungsverhalten der FHL2-Mutanten an Titin untersuchen. Hierfür war die Produktion von rekombinanten Proteinen der FHL2-Varianten notwendig. Wir interessierten uns insbesondere für die Darstellung des möglicherweise veränderten Interaktionsverhaltens und struktureller Unterschiede zwischen den verschiedenen FHL2-Varianten. Letztendlich stellte sich dies jedoch schwieriger als geplant dar. Es gelang uns nicht, die Proteine herzustellen, so dass im Rahmen dieser Doktorarbeit die Produktion der rekombinan-

ten Proteine nicht erfolgreich beendet werden konnte. Der geplante Titin-Bindungs-Essay ist damit bislang ausstehend, wäre für die weitere Zukunft jedoch von Bedeutung. Anstelle dessen führte Dr. Andreas Unger in Kollaboration mit unserer Arbeitsgruppe Immuno-Gold-Färbungen zur FHL2-Lokalisation in kardialen Myofibrillen durch.

6.3.3 FHL2-Lokalisation in kardialen Myofibrillen

Grundlage dieser Analyse waren die Berichte von *FHL2*-Dysregulation in DCM und Herzinsuffizienz (Matsumoto, Hayashi et al. 2005). Die vergleichenden Immuno-Gold-Färbungen zur FHL2-Lokalisation wurden in kardialen Myofibrillen durchgeführt. Als Gewebe diente humanes Ventrikelmyokard eines vitalen Spenderherzens (Abb. 29 A), eines Patienten mit Aortenklappenstenose (Abb. 29 C), eines HCM-Patienten mit *MYBPC3*-Mutation (Abb. 29 B) und eines HCM-Patienten mit einer Ausflusstrakt-Obstruktion (HOCM) bei zugrunde liegender *MYBPC3*-Mutation (Abb. 29 D). Außerdem wurde kardiales Gewebe einer HCM-Maus (KI, Abb. 29 E) sowie ihrer WT-Kontrollgruppe (Abb. 29 F) verwendet. Diese HCM-Mauslinie ist eine etablierte *Mybpc3 knock-in*-Mauslinie (*Mybpc3*-KI). In diese ist in *Mybpc3* eine der häufigsten mit HCM assoziierten Mutationen des Menschen gezielt eingeführt worden. Diese Punktmutation ist beim Menschen mit einem schweren Phänotyp und einer schlechten Prognose assoziiert ist (Vignier, Schlossarek et al. 2009, Fraysse, Weinberger et al. 2012).



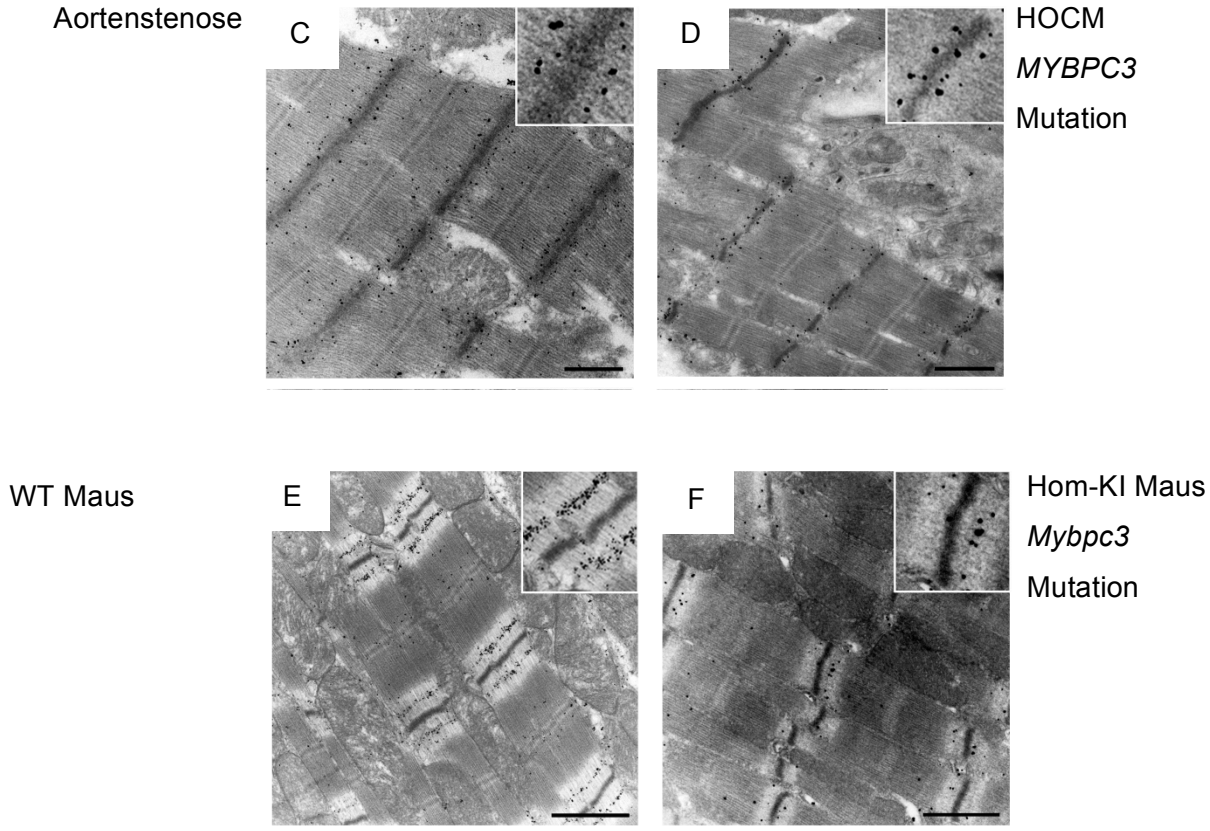


Abb. 29: Immunogold-Markierung von FHL2 im Myokard. A, menschliches Spenderherz, B, HCM-Patient mit *MYBPC3*-Mutation, C, Patient mit Aortenstenose, D, HOCM-Patient mit *MYBPC3*-Mutation, E, WT-Maus, F, *Mybpc3*-KI-Maus. Maßstableiste entspricht 1µm.

Die Analyse der Gewebe ergab, dass sich alle Myofibrillen immunopositiv für den FHL2-Antikörper zeigten. Weiterhin zeigte sich in den Immunogold-Färbungen die höchste FHL2-Dichte an der N-Linie in der Mitte der I-Bande des Sarkomers, was impliziert, dass das Gros des zytosolischen FHL2 mit der Federregion des Titins verbunden ist. Diese Tatsache konnte insbesondere bei der Darstellung des kardialen Sarkomers in höherer Auflösung (Kästchen der rechten oberen Ecken, 7) deutlich gemacht werden. Diese Lokalisation ergab sich für jede der untersuchten Myokardproben. Im humanen Spendermyokard und in WT-Mäusen (Abb. 29 A und E) zeigten sich in den Analysen grundsätzlich die höchste Intensität der Immunfärbung und auch hier insbesondere an der I-Bande. Das Zytosol vom menschlichen Spender zeigt eine deutlich vermehrte Dichte des Reaktionsprodukts im Vergleich zum Gewebe von HCM-Patienten (Abb. 29 B). Die Färbungen der HCM- und HOCM-Gewebeproben zeigten ein ähnliches FHL2-Signal. Grundsätzlich lässt sich zusammenfassen, dass die Analyse der pathologischen Gewebeproben der HCM-Patienten und der HCM-Maus eine deutli-

che Intensitätsminderung der Goldpartikel-Färbung im Vergleich mit dem humanen Spendergewebe bzw. der WT-Maus ergab.

Dass die sarkomerische FHL2-Protein-Lokalisation in HCM-Gewebe verändert war, zeigte sich insbesondere durch die verminderte Bindung an der I-Bande. Ähnliche Ergebnisse präsentierten auch Bovill et al. an humanen Herzinsuffizienz-Proben, wo sich FHL2 ebenfalls reduziert zeigte. Ob diese Herunterregulierung von FHL2 in HCM und Herzinsuffizienz jedoch ein Begleitphänomen ist oder ob dieselben Mechanismen, die zu Hypertrophie und anschließender Herzinsuffizienz führen, auch für die beobachtete Herunterregulation von FHL2 verantwortlich sind, bleibt unklar und noch zu evaluieren. Die geringere *FHL2*-Expression und sarkomerische Lokalisation würden auch einem geringeren Einfluss auf die oben beschriebenen Kaskaden bedeuten, was den HCM-Phänotyp noch verstärken könnte.

7 Zusammenfassung

Das *four-and-a-half-LIM*-Protein 2 (FHL2) spielt als bedeutender Interaktionspartner kardialer Proteine wie Titin, als strukturell wichtiger Ansatzpunkt an den I- und M-Banden des Sarkomers und als Interaktionspartner metabolischer Enzyme von bedeutenden Hypertrophie-Signalwegen wie den Calcineurin-, und ERK-Signalpfaden eine wichtige Rolle. Vorangehende Studien zeigten, dass FHL2 antihypertrophe Eigenschaften besitzt und dass es bei *FHL2*-Defizienz unter chronischen Stress-Bedingungen zu einer ausgeprägteren Hypertrophie-Entwicklung kommt.

Wir stellten daher die Hypothese auf, dass Mutationen im *FHL2*-Gen zu Veränderungen der normalen FHL2-Eigenschaften führen, wodurch es zur Entwicklung einer HCM kommen könnte. Dazu untersuchten wir ein HCM-Patientenkollektiv mit bisher nicht identifizierten Krankheitsgenen auf Mutationen im *FHL2*-Gen. Neben drei berichteten *„silent"*-SNPs (c.678C>T, N226N, rs137869171; c.804C>T, D268D, rs3087523; c.819C>T, P273P, rs11124029), und einem *„missense"*-SNP (c.530G>A, R177Q), konnten wir zwei neue „*missense*"-Mutationen (c.512C>T, T171M; c.559G>T, V187L) identifizieren. Zur Evaluation dieser Ergebnisse erfolgte die Produktion von AAV6, die für die drei „*missense*"-Mutationen des *FHL2* kodieren. In transduzierten NMCMs wie auch im 3D-Modell des EHTs zeigte jede Mutation eine stabile Integration ins kardiale Sarkomer. In funktionellen Untersuchungen an transduzierten EHTs ergaben sich normale basale Kraft- und Kontraktilitätsparameter für c.530G>A- und c.559G>T -transduzierte EHTs, während c.512C>T-transduzierte EHTs eine Hyperkontraktilität im Vergleich zu WT-EHTs zeigten. Zur weitergehenden Beschreibung und Etablierung von *FHL2* als Krankheitsgen der HCM sollten Stimulationsversuche mit akutem und chronischem Stress sowohl im 2D- wie auch 3D-Modell und die anschließende Analyse des fetalen Genprogrammes, die Evaluation der Regulation der verschiedenen Hypertrophie-Kaskaden sowie Kontraktilitätsanalysen durchgeführt werden. Auch die Interaktion der verschiedenen FHL2-Varianten mit anderen kardialen Strukturproteinen wie Titin könnte weitere Rückschlüsse über deren Pathogenität zugelassen. Leider missglückte die Produktion rekombinanter Proteine, der geplante Titin-Bindungs-Essay ist für die Zukunft jedoch weiterhin geplant. Immuno-Gold-Färbungen in kardialen Myofibrillen konnten einen geringeren FHL2-Protein-Gehalt im HCM-Gewebe von Patienten nachweisen, was die Hypothese unterstützt, dass die FHL2 Expression negativ mit einer HCM assoziiert ist.

Falls weiterführende Ergebnisse die Hypothese bestätigen, dass Mutationen im *FHL2*-Gen zu Hypertrophie-Entwicklung und Störungen der Kontraktilität im Myokard führen und zur Entwicklung einer HCM beitragen könnten, sollte die systematische Suche nach *FHL2*-Mutationen insbesondere für HCM-Patienten erwogen werden, für die bislang keine Mutation in den bereits etablierten Krankheitsgenen gefunden wurde.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mikroskopischer und makroskopischer Vergleich eines normalen Herzens (links) und eines mit hypertropher Kardiomyopathie (rechts). Deutlich werden beim Herz mit Hypertropher Kardiomyopathie vor allem die interventrikuläre Septumhypertrophie und das verkleinerte Ventrikellumen. Abbildungen modifiziert von der Webseite der Mayokliniken und Geisterfe-Lawrence et al. 1990. 14

Abb. 2: Der Pathomechanismus der HCM. Verminderte Dehnbarkeit des LV durch vermehrte Muskelmasse, verringertes Volumen und pathologische Myokardsteifigkeit. Verminderte diastolische Relaxation des linken Ventrikels durch erhöhten Kontraktionswiderstand, verminderte Koronar- und linksventrikuläre Füllung. Häufig begleitend Mitralinsuffizienz, linksventrikulären Asymmetrie und biochemische Prozesse. Grafik adaptiert nach Doerr, Seifert et al., 2000. 17

Abb. 3: Schemadarstellung *FHL2*. Exons sind nummeriert. Kodierende Regionen sind als schwarze, nichtkodierende Regionen sind als graue Kästchen dargestellt. ATG markiert das Startcodon der Translation, TGA das Stopcodon. 21

Abb. 4: Aufbau des Sarkomers und Interaktion der Hauptbestandteile. Neben Aktin und Myosin spielt auch das Strukturprotein Titin eine wichtige Rolle im Zusammenspiel der M- und Z-Scheibe. Frei adaptiert aus Physiologie, Klinke, Pape, Kurtz, Silbernagl, Thieme. 22

Abb. 5: Immunfluoreszenz an adulten Kardiomyozyten von WT-Mäusen. Linkes Bild IF mit α-Aktinin-Primärantikörpern und Sekundärantikörper Alexa488, mittleres Bild mit FHL2-Antikörpern und Sekundärantikörper Cy3, sowie rechts beide übereinandergelegt. Es zeigt sich eine deutliche Ko-Lokalisation beider Proteine. Nicht-publizierte Daten der AG Carrier. 22

Abb. 6: h*FHL2* cDNA für die Produktion rekombinanter Proteine (A) und für die AAV6-Produktion (B) mit Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme. Aus humaner, kardialer cDNA eines gesunden Spenderherzens wurde mittels Linker-PCR mit den Primern 5'-CACC-BamHI-ATG und 3`-SmaI die h*FHL2*-cDNA mit den BamHI- und SmaI-Schnittstellen bzw. mit den Primern 5'-CACC-BamHI-Kozak-ATG-Flag2 und 3'- BsaBI-*FHL2* die h*FHL2*-cDNA mit den BsaBI- und BamHI-Schnittstellen amplifiziert. *hFHL2*: humanes *FHL2*, BamHI, SmaI,

BamHI und BsaBI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme, Flag-Tag: Flag-Sequenz, Kozak: Kozak-Sequenz. 31

Abb. 7: Der Transport-Vektor pEF5-TOPO. Abbildung aus der Anleitung *pEF5-TOPO Expression Kit* der Firma Invitrogen. 35

Abb. 8: Der Vektor dsAAV-CMVenh-MLC260-EGFP. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wird EGFP ausgeschnitten und der Vektor linearisiert. 5'ITR: inverse terminale Repetitionen am 5' Ende; CMVenhancer: Verstärker des CMV-Promoters; MLC260: Regulator der Transkription; CMV-MLC260 for: Sequenz für Vorwärts-Sequenzierungsprimer; EGFP: *enhanced green flourescent protein;* BamHI und XbaI: Schnittstellen für Restriktionsenzyme. 45

Abb. 9: Darstellung der gefundenen *FHL2*-Mutationen. Die obere Abbildung zeigt die betroffenen Codons und Aminosäuren der oben beschriebenen Mutationen I-III. Angegeben sind die Lokalisation der Aminosäure und die Nukleotidposition. Zusätzlich sind die vier organischen Nukleotidbasen ausgezählt. a) zeigt die Mutation c.512C>T, p.Thr171Met, b) zeigt die Mutation c.530G>A, p.Arg177Gln und c) zeigt die Mutation c.559G>T, p. Val187Leu. Die Mutationsträger sind nicht miteinander verwandt. Die untere Abbildung zeigt die gefundenen drei *FHL2*-Polymorphismen. a) zeigt den Polymorphismus c.678C>T, p. Asn226Asn in Exon 7. b) zeigt den Polymorphismus c.804C>T, p.Asp268Asp in Exon 8. c) zeigt den Polymorphismus c.819C>T, p.Pro273Pro in Exon 8. 62

Abb. 10: Schematische Darstellung der strukturellen Anordnung des FHL2-Proteins. A, dargestellt sind die drei gefundenen *„missense"*-Mutationen und deren Lokalisation im *FHL2*-Gen bezüglich der LIM-Domänen. B zeigt sich die Mutations-Lokalisation in Bezug auf das *FHL2*-Genom. Die Kästchen und Zahlen markieren die 8 Exons des *FHL2*. Die Exons 1-3 sind nicht kodierend, Exon 4 bis 8 kodieren, in diesen befinden sich die 6 verschiedenen *FHL2*-Mutationen. Die Pfeile zeigen die Lokalisation der jeweiligen Mutationen in den betroffenen Exons an. ATG = Startcodon, TGA = Stopcodon. 63

Abb. 11: Stammbäume der in 5.1 beschriebenen Familien. Die *FHL2*-Mutationen zeigten sich in 3 nicht-verwandten Familien aus Spanien, Frankreich und Deutschland. A, Stammbaum der Familie F-003-0036 der Mutation c.512C>T, T171M, B, Stammbaum der Familie F-19949 der Mutation c.530G>A, R177Q und C, Stammbaum der Familie F-20198 der Mutation c.559G>T, V187L. Die römischen Zahlen symbolisieren die Generationen, die arabischen Nummern zählen die Individuen in einer Generation auf. Männliche Individuen sind als Kästchen, die Frauen als Kreise symbolisiert. Individuen mit HCM sind schwarz markiert,

nicht-betroffene Individuen sind nicht markiert, Individuen mit intermediärem Phänotyp sind grau markiert. Verstorbene Individuen sind mit einer Diagonalen gekennzeichnet, die Indexpatienten mit einem Pfeil. Individuen, die die jeweilige Mutation tragen sind mit (+), Individuen, bei denen die Mutation ausgeschlossen wurde, sind mit (-) gekennzeichnet. Individuen, die nicht genotypisiert wurden, sind nicht markiert. 66

Abb. 12: Vektor pEF5-Topo mit Flag2-*FHL2*-WT-cDNA links. A zeigt das für die Virusherstellung benötigte Vektor-Insert-Konstrukt. B zeigt das für die Proteinherstellung benötigte Vektor-Insert-Konstrukt. h*FHL2*: humanes *FHL2*; Flag Tag: Flag Tag-Sequenz; Kozak: Kozak-Sequenz; BamHI und SmaI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme. 67

Abb. 13: Vektorkarten. A zeigt den TOPO-Vektor mit dem Insert Flag2-h*FHL2* der drei Mutanten für die Virusproduktion links. B zeigt den TOPO-Vektor mit den gewünschten Mutationen im Inserts für die Proteinherstellung. h*FHL2*: humanes *FHL2*; Flag Tag: Flag Tag-Sequenz; Kozak: Kozak-Sequenz; BamHI, BsaBI und SmaI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme. 68

Abb. 14: Gelelektrophorese der *FHL2*-Klonierungen. A, Gelelektrophorese mit erwarteter *FHL2*-Bande nach PCR mit kardialer cDNA eines „non-failing“ (nf), gesunden Spenderherzens, sowie Wasserkontrolle. B, Verdau des Plasmids pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT mit BamHI und BsaBI nach Ligation in den Arbeitsvektor pEF5-TOPO. C, Kontrollverdau von pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-c.512C>T nach Mutagenese-PCR und anschließender Ligation in den genannten Arbeitsvektor. D, Kontrollverdau von pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-c.530G>A und -c.559G>T nach Mutagenese-PCR und Ligation in den o.g. Arbeitsvektor. .. 69

Abb. 15: Zielvektoren für die AAV6-Produktion *FHL2*-Varianten. A, der ligierte Vektor dsAAV-CMVenh-MLC260 mit dem gewünschten Insert Flag2-h*FHL2* des WTs (A), sowie der drei Mutanten (B). CMVenhancer: Verstärker des CMV-Promoters; MLC260: Regulator der Transkription, h*FHL2*: humanes *FHL2*; Flag Tag: Flag Tag-Sequenz; Kozak: Kozak-Sequenz; BamHI und BsaBI: Schnittstellen für Restriktionsenzyme. 69

Abb. 16: Gelelektrophorese nach Restriktions-Verdau. A zeigt den Verdau des Plasmids pdsAAV-CMV-MLC260-Flag2-*FHL2*-WT nach Ligation in den genannten Zielvektor. B zeigt den Verdau des Plasmids pdsAAV-CMV-MLC260-Flag2-*FHL2*-c.512C>T nach Ligation in den genannten Zielvektor. C zeigt den Kontrollverdau von Plasmid pdsAAV-CMV-MLC260-Flag2-*FHL2*-c.530G>A sowie -c.559G>T nach Ligation in genannten Zielvektor. 70

Abb. 17: Proteinsignale der FHL2-Varianten WT und c.512C>T nach 48h bzw. 72h Transduktion von Mauskardiomyozyten. Kardiomyozyten wurden aus neugeborenen Mäusen

isoliert und mit AAV6, die FLAG-markiertes WT-FHL2 oder HCM-assoziierte Mutanten kodieren, mit verschiedenen aufgeführten MOIs transduziert und für 48h (A) und 72h (B) kultiviert. Western Blot gefärbt mit dem FLAG-Antikörper, sowie mit Calsequestrin-Antikörper zur Kontrolle, der FLAG-FHL2-WT oder –c.512C>T detektiert. Ponceaufärbung jeweils rechts, als Ladekontrolle. Der Molekulargewichtsmarker ist angezeigt. 71

Abb. 18: Proteinsignale der genannten vier FHL2-Varianten nach Transduktion von Mauskardiomyozyten. Kardiomyozyten wurden aus neugeborenen Mäusen isoliert und mit AAV6 (MOI 30 000), die FLAG-markiertes WT-FHL2 oder HCM-assoziierte Mutanten kodieren, transduziert und für 96h kultiviert. A, repräsentativer Western Blot gefärbt mit dem FLAG-Antikörper, der FLAG-FHL2-WT oder -Mutanten detektiert sowie B, der Ponceaufärbung als Ladekontrolle. Der Molekulargewichtsmarker ist angezeigt. C, Proteinsignal der FHL2-Varianten genormt zur Proteinfärbung durch Ponceau und relativiert zum WT-Signal. Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler (n = 6-8). Varianzanalyse (*one-way* ANOVA) mit Dunnett's Post-Test im Vergleich zum WT. 72

Abb. 19: Zelluläre Lokalisation von nativem FHL2. A zeigt die Ko-Anfärbung des nativen Fhl2 mit cMyBP-C in NMCM, B zeigt die Ko-Anfärbung mit α-Aktinin in AMVMs. Maßstabsleiste entspricht 10 µM. 73

Abb. 20: Sarkomerische Lokalisation von FHL2-WT und -Mutanten nach Transduktion von NMCM. Aufgeführt sind jeweils die Immunfluoreszenz mit Flag-markiertem FHL2, mit cMyBP-C, beide Bilder übereinander gelegt sowie eine Vergrößerung. Maßstableiste entspricht 10 µm. Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt von Dr. Felix Friedrich vom Institut für Experimentelle Pharmakologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. 74

Abb. 21: Sarkomerische Lokalisation von FHL2-WT und -Mutanten nach Transduktion von NMCM. Aufgeführt sind jeweils die Immunfluoreszenz mit Flag-markiertem FHL2, mit Titin sowie beide Bilder übereinandergelegt. Maßstableiste entspricht 10 µm. Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt von Dr. Felix Friedrich vom Institut für Experimentelle Pharmakologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. 75

Abb. 22: Transduktionskontrolle der EHTs. A AAV6-GFP-transduziertes EHT und B nicht-transduziertes EHT unter UV-Licht. Maßstableiste entspricht 1 mm. 76

Abb. 23: Immunfluoreszenz von FHL2-transduziert EHTs. Aufgeführt sind jeweils die Immunfluoreszenz mit Flag-getagtem FHL2, mit cMyBP-C sowie beide Bilder übereinander gelegt. Doppelbanden der dritten Mutante sind mit Pfeilen markiert. Maßstableiste entspricht

10 µm. Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt von Dr. Felix Friedrich vom Institut für Experimentelle Pharmakologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. 77

Abb. 24: Messungen der mit FHL2-WT und -Mutanten transduzierten EHTs an Tag 14. Analyse hinsichtlich der aufgeführten Parameter Kraft (A, in mN), Kontraktions-Geschwindigkeit (B, in mN/s), Relaxations-Geschwindigkeit (C, in mN/s). Daten angegeben als Mittelwert ± Standardfehler. N wie in den Balken angegeben. Analyse durch: Varianzanalyse (*one-way* ANOVA), Dunnet's Post-Test im Vergleich zum WT, * p< 0,05, **p>0.01. 78

Abb. 25: Gelelektrophorese des durchgeführten Restriktions-Verdaus. A zeigt PCR-Ansätze an der DNA eines gesunden Spenderherzens. B zeigt den Verdau des Plasmids pEF5-TOPO-*FHL2*-WT nach Ligation in den Arbeitsvektor pEF5-TOPO. C zeigt den Kontrollverdau von pEF5-TOPO-*FHL2*-c.512C>T, -c.530G>A und -c.559G>T nach anschließender Ligation in den genannten Arbeitsvektor. 79

Abb. 26: Legierter Vektor pGex-5x-h*FHL2*-Fusion. A: Vektor mit *FHL2*-WT-cDNA, B Vektor, in den die Mutationen eingefügt wurden. BamHI und SmaI: Sequenz für Schnittstellen der Restriktionsenzyme; Stop: Stop-Kodon; h*FHL2*: humanes *FHL2*; *Factor Xa cleavage site*: Schnittstelle Faktor Xa; GST: Gen für Glutathion-S-Transferase. 80

Abb. 27: Gelelektrophorese des durchgeführten Restriktions-Verdaus. A zeigt den Verdau der Plasmide pGex-5x-*FHL2*-WT und –c.512C>T nach Ligation in den genannten Zielvektor. B zeigt den Verdau des Plasmids pGex-5x-*FHL2*-c.530G>A sowie c.559G>T nach Ligation in den genannten Zielvektor. 80

Abb. 28: Coomassie links und Western Blot auf Nitrozellulose rechts. Darstellung der verschiedenen Schritte der Produktion aller vier rekombinanten FHL2-Protein-Varianten. Coomassie mit 12% SDS-Gel. Die Abbildungen zeigen in folgender Reihenfolge A, FHL2-WT, B, FHL2-c.512C>T, C, FHL2-c.530G>A und D, FHL2-c.559G>T. T0: vor Induktion, T1-4: während der Induktion, Son: nach Sonifizierung, SN: nach Bindung am Säulenmaterial. W1-3: Waschschritte, E1+2: Elution 1 und 2. Erwartete Bandengröße: FHL2+GST 56 kDa. 82

Abb. 29: Immunogold-Markierung von FHL2 im Myokard. A, menschliches Spenderherz, B, HCM-Patient mit *MYBPC3*-Mutation, C, Patient mit Aortenstenose, D, HOCM-Patient mit *MYBPC3*-Mutation, E, WT-Maus, F, *Mybpc3*-KI-Maus. Maßstableiste entspricht 1µm. 92

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte Mutationen in Genen der sarkomerischen Proteine, die zur Hypertrophen Kardiomyopathie führen. Angegeben sind Gen, Protein, sowie Anzahl der bekannten Mutationen (Schlossarek, Mearini et al. 2011). 19

Tabelle 2: Auflistung der Familie der four-and-a-half-LIM-Proteine. Angabe von Name, Expression und Funktion (Kong, Shelton et al. 2001). 21

Tabelle 3: Auflistung der benutzten Primer beim Screening nach Mutationen im *FHL2*. Angegeben sind die Basenpaare in 5‘3‘-Richtung, wie auch das Ziel-Exon des jeweiligen Primers. 31

Tabelle 4: Liste der für die Linker-PCR benötigten Primer: Angabe der Sequenz in 5‘3‘-Richtung sowie der Schmelztemperatur. 32

Tabelle 5: Reaktionsansatz der *Touchdown*-PCR. PCR mit 5‘-CACC-BamHI-Kozak-ATG-Flag2- und 3’BsaBI-*FHL2*-Primern für das für die Virenproduktion benötigte cDNA-Konstrukt. 33

Tabelle 6: Reaktionsansatz der *Touchdown*-PCR. PCR mit 5‘-CACC-BamHI-ATG und 3’SmaI-h*FHL2*-Primern für das für die Proteinherstellung benötigte cDNA-Konstrukt. 33

Tabelle 7: Konditionen der *Touchdown*-PCR: PCR mit 5‘-CACC-BamHI-Kozak-ATG-Flag2- und 3’BsaBI-*FHL2*-Primern für das für die Virenproduktion benötigte cDNA-Konstrukt, sowie PCR mit 5‘-CACC-BamHI-ATG und 3’SmaI-h*FHL2*-Primern für das für die Proteinherstellung benötigte cDNA-Konstrukt. 33

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete FastDigest Enzyme der Firma Fermentas. Angegeben sind Name, Sequenz und die benötigte Temperatur. Für alle Enzyme wurde der 10x FastDigest Green Buffer verwendet. 40

Tabelle 9: Ansatz des Kontrollverdaus pEF5-TOPO-h*FHL2*-Flag2-WT mit BamHI und BsaBI. 40

Tabelle 10: Ansatz des Kontrollverdaus von pEF5-TOPO-*FHL2*-WT mit BamHI und SmaI. . 40

Tabelle 11: Während der Klonierungsschritte verwendeten Sequenzierungsprimer. Angegeben sind Name und Sequenz in 5‘3‘-Richtung. 41

Tabelle 12: Liste der in den Mutagenese-PCRs benutzten Primer. Angegeben sind Name, Sequenz, sowie die Schmelztemperatur (Tm). 42

Tabelle 13: Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR für c.512C>T in pEF5-TOPO Flag2-*FHL2*.....42

Tabelle 14: Konditionen der Mutagenese-PCR für c.512C>T (p.Thr.171Met) in pEF5-TOPO Flag2-*FHL2*. 42

Tabelle 15: Reaktionsansätze der Mutagenese-PCR für die Mutationen c.530G>A und c.559G>T in pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*. 43

Tabelle 16: Konditionen der Reaktionsansätze der Mutagenese-PCR für die Mutationen c.530G>A und c.559G>T in pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*. 43

Tabelle 17: Reaktionsansätze der Mutagenese-PCR für jeweils c.512C>T, c.530G>A, und c.559G>T in pEF5-TOPO-*FHL2*.....43

Tabelle 18: Konditionen der Reaktionsansätze der Mutagenese-PCR für jeweils c.512C>T, c.530G>A und c.559G>T in pEF5-TOPO-*FHL2*. 44

Tabelle 19: Restriktionsverdau von pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-c.512C>T, c.530G>A und c.559G>T. 44

Tabelle 20: Kontrollverdau von pEF5-TOPO-*FHL2*-c.512C>T, -c.530G>A und -c.559G>T. .45

Tabelle 21: Restriktionsverdau von pEF5-TOPO-Flag2-*FHL2*-WT/Mut. 46

Tabelle 22: Restriktionsverdau von pdsAAV-CMV-MLC260-EGFP. 46

Tabelle 23: Ligationsansatz des linearisierten AAV6-CMVenh-MLC260 mit verdautem Flag2-*FHL2*-WT/Mut. 47

Tabelle 24: Ligationsansatz des linearisierten Vektors pGex-5x-1 mit verdautem Insert *FHL2*-WT/Mut. 48

Tabelle 25: Pipettierschema für Proteinstandardkurven. Proteinkonzentrations-Messungen nach Bradford. 51

Tabelle 26: Zusammensetzung der für die PAGE benötigten Trenn- und Sammelgele. Angegeben sind Konzentration der Gele, sowie die Zutaten. Angaben in ml. 52

Tabelle 27: Übersicht der im Screening gefundenen Mutationen des *FHL2*-Gens. Angegeben sind Mutation, Lokalisation im Exon, Nukleotidveränderung, resultierender Aminosäureaustausch und Frequenz in Kontrollen. Durchgeführt von S. Reischmann und Dr. F. Friedrich, Institut für Experimentelle Pharmakologie des UKE. 61

Tabelle 28: Liste der von Dr. O. Müller produzierten AAV 6. Angegeben sind die zugehörigen Titer. 70

Tabelle 29: Auflistung aller verwendeten Lösungen. Angegeben sind Lösung, Ansatz und Endkonzentration. 108

9 Verwendete Substanzen und Lösungen

9.1 Substanzen

- Acrylamid 40%, Biorad
- Agarose, Invitrogen
- Alkalische Phosphatase, Fermentas
- Ampicillin, SERVA *Electrophoresis* GmbH
- Ammoniumpersulfat, APS, Bio-Rad
- Anti-α-Aktinin Monoklonaler Maus-Antikörper, Sigma-Aldrich
- Anti-Calsequestrin-Antikörper, Dionova
- Anti-Fhl2-Polyklonaler Antikörper, MBL für NMCM und *custom made* für AMVM
- Anti-Flag-Polyklonaler Antikörper, Sigma Aldrich
- Anti-GST-Polyklonaler Antikörper, GE Healthcare
- Anti-Kaninchen-Antikörper Alexa-fluor 546, Invitrogen
- Anti-Kaninchen-Antikörper, POX- gekoppelt, Dionova
- Anti-Maus-Antikörper, POX-gekoppelt, Invitrogen
- Anti-cMyBP-C-Antikörper, *custom made*
- Anti-Saddayappan-Antikörper, *custom made*
- Anti-Titin-Antikörper, *custom made*
- Aprotinin, Sigma Aldrich
- Aqua ad iniectabilia, Baxter
- BL 21-E.coli, GE Healthcare
- Bradford-Lösung, Biorad
- Bromphenolblau, Merck
- BSA, Sigma Aldrich
- Coomassie Brilliantblau G250-Lösung, Therma Scientific
- DMEM, Invitrogen
- dNTP-Mix, PCR-Reagenzien, Fermentas
- DTT, Sigma Aldrich
- ECL-Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare
- EDTA, Sigma
- Essigsäure, Merck
- Ethanol, J.T. Baker
- Ethidiumbromid, Fluka Biochemica

- Gene Ruler 100 bp Plus, 1 kb, Fermentas
- Faktor Xa, GE Health Care
- Fast Digest Enzyme und Buffer, Fermentas
- Fibrinogen, Sigma
- Fötales Kälberserum FCS, Invitrogen
- *Gel Extraction Kit*, Qiagen
- Glukose, Roth Chemie GmbH
- Glutathion Sepharose 4B, -Elutionspuffer und -Säulen, GE Health Care
- Glycerin, Merck KgaA
- HBSS, Invitrogen
- Hefeextrakt, Becton
- Hepes, Sigma
- Horse Serum, hitze-inaktiviert, Invitrogen
- Isopropanol, Merck
- Isotonische 0.9% Natriumchlorid-Lösung
- Laminin, Roche
- 6x *loading dye* (Ladepuffer), Fermentas
- M199, Sigma Aldrich
- *Mass Rule DNA ladder Mix*, Fermentas
- *Maxiprep Kit*, Macherey Nagel
- Methanol, J.T. Baker
- Milchpulver, Roth
- *Miniprep Kit*, Macherey Nagel
- $MgSO_4$: Merck KgaA
- $MnCl_2$: Merck KgaA
- MOPS: Merck KgaA
- Mowiol 4-88, Hoechst
- Natriumlaurylsulfat, Sigma
- *NucleoBond Xtra Plasmid Purification Kit*, Marcherey-Nagel
- *NucleoSpin Plasmid-Kit*, Macherey Nagel
- Oligonukleotide (Primer), Invitrogen und Eurofins MWG Operon
- PBS, Invitrogen
- *pEF5/FRT/V5 Directional Expression Kit*, Invitrogen

- Penicillin, Invitrogen
- Penicillin/Streptomycin, Invitrogen
- Pepton, Becton
- Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase, Agilent Technologies
- pGEX-5X-1 *GST Expression Vector*, GE Healthcare
- Phenylephrin, Sigma
- Phusion Hot Start II DNA Polymerase, Biozym Scientific
- Ponceau S 0,1%, Sigma
- Precision Plus Protein Standard, Biorad
- PrimeStar Polymerase, Mobitec
- QIAquick Gel Extraction-Kit, Qiagen
- *Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit,* Stratagene
- *Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit XL*, Stratagene
- SOC-Medium, Invitrogen
- T4-Ligase und Ligase-Puffer, Fermentas
- TEMED, Biorad
- Thrombin, Sigma Aldrich
- Top 10-E.coli, Invitrogen
- TOPO-Cloning PEF5/FRT/V5, Invitrogen
- TO-PRO®-3 Iodid, Life technology
- Tris Base, Sigma
- Tris-HCl, Sigma
- Trypsin, Invitrogen
- Tryptanblau, Invitrogen
- Trypton, Becton
- Tween 20, Sigma
- West Dura Detection Kit, Thermo Fisher Scientific
- Xyloncyanol, Sigma

9.2 Lösungen

Lösung	Ansatz	Endkonzentration
Agar-Nährboden	7,5 g Agar suspendiert in 500 ml LB-Medium, nachfolgend autoklaviert	1,5 mg/ml
Ampicillin	40 mg Ampicillin in 8 ml Wasser gelöst	50 µg/ml
Blotpuffer 10x Stammlösung	60,5 g Tris, 288 g Glycin in 2 l Wasser gelöst. Für 2 l 1x- Puffer: 200 ml Stammlösung, 1400 ml Wasser, 400 ml MetOH	25 mM Tris 192 mM Glycin
Dark Medium	70 ml *Light Medium*, 8,3 ml *Horse Serum*, 4,1 ml FCS	
EHT-Medium	DMEM, 10% Pferdeserum, 2% Hühner-Embryo-Extrakt, 1% P/S, Insulin (10 µl/ml), Tranexam-Säure (400 µmol/l) und Aprotinin	
Laemmli 6x Stammlösung	2,4 g SDS, 20 mg Bromphenolblau, 2,4 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 12 g Glycerol, aufgefüllt auf 20 ml mit Wasser, 1,86 g DTT	
LB-Medium	5 g Hefeextrakt, 20 g Pepton 140, 5 g $MgSO_4$, pH mit KOH auf 7,6 eingestellt, auf 1 l mit Wasser aufgefüllt, autoklaviert	
Light Medium	75 ml DMEM, 25 ml M199, 1 ml P/S, 1 ml Hepes	
Loading dye 6x	18,9 g Glycerin, 25 mg Bromphenolblau und 30 mg Xylencyanol mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt	
SOC-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl auf 900 ml mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt, pH 7 eingestellt, autoklaviert, abkühlen. 10 ml sterile 1 M $MgCl_2$ Lösung und 20 ml sterile 1 M Glukoselösung dazu	
TAE-Puffer	Tris Base, EDTA, Essigsäure	
TBS bzw. TBS-T	Für 10x -Stammlösung: 242,2 g Tris, 175,32 g NaCl, mit 37% HCl auf pH 7,5 eingestellt. Für TBS-T Zugabe von 0,2% v/v Tween	1 M Tris, 1,5 M NaCl
TFB I-Puffer	1,8 g $RbCl_2$, 4,5 ml KAc 1 M, 0,225 g $CaCl_2$, 7,5 ml $MnCl_2$ 1 M, 28,35 g Glycerin. Mit Wasser auf	30 mM KAc, 100 mM $RbCl_2$,

	150 ml aufgefüllt, pH-Wert auf 5,8 mit Essigsäure eingestellt.	10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15% Glycerin
TFB II-Puffer	0,1 ml MOPS 1 M, 0,11 g $CaCl_2$, 0,012 g $RbCl_2$, 1,89 g Glycerin. Mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, pH-Wert mit NaOH auf 7 eingestellt.	10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl_2$, 15% Glycerin
Tyrode-Lösung	NaCl 120 mM, KCl 5.4 mM, MgCl2 1.0 mM, $CaCl_2$ 0.2 mM, NaH_2PO_4 0.4 mM, $NaHCO_3$ 22.8, g mM, Glukose 5.0 mM, Na_2EDTA 0.05 mM, Askorbinsäure 0.3 mM	
Western-Blot-Sammelgel	6,03 ml Wasser, 1,28 ml Acrylamid 40%, 0,5 ml Tris pH 6,8, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 0,01 ml TEMED; für 4 kleine Gele	
Western-Blot-Trenngel, 12%	4,3 ml Wasser, 3 ml Acrylamid 40%, 2,5 ml Tris pH 8,8, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 0,004 ml TEMED; für 2 kleine Gele	
Western-Blot-Trenngel, 15%	3,55 ml Wasser, 3,75 ml Acrylamid 40%, 2,5 ml Tris pH 8,8, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 0,004 ml TEMED; für 2 kleine Gele	

Tabelle 29: Auflistung aller verwendeten Lösungen. Angegeben sind Lösung, Ansatz und Endkonzentration.

9.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

- *Accu-jet*-Pipettierhilfe, Brand
- Analysenwaage, Sartorius
- Bechergläser, Schott Duran
- Biosphere Filtertips 10/100/1000/2,5 µl, Sarstedt
- *Blotting*-Papier (Whatman 3MM), Schleicher & Schuell
- *Blotting*-System (*Mini Trans-Blot cell),* Biorad
- Chemie Genius Bio-imaging-System, Syngene
- Chirurgische Instrumente, Karl Hammacher GnbH
- Codon Code Aligner Software®
- Coverslips, Sarstedt
- Dicke und dünne Western Blot Glasplatten, Biorad
- Einmalküvetten, Sarstedt
- Eismaschine, Scotsman
- Elektrophorese-Systeme, Bio-Rad
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml), Eppendorf
- Falcon-Reaktionsgefäße (15 und 50 ml), Sarstedt
- Fluoreszenz-Mikroskop Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss
- GeneTools-Software, Syngene
- Inkubator, Heraeus Instruments
- IonOptix, IonOptix Corporation
- IonWizard 6.0 Software
- konfokales Carl Zeiss Lasermikroskops und entsprechendes Analyseprogramm (Zeiss LSM 510 META)
- MagnetrührerJanke & Kunkel
- Mikrozentrifuge, Eppendorf AG
- Mikrowelle, Sharp
- *multiple Well*-Platten (96-*Well*), Sarstedt
- NanoDropTM ND-1000 (Spectrophotometer), Thermo Scientific
- Neubauer-Zählkammer, Glaswarenfabrik Karl Hecht
- Nitrilhandschuhe, Ansell
- Nitrocellulosemembran, Schleicher & Schuell
- PCR-Reaktionsgefäße, Sarstedt

- PCR-Zykler, Applied Biosystems
- pH-Meter, Knick GmbH
- Pipetten, Eppendorf
- Pipettenspitzen (für 10, 100 und 1000 µl), Sarstedt
- Primer3-Software
- PVDF-Membran, VWR
- Reinstwasser-System, Millipore
- Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml), Sarstedt
- Serologische Pipetten (10 ml), Becton Dickinson
- Smart SpecTM 3000, Spectrophotometer, Biorad
- *Snapcap,* Sarstedt
- Spannungsgerät, Bio-Rad
- Sterilwerkbank, Heraeus
- Sterile Filter (0,22 µm), Sarstedt
- Ultrasschallgerät, Visual Sonics
- Vortexer (Vibrofix VF1), Janke & Kunkel
- Wasserbad, GFL
- Zellkulturflasche (T75), Sarstedt
- Zellkulturplatten (6, 12 und 24 *Well*), Nalge Nunc International
- Zellschaber, Sarstedt
- Zentrifugen, Eppendorf AG
- Zentrifugenbecher, 175/225 ml, BD Falkon

10 Literaturverzeichnis

Ahmad, F., J. G. Seidman and C. E. Seidman (2005). "The genetic basis for cardiac remodeling." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 185-216.

Alcalai R, Seidman JG, Seidman CE (2008). "Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics." J Cardiovasc Electrophysiol. 2008 Jan;19(1):104-10.

Barefield, D. and S. Sadayappan (2010). "Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease." J Mol Cell Cardiol **48**(5): 866-875.

Baurand, A., L. Zelarayan, R. Betney, C. Gehrke, S. Dunger, C. Noack, A. Busjahn, J. Huelsken, M. M. Taketo, W. Birchmeier, R. Dietz and M. W. Bergmann (2007). "Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling." Circ Res **100**(9): 1353-1362.

Bovill, E., S. Westaby, A. Crisp, S. Jacobs and T. Shaw (2009). "Reduction of four-and-a-half LIM-protein 2 expression occurs in human left ventricular failure and leads to altered localization and reduced activity of metabolic enzymes." J Thorac Cardiovasc Surg **137**(4): 853-861.

Braunwald, Zipes, Libby (2001). Braunwald`s Heart Disease. A Textbook of cardiovascular medicine, Saunders Elsevier. 6. Ausgabe. Kapitel 48, Seite 1764-1767.

Cannan, C. R., G. S. Reeder, K. R. Bailey, L. J. Melton, 3rd and B. J. Gersh (1995). "Natural history of hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study, 1976 through 1990." Circulation **92**(9): 2488-2495.

Carrier, L. (2007). "Cardiac myosin-binding protein c in the heart." Archives des maladies du coeur et des vaisseaux **100**(3): 238-243.

Cazorla, O., S. Szilagyi, N. Vignier, G. Salazar, E. Kramer, G. Vassort, L. Carrier and A. Lacampagne (2006). "Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice." Cardiovasc Res **69**(2): 370-380.

Chu, P. H., W. M. Bardwell, Y. Gu, J. Ross and J. Chen (2000). "FHL2/SLIM3 is not essential for cardiac development and function." Mol. Cell Biol. **20**: 7460-7462.

Crocini, C., T. Arimura, S. Reischmann, A. Eder, I. Braren, A. Hansen, T. Eschenhagen, A. Kimura and L. Carrier (2013). "Impact of ANKRD1 mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy on contraction parameters of engineered heart tissue." Basic Res Cardiol **108**(3): 349.

Doerr, Seifert and Uehlinger (2000). Herausgeber W. Hort. Spezielle pathologische Anatomie; Pathologische Anatomie des Herzens und seiner Hüllen II, Springer. Kapitel 7, Abschnitt F, Seite 1064-1075 und Abschnitt K, Seite 1101-1104.

Elliott, P. und W. J. McKenna (2004). "Hypertrophic cardiomyopathy." Lancet **363**(9424): 1881-1891.

Elliott, P., J. Gimeno, M. Tome and W. McKenna (2006). "Left ventricular outflow tract obstruction and sudden death in hypertrophic cardiomyopathy." Eur Heart J **27**(24): 3073; author reply 3073-3074.

Erdmann, E. (2011). Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße, Springer. 8. Auflage, Kapitel 12, Seite 339.

Forissier, J. F., P. Richard, S. Briault, C. Ledeuil, O. Dubourg, B. Charbonnier, L. Carrier, C. Moraine, G. Bonne, M. Komajda, K. Schwartz and B. Hainque (2000). "First description of germline mosaicism in familial hypertrophic cardiomyopathy." J Med Genet **37**(2): 132-134.

Fraysse, B., F. Weinberger, S. C. Bardswell, F. Cuello, N. Vignier, B. Geertz, J. Starbatty, E. Kramer, C. Coirault, T. Eschenhagen, J. C. Kentish, M. Avkiran and L. Carrier (2012). "Increased myofilament Ca2+ sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice." J Mol Cell Cardiol **52**(6): 1299-1307.

Friedrich, F. W. and L. Carrier (2012). "Genetics of hypertrophic and dilated cardiomyopathy." Curr Pharm Biotechnol **13**(13): 2467-2476.

Friedrich, F. W., B. R. Wilding, S. Reischmann, C. Crocini, P. Lang, P. Charron, O. J. Muller, M. J. McGrath, I. Vollert, A. Hansen, W. A. Linke, C. Hengstenberg, G. Bonne, S. Morner, T. Wichter, H. Madeira, E. Arbustini, T. Eschenhagen, C. A. Mitchell, R. Isnard and L. Carrier (2012). "Evidence for FHL1 as a novel disease gene for isolated hypertrophic cardiomyopathy." Hum Mol Genet **21**(14): 3237-3254.

Gabriel, B., S. Mildenberger, C. W. Weisser, E. Metzger, G. Gitsch, R. Schule and J. M. Muller (2004). "Focal adhesion kinase interacts with the transcriptional coactivator FHL2 and both are overexpressed in epithelial ovarian cancer." Anticancer Res **24**(2B): 921-927.

Geisterfer-Lowrance AA1, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG (1990). "A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation." Cell 62(5): 999-1006.

Gersh, B. J., B. J. Maron, R. O. Bonow, J. A. Dearani, M. A. Fifer, M. S. Link, S. S. Naidu, R. A. Nishimura, S. R. Ommen, H. Rakowski, C. E. Seidman, J. A. Towbin, J. E. Udelson and

C. W. Yancy (2011). "2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." J Am Coll Cardiol **58**(25): 2703-2738.

Granzier, H. L., M. H. Radke, J. Peng, D. Westermann, O. L. Nelson, K. Rost, N. M. King, Q. Yu, C. Tschope, M. McNabb, D. F. Larson, S. Labeit and M. Gotthardt (2009). "Truncation of titin's elastic PEVK region leads to cardiomyopathy with diastolic dysfunction." Circ Res **105**(6): 557-564.

Hansen, A., A. Eder, M. Bonstrup, M. Flato, M. Mewe, S. Schaaf, B. Aksehirlioglu, A. Schworer, J. Uebeler and T. Eschenhagen (2010). "Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue." Circ Res **107**(1): 35-44.

Hirt, M. N., N. A. Sorensen, L. M. Bartholdt, J. Boeddinghaus, S. Schaaf, A. Eder, I. Vollert, A. Stohr, T. Schulze, A. Witten, M. Stoll, A. Hansen and T. Eschenhagen (2012). "Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model." Basic Res Cardiol **107**(6): 307.

Hojayev, B., B. A Rothermel and J. A. Hill (2009). "Abstract 3606: FHL2 Binds Calcineurin and Represses Pathologic Cardiac Growth " Circulation **120**,S 835.

Hojayev, B., B. A. Rothermel, T. G. Gillette and J. A. Hill (2012). "FHL2 binds calcineurin and represses pathological cardiac growth." Mol Cell Biol **32**(19): 4025-4034.

Jarcho J. A., W. McKenna, J.A. Pare, S. D. Solomon, R. F. Holcombe, S. Dickie, T Levi, , H. Donis-Keller, J.G. Seidman, C. E. Seidman, M.D (1989). Mapping a Gene for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy to Chromosome 14q1." N Engl J Med; **321**:1372-1378.

Johannessen, M., S. Moller, T. Hansen, U. Moens and M. Van Ghelue (2006). "The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2." Cell Mol Life Sci **63**(3): 268-284.

Kane, J. F. and D. L. Hartley (1991). "Properties of recombinant protein-containing inclusion bodies in Escherichia coli." Bioprocess Technol **12**: 121-145.

Kimura, A. (2010). "Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond." J Hum Genet **55**(2): 81-90.

Klinke, Pape, Kurtz, Silbernagl (2009). Physiologie, Thieme, 6. Auflage, Seite 101-102 und 129.

Kong, Y., J. M. Shelton, B. Rothermel, X. Li, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and R. S. Williams (2001). "Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation." Circulation **103**(22): 2731-2738.

Lange, S., D. Auerbach, P. McLoughlin, E. Perriard, B. W. Schafer, J. C. Perriard and E. Ehler (2002). "Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2." J Cell Sci **115**(Pt 24): 4925-4936.

LeWinter, M. M., Y. Wu, S. Labeit and H. Granzier (2007). "Cardiac titin: structure, functions and role in disease." Clin Chim Acta **375**(1-2): 1-9.

LeWinter, M. M. and H. Granzier (2010). "Cardiac titin: a multifunctional giant." Circulation **121**(19): 2137-2145.

Linke, W. A., D. E. Rudy, T. Centner, M. Gautel, C. Witt, S. Labeit and C. C. Gregorio (1999). "I-band titin in cardiac muscles is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure." J. Cell. Biol. **146**: 631-644.

Lloyd-Jones, D., R. J. Adams, T. M. Brown, M. Carnethon, S. Dai, G. De Simone, T. B. Ferguson, E. Ford, K. Furie, C. Gillespie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, P. M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, M. Mussolino, G. Nichol, V. L. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. D. Wong and J. Wylie-Rosett (2010). "Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association." Circulation **121**(7): e46-e215.

Marian, A. J. (2010). "Update on hypertrophic cardiomyopathy." Tex Heart Inst J **37**(3): 322-323.

Maron, B. J., N. Sato, W. C. Roberts, J. E. Edwards and R. S. Chandra (1979). "Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum. Comparison of fetuses and infants with and without congenital heart disease and patients with hypertrophic cardiomyopathy." Circulation **60**(3): 685-696.

Maron, B. J. und R. O. Bonow (1987). "Hypertrophic Cardiomyopathy." New England Journal Medicine **316**: 780-789.

Maron, B. J., J. M. Gardin, J. M. Flack, S. S. Gidding, T. T. Kurosaki and D. E. Bild (1995). "Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults." Circulation **92**(4): 785-789.

Maron, B. J., W. J. McKenna, G. K. Danielson, L. J. Kappenberger, H. J. Kuhn, C. E. Seidman, P. M. Shah, W. H. Spencer, 3rd, P. Spirito, F. J. Ten Cate and E. D. Wigle (2003). "American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines." J Am Coll Cardiol **42**(9): 1687-1713.

Maron, M. S., I. Olivotto, S. Betocchi, S. A. Casey, J. R. Lesser, M. A. Losi, F. Cecchi and B. J. Maron (2003). "Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy." N Engl J Med **348**(4): 295-303.

Maron, B. J., J. A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A. J. Moss, C. E. Seidman and J. B. Young (2006). "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention." Circulation **113**(14): 1807-1816.

Maron, M. S., I. Olivotto, A. G. Zenovich, M. S. Link, N. G. Pandian, J. T. Kuvin, S. Nistri, F. Cecchi, J. E. Udelson and B. J. Maron (2006). "Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction." Circulation **114**(21): 2232-2239.

Marston S, Copeland O, Gehmlich K, Schlossarek S, Carrier L. " How do MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy?" J Muscle Res Cell Motil. **33**(1): 75-80.

Matsumoto, Y., T. Hayashi, N. Inagaki, M. Takahashi, S. Hiroi, T. Nakamura, T. Arimura, K. Nakamura, N. Ashizawa, M. Yasunami, T. Ohe, K. Yano and A. Kimura (2005). "Functional analysis of titin/connectin N2-B mutations found in cardiomyopathy." J Muscle Res Cell Motil **26**(6-8): 367-374.

Morimoto, S., F. Yanaga, R. Minakami and I. Ohtsuki (1998). "Ca2+-sensitizing effects of the mutations at Ile-79 and Arg-92 of troponin T in hypertrophic cardiomyopathy." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): C200-207.

Nishi, H., A. Kimura, H. Harada, Y. Koga, K. Adachi, K. Matsuyama, T. Koyanagi, S. Yasunaga, T. Imaizumi, H. Toshima and et al. (1995). "A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy." Circulation **91**(12): 2911-2915.

Okamoto, R., Y. Li, K. Noma, Y. Hiroi, P. Y. Liu, M. Taniguchi, M. Ito and J. K. Liao (2013). "FHL2 prevents cardiac hypertrophy in mice with cardiac-specific deletion of ROCK2." FASEB J **27**(4): 1439-1449.

Park, J., C. Will, B. Martin, L. Gullotti, N. Friedrichs, R. Buettner, H. Schneider, S. Ludwig and V. Wixler (2008). "Deficiency in the LIM-only protein FHL2 impairs assembly of extracellular matrix proteins." FASEB J **22**(7): 2508-2520.

Pohlmann, L., I. Kroger, N. Vignier, S. Schlossarek, E. Kramer, C. Coirault, K. R. Sultan, A. El-Armouche, S. Winegrad, T. Eschenhagen and L. Carrier (2007). "Cardiac myosin-binding protein C is required for complete relaxation in intact myocytes." Circ Res **101**(9): 928-938.

Purcell, N. H., D. Darwis, O. F. Bueno, J. M. Muller, R. Schule and J. D. Molkentin (2004). "Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes." Mol Cell Biol **24**(3): 1081-1095.

Radke, M. H., J. Peng, Y. Wu, M. McNabb, O. L. Nelson, H. Granzier and M. Gotthardt (2007). "Targeted deletion of titin N2B region leads to diastolic dysfunction and cardiac atrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3444-3449.

Renger A, Zafiriou MP, Noack C, Pavlova E, Becker A, Sharkova K, Bergmann MW, El-Armouche A, Zimmermann WH, Zelarayán LC (2013). "The four and a half LIM-domain 2 controls early cardiac cell commitment and expansion via regulating β-catenin-dependent transcription." Stem Cells. 31(5):928-40.

Remmele, W., Buss, H., R. Caesar and T. Eckhardt (1999). Rechtsfragen der Pathologie, Einführung in die bioptische Diagnostik, Herz- und Gefäßsystem, Hämatologie, Milz, Thymus. Band 1, Springer. Kapitel 7, Seite 143-148.

Richardson, P., W. McKenna, M. Bristow, B. Maisch, B. Mautner, J. O'Connell, E. Olsen, G. Thiene, J. Goodwin, I. Gyarfas, I. Martin and P. Nordet (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies." Circulation **93**(5): 841-842.

Robert, P., P. Tsui, M. P. Laville, G. P. Livi, H. M. Sarau, A. Bril and I. Berrebi-Bertrand (2001). "EDG1 receptor stimulation leads to cardiac hypertrophy in rat neonatal myocytes." J Mol Cell Cardiol **33**(9): 1589-1606.

Saito S, Hiroi Y, Zou Y, Aikawa R, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I (2000). "beta-Adrenergic pathway induces apoptosis through calcineurin activation in cardiac myocytes." J Biol Chem. **275**(44):34528-33.

Samson, T., N. Smyth, S. Janetzky, O. Wendler, J. M. Muller, R. Schule, H. von der Mark, K. von der Mark and V. Wixler (2004). "The LIM-only proteins FHL2 and FHL3 interact with alpha- and beta-subunits of the muscle alpha7beta1 integrin receptor." J Biol Chem **279**(27): 28641-28652.

Schlossarek, S., G. Mearini and L. Carrier (2011). "Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic opportunities." J Mol Cell Cardiol **50**(4): 613-620.

Seidman, J. G. and C. Seidman (2001). "The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms." Cell **104**(4): 557-567.

Stohr, A., F. W. Friedrich, F. Flenner, B. Geertz, A. Eder, S. Schaaf, M. N. Hirt, J. Uebeler, S. Schlossarek, L. Carrier, A. Hansen and T. Eschenhagen (2013). "Contractile abnormalities and altered drug response in engineered heart tissue from Mybpc3-targeted knock-in mice." J Mol Cell Cardiol **63**: 189-198.

Sun, J., G. Yan, A. Ren, B. You, J. K. Liao (2006). "FHL2/SLIM3 decreases cardiomyocyte survival by inhibitory interaction with sphingosine kinase-1." Circ Res **99**(5): 468-476.

van Dijk, S. J., E. R. Paalberends, A. Najafi, M. Michels, S. Sadayappan, L. Carrier, N. M. Boontje, D. W. Kuster, M. van Slegtenhorst, D. Dooijes, C. dos Remedios, F. J. ten Cate, G. J. Stienen and J. van der Velden (2012). "Contractile dysfunction irrespective of the mutant protein in human hypertrophic cardiomyopathy with normal systolic function." Circ Heart Fail **5**(1): 36-46.

Vignier, N., S. Schlossarek, B. Fraysse, G. Mearini, E. Kramer, H. Pointu, N. Mougenot, J. Guiard, R. Reimer, H. Hohenberg, K. Schwartz, M. Vernet, T. Eschenhagen and L. Carrier (2009). "Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system regulate cardiac myosin-binding protein C mutant levels in cardiomyopathic mice." Circ Res **105**(3): 239-248.

Vosberg, H. P. (1998). "[Genetic causes of hypertrophic cardiomyopathy]." Med Klin (Munich) **93**(4): 252-259.

Wilkins B. J., Molkentin J. D. **(**2004). "Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy." Biochem Biophys Res Commun. **322**(4):1178-91.

World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet N° 317, 2013. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en

11 Veröffentlichungen

Kongressbeiträge

F. W. Friedrich, A. Unger, S. Reischmann, **A. Schwalm**, W. Linke, J. Münch, M. Patten-Hamel, J. van der Velden, T. Eschenhagen, L. Carrier. FHL2 is downregulated and exhibits lower I-band binding signal in human and mouse hypertrophic cardiomyopathy tissue samples. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herbsttagung, Dresden, Deutschland, 2013.

F. Friedrich, **A. Schwalm**, D. Ramanujam, E. Galve, P. Charron, R. Isnard, C. Hengstenberg, S. Engelhardt, T. Eschenhagen, L. Carrier. Mutations in FHL2 cause hypertrophic cardiomyopathy and lead to contractile alterations in engineered heart tissue. European Society of Cardiology, Heart Failure Winter Research Meeting, Les Diablerets, Schweiz, 2014.

12 Danksagung

Diese Promotion zu meistern war eine lange und lebendige Reise. Ich möchte denen meinen Dank aussprechen, ohne deren Hilfe die Fertigstellung ohne Zweifel nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte Prof. Thomas Eschenhagen für die Bereitstellung dieses Themas danken. Ich habe Ihr Engagement und Ihre jederzeit offene Tür immer zu schätzen gewusst. Im Institut konnte ich das wissenschaftliche Arbeiten in einer tollen, internationalen Atmosphäre kennenlernen und bin sicher nicht ohne Grund der kardiovaskulären Medizin nicht abtrünnig geworden.

Tiefen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Lucie Carrier aussprechen, die als meine Arbeitsgruppenleiterin stets Vorbild und tolle Ansprechpartnerin gewesen ist. Lucie hat mich immer mit ihrem Enthusiasmus und ihrer Motivationsfähigkeit beeindruckt und mich für die kardiovaskuläre Forschung begeistert. Insbesondere für die Möglichkeit des Praktikums in Paris bin ich sehr dankbar und denke gerne an die Zeit zurück.

Felix Friedrich war zu jeder Zeit ein toller Betreuer und Freund. Ich möchte ihm für seine Zeit und Energie danken, die Engelsgeduld mit der er meine unzähligen Fragen beantwortet hat, sowie für die tollen und schnellen Korrekturen dieser Arbeit. Seine unerschütterliche Begeisterungsfähigkeit hat mich immer wieder aufs Neue ermutigen können. Ich habe die zahlreichen Gespräche über Wissenschaft und das Leben immer genossen und freue mich sehr, dass die „Betreuung“ bis heute nicht aufgehört hat.

Ich danke der gesamten AG Carrier für ihre Motivation und Unterstützung und die lehrreiche Zeit im Labor. Insbesondere Silke Reischmann gilt mein Dank, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und auch Lisa Krämer und Doreen Stimpel, die mir nicht nur mit professionellen Ratschlägen, sondern mit vielen lustigen Unterhaltungen die Zeit versüßten.

Bei Dr. Oliver Müller aus Heidelberg und Dr. Andreas Unger möchte ich mich für die freundliche Kollaboration bedanken.

Ich danke meiner Familie. Es gibt nichts Schöneres als zu wissen, dass ihr zu jeder Zeit für mich da seid.

13 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

14 Eidesstattliche 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....