

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie  
Institutsdirektor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

**S100A4 als Zielprotein der E3-Ligase Asb2 $\beta$**

Dissertation

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

Vorgelegt von:

Simon Pascal Braumann  
aus Bergisch-Gladbach

Hamburg 2016

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:** 09.12.2016

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Lucie Carrier

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** PD Dr. med Monika Patten-Hamel

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:** Prof. Elke Oetjen

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1. Systematik der Kardiomyopathien</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2. Hypertrophe Kardiomyopathie</b> .....	<b>7</b>
1.2.1. Epidemiologie der HCM .....	8
1.2.2. Symptome der HCM .....	8
1.2.3. Diagnostik der HCM .....	8
1.2.4. Genetik der HCM .....	10
1.2.5. Histopathologie der HCM .....	11
1.2.6. Therapie der HCM.....	12
<b>1.3. Das Ubiquitin-Proteasom-System</b> .....	<b>13</b>
1.3.1. Reaktionsablauf und Bedeutung des UPS .....	13
1.3.2. Das UPS und die hypertrophe Kardiomyopathie .....	16
1.3.3. Die E3-Ligase Asb2 $\beta$ .....	18
<b>1.4. Vorergebnisse</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5. S100-Proteine</b> .....	<b>19</b>
1.5.1. Struktur und Funktion.....	19
1.5.2. S100A4 .....	21
<b>1.6. Fragestellung</b> .....	<b>24</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1. Zur Arbeit mit Nukleinsäuren</b> .....	<b>25</b>
2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion .....	25
2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.1.3. DNA-Gelextraktion .....	27
2.1.4. Restriktionsverdau.....	28
2.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten .....	29
2.1.6. Chemisch kompetente E. coli .....	30
2.1.7. Herstellung chemisch kompetenter E. coli .....	30
2.1.8. Transformation chemisch kompetenter E. coli.....	31
2.1.9. Kontrolle der Ligation mittels <i>Colony-PCR</i> .....	31
2.1.10. Plasmidisolation mittels Mini- und Maxipräparation .....	32
2.1.11. Klonierung.....	34
2.1.12. Sequenzierung.....	35
2.1.13. Vorbereitung von Mäuseherzen .....	36
2.1.14. RNA-Isolation.....	36

2.1.15.	cDNA Synthese mittels reverser Transkription.....	36
2.1.16.	Quantitative PCR .....	37
<b>2.2.</b>	<b>Zur Arbeit in der Zellkultur .....</b>	<b>38</b>
2.2.1.	HEK-293-Zellen .....	38
2.2.2.	Cos-7-Zellen.....	38
2.2.3.	Kultivierung und Vorbereitung .....	38
2.2.4.	Co-Transfektion.....	39
2.2.5.	Behandlung mit einem UPS-Inhibitor.....	40
2.2.6.	Ernten der Zellen .....	40
2.2.7.	Immunfluoreszenz .....	40
<b>2.3.</b>	<b>Zur Arbeit mit Proteinen.....</b>	<b>41</b>
2.3.1.	Proteinbestimmung nach Bradford .....	41
2.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
2.3.3.	Western-Blot.....	43
<b>2.4.</b>	<b>Zur Arbeit mit künstlichem Herzgewebe .....</b>	<b>44</b>
2.4.1.	Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten .....	44
2.4.2.	Herstellung von EHTs .....	45
2.4.3.	Transduktion mit Adeno-assoziierten Viren .....	47
2.4.4.	Kultivierung der EHTs .....	48
2.4.5.	Funktionelle Analyse der EHTs .....	49
2.4.6.	Ernten der EHTs .....	51
2.4.7.	RNA-Isolierung aus EHTs .....	51
2.4.8.	Protein-Isolierung aus EHTs.....	51
2.4.9.	Immunfluoreszenz der EHTs.....	51
<b>2.5.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>52</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1.</b>	<b>Genexpression von <i>Asb2β</i> und <i>S100A4</i> .....</b>	<b>53</b>
3.1.1.	mRNA-Konzentration im Tiermodell der hypertrophen Kardiomyopathie .....	53
3.1.2.	mRNA-Konzentration im Tiermodell der dilatativen Kardiomyopathie.....	56
3.1.3.	mRNA-Konzentration im EHT-Modell der pathologischen Hypertrophie.....	57
<b>3.2.</b>	<b><i>S100A4</i> als Zielprotein von <i>Asb2β</i>.....</b>	<b>59</b>
3.2.1.	<i>S100A4</i> in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCs).....	59
3.2.2.	Versuche mit dem Antikörper Abcam 93283 ( <i>S100A4</i> ).....	59
3.2.3.	Versuche mit maßgeschneidertem Antikörper Eurogentec Custom <i>S100A4</i> .....	60
3.2.4.	Klonierung .....	63
3.2.5.	Amplifikation des Inserts .....	67
3.2.6.	Restriktionsverdau.....	67

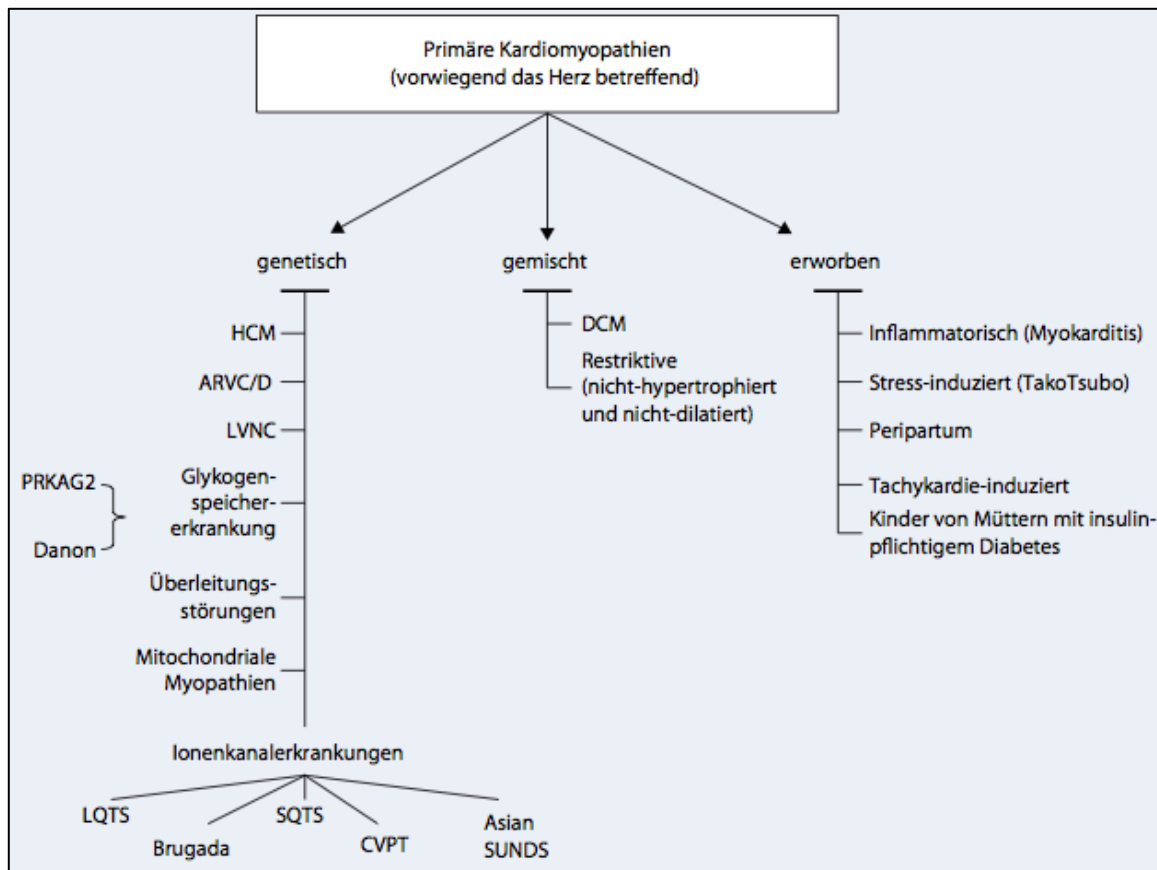
3.2.7.	Ligation und <i>Colony</i> -PCR .....	68
3.2.8.	Einzeltransfektionen .....	69
3.2.9.	Co-Transfektion .....	72
<b>3.3.</b>	<b>Effekte von S100A4 auf die EHT-Kontraktilität .....</b>	<b>76</b>
3.3.1.	Transduktion .....	76
3.3.2.	Analyse der Transduktionseffizienz <i>in vivo</i> .....	78
3.3.3.	S100A4-Proteinkonzentration in EHTs .....	81
3.3.4.	Lokalisation des überexprimierten S100A4 in EHTs.....	82
3.3.5.	Einfluss der S100A4-Überexpression auf Funktion der EHTs .....	83
3.3.6.	Einfluss der S100A4-Überexpression auf die Genexpression der EHTs.....	86
3.3.7.	Ergebnisse des Wiederholungsversuchs .....	90
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1.</b>	<b>Charakterisierung von Asb2<math>\beta</math> und S100A4 im Herzen.....</b>	<b>95</b>
4.1.1.	Genexpression von Asb2 $\beta$ .....	95
4.1.2.	Genexpression von S100A4.....	97
<b>4.2.</b>	<b>Strategie-Wechsel: Co-Transfektion .....</b>	<b>100</b>
<b>4.3.</b>	<b>Die funktionelle Rolle von S100A4 in künstlichem Herzgewebe.....</b>	<b>103</b>
4.3.1.	Lokalisation .....	103
4.3.2.	Einfluss auf funktionelle Parameter in EHTs.....	105
<b>4.4.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>108</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>122</b>
<b>8.</b>	<b>VERWENDETE LÖSUNGEN UND MATERIALIEN .....</b>	<b>125</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>127</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>128</b>
<b>11.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>129</b>

## **1. Einleitung**

Herz-Kreislauf-erkrankungen waren im Jahr 2012 für ca. 14 Millionen Todesfälle weltweit verantwortlich. In der Europäischen Union stirbt aktuell jeder Zweite an den Folgen von auf Arteriosklerose beruhenden Erkrankungen, wie arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit oder Schlaganfall (WHO, 2014). Neben diesen klassischen Krankheitsbildern gibt es jedoch weitere Erkrankungen des Herzens, die auch und vor allem jüngere Menschen betreffen. Zu diesen gehört die heterogene Gruppe der Kardiomyopathien.

### **1.1. Systematik der Kardiomyopathien**

Die WHO definierte den Begriff Kardiomyopathie 1980 noch unsicher als „Gruppe von Herzmuskelerkrankungen unklarer Genese“ (1980) und führte 1996 erstmalig die konkreten Bezeichnungen dilatative (DCM), hypertrophe (HCM), restriktive und arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ein (Richardson et al. 1996). Eine heute allgemein anerkannte Klassifikation (s. Abbildung 1) stammt von der *American Heart Association* und teilt die Kardiomyopathien zunächst nach Genese in primäre und sekundäre Formen ein. Zu den sekundären Formen werden all die Kardiomyopathien gerechnet, bei denen das Herz auf Grund einer systemischen Erkrankung mitbeteiligt ist. Primäre Kardiomyopathien werden nach Ätiologie in genetische, erworbene und Mischformen unterteilt (Maron et al. 2006).



**Abbildung 1: Klassifikation primärer Kardiomyopathien.** Primäre Kardiomyopathien betreffen primär das Herz und beruhen nicht auf einer systemischen Grunderkrankung. Die Abbildung zeigt die Klassifikation primärer Kardiomyopathien anhand ihrer Ätiologie. Die HCM ist eine genetische primäre Kardiomyopathie (Maron et al. 2006, Elliott et al. 2008).

Dass wenig später von der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) eine alternative Einteilung vorgeschlagen wurde, in der die Praktikabilität der ursprünglichen Klassifikation in Frage gestellt wird (Elliott et al. 2008), zeigt die Komplexität der Systematik. Da in dieser Arbeit hauptsächlich die HCM thematisiert wird, ist im Folgenden nur diese Form der Kardiomyopathien näher beschrieben.

## 1.2. Hypertrophe Kardiomyopathie

In ihren kürzlich erschienen neuen Richtlinien definiert die ESC die HCM als das Vorliegen einer Hypertrophie der linksventrikulären Herzwand, das nicht allein auf pathologische Belastung des Ventrikels – etwa arterielle Hypertonie oder Defekte auf Klappenebene – zurückzuführen ist. Diagnostisches Kriterium im adulten Herzen ist eine Septumdicke von  $\leq 15\text{mm}$  bzw.  $\leq 13\text{mm}$  bei Verwandten ersten Grades Betroffener. Die Art der Bildgebung spielt hierbei keine Rolle (Elliott et al. 2014).

### **1.2.1. Epidemiologie der HCM**

Epidemiologische Studien haben ergeben, dass die HCM mit einer Prävalenz von mindestens 1:500 zu den häufigen angeborenen Herzerkrankungen gehört (Maron et al. 1995). Die HCM ist eine globale Erkrankung die beide Geschlechter gleichsam betrifft (Olivotto et al. 2005) und in verschiedenen Ethnien auftritt (Maron et al. 2003). Die Mortalität auf Grund von kardiovaskulären Ereignissen beträgt 1,4%/Jahr (Efthimiadis et al. 2014b).

Diese epidemiologischen Daten stehen in ausgeprägtem Widerspruch zum klinischen Alltag, in dem die HCM deutlich seltener erkannt wird, so dass sie als unterdiagnostizierte Erkrankung eingestuft werden kann (Maron und Maron 2013). Gründe hierfür sind das unspezifische klinische Erscheinungsbild sowie die komplexen Zusammenhänge von Genotyp und Phänotyp.

### **1.2.2. Symptome der HCM**

Die klinischen Symptome der HCM sind häufig unspezifisch. Sie reichen von leichten pektanginösen Beschwerden, Schwindel und Dyspnoe bis hin zu ventrikulären Arrhythmien und dem gefürchteten plötzlichen Herztod (*sudden cardiac death*, SCD, Herold et al. 2014). Diese Komplikation tritt gehäuft bei jungen, sportlich aktiven HCM-Patienten auf und ist fatalerweise nicht selten Erstmanifestation der Erkrankung (Spirito et al. 2000). Im Verlauf kann sich die HCM, mit oder ohne Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts (LVOT), wie eine klassische Herzinsuffizienz präsentieren oder über eine Hypertrophie auf Vorhofebene zu Vorhofflimmern und einem erhöhten Schlaganfall-Risiko führen (Maron et al. 2014). Gerade weil die HCM einen so unterschiedlichen Verlauf annehmen kann, gehört neben der Identifikation Betroffener die Risikostratifizierung für das Auftreten von Komplikationen zur Hauptaufgabe in der Klinik.

### **1.2.3. Diagnostik der HCM**

Im EKG Betroffener sind tiefe Q-Zacken, ST-Strecken-Hebungen, T-Wellen-Negativierungen und eine Zunahme von Dauer und Amplitude der QRS-Komplexe die Korrelate von linksventrikulärer Hypertrophie, Myokard-Fibrose und



Wandbewegungsstörungen und erlauben Aussagen über Krankheitsprogress und das Auftreten unterschiedlicher Komplikationen (Zhang et al. 2014). Die erhöhte QRS-Amplitude ist nicht nur die häufigste Abnormalität, sondern stellt auch einen gesonderten Risikofaktor für SCD dar (Ostman-Smith et al. 2010).

Echokardiographisch hat in der initialen Diagnostik die linksventrikuläre Septumhypertrophie die höchste Relevanz. Eine Septumdicke von  $\geq 15$  mm ist Voraussetzung für die Diagnose der HCM. Aber auch das genaue Ausmaß dieser Septumhypertrophie ist für die Prognose wichtig: Spirito et al. konnten zeigen, dass eine Hypertrophie von  $\geq 30$  mm besonders häufig in jungen, asymptomatischen Patienten auftritt und gleichzeitig mit einem deutlich erhöhten Risiko für SCD assoziiert ist (Spirito et al. 2000). Ebenso wichtig ist die Dokumentation der linksventrikulären Funktion mittels Echokardiographie im Verlauf der Erkrankung, da eine globale systolische Dysfunktion mit Ejektionsfraktion von  $< 50\%$  für ein Spätstadium der HCM spricht und mit einem deutlichen Anstieg der Mortalität auf  $11\%$ / Jahr assoziiert ist (Harris et al. 2006). Weitere echokardiographische Merkmale der HCM sind ein verlagertes anteriores Mitralsegel, welches in der Systole eine Bewegung in Richtung Septum vollzieht und so den LVOT einengt, sowie ein damit verbundener Ruhedruckgradient im LVOT (Klinische Kardiologie, Erdmann, Springer-Verlag 2011).

Das Kardio-MRT gehört zum Goldstandard in der HCM-Diagnostik. Wegen seines hohen Weichteilkontrastes eignet es sich zur Darstellung morphologischer Auffälligkeiten, wie subaortalen Obstruktionen des Ausflusstraktes, pathologischer Konfiguration der Papillarmuskeln oder apikaler Herzwandaneurysmata und ist der Echokardiographie besonders in der Diagnostik bestimmter Lagevarianten der Hypertrophie überlegen (Valente et al. 2013). Mittels Stress-Perfusions-MRT lassen sich *Mismatch* von Koronardurchblutung und Wandbewegung sowie eine Störung der Mikrovaskularisation darstellen (Zhang et al. 2014). Gadolinium als MRT-Kontrastmittel liefert mittels Analyse des sog. *Late-Gadolinium-Enhancement* entscheidende Informationen über das Vorhandensein einer myokardialen Fibrose, welche mit einer erhöhten Mortalität und einem tendenziell erhöhten Risiko für SCD assoziiert ist (Green et al. 2012). Außerdem kann die HCM mittels Kardio-MRT von phänotypisch ähnlichen Erkrankungen wie Morbus Fabry (lysosomale Speicherkrankheit) und kardialer Amyloidose unterschieden werden (Syed et al. 2010, Sado et al. 2013).

#### 1.2.4. Genetik der HCM

Die HCM ist die häufigste monogenetische Herzkrankheit und schon 1990 wurde die erste mit HCM assoziierte Mutation auf dem Gen für die  $\beta$ -Isoform der schweren Myosin-Kette (*MYH7*) identifiziert (Geisterfer-Lowrance et al. 1990). Mittlerweile sind ca. 1400 Mutationen auf insgesamt 25 verschiedenen Genen (davon 10 sog. Major-Gene) bekannt, von denen die Mehrzahl einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster folgt (Schneider et al. 2008, Schlossarek und Carrier 2011, Seidman und Seidman 2011). *De novo* Mutationen und autosomal-rezessive Erbgänge sind verhältnismäßig selten. Der Großteil der zu HCM führenden Mutationen betrifft entweder *MYH7* oder *MYBPC3*, das für das kardiale Myosin-Bindeprotein C kodiert (Maron et al. 2012). Da die meisten identifizierten Mutationen Gene des Sarkomers betreffen, wird die HCM auch als Erkrankung des Sarkomers bezeichnet.

Das Verhältnis von Genotyp zu Phänotyp ist deutlich komplexer als zunächst vermutet: Zum einen wird nur bei etwa der Hälfte aller HCM-Patienten eine der bekannten Mutationen nachgewiesen (Ho et al. 2015). Dies spricht dafür, dass noch nicht alle Mutationen bekannt sind (Richard et al. 2003, Ackerman et al. 2011). Zum anderen bedeutet ein positiver Genotyp nicht zwingend, dass der/die Betroffene auch an einer HCM erkrankt. Häufig weisen Träger einer bestimmten Mutation zwar phänotypische Auffälligkeiten wie ungewöhnlich konfigurierte Mitralsegel oder myokardiale Narben auf (Maron et al. 2011) und können sogar letale Komplikationen einer HCM entwickeln (Christiaans et al. 2009), doch kann die linksventrikuläre Hypertrophie auch vollständig fehlen, so dass keine klinische Diagnostik möglich ist. Interessanterweise betrifft dies nicht nur beliebige Träger der gleichen Mutation, sondern tritt auch innerhalb einer Familie zwischen zwei Mutationsträgern auf (Ciro et al. 1983). Somit kann eine mit der HCM-assoziierte Mutation nicht einfach als benigne oder maligne eingestuft werden; weitere Mechanismen müssen für den Übergang von Genotyp zu Phänotyp verantwortlich sein.

Eine wichtige Rolle spielt die Anzahl der Mutationen sowie ihre Allel-Konstitution. Homozygote Merkmalsträger erkranken früher an einer ausgeprägten HCM und besitzen eine deutlich gesteigerte Tendenz zum Progress sowie ein erhöhtes Risiko für Komplikationen. Gleiches gilt für Betroffene mit mehr als einer heterozygoten Mutation

in verschiedenen Genen und für Träger einer *compound*-Heterozygotie, bei denen zwei Allele im gleichen Gen an unterschiedlichen Loci mutiert sind (Kelly und Semsarian 2009).

Auch die Art der Mutation nimmt entscheidend Einfluss auf den Phänotyp. *Missense*-Mutationen, welche häufig im *MYH7* Gen zu finden sind, führen über eine Punktmutation zum Austausch einer Aminosäure bei erhaltenem Leseraster. Je nach Genlocus und Aminosäure ist das Proteinprodukt in seiner Funktion eingeschränkt, wird aber dennoch synthetisiert und im Sarkomer eingebaut. Mutationen im *MYBPC3* führen hingegen häufig zu auffallend niedrigen Konzentrationen von mRNA und Protein auf Grund einer Verschiebung des Leserasters oder eines sofortigen Abbruchs der Translation (*Nonsense*- oder auch *Truncating*-Mutation). Da dieser Ausfall durch das nicht betroffene Allel zum Teil kompensiert werden kann, besitzen heterozygote Träger einer Mutation im *MYBPC3* häufig eine bessere Prognose als Träger von *MYH7* Mutationen (Carrier et al. 2010).

Eine weitere entscheidende Rolle bei der Übersetzung von Genotyp zu Phänotyp spielen posttranslationale Modifikationen, bei denen die fertige Peptidsequenz durch sehr vielfältige Reaktionen prozessiert wird. Zu diesen gehört auch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).

### **1.2.5. Histopathologie der HCM**

Trotz moderner bildgebender Verfahren stellt die Pathologie noch immer einen Eckpfeiler in der Diagnostik der HCM dar. Auch zum besseren Verständnis soll daher kurz auf die mikroskopischen Charakteristika der HCM eingegangen werden.

Histologisch fallen drei Hauptmerkmale auf: Hypertrophie der Kardiomyozyten, ungeordnete Myofibrillen und interstitielle Fibrose. Ein normaler Kardiomyozyt besitzt einen Durchmesser von etwa 10-15 µm und einen einzelnen mittig angeordneten Zellkern. In Proben von HCM-Patienten hingegen sind die Myozyten auf über 40 µm verbreitert und weisen oft vergrößerte, pleomorphe und hyperchrome Kerne auf. Diese vergrößerten Kardiomyozyten bilden ungeordnete Myofibrillen, die schräg oder senkrecht zueinander stehen. Dieser Befund grenzt die HCM von anderen

druckbedingten Pathologien wie etwa der hypertensiven Herzkrankheit oder der Aortenklappenstenose ab (Hughes 2004, Kocovski und Fernandes 2015). Besonders auffällig ist die Ausdehnung des interstitiellen Raums. Dysplastische Koronarien besitzen eine durch Proliferation glatter Muskelzellen und Einlagerung von Kollagen verdickte Wandstruktur und sind ein typisches Merkmal der HCM (Maron et al. 1986). Shirani et al. konnten im Ventrikelseptum von an SCD verstorbenen HCM-Patienten eine achtfache Zunahme des interstitiellen Kollagens feststellen. Dies ist ein klassischer Vorbefund einer manifesten Fibrose und ein Hinweis darauf, dass nicht nur pathologische Sarkomerproteine, sondern auch Prozesse im Bindegewebe eine Rolle bei der Entstehung der HCM spielen (Shirani et al. 2000).

### **1.2.6. Therapie der HCM**

Die Therapie der HCM ist sehr komplex und hängt entscheidend von Symptomatik sowie dem Risiko für Komplikationen ab. Zu den konservativen Maßnahmen gehören einerseits die Vermeidung von sportlichen Maximalbelastungen, welche das Auftreten maligner Arrhythmien begünstigen (Maron et al. 2009), andererseits die medikamentöse Therapie. Der Fokus liegt hierbei auf einer Entlastung des linken Ventrikels, etwa mit Hilfe von Beta-Adrenozeptor-Antagonisten und Calcium-Kanal-Antagonisten vom Verapamil-Typ. Bei Vorliegen einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes sind Vor- und Nachlast senkende Medikamente, die den Druckgradienten erhöhen, ebenso wie positiv inotrop wirkende Stoffe absolut kontraindiziert. Kann eine Obstruktion auch unter Belastung sicher ausgeschlossen werden, sollten HCM-Patienten mit einer Ejektionsfraktion (EF) <50% nach den Therapie-Richtlinien der chronischen Herzinsuffizienz behandelt werden (Elliott et al. 2014). Ab einem Ruhegradienten von >30 mm Hg ist eine invasive Therapie indiziert: Bei der transkoronaren Ablation der Septumhypertrophie (TASH) wird mittels Koronarangiographie iatrogen ein Infarkt in einem septalen Ast des *Ramus interventricularis anterior* gesetzt. Alternativ kann mittels Radiofrequenzkatheterablation gezielt ein Gewebsuntergang im Septum herbeigeführt werden. Beide Maßnahmen führen zu einer Vernarbung der Obstruktion und somit zu einer Reduktion des Druckgradienten. Außerdem ermöglicht die operative Entfernung überschüssigen Muskelgewebes mittels Myektomie eine Verringerung der linksventrikulären Obstruktion. Primärpräventiv werden Patienten mit einem hohen

Risiko für maligne Herzrhythmusstörungen mit einem implantierbaren Kardioverter-Defibrillator (ICD) versorgt.

In experimentellen Untersuchungen in einem HCM-Mausmodell konnte mittels Transduktion adenoassoziierter Viren der HCM-Phänotyp erfolgreich und langfristig positiv beeinflusst werden (Mearini et al. 2014). Vorherige Ansätze der kausalen Therapie hatten stets die mutierte prä-mRNA zum Ziel, wie etwa mittels exon-skipping (Gedicke-Hornung et al. 2013) oder trans-splicing (Mearini et al. 2013), erwiesen sich jedoch als nicht effizient genug, um den Phänotyp zu verbessern. Mearini et al. konnte durch den Gentransfer mittels adenoassoziierter Viren jedoch nicht nur die Haploinsuffizienz beeinflussen, sondern gleichzeitig die Menge toxischer mRNA verringern (Mearini et al. 2014). Diese sog. Gentherapie stellt die bislang einzige kausale Therapieoption für diese ansonsten nur symptomatisch zu therapierende Erkrankung dar und wird in Zukunft mit Sicherheit noch an Bedeutung gewinnen.

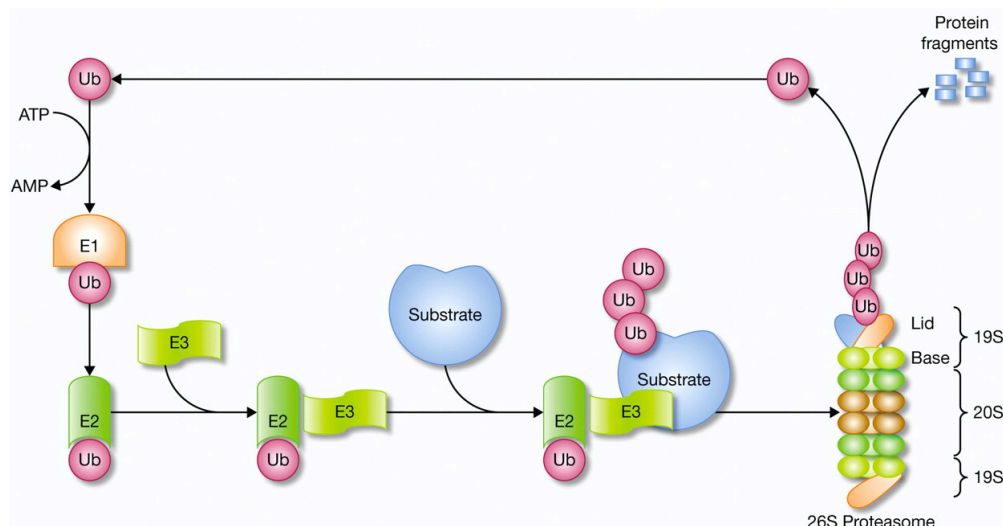
### **1.3. Das Ubiquitin-Proteasom-System**

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein zentraler Bestandteil jeder eukaryotischen Zelle und entscheidend für ihre Funktion. Bereits 1975 beschrieb Goldstein ein Protein, das er auf Grund seiner Verbreitung und Funktion *ubiquitous immunopoietic polypeptide (UBIP)* nannte (Goldstein et al. 1975). Für ihre Arbeiten, die entscheidend zur Charakterisierung des UPS beitrugen, erhielten Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose 2004 den Nobelpreis für Chemie.

#### **1.3.1. Reaktionsablauf und Bedeutung des UPS**

Die Regulation des Proteoms ist in eukaryotischen Zellen von höchster Bedeutung. Als Schutz vor intrinsischer Toxizität durch falsch gefaltete oder anders geschädigte Proteine, aber auch als Anpassungsreaktion auf veränderte Umweltbedingungen oder im Rahmen regulär ablaufender Prozesse werden ca. 90% aller Proteine durch das UPS degradiert, ca. 30% davon sogar binnen der ersten Minuten nach ihrer Synthese (Schubert et al. 2000). Die 96%ige Sequenzhomologie des Ubiquitins im Genom von Mensch und Hefe unterstreicht das evolutionäre Alter und damit die Bedeutung dieses Proteins.

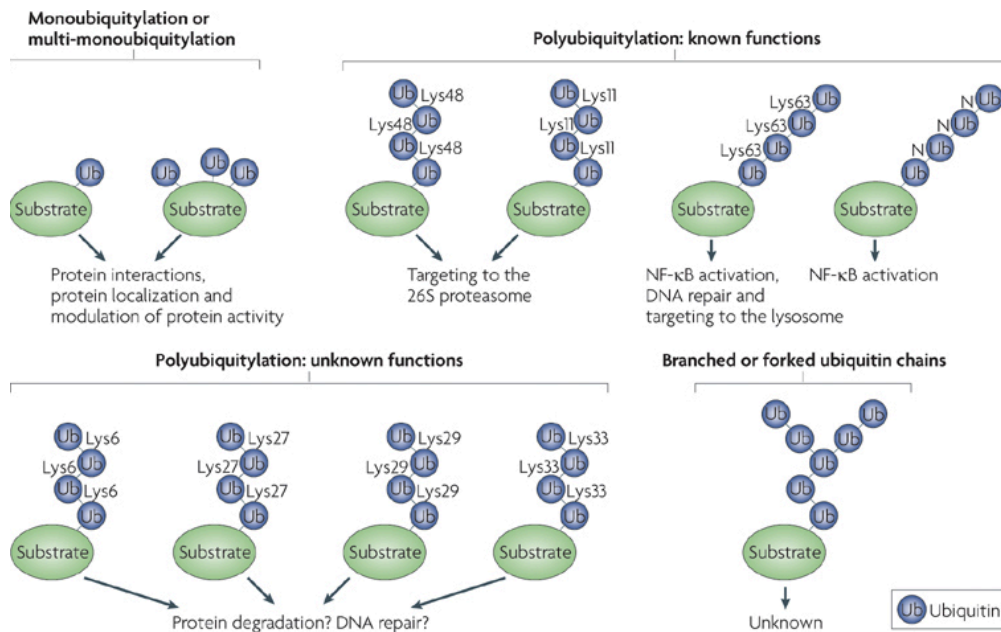
Der Abbau von Proteinen im UPS erfolgt in zwei Hauptschritten (s. Abbildung 2). Zunächst wird das Zielprotein mit mehreren Ubiquitin-Molekülen markiert. Durch diese Markierung erfolgt schließlich die Degradierung des Zielproteins im 26S Proteasom. Eine Kaskade von drei Proteinen ist für den ersten Schritt verantwortlich. Zunächst führt das Ubiquitin-Aktivierende-Enzym (E1) durch die Hydrolyse von ATP zu einer Adenylierung von Ubiquitin. Daraufhin wird das aktivierte Ubiquitin-Molekül vom Cystein-Rest des E1 auf einen Cystein-Rest eines Ubiquitin-Konjugierenden-Proteins (E2) übertragen. Schließlich bindet eine Ubiquitin-Ligase (E3) sowohl E2 und Ubiquitin, als auch das Zielprotein. Aus dem so entstehenden Komplex geht das ubiquitinierte Zielprotein hervor (Hershko und Ciechanover 1992). Strukturell lassen sich die E3-Ligasen weiter einteilen: der überwiegende Teil gehört zu den *really interesting new gene* oder kurz *RING*-Finger-E3-Ligasen. Diese Gruppe bindet E2-Ubiquitin und das Zielprotein simultan und formt so einen Komplex, aus dem das ubiquitinierte Zielprotein hervorgeht. Bei E3-Ligasen vom HECT-Typ, welche als einzige E3-Ligasen intrinsische katalytische Aktivität besitzen, erfolgt die Ubiquitinierung über einen Zwischenschritt (Bernassola et al. 2008, Mund et al. 2014). Eine dritte, seltene und vergleichsweise schlecht charakterisierte Gruppe bilden die U-Box-E3-Ligasen. Gemeinsam haben alle drei Gruppen, dass am Ende der Reaktion ein Ubiquitin-Molekül an das Zielprotein gebunden ist. Für eine Erkennung des Substrats durch das 26S Proteasom ist eine Kette von mindestens vier Ubiquitin-Molekülen erforderlich (Thrower et al. 2000). Im Anschluss an die Degradation des Zielproteins kann Ubiquitin recycelt werden.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Reaktionsablaufs im UPS.** Ubiquitin-Moleküle (Ub) werden von Ubiquitin-Aktivierende-Enzym (E1) unter Verbrauch von ATP aktiviert und auf ein Ubiquitin-Konjugierendes-Protein (E2) übertragen. E3-Ubiquitin-Ligasen (E3) verbinden das Substrat mit dem aktivierten Ubiquitin und markieren es so für den Abbau im 26S-Proteasom. Dieses besteht aus einer 20S-Kern-Untereinheit und zwei 19S Untereinheiten. Ubiquitin verlässt das Proteasom unbeschadet und wird erneut in den Zyklus eingeschleust (Rahimi 2012).

Den Feinschliff erhält dieses System durch die Vielfalt der beteiligten Proteine. So sind im Menschen zwar nur zwei verschiedene E1-Proteine bekannt (Groettrup et al. 2008), diese können jedoch das Ubiquitin auf 35 verschiedene E2-Proteine transferieren, welche ihren Bindungspartner aus vermutlich über 1000 E3-Ligasen wählen (Varshavsky 2006). Jede E3-Ligase erkennt wiederum nur einige wenige Substrate. So stellen sie die Spezifität des gesamten Systems sicher.

Doch das UPS ist noch komplexer: Zu den Substraten von E3-Ligasen gehören auch E2- und E3-Proteine selbst. Außerdem bestimmen sowohl die Anzahl der Ubiquitin-Moleküle als auch der Ligationsort auf der Peptidsequenz des Zielproteins und die Form der so entstehenden Kette(n) über den weiteren Ablauf (s. Abbildung 3). Die Degradation des ubiquitinierten Proteins im Proteasom ist bei weitem nicht der einzige Endpunkt. So wird vorstellbar, wie das UPS an so verschiedenen Vorgängen wie Zellzyklus und Apoptose, DNA-Transkription, Rezeptor- und Ionenkanal-Modulierungen, Sekretionsvorgängen und viralen Infektionen beteiligt sein kann (Hicke 2001, Komander und Rape 2012).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung bekannter Ubiquitin-Ketten und ihrer Funktion.** Die Bindung eines oder mehrerer Ubiquitin-Moleküle kann verschiedene Folgen für das Substrat haben: Polyubiquitinierung mit an Lysin-48 verknüpften Ketten führt zur Degradation im 26S-Proteasom (obere Reihe Mitte). Nicht alle Funktionen der verschiedenen Kettentypen sind bekannt. Ohne einzeln auf die anderen Kettenformen einzugehen wird ersichtlich, wie ausgesprochen vielfältig und komplex das UPS agiert (Marston et al. 2012).

Das Proteasom lässt sich durch Zugabe von Inhibitoren hemmen. Zu den reversiblen Hemmstoffen gehören MG132, das vornehmlich für Untersuchungen *in vitro* verwendet wird und MG262, besser bekannt als Bortezomib, welches in der Therapie des Multiplen Myeloms zum Einsatz kommt. Zu den irreversiblen Proteasom-Inhibitoren gehören  $\beta$ -Lacton und Epoxomicin, welches erstmals 1992 aus einem *Actinomyces*-Stamm isoliert werden konnte (Hanada et al. 1992). Alle Proteasom-Inhibitoren wirken an den  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Kernpartikels, der zentralen Untereinheit des 26S-Proteasoms. Sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell haben sich Proteasom-Inhibitoren bereits als vielversprechende Wirkstoffe für die Behandlung von kardialer Hypertrophie erwiesen (Grigorian et al. 2001, Hedhli und Depre 2010). Ein Problem bleibt jedoch weiterhin ihre Toxizität.

### 1.3.2. Das UPS und die hypertrophe Kardiomyopathie

Die HCM wird durch eine *a priori* Hypertrophie des linken Ventrikels definiert. Da Hypertrophie generell durch einen erhöhten Proteingehalt entsteht und das UPS für 90%

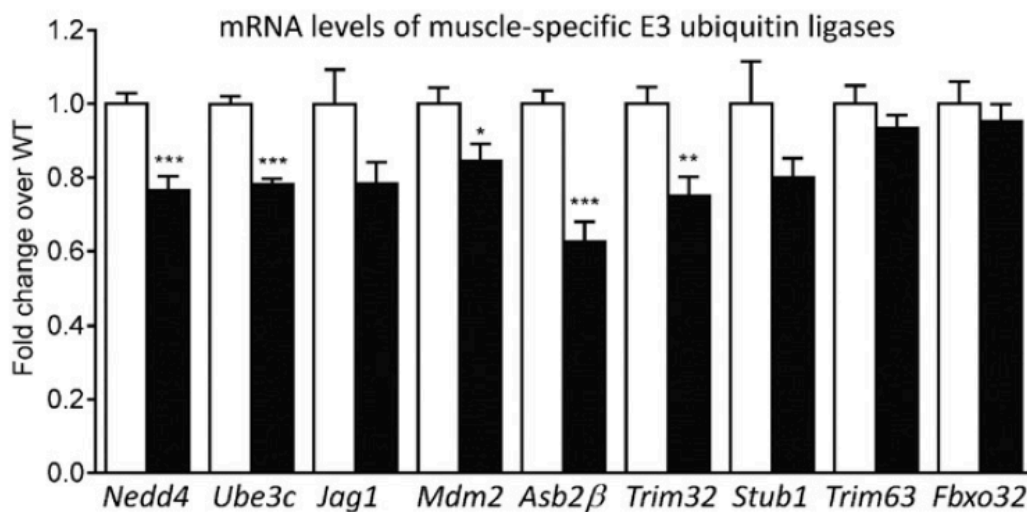


des intrazellulären Proteinabbaus verantwortlich ist, liegt die Vermutung einer kausalen Verbindung nahe.

Mutationen in *MYBPC3* führen in der Regel zu einem Abbruch der Translation und einem entsprechend verkürzten cMyBP-C. Die Analyse von cMyBP-C-Mutanten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erbrachte Hinweise auf einen Beitrag des UPS zur Pathophysiologie der HCM. So konnten in kardialen Gewebeproben von heterozygoten Trägern einer *MYBPC3* Mutation keine entsprechend verkürzten Proteine nachgewiesen werden, was für einen Abbau durch das UPS spricht (van Dijk et al. 2009). Sarikas und Carrier et al. konnten zeigen, dass in neonatalen Rattenkardiomyozyten mittels Adenovirus zwar eine angemessene Konzentration einer cDNA mit *MYBPC3*-Mutation erreicht wurde, jedoch kein Proteinäquivalent nachweisbar war (2005). Erst die Inhibition des UPS durch Zugabe von MG132 führte zum Nachweis der verkürzten Proteine (Sarikas et al. 2005).

Ein von Prof. Lucie Carrier entwickeltes Mausmodell mit einer Punktmutation in *Mybpc3* lieferte die Grundlage für weitere Erkenntnisse in der Beziehung zwischen HCM-Phänotyp und UPS-Funktion. Verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Mäusen (WT) besitzen die für diese Mutation homozygoten Tiere (KI-Mäuse) im Alter von drei Monaten klassische Merkmale einer HCM wie linksventrikuläre Hypertrophie, interstitielle Fibrose und eine diastolische Dysfunktion (Vignier et al. 2009, Fraysse et al. 2012). Bei Untersuchungen der UPS-Aktivität in KI-Mäusen konnte unmittelbar postnatal sowie in den ersten Lebenswochen eine erhöhte Aktivität des UPS festgestellt werden, ab einem bestimmten Alter war die UPS-Aktivität jedoch vermindert. Vermutlich führt ein erhöhter *turnover* der mutierten Proteine zu einer Verstopfung oder Abnutzung des UPS (Schlossarek et al. 2012a). Interessanterweise besitzen heterozygote Mutanten dieses Mausmodells (Het-KI) zwar einen unauffälligen Phänotyp, dieser kann jedoch durch adrenerge Stimulation demaskiert werden: Gleichzeitig mit dem Auftreten von septumbetonter linksventrikulärer Hypertrophie konnte eine Störung des UPS festgestellt werden (Schlossarek et al. 2012c). Außerdem weisen diese heterozygoten Tiere bereits früh eine erhöhte Calcium-Sensitivität, schnelleren Calcium-Abbau und eine diastolische Dysfunktion auf (Fraysse et al. 2012). Diese Befunde sind eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung des UPS an der Entstehung von HCM.

Wegen ihrer entscheidenden Position innerhalb des UPS sind die E3-Ligasen in den wissenschaftlichen Fokus gelangt. Es existieren muskelspezifische Formen dieser E3-Ligasen und es ist bereits gelungen, bestimmten E3-Ligasen ihre Substrate zuzuordnen. Naturgemäß sind diejenigen Substrate von Interesse, die in der Pathogenese einer Erkrankung eine wichtige Rolle spielen. Für das Proteinprodukt einer humanen *MYBPC3* Mutation konnte Atrogin-1 als E3-Ligase identifiziert werden (Mearini et al. 2010). Im bereits beschriebenen Mausmodell der HCM konnte auf Genexpressionsebene die Herunterregulation einer weiteren E3-Ligase namens *Asb2 $\beta$*  festgestellt werden (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4: mRNA Expression muskelspezifischer E3-Ubiquitin-Ligasen im Herzen** (Thottakara et al. 2015). Die Abbildung zeigt die Quantifizierung der mRNA-Konzentration verschiedener muskelspezifischer E3-Ligasen in 9 Wochen alten *Mybpc3*-KI- (schwarz) bzw. WT-Mäuse (weiß). Die mRNA-Konzentrationen (relativ zum WT) wurden mittels quantitativer PCR in Ventrikelgewebe neun Wochen alter *Mybpc3*-KI- bzw. WT-Mäusen erhoben. Die Daten sind angegeben als Mittelwert +SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. WT, Student-t-test für ungepaarte Stichproben,  $n = 8$  pro Gruppe.

### 1.3.3. Die E3-Ligase *Asb2 $\beta$*

*Asb2 $\beta$*  steht für die  $\beta$ -Isoform von *ankyrin repeat-containing protein with a suppressor of cytokine signaling box 2*, einer E3-Ligase, die im Menschen spezifisch in Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert wird (Bello et al. 2009). Mittlerweile sind mit Desmin und Filamin B bereits zwei Substrate von *Asb2 $\beta$*  identifiziert worden (Bello et al. 2009, Thottakara et al. 2015). Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung eines weiteren Substrates der E3-Ligase *Asb2 $\beta$* . Im folgenden Abschnitt wird kurz auf den aktuellen Forschungsstand zur Rolle von *Asb2 $\beta$*  eingegangen.

## **1.4. Vorergebnisse**

Die am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des UKE in der Arbeitsgruppe Carrier durchgeführten Voruntersuchungen bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Um neue Zielproteine von Asb2 $\beta$  zu identifizieren, wurden zwei Adenoviren produziert: Adeno-Asb2 $\beta$ -WT führt zu einer Überexpression der intakten Variante von Asb2 $\beta$ . Adeno-Asb2 $\beta$ -Mut enthält an der F-Box von Asb2 $\beta$ , einer für die Erkennung des Zielproteins kritischen Stelle, eine Punktmutation und kodiert so eine inaktive Form von Asb2 $\beta$ . Neonatale Mauskardiomyozyten (NMCM) wurden jeweils mit einem der Viren transduziert und ihr Proteom nach 48 h Inkubation untersucht. In der Annahme, dass die inaktive Form von Asb2 $\beta$  ihre Zielproteine nicht für den Abbau im Proteasom markieren kann, galten in der entsprechend behandelten NMCM-Gruppe deutlich höher konzentrierte Proteine als aussichtsreiche Kandidaten für Asb2 $\beta$ -Zielproteine.

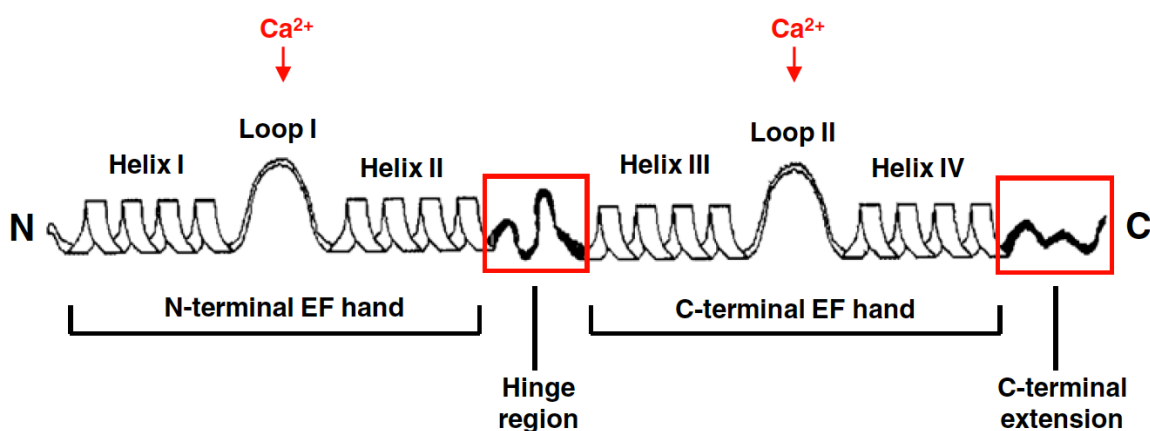
Die Analyse der Proteome beider Gruppen erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen sowohl durch Massenspektrometrie als auch durch 2D-Gelelektrophorese und brachte eine große Menge unterschiedlich konzentrierter Proteine hervor. Thottakara und Friedrich et al. konnten durch diese und durch Kontrolluntersuchungen bereits Desmin als Zielprotein von Asb2 $\beta$  identifizieren (Thottakara et al. 2015). Den stärksten Konzentrationsunterschied zwischen mit Adeno-Asb2 $\beta$ -WT behandelten Kardiomyozyten und der Adeno-Asb2 $\beta$ -Mut-Gruppe zeigte das Protein S100A4, ein Mitglied der S100-Proteinfamilie.

## **1.5. S100-Proteine**

### **1.5.1. Struktur und Funktion**

S100 ist der Oberbegriff für eine Proteinfamilie, die zum ersten Mal 1965 von Moore beschrieben und auf Grund ihrer Löslichkeit in 100% gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung benannt wurde (Moore 1965). Der Zusatz S100A, S100B usw. beschreibt in der Nomenklatur den Genlocus des entsprechenden Mitglieds; so finden sich alle Gene der Untergruppe S100A auf Chromosom 1q21 (Schafer et al. 1995). Mittlerweile sind über 25 verschiedene S100-Proteine beschrieben.

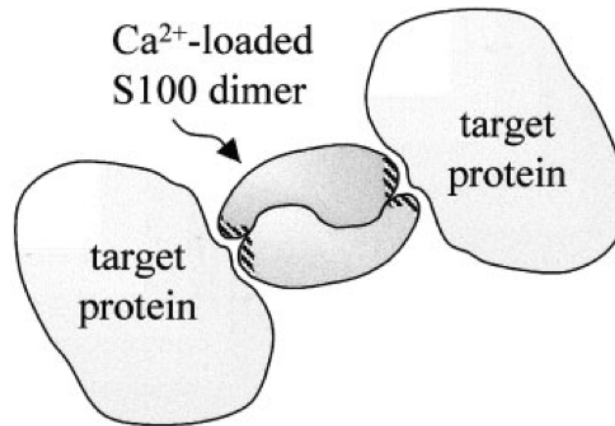
Strukturell ähneln sich alle S100-Proteine: Sie sind zwischen 9 und 13 kDa groß und besitzen zwei Calcium-Bindungsstellen vom EF-Hand Typ, ein *Helix-Loop-Helix*-Motiv, das auch in anderen Calcium bindenden Proteinen wie Calmodulin und Troponin T zu finden ist. Die näher am C-Terminus befindliche Calcium-Bindungsstelle weist die hoch konservierte klassische EF-Hand-Sequenz auf, wohingegen die N-terminal gelegene eine leicht veränderte Sequenz besitzt, wodurch beide Bindungsstellen Calcium mit unterschiedlich hoher Affinität binden. Beide EF-Hand-Motive werden durch die sog. *Hinge*-Region verbunden (s. Abbildung 5). Die Sequenz dieser *Hinge*-Region sowie die des C-Terminus weisen innerhalb der S100-Proteine die größte Sequenzvariabilität auf (Rohde et al. 2010) und geben einen Hinweis auf ihre Funktion im individuellen S100-Subtyp. Die Bindung von Calcium führt zu einer Konformitätsänderung und Ausbildung einer hydrophoben Tasche, an welcher sowohl *Hinge*-Region als auch C-Terminus entscheidend beteiligt sind. Da S100-Proteine keine enzymatische Aktivität aufweisen, bildet diese hydrophobe Tasche die entscheidende Struktur für die Wechselwirkung von S100 mit anderen Proteinen und bestimmt damit über ihre Funktion (Zimmer et al. 2003).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von S100.** Die Abbildung zeigt ein S100A4-Molekül vom N- bis C-terminalen Ende. Die *Hinge*-Region verbindet zwei EF-Hand-Motive (*Helix-Loop-Helix*), welche je ein Calcium-Molekül binden können. Gemeinsam mit dem C-Terminus stellt die *Hinge*-Region den funktionell entscheidenden Abschnitt des jeweiligen S100-Proteins dar (hier rot umrandet). Die verschiedenen S100-Proteine weisen dort die größte Sequenzvariabilität auf (Rohde et al. 2010).

Eine weitere Eigenschaft der S100-Proteine ist ihre Tendenz, sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden. Zwei S100-Proteine legen sich symmetrisch und antiparallel zusammen und werden über nicht-kovalente Bindungen zwischen den jeweiligen Helices I und IV zusammengehalten. Diese Dimerisierung verstärkt möglicherweise die Bindungsaffinität der Monomere. Ein solches Dimer ist nun in der Lage, an

gegenüberliegenden Seiten je ein Effektorprotein zu binden, beide so in funktionelle Nähe zueinander zu bringen und ihre Aktivität zu regulieren (s. Abbildung 6). Da dieser Prozess in der Regel Calcium-abhängig abläuft, werden S100-Proteine auch als Calcium-Sensoren bezeichnet (Donato 2003).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktion eines S100-Proteins.** Die Dimerisierung zweier S100-Proteine, die je ein Zielprotein gebunden haben, bringt diese Zielproteine in funktionelle Nähe zueinander und reguliert so ihre Aktivität. Dieser Prozess geschieht Calcium-abhängig (Donato 2003).

Das Expressionsmuster von S100-Proteinen ist sehr spezifisch für Zellen und Gewebe und berücksichtigt deren Entwicklungsgrad. S100-Proteinen werden vielfältige Rollen in der Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose zugeschrieben. Darüber hinaus sind sie an der Zellmotilität sowie der Entstehung von Hypertrophie beteiligt und beeinflussen das intrazelluläre Calcium-Handling (Rohde et al. 2010).

### 1.5.2. S100A4

Bereits die alternative Bezeichnung ‚Metastasin‘ für S100A4 zeigt, in welchem Fachbereich es bislang die größte Rolle spielt. 1989 fanden Ebralidze et al. in verschiedenen Tumorzellen hohe Konzentrationen von S100A4-mRNA (Ebralidze et al. 1989). Mittlerweile ist S100A4 in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen als prognostischer Marker etabliert: Rudland et al. konnten zeigen, dass das mediane Überleben von Patientinnen mit Mamma-Karzinom im Frühstadium abhängig von der S100A4-Expression im Tumorgewebe von 229 auf 47 Monate sinkt (Rudland et al. 2000). Eine Metaanalyse mit über 2800 an kolorektalem Karzinom erkrankten Patienten konnte ebenfalls eine negative Korrelation von S100A4 und Gesamtüberleben zeigen (Liu et al. 2013). Vergleichbare Resultate finden sich auch in Kohorten von Patienten mit anderen Tumoren (Mishra et al. 2012).

Die exakten Prozesse, mit denen S100A4 ein Tumorwachstum begünstigt sind zwar noch nicht verstanden, jedoch sind viele seiner Interaktionspartner bereits beschrieben und geben Aufschluss über potentielle Mechanismen: Über die Bindung von Proteinen des Zytoskeletts wie Nicht-Muskel-Myosin, Aktinfilamente und Tubulin beeinflusst S100A4 die Zellmotilität und Reorganisation des Cytoskeletts (Helfman et al. 2005). Die Stabilisierung von p53 führt zu einer Selektion bestimmter Tumormutanten (Grigorian et al. 2001) und als *downstream* Effektor des TGF $\beta$ -Signalweges (*transforming growth factor*) kann S100A4 über die Hochregulierung bestimmter Matrixmetallo-Proteasen die Angiogenese begünstigen (Ambartsumian et al. 2001, Xie et al. 2009). Interessanterweise hat S100A4 nicht nur streng intrazelluläre Wirkungen, sondern kann auch parakrine Effekte hervorrufen; ein Rezeptor ist jedoch noch nicht beschrieben (Schneider et al. 2008).

Aber S100A4 besitzt noch weitere Bezeichnungen, wie z.B. *Fibroblast-specific protein* (Fsp-1). Entsprechend mehren sich die Hinweise auf eine Beteiligung von S100A4 an der Entstehung von Leberzirrhose, Lungen- und Nierenfibrose, rheumatoider Arthritis sowie kardialer Hypertrophie. Dieser heterogene Gruppe ist die pathologische Veränderung des Bindegewebes gemeinsam. In einer Übersichtsarbeit bezeichnen Schneider et al. Anpassungsreaktionen wie Fibrosierung, Wundheilung und Neovaskularisation als „physiologische Invasion“ und führen als gemeinsame Merkmale der o.g. Erkrankungen Fibrose und Entzündungsreaktionen an, für die wiederum Zellmotilität und Veränderungen der Extrazellulärmatrix entscheidende Voraussetzungen sind (Schneider et al. 2008). Mehrere Untersuchungen konnten diese Beteiligung von S100A4 an Fibrosierung bzw. Epithel-Mesenchym-Transformation zeigen (Iwano et al. 2002, Zeisberg et al. 2007).

S100A4 beeinflusst also die Aggressivität von Tumoren und spielt eine entscheidende Rolle bei der pathologischen Vermehrung von Bindegewebe. S100A4 galt lange als Standardmarker für Fibroblasten. Jedoch konnten Kong et al. zeigen, dass auch Zellen der Hämatopoese, des Endothels und der glatten Gefäßmuskulatur hohe Konzentrationen an S100A4 aufweisen (Vu Manh et al. 2005). Über die Funktion von S100A4 in Kardiomyozyten gibt es dagegen unterschiedliche Angaben.

Tamaki et al. konnten in einem Hypertrophie-Tiermodell (Dahl-Salz sensible Ratten) einen Anstieg der Konzentration sowohl von *S100A4*-mRNA als auch von *S100A4*-Proteinen feststellen. Dieser Anstieg korrelierte mit Alter und Schwere des kardialen Phänotyps. Ein si-RNA induzierter 70%iger *Knockdown* von *S100A4*-mRNA in kardialen Fibroblasten neonataler Ratten führte zu einer Herunterregulierung profibrotischer Gene wie *Col1a1*, *Col3a1*, *Fibronectin 1* und *Ctgf*. Die in der gleichen Arbeit untersuchten *S100A4*-KO-Mäuse wiesen keinen auffälligen Phänotyp unter Ruhebedingungen auf. Diese Mäuse reagierten auf eine transversale Konstriktion der Aorta mit weniger interstitieller Fibrose und zeigten keine Hochregulation der o. g. profibrotischen Gene (Tamaki et al. 2013). In einem weiteren Tiermodell korrelierte eine durch Isoprenalin - einem Noradrenalinderivat und klassischen Aktivator von  $\beta$ -Adrenozeptoren - induzierte kardiale Hypertrophie (+30%) mit einer Zunahme der *S100A4* Konzentration auf immunhistochemischer Ebene (Inamoto et al. 2000).

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Schneider et al., welche die Konzentration von *S100A4* in zwei Tiermodellen und in explantierten Herzen von an ischämischer Kardiomyopathie leidenden Patienten untersucht haben. So fand sich in kardialen Gewebeproben von Ratten, bei denen ein Infarkt gesetzt worden war, ebenso wie in den menschlichen Proben eine erhöhte Konzentration von *S100A4*. Diese war am Rand des Infarktes am höchsten, jedoch konnte *S100A4* nur im Bindegewebe und ausdrücklich nicht in Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten die Ursache hierfür in der Bindung bzw. der Aufnahme von parakrin sezerniertem *S100A4* in die Kardiomyozyten. *In vitro* konnten sie diese Aufnahme von *S100A4* in neonatale Rattenkardiomyozyten bestätigen, indem sie dem Zellmedium rekombinantes *S100A4* zugaben und dieses kurz darauf in intrazellulären Vesikeln nachwiesen. Darüberhinaus führte das in Kardiomyozyten aufgenommene *S100A4* nicht nur zu einer dosisabhängigen Hypertrophie, sondern auch zu einem längerem Überleben der behandelten Zellen in Kultur sowohl unter serumfreien Bedingungen als auch nach Zugabe von Doxorubicin, einem DNA-Interkalans (Schneider et al. 2007).

Eine erhöhte *S100A4*-Konzentration scheint also mit kardialer Hypertrophie assoziiert zu sein. Ob es tatsächlich in Kardiomyozyten selbst synthetisiert wird, ist nicht klar.

## 1.6. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von S100A4 als Substrat von Asb2 $\beta$  sowie eine Charakterisierung dieser Interaktion. Eine Haupteigenschaft der HCM auf zellulärer Ebene ist die gestörte Balance aus Proteinbiosynthese und Proteinabbau. Da das UPS für ca. 90% des intrazellulären Proteinabbaus verantwortlich ist, liegt eine Beteiligung des UPS an Entstehung bzw. Verlauf der HCM nahe und diese Vermutung wurde bereits vielfältig untersucht und bestätigt (Grigorian et al. 2001, Schlossarek und Carrier 2011, Mishra et al. 2012). Im HCM-Tiermodell wurde eine verminderte Konzentration von *Asb2 $\beta$* -mRNA festgestellt. Als E3-Ligase stellt Asb2 $\beta$  die Substratspezifität des UPS sicher. Mit Desmin und Filamin B sind bereits zwei Substrate von Asb2 $\beta$  identifiziert worden (Bello et al. 2009, Thottakara et al. 2015).

Ziele dieser Arbeit waren:

1. Analyse der Genexpression von *Asb2 $\beta$*  und *S100A4* sowohl im *Mybpc3*-KI HCM-Tiermodell als auch in anderen Grundlagenmodellen kardialer Pathologien.
2. Evaluation von S100A4 als Interaktionspartner von Asb2 $\beta$  (Hauptfragestellung).
3. Untersuchung des Einflusses von überexprimiertem S100A4 auf künstliches Herzmuskelgewebe aus neonatalen Rattenkardiomyozyten als Modell für einen verringerten Abbau durch Asb2 $\beta$ .



## 2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel sind verschiedene Versuche und Protokolle aufgeführt, welche auch schon in früheren Arbeiten in unserem Institut beschrieben sind. Zur besseren Lesbarkeit sind einige Beschreibungen aus einer Vorgängerarbeit wörtlich übernommen (Schwalm 2015). Dies betrifft die folgenden Abschnitte: 2.1.1. - 2.1.3., 2.1.6. - 2.1.8., 2.1.10., 2.1.12. sowie 2.3.1. - 2.3.3.

### 2.1. Zur Arbeit mit Nukleinsäuren

#### 2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, „PCR“) dient der zellfreien exponentiellen Amplifikation kurzer DNA-Abschnitte *in vitro*. Diese Reaktion verläuft in mehreren, sich wiederholenden Zyklen (Mullis et al. 1986). Sie beginnt mit der Initialisierung. Dieser längere Denaturierungsschritt bei 94 °C stellt sicher, dass alle Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen Matrize aufgebrochen werden. Die folgenden sich wiederholenden Zyklen bestehen aus kurzer Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation. Die PCR vervielfältigt dabei einen DNA-Abschnitt, der zwischen den sogenannten Primern der Reaktion liegt. Diese sind zwei kurze, zur Matrize komplementäre Oligonukleotide, die an beiden Enden des zu vervielfältigenden Abschnittes liegen. Die Basenfolge der verwendeten Primer bestimmt die Temperatur, bei der die einzelnen Schritte optimal ablaufen.

Eine Sonderform der PCR ist die *Touchdown-PCR* (Don et al. 1991) Hierbei wird durch eine initial hohe, nur knapp unterhalb der Primer-Denaturierung liegende *Annealing*-Temperatur eine besonders spezifische Primerbindung erreicht. Im Verlauf wird die Temperatur graduell gesenkt, um eine effiziente Amplifikation zu erreichen. So wird eine spezifischere und höher konzentrierte Menge Amplifikat synthetisiert. In Tabelle 2 sind beispielhaft *Annealing*-Temperaturen von 75 °C und 70 °C angegeben. Während der ersten 11 Zyklen wird die Temperatur um 0,5 °C pro Zyklus bis auf 70 °C gesenkt und die PCR mit 70 °C für 24 Zyklen zu Ende geführt.

Reagenzien	Menge
10x Puffer	2 µl
25 mM MgCl <sup>2</sup>	1,2 µl
10 mM dNTPs	0,4 µl
5'-CACCC-NheI-Kozak-ATG-S100A4	0,4 µl
3'-S100A4-V5-NotI	0,4 µl
AmpliTaq Gold	0,2 µl
Murine Fibroblasten cDNA	1 µl
aufgefüllt mit Aqua ad iniectabilia	14,4 µl
Endvolumen	20 µl

**Tabelle 1: Beispiel-Reaktionsansatz einer Touchdown-PCR.**

Temperatur	Dauer
94 °C	3 min
94 °C	30 s
75 °C	30 s
68 °C	1 min
94 °C	30 s
70 °C	30 s
68 °C	30 s
68 °C	10 min

**Tabelle 2: Konditionen der Touchdown-PCR im Thermocycler.**

### 2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Moleküle mit einer Nettoladung, wie auch DNA, wandern im elektrischen Feld. Die Wandergeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Feldstärke, der Nettoladung der Moleküle, sowie dem Reibungskoeffizienten. Kleinere Moleküle wandern schneller durch ein Gel als größere Moleküle, so dass mit Hilfe der Gelelektrophorese eine Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe möglich ist. Das Trägermedium hier ist Agarose. Die DNA kann durch Interkalierung des im Gel enthaltenen Ethidiumbromid in den DNA-Doppelstrang sichtbar gemacht werden. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente werden unterschiedliche Agarose-Konzentrationen verwendet. Der für die Herstellung eines Agarosegels erforderliche Gelschlitten wurde zunächst 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 verwendeten Gelsschlittens z.B. 150 ml 1% TAE-Puffer und 1,5 g Agarose in der Mikrowelle kurz aufgekocht und anschließend auf Handwärme abgekühlt, mit 4 µl/100 ml Ethidiumbromid versetzt und in den Schlitten gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Schlitten aus dem Rahmen ausgespannt, in eine 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. Ein Ladepuffer diente der visuellen Größenkontrolle während der Elektrophorese. Als Größenstandard wurden je nach Bedarf eine 100 Basenpaar (bp)- Leiter oder eine 1 Kilobasenpaar (kb)- Leiter parallel über das Gel aufgetrennt. Nach dem Beladen wurde eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proben für ca. 1 h bei 80-200 V (je nach Konzentration des Agarosegels, Größe der Kammer und der Fragmente) aufgetrennt. Passende Fragmente (z.B. S100A4 V5 = 372 bp) konnten im Anschluss aus dem Gel geschnitten und die DNA extrahiert werden.

### **2.1.3. DNA-Gelextraktion**

Das Prinzip der DNA-Extraktion aus Agarosegelen beruht auf der unterschiedlichen Bindungsfähigkeit von DNA-Fragmenten an eine Silica-Membran bei variablen pH- und Salzkonzentrations-Bedingungen. 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 anschließenden Waschschrte dienen der Reinigung der DNA von Kontaminationen wie z.B. Agarose, Salzen, Enzymen und Oligonukleotiden. Die Elution der an die Silica-Membran gebundenen DNA erfolgt mit destilliertem Wasser. Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction-Kits der Firma Qiagen® nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Gewicht der DNA-Probe wurde ermittelt und eine dreifache Menge QG-Puffer zur Probe 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. Pro Ansatz wurde ein Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt und erneut vortex-gemischt. Bis zu 800 µl davon konnten nun auf eine QIAquick®-Spin-Säule pipettiert und bei 13 000 rpm

und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert werden. 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 13 000 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 13 000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert, das Zentrifugat verworfen und im Anschluss eine erneute Zentrifugation für 30 s bei 13 000 rpm und Raumtemperatur durchgeführt. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 30 µl *Aqua ad iniectabilia* direkt auf die Membran der Säule pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine abschließende Zentrifugation zur Elution der DNA aus der Säule wurde für 1 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die DNA-Konzentration konnte anschließend mittels NanoDrop™-Spektrophotometer der Firma Thermo Scientific® ermittelt werden.

#### **2.1.4. Restriktionsverdau**

Restriktionsendonukleasen, zuerst 1962 beschrieben (Dussoix und Arber 1962), 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. Es werden vier Haupttypen von Restriktionsenzymen unterschieden. Die hier Verwendeten gehören zu den Typ II-Restriktionsendonukleasen und benötigen für ihre Funktion kein ATP. Ihre Erkennungssequenzen bestehen gewöhnlich aus Palindromen im DNA-Doppelstrang. Dies sind kurze Abschnitte innerhalb der DNA, welche in beide Richtungen gelesen die gleiche Sequenz aufweisen. Restriktionsendonukleasen werden dazu genutzt, DNA-Moleküle in spezifische Fragmente zu zerteilen. Dabei entstehen spezifische Enden, welche sich entweder überlappen („*sticky ends*“) oder stumpfe Endstücke bilden („*blunt ends*“). Die Art dieser Enden ist entscheidend für die anschließende Ligation der geschnittenen DNA-Fragmente.

Sämtliche DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt. Die Hauptbezugsquelle für Restriktionsendonukleasen waren die FastDigest® Enzyme von Thermo Scientific® (s. Tabelle 3). Für alle Enzyme wurde der 10x FastDigest® Green Buffer verwendet.

Name	Sequenz und Schnittstelle	Temperatur
FastDigest NotI	5'---GC GGCCGC---3' 3'---CGCCGG CG---5'	37 °C
FastDigest NheI	5'---G CTAGC---3' 3'---CGATC G---5'	37 °C

**Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete FastDigest® Enzyme von Thermo Scientific.**

Reagenzien	Menge
10x Green Buffer	2 µl
FastDigest NotI	1 µl
FastDigest NheI	1 µl
pGG2-CMV-FLAG-GFP	1 µg
aufgefüllt mit <i>Aqua ad iniectabilia</i>	15,4 µl
Endvolumen	20 µl
Bedingungen	15 min NotI, dann weitere 15 min mit NheI, komplett bei 37 °C

**Tabelle 4: Ansatz eines Kontrollverdaus am Beispiel von pGG2-CMV-FLAG-GFP mit NotI und NheI.**

### 2.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Unter einer Ligation versteht man das Verknüpfen von DNA-Fragmenten. Diese wird zumeist mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase durchgeführt. Verwendet wurde hier die T4-DNA-Ligase, ein Enzym des Bakteriophagen T4. Dieses kann sowohl in DNA-Einzelstrangbrüchen als auch zwischen Fragmenten mit kurzen, komplementären überlappenden Enden die Ausbildung kovalenter Phosphodiesterbrücken katalysieren. Die zu ligierenden Fragmente werden in verschiedenen Ansätzen (s. Tabelle 5) äquimolar und mit bis zu 5-fach molarem Insert-Überschuss mit 50 ng linearisiertem Vektor nach folgender Formel ligiert:

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

Reagenzien	Menge
Insert mS100A4-V5C	Je nach Vektor-Insert-Ratio
pGG2-CMV-FLAG-GFP	50 ng
10x Ligase-Puffer	2 µl
PEG 5000	2 µl
T4-Ligase 5u	1 µl
aufgefüllt mit <i>Aqua ad iniectabilia</i>	20 µl Endvolumen
Endvolumen	20 µl
Bedingungen	60 min, 22 °C

**Tabelle 5: Beispiel-Reaktionsansatz für Ligation von Vektor und Insert.**

### 2.1.6. Chemisch kompetente *E. coli*

Bei den verwendeten TOP 10-Zellen handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen *E.coli*-Stamm, der sich durch eine Überexpression des Lac-Repressor-Gens für *Blue-White*-Screening auszeichnet. Es wurden TOP 10-Zellen der Firma Invitrogen® verwendet. Diese Bakterien wurden in chemisch kompetenter Form (für Hitzeschock-Transformation geeignet) verwendet. Aufgrund des großen Bedarfes an TOP10-Zellen wurden diese nach einem eigenen Protokoll vermehrt.

### 2.1.7. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Zunächst wurde eine LB-Agarplatte mit TOP10-Zellen über Nacht im Inkubator bei 37°C angeimpft. Am Folgetag wurden zwei Kolonien selektiert, 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<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm Lichtwellenlänge) von 0,4 erneut unter gleichen Bedingungen schüttelinkubiert und 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 TFBII®-Puffer der Firma Teknova® auf Eis vollständig resuspendiert. Nach 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.

### **2.1.8. Transformation chemisch kompetenter E. coli**

Diese Methode dient dem Einbringen von Fremd-DNA in Bakterienzellen, wobei zumeist zirkuläre DNA-Moleküle verwendet werden (Avery et al. 1944). Die Plasmidlösung wurde zunächst vorsichtig geschüttelt, auf Eis vorgekühlt und auf eine Konzentration von 1 ng/ µl vorverdünnt. Die chemisch kompetenten Bakterien, hier TOP10, wurden von -80 °C Lagerungstemperatur auf Eis aufgetaut. In ein 1,5 ml Aliquot-Reaktionsgefäß mit 200 µl der Bakteriensuspension wurde 1 ng Plasmid des jeweiligen Ligations-Ansatzes gegeben (s. Tabelle 5). 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 250 µl SOC-Medium (*super optimal broth with catabolite repression*, 20 nM Glukose) bei 37 °C wurde das Reaktionsgemisch für 60 min bei 37 °C und 180 rpm schüttelinkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen (je nach Resistenz des Vektors Ampicillin bzw. Kanamycin), auf 37 °C vorgewärmten Agarplatten ausplattiert. Durch Verwendung passender Restriktionsenzyme wurde die korrekte Durchführung der Transformation sichergestellt. Als Positivkontrolle dienten 50 ng ungeschnittener zirkulärer Arbeitsvektor. Für die Negativkontrolle wurden 50 ng Arbeitsvektor geschnitten und mit alkalischer Phosphatase behandelt, wodurch eine Selbstligation verhindert wurde. Als Kontrolle für die Funktion der T4-Ligase enthielt ein Ansatz 50 ng geschnittenen Arbeitsvektor. Um sicherzustellen, dass Einzelkolonien entstehen, wurden auf je einer Agarplatte 50 µl und 200 µl des Reaktionsgemisches mittels einer aus einer Pasteurpipette geformten dreieckigen Plattieröse verteilt und die Agarplatten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### **2.1.9. Kontrolle der Ligation mittels Colony-PCR**

Die Herstellung einer Flüssigkultur und die anschließende Plasmidisolation zu einer Mini-Präparation stellt einen möglichen, wenngleich sehr materialaufwendigen

Weg dar, die erfolgreiche Ligation zu kontrollieren. Für eine Vielzahl an Klonierungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bot sich die Methode der *Colony*-PCR an.

Hierfür wurden die Agarplatten nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden dem Brutschrank entnommen und nach Begutachtung der Positiv- und Negativkontrollen monoklonale Bakterienkulturen von den beimpften Agarplatten selektiert. Um ausschließlich monoklonale Kolonien zu erhalten, wurden nur solche Kolonien selektiert, 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 Kolonie wurde eine neue Pipettenspitze verwendet. Unmittelbar vor diesem „Picken“ der monoklonalen Kolonien wurde ein 20 µl *Touchdown*-PCR-Ansatz vorbereitet (Tabelle 2). Als Primer dienten zwei Sequenzen, die den Expressionsvektor auf beiden Seiten des Inserts flankierten. Die verwendete Pipettenspitze wurde kurz am Rand des jeweiligen PCR-Röhrchen abgestrichen und danach in einen mit Nährmedium befüllten 10 ml *Snapcap*-Behälter gegeben und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm schüttelinkubiert. Nach Ablauf der PCR wurden die einzelnen Reaktionsansätze auf ein Gel aufgetragen und analysiert. Im Falle einer erfolgreichen Ligation war auf dem Gel ein Fragment zu erkennen, welches um die Anzahl der Basenpaare des Inserts größer war als das PCR-Produkt des Ansatzes, der lediglich den Vektor enthielt. Nur aus erfolgreich ligierten Ansätzen wurden daraufhin Mini-Präparationen hergestellt.

#### **2.1.10. Plasmid isolation mittels Mini- und Maxipräparation**

Zur Mini-Präparation wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel verwendet. Um die Bakterienzellen zu ernten und kultivieren, wurden 2 ml der gesättigten *E. coli*-Kultur im LB-Medium der Übernachtskultur aus dem *Snapcap*-Behälter in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 30 s bei 11000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Zur Zell-Lyse wurden 250 µl Buffer A1 in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Zellen wurden durch Vortexen komplett resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Buffer A2 hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden vorsichtig acht Mal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis das Lysat klar erschien. Nun wurden 300 µl Buffer A3 dazugegeben und wieder vorsichtig acht 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 Buffer A4 wurden auf die Säule gegeben und das Reaktionsgefäß erneut 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 30 µl *Aqua ad iniectabilia* versetzt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 15 min mit anschließender Zentrifugation für 1 min bei 11000 g und Raumtemperatur.

Nach erfolgreicher Transformation wurde zur Kontrolle ein Restriktionsverdau (s. 2.1.4) durchgeführt und die korrekte Insertion mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.1.2) überprüft. Die passenden Amplifikate wurden mittels Gelextraktion (s. 2.1.3) isoliert und im Anschluss sequenziert.

Die Plasmidisolation mittels Maxi-Präparation wurde mithilfe des NucleoBond® Xtra Plasmid Purification Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Für die Maxi-Präparation wurde ein korrekt sequenzierter Klon (s. 2.1.9) ausgewählt. Vom Rest der Übernachts-E. coli Kultur wurde zunächst 1 ml mit 9 ml LB Medium vermischt und für 3 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Diese 10 ml wurden wiederum in 300 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die 300 ml der Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation bei 4500 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, um die Bakterienzellen zu ernten. Zur Resuspension wurden 12 ml Buffer RES + RNase gegeben und solange auf- und abpipettiert, bis die Suspension vollständig homogen war. Zur Zell-Lyse wurden 12 ml Buffer LYS zur Suspension gegeben, fünf Mal vorsichtig invertiert und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Filter-Äquibrierung der NucleoBond® Xtra Säule. Zur Neutralisation wurden 12 ml Buffer NEU zur Suspension gegeben und anschließend sofort durch 15-maliges Invertieren gemixt. Die homogene Suspension wurde nach dreimaligem Mixen auf die Filter der NucleoBond® Xtra Säule gegeben. Die Säule und der Filter wurden mit 12 ml des Buffer EQU gewaschen, indem diese wieder auf die überstehenden Ränder der Säule gegeben wurden. Anschließend wurde der Filter vorsichtig aus der Säule gezogen und verworfen.

Nun wurden 25 ml WASH Buffer in die Säule gegeben, um die Säule nochmals zu waschen. Zur Elution der DNA aus der Membran wurden 15 ml ELU Buffer 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 vortex-gemischt. 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 bei 5000 rpm und Raumtemperatur wiederholt. Mit Hilfe des NanoDrop wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Im Anschluss an die Maxipräparation wurde ein weiterer Kontrollverdau zur Verifizierung der gewünschten Sequenz durchgeführt.

### 2.1.11. Klonierung

Die Technik des *Epitope-Tagging*, d.h. die Klonierung eines kurzen Abschnitts einer bekannten Aminosäuresequenz vor bzw. hinter die cDNA-Sequenz des zu exprimierenden Proteins, ermöglicht nicht immer den fehlerfreien Nachweis im Western Blot. Aus diesem Grund wurden mit dem HIS-Tag und dem V5-Tag zwei verschiedene Klonierungsstrategien parallel verfolgt, die den Proteinnachweis im Western-Blot sicherstellen sollten. Das V5-Tag wurde sowohl C- als auch N-Terminal an die *S100A4*-cDNA kloniert. Tabelle 6 listet alle für die initiale Amplifikation verwendeten Primer auf.

Primernamen	Sequenz
mS100A4HIS F	GCAAGACCCTTGGAGGAGGC
mS100A4HIS R	TCACTTCTTCCGGGGCTCCTTATC
mS100A4V5C F	CACCGCTAGCGCCACCATGGCAAGACCCTTGGAGGAGG
mS100A4V5C R	TAAGGAGCCCCGGAAGAAGGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGA TTCTACGTGAGCGGCCGC
mS100A4V5N F	CACCGCTAGCGCCACCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGAT TCTACGGCAAGACCCTTGGAGGAGG
mS100A4V5N R	GCGGCCGCTCACTTCTTCCGGGGCTCCTTA

**Tabelle 6:** Für die Amplifikation der *S100A4*-cDNA mit HIS- bzw. V5-Tag verwendete Primersequenzen.

### **S100A4HIS**

Das pcDNA4/HisMax<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup>TA Expression-Kit der Firma Life Technologies<sup>®</sup> bietet die Möglichkeit, in wenigen Arbeitsschritten ein Plasmid zu klonieren, das vor dem Insert, also am N-terminalen Ende des Peptids, sechs aufeinander folgende Histidin-Moleküle besitzt. Der enthaltene linearisierte Vektor pcDNA4/HisMax<sup>®</sup> ermöglicht durch Einzel-Thymidin-Überhänge und unter Kontrolle einer kovalent gebundene Topoisomerase I die korrekt orientierte Ligation eines zuvor amplifizierten PCR-Produktes in einem einzigen Arbeitsschritt.

### **S100A4-V5C**

Für dieses Plasmid wurden zunächst Primer entworfen, durch die sich ein Insert amplifizieren ließ, das neben der Sequenz von S100A4 sowohl Restriktionsschnittstellen für die Enzyme NheI und Not als auch ein carboxyterminales V5-Tag enthielt. Daneben enthielten die Primer ein 5'-CACC für die korrekte Orientierung im Zielvektor, eine Kozak-Sequenz, die für den Start der Translation unabdingbar ist (Kozak 1984) und je ein ATG- und TGA-Triplet als Start- bzw. Stopp-Codon.

### **S100A4-V5N**

Im Anschluss an die initiale Amplifikation erfolgte die Klonierung mit Hilfe des CloneJET<sup>™</sup> PCR Cloning Kits der Firma Thermo Scientific<sup>®</sup> (#K1231). Dieses Kit beinhaltet einen linearisierten Vektor, der im Falle einer Selbst-Ligation die letale Restriktionsendonuklease Eco471R produziert und so sicherstellt, dass nur Ligationen, die ein Insert enthalten, für eine Transformation zur Verfügung stehen. Es eignet sich sowohl für *blunt-end*- als auch für *sticky-end*-PCR-Produkte. Da die für die PCR verwendete Taq DNA-Polymerase stets *sticky-end*-Produkte synthetisiert, wurde den entsprechenden Abschnitten des Hersteller-Protokolls gefolgt. Das so entstandene Konstrukt wurde durch Sequenzierung mit den im Kit enthaltenen Primern auf korrekte Insertion überprüft.

#### **2.1.12. Sequenzierung**

Alle verwendeten Primersequenzen wurden mit Hilfe des Online-Programms Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) erstellt. Die Synthese der Primer erfolgte durch Eurofins MWG Operon, Ebersberg Deutschland. Für jede zu sequenzierende Probe

wurden DNA-Konzentrationen von mindestens 750 ng benötigt. Pro Sequenzierung wurden außerdem entsprechende Primer in einer Konzentration von 2 pmol mitgesandt.

#### **2.1.13. Vorbereitung von Mäuseherzen**

Zur Analyse von Gen- und Proteinexpression wurden Mäuseherzen präpariert (Schwalm 2015) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mittels vorgekühltem Mörser wurden die Herzen gepulvert und danach abgewogen.

#### **2.1.14. RNA-Isolation**

Entscheidend für eine erfolgreiche RNA-Isolation ist eine RNase-freie Arbeitsumgebung. Alle RNA-Isolationen in dieser Arbeit erfolgten mit Hilfe des RNA Total RNA Isolation Systems der Firma Promega®. Zu jeder Probe aus der RNA isoliert werden sollte, wurden 175 µl RNA Lysis Buffer dazugegeben, um die Zellen zu lysieren. Danach erfolgte die Zugabe von 350 µl RNA Dilution Buffer, eine vorsichtige Vermischung sowie eine dreiminütige Inkubation im Thermocycler bei 70 °C. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 14 000 rpm bei Raumtemperatur) erfolgte der Transfer des Lysates in *Spin Columns*. Nach zwei Waschschritten erfolgte die Zugabe von DNase I, um Rest-DNA in den Proben zu spalten. Die Säule wurde zwei weitere Male gewaschen und die RNA konnte mittels Nuklease-freiem Wasser nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur von den Säulen gelöst werden. Im Anschluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA mittels NanoDrop-Spektrophotometer. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **2.1.15. cDNA Synthese mittels reverser Transkription**

Für die quantitative Analyse der Gene einer Zelle muss zunächst die Gesamt-mRNA der Zielzelle in *coding* DNA oder cDNA umgeschrieben werden. Diese Technik der reversen Transkription (RT) wurde erstmals 1970 von Howard Temin beschrieben (Inamoto et al. 2000). In dieser Arbeit wurde die cDNA-Synthese mit dem SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR® der Firma Invitrogen® durchgeführt. 200 ng isolierte RNA wurden mit 10 µM dNTP und je nach später untersuchtem Referenzgen entweder

mit oligo-dT- oder random- hexamer-Primern bei 65 °C für 5 min inkubiert (s. Tabelle 7).

Reagenzien Ansatz 1	Menge
RNA	200 ng (konzentrationsabhängig)
Oligo dT- bzw. random-hexamer-Primer	1 µl
dNTP Mix	1 µl
RNase freies Wasser	5 µl

**Tabelle 7: cDNA-Synthese Ansatz 1.**

In einem separaten Inkubationsgefäß wurde ein Mastermix dem Hersteller-Protokoll entsprechend gemischt, der neben passenden Puffer- und Ionenkonzentrationen die Enzyme RNase OUT zur Hemmung ubiquitär vorkommender RNasen und SuperScript® III RT zur reversen Transkription enthielt (s. Tabelle 8). Je 10 µl dieses Mastermixes wurden mit je einer Ausgangsprobe gemischt und bei 50 °C für 50 min (oligo- dT- Primer) bzw. 25 °C für 10 min und anschließend 50 °C für 50 min (random-hexamer-Primer) inkubiert. Die Termination der Polymerasen erfolgte bei 85 °C für 5 min. Nicht transkribierte mRNA-Fragmente wurden durch anschließende Inkubation mit RNase H bei 37 °C für 20 min gespalten. Bei jeder neuen reversen Transkription wurde je ein Ansatz ohne Zugabe der SuperScript® III RT vorbereitet, der in der folgenden quantitativen PCR als Negativkontrolle diente:

Reagenzien Ansatz 2	Menge
10x RT-Puffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT	1 µl
SuperScript® III RT	1 µl

**Tabelle 8: cDNA-Synthese Ansatz 2.**

### 2.1.16. Quantitative PCR

Die quantitative *real-time* PCR ist eine PCR-basierte Methode zur relativen Quantifizierung geringer DNA-Mengen. Das Prinzip beruht auf der Interkalierung eines Fluoreszenzfarbstoffes in doppelsträngiger DNA (dsDNA). Dieser Fluoreszenzfarbstoff

wird durch die Bindung an dsDNA als Farbstoff aktiv. Wird nun eine PCR durchgeführt, erhöht sich mit jedem Zyklus die Menge an DNA, was damit auch zu einer exponentiellen Zunahme der Fluoreszenz bei einer definierten Wellenlänge führt. Das Ausmaß des exponentiellen Anstieges ist abhängig von der eingesetzten DNA-Menge. So kann durch Auswertung des relativen Fluoreszenz-Anstieges die DNA-Menge quantifiziert werden. Dies ist mit einem *real-time-cycler* möglich. Für die quantitative *real-time*-PCR wurden Reagenzien aus dem QuantiTect SYBR®-Green-PCR-Kit der Firma Qiagen® verwendet.

## **2.2. Zur Arbeit in der Zellkultur**

### **2.2.1. HEK-293-Zellen**

Die HEK-293-Zelllinie, wird auf Grund ihrer einfachen Handhabung oft verwendet. Sie basiert auf der Transformation humaner embryonaler Nierenzellen mit einem Adenovirus 5 und wurde in den 1970er Jahren erstmalig synthetisiert (Graham et al. 1977). HEK- Zellen sind sehr einfach zu kultivieren und eignen sich für Versuche, in denen die Funktion der Zelle selbst ohne Bedeutung ist, wie z.B. Transfektionsexperimente oder Synthese verschiedener Viren.

### **2.2.2. Cos-7-Zellen**

Cos-7 ist eine Zelllinie, die ähnlich wie HEK-293 Zellen aus oben genannten Gründen weit verbreitet ist. Für ihre Herstellung wurden Fibroblast-like-cells aus Nierenzellen von Affen isoliert und mit einem SV-40-Virus immortalisiert (Jensen et al. 1964). Ihre Vorteile decken sich mit denen von HEK-293-Zellen.

### **2.2.3. Kultivierung und Vorbereitung**

Da mit beiden Zelllinien exakt gleich verfahren wurde, ist im Folgenden nur noch von Cos-7-Zellen die Rede. Um den Abbau von S100A4 durch ASB2 $\beta$  zu validieren, wurden Cos-7-Zellen im 12-Well-Format mit jeweils zwei Plasmiden (S100A4 und ASB2 $\beta$  WT oder MUT) mittels TurboFect Transfection Reagent (Thermo-Scientific #R0351) co-transfiziert. Hierfür wurden Cos-7-Zellen (mit freundlicher Unterstützung der AG Apfelbacher, Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie, UKE) in TPP T75-Kulturflaschen in Cos-7-Medium (DMEM, low glucose GlutaMAX™ +Pyruvat von Gibco®,

10% FCS, 1% P/S, 1% MEM NEAA) bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit angewärmten PBS wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst, das Trypsin im Anschluss mit Cos-7-Medium inaktiviert und die Zellen in einer Neubauer Zellkammer durch Zugabe von Trypanblau, welches lediglich tote Zellen anfärbt, gezählt. Die Verdünnung von 20 µl Zelllösung erfolgte mit 20 µl Trypanblau und 40 µl Medium. 24 Stunden vor Transfektion wurden 170 000 Zellen in 1,5 ml Cos-7-Medium pro Well einer 12-Well-Platte ausplattiert. Bei einer Kapazität (laut Hersteller) von 400 000 Zellen pro Well und einer Generationszeit von 24 Stunden waren so zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 85% des Wells bedeckt.

#### **2.2.4. Co-Transfektion**

Eine erfolgreiche transiente Transfektion eukaryoter Zellen beruht im Wesentlichen auf zwei Faktoren: Der Aufnahme der Plasmide in die Zielzellen und der intrazellulären Transkription mit anschließender Translation der Plasmidsequenz. Die korrekte Plasmidsequenz ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Transfektion. Um die Transfektionseffizienz zu steigern, gibt es eine Vielzahl von Zusätzen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit dem Transfektionsreagenz TurboFect™ von ThermoScientific® gearbeitet.

Die Transfektion eukaryoter Zellen durch Plasmide mit Hilfe des Transfektionsreagenz TurboFect™ beruht anders als lipidbasierte Formeln auf der Bildung positiv geladener Komplexe mit der Plasmid-DNA. Diese kationischen Komplexe erleichtern einerseits die Diffusion in die Zielzelle, andererseits schützen sie die Plasmid-DNA vor zu rascher Degradation durch intrazelluläre DNasen. Vor jeder Transfektion wurde die Konzentration der verwendeten Plasmide via NanoDrop-Spektrophotometer neu bestimmt und somit sichergestellt, dass jedes Well mit einer exakten Menge an Plasmid transfiziert wurde. Für die Transfektion wurde pro µg Plasmid-DNA 2 µl Turbofect™ Transfektionsreagenz verwendet und mit OPTIMEM Medium auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde vortex-gemischt, kurz herunterzentrifugiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde eine entsprechende Menge auf die Wells verteilt und die Platten bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub> und 40% O<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.2.5. Behandlung mit einem UPS-Inhibitor**

24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Epoxomicin behandelt. Epoxomicin wurde erstmalig aus Actinomycetes isoliert und ist ein potenter und zugleich spezifischer Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Ebraldidze et al. 1989). Hierfür wurden nach Absaugung des bereits auf den Zellen befindlichen Mediums 1,5 ml einer 1 µM Lösung aus Cos-7-Medium und Epoxomicin bzw. Dimethylsulfoxid als Negativkontrolle (DMSO, Trägermedium in dem Epoxomicin gelöst ist) jedem Well hinzugegeben.

### **2.2.6. Ernten der Zellen**

48 Stunden nach Transfektion erfolgte das Ernten der transfizierten Zellen. Die 12-Well-Platte wurde auf Eis gestellt und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden pro Well 100 µl Kranias-Puffer auf die Zellen gegeben, die Zellen abgekratzt und in ein 1,5 µl Inkubationsgefäß überführt. Die im Kranias-Puffer enthaltenen Substanzen EDTA (Ethylendiamintetraacetat), SDS (Natriumdodecylsulfat) und NaF (Natriumfluorid) stellten die Konservierung der Proben sicher. Um eine höhere Fluidität des Zell-Kranias-Gemisches zu erreichen, wurde es unmittelbar nach der Ernte mit Hilfe des TissueLysers™ (Qiagen®) für 1 x 2 min bei 20 Hz homogenisiert.

### **2.2.7. Immunfluoreszenz**

Durch Immunfluoreszenz können bestimmte Proteine mittels Antikörper in Zellen oder Geweben sichtbar gemacht werden. An Sekundärantikörpern sind Farbstoffe gekoppelt, welche auf Anregung durch Licht bestimmter Wellenlängen fluoreszieren. Durch Einsatz verschiedener Filter lässt sich diese Fluoreszenz in ein spezifisches Signal umwandeln. Für die Immunfluoreszenz wurden unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen je vier runde, autoklavierte Deckgläser in den Wells ausgelegt (12 mm Durchmesser) und danach mit Laminin beschichtet. Nach erfolgter Transduktion wurden die Wells dreimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur mit phosphatgepuffertem Formaldehyd (Roti®-Histofix) fixiert. Währenddessen wurden zwei Lösungen angesetzt, die dem Blocken reaktiver Aminogruppen sowie als Antikörpermedium dienen:



<b>Lösung A</b>	<b>Lösung B</b>
1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
10% FCS	1% BSA
1% BSA	0,5% Triton X-100
0,5% Triton X-100	

**Tabelle 9: Zusammensetzung der Lösungen für Immunfluoreszenz.**

Jedes Well wurde mit 3 ml Lösung A für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen auf Parafilm transferiert, zwei Mal für 5 min mit 100 µl Lösung B gewaschen und anschließend mit ebenfalls in Lösung B verdünnten Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen erneut zwei Mal für 5 min mit 100 µl Lösung B gewaschen und mit ebenfalls in 100 µl Lösung B verdünnten Sekundär-Antikörpern für 1 h inkubiert. Alle Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Deckgläschen wurden drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen, für 10 min mit DRAQ5 inkubiert, erneut mit PBS gewaschen und mit Mowiol auf Objektträgern fixiert. Diese konnten bis zur Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

## **2.3. Zur Arbeit mit Proteinen**

### **2.3.1. 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 nm nach 595 nm zugrunde, die bei Proteinbindung erfolgt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption nach dem Lambert-Beer-Gesetz 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-Lösung 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 10: Pipettierschema für die Proteinstandardkurve der Proteinkonzentrations-Messungen nach Bradford.**

Es wurden jeweils 5 µl der Proteinprobe zu 795 µl 0,1 M NaOH-Lösung in Einmalküvetten pipettiert, anschließend mit 200 µl Bradford-Lösung aufgefüllt und gemischt. Nach Inkubation für 10 min wurde die Absorption in einem Fotometer (Smart Spec® 3000 der Firma Bio-Rad Laboratories®) 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-Lösung so verdünnt, dass die gemessenen Absorptionen im mittleren Bereich der Standardkurve lagen und mindestens in Doppelbestimmung gemessen.

### **2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Um in einem Proteingemisch ein bestimmtes Protein nachzuweisen, erfolgt zunächst eine Auftrennung der einzelnen Proteine abhängig von ihrer Größe. Um den Einfluss von Sekundär- und Tertiär-Strukturen auszuschließen werden die Proteine zunächst denaturiert und mit einer negativen Ladung versehen. Anschließend lässt man die Proben durch ein Polyacrylamidgel laufen, an dem ein elektrisches Feld anliegt.

Die SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)-PAGE wurde nach der Laemmli-Methode durchgeführt. Entsprechend der zuvor durchgeführten Bradford-Konzentrationsbestimmung wurden dafür je 10 ng jeder Probe in 6x Laemmli-Puffer

aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Für die Gelelektrophorese wurden entsprechend des zu separierenden Protein-Molekulargewichtes 12%ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V für 10 min und anschließend bei 120 V für ca. 110 min in dem Mini Protean 3 Elektrophorese-System (Bio-Rad) in einem 1x Elektrophorese-Puffer. Auf jedem Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (Precision Plus Protein Standard™, Bio-Rad), um den Fortschritt der Elektrophorese beobachten zu können und als Orientierungshilfe auf dem anschließenden Blot.

### **2.3.3. Western-Blot**

Das Western-Blot-Verfahren ist ein Verfahren zur spezifischen Detektion von Proteinen mittels Antikörpern gegen geeignete Epitope der nachzuweisenden Proteine (Towbin et al. 1979). Die mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine werden in einem orthogonal zu ihrer ursprünglichen Laufrichtung ausgerichteten Feld aus dem Gel heraus auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert („geblottet“). Hier können sie mittels Antikörpern sichtbar gemacht werden. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper an andere Epitope des Proteingemisches zu verhindern, müssen diese freien unspezifischen Bindungsstellen zunächst blockiert werden. Dies erfolgt mit Lösungen von fettarmem Milchpulver (MP) oder bovinem Serumalbumin (BSA). Nach Inkubation mit einem für das gesuchte Protein spezifischen Primär-Antikörper wird die Membran erneut mit einem meist gegen das Fc-Fragment des Primär-Antikörpers gerichteten Sekundär-Antikörper inkubiert. Dieser ist kovalent an ein Meerrettich-Peroxidase-Molekül gekoppelt. Nach Zugabe eines unter Chemolumineszenz umgesetzten Substrates der Meerrettich-Peroxidase kann die Reaktion und damit das Proteinsignal durch Schwärzung eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilmes oder durch Messung der kumulativen Lichtemission in einer Dunkelkammer mit einer geeigneten Kamera sichtbar gemacht werden.

Der Protein-Transfer erfolgte nach der Gelelektrophorese in einer mit Blotpuffer gefüllten Kammer bei 330 mA für 78 min. Im Anschluss wurde die Membran auf einem Orbitalschwenker dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen und für 1 h in 10% MP für weitere 5 min geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde der Blot mit dem Primär-Antikörper in vormalig getesteter Konzentration (s. Tabelle 11) auf einem

Rollmischer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Wiederum wurde der Blot drei Mal in 1x TBST gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper für 1 h auf dem Rollmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde der Blot mit ECL-Lösung (Amersham Biosciences) entwickelt. Pro Membran wurden 700 µl der Lösung benutzt, so dass diese den Blot gerade vollständig bedeckte. Die benetzte Membran wurde zwischen zwei Kopierfolien gegeben und die Autolumineszenz anschließend in einer Gelfotokammer gemessen.

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Medium</b>	<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Medium</b>
Anti-FLAG 1: 5000	TBS/T + 5% MP	Anti- Maus 1: 5000	TBS/T + 5% MP
Anti-V5 1: 1000	TBS/T + 5% MP	Anti- Maus 1: 5000	TBS/T + 5% MP
Anti-GAPDH 1: 2000	TBS/T	Anti- Maus 1: 5000	TBS/T + 5% MP
Anti-Total ERK 1:2000	TBS/T	Anti-Kaninchen 1:5000	TBS/T + 5% MP
Abcam Anti S100A4	Versch. getestet	Anti-Maus 1: 5000	Versch. getestet
Eurogentec® Custom S100A4	Versch. getestet	Anti-Kaninchen 1:5000	Versch. getestet

**Tabelle 11: Liste der verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper-Konzentrationen und Trägermedien.**

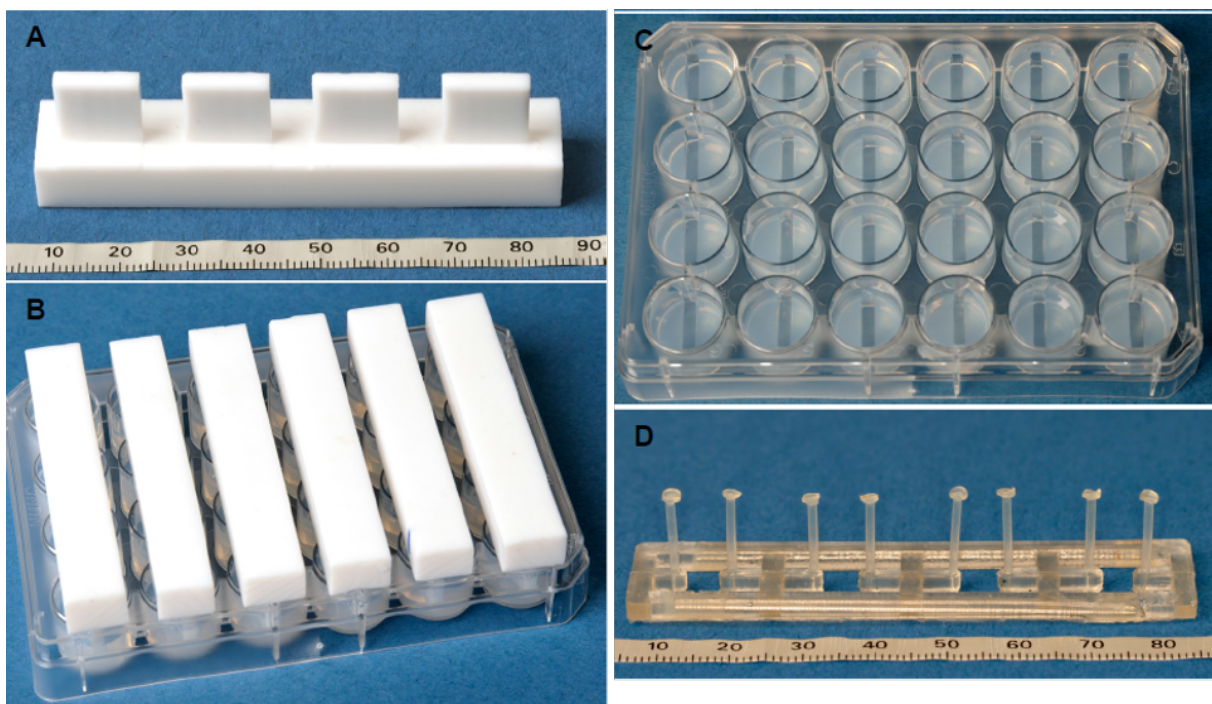
## **2.4. Zur Arbeit mit künstlichem Herzgewebe**

### **2.4.1. Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten**

Für die Präparation der Kardiomyozyten wurden Wistar- und Lewis-Ratten im Alter von 0-3 Tagen nach dem von der Ethik-Kommission der Universität Hamburg genehmigten Protokoll verwendet. Die Präparation erfolgte standardisiert durch zwei Mitarbeiter des Instituts (June Übeler und Thomas Schulze). Hierbei wurden die Tiere unter sterilen Bedingungen dekapitiert und ihre Herzen entnommen. Die Atrien der neonatalen Rattenherzen wurden abgetrennt und die separierten Ventrikel einem fraktionierten Trypsin/DNase-Aufschluss unterzogen (Eschenhagen et al. 1997) Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellkonzentration der Kardiomyozytensuspension bestimmt. Die durch dieses Verfahren isolierten Rattenkardiomyozyten wurden unmittelbar für die Herstellung von *Engineered Heart Tissue* (EHT) verwendet.

## 2.4.2. Herstellung von EHTs

Für die Herstellung von EHTs im 24-Well-Format wurde eine etablierte Methode zur Generierung von kleinen EHTs auf Fibrinbasis genutzt (Hansen et al. 2010). Dazu wurde eine 24-Well-Zellkulturschale mit 60 °C heißer 2%iger Agaroselösung befüllt. In jedes Well wurden 1,5 ml Agarose pipettiert. Mit Hilfe von Platzhaltern aus Teflon wurden Gussformen generiert. In diese wurden nach Aushärtung der Agarose und Entfernen der Platzhalter Silikonhalterungen für die später herzustellenden EHTs platziert (s. Abbildung 7).



**Abbildung 7: Herstellung von EHTs.** Abgebildet ist die erforderliche „Hardware“ zur Herstellung von EHTs. A: Platzhalter aus Teflon. B: 24-Well-Platte mit eingesetzten Platzhaltern aus Teflon. C: 24-Well-Platte mit ausgehärteter Agarose nach Entfernung der Platzhalter. D: Silikonhalterungen für die später herzustellenden EHTs (modifiziert aus der Dissertation von Nils Sörensen, 2013).

Zur Herstellung einer Platte EHTs im 24-Well-Format wurde folgender Mastermix angesetzt:

Zellsuspension	16,7 x 10 <sup>6</sup> Zellen
2X DMEM (s. Tabelle 13)	186,7 µl
Bovines Fibrinogen	86,7 µl
Nicht-Kardiomyozyten-Medium (s. Tabelle 14)	ad 3333,3 µl
Ggf. Adenoassoziierter Virus 6 (AAV6)	Entsprechend Virus-Titer

**Tabelle 12: Mastermix für die Herstellung einer Platte EHTs im 24-well-Format.**

<b>2x DMEM</b>
20% 10X DMEM
20% Pferdeserum (inaktiv)
2% Penicillin/Streptomycin
4% Hühnerembryonenextrakt
in <i>Aqua ad iniectabilia</i>

**Tabelle 13: Zusammensetzung des 2x DMEM.**

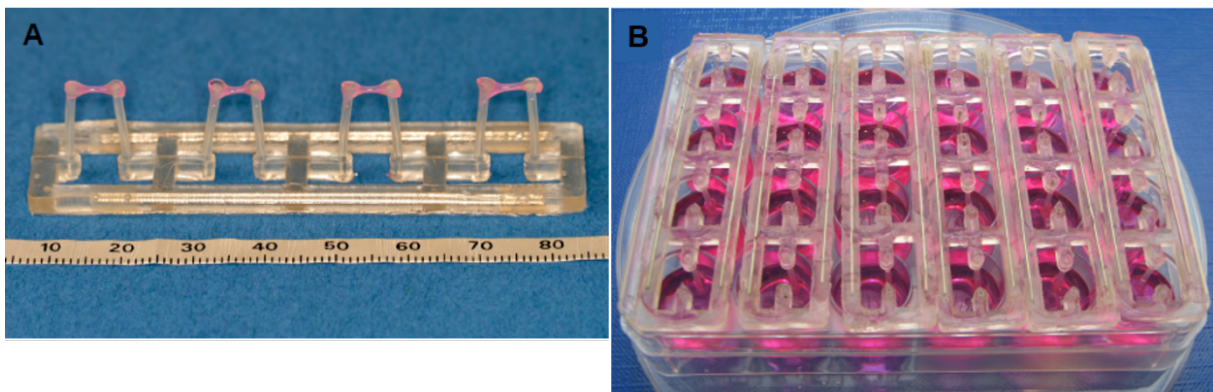
<b>Nicht-Kardiomyozyten-Medium</b>
10% fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
1% Penicillin/Streptomycin
1% Glutamin in DMEM

**Tabelle 14: Zusammensetzung des Nicht-Kardiomyozyten-Mediums.**

DMEM	mit 1 g/l D-Glukose, 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub>
Pferdeserum (inaktiviert)	10%
Hühnerembryonenextrakt	2%
Penicillin/Streptomycin	1%
Insulin	10 µg/ml
Aprotinin	10 µg/ml

**Tabelle 15: Zusammensetzung des EHT-Mediums.**

Für das 24-Well-Format wurden nun je 3  $\mu\text{l}$  einer 100 U/ml Thrombinlösung in 24 sterile 0,2 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Diesen wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  des zuvor sorgfältig homogenisierten Mastermixes hinzugefügt und das Gemisch sofort in die Agarosevertiefung um die Silikonhalterung pipettiert. Nach Zugabe des Fibrinogens war ein schnelles Arbeiten notwendig, um ein vorzeitiges Gerinnen des Ansatzes durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin zu verhindern. Nach zwei Stunden Inkubationszeit in den Gussformen bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub> und 40% O<sub>2</sub> (Zellkulturschrank) war die Zell-Fibrin-Mischung auspolymerisiert und die Kardiomyozyten in einer dreidimensionalen Matrix eingebettet. Es wurde nun jedes Well mit vorgewärmtem DMEM überschichtet und für 20 min inkubiert, um das Herauslösen der an den Silikonhalterungen hängenden EHTs (s. Abbildung 8A) aus den Agaroseformen zu erleichtern. Die 24-Well-EHTs wurden daraufhin in eine neue 24-Well-Zellkulturschale überführt, die zuvor mit jeweils 1,5 ml vorgewärmtem EHT-Medium pro Well befüllt worden war (s. Abbildung 8B). Nach diesem Protokoll erhielt man 24 EHTs mit einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  und einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen pro EHT.



**Abbildung 8: Fertige EHTs im 24-Well-Format.** A: 4 EHTs sind zwischen den Silikonhalterungen auspolymerisiert. B: 24-Well-Platte gefüllt mit EHT-Medium und einliegenden EHTs (modifiziert aus Dissertation Nils Sörensen, 2013).

### 2.4.3. Transduktion mit Adeno-assoziierten Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind einzelsträngige DNA-Viren aus der Familie der Parvoviren und der Gattung der Dependoviren. Ihr Name leitet sich von der Abhängigkeit eines Adenovirus als Helfervirus ab, ohne welchen sie sich weder in die DNA des Zielorganismus integrieren noch in diesem replizieren können. Aufgrund ihrer niedrigen Immunogenität und da sie mit keiner für Menschen gefährlichen Krankheit assoziiert sind, eignen sie sich hervorragend als virale Vektoren zur Transduktion

eukaryoter Zellen. Ein Nachteil besteht in der Limitation der Größe des Inserts, welches auf 4,7 kb beschränkt ist.

Für den Fall, dass eine virale Transduktion der EHTs mittels AAV6 stattfinden sollte, wurde dieser entsprechend seiner Konzentration in einer MOI von 1000 dem Mastermix vor der Polymerisierung zugefügt. Hierbei war darauf zu achten, entsprechend weniger Nicht-Kardiomyozyten-Medium und entsprechend mehr 2X DMEM zu verwenden. Die Virusmenge wurde zu Beginn der EHT-Herstellung der Zellsuspension beigemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe aller anderen Bestandteile des Mastermixes. Tabelle 16 listet die verwendeten AAV6 auf.

<b>Verwendete AAV6</b>
AAV6-hTnT-pGG2-S100A4V5C
AAV6-Empty Vector
AAV6-GFP

**Tabelle 16: Liste der verwendeten Adeno-assoziierten Viren für die Transduktion von EHTs.**

Um den Effekt der Transduktion unabhängig von anderen Faktoren darzustellen, wurden stets EHTs derselben Präparation in verschiedene zu transduzierende Gruppen aufgeteilt und entsprechend auf die Platten verteilt.

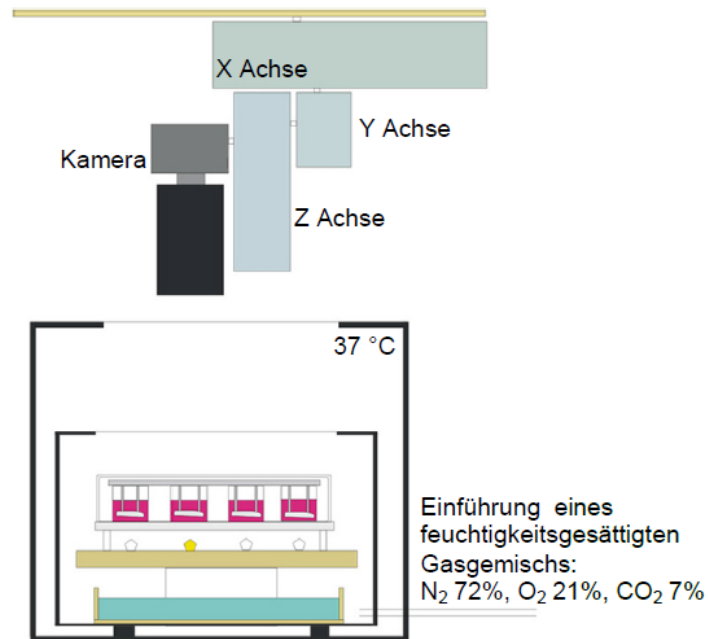
#### **2.4.4. Kultivierung der EHTs**

Die Kultivierung der EHTs erfolgte im Zellkulturschrank bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub> und 40% O<sub>2</sub>. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das EHT-Medium gewechselt, das immer frisch angesetzt wurde. Um den dritten Tag nach Herstellung der EHTs begannen die Kardiomyozyten mikroskopisch sichtbar zu kontrahieren, nach ca. sieben Tagen wurden die ersten kohärenten Muskelkontraktionen mit Auslenkung der Silikonschläuche beobachtet. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Mit Einsetzen der ersten makroskopisch sichtbaren Kontraktionen wurden die Kontraktionseigenschaften der EHTs jeweils zwei Stunden nach Medienwechsel in einer videooptischen Messapparatur gemessen.

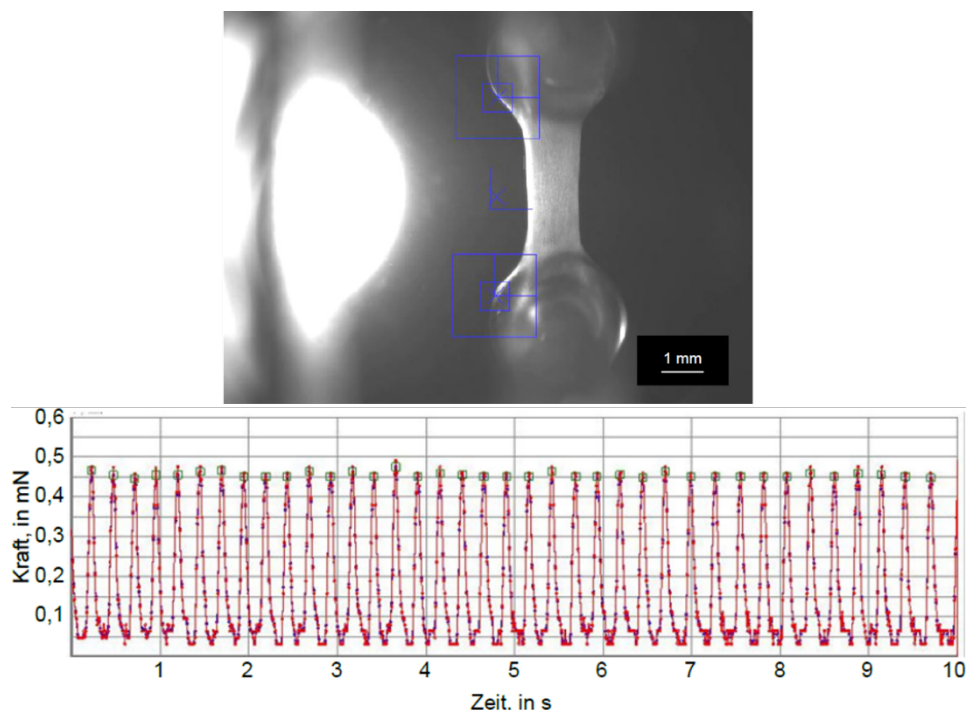


#### **2.4.5. Funktionelle Analyse der EHTs**

Mittels eines in unserem Institut für das 24-Well-Format entwickelten Messsystems konnten die EHTs im Verlauf der Kulturzeit objektiv und standardisiert bzgl. kontraktiver Parameter wie Kontraktionskraft, Kontraktions- und Relaxationszeit analysiert werden (Hansen et al. 2010). Diese Messapparatur bestand aus einer Zellkulturschrank-ähnlichen Einheit, in der Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie die Gaszusammensetzung regulierbar waren. Der Deckel dieser Einheit bestand aus einer Glasplatte, über der sich eine Basler-Kamera befand, welche an einem x-y-z-System montiert und über einen PC ansteuerbar war (s. Abbildung 9). Als Lichtquelle für die einzelnen EHTs dienten LEDs, die unter jedem Well angebracht waren. Die Beleuchtung wurde mit der Aufnahme synchronisiert, um ein Erwärmen des Mediums durch dauerhafte Lichteinwirkung zu vermeiden (s. Abbildung 10). Die videooptischen Messungen fanden mit Hilfe einer eigens programmierten Software statt. Das Programm basierte dabei auf dem Prinzip der Figur-Erkennung und setzte so automatisch Messpunkte (angezeigt durch blaue Quadrate, s. Abbildung 10) am oberen und unteren Ende des kontrahierenden EHTs. Der sich verändernde Abstand zwischen diesen Messpunkten wurde von der Software bestimmt und über die Aufnahmezeit festgehalten. Basierend auf der Abstandsänderung der Silikonschläuche und deren elastischen Eigenschaften wurde die Kontraktionskraft durch das Programm berechnet. So wurden ferner Durchschnittswerte für die Kraft, die Frequenz sowie die Kontraktions- und Relaxationszeit errechnet.



**Abbildung 9: Schematische Abbildung der videooptischen Messapparatur.** Dargestellt ist die Zellkulturschrank-ähnliche Einheit in der Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Gaszusammensetzung regulierbar sind (unterer Bereich). Der Deckel dieser Einheit besteht aus einer Glasplatte, über der sich eine Basler-Kamera befindet, welche an einem x-y-z-System montiert und über einen PC ansteuerbar ist. Als Lichtquelle für die einzelnen EHTs dienen LEDs, die unter jedem Well angebracht sind (Hansen et al. 2010).



**Abbildung 10: Exemplarische Messung eines EHTs.** Oben ist eine Momentaufnahme eines EHTs in der videooptischen Messapparatur abgebildet. Darunter abgebildet die graphische Darstellung der Kontraktionskraft in mN pro Zeit (hier 10s). Die grünen Kästchen zeigen automatisch als Kontraktion erkannte Bewegungen des EHTs, welche zur Ermittlung der funktionellen Parameter verwendet werden (Hansen et al. 2010).

#### **2.4.6. Ernten der EHTs**

Unmittelbar nach der letzten funktionellen Analyse wurden die EHTs geerntet. Noch an den Silikonschläuchen befestigt, wurden alle Proben zunächst drei Mal in 4 °C PBS gewaschen und anschließend entweder in flüssigem Stickstoff gefroren (für die RNA- und Proteinisolation) oder mit phosphatgepuffertem Formaldehyd Roti®-Histofix (für die Immunfluoreszenz) behandelt. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung bei -80 °C bzw. in TRIS gepufferter NaCl-Lösung (TBS Azid).

#### **2.4.7. RNA-Isolierung aus EHTs**

Die RNA-Isolierung erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Kits der Firma Promega® (s. 2.1.14). Da der hohe Anteil an Fibrin die verwendeten Säulen verstopft hätten, mussten die Proben zunächst mittels Proteinase K, einer Breitspektrum-Serinprotease, verdaut werden. Hierfür wurden 1,5 ml Eppendorfgefäße mit jeweils 175 µl RNA-Lysepuffer und 20 µl Proteinase K gefüllt, ein EHT hinzugegeben und für 45 min bei 56 °C und 300 rpm im Thermocycler schüttelinkubiert. Zur Sicherheit erfolgte eine wiederholte Zugabe von 10 µl Proteinase K und eine weitere 15-minütige Inkubation bei 56 °C und 300 rpm. Im Anschluss konnte die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden (s. 2.1.15). In der cDNA der EHTs wurde daraufhin die Konzentration verschiedener Gene gemessen.

#### **2.4.8. Protein-Isolierung aus EHTs**

Für die Protein-Isolierung wurden 2 ml Eppendorfgefäße mit jeweils 70 µl Protein-Isolationspuffer (P1-Buffer Qiagen® + Phosphatase Inhibitor + EDTA) und einer TissueLyser-Edelstahlkugel (Qiagen®) gefüllt, ein EHT hinzugegeben und mit Hilfe des TissueLyser (Qiagen®) für drei Mal 30 s bei 20 Hz homogenisiert. Nach Entfernen der Edelstahlkugel konnten die Proben bei -80 °C gelagert werden.

#### **2.4.9. Immunfluoreszenz der EHTs**

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden die EHTs im Ganzen (*whole mount*) gefärbt. Nachdem sie über Nacht bei 4 °C mit Histofix fixiert wurden, erfolgte ein Waschschriff in TBS (15 min). Anschließend wurden die Präparate 24 h in Lösung A (s. Tabelle 9) bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen des Primär-Antikörpers zu verhindern. Nach dem Blocken wurde der Primär-Antikörper in

Lösung B (s. Tabelle 9) zu den EHTs gegeben und ebenfalls 24 h bei 4 °C unter Bewegung inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS über Nacht konnte mit dem zweiten Antikörper sowie DRAQ5™ (DR50050, Biostatus Limited®, 1:1000) zur Kernfärbung analog zum Primär-Antikörper inkubiert werden. Nach einem letzten Waschschrift über Nacht wurden die Präparate mit dem wasserlöslichen, nicht fluoreszierenden Eindeckmedium Fluoromount-G auf Objektträgern mit Vertiefungen eingedeckt und am konfokalen Laser-Mikroskop untersucht.

## 2.5. Statistische Auswertung

Die Daten wurden als arithmetischer Mittelwert±Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) präsentiert. Mit n wurde die Anzahl der EHTs bzw. Einzelversuche/-proben bezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student-t-Test für ungepaarte Messungen oder, bei mehr als zwei Versuchsgruppen, mittels *One-way-ANOVA* mit anschließendem *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test* ermittelt. Wurden Versuchsgruppen über einen längeren Zeitraum beobachtet, erfolgte die Anwendung eines *two-way-ANOVA* mit anschließendem Bonferroni Nachtest. Die Analysen wurden mit der GraphPad Prism 5 Software durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant bewertet. In den Abbildungen wird das Signifikanzniveau in Form von Sternchen angezeigt (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Genexpression von *Asb2 $\beta$* und *S100A4*

Um ein besseres Verständnis ihrer möglichen Rollen im Herzen zu erhalten, wurde die Genexpression von *Asb2 $\beta$*  und *S100A4* in verschiedenen Modelle kardialer Pathologien untersucht: Zum einen erfolgte die Analyse im gleichen HCM-Mausmodell, in dem ursprünglich die verringerte *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentration (s. Abbildung 4) festgestellt worden war, wobei in der vorliegenden Arbeit auch andere Altersstufen dieses Modells untersucht wurden. Zum anderen erfolgte die Analyse in einem Mausmodell der dilatativen Kardiomyopathie sowie in einem *in vitro* Modell pathologischer Hypertrophie. Durch diese breite Untersuchung erhofften wir uns, ein eventuell wiederkehrendes Muster der Genexpression von *Asb2 $\beta$*  und *S100A4* zu entdecken bzw. zu widerlegen.

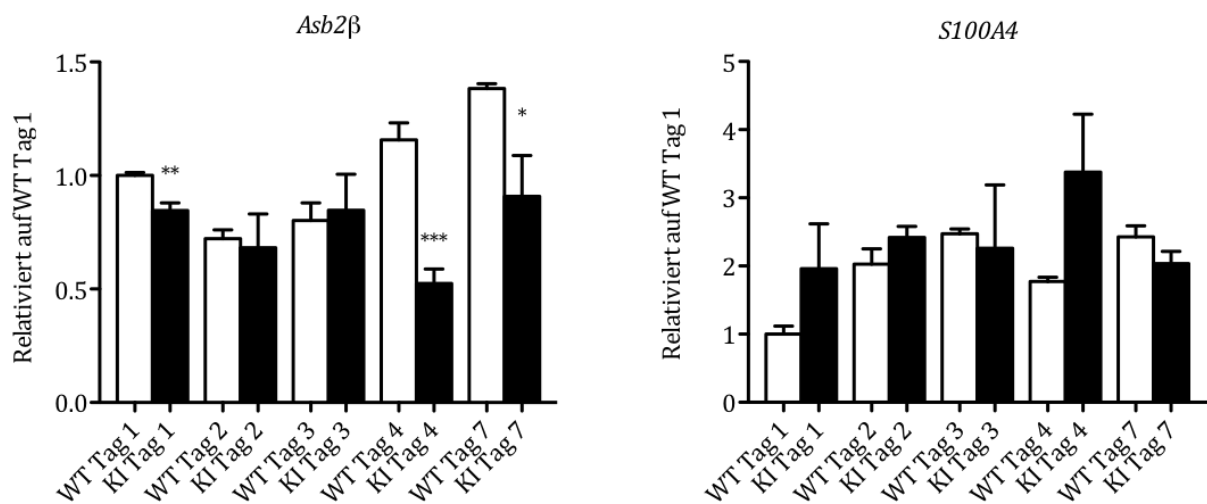
#### 3.1.1. mRNA-Konzentration im Tiermodell der hypertrophen Kardiomyopathie

Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass 10 Wochen alte Tieren des *Mybpc3*-KI-Mausmodells der HCM im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe eine niedrigere *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentration aufweisen (s. Abbildung 4). Die Gesamtaktivität des UPS ist in diesen Mäusen für verschiedene Altersstufen gut charakterisiert: Während das UPS in den KI-Mäusen bereits kurz nach der Geburt und innerhalb der ersten 14 Lebenswochen hochaktiv ist, sinkt seine Aktivität mit zunehmendem Alter verglichen mit den WT-Tieren stark ab (Schlossarek et al. 2012b). Entsprechend sollte nun konkret die *steady-state*-Konzentration von *Asb2 $\beta$*  für verschiedene Altersstufen untersucht werden. Hierfür wurden in Tieren, die alle homozygot für eine Mutation im *Mybpc3*-Gen waren, cDNA-Proben der ersten Lebenswoche, im Alter von 10 Wochen, sowie im Alter von ca. 1 Jahr untersucht und mit der cDNA entsprechend alter WT-Tiere verglichen. Alle KI-Mäuse wiesen zum Zeitpunkt der cDNA-Analyse einen HCM-Phänotyp auf.

Gleichsam wurden in beiden Gruppen auch die *steady-state*-Konzentrationen von *S100A4* untersucht. So sollte ein Vergleich der *S100A4*-Expression im *Mybpc3*-KI-Mausmodell mit der bestehenden Literatur möglich sein. Für Tiermodelle der linksventrikulären Hypertrophie, der ischämischen Kardiomyopathie und der

myokardialen Infarzierung ist eine erhöhte *steady-state*-Konzentration der *S100A4*-mRNA relativ zu unbehandelten Kontrolltieren bekannt.

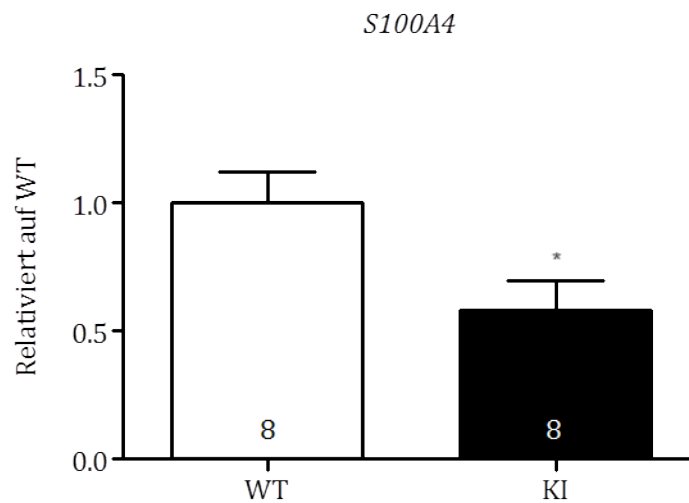
Die Analysen von *Asb2 $\beta$*  wurde in Proben von WT-Tieren 1, 2, 3, 4 und 7 Tage nach Geburt durchgeführt (s. Abbildung 11). In diesen Proben ließ sich ein gradueller Anstieg der *steady-state*-Konzentration von *Asb2 $\beta$* -mRNA feststellen. In entsprechenden Proben der KI-Tiere konnte kein vergleichbarer Anstieg die *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentration von Tag 1 bis Tag 7 beobachtet werden. Beim Vergleich der beiden Gruppen fiel auf, dass die *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentrationen in den KI-Tieren an Tag 1, 4 und 7 relativ zur WT-Gruppe signifikant niedriger waren. Am stärksten war dieser Unterschied an Tag 4, an dem in den KI-Tieren nur etwa 40 % der WT-Level gemessen werden konnten. Bei der Analyse von *S100A4* fiel im zeitlichen Verlauf der WT-Proben ebenfalls ein tendenzieller Anstieg der *S100A4*-mRNA-Konzentration mit einem Maximum an Tag 7 auf. In den KI-Tieren konnte ein solcher konstanter Anstieg nicht beobachtet werden. Beim Vergleich zwischen WT- und KI-Gruppe fiel kein signifikanter Unterschied in den *S100A4 steady-state*-Konzentrationen auf.



**Abbildung 11: *Asb2 $\beta$* - und *S100A4*-mRNA-Konzentration in *Mybpc3* KI- und WT-Mäusen während der ersten Lebenswoche.** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *Asb2 $\beta$*  und *S100A4* in Ventrikelgewebe von 1, 2, 3, 4 und 7 Tage alten *Mybpc3*-KI- (schwarz) bzw. WT-Mäusen (weiß). Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$ SEM \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001 vs. WT,  $n$ =4 pro Gruppe, Student-t-test für ungepaarte Stichproben.

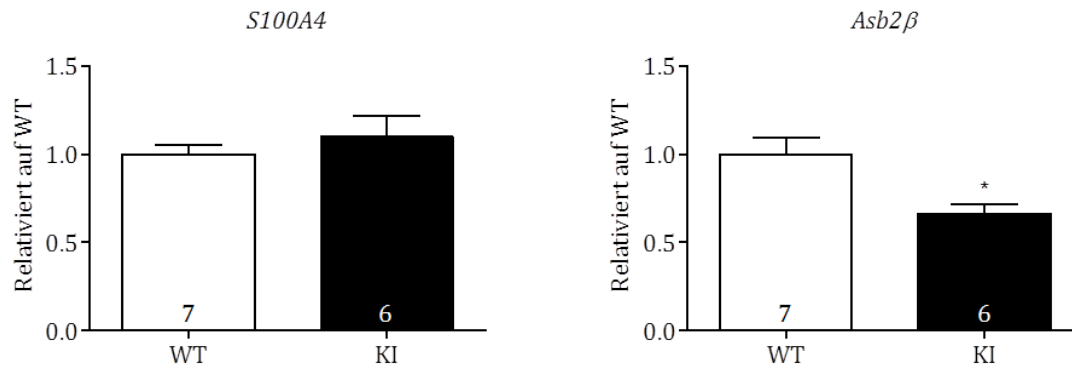
Das entscheidende Vorergebnis für diese Dissertation war die niedrigere mRNA-Konzentration von *Asb2 $\beta$*  im *Mybpc3*-KI Mausmodell im Alter von 10 Wochen (s. 1.3.2).

In denselben Proben der KI-Mäuse zeigte sich eine 42% niedrigere *S100A4* mRNA-Konzentration als im WT (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12: *S100A4*-mRNA-Konzentration in *Mybpc3*-KI- und WT-Mäusen im Alter von zehn Wochen.** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *S100A4* in Ventrikelgewebe von zehn Wochen alten *Mybpc3*-KI- (schwarz) bzw. WT-Mäusen (weiß). Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$ SEM \* $p < 0,05$ , vs. WT,  $n = 8$  pro Gruppe, Student-t-test für ungepaarte Stichproben.

Schlossarek et al. konnten zeigen, dass 57 Wochen alte Mäuse des *Mybpc3*-KI Mausmodells eine erhöhte *steady-state*-Konzentration ubiquitiniertes Proteine besitzen, bei gleichzeitig verringerter Aktivität des Proteasoms. Daraus schlossen sie auf ein gestörtes UPS im Alter (Schlossarek et al. 2012a). Entsprechend wurde die cDNA 54-66 Wochen alter KI-Mäuse auf die Konzentration von *Asb2 $\beta$* -mRNA untersucht. In den KI-Mäusen konnte im Vergleich zu den WT-Tieren eine 40% niedrigere *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentration gemessen werden (s. Abbildung 13). Überraschenderweise war die mRNA-Konzentration von *Asb2 $\beta$*  bereits in der ersten Lebenswoche niedriger als in den WT-Kontrolltieren. Anders als aus der Literatur (Schneider et al. 2007, Tamaki et al. 2013) bekannt, konnten in den KI-Mäusen also zu keinem Zeitpunkt höhere *steady-state*-Konzentrationen von *S100A4*-mRNA gemessen werden. Im Alter von 10 Wochen wiesen die KI-Tiere sogar niedrigere *S100A4*-mRNA-Konzentrationen als die Kontrolltiere auf.



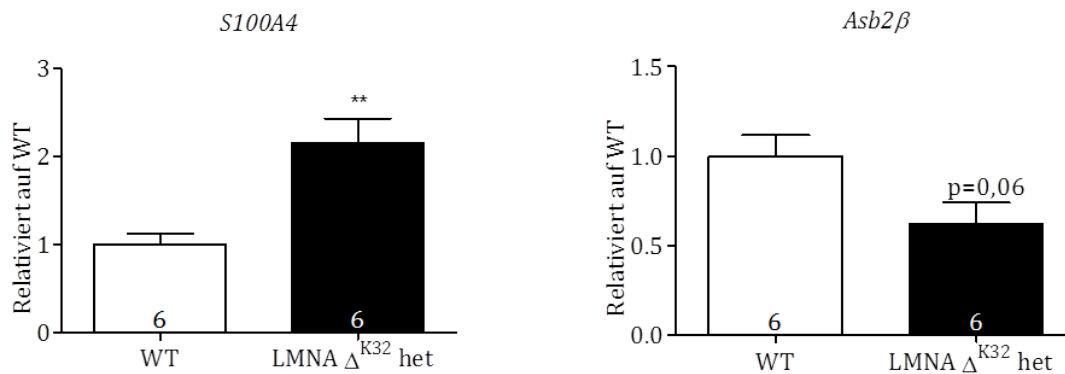
**Abbildung 13: *Asb2β*- und *S100A4*-mRNA-Konzentration in *Mybpc3*-KI- und WT-Mäusen im Alter von 54-66 Wochen.** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *S100A4* und *Asb2β* in Ventrikelgewebe von 54-66 Wochen alten *Mybpc3*-KI- (schwarz) bzw. WT-Mäusen (weiß). Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$ SEM \* $p < 0,05$ , vs. WT, n=7 (WT) n=6 (KI), Student-t-test für ungepaarte Stichproben.

### 3.1.2. mRNA-Konzentration im Tiermodell der dilatativen Kardiomyopathie

Auch für die familiäre dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine Störung des UPS beschrieben (Gilbert et al. 1999). Um die Ergebnisse der Genexpression im HCM-Modell besser einordnen zu können, wurden die mRNA-Konzentrationen von *Asb2β* und *S100A4* auch in einem Mausmodell der dilatativen Kardiomyopathie untersucht. Diese Mäuse besitzen eine Deletion im *LMNA* Gen, welches für das Strukturprotein Lamin kodiert und zum ersten Mal von Quijano-Roy et al. im Menschen beschrieben wurde (Quijano-Roy et al. 2008). *LMNA*- $\Delta^{K32}$ -homozygote Tiere dieses Modells weisen bereits kurz nach der Geburt sowohl ein geringeres Körpergewicht als auch eine verringerte linksventrikuläre Masse auf und werden nicht älter als 19 Tage. Jedoch leben 54 Wochen nach Geburt noch 50% der *LMNA*- $\Delta^{K32}$ -heterozygoten Mäuse. Sie weisen zu diesem Zeitpunkt ein erniedrigtes Herzgewicht bei gleichzeitig systolisch und diastolisch erhöhten linksventrikulären Innendurchmessern als Zeichen eines DCM-Phänotyps auf (Efthimiadis et al. 2014a). Der eindeutige Phänotyp in fortgeschrittenem Alter bot daher eine gute Vergleichsmöglichkeit zum HCM-Model. Interessanterweise weisen diese Mäuse kommt es in diesem Mausmodell zu zwei unterschiedlichen Phasen des Pathomechanismus: Jungtiere besitzen deutliche geringere Lamin-Konzentration, was auf einen Abbau der toxischen Lamin-Mutante zurückzuführen ist. In älteren Tieren hingegen konnte insgesamt eine deutliche Zunahme der Lamin-Konzentration gesehen werden, was als Ausdruck einer UPS-Insuffizienz zu deuten ist (Cattin et al. 2013). In diesen heterozygoten *LMNA*- $\Delta^{K32}$ -Mäusen zeigten sich im Alter von 54-66 Wochen eine



110% höhere *S100A4* mRNA-Konzentration, während die *Asb2β* mRNA-Konzentrationen tendenziell niedriger (-40%) als in der WT-Kontrolle waren (s. Abbildung 14). Anders als im *Mybpc3*-KI HCM Mausmodell deckt sich die erhöhte Konzentration von *S100A4*-mRNA im Tiermodell der dilatativen Kardiomyopathie mit den Ergebnissen der eingangs beschriebenen Literatur (s. 1.5.2). Die erniedrigten *Asb2β* mRNA-Konzentrationen passen zu den Ergebnissen aus dem HCM-Modell.



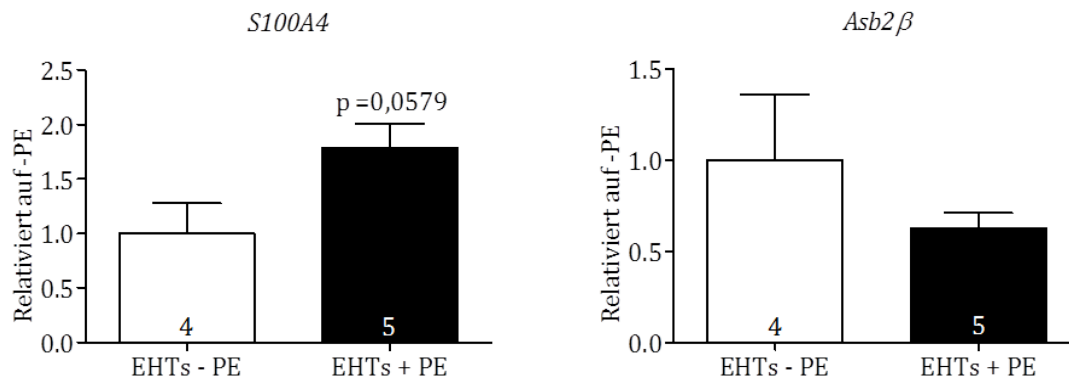
**Abbildung 14: *Asb2β*- und *S100A4*-mRNA-Konzentration in 54-66 Wochen alten Tieren eines DCM-Mausmodells.** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *S100A4* und *Asb2β* in Ventrikelgewebe 54-66 Wochen alter *LMNA-Δ<sup>K32</sup>*-heterozygoter (schwarz) bzw. WT-Mäuse (weiß). Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$ SEM \*\* $p < 0,005$  vs. WT,  $n=6$  pro Gruppe, Student-t-test für ungepaarte Stichproben.

### 3.1.3. mRNA-Konzentration im EHT-Modell der pathologischen Hypertrophie

Mit Hilfe des am Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie entwickelten, dreidimensionalen *in vivo* Modells des künstlichen Herzgewebes, *engineered heart tissue*, EHT (Hansen et al. 2010) etablierten Hirt et al. ein *in vivo* Modell der kardialen pathologischen Hypertrophie. In ihrer Arbeit führte eine akute Nachlasterhöhung zu einer ausgeprägten Hypertrophie der Kardiomyozyten, Fibroseentwicklung, eingeschränkter kontraktile Funktion sowie zu einer Aktivierung des hypertrophen Genprogramms (Hirt et al. 2012). Interessanterweise fiel beim Vergleich des Transkriptom der so behandelten EHTs mit dem zweier Mausmodelle akuter Nachlasterhöhung auf, dass *S100A4* in allen drei Gruppen hochreguliert war. Als Positivkontrolle dienten mit Phenylephrin behandelte EHTs, für die sie mit der akuten Nachlasterhöhung vergleichbare Effekte nachweisen konnten. Als klassischer  $\alpha_1$ -adrenerger Agonist führt Phenylephrin über die Aktivierung von Phospholipase C zur Bildung der *second messenger* Moleküle Inositoltrisphosphat und Diacylglycerin.

Dadurch wird kurzfristig die Calcium-Konzentration im Zytosol und damit die Kontraktionskraft erhöht und langfristig die Expression hypertropher Gene aktiviert (Efthimiadis et al. 2014c).

In den EHTs führte eine Behandlung mit Phenylephrin tendenziell zu höheren *S100A4*-mRNA-Konzentrationen, während die *Asb2β*-mRNA-Konzentration in den mit Phenylephrin behandelten EHTs tendenziell geringer als in den Kontroll-EHTs war (s. Abbildung 15). Vergleichbar mit den Ergebnissen der Analyse im DCM-Modell schien auch hier das kardiale Hypertrophie-Modell zumindest mit einem Trend zum Anstieg der *S100A4*-mRNA-Konzentrationen bei gleichzeitigem Abfall der *Asb2β*-mRNA-Konzentrationen assoziiert zu sein.



**Abbildung 15: *Asb2β*- und *S100A4*-mRNA-Konzentration in EHTs +/- Phenylephrin.** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *Asb2β* und *S100A4* in künstlichem Herzgewebe (EHTs), die mit (+PE, schwarz) oder ohne (-PE, weiß) dem  $\alpha$ 1-adrenergen Agonist Phenylephrin behandelt wurden. Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$ SEM vs. unbehandelte EHTs, n=4 (-PE), n=5 (+PE), Student-t-test für ungepaarte Stichproben.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen die Konzentrationen der *Asb2β*-mRNA in allen untersuchten Modellen erniedrigt war. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Thottakara et al. (Thottakara et al. 2015). Für die mRNA-Konzentrationen von *S100A4* galt dies nur bedingt: Wie in der Literatur beschrieben, zeigten sich in den *LMNA*- $\Delta^{K32}$ -Mäusen und den Phenylephrin-behandelten EHTs höhere *S100A4*-mRNA-Konzentrationen. Einzig im *Mybpc3*-KI HCM-Mausmodell zeigten sich generell unveränderte, bzw. im Alter von 10 Wochen sogar erniedrigte *S100A4*-mRNA-Konzentrationen.

### **3.2. S100A4 als Zielprotein von Asb2 $\beta$**

Die Hauptfragestellung dieser Arbeit war, ob S100A4 als Substrat von Asb2 $\beta$  für die Degradation im Proteasom markiert wird.

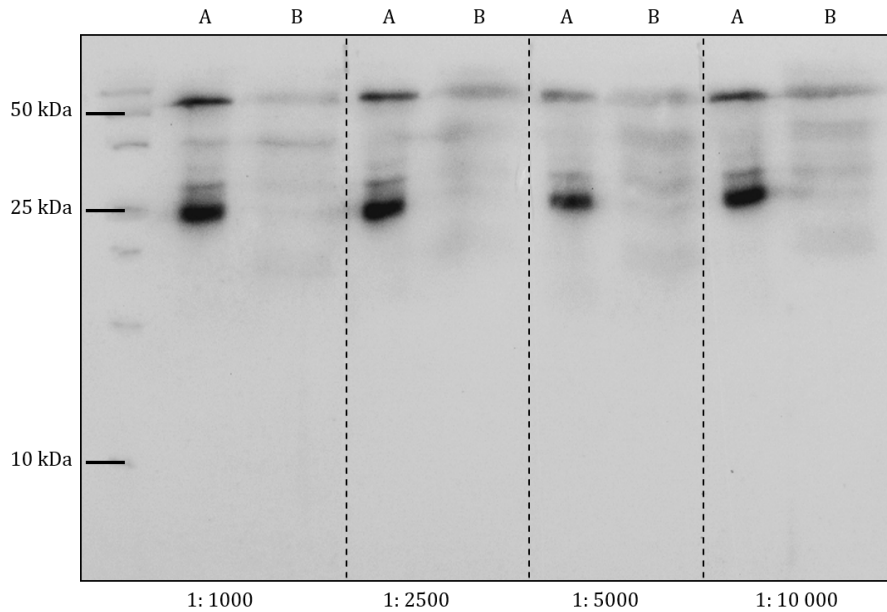
#### **3.2.1. S100A4 in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCMs)**

In Anlehnung an die bereits beschriebenen Vorergebnisse wurde zunächst versucht, Unterschiede in der *steady-state* Protein-Konzentration von endogenem S100A4 in mit Asb2 $\beta$  WT und MUT transduzierten neonatalen Mauskardiomyozyten nachzuweisen. Eine geringere S100A4-Protein-Konzentration in mit Asb2 $\beta$  WT behandelten NMCMs wäre ein erster Hinweis für einen Abbau durch Asb2 $\beta$  gewesen.

#### **3.2.2. Versuche mit dem Antikörper Abcam 93283 (S100A4)**

Zunächst mussten korrekte Versuchsbedingungen für den zu verwendenden Antikörper etabliert werden. Die ersten Versuche erfolgten mit einem Antikörper der Firma Abcam®. Als Proben für die Testung des Antikörpers gegen S100A4 dienten unbehandelte NMCMs und Mausherzgewebe. Um die optimalen Versuchsbedingungen zu bestimmen, erfolgten die Versuche in unterschiedlichen Antikörper-Konzentrationen und sowohl auf PVDF- als auch auf Nitrocellulose-Membranen.

Die Banden im Western Blot der S100A4-Testung passten nicht zu den vom Hersteller vorgegebenen Proteingrößen (s. Abbildung 16). Der abgebildete Western Blot ist lediglich ein repräsentatives Beispiel aus vielen Versuchen mit unterschiedlichen Proben und Bedingungen. Als Proben dienten u.a. Proteinextrakte von unbehandelten Mausfibroblasten, Mauskardiomyozyten und Mausherzgewebe. Außerdem wurde der Antikörper auf seine Bindungsfähigkeit in Proben von mit S100A4 transfizierten HEK-293-Zellen (pGG2-CMV-S100A4V5C) und transduzierten EHTs (AAV6-cTnT-S100A4V5C) untersucht. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte HEK-293 Zellen. Trotz wiederholter Durchführung der Western Blots konnte bei keinem der Versuche ein spezifischer Nachweis von endogenem S100A4 erreicht werden.



**Abbildung 16: Repräsentativer Western Blot der Testung des S100A4-Antikörpers Abcam 93283.** Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot in unterschiedlichen Versuchsbedingungen für den S100A4-Antikörper Abcam 93283. Untersucht wurde die S100A4-Protein-Konzentration in Mausherzgewebe von WT-Mäusen (A) bzw. unbehandelten neonatalen Mausekardiomyozyten (B). Der Erstantikörper S100A4 wurde in den Verdünnungen 1:1 000, 1:2 500, 1:5 000 und 1:10 000 getestet. Molekulargewicht des Markers durch schwarze Balken angezeigt, erwartetes Molekulargewicht von S100A4 ca. 12 kDa.

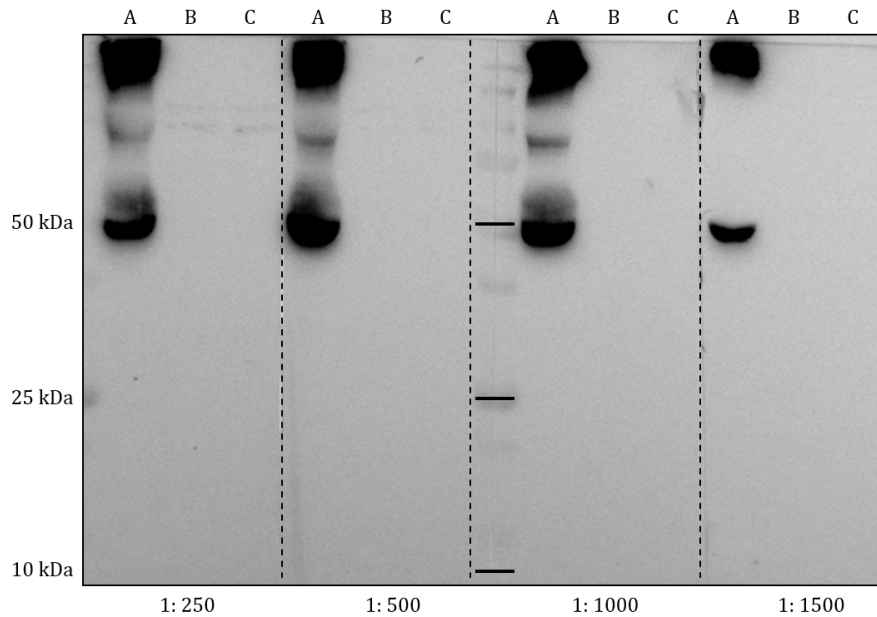
### 3.2.3. Versuche mit maßgeschneidertem Antikörper Eurogentec Custom S100A4

Da mit den vorhandenen Antikörpern in Mausherzgewebe, neonatalen Mausekardiomyozyten, Maus-Fibroblasten und transfizierten HEK-293-Zellen kein S100A4-Proteinsignal nachgewiesen werden konnte, wurde mit Hilfe des Speedy-28-Programmes der Firma Eurogentec® ein maßgeschneiderter Antikörper gegen ein Epitop in der Aminosäuresequenz von S100A4 synthetisiert. Die Aminosäuresequenz wurde so gewählt, dass der Antikörper S100A4 in den Spezies Mensch, Ratte und Maus detektieren sollte. Ein bestimmter Abschnitt in der homologen Sequenz der drei Spezies wurde als Antikörper-Bindungsstelle gewählt (s. Tabelle 17).

S100-A4 [Homo sapiens]	MACPLEKALDVMVSTFHKYSGKEGDKFKLNKSELKELLTRELPSFLGKRTDE AAFQKLMS <b>NLDSNRDNEVDFQEYCVFLSCIAMMCNEFFEGFPDKQPRKK</b>
S100-A4 [Mus musculus]	MARPLEEALDVIVSTFHKYSGKEGDKFKLNKTELKELLTRELPSFLGKRTDEA AFQKVMS <b>NLDSNRDNEVDFQEYCVFLSCIAMMCNEFFEGCPDKEPRKK</b>
S100-A4 [Rattus norvegicus]	MARPLEEALDVIVSTFHKYSGNEGDKFKLNKTELKELLTRELPSFLGRRTDEA AFQKLMN <b>NLDSNRDNEVDFQEYCVFLSCIAMMCNEFFEGCPDKEPRKK</b>
Sequenz des Antikörpers Eurogentec® Custom S100A4	<b>NLDSNRDNEVDFQEYC</b>

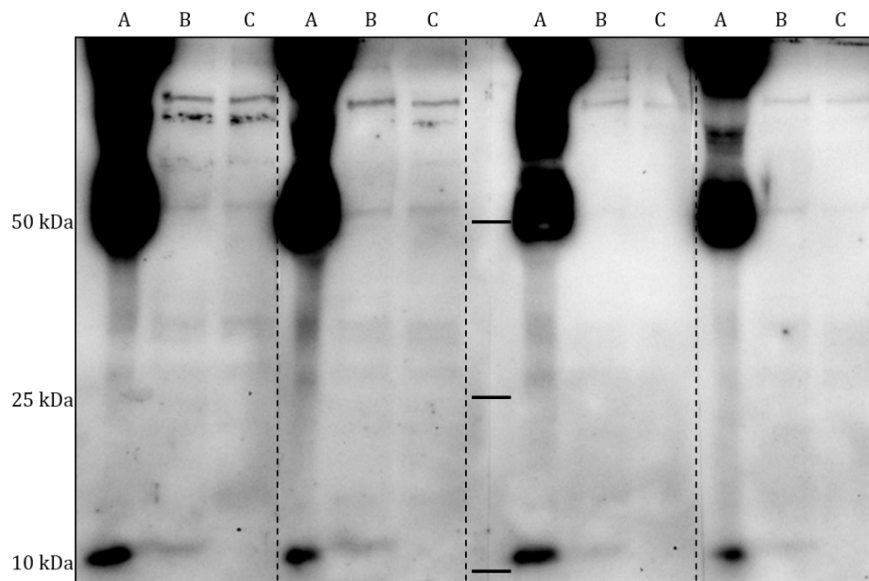
**Tabelle 17: Aminosäuresequenzen von S100A4 in den Spezies Mensch, Maus, Ratte im FASTA-Format, sowie die Aminosäuresequenz des verwendeten Eurogentec®-Custom-Antikörpers gegen S100A4.** Sequenzhomologie in **fett** hervorgehoben. Der Eurogentec®-Custom-Antikörpers sollte somit theoretisch S100A4 aller drei Spezies binden können.

Auch der Custom S100A4-Antikörper wurde in einer Vielzahl unterschiedlicher Blots auf seine Bindungsfähigkeit an S100A4 untersucht. Es wurden vergleichbare Proben wie bei der Testung des Antikörpers Abcam 93283 verwendet. Der Antikörper wurde in Konzentrationen von 1: 250 bis 1: 20 000 auf PVDF- und Nitrocellulose-Membranen getestet (s. Abbildung 17).



**Abbildung 17: Repräsentativer Western Blot verschiedener Bedingungen für Custom-S100A4-Antikörper (Eurogentec®).** Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot in unterschiedlichen Versuchsbedingungen für den S100A4-Antikörper Custom-S100A4 Eurogentec. Untersucht wurde die Expression von S100A4-Protein in EHTs, die mit einem S100A4 überexprimierenden AAV6 behandelt wurden (A), in HEK-293-Zellen, die mit einem S100A4 überexprimierenden Plasmid behandelt wurden (B) sowie in unbehandelten HEK-293-Zellen (C). Der Erstantikörper wurde in den Verdünnungen 1:250, 1:500, 1:1 000 und 1:1 500 getestet. Molekulargewicht des Markers durch schwarze Balken angezeigt, erwartetes Molekulargewicht von S100A4 ca. 12 kDa.

Um sicherzugehen, dass S100A4 geladen und der Western Blot korrekt durchgeführt worden war, wurden die Membranen im Anschluss mit dem Antikörper gegen ein V5-Tag inkubiert. Hier zeigte sich ein Signal in Höhe von ca. 12 kDa als Nachweis des exogen eingebrachten V5-getaggtten S100A4 (s. Abbildung 18). Zur besseren Übersicht ist nur ein exemplarischer Western Blot abgebildet.



**Abbildung 18: Nachweis des V5-getaggtten S100A4** nach Kontroll-Behandlung mit dem Primär-Antikörper gegen V5 in der Verdünnung 1:1 000. Der Nachweis des V5-getaggtten S100A4 unmittelbar oberhalb der 10 kDa Markierung in entsprechend behandelten Proben (jeweils A + B) spricht gegen einen spezifischen Nachweis von S100A4 durch den Custom-Antikörper, erwartetes Molekulargewicht von S100A4 ca. 12 kDa.

Die große Menge unspezifischer Signale sowie das eindeutige V5-Signal in den transfizierten HEK-293-Zellen bzw. den transduzierten EHTs ließen darauf schließen, dass S100A4 durch den Antikörper Custom S100A4 nicht spezifisch nachgewiesen werden konnte.

### 3.2.4. Klonierung

Da der Nachweis endogenen S100A4 auf Proteinebene nicht erfolgreich war, erfolgte ein Strategiewechsel. Spaich et al. beschrieben 2012 mit Fbxl22 erstmals eine weitere herzspezifische E3-Ligase und identifizierten  $\alpha$ -Actinin und Filamin C als Substrate. Hierzu co-transfizierten sie HEK-293-Zellen mit Plasmiden der drei beteiligten Proteine und analysierten die  $\alpha$ -Actinin- bzw. Filamin Konzentration in Abhängigkeit von der Fbxl22-Expression (Spaich et al. 2012). Analog dazu dienten in der vorliegenden Arbeit COS-7-Zellen als „Boxring“, der die Rahmenbedingungen für den Abbau von S100A4 durch Asb2 $\beta$  darstellte. Keine der verwendeten Zelllinien exprimiert S100A4 oder Asb2 $\beta$  endogen, so dass gleichsam von einem neutralen „Ringrichter“ gesprochen werden könnte. Ein Vorteil dieser Methodik bestand darin, die eingebrachten Konstrukte mit sog. Epitop-Tags, kurzen Aminosäuren-Motiven versehen zu können, um ihre Detektion im Western-Blot zu erleichtern.

Da jedoch auch die Technik des Epitop-Taggings nicht immer eine einwandfreie Detektion im Western Blot garantiert, wurden mehrere Ansätze verfolgt. Für die Detektion von Asb2 $\beta$  wurde das FLAG-Tag gewählt, mit dem unsere Arbeitsgruppe bereits Erfahrung hatte. Für die Detektion von S100A4 wurden unterschiedliche Tags (HIS, V5) in verschiedenen Positionen (C- und N-terminal) Tags verwendet (Jarvik und Telmer 1998). Der Aufbau der einzelnen Plasmide wird kurz vorgestellt, unabhängig davon, ob die Detektion von S100A4 erfolgreich war. Im Anschluss werden ab 3.2.5 die benötigten Klonierungsschritte am Beispiel des Plasmids pGG2-CMV-mS100A4-V5-C gezeigt. Diese erfolgreichen Zwischenschritte werden bewusst als Ergebnis gezeigt. In Abschnitt 3.2.8 werden die Ergebnisse der Transfektionen mit unterschiedlich positionierten Tags präsentiert.

#### **3.2.4.1. Plasmid pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$ WT und MUT**

Für die Expression von Asb2 $\beta$  wurde mit dem Plasmid pGG2-CMV-FLAG-GFP gearbeitet, welches mit einem FLAG-Tag am C-Terminus versehen war und für ein Grün fluoreszierendes Protein kodierte. pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$  WT und pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$  MUT unterschieden sich genau wie die Adenoviren, die von Thottakara et al. verwendet worden waren, einzig durch eine Punktmutation in der SOCS-Box von Asb2 $\beta$  (s. Abbildung 19A).

#### **3.2.4.2. Plasmid pGG2-CMV-S100A4-V5-C**

Die Klonierung des Konstrukts in den Vektor pJET1.2 ist unter 2.1.11 beschrieben. Für die spätere Verwendung in Co-Transfektionen war der im Vektor enthaltene T7-Promoter nicht geeignet, da er im Vergleich zum CMV-Promoter des pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$  wahrscheinlich zu einer unterschiedlich starken Expression des Konstruktes geführt hätte. Aus diesem Grund erfolgte die Subklonierung des Inserts in den bereits erwähnten Vektor pGG2-CMV-FLAG-GFP (s. Abbildung 19D). Auf Grund der gleichen Restriktionsschnittstellen gestaltete sich diese Subklonierung sehr einfach. Abschließend wurde das Plasmid mittels Sequenzierung auf korrekte Basenfolge überprüft.

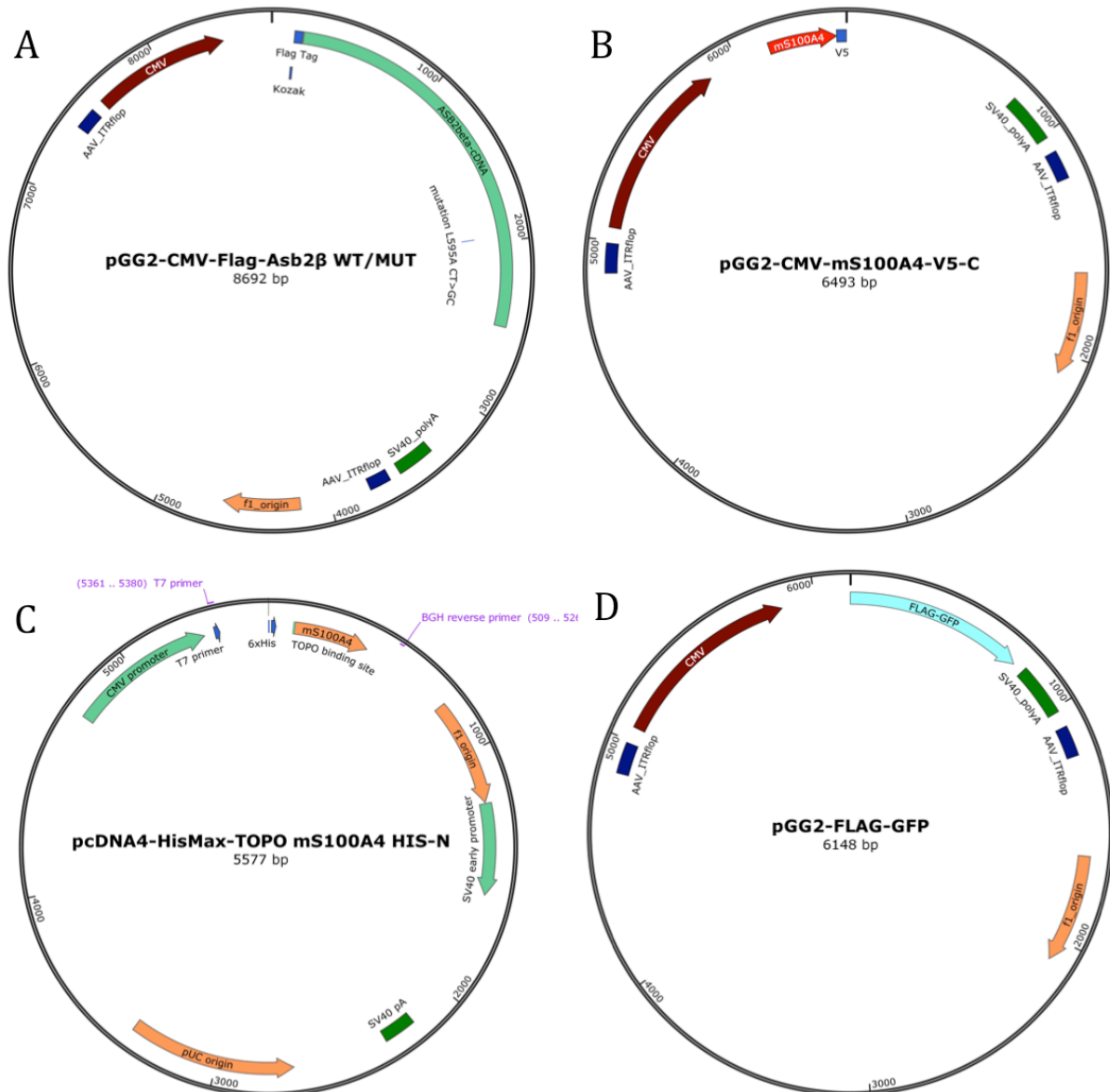


#### **3.2.4.3. Plasmid pGG2-CMV-mS100A4-V5-N**

Der einzige Unterschied zu dem Plasmid pGG2-CMV-S100A4-V5-C bestand in der unterschiedlichen Position des V5-Tag (N- statt C-Terminal), daher wird für pGG2-CMV-mS100A4-V5-N auf eine Abbildung verzichtet.

#### **3.2.4.4. Plasmid pcDNA4-HisMax-TOPO mS100A4 HIS-N**

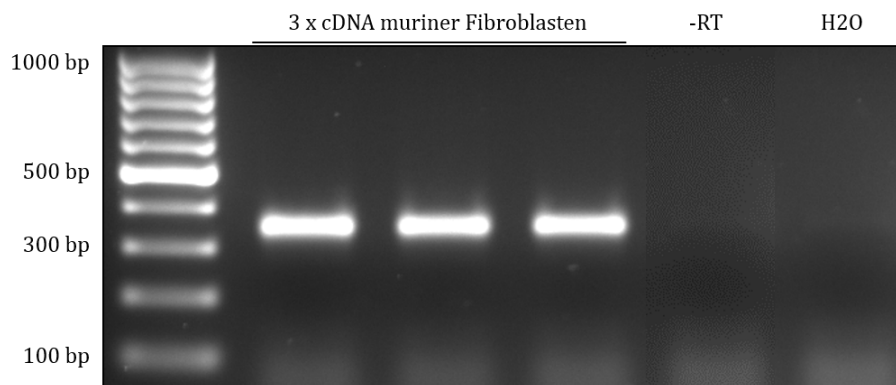
Da zum Zeitpunkt der Klonierungen nicht klar war, welches Tag an welcher Position die beste Detektion im Western Blot ermöglichen würde, wurde parallel zu den V5-getaggen Konstrukten ein weiteres Plasmid synthetisiert, welches vor Beginn der S100A4-Sequenz sechs Histidinreste enthielt (s. Abbildung 19C).



**Abbildung 19: Schematische Karte der für die Transfektion von COS7-Zellen verwendete Plasmide pGG2-CMV-Asb2β-FLAG-WT bzw. MUT (A), pGG2-CMV-mS100A4-V5-C (B), pcDNA4-HisMax-TOPO mS100A4 HIS-N (C) und pGG2-FLAG-GFP (D).** Vor die *Asb2β*-cDNA wurde ein FLAG-Tag kloniert, um die spätere Detektion im Western Blot zu ermöglichen. Als Promoter diente der Zytomegalie-Virus-Promoter (CMV). Die aus dem *simian virus 40* stammende SV40\_polyA-Sequenz ermöglichte die Polyadenylierung des Konstrukts und verhinderte so dessen frühzeitige Degradation. Die beiden AAV\_ITRflop-Sequenzen (*inverted terminal repeats*) ermöglichten die Synthese eines AAV, der f1\_origin diente der fakultativen Herstellung von *small interfering RNA* gegen das Konstrukt (A). Hinter die murine *S100A4*-cDNA wurde ein V5-Tag kloniert, um die spätere Detektion im Western Blot zu ermöglichen (B). Vor die *S100A4*-cDNA wurde ein HIS-Tag kloniert. Die Primerbindungsstellen *T7* und *BGH-reverse* ermöglichten die Kontroll-Sequenzierung des fertigen Konstrukts. Der *pUC origin* diente der Replikation des Konstrukts in *E.coli*. Die *SV40 early promoter sequence* verstärkte die Translation des Konstrukts in eukaryotischen Zellen (C). Vor der *GFP*-cDNA befindet sich ein FLAG-Tag. Dieser Vektor wurde als *Backbone* für die Subklonierung gewählt (D).

### 3.2.5. Amplifikation des Inserts

Für die Klonierung des Plasmids pGG2-CMV-mS100A4-V5-C musste zuerst die cDNA des Inserts S100A4-V5-C mittels PCR amplifiziert werden. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen und die Sequenz des Inserts bestimmten hierbei die für diese Amplifizierung verwendeten Primer-Sequenzen (s. Tabelle 6). Als *Template* diente cDNA muriner Fibroblasten. Das Produkt NheI-S100A4-V5-C-Not war 372 bp lang (s. Abbildung 20).

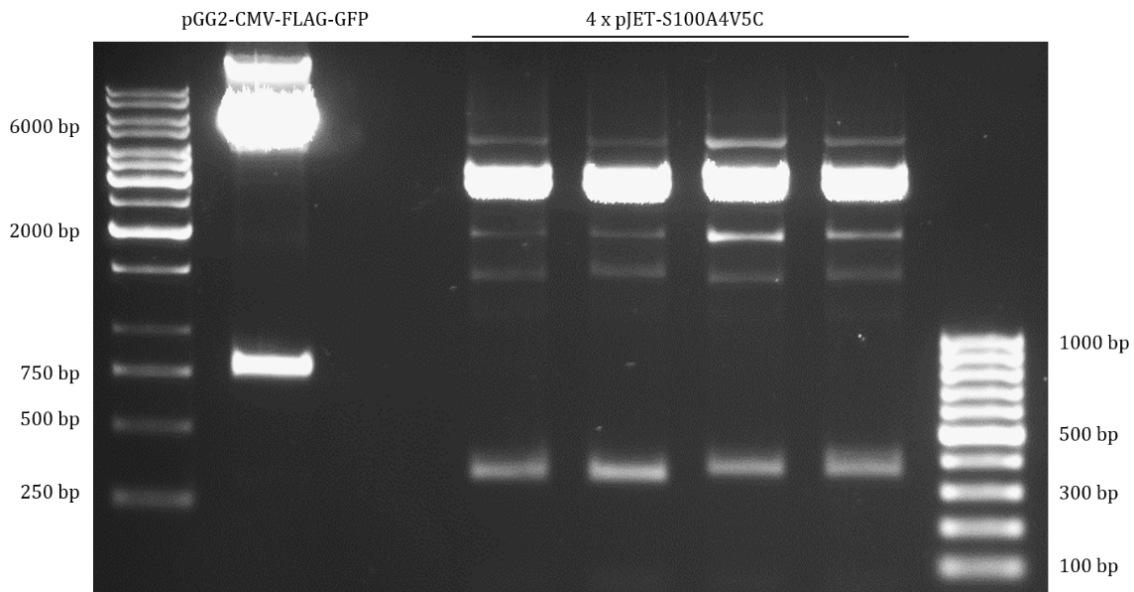


**Abbildung 20: Nachweis der Amplifikation von S100A4-V5-C.** Die Abbildung zeigt ein PCR-Gel mit einer Bande auf der erwarteten Höhe von 372 bp nach der Amplifikation des Konstruktes S100A4-V5C. Als *Template* der reversen Transkription diente in drei verschiedenen Ansätzen cDNA muriner Fibroblasten. Die Negativkontrolle erfolgte sowohl ohne reverse Transkriptase (-RT) als auch mit Wasser (H<sub>2</sub>O). Marker: 1 kb, Laufbedingungen: 0,6% Agarose, 80 mV, 45 min.

### 3.2.6. Restriktionsverdau

Im Anschluss wurde der Zielvektor pGG2-CMV-FLAG-GFP (6148 bp), welcher den für die Transfektion gewünschten CMV-Promoter enthielt, mit den passenden Restriktionsenzymen verdaut, um einen linearisierten *Backbone* (5410 bp) für die Ligation mit dem Insert zu erhalten.

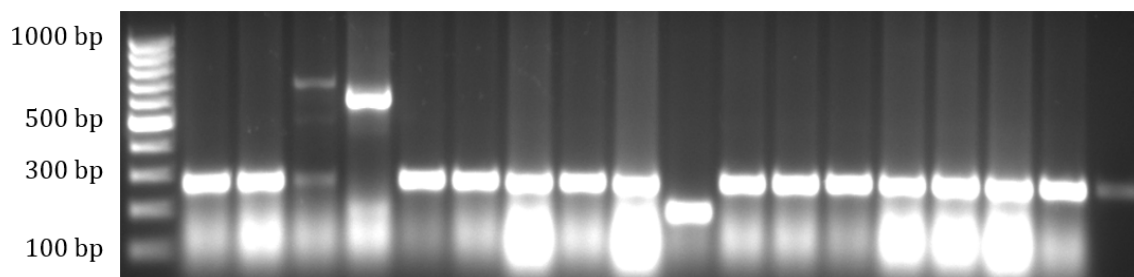
Das Insert S100A4-V5-C (372 bp) konnte ebenfalls durch einen Restriktionsverdau aus dem bereits klonierten, letztlich aber nicht für Transfektionen verwendeten Plasmid pJET-S100A4-V5-C (2974 bp) herausgeschnitten werden (s. Abbildung 21).



**Abbildung 21: Restriktionsverdau von pGG2-CMV-FLAG-GFP und pJET-S100A4-V5-C.** Die Abbildung zeigt ein PCR-Gel als Ergebnis eines Restriktionsverdaus mit den Enzymen NheI und NotI. Es wurden sowohl der pGG2-CMV-FLAG-GFP-Vektor (erste Tasche, erwartete Höhe des *Backbone* 5410 bp) als auch vier Ansätze des pJET-S100A4-V5-C (Taschen 2-5, erwartete Höhe des Inserts 372 bp) geschnitten. Marker: 10 kb (links) und 1 kb (rechts). Laufbedingungen: 0,8% Agarose, 80 mV, 55 min.

### 3.2.7. Ligation und *Colony-PCR*

Nach einer Gelextraktion (s. 2.1.3) konnten die Fragmente der Amplifikation mittels T4-Ligase verbunden und die erfolgreiche Ligation (s. 2.1.5) durch eine *Colony-PCR* (s. 2.1.9) überprüft werden. Derjenige Klon, der das korrekt ligierte Plasmid aufgenommen hatte, wies nun neue Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen auf. Von 18 ausgewählten Klonen hatte nur ein Klon das korrekte Plasmid (557 bp) aufgenommen (s. Abbildung 22).



**Abbildung 22: *Colony-PCR*.** Die Abbildung zeigt ein PCR-Gel als Ergebnis nach einer *Touchdown-PCR*. Zuvor waren 18 verschiedene TOP10-Klone ausgewählt und nach der *Touchdown-PCR* einzeln in die Geltaschen gegeben worden. Der Nachweis des korrekt inserierten Fragments gelang auf der erwarteten Höhe von 557 bp in der 4. Tasche von links. Marker 1 kb. Laufbedingungen 0,6% Agarose, 80 mV, 45 min.

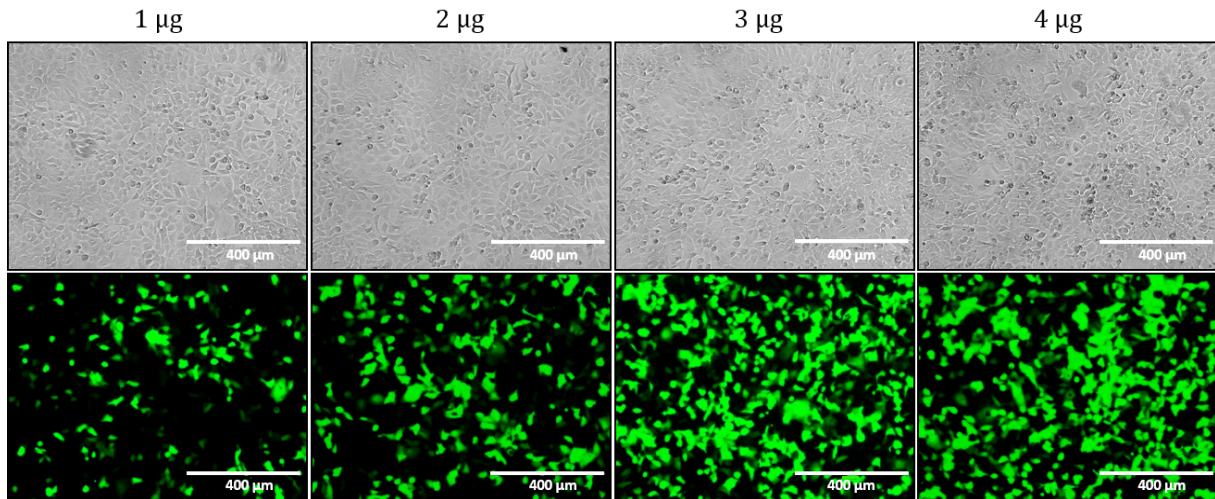
### **3.2.8. Einzeltransfektionen**

Bevor der Abbau von S100A4 durch Asb2 $\beta$  mittels Co-Transfektion überprüft werden konnte, wurden die verwendeten Plasmide in Einzeltransfektionen und anschließenden Western Blots auf ihre Expressionseffizienz sowie Nachweisbarkeit getestet.

#### **3.2.8.1. pGG2-CMV-FLAG-GFP**

Um die Effizienz des Transfektionsreagenz TurboFect™ zu überprüfen und gleichzeitig sicherzustellen, dass die verwendeten HEK-293-Zellen die Behandlung überstehen, wurde die erste Transfektion von HEK-293-Zellen mit einem pGG2-CMV-FLAG-GFP Plasmid durchgeführt. Wegen des enthaltenen GFPs konnte durch eine Fluoreszenzmikroskopie *in vitro* sowohl die korrekte Durchführung gesichert als auch die Promotereffizienz und die optimale Plasmidmenge bestimmt werden (s. Abbildung 23).

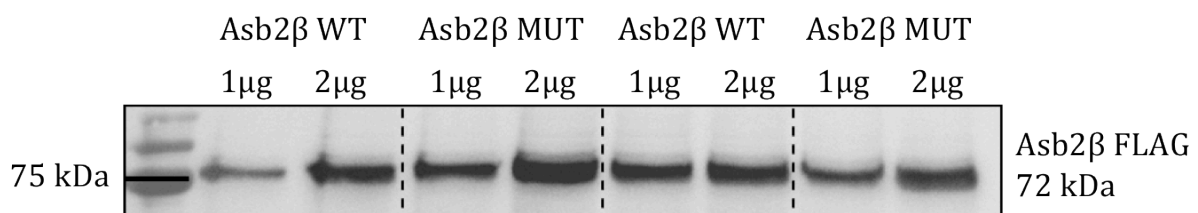
Je größer die verwendete Menge an Plasmid war, desto stärker wurde das Fluoreszenzsignal. Betrachtete man die Durchlicht-Mikroskop-Aufnahmen, schien kein Unterschied im Überleben der Zellen der verschiedenen Gruppen zu bestehen. Daraus folgte, dass bis zu 4  $\mu$ g eines Plasmids mit CMV-Promoter pro Well einer 12-Well-Platte eine geeignete Menge für eine effiziente Transfektion darstellen. Als nächstes erfolgte der Nachweis der überexprimierten Proteine auf Western-Blot-Ebene. Ziel war die optimale Detektion des getaggten S100A4. Im Folgenden sind die Ergebnisse von Einzel-Transfektionen der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (s. Abbildung 19A-C) aufgeführt.



**Abbildung 23: Kontrolle der Transfektionseffizienz.** In der unteren Reihe abgebildet ist eine Fluoreszenzmikroskopie zur Kontrolle der Transfektionseffizienz von pGG2-CMV-FLAG-GFP in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit 1-4 µg Plasmid nach einer Inkubation von 48h (100-fache Vergrößerung). Entsprechend der Menge des verwendeten Plasmids zeigt sich ein ansteigendes GFP-Signal. Die obere Reihe zeigt die dazugehörige Durchlicht-Aufnahme. Maßstabsbalken 400 µm.

### 3.2.8.2. pGG2-CMV-FLAG-Asb2β MUT oder WT

Die Transfektion erfolgte mit jeweils 1 µg und 2 µg pGG2-CMV-FLAG-Asb2β-WT bzw. MUT. Je nach verwendeter Menge wurde dasselbe Konstrukt unterschiedlich stark exprimiert (1 µg WT vs. 2 µg WT bzw. 1 µg MUT vs. 2 µg MUT). Vergleich man die Expression beider Konstrukte (1 µg WT vs. MUT bzw. 2 µg WT vs. MUT) so war kein Unterschied im FLAG-Signal zu erkennen (s. Abbildung 24). Beide Konstrukte wurden gleich stark exprimiert. Dies war eine wichtige Voraussetzung für die späteren Co-Transfektionen.



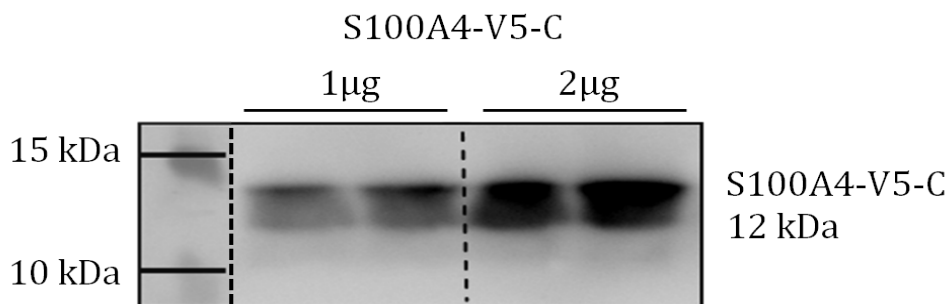
**Abbildung 24: Einzeltransfektion von HEK-293-Zellen mit pGG2-CMV-FLAG-Asb2β-WT bzw. MUT.** Die Abbildung zeigt einen Western Blot mit Nachweis der Transfektionseffizienz von pGG2-CMV-FLAG-Asb2β-WT bzw. pGG2-CMV-FLAG-Asb2β-MUT in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit 1 µg bzw. 2 µg Plasmid nach einer Inkubation von 48h. Molekulargewicht des Markers durch schwarzen Balken angezeigt.

### **3.2.8.3. pcDNA4-HisMax-TOPO mS100A4 HIS-N und pGG2-CMV-mS100A4-V5-N**

Für die Einzel-Transfektion wurden 1-4 µg des HIS-getaggten Konstrukts verwendet. Aufgrund der starken unspezifischen Interaktion des HIS-Antikörpers u.a. mit dem Proteinstandard sowie der selbst bei 4 µg Plasmid nur sehr schwachen Bande war dieses Konstrukt für die geplanten Co-Transfektionen ungeeignet. Ebenfalls als ungeeignet erwies sich das am N-Terminus mit V5-Tag versehene Konstrukt, da kein Nachweis des getaggten Konstruktes im Western Blot gelang. Auf Abbildungen der beiden Versuche wurde verzichtet.

#### 3.2.8.4. pGG2-CMV-mS100A4-V5-C

Die beiden Plasmide pcDNA4-HisMax-TOPO mS100A4 HIS-N und pGG2-CMV-mS100A4-V5-N erbrachten keinen erfolgreichen Nachweis der Überexpression. In der Annahme, dass die N-terminale Position des V5-Tags den erfolgreichen Nachweis im Western Blot verhinderte, wurde ein weiterer Versuch mit dem C-terminal getaggten Konstrukt unternommen. Hierfür wurden 1-2  $\mu\text{g}$  pGG2-CMV-mS100A4-V5-C auf HEK-293-Zellen getestet. Vergleichbar mit der Transfektion mit den beiden pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$  Plasmiden war auch hier im Western-Blot ein dosisabhängiges V5-Signal und zugleich keine unspezifischen Interaktionen des V5-Antikörpers zu erkennen (s. Abbildung 25). Daher wurde dieses Konstrukt gemeinsam mit den beiden pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$  für die folgenden Co-Transfektionen ausgewählt.



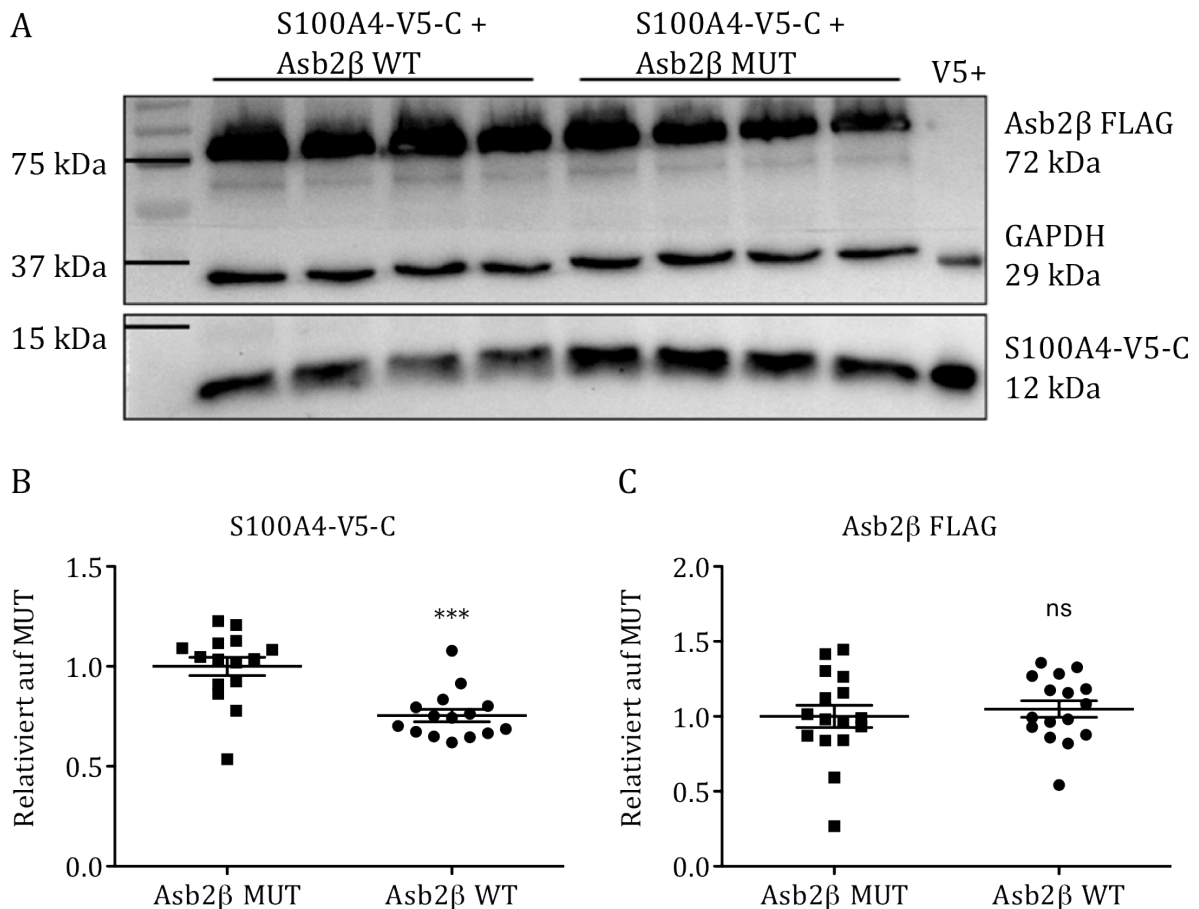
**Abbildung 25: Einzeltransfektion von HEK-293-Zellen pGG2-CMV-mS100A4-V5-C.** Die Abbildung zeigt einen Western Blot mit Nachweis der Transfektionseffizienz von pGG2-CMV-mS100A4-V5-C in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit 1  $\mu\text{g}$  bzw. 2  $\mu\text{g}$  Plasmid nach einer Inkubation von 48 h. Molekulargewicht des Markers durch schwarzen Balken angezeigt.

#### 3.2.9. Co-Transfektion

Nun konnte die Ausgangshypothese untersucht werden: Um den Abbau von S100A4 durch Asb2 $\beta$  zu verifizieren, wurden Cos-7-Zellen mit 0,5  $\mu\text{g}$  pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$ -WT oder MUT und gleichzeitig mit 1  $\mu\text{g}$  pGG2-CMV-mS100A4-V5-C co-transfiziert (s. 2.2.4). Nach 48 h Inkubationszeit konnten die Zellen geerntet werden. Im Western Blot wurde daraufhin die Signalintensität von S100A4 V5C durch den V5-Antikörper untersucht. Außerdem wurde die Membran mit FLAG-Antikörper inkubiert, um die Asb2 $\beta$ -Konstrukte vergleichen zu können. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt und insgesamt 15 co-transfizierte Wells analysiert (s. Abbildung 26). Nach Quantifizierung der Signalintensitäten konnte die Expression von S100A4 in beiden Gruppen verglichen werden. In den mit Asb2 $\beta$  WT co-transfizierten Cos-7-Zellen zeigte



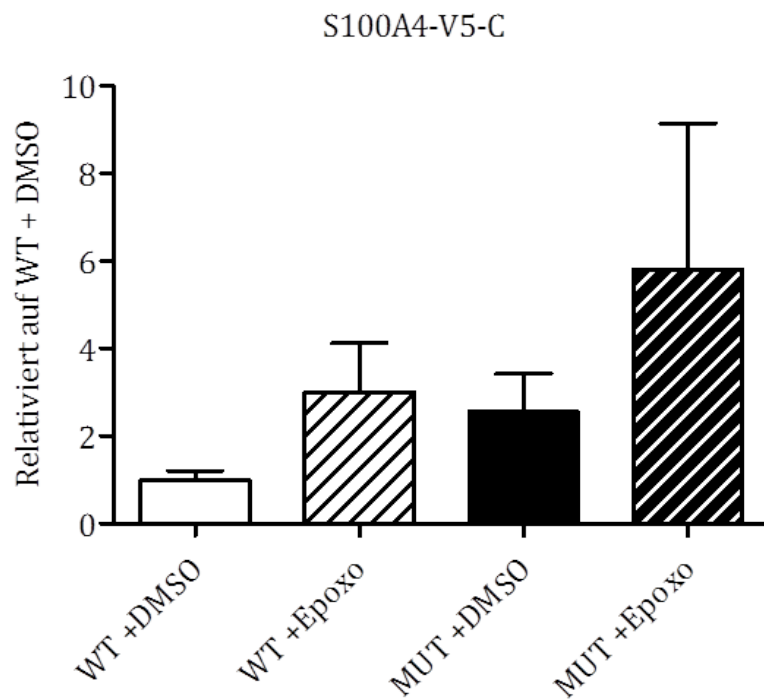
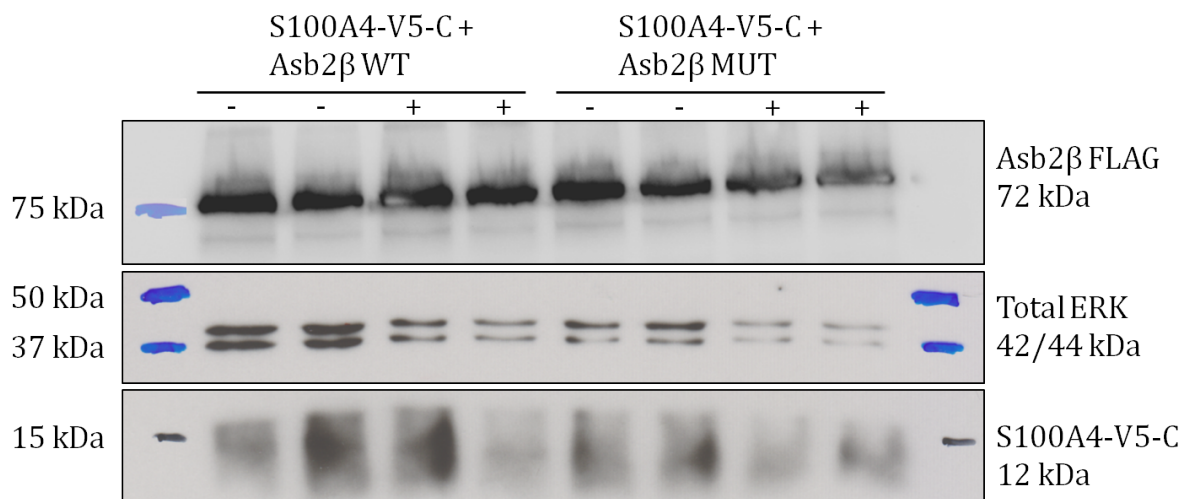
sich ein um 26% geringeres Signal für S100A4 als in den mit Asb2 $\beta$  MUT behandelten Zellen (s. Abbildung 26B). Dieses Ergebnis war in allen drei Co-Transfektionen reproduzierbar und statistisch signifikant ( $p < 0.001$ ). Daraus lässt sich schließen, dass das exogen zugeführte S100A4 in den untersuchten Zellen durch den Asb2 $\beta$  WT abgebaut wird. Gleichzeitig zeigte sich, dass sowohl Asb2 $\beta$  WT als auch Asb2 $\beta$  MUT gleich stark exprimiert wurden (s. Abbildung 26C).



**Abbildung 26: Co-Transfektion von Cos-7-Zellen mit pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$ -WT bzw. MUT und pGG2-CMV-mS100A4-V5-C und Quantifizierung von S100A4-V5-C und Asb2 $\beta$  FLAG.** Gezeigt wird ein Western Blot von Cos-7-Zellen nach gleichzeitiger Transfektion mit 0,5  $\mu$ g pGG2-CMV-FLAG-Asb2 $\beta$ -WT oder MUT und mit 1  $\mu$ g pGG2-CMV-mS100A4V5-C nach einer Inkubationszeit von 48h. Ladekontrolle: GAPDH, Molekulargewicht des Markers durch schwarzen Balken angezeigt (A). Bei der Quantifizierung des S100A4-V5-C-Signals fiel eine erniedrigte Konzentration von S100A4 in mit Asb2 $\beta$  WT behandelten Zellen auf (B). Die Expression der beiden Asb2 $\beta$ -Konstrukte MUT und WT unterschied sich nicht (C). Die Daten sind angegeben als *dot plot* mit Mittelwert  $\pm$ SEM \*\*\* $p < 0,001$  vs. Asb2 $\beta$  WT, Student-t-test für ungepaarte Stichproben,  $n = 15$  pro Gruppe.

Um sicherzustellen, dass die verringerte Konzentration von S100A4 in den mit Asb2 $\beta$ -WT behandelten Zellen auf einen proteasomalen Abbau zurückzuführen war,

erfolgte die Zugabe von Epoxomicin, einem irreversiblen Inhibitor der  $\beta$ -Untereinheit des 20S-Proteasoms. Es zeigte sich, dass in Epoxomicin behandelten Cos-7-Zellen eine Stabilisierung von S100A4 gelang. Epoxomicin führte in mit Asb2 $\beta$  WT behandelten Cos-7-Zellen zu einem 3-fachen Anstieg der S100A4-Konzentration im Vergleich zur mit DMSO (Vehikel) behandelten Kontrollgruppe. Ohne Epoxomicin-Behandlung lag die *steady-state*-Konzentration von S100A4 in den mit Asb2 $\beta$  MUT behandelten Cos-7-Zellen 2,5-fach höher als in der Asb2 $\beta$  WT Gruppe (s. Abbildung 27). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Asb2 $\beta$ -mediierten proteasomalen Degradation von S100A4. Nebenbefundlich fiel auf, dass die Behandlung mit Epoxomicin auch *innerhalb* beider Asb2 $\beta$  MUT-Gruppen zu einer nennenswert unterschiedlichen S100A4-Konzentration, mit einem deutlichen Anstieg in der behandelten Gruppe führte.



**Abbildung 27: Co-Transfektion von Cos-7-Zellen mit pGG2-CMV-FLAG-Asb2β-WT bzw. MUT und pGG2-CMV-mS100A4-V5-C und Quantifizierung des S100A4V5C-Signals nach Behandlung mit dem UPS-Inhibitor Epoxomicin bzw. DMSO.** Die Abbildung zeigt einen Western Blot von Cos-7-Zellen 72h nach gleichzeitiger Transfektion mit 0,5 µg pGG2-CMV-FLAG-Asb2β-WT oder MUT und 1 µg pGG2-CMV-mS100A4V5-C. Alle Zellen wurden für 24 h entweder mit 500 nM Epoxomicin (+) oder DMSO-Kontrolle (-) behandelt. Ladekontrolle: Total ERK, Molekulargewicht des Markers durch schwarzen Balken angezeigt. Darunter abgebildet die Quantifizierung des S100A4-V5-C-Signals. Die Daten sind angegeben als Mittelwert +SEM relativiert auf Asb2β WT + DMSO, Student-t-test für ungepaarte Stichproben, n=3 pro Gruppe.

### 3.3. Effekte von S100A4 auf die EHT-Kontraktilität

In Modellen der dilatativen Kardiomyopathie sowie der pathologischen Hypertrophie zeigten sich erhöhte mRNA-Konzentrationen von *S100A4*. Es konnte gezeigt werden, dass *S100A4* ein Substrat von Asb2 $\beta$  ist oder zumindest die *S100A4*-Expression von Asb2 $\beta$  beeinflusst wird. Abschließend galt es nun, die Effekte von *S100A4* auf Proteinebene zu verstehen. Setzt man voraus, dass *S100A4* durch Asb2 $\beta$  direkt oder indirekt dem proteasomalen Abbau zugeführt wird und dieser Mechanismus im *Mybpc3*-KI Mausmodell, das sowohl eine systolische wie auch diastolische Dysfunktion zeigt, gestört ist, stellte sich die Frage, ob ein verminderter *S100A4* Abbau zur Kontraktilitätsstörung beitragen könnte.

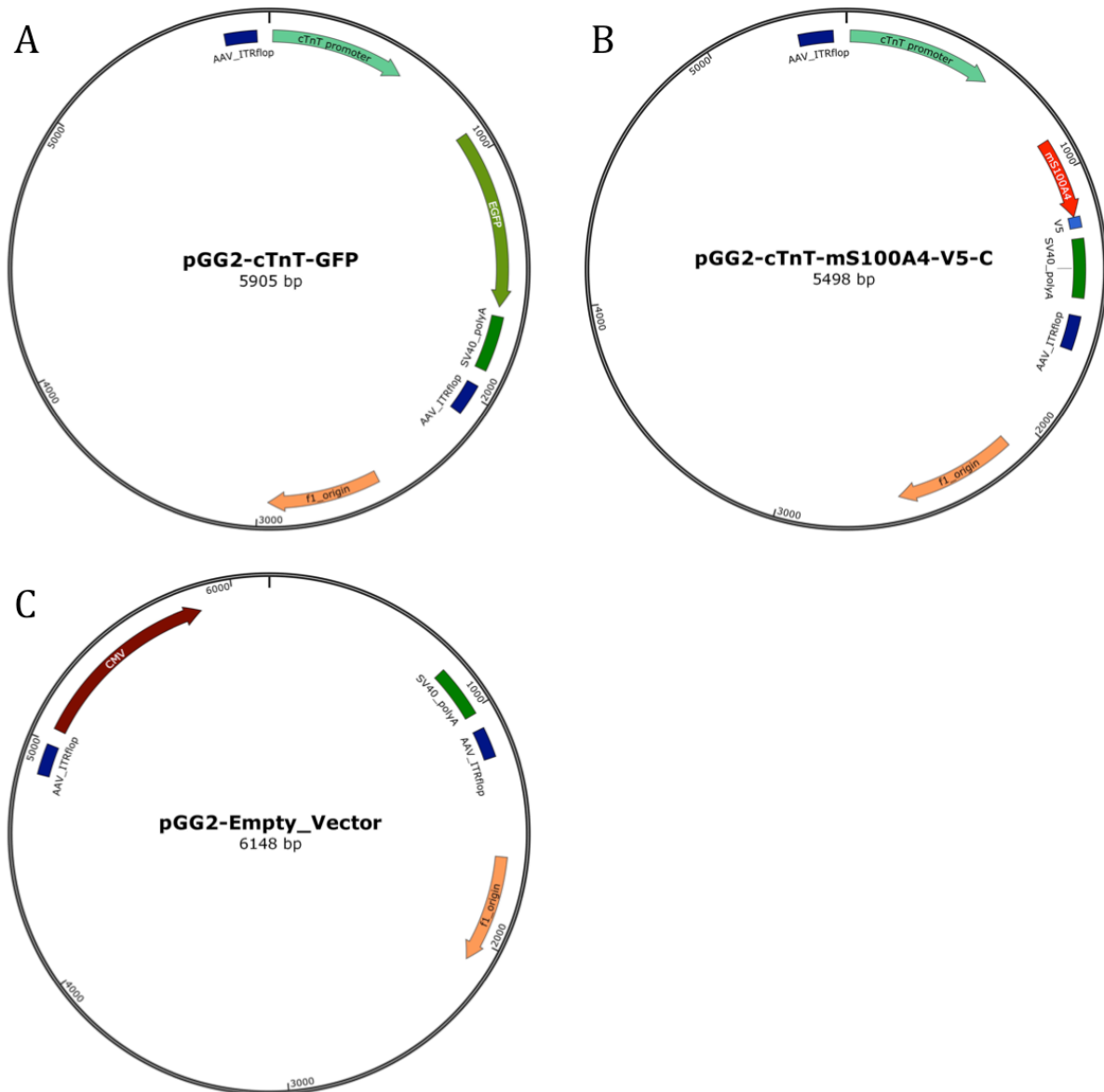
Da funktionelle Parameter in der Kardiologie von größtem Interesse sind, wurde für diese Fragestellung das am Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie entwickelte, dreidimensionale *in vivo* Modell des künstlichen Herzgewebes (Hansen et al. 2010) verwendet. Die EHTs wurden mit einem AAV6 transduziert, der eine V5-getaggte *S100A4* cDNA enthielt, um eine transiente *S100A4* Überexpression zu erreichen. Anschließend erfolgte die funktionelle Kontraktilitäts-Analyse mittels videooptischer Analyse (s. 2.4.5).

#### 3.3.1. Transduktion

Die Transduktion der EHTs erfolgte in vier Gruppen: Zur Analyse der Transduktionseffizienz *in vivo* wurde eine Gruppe EHTs mit einem GFP-gekoppelten AAV6 behandelt. Dessen Expression konnten fluoreszenzmikroskopisch bei 475 nm überprüft werden (s. Abbildung 28A). Diese Gruppe sollte zunächst auch als Kontrollgruppe der funktionellen Analyse dienen. Dies wurde jedoch wegen des negativen Effektes der GFP-Expression auf die EHT-Kontraktilität verworfen (s. Abbildung 33).

Als Kontrollgruppe der funktionellen Analyse wurden EHTs mit einem Kontrollvirus Empty Vector (EV) behandelt. Dieser wurde aus dem gleichen *Backbone* wie der *S100A4*-Virus kloniert, enthielt hinter seinem Promotor jedoch keine Nukleotidsequenz (s. Abbildung 28C). So konnte ausgeschlossen werden, dass die Zugabe des AAV6 während der Herstellung der EHTs einen negativen Effekt auf ihre Kontraktilität hatte.

Eine dritte „echte“ Kontrollgruppe wurde nicht transduziert (NT) und bot so eine Vergleichsmöglichkeit mit der EV-Gruppe. Außerdem wurde die vierte und entscheidende Gruppe mit dem AAV6 behandelt, der zu einer Überexpression von V5-getagtem S100A4 führen sollte (s. Abbildung 28B).

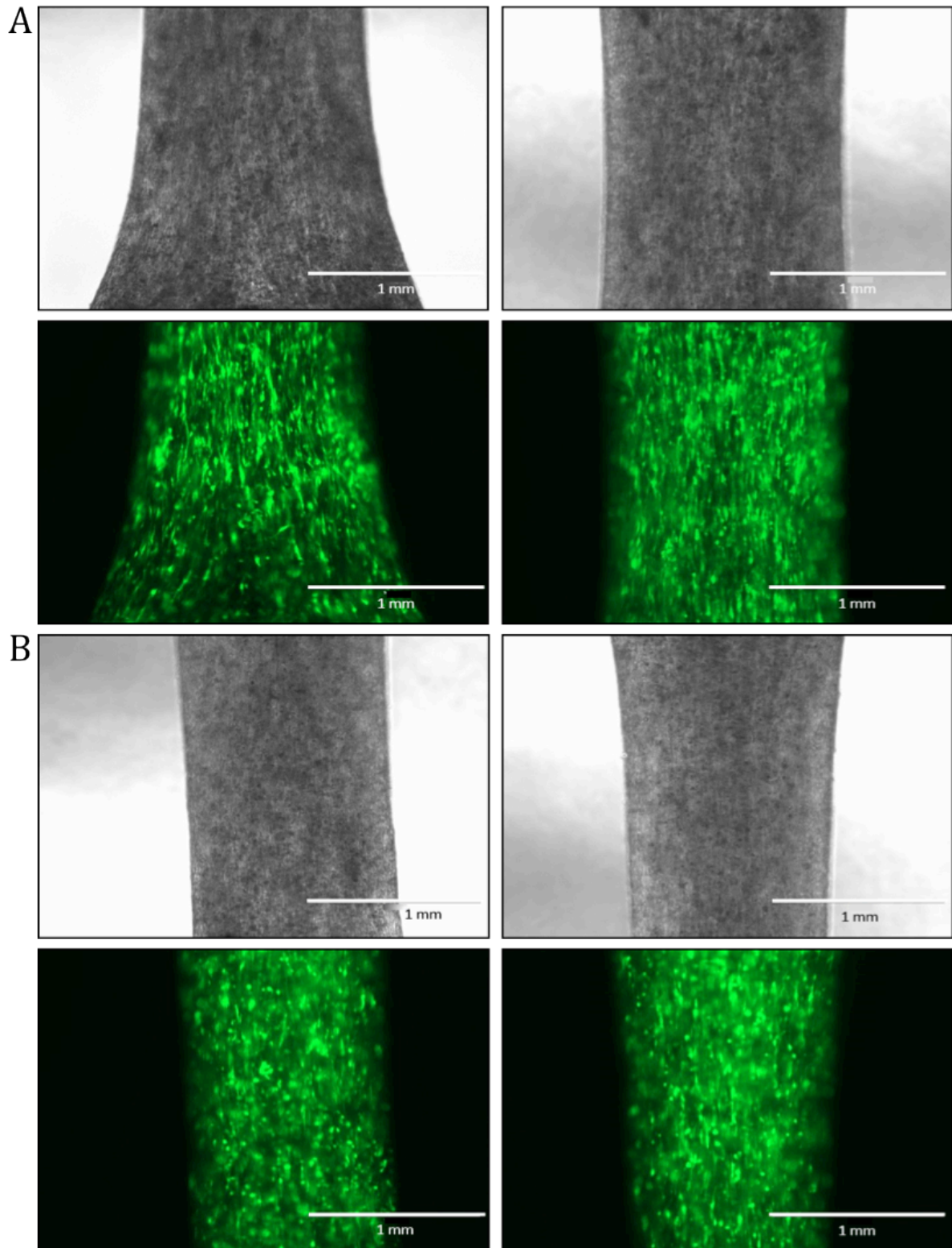


**Abbildung 28: Schematische Karte der für die Transduktion von EHTs verwendete Vektoren pGG2-cTnT-GFP (A), pGG2-cTnT-mS100A4-V5-C (B) und pGG2-Empty Vector (C).** Diese Vektoren wurden für die Herstellung der entsprechenden AAV6 verwendet. Der kardiale Troponin-T-Promoter (cTnT) unterstützt die Translation des jeweiligen *inserts* spezifisch in Kardiomyozyten. Die restlichen Sequenzen entsprechen Abbildung 19.

### 3.3.2. Analyse der Transduktionseffizienz *in vivo*

Ziel der ersten Transduktionsexperimente war es, die optimale Virusmenge pro EHT zu ermitteln. Die hierfür benutzte Einheit MOI (*multiplicity of infection*) beschreibt die Anzahl an Virionen pro Zielzelle. Die verwendete MOI sollte groß genug sein, um eine ausreichende Expression des Zielproteins zu gewährleisten, gleichzeitig aber möglichst klein, um nicht toxisch zu sein. Als Orientierung diente die Masterarbeit von Julia

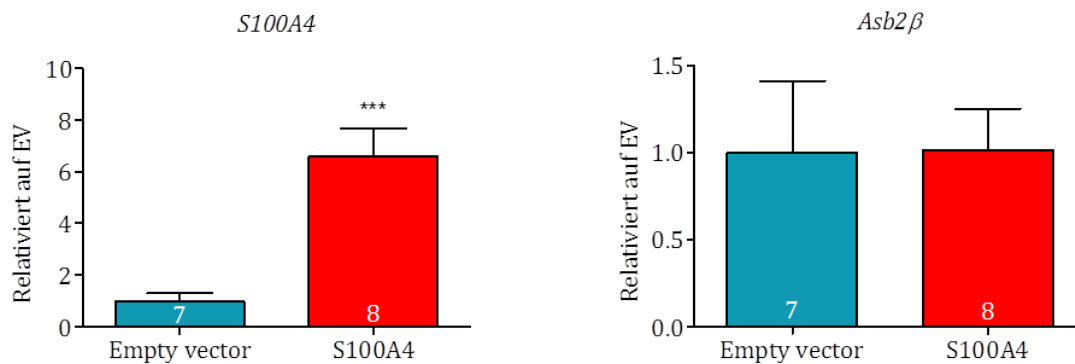
Mourot Filiatre (2012). Für die ersten Versuche wurden MOIs von 1000 und 3000 gewählt. Als Virus diente der bereits beschriebene AAV6-GFP. Weder im GFP-Signal noch im Überleben der EHTs zeigten sich zwischen MOI von 1000 und 3000 Unterschiede (s. Abbildung 29).



**Abbildung 29: Kontrolle der Transduktionseffizienz in vivo.** Die Abbildungen zeigen in den unteren Reihen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von je zwei exemplarischen EHTs zur Kontrolle der Transduktionseffizienz von AAV6-GFP mit einer MOI von 1 000 (A) bzw. 3000 (B) nach einer Inkubation von 10 Tagen (40-fache Vergrößerung). Das GFP ist gleichmäßig exprimiert und etwas stärker bei einer MOI von 3 000. Die obere Reihe zeigt jeweils die dazugehörige Durchlichtaufnahme. Maßstabsbalken 1 mm.



Die quantitative Analyse der *S100A4*-mRNA diente allgemein als Maß für den Erfolg der Transduktion und die Transkription der cDNA. Durch den herzspezifischen Troponin T-Promoter wurde sichergestellt, dass das Konstrukt nur in den Kardiomyozyten der EHTs exprimiert wurde. Nach Ernten und RNA-Isolation (s. 2.4.6) wurde die cDNA der EHTs synthetisiert (s. 2.1.15) und mittels qPCR analysiert (2.1.16). Die verwendeten Primer detektierten sowohl die endogene als auch die exogene *S100A4*-mRNA-Konzentration und ermöglichten so eine klare Abgrenzung des Effektes der Transduktion. Die mit *S100A4* behandelten EHTs enthielten ca. 6,6-fach mehr *S100A4*-mRNA-Konzentrationen als die mit EV-Virus behandelte Gruppe (s. Abbildung 30). Dies beweist eine erfolgreiche Transkription des Konstruktes. Die mRNA-Konzentration von *Asb2β* blieb hiervon unbeeinflusst.

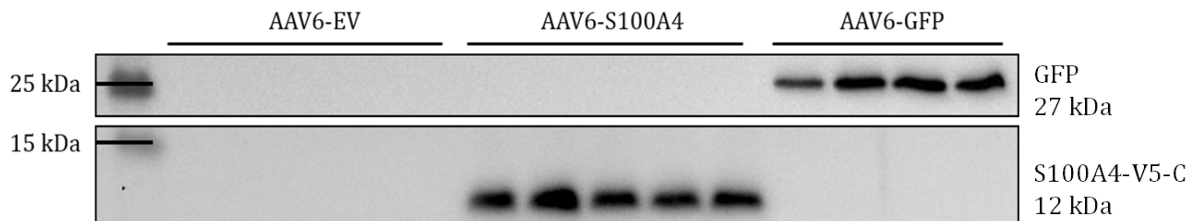


**Abbildung 30:** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *Asb2β* und *S100A4* in mit AAV6-S100A4-V5-C- und Empty Vector-behandelten EHTs (MOI 1 000). Relativ zur EV-Gruppe zeigte sich eine 6,6-fache höhere *S100A4*-mRNA-Konzentration in den mit AAV6-S100A4-V5-C behandelten EHTs, während sich kein Unterschied in der *Asb2β* mRNA-Konzentration ergab. Die Daten sind angegeben als Mittelwert +SEM \*\*\*p<0,001 vs. EV, Student-t-test für ungepaarte Stichproben, n=7 (EV), n=8 (S100A4).

### 3.3.3. S100A4-Proteinkonzentration in EHTs

Der Nachweis von *S100A4* in Proteinextrakten der EHTs diente ebenfalls als Maß für den Erfolg der Transduktion und konkret für die erfolgte Translation zu einem fertigen Protein. Da der AAV6-S100A4-V5-C hinter der cDNA für *S100A4* die Sequenz für ein V5-Tag enthielt, konnte mittels Antikörpern gegen dieses Tag das durch Virusbehandlung überexprimierte *S100A4* nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle der Western Blot-Bedingungen dienten Proben der GFP-Gruppe, deren erfolgreiche Transduktion ja bereits fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Als Negativkontrolle dienten Proben der EV-Gruppe.

Im Western Blot war eine Bande bei der zu erwartenden Höhe (12 kDa) nur in den mit S100A4 behandelten EHTs zu erkennen. Dies zeigt eine erfolgreiche Translation des Konstruktes. Der Nachweis von GFP (26,9 kDa) als Positivkontrolle gab den Hinweis auf eine erfolgreiche Transduktion der EHTs (s. Abbildung 31).

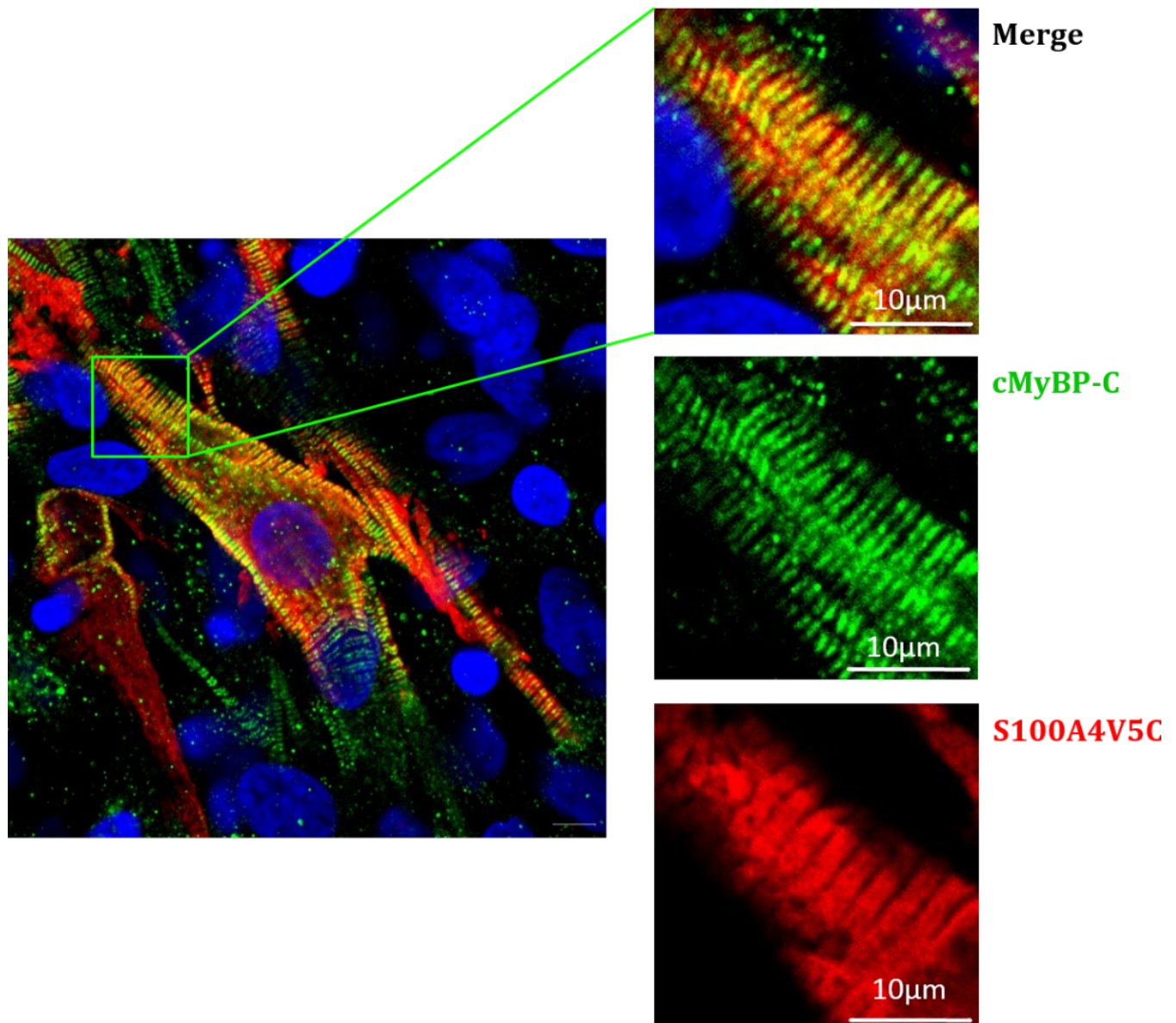


**Abbildung 31: Nachweis der Transduktion im Western Blot.** Die Abbildung zeigt einen Western Blot mit Nachweis der Transduktion (MOI 1000) von AAV6-S100A4-V5-C und AAV6-GFP in EHTs. Molekulargewicht des Markers durch schwarzen Balken angezeigt.

### 3.3.4. Lokalisation des überexprimierten S100A4 in EHTs

Um funktionelle Effekte erklären und eine Interaktion mit Asb2 $\beta$  nachvollziehen zu können, wurde die Lokalisation des überexprimierten S100A4 im Sarkomer mittels Immunfluoreszenz (s. 2.2.7) untersucht. Als Orientierungshilfe dienten hierbei Antikörper gegen das cMyBP-C, das in der A-Bande des Sarkomers zu finden ist (Carrier et al. 2015), sowie DRAQ5, ein DNA-Farbstoff, mit dem sich Kernregion vom Cytoplasma einer Zelle abgrenzen lassen.

Die Querstreifung des V5-Signals deutete eine spezifische Lokalisation im Sarkomer an. Im übereinander gelegten *Merge*-Bild erkennt man, dass S100A4 mit cMyBP-C colokalisiert, was ebenfalls auf eine Lokalisation in der A-Bande des Sarkomers hindeutet (s. Abbildung 32).

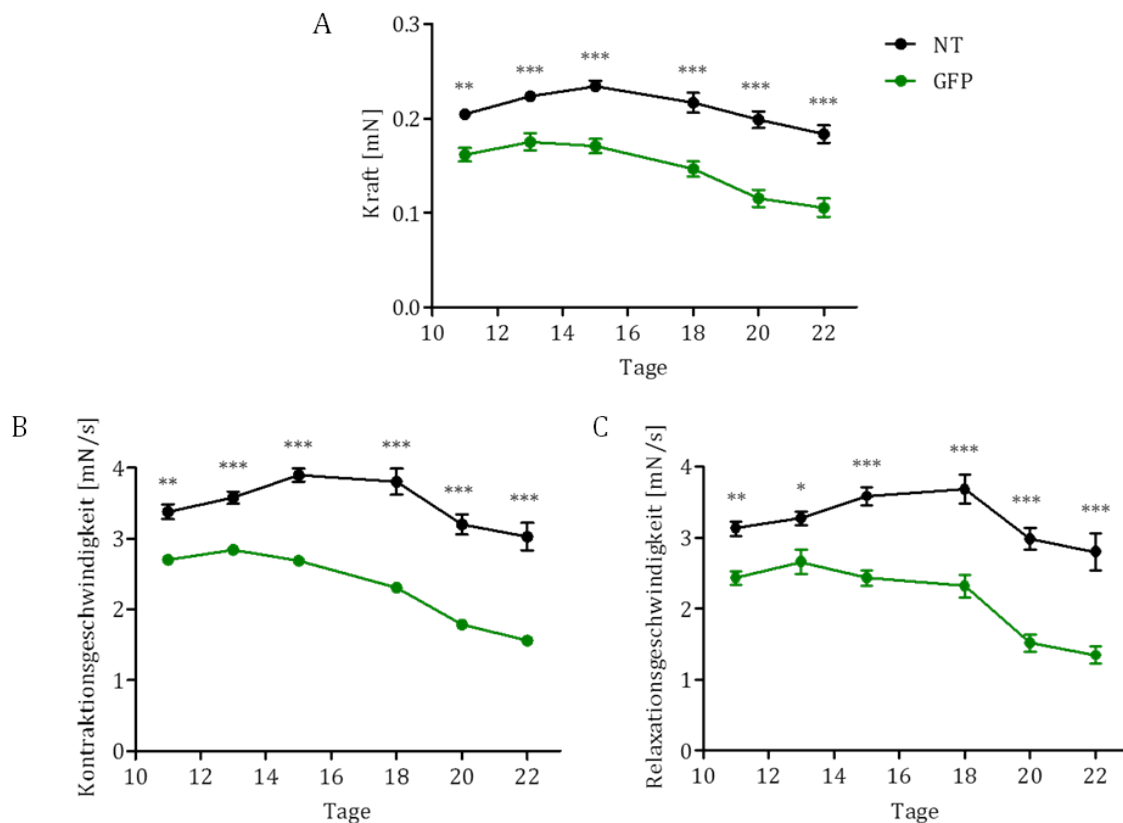


**Abbildung 32: Immunfluoreszenz in EHTs.** Die Abbildung zeigt den Bildausschnitt einer Immunfluoreszenzaufnahme eines EHTs nach Transduktion mit AAV6-S100A4-V5-C und Primär-Antikörpern gegen das V5-Tag (rot) bzw. cMyBP-C (grün) und einer Kernfärbung für DRAQ5 (blau). Oben rechts abgebildet ist ein *Merge*-Bild, in welchem die verschiedenen Signale übereinander gelegt wurden. S100A4 zeigt eine spezifische Expression in der A-Bande des Sarkomers. Maßstabsbalken 10 µm.

### 3.3.5. Einfluss der S100A4-Überexpression auf Funktion der EHTs

Nachdem sowohl die Transkription als auch die Translation des Konstruktes gesichert worden waren, konnten nun die Effekte der Überexpression von S100A4 in künstlichem Herzgewebe mit einer automatischen videooptischen Messeinheit untersucht werden. Als Parameter wurden Kraft, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, sowie Kontraktions- (T1) und Relaxationsdauer (T2) gewählt.

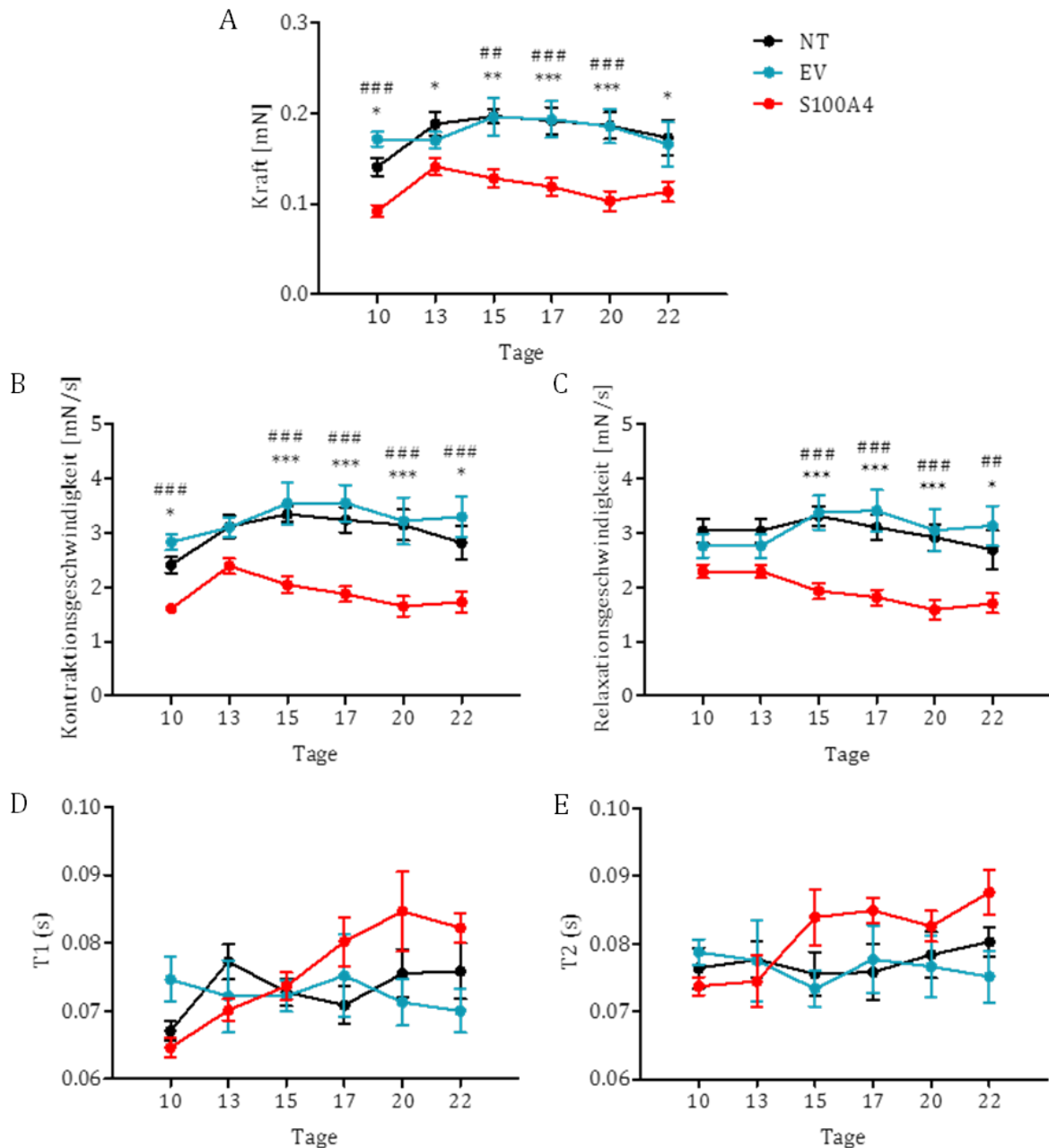
Zuerst sollten GFP-behandelte EHTs, mit denen bereits die *in vivo* Transduktionseffizienz ermittelt worden war, die Kontrollgruppe der funktionellen Analyse bilden. Jedoch wiesen diese von Beginn an eine deutlich schlechtere Kraftentwicklung, sowie verringerte Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit als die NT-Gruppe auf, was möglicherweise auf eine GFP-vermittelte Störung des Querbrückenzyklus zurückzuführen ist (Xie et al. 2009). Daher kam die AAV6-vermittelte Überexpression von GFP als Kontrolle nicht in Frage (s. Abbildung 33).



**Abbildung 33: Einfluss von GFP auf die Funktion der EHTs.** Die Abbildung zeigt die funktionelle Analyse von EHTs nach Transduktion mit AAV6-GFP (MOI 1000) im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen (NT). Die Expression von GFP in EHTs führte zu einer deutlichen Verschlechterung der Kraft (A), Kontraktions- (B) und Relaxationsgeschwindigkeit (C). GFP-behandelte EHTs eigneten sich daher nicht als Kontrollgruppe. Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$ SEM \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. NT, *One-way-ANOVA* mit anschließendem *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*,  $n = 12$  pro Gruppe.

Um einen Einfluss der AAV6-Behandlung auf die funktionelle Entwicklung der EHTs auszuschließen, erfolgte die Analyse einer parallelen Transduktion der EHTs mit AAV6-S100A4-V5-C und dem AAV6-Empty Vector (EV), der zwar aus dem gleichen *Backbone* wie der S100A4-Virus kloniert worden war, jedoch hinter seinem Promotor keine Nukleotidsequenz enthielt. Hierbei zeigte sich schon früh (Tag 10 der Kultur) ein signifikanter Abfall der S100A4-Gruppe in den Parametern Kraft, sowie Kontraktions-

und Relaxationsgeschwindigkeit. Die Analyse der Dauer bis zur 80%igen Kontraktion bzw. Relaxation zeigte eine ähnliche Tendenz, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Außerdem zeigte sich kein Unterschied zwischen der NT- und der EC-Gruppe, so dass ein toxischer Effekt des Empty-Vector AAV6 unwahrscheinlich war (s. Abbildung 34).



**Abbildung 34: Einfluss von S100A4 auf die Funktion der EHTs.** Die Abbildung zeigt die funktionelle Analyse von EHTs nach Transduktion (MOI 1000) mit AAV6-S100A4-V5-C (rot) und dem Empty Vector (EV, blau) im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen (NT, schwarz). Die EHTs, die mit S100A4 transduziert worden waren, zeigten eine deutliche Verschlechterung der Kraft (A), Kontraktions- (B) und Relaxationsgeschwindigkeit (C). Eine ähnliche Tendenz zeigte sich auch für die Dauer bis zur 80%igen Kontraktion (T1, D) bzw. Relaxation (T2, D). Es bestand kein Unterschied der Funktion zwischen EV und NT. Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$ SEM \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001 (bzw. #) vs. NT, *One-way-ANOVA* mit anschließendem *Dunnnett's-Multiple-Comparison-Test*,  $n=16$  pro Gruppe.

### 3.3.6. Einfluss der S100A4-Überexpression auf die Genexpression der EHTs

Wie sich in der ersten Runde der Transfektionsexperimente gezeigt hatte, schien sich die Überexpression von S100A4 in EHTs negativ auf ihre Funktion auszuwirken. Tamaki

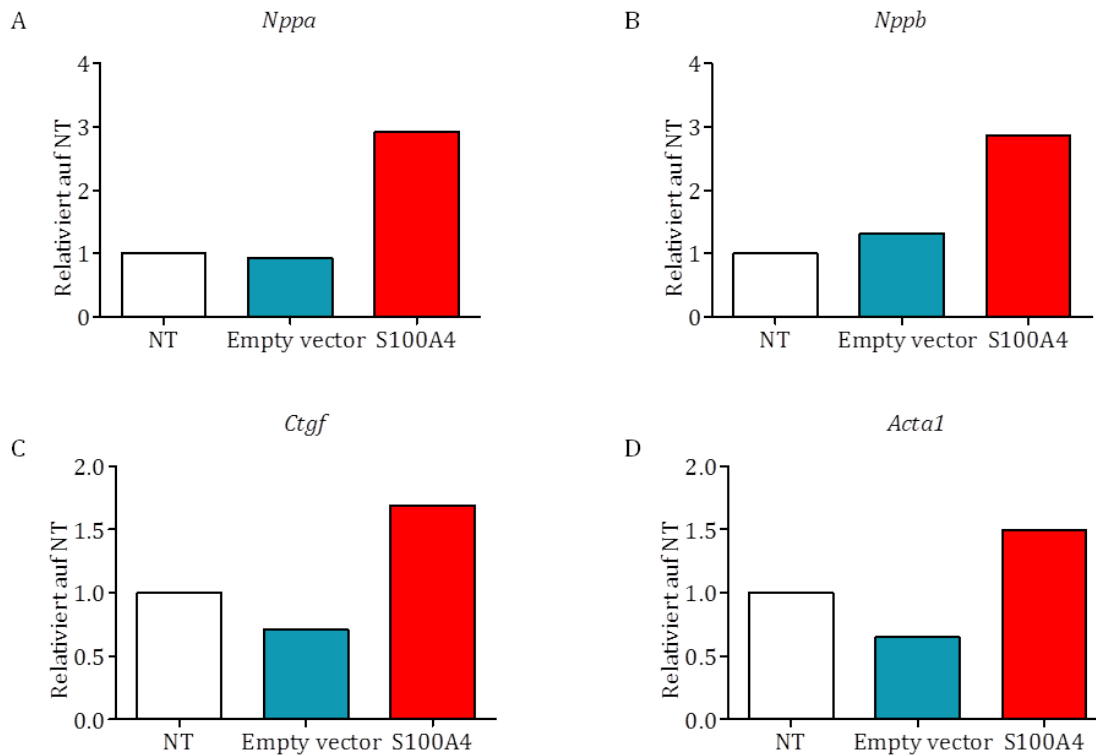
et al. konnten zeigen, dass ein si-RNA vermittelter 70%iger *Knockdown* von S100A4 zu einer verringerten mRNA-Konzentration verschiedener profibrotischer und hypertropher Gene führte (Tamaki et al. 2013). Um ein besseres Verständnis der möglichen Mechanismen dieser Funktionsstörung zu bekommen, wurden angelehnt an Tamaki et al. in allen drei EHT-Gruppen die mRNA-Konzentrationen folgender Gene analysiert:

<b>Gencode</b>	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>
<i>COL1A1</i>	Kollagen Typ I	Hauptbestandteil von Kollagenfasern in Bindegewebe
<i>COL3A1</i>	Kollagen Typ III	Bestandteil von Kollagenfasern in Bindegewebe, assoziiert mit Kollagen Typ I
<i>FN</i>	Fibronektin	Glykoprotein der Extrazellulärmatrix
<i>CTGF</i>	Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	Mediator der Synthese von Extrazellulärmatrix
<i>ACTA1</i>	$\alpha$ -skeletales Aktin	Muskelspezifisches Aktin, zentraler Bestandteil des kontraktilen Apparates
<i>NPPA</i>	Atriales Natriuretisches Peptid (ANP)	Vasodilatativer Botenstoff, fördert renale Diurese
<i>NPPB</i>	Brain Natriuretisches Peptid (BNP)	Vasodilatativer Botenstoff, fördert renale Diurese, diagnostischer Marker der Herzinsuffizienz

**Tabelle 18:** Liste der untersuchten Gene nach Transduktion der EHTs.

Um Material zu sparen wurden die RNA-Proben der einzelnen EHTs der Gruppe zunächst kombiniert und zu einer einzigen cDNA-Probe umgeschrieben. So ließ sich bereits eine Tendenz der potenziell co-regulierten Gene feststellen.

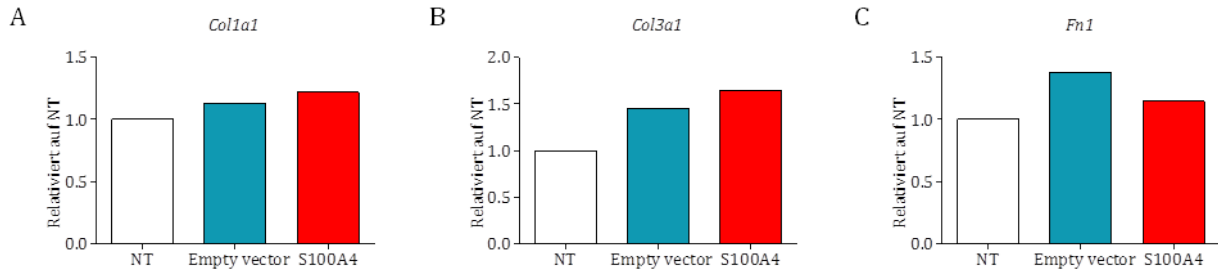
In den kombinierten cDNA-Proben der S100A4 überexprimierenden EHTs zeigte sich eine deutlich höhere mRNA-Konzentration von *Acta1*, *Nppa*, *Nppb* und *Ctgf* verglichen mit der EV-Kontrollgruppe und unbehandelten EHTs (s. Abbildung 35).



**Abbildung 35: Analyse der mRNA-Konzentration in kombinierten cDNA-Proben der EHTs.** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *Nppa* (A), *Nppb* (B), *Ctgf* (C) und *Acta1* (D) in EHTs nach Transduktion (MOI 1 000) mit AAV6-S100A4-V5-C (rot) und dem Empty Vector (EV, blau) im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen (NT, weiß). Die mRNA-Konzentrationen dieser vier Gene wurden in Einzel-cDNA-Proben erneut untersucht.

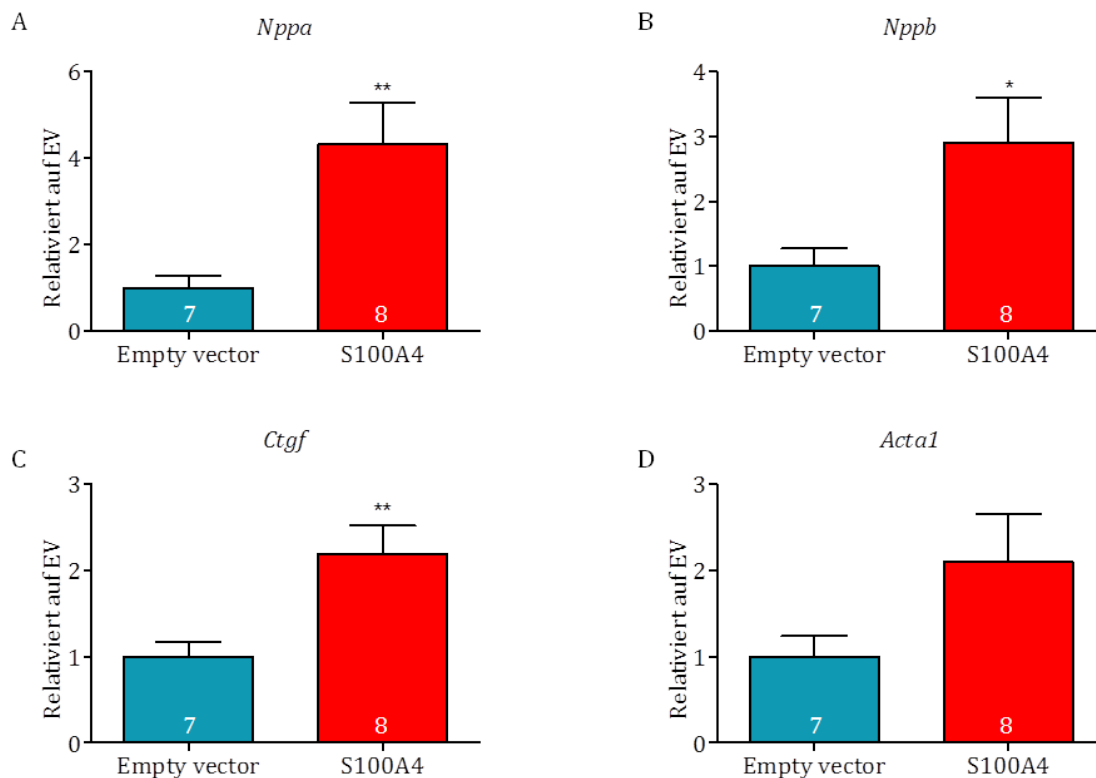
*Col1a1*, *Col3a1* und *Fn1* wurden dagegen nicht für eine erneute Analyse der Einzel-cDNA-Proben ausgewählt. Zwar schienen die mit AAV6-S100A4 behandelten EHTs relativ zu unbehandelten EHTs mehr *Col3a1*-mRNA zu enthalten, jedoch war der Unterschied zur EV-Gruppe sehr gering (EV 1,5-fach, S100A4 1,6-fach, relativ zu nicht transduzierten EHTs). Die großen Unterschiede der funktionellen Analyse waren somit vermutlich nicht auf Unterschiede in den mRNA-Konzentrationen von *Col1a1*, *Col3a1* und *Fn1* zurückzuführen (s. Abbildung 36).





**Abbildung 36: Analyse der mRNA-Konzentration in kombinierten cDNA-Proben der EHTs.** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *Col1a1* (A), *Col3a1* (B), *Fn 1* (C) in EHTs nach Transduktion (MOI 1 000) mit AAV6-S100A4-V5-C (rot) und dem Empty Vector (EV, blau) im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen (NT, weiß). Diese Gene wurden nicht erneut in Einzel-cDNA-Proben untersucht.

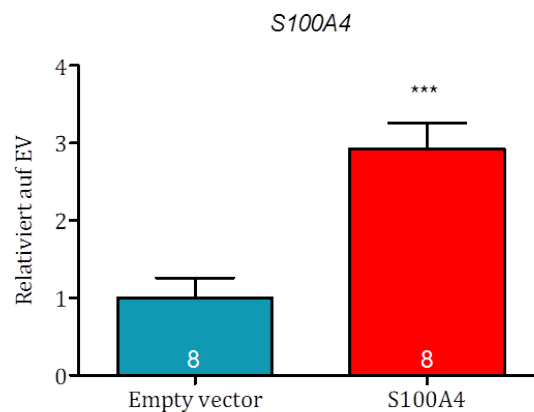
Die durch die Analyse der kombinierten cDNA-Proben identifizierten Kandidaten-Gene wurden im Anschluss einer erneuten quantitativen PCR unterzogen, dieses Mal erfolgte zuvor die reverse Transkription der RNA für jedes EHTs einzeln und die *steady-state-level* wurden nur zwischen der EV- und S100A4-Gruppe verglichen. Wie sich schon in der Analyse der gepoolten Proben angedeutet hatte, zeigten sich in den S100A4-EHTs deutlich höhere mRNA-Konzentrationen von *Acta1*, *Nppa*, *Nppb* und *Ctgf* (s. Abbildung 37). Dieses Ergebnis könnte eine mögliche Erklärung der kontraktile Dysfunktion sein, andererseits einen Kompensationsmechanismus der S100A4-transduzierten EHTs darstellen.



**Abbildung 37: Analyse der mRNA-Konzentrationen in Einzel-cDNA-Proben der EHTs.** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen von *Nppa* (A), *Nppb* (B), *Ctgf* (C) und *Acta1* (D) in EHTs nach Transduktion (MOI 1000) mit AAV6-S100A4-V5-C (rot) und dem Empty Vector (EV, blau) im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen (NT, weiß). Die Daten sind angegeben als Mittelwert +SEM \*p<0,05, \*\*p<0,01, vs. EV, Student-t-test für ungepaarte Stichproben, n=7 (EV), n=8 (S100A4).

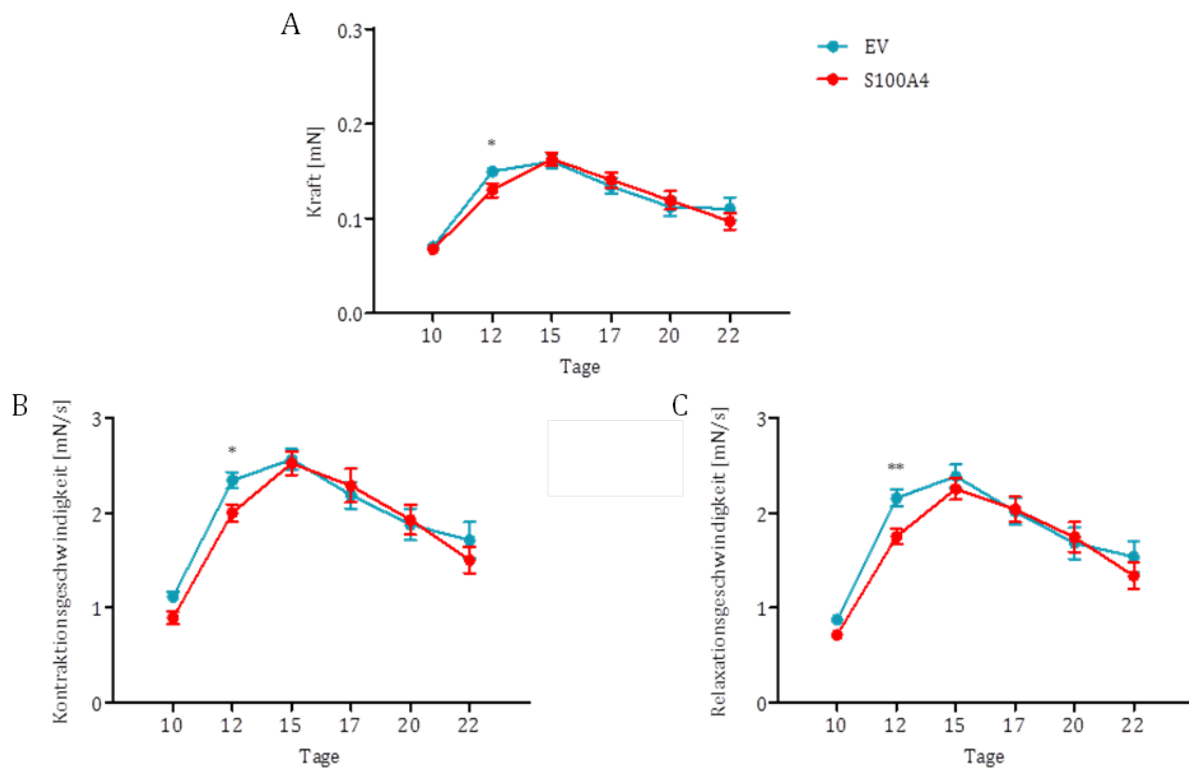
### 3.3.7. Ergebnisse des Wiederholungsversuchs

Zur Bestätigung der Ergebnisse erfolgte eine erneute Transduktion von EHTs mit AAV6-S100A4-V5-C bzw. Empty Vector. Hierbei fiel auf, dass die Transduktionseffizienz des AAV6-S100A4-V5-C im Vergleich zum ersten Versuch abgeschwächt war. So konnte lediglich eine 3-fach erhöhte mRNA-Konzentration von S100A4 verglichen mit der Empty Vector-Gruppe gemessen werden (im Vorversuch 6,6-fach, s. Abbildung 30 und Abbildung 38). Auf eine erneute Messung der *Asb2β*-mRNA-Konzentration wurde verzichtet.



**Abbildung 38:** Die Abbildung zeigt die mRNA-Konzentrationen *S100A4* in mit AAV6-S100A4-V5-C- und Empty Vector-behandelten EHTs (MOI 1 000) eines zweiten Versuchs mit denselben Versuchsbedingungen. Es zeigte sich eine 3-fach höhere *S100A4*-mRNA-Konzentration in den mit AAV6-S100A4-V5-C behandelten EHTs, relativ zur EV-Gruppe. Die Daten sind angegeben als Mittelwert +SEM \*\*\*p<0,001 vs. EV, Student-t-test für ungepaarte Stichproben, n=7 (EV), n=8 (S100A4).

Auch diese EHTs wurden einer funktionellen Analyse unterzogen. Es zeigte sich kein vergleichbar starker Abfall der funktionellen Parameter. In der frühen Entwicklung (an Tag 12) zeigte sich die Empty Vector-Gruppe sogar eine erhöhte Kraft, sowie verbesserte Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (s. Abbildung 39).



**Abbildung 39: Einfluss von S100A4 auf die Funktion der EHTs im Wiederholungsversuch.** Die Abbildung zeigt die funktionelle Analyse von EHTs nach Transduktion (MOI 1000) mit AAV6-S100A4-V5-C (rot) und dem Empty Vector (EV, blau). Die Überexpression von S100A4 führte zu keiner Verminderung der Kraft (A), Kontraktions- (B) und Relaxationsgeschwindigkeit (C). Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$ SEM \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. NT, *One-way-ANOVA* mit anschließendem *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*,  $n=16$  (S100A4)  $n=14$  (EV).

## 4. Diskussion

Die hypertrophe Kardiomyopathie ist eine angeborene Herzerkrankung, die besonders bei jungen Menschen schwerwiegende Verläufe annehmen kann und insgesamt als unterdiagnostiziert zu bezeichnen ist. Die Diagnostik wird zu einem großen Teil durch die komplexen Zusammenhänge von Genotyp und Phänotyp erschwert. Von einer Beteiligung des UPS, einem hochkonservierten System zur Regulation des Proteoms aller eukaryotischen Zellen an der Pathophysiologie der Erkrankung ist auszugehen (Schlossarek und Carrier 2011). Das von Prof. Lucie Carrier entwickelte HCM-Mausmodell mit einer *Mybpc3*-Punktmutation (KI-Maus) besitzt klassische Merkmale der HCM, wie linksventrikuläre Hypertrophie, interstitielle Fibrose und diastolische Dysfunktion (Vignier et al. 2009, Fraysse et al. 2012) und weist ein gestörtes UPS auf (Carrier et al. 2010, Schlossarek et al. 2012b). Im UPS nehmen E3-Ligasen eine zentrale Rolle ein, da sie im letzten Reaktionsschritt das Substrat mit einem Ubiquitin-Molekül verbinden, es so für den Abbau im 26S-Proteasom markieren und somit für die Reaktionsspezifität verantwortlich sind. Die Analyse der mRNA-Konzentrationen verschiedener muskelspezifischer E3-Ligasen ergab in KI-Mäusen eine signifikant erniedrigte *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentration. Um Zielproteine von *Asb2 $\beta$*  zu identifizieren wurden in Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit zwei Adenoviren produziert, die entweder eine WT- oder eine dysfunktionale *Asb2 $\beta$* -MUT-Variante exprimieren. Durch Transduktion neonataler Mauskardiomyozyten und anschließender massenspektrometrischer Analyse ihres Proteoms konnten Filamin B und Desmin als Zielproteine von *Asb2 $\beta$*  identifiziert werden (Bello et al. 2009, Thottakara et al. 2015). Diese massenspektrometrische Analyse ergab jedoch noch weitere mögliche Substrate von *Asb2 $\beta$* , eines davon war das Protein S100A4 (Daten unveröffentlicht).

Zentrale Fragestellung dieser Arbeit war die Validierung von S100A4 als Substrat der E3-Ubiquitin-Ligase *Asb2 $\beta$* . Neben der Hauptfragestellung sollte in dieser Arbeit außerdem die Genexpression von *Asb2 $\beta$*  und S100A4 nicht nur im eingangs erwähnten HCM-Mausmodell, sondern auch in anderen Modellen kardialer Pathologien untersucht werden. Dadurch sollte eine Einordnung der Ergebnisse aus dem HCM-Modell ermöglicht werden. Um einen möglichen Effekt der Interaktion von *Asb2 $\beta$*  und S100A4

zu verstehen, wurde außerdem der Einfluss einer Überexpression von *S100A4* auf die kontraktile Funktion von künstlichem Herzmuskelgewebe untersucht.

Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst:

1. Die Untersuchung der mRNA-Konzentration von *Asb2 $\beta$*  und *S100A4* mittels quantitativer PCR erbrachte folgende Ergebnisse: Bei Betrachtung des HCM-Mausmodells konnte in zehn Wochen alten KI-Mäusen eine erniedrigte mRNA-Konzentration von *S100A4* gemessen werden. In einjährigen Tieren war dieser Unterschied nicht mehr feststellbar. Auch die Konzentration der *Asb2 $\beta$* -mRNA war in den betroffenen Tieren sowohl während der ersten Lebenswoche als auch im Alter von einem Jahr signifikant verringert. Die mRNA-Konzentrationen von *Asb2 $\beta$*  und *S100A4* in den weiteren untersuchten Modellen deckten sich weitestgehend mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen: Sowohl in einem Mausmodell mit dilatativer Kardiomyopathie als auch in einem *in vitro* Modell kardialer pathologischer Hypertrophie zeigten sich höhere *S100A4*- und niedrigere *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentrationen.
2. Es ist außerdem gelungen, einen Degradationsassay zu etablieren, der zunächst zur Identifizierung von Desmin als Substrat von *Asb2 $\beta$*  beitrug und mit dem der Abbau von *S100A4* durch *Asb2 $\beta$*  untersucht werden konnte: Hierfür wurde zunächst eine Vielzahl von Plasmiden kloniert, um eine reproduzierbare Detektion der Konstrukte zu gewährleisten. Die Co-Transfektion von Cos-7-Zellen mit Plasmiden für *S100A4* und *Asb2 $\beta$*  WT bzw. MUT führte in der WT-Gruppe zu einer verringerten Expression der *S100A4*-Proteinkonzentration. Die Inhibition des UPS durch Epoxomicin führte hingegen zu einer Stabilisierung der Proteinkonzentration von *S100A4*.
3. Weiterhin konnte in künstlichem Herzmuskelgewebe aus Rattenkardiomyozyten gezeigt werden, dass eine ausreichend starke Überexpression von *S100A4*-mRNA zu einem deutlichen Funktionsverlust führte. Die maximale Kraftentwicklung war abgeschwächt und die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten

waren verlängert. Dieser Funktionsverlust ging mit einem Anstieg der mRNA-Konzentration verschiedener profibrotischer und hypertropher Gene einher.

#### **4.1. Charakterisierung von *Asb2 $\beta$* und *S100A4* im Herzen**

##### **4.1.1. Genexpression von *Asb2 $\beta$***

Im Alter von zehn Wochen besitzen die homozygoten KI-Mäuse einen ausgeprägten HCM-Phänotyp (Vignier et al. 2009). Daher erfolgte auch die bisherige Charakterisierung der mRNA-Expression verschiedener muskelspezifischer E3-Ligasen zu diesem Zeitpunkt (Thottakara et al. 2015). Jedoch weisen die KI-Mäuse bereits zum Zeitpunkt der Geburt ein im Vergleich zu WT-Tieren 22% höheres Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis auf (Schlossarek et al. 2012b). Auf Grund dieser früh auftretenden linksventrikulären Hypertrophie untersuchten wir die *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentrationen in KI-Mäusen der ersten Lebenswoche. Während WT-Mäuse innerhalb der ersten Lebenswoche einen graduellen Anstieg der *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentrationen aufwiesen, blieb ein solcher in den KI-Tieren aus und die *steady-state*-Konzentrationen der *Asb2 $\beta$* -mRNA waren relativ zu den WT-Tieren signifikant verringert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Voruntersuchungen, in denen neugeborene Mäuse eine tendenziell höhere UPS-Aktivität aufwiesen (Schlossarek et al. 2012a). Allerdings zeigten Schlossarek et al. diese erhöhte UPS-Aktivität an Hand von insgesamt höheren Konzentration an ubiquitinierten Proteinen, sowie einer erhöhten Aktivität des 26S-Proteasoms und nicht durch Einzelanalysen der beteiligten E3-Ligasen. Es ist also durchaus denkbar, dass einzelne E3-Ligasen als unsichtbares Frühsymptom bereits herunterreguliert sind, während das gesamte UPS auf Hochtouren läuft, um den erhöhten *turnover* fehlerhafter Proteine zu kompensieren.

Bedenkt man den eindeutigen HCM-Phänotyp in zehn Wochen alten KI-Mäusen (Vignier et al. 2009), verwundert es nicht, dass auch ein Jahr alte Tiere weiterhin Merkmale der HCM aufweisen. Interessanterweise zeigen jedoch trotz dieses konstanten Phänotyps ältere KI-Mäuse eine niedrigere UPS-Aktivität. Dieser Vorgang ist vermutlich durch Abnutzung und dauerhafte Überfrachtung des Systems mit falsch gefaltetem cMyBP-C zu erklären. Deutlich wird dies daran, dass lediglich KI-Tiere im Alter eine niedrige UPS-Aktivität aufweisen, wohingegen KO-Mäuse, die keinerlei cMyBP-C besitzen, keine

verminderte UPS-Aktivität besitzen (Schlossarek et al. 2012b). Passend zu diesen Ergebnissen von Schlossarek et al. konnte auch in der vorliegenden Arbeit in alten KI-Mäusen eine niedrigere *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentration festgestellt werden. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass nicht-degradierte Zielproteine von *Asb2 $\beta$*  zu Entstehung oder Progress der HCM beitragen.

Um die Ergebnisse des HCM-Modells besser einordnen zu können, wurde auch die *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentration in anderen Modellen kardialer Erkrankungen untersucht. Im Alter von einem Jahr weisen Mäuse, die heterozygot für eine Deletion im *LMNA* Gen sind (*LMNA*- $\Delta^{K32}$ -heterozygot), klassische Merkmale einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM), wie ein geringes Herzgewicht bei gleichzeitig erhöhten systolischen und diastolischen linksventrikulären Innendurchmessern auf. Gleichzeitig liegt in diesen Mäusen offensichtlich eine Störung der UPS-Funktion vor: Neben einer erhöhten Konzentration der mutierten Lamin-Isoform weisen diese Mäuse auch insgesamt einen Anstieg ubiquitiniertes Proteine auf. Vergleichbar mit den o.g. Daten von Schlossarek et al. aus dem *MYBPC3*-KI-Mausmodell scheint es auch in den heterozygoten *LMNA*- $\Delta^{K32}$ -Mäusen, als sei das UPS durch die erhöhte Konzentration eines falsch gefalteten Proteins in einen Sättigungszustand geraten, so dass die toxische Lamin-Mutante nicht mehr abgebaut werden kann und somit zur Entstehung der Kardiomyopathie beiträgt (Schlossarek et al. 2012b, Cattin et al. 2013). Einen ähnlichen Effekt konnten auch Sarikas et al. für eine mutierte cMyBP-C-Isoform beobachten (Sarikas et al. 2005). Die *Asb2 $\beta$* -mRNA-Konzentrationen waren in den *LMNA*- $\Delta^{K32}$  Mäusen im Vergleich zum WT tendenziell niedriger. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass die Übersättigung des UPS, ähnlich wie im *Mybpc3*-KI Modell, bereits zu einer Abnutzung geführt hat und daher einzelne Komponenten des Systems herunterreguliert sind.

Ähnlich verhielt es sich auch im EHT-Modell der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie. Diese EHTs wurden von Hirt et al. als Positivkontrolle zum entwickelten *in vitro* Modell kardialer Hypertrophie etabliert: Neben der Hochregulation klassischer hypertropher Gene wie *Myh7*, *Acta1*, *Nppa* und *Nppb* zeigten sich auch eine Zunahme des Querschnitts der einzelnen Kardiomyozyten als Nachweis einer Hypertrophie, sowie eine übermäßige Fibrosierung (Hirt et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit fiel in diesen EHTs eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen niedrigere *Asb2 $\beta$* -mRNA-



Konzentration auf. In den Tiermodellen von HCM und DCM scheint sich die UPS-Aktivität altersabhängig zu ändern (s.o.). Die Phenylephrin-Behandlung der EHTs begann 14 Tage nach ihrer Herstellung. EHTs besitzen zu diesem Zeitpunkt eindeutige Zeichen unreifer Zellstadien der Kardiomyozyten und dieser Aspekt des Modells wird erst seit kurzem erfolgreich optimiert (Hirt et al. 2014). Hirt et al. haben zwar noch keine Untersuchungen über die UPS-Aktivität der so behandelten EHTs angestellt, jedoch sind die Ergebnisse der PE-EHTs auf Grund dieses unreifen Zellstadiums am ehesten mit denen der postnatalen HCM-Mäuse zu vergleichen. Denkbar ist demnach, dass die pathologische Hypertrophie und Fibrosierung und der damit verbundene Protein-*turnover* zu einer generellen Aktivierung des UPS führen. Ähnlich wie in den HCM-Mäusen könnten auch hier einzelne Komponenten des Systems wie z.B. E3-Ligasen bereits frühzeitig herunterreguliert sein. Erneut kann über die Genese nur spekuliert werden: Ob die veränderte *Asb2β*-mRNA-Konzentration ursächlich an der Hypertrophie beteiligt ist oder lediglich als kompensatorisch zu werten ist, bleibt offen.

Für eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse wären Messungen der Protein-Konzentrationen von *Asb2β* in allen Proben unbedingt notwendig. Leider war es nicht möglich, den endogenen Gehalt an *Asb2β* in Herzgewebe zu ermitteln, da die kommerziell erhältlichen Antikörper im Western-Blot nicht erfolgreich etabliert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Natürlich müssen mRNA- und Protein-Konzentrationen nicht zwangsläufig korrelieren, jedoch ergeben die in allen untersuchten pathologischen Modellen erniedrigten *Asb2β*-mRNA-Konzentrationen ein insgesamt eindeutiges Bild und lassen den Schluss zu, dass *Asb2β* auch auf Proteinebene in niedrigeren Konzentrationen vorliegen könnte. Umso wichtiger erscheint demnach die Identifikation neuer Zielproteine von *Asb2β*.

#### **4.1.2. Genexpression von S100A4**

Die Rolle von S100A4 im Herzen ist nicht eindeutig geklärt. Tamaki et al. sind von einer Expression von S100A4 in Kardiomyozyten überzeugt und sehen in S100A4 einen wesentlichen Mediator kardialer Fibrosierung; ein Befund, der sich mit der Rolle von S100A4 außerhalb des Herzens vereinbaren lässt (Tamaki et al. 2013). Schneider et al. hingegen glauben nicht an eine Expression von S100A4 *in* Kardiomyozyten, sondern vermuten eher S100A4-vermittelte parakrine Effekte *auf* Kardiomyozyten (Schneider et

al. 2007). Beide Gruppen stellen jedoch fest, dass die mRNA-Konzentration von *S100A4* in verschiedenen Maus- und Rattenmodellen kardialer Pathologien erhöht ist. Schneider et al. zeigten dies in zwei verschiedenen Hypertrophie-Modellen in der Ratte: sechs Wochen nach operativer transversaler Konstriktion der Aorta (TAC), die zur druckinduzierten Hypertrophie führt, konnten sie in den Ratten einen 5,1-fachen Anstieg der *S100A4*-mRNA feststellen. Gleichsam führte ein operativ induzierter Myokardinfarkt neun Wochen nach Intervention verglichen mit unbehandelten Tieren zu einem 4,8-fachen Anstieg der *S100A4*-mRNA (Schneider et al. 2007). Tamaki et al. nutzten hingegen genetisch veränderte, sog. Dahl-Ratten, die auf Salzkonsum mit übermäßiger LV-Hypertrophie reagieren und in der Folge eine Herzinsuffizienz entwickeln. Im Stadium der manifesten Herzinsuffizienz zeigten sie verglichen mit gesunden Kontrolltieren einen fünffachen Anstieg der *S100A4*-mRNA und -Protein-Konzentration (Tamaki et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse zumindest für das HCM-Modell nicht bestätigt werden. Sowohl in postnatalen als auch in alten Tieren scheint kein Unterschied in der *S100A4*-mRNA-Konzentration zwischen WT und KI vorzuliegen. In zehn Wochen alten KI-Mäusen ist die mRNA-Konzentration von *S100A4* sogar ca. 60% niedriger. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch liegt in der Aktivität des UPS: Weder Schneider noch Tamaki haben diese untersucht und es ist denkbar, dass das UPS in ihren Modellen intakt ist. Im Überfluss produziertes *S100A4*-Protein würde somit erfolgreich im Proteasom degradiert werden, wogegen spekuliert werden kann, dass es in den HCM-Mäusen als Reaktion auf den fehlenden Abbau im gestörten UPS auf Genebene herunterreguliert wird (Schneider et al. 2007, Tamaki et al. 2013).

Gegen diese Theorie spricht eine Arbeit von Ranek et al., die zeigen konnten, dass das UPS in TAC-Mäusen im Laufe weniger Wochen insuffizient wird (Ranek et al. 2015). Auch die in der vorliegenden Arbeit ermittelten *S100A4*-mRNA-Konzentrationen in den anderen beiden untersuchten Modellen weisen auf eine dysfunktionales UPS hin: Sowohl *LMNA-Δ<sup>K32</sup>* Mäuse als auch Phenylephrin behandelte EHTs weisen eine deutliche, ca. zweifach höhere *S100A4*-mRNA-Konzentration im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen auf. Geht man von einer vergleichbaren Störung des UPS innerhalb der untersuchten Modelle aus, so müssten sich auch die mRNA-Konzentrationen von *S100A4* vergleichbar verhalten. Vor dem Hintergrund der eingangs

erwähnten Komplexität des UPS, ist eine endgültige Bewertung an Hand der mRNA einer einzelnen E3-Ligase nicht zulässig.

Interessanterweise konnten Tamaki et al. aber nicht nur den Ist-Zustand in Tiermodellen evaluieren, sondern diesen auch beeinflussen: Durch Verwendung von *small interfering RNA* gegen *S100A4* konnte ein 70%iger *Knockdown* von *S100A4*-mRNA erreicht werden. Dies führte zu einem signifikanten Absinken der mRNA-Konzentrationen verschiedener profibrotischer Gene wie *Col1a1*, *Col3a1*, *Fn* und *Ctgf*. Gleichzeitig konnte sie zeigen, dass *S100A4* ein Interaktionspartner von p53 zu sein scheint. Der Tumorsuppressor p53 ist ein Transkriptionsfaktor, dem eine Reihe von Genen des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur unterstellt sind und der auf Grund dieser zentralen Position als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (Lane 1992). In Fibroblasten co-lokalisieren *S100A4* und p53 im Zellkern und ein doppelter *Knockdown* von *S100A4* und *p53* machte die o.g. Effekte des *Knockdowns* von *S100A4* allein rückgängig (Tamaki et al. 2013). Außerdem untersuchten Tamaki et al. ein *S100A4-Knockout*-Modell. In diesen Tieren zeigte sich interessanterweise basal zwar kein Phänotyp, jedoch ergab sich nach TAC Intervention in den KO-Tieren eine verminderte kardiale Fibrosierung. Außerdem konnten sie die Ergebnisse des *Knockdowns* bestätigen: Der in den Kontrolltieren gemessene Anstieg der mRNA-Konzentrationen von *Col1a1*, *Col3a1*, *Fn* und *Ctgf* blieb in den KO-Tieren aus. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *S100A4* eine ursächliche Funktion im TAC-Modell besitzen könnte.

Interessanterweise zeigten kürzlich erschiene Daten eine Korrelation von *S100A4*-Proteinkonzentrationen und Fibrosierung in HCM-Patienten: Qi et al. haben menschliche HCM-Proben auf Proteinexpression und mRNA-Konzentration von *S100A4* untersucht (Qi et al. 2016). Hierzu verglichen sie Proben von insgesamt zehn HCM-Patienten, die sich einer septalen Myektomie unterzogen hatten, mit Herzgewebe von Unfallopfern. Zunächst evaluierten sie den Grad der Fibrosierung als Kriterium für eine ausgeprägte HCM. Sie stellten fest, dass in den Gewebeschnitten der HCM-Patienten sowohl deutlich mehr *S100A4*-mRNA als auch *S100A4*-Protein enthalten war. Interessanterweise korrelierte dieses Ergebnis mit einem entsprechenden Anstieg von p53, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene. Qi et al. vermuten ähnlich wie Tamaki et al., dass eine Interaktion von *S100A4* und p53 zu einer übermäßigen Fibrosierung im Herzen

beiträgt. Eine Theorie, die sich gut mit unseren Daten deckt. Leider erfolgte der Proteinnachweis von S100A4 lediglich mittels Immunhistochemie statt per Immunofluoreszenz. Letztere Methode hätte genaue Lokalisation von S100A4 vermutlich präziser nachweisen können und somit zur Klärung beigetragen, ob tatsächlich eine Expression von S100A4 *innerhalb* von Kardiomyozyten existiert.

Leider konnten in der vorliegenden Arbeit zur Detektion des endogenen S100A4 keine Antikörper-Bedingungen etabliert werden. Weder kommerzielle noch ein individuell von der Firma Eurogentec® produzierter Antikörper ermöglichten den Nachweis von S100A4 in verschiedenen Proben. Dies betraf sowohl klassische S100A4-Positivkontrollen wie Fibroblasten, als auch unterschiedliche Zelltypen, in denen S100A4 via Plasmid oder Adeno-assoziiertem Virus überexprimiert worden war. Somit könnte man zunächst vermuten, dass S100A4 in keiner der untersuchten Proben vorhanden war. Die Tatsache, dass in Mauskardiomyozyten kein Nachweis gelang, würde die Hypothese von Schneider et al. stützen, nach der S100A4 in Kardiomyozyten nicht exprimiert wird. Allerdings konnten wir auch in Mausherzgewebe, das neben Kardiomyozyten auch Fibroblasten enthält, mit dem Eurogentec®-Antikörper kein S100A4 detektieren. Bei einer erneuten Untersuchung mittels V5-Antikörper gelang schließlich der Nachweis des exogen überexprimierten S100A4 am V5-Tag des eingebrachten Konstrukts. Dies wiederum spricht eher für einen ungeeigneten Eurogentec®-Antikörper, schließt aber Schneiders Hypothese noch immer nicht aus. Eine Interferenz des V5-Tags bei der Bindung des Eurogentec-Antikörpers sollte durch die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE eigentlich verhindert werden, kann letztlich jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Da die Evaluation von S100A4 als Substrat von Asb2 $\beta$  jedoch die zentrale Fragestellung dieser Arbeit bildete, musste eine Lösung gefunden werden, mit der sich der Abbau von S100A4 abhängig von Asb2 $\beta$  nachweisen ließ, ohne die nativen Proteine im Western Blot messen zu können.

#### **4.2. Strategie-Wechsel: Co-Transfektion**

In Ermangelung eines erfolgreichen Nachweises von endogenem S100A4 wurde der ursprüngliche Plan, diesen Abbau durch Behandlung von NMCM mit den Adenoviren für Asb2 $\beta$  WT bzw. MUT nachzuweisen (Thottakara et al. 2015), verworfen. Stattdessen

sollte ein Degradationsassay etabliert werden, der den Abbau von S100A4 durch Asb2 $\beta$  nach Co-Transfektion in Cos-7-Zellen beweisen sollte. Im Folgenden werden sowohl das Abrücken von der ursprünglichen Strategie, sowie die Vor- und Nachteile eines solchen Degradationsassays diskutiert.

Der Nachweis einer Interaktion zweier Proteine mit der Folge des Abbaus des einen durch das andere ist eine klassische biologische Fragestellung, die naturgemäß häufig Untersuchungen des UPS betrifft. Die Strategie einen Degradationsassay zu etablieren, ist weit verbreitet (Omerovic et al. 2007, Hou et al. 2012, Spaich et al. 2012, Thottakara et al. 2015) und bietet viele Vorteile: Die üblicherweise verwendeten Tumorzelllinien (HeLa, HEK-293, Cos-7 u.a.) sind einfach zu handhaben und weit verbreitet. Sind die zu untersuchenden Proteine nicht zu groß, kann ihre cDNA vergleichsweise einfach in einen Transfektionsvektor kloniert werden. Außerdem kann durch Wahl der Promoter die Expression der Konstrukte beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Verwendung des CMV-Promoters für beide Konstrukte eine unterschiedlich starke Transkription der cDNA von *S100A4* bzw. *Asb2 $\beta$*  ausgeschlossen. Der vermutlich wichtigste Vorteil liegt auf der Hand: Durch Anhängen eines Epitop-Tag an die cDNA des Proteins wird seine Detektion im Western Blot deutlich vereinfacht. Eine wichtige Voraussetzung bestand darin, dass die Wirtszelle, in welche die cDNA eingebracht wird, die untersuchten Proteine nicht selbst produziert. Dies wurde durch nicht-transfizierte Zellen als Negativkontrolle sichergestellt (Daten nicht gezeigt). Diese Voraussetzung ist jedoch gleichzeitig Fluch und Segen. Zwar kann zumindest theoretisch ein Einfluss von endogenen Proteinen auf den Abbau ausgeschlossen werden, aber die Tatsache, dass die Wirtszelle die untersuchten Proteine nicht selbst synthetisiert, stellt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Organismus zumindest in Frage.

In insgesamt drei separaten Versuchen wurden Cos7-Zellen mit konstanten Mengen von S100A4-V5-C sowie Asb2 $\beta$  WT bzw. MUT co-transfiziert. Zunächst war es wichtig, eine konstante Expression der beiden Asb2 $\beta$  Konstrukte WT und MUT zu erreichen. So konnte sichergestellt werden, dass die Expression von S100A4-V5-C nicht durch unterschiedlich starke Expression von Asb2 $\beta$  WT bzw. MUT innerhalb der Cos-7-Zellen beeinflusst wurde. Nicht die Menge, sondern nur die Funktion von Asb2 $\beta$  sollte S100A4 beeinflussen. Bei der Analyse des S100A4-Signals zeigte sich eine signifikante Reduktion

der Expression von S100A4 in der mit Asb2 $\beta$ -WT co-transfizierten Gruppe. Dies ist ein Hinweis darauf, dass S100A4 von der intakten WT-Variante von Asb2 $\beta$  abgebaut oder zumindest beeinflusst wird, nicht jedoch von der mutierten Variante von Asb2 $\beta$ . Die Reduktion von S100A4 um 26% erscheint zunächst gering. Es ist jedoch denkbar, dass Asb2 $\beta$  nur eine von mehreren E3-Ligasen darstellt, die S100A4 für den proteasomalen Abbau markieren. Wohlmöglich werden diese anderen Interaktionspartner von S100A4 in den untersuchten Cos7-Zellen nicht exprimiert, so dass wir lediglich den Effekt von Asb2 $\beta$  auf S100A4 untersuchen konnten. Falls diese unbekanntes E3-Ligasen in Kardiomyozyten der HCM-Mäuse exprimiert werden, könnte das den Unterschied zwischen erwarteter und gemessener S100A4-Konzentration erklären und müsste wie bereits diskutiert als Schwachstelle des artifiziellen Systems gewertet werden. Eine weitere Möglichkeit, die bedacht werden muss, ergibt sich aus der Tatsache, dass wie eingangs erwähnt auch E3-Ligasen selbst Zielproteine anderer E3-Ligasen werden können. So könnte Asb2 $\beta$  eine weitere E3-Ligase der proteasomalen Degradation zuführen, welche so ihrerseits nicht mehr für die Ubiquitinierung von S100A4 zur Verfügung steht. Ein Nachweis der direkten Interaktion von Asb2 $\beta$  und S100A4 durch eine Co-Immunopräzipitation würde hier Klarheit schaffen.

Für einen Abbau von S100A4 durch Asb2 $\beta$  spricht weiterhin die erfolgreiche UPS-Inhibition durch Zugabe von Epoxomicin, eines spezifischen UPS-Inhibitors. Die Behandlung der mit Asb2 $\beta$ -WT co-transfizierten Zellen mit Epoxomicin führte zu einem Anstieg der S100A4-Konzentration verglichen mit der Vehikel-Gruppe. Interessanterweise konnte ein vergleichbarer Anstieg auch zwischen den beiden mit Asb2 $\beta$ -MUT behandelten Gruppen festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nicht nur Asb2 $\beta$ , sondern auch andere E3-Ligasen am proteasomalen Abbau von S100A4 beteiligt sind. Einschränkend ist anzumerken, dass die relativ kleine Gruppe von n=3 noch kein signifikantes Resultat hervorgebracht hat. Wir sind jedoch überzeugt, dass ein Effekt deutlich wird, wenn der Versuch ein weiteres Mal mit größerer Probenanzahl durchgeführt wird.

Ein weiterer Hinweis auf einen Abbau von S100A4 durch Asb2 $\beta$  findet sich beim Vergleich mit den Ergebnissen von Thottakara et al. (2015). Dort konnte Desmin als Zielprotein von Asb2 $\beta$  etabliert werden. Dies geschah sowohl mittels des in dieser

Arbeit etablierten Cos-7-Zell-Assays, als auch durch Nachweis eines verminderten Gehaltes an endogenem Desmin in entsprechend adenoviral transduzierten NCMs. Weiterhin gelang es, eine direkte Interaktion von Asb2 $\beta$  und Desmin durch Co-Immunopräzipitation nachzuweisen. Diese Ergebnisse lassen die Hoffnung zu, dass mittels geeigneter Antikörper für S100A4 dessen Abbau durch Asb2 $\beta$  auch in „natürlicheren“ *Settings*, wie etwa den o.g. adenoviral transduzierten NCMs, bewiesen werden könnte. Einen solchen Versuchsaufbau könnte man durch siRNA gegen Asb2 $\beta$  erweitern. Ein solcher *Knockdown* von Asb2 $\beta$  müsste folgerichtig zu einer Stabilisierung von S100A4 führen.

### **4.3. Die funktionelle Rolle von S100A4 in künstlichem Herzgewebe**

#### **4.3.1. Lokalisation**

Thottakara und Friedrich et al. konnten für Asb2 $\beta$  in neonatalen Mauskardiomyozyten eine Lokalisation in der Z-Scheibe des Sarkomers nachweisen (Thottakara et al. 2015). Für das überexprimierte S100A4 konnte in den EHTs mittels Immunfluoreszenz eine Lokalisation nachgewiesen werden, die weitestgehend der A-Bande zugeordnet werden kann. Dies ist in etwa vergleichbar mit cMyBP-C, dessen Expression im Sarkomer gut untersucht ist (Gilbert et al. 1999, Carrier et al. 2015).

Falls S100A4 ein Zielprotein von Asb2 $\beta$  ist, muss es an irgendeinem Zeitpunkt mit diesem in räumliche Nähe treten, damit Asb2 $\beta$  die Bildung eines Komplexes bestehend aus E2-Protein, Ubiquitin und Zielprotein katalysieren kann. In den bereits erwähnten Arbeiten der Gruppen um Tamaki bzw. Schneider sind ebenfalls immunzytochemische Versuche durchgeführt worden. Allerdings zeigen Tamaki et al. nur in Fibroblasten ein positives S100A4-Signal (Tamaki et al. 2013). Schneider et al. konnten dieses aber lediglich am Rand von Infarktzone erkennen und ausdrücklich nicht *innerhalb* der Kardiomyozyten. Sie stellten weiterhin fest, dass die Inkubation neonataler Ratten-Kardiomyozyten mit rekombinantem S100A4 zu einer dosisabhängigen zellulären Hypertrophie führte. In den Kardiomyozyten beobachteten sie sowohl ein intranukleäres als auch ein zytoplasmatisches Signal in vesikelartigen Strukturen (Schneider et al. 2007). Eine externe Zugabe eines Proteins kann jedoch unseres Erachtens nicht mit einer intrazellulären Expression durch eine virale Transduktion

verglichen werden. In vielen malignen Erkrankungen finden sich erhöhte S100A4-Proteinkonzentrationen. Auffällig dabei ist, dass S100A4 weniger spezifischen Geweben zugeordnet werden kann, sondern stets in Metastasen zu finden ist. Es wird vermutet dass S100A4 eine entscheidende Rolle bei der Epithel-Mesenchym-Transformation zukommt und somit zur Metastasierungstendenz der entarteten Zellen beiträgt (Mishra et al. 2012). Da sich in der Literatur keine Immunfluoreszenz-Untersuchungen von S100A4 in Kardiomyozyten fanden, stellt der Nachweis der spezifischen Expression des Konstrukts im Sarkomer der EHTs nach unserem Wissen die bislang erste Beschreibung der S100A4-Lokalisation in Kardiomyozyten dar.

Über die Funktion von S100A4 im Bereich der A-Bande lässt sich nur spekulieren. Im Herzen ist jedoch mit S100A1 ein weiteres Familienmitglied von S100A4 deutlich besser charakterisiert. S100A1 findet sich in allen Bereichen des Sarkomers, mit stärkster Konzentration im Bereich der A-Bande und im sarkoplasmatischen Retikulum. Die ihm zugeschriebenen Funktionen sind vielfältig: So reguliert es durch Bindung an den Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) und an die Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums (Serca) den Calcium-Haushalt im SR und führt durch Interaktion mit der mitochondrialen ATP-Synthase zu einer erhöhten Bereitstellung von ATP (Rohde et al. 2010). Im Sarkomer bindet S100A1 an Titin und reduziert so die passive Vorspannung der Myofilamente (Yamasaki et al. 2001). Alle beschriebenen Funktionen von S100A1 haben einen positiven Effekt auf die Funktion des Kardiomyozyten. Für S100A4 kommen nach unseren Erkenntnissen jedoch eher negative Einflüsse auf Kardiomyozyten in Frage. Neben Effekten auf die Expression verschiedener profibrotischer und hypertropher Gene (s.o.) könnte auch S100A4 ähnlich wie S100A1 (Rohde et al. 2010) eine Bindung mit Titin eingehen und so etwa in der HCM zur Entstehung der typischen diastolischen Dysfunktion beitragen.

Wenn man davon ausgeht, dass die Überexpression von S100A4 in der A-Bande der EHTs mit der *in vivo* Lokalisation im Herzen übereinstimmt, spricht das Ergebnis der durchgeführten Immunfluoreszenz gegen eine direkte Interaktion von Asb2 $\beta$  und S100A4. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die starke Überexpression von S100A4 zu einer ungewöhnlichen Lokalisation geführt hat. Dies wiederum würde natürlich auch die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen in Frage stellen. Eine weitere Möglichkeit, die bereits zuvor (s. 4.2) diskutiert wurde, ist der indirekte Einfluss von



Asb2 $\beta$  auf S100A4 durch eine weitere, zwischengeschaltete E3-Ligase oder ein anderes spezifisches Enzym des UPS. Auch hier könnte eine Co-Immunopräzipitation Klarheit schaffen. Ebenfalls bedenken sollte man, dass auch in den Immunfluoreszenz-Analysen der Arbeit von Thottakara et al. nicht endogenes Asb2 $\beta$ , sondern überexprimiertes Asb2 $\beta$  detektiert wurde (Thottakara et al. 2015). Insofern muss auch die spezifische Expression von Asb2 $\beta$  in der Z-Bande kritisch hinterfragt und nach Möglichkeit durch Etablierung von Antikörpern gegen endogenes Asb2 $\beta$  in weiteren Immunfluoreszenz-Messungen bestätigt werden.

#### **4.3.2. Einfluss auf funktionelle Parameter in EHTs**

Die Konzentration von *Asb2 $\beta$* -mRNA ist im Mausmodell der hypertrophen Kardiomyopathie in verschiedenen Altern verringert. Die HCM ist eine Herzmuskelerkrankung, die durch eine Hypertrophie der linksventrikulären Herzwand gekennzeichnet ist und histopathologisch u.a. durch Hypertrophie der Kardiomyozyten und interstitielle Fibrose auffällt (Shirani et al. 2000, Elliott et al. 2014, Kocovski und Fernandes 2015). Interpretiert man den verminderten Gehalt an *Asb2 $\beta$* -mRNA als möglichen Beitrag zur Pathogenese der HCM, rücken die Zielproteine von Asb2 $\beta$  in den Fokus. Mit Desmin und Filamin B konnten bereits zwei Zielproteine von Asb2 $\beta$  identifiziert werden (Bello et al. 2009, Thottakara et al. 2015). Durch die vorliegende Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Asb2 $\beta$  S100A4 direkt oder zumindest indirekt dem proteasomalen Abbau zuführt. Folglich war die Charakterisierung des Einflusses von S100A4 auf funktionelle Parameter im EHT-Modell ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Das am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie entwickelte *in vitro* Modell für künstliches Herzgewebe (EHT) bot hierzu ideale Voraussetzungen. Wie von Hansen et al. dargestellt, sind die Herzmuskel-Konstrukte auf Fibrinbasis standardisiert und einfach zu handhaben, d.h. sie liefern verlässliche Daten bei gleichzeitig unkomplizierten Bedingungen (Hansen et al. 2010). Um die funktionelle Rolle von S100A4 im Herzen besser verstehen zu können, wurde es in den EHTs überexprimiert.

Die Überexpression von S100A4 in EHTs geschah mittels Adeno-assoziierten Viren vom Serotyp 6. Zunächst musste eine effiziente, aber nicht toxische MOI ermittelt werden.

Dies geschah durch Transduktion mit dem GFP-exprimierenden AAV-GFP in MOIs von 1 000 und 3 000, angelehnt an (Filiatre 2012). Nach Analyse der behandelten EHTs unter dem Fluoreszenzmikroskop, sowie durch Nachweis der GFP-Expression im Western-Blot konnte eine MOI von 1 000 für alle folgenden Versuche etabliert werden. Als nächstes musste eine Negativ-Kontrolle gefunden werden, um auszuschließen, dass die Behandlung mit einem Adeno-assoziierten Virus einen Einfluss auf die Funktion der EHTs hatte. Der naheliegende AAV-GFP erwies sich leider als ungeeignet, da er im Vergleich zu untransduzierten EHTs einen negativen Effekt auf alle gemessenen kontraktile Parameter induzierte (s. Abbildung 33). Dies lässt sich möglicherweise durch eine Bindung von GFP an Myosin erklären, wodurch die effektive Folge des Querbrücken-Zyklus gestört wird (Xie et al. 2009). Schließlich wurde ein Leervektor als Negativkontrolle etabliert, der zwar die Behandlung der EHTs mittels AAV6 widerspiegelte, jedoch kein Protein exprimierte.

Mit den so etablierten Versuchsbedingungen konnte nun die Ausgangsfragestellung untersucht werden. Hat eine Überexpression von S100A4 einen negativen Effekt auf die EHT-Funktion? Die Ergebnisse erscheinen auf den ersten Blick widersprüchlich: Im ersten Versuch konnte ein eindeutiger negativer Effekt von S100A4 auf Kraft, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der EHTs nachgewiesen werden. Mit Leervektor behandelte Kontrollen zeigten hierbei keinen Unterschied zu unbehandelten EHTs. In einer Wiederholung desselben Versuchs zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Beim Betrachten der quantitativen Nachweise von S100A4-mRNA fällt auf, dass die funktionell so schwache S100A4-Gruppe der ersten Transduktion einen deutlich höheren Gehalt an S100A4-mRNA aufwies als die funktionell unauffälligen EHTs der zweiten Transduktion (6,6-fach vs. 3-fach). Dieser Unterschied auf Genexpressionsebene könnte auch einen ebensolchen Unterschied auf Proteinebene verursachen und entsprechend Einfluss auf die Funktion nehmen. Es fällt auf, dass alle EHTs der zweiten Transduktion eine insgesamt schlechtere funktionelle Entwicklung aufwiesen als die EHTs des ersten Versuchs. So entwickelten die EHTs der Kontrollgruppe in der ersten Transduktion eine maximale Kraft von 190  $\mu\text{N}$  und Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeiten von 360  $\mu\text{N/s}$  bzw. 320  $\mu\text{N/s}$ . Im Wiederholungsversuch wurden diese Werte nicht erreicht (160  $\mu\text{N}$ , 240  $\mu\text{N/s}$  bzw. 220  $\mu\text{N/s}$ ), was als Hinweis auf eine ungenügende Reifung der EHTs interpretiert werden kann. Ein quantitativer Vergleich der S100A4-Expression zwischen den beiden

Transduktionen auf Proteinebene wurde leider nicht durchgeführt. Ebenso wurden keine maximale MOI untersucht, bei der sich sowohl in der S100A4- als auch in der Leervektor-Gruppe ein deutlicher funktioneller Abfall im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine höhere Viruskonzentration zu einer höheren *steady-state* Konzentration von S100A4 in EHTs geführt hätte, ohne diesen zu schaden. Ein zweifelsfreier Effekt von S100A4 auf EHTs ließ sich nicht sicher nachweisen. Jedoch soll auf Grund der Eindeutigkeit der Ergebnisse der ersten Transduktion, sowie der zahlreichen Hinweise in der Literatur eine mögliche Rolle von S100A4 in der „Pathogenese“ diskutiert werden.

S100A4 ist ein Mediator verschiedener fibrosierender Erkrankungen. Eine kardiale Fibrose ist wiederum ein gemeinsames Merkmal verschiedener Herzerkrankungen (Schneider et al. 2008). Die Haupttodesursache von Patienten mit HCM sind maligne Herzrhythmusstörungen (Spirito et al. 2000). Diese haben ihren Ursprung häufig in fibrosiertem Myokard (van Rijsingen et al. 2011). Speziell der plötzliche Herztod von HCM-Patienten während sportlicher Aktivität ist wahrscheinlich direkt mit dem Ausmaß kardialer Fibrose assoziiert (Green et al. 2012). Aus diesen Gründen kam eine übermäßige Fibrosierung als Ursache der Funktionsverschlechterung in Frage. In der mit S100A4 behandelten EHT-Gruppe fiel eine ca. 2,5-fache Überexpression von *Ctgf*, dem *connective tissue growth factor* auf. Dieses Ergebnis deckt sich außerdem mit den Daten von Tamaki et al., nach denen die mRNA-Konzentration von *Ctgf* durch *Knockdown* und *Knockout* von S100A4 geringer ist. *Ctgf* verursacht eine kardiale Hypertrophie in Ratten und ist ein Effektorprotein von TGF $\beta$ , einem zentralen Mediator von kardialer Fibrose (Teekakirikul et al. 2010), auch in einem anderen HCM-Mausmodell (Azibani et al. 2012). Möglicherweise ist die Überexpression von *Ctgf* als Symptom von einer S100A4-induzierten Fibrosierung der EHTs mit anschließendem Funktionsverlust zu werten. Aufschlussreich wäre hier z.B. eine Messung der Proteinkonzentration von *Ctgf* im Western Blot. Desweiteren würde eine Dystrophin-Färbung der Kardiomyozyten-Membranen innerhalb der EHTs Aufschluss über eine übermäßige Fibrosierung als eventuelle Folge der Überexpression von S100A4 geben.

Natriuretische Peptide, zu denen ANP und BNP gehören, nehmen eine zentrale Rolle im Flüssigkeitshaushalt und der Blutdruckregulation ein. Als Antwort auf erhöhten transmuralen Druck werden sie von Atrium bzw. Ventrikel ausgeschüttet und wirken

über Vasodilatation und Natriurese hypotensiv (Espiner et al. 1995). Während der Schwangerschaft finden sich die höchsten ANP- und BNP-Konzentrationen parallel zu entscheidenden Zeitpunkten der fetalen Herzentwicklung (Cameron und Ellmers 2003). Entsprechend kann von erhöhten ANP- und BNP-Konzentrationen im adulten Herz auf eine Reaktivierung des fetalen Genprogramms geschlossen werden, so wie sie etwa bei pathologischer kardialer Hypertrophie auftreten. Sowohl ANP als auch BNP sind bei Herzinsuffizienz verschiedener Ätiologie erhöht und können als unabhängige Prädiktoren von Mortalität gewertet werden (Lainchbury et al. 1997). Daher war eine Untersuchung der mRNA-Konzentrationen von *Nppa* und *Nppb* auch in den dysfunktionalen, S100A4 überexprimierenden EHTs relevant. Und tatsächlich konnten in der entsprechenden Gruppe für *Nppa* und für *Nppb* erhöhte mRNA-Konzentrationen nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf eine Aktivierung des fetalen Genprogramms mit konsekutiver Hypertrophie sein könnte.

#### **4.4. Ausblick**

Sowohl *As2 $\beta$*  wie auch S100A4 sind interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen im Kontext der HCM. Für die unmittelbare Zukunft gilt es zunächst, eine direkte Interaktion von *Asb2 $\beta$*  und S100A4 z.B. mittels Co-Immunoprecipitation nachzuweisen. Diese Interaktion verspricht eine interessante Verbindung zwischen Störung des UPS in Patienten mit HCM und einer eingeschränkten Funktion durch kardiale Fibrosierung. So wäre eine Korrelation zwischen MRT-ermittelte Fibrose und S100A4-Plasmaspiegeln interessant. Um Gewissheit über die Funktion von S100A4 in EHTs zu bekommen, wäre eine erneute Transduktion von EHTs mit dem AAV6-S100A4V5C geeignet. Voraussetzung für eine tiefer gehende Analyse wäre eine ausreichend hohe Transkription von S100A4. Gelingt eine solche erneut, könnten weitere Untersuchungen verschiedener profibrotischer Gene, aber auch eine Analyse der zellulären Hypertrophie, etwa durch Dystrophin-Färbung, Aufschluss über die S100A4-induzierten pathophysiologischen Prozesse innerhalb des EHTs bringen.

Tamaki et al. haben die *S100A4-Knockout*-Maus gut untersucht. Gleichsam wäre natürlich auch ein *Knockout* von *Asb2 $\beta$*  interessant. Mäuse mit einer kompletten Inaktivierung von *Asb2 $\beta$*  sind extrauterin nicht lebensfähig (persönliche Kommunikation P. Christel Moog-Lutz, Daten unveröffentlicht). Mit Hilfe des Cre-loxP-Systems ist es

jedoch möglich, einen konditionalen, d.h. zeitlich begrenzten *Knockout* herbeizuführen. In einer solchen Maus könnte man nach dem induzierten *Knockout* von *Asb2 $\beta$*  den kardialen Phänotyp auf Merkmale einer HCM untersuchen und gleichzeitig die Proteinkonzentration von S100A4 überwachen. Die Rolle von *Asb2 $\beta$*  in der HCM könnte somit besser verstanden werden.

Schlussendlich wäre auch ein Blick über den kardiologischen Tellerrand interessant: Sollte sich in Folgeexperimenten der Abbau von S100A4 durch *Asb2 $\beta$*  bestätigen, könnte ein verstärkter Abbau von S100A4 durch gezielte Aktivierung von *Asb2 $\beta$*  zu einer verringerten Metastasierungstendenz führen und so ein interessantes Therapiekonzept der Onkologie darstellen.

## 5. Zusammenfassung

Die hypertrophe Kardiomyopathie ist die häufigste monogenetische Herzerkrankung und führt wegen des erhöhten Risikos für plötzlichen Herztod und bei Vorliegen einer Ausflusstraktobstruktion oft schon in jungen Jahren zu massiven Einschränkungen des alltäglichen Lebens. Obwohl bereits sehr viele zu HCM führende Mutationen bekannt sind, ist die Pathogenese der Erkrankung noch immer nicht vollständig verstanden und es fehlen kausale Behandlungsmöglichkeiten. Das Ubiquitin-Proteasom-System, das für einen Großteil des intrazellulären Proteinabbaus verantwortlich ist, scheint eine zentrale Rolle bei der Entstehung der HCM einzunehmen. Innerhalb des UPS katalysieren E3-Ligasen die entscheidende Reaktion und stellen so sicher, welche Proteine dem proteasomalen Abbau zugeführt werden. In einem *Mybpc3*-KI Mausmodell der HCM wurde eine Herunterregulation der E3-Ligase *Asb2β* festgestellt, so dass *Asb2β* und seine potenziellen Zielproteine in den Fokus unserer Arbeitsgruppe gelangt sind. Zuvor konnten mit Filamin B und Desmin bereits zwei Strukturproteine des Sarkomers bzw. des Cytoskeletts als Reaktionspartner von *Asb2β* identifiziert werden. Ziel dieser Arbeit war die Validierung von *S100A4* als neuem Interaktionspartner von *Asb2β* und darüber hinaus die funktionelle Charakterisierung von *S100A4* in künstlichem Herzgewebe. Weiterhin wurde die Genexpression von *Asb2β* und *S100A4* in verschiedenen Grundlagenmodellen kardialer Erkrankungen untersucht. Die wichtigsten gewonnenen Ergebnisse waren:

1. Trotz der verstärkten Aktivität des UPS in neonatalen *Mybpc3*-KI HCM-Mäusen zeigte sich in jungen und adulten *Mybpc3*-KI Mäusen eine niedrigere *Asb2β*-mRNA-Konzentration als in WT Tieren.
2. Im Lamin-Mausmodell mit dem Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie und zwei EHT-Modellen für pathologische Hypertrophie zeigten sich höhere *S100A4*-mRNA-Konzentrationen als in den Kontrollgruppen, während im *Mybpc3*-KI Mausmodell niedrigere *S100A4* mRNA-Konzentration festgestellt wurden.

3. Im Co-Transfektions-Assay zeigte sich, dass die S100A4 *steady-state* Proteinkonzentration durch Co-Transfektion mit Asb2 $\beta$  WT niedriger als mit Asb2 $\beta$  Mut war. Die Stabilisierung von S100A4 durch Zugabe des UPS-Inhibitors Epoxomicin bewies, dass der Abbau von S100A4 im Proteasom stattfindet.

4. Eine starke Überexpression von S100A4 wirkte sich negativ auf Kraft, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit im Modell des künstlichen Herzgewebes aus.

Trotz vieler neuer Erkenntnisse bleibt abschließend festzustellen, dass für einen sicheren Nachweis von S100A4 als Zielprotein von Asb2 $\beta$  weitere Versuche folgen müssen. Sollten keine Antikörper-Bedingungen für endogenes S100A4 gefunden werden, wäre eine Co-Immunopräzipitation mit und ohne UPS-Inhibierung nach Co-Transfektion eine geeignete Alternative. Die Rolle von S100A4 in der komplexen Pathogenese der hypertrophen Kardiomyopathie sollte bei der zukünftigen Erforschung dieser Krankheit nicht außer Acht gelassen werden.

## Summary

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common monogenetic cardiac disease. Together with left outflow tract obstruction its increased risk for sudden cardiac death leads to a significant reduction in the quality of life even in younger individuals. Although many mutations responsible for the development of HCM have been identified, its pathogenesis is yet to be understood completely and causal therapeutic options are unavailable. The Ubiquitin-Proteasom-System degrades the major part of all synthesized proteins and plays a pivotal role in the development of HCM. Within the UPS E3-Ligases catalyse the final reaction of the ubiquitination and thereby ensure substrate-specificity. An E3-Ligase called Asb2 $\beta$  has been found to be downregulated in *Mybpc3*-KI mice, an animal model of HCM. Therefore potential targets of Asb2 $\beta$  have gained our attention. Previously two sarcomeric proteins Filamin B and Desmin had been identified as targets of Asb2 $\beta$ . Aim of this study was the validation of S100A4 as a novel target of Asb2 $\beta$  followed by its functional effect on *engineered heart tissue* (EHT). Moreover mRNA-levels of *S100A4* and *Asb2 $\beta$*  were analysed in different models of cardiac disease. In summary the results were:

1. Although the UPS in neonatal *Mybpc3*-KI mice is generally upregulated, *Asb2β*-mRNA-levels were found to be decreased in young and adult *Mybpc3*-KI mice compared to wild type controls.

2. In these mice *S100A4*-mRNA-levels were found to be decreased. Other cardiac disease-models such as DCM-mice or pathologically hypertrophied EHTs contained higher *S100A4*-mRNA-levels.

3. Co-transfection of Cos-7-cells with *S100A4* and a dysfunctional *Asb2β* mutant lead to higher expression levels of *S100A4* protein when compared to co-transfection with *Asb2β* wild type. Adding of the UPS-inhibitor epoxomicin diminished (?) this effect and lead to stabilization of *S100A4*, proving the degradation of *S100A4* happened in the UPS.

4. Strong adeno-associated viral overexpression of *S100A4* in EHT lead to significantly attenuated force development as well as contraction and relaxation velocity.

Though this study yielded strong evidence for the *Asb2β*-mediated degradation of *S100A4* in the UPS, more experiments should follow for definite proof. Until a good antibody signal for endogenous *S100A4* is found, co-immunoprecipitation in co-transfected samples with and without UPS-inhibition are likely to produce clarifying results. *S100A4* should not be overlooked when researching HCM in the future.



## 6. Literaturverzeichnis

[http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/185312/Leading-causes-of-death-in-Europe-Fact-Sheet-Ger.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/185312/Leading-causes-of-death-in-Europe-Fact-Sheet-Ger.pdf?ua=1)

<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.htm>

(1980) Report of the WHO/IFSC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 44: 672-673

Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Camm AJ, Ellinor PT, Gollob M, Hamilton R, Hershberger RE, Judge DP, Le Marec H, McKenna WJ, Schulze-Bahr E, Semsarian C, Towbin JA, Watkins H, Wilde A, Wolpert C, Zipes DP (2011) HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm* 8: 1308-1339

Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y, Lukanidin E (2001) The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 20: 4685-4695

Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med* 79: 137-158

Azibani F, Devaux Y, Coutance G, Schlossarek S, Polidano E, Fazal L, Merval R, Carrier L, Solal AC, Chatziantoniou C, Launay JM, Samuel JL, Delcayre C (2012) Aldosterone inhibits the fetal program and increases hypertrophy in the heart of hypertensive mice. *PLoS One* 7: e38197

Bello NF, Lamsoul I, Heuze ML, Metais A, Moreaux G, Calderwood DA, Duprez D, Moog-Lutz C, Lutz PG (2009) The E3 ubiquitin ligase specificity subunit ASB2beta is a novel regulator of muscle differentiation that targets filamin B to proteasomal degradation. *Cell Death Differ* 16: 921-932

Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G (2008) The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 14: 10-21

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Cameron VA, Ellmers LJ (2003) Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology* 144: 2191-2194

Carrier L, Mearini G, Stathopoulou K, Cuello F (2015) Cardiac myosin-binding protein C (MYBPC3) in cardiac pathophysiology. *Gene* 573: 188-197

Carrier L, Schlossarek S, Willis MS, Eschenhagen T (2010) The ubiquitin-proteasome system and nonsense-mediated mRNA decay in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 85: 330-338

Cattin ME, Bertrand AT, Schlossarek S, Le Bihan MC, Skov Jensen S, Neuber C, Crocini C, Maron S, Laine J, Mougnot N, Varnous S, Fromes Y, Hansen A, Eschenhagen T, Decostre V, Carrier L, Bonne G (2013) Heterozygous LmndelK32 mice develop dilated cardiomyopathy through a combined pathomechanism of haploinsufficiency and peptide toxicity. *Hum Mol Genet* 22: 3152-3164

- Christiaans I, Lekanne dit Deprez RH, van Langen IM, Wilde AA (2009) Ventricular fibrillation in MYH7-related hypertrophic cardiomyopathy before onset of ventricular hypertrophy. *Heart Rhythm* 6: 1366-1369
- Ciro E, Nichols PF, Maron BJ (1983) Heterogeneous morphologic expression of genetically transmitted hypertrophic cardiomyopathy: two-dimensional echocardiographic analysis. *Circulation* 67: 1227-1233
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008
- Donato R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60: 540-551
- Dussoix D, Arber W (1962) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage lambda. *J Mol Biol* 5: 37-49
- Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, Lukanidin E (1989) Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca<sup>2+</sup>-binding protein family. *Genes Dev* 3: 1086-1093
- Efthimiadis GK, Pagourelas ED, Hadjimiltiades S, Meditskou S, Karvounis H, McKenna WJ (2014a) Feasibility and Significance of Preclinical Diagnosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Cardiol Rev*
- Efthimiadis GK, Zegkos T, Meditskou S, Hadjimiltiades S (2014b) Perspectives on sudden death prevention in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiol Rev* 22: 210-216
- Efthimiadis GK, Zegkos T, Pagourelas ED, Karvounis H (2014c) Myocardial crypts as a preclinical sign of hypertrophic cardiomyopathy. *Hippokratia* 18: 359-361
- Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A (2008) Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 29: 270-276
- Elliott PM, Anastakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, Hagege AA, Lafont A, Limongelli G, Mahrholdt H, McKenna WJ, Mogensen J, Nihoyannopoulos P, Nistri S, Pieper PG, Pieske B, Rapezzi C, Rutten FH, Tillmanns C, Watkins H (2014) 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 35: 2733-2779
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11: 683-694
- Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Nicholls MG (1995) Natriuretic hormones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 24: 481-509
- Filiatre J (2012) Evaluation of Mybpc3 conventional gene therapy in engineered heart tissues derived from hypertrophic cardiomyopathy mouse model.

- Fraysse B, Weinberger F, Bardswell SC, Cuello F, Vignier N, Geertz B, Starbatty J, Kramer E, Coirault C, Eschenhagen T, Kentish JC, Avkiran M, Carrier L (2012) Increased myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol* 52: 1299-1307
- Gedicke-Hornung C, Behrens-Gawlik V, Reischmann S, Geertz B, Stimpel D, Weinberger F, Schlossarek S, Precigout G, Braren I, Eschenhagen T, Mearini G, Lorain S, Voit T, Dreyfus PA, Garcia L, Carrier L (2013) Rescue of cardiomyopathy through U7snRNA-mediated exon skipping in Mybpc3-targeted knock-in mice. *EMBO Mol Med* 5: 1128-1145
- Geisterfer-Lowrance AA, 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: 999-1006
- Gilbert R, Cohen JA, Pardo S, Basu A, Fischman DA (1999) Identification of the A-band localization domain of myosin binding proteins C and H (MyBP-C, MyBP-H) in skeletal muscle. *J Cell Sci* 112 ( Pt 1): 69-79
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA (1975) Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 11-15
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74
- Green JJ, Berger JS, Kramer CM, Salerno M (2012) Prognostic value of late gadolinium enhancement in clinical outcomes for hypertrophic cardiomyopathy. *JACC Cardiovasc Imaging* 5: 370-377
- Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E (2001) Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 276: 22699-22708
- Groettrup M, Pelzer C, Schmidtke G, Hofmann K (2008) Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci* 33: 230-237
- Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, Toda S, Nishiyama Y, Tomita K, Yamamoto H, Konishi M, Oki T (1992) Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiot (Tokyo)* 45: 1746-1752
- Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwoerer AP, Uebeler J, Eschenhagen T (2010) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 107: 35-44
- Harris KM, Spirito P, Maron MS, Zenovich AG, Formisano F, Lesser JR, Mackey-Bojack S, Manning WJ, Udelson JE, Maron BJ (2006) Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 114: 216-225
- Hedhli N, Depre C (2010) Proteasome inhibitors and cardiac cell growth. *Cardiovasc Res* 85: 321-329
- Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M (2005) The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 92: 1955-1958
- Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61: 761-807

- Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 195-201
- Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, Schaaf S, Bornchen C, Muller C, Schulz H, Hubner N, Stenzig J, Stoehr A, Neuber C, Eder A, Luther PK, Hansen A, Eschenhagen T (2014) Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 74: 151-161
- Hirt MN, Sorensen NA, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A, Vollert I, Stohr A, Schulze T, Witten A, Stoll M, Hansen A, Eschenhagen T (2012) Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107: 307
- Ho CY, Charron P, Richard P, Girolami F, Van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto Y (2015) Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovasc Res* 105: 397-408
- Hou Y, Moreau F, Chadee K (2012) PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NFkappaB/p65. *Nat Commun* 3: 1300
- Hughes SE (2004) The pathology of hypertrophic cardiomyopathy. *Histopathology* 44: 412-427
- Inamoto S, Muraio S, Yokoyama M, Kitazawa S, Maeda S (2000) Isoproterenol-induced myocardial injury resulting in altered S100A4 and S100A11 protein expression in the rat. *Pathol Int* 50: 480-485
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110: 341-350
- Jarvik JW, Telmer CA (1998) Epitope tagging. *Annu Rev Genet* 32: 601-618
- Jensen FC, Girardi AJ, Gilden RV, Koprowski H (1964) Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52: 53-59
- Kelly M, Semsarian C (2009) Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: a marker of disease severity? *Circ Cardiovasc Genet* 2: 182-190
- Kocovski L, Fernandes J (2015) Sudden cardiac death: a modern pathology approach to hypertrophic cardiomyopathy. *Arch Pathol Lab Med* 139: 413-416
- Komander D, Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81: 203-229
- Kozak M (1984) Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature* 308: 241-246
- Lainchbury JG, Espiner EA, Frampton CM, Richards AM, Yandle TG, Nicholls MG (1997) Cardiac natriuretic peptides as predictors of mortality. *J Intern Med* 241: 257-259
- Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16
- Liu Y, Tang W, Wang J, Xie L, Li T, He Y, Qin X, Li S (2013) Clinicopathological and prognostic significance of S100A4 overexpression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Diagn Pathol* 8: 181
- Maron BJ, Carney KP, Lever HM, Lewis JF, Barac I, Casey SA, Sherrid MV (2003) Relationship of race to sudden cardiac death in competitive athletes with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 41: 974-980

Maron BJ, Doerer JJ, Haas TS, Tierney DM, Mueller FO (2009) Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980-2006. *Circulation* 119: 1085-1092

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE (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: 785-789

Maron BJ, Maron MS (2013) Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 381: 242-255

Maron BJ, Maron MS, Semsarian C (2012) Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol* 60: 705-715

Maron BJ, Ommen SR, Semsarian C, Spirito P, Olivetto I, Maron MS (2014) Hypertrophic cardiomyopathy: present and future, with translation into contemporary cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 64: 83-99

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

Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC (1986) Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 8: 545-557

Maron BJ, Yeates L, Semsarian C (2011) Clinical challenges of genotype positive (+)-phenotype negative (-) family members in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 107: 604-608

Marston S, Copeland O, Gehmlich K, Schlossarek S, Carrier L (2012) How do MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy? *J Muscle Res Cell Motil* 33: 75-80

Mearini G, Gedicke C, Schlossarek S, Witt CC, Kramer E, Cao P, Gomes MD, Lecker SH, Labeit S, Willis MS, Eschenhagen T, Carrier L (2010) Atrogin-1 and MuRF1 regulate cardiac MyBP-C levels via different mechanisms. *Cardiovasc Res* 85: 357-366

Mearini G, Stimpel D, Geertz B, Weinberger F, Kramer E, Schlossarek S, Mourot-Filiatre J, Stoehr A, Dutsch A, Wijnker PJ, Braren I, Katus HA, Muller OJ, Voit T, Eschenhagen T, Carrier L (2014) Mybpc3 gene therapy for neonatal cardiomyopathy enables long-term disease prevention in mice. *Nat Commun* 5: 5515

Mearini G, Stimpel D, Kramer E, Geertz B, Braren I, Gedicke-Hornung C, Precigout G, Muller OJ, Katus HA, Eschenhagen T, Voit T, Garcia L, Lorain S, Carrier L (2013) Repair of Mybpc3 mRNA by 5'-trans-splicing in a Mouse Model of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2: e102

Mishra SK, Siddique HR, Saleem M (2012) S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev* 31: 163-172

Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 739-744

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273
- Mund T, Lewis MJ, Maslen S, Pelham HR (2014) Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16736-16741
- Olivotto I, Maron MS, Adabag AS, Casey SA, Vargiu D, Link MS, Udelson JE, Cecchi F, Maron BJ (2005) Gender-related differences in the clinical presentation and outcome of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 46: 480-487
- Omerovic J, Santangelo L, Puggioni EM, Marrocco J, Dall'Armi C, Palumbo C, Belleudi F, Di Marcotullio L, Frati L, Torrisi MR, Cesareni G, Gulino A, Alimandi M (2007) The E3 ligase Aip4/Itch ubiquitinates and targets ErbB-4 for degradation. *FASEB J* 21: 2849-2862
- Ostman-Smith I, Wisten A, Nylander E, Bratt EL, Granelli A, Oulhaj A, Ljungstrom E (2010) Electrocardiographic amplitudes: a new risk factor for sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 31: 439-449
- Qi X, Han J, Zhao P, Dong X, Gong S (2016) S100A4 and P53 in myocardial collagen fibers of hypertrophic cardiomyopathy : Expression and clinical significance. *Herz*
- Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bonnemann CG, Jeannet PY, Colomer J, Clarke NF, Cuisset JM, Roper H, De Meirleir L, D'Amico A, Ben Yaou R, Nascimento A, Barois A, Demay L, Bertini E, Ferreiro A, Sewry CA, Romero NB, Ryan M, Muntoni F, Guicheney P, Richard P, Bonne G, Estournet B (2008) De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol* 64: 177-186
- Rahimi N (2012) The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 11: 538-548
- Ranek MJ, Zheng H, Huang W, Kumarapeli AR, Li J, Liu J, Wang X (2015) Genetically induced moderate inhibition of 20S proteasomes in cardiomyocytes facilitates heart failure in mice during systolic overload. *J Mol Cell Cardiol* 85: 273-281
- Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burbanc M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M (2003) Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations and implications for molecular diagnosis strategy. *Circulation* 107: 2227-2232
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P (1996) Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-842
- Rohde D, Ritterhoff J, Voelkers M, Katus HA, Parker TG, Most P (2010) S100A1: a multifaceted therapeutic target in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* 3: 525-537
- Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R (2000) Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res* 60: 1595-1603
- Sado DM, White SK, Piechnik SK, Banyersad SM, Treibel T, Captur G, Fontana M, Maestrini V, Flett AS, Robson MD, Lachmann RH, Murphy E, Mehta A, Hughes D, Neubauer S, Elliott PM, Moon JC (2013) Identification and assessment of Anderson-Fabry disease by cardiovascular magnetic resonance noncontrast myocardial T1 mapping. *Circ Cardiovasc Imaging* 6: 392-398

- Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg KS, Eschenhagen T, Zolk O (2005) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res* 66: 33-44
- Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25: 638-643
- Schlossarek S, Carrier L (2011) The ubiquitin-proteasome system in cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 26: 190-195
- Schlossarek S, Englmann DR, Sultan KR, Sauer M, Eschenhagen T, Carrier L (2012a) Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 107: 1-13
- Schlossarek S, Englmann DR, Sultan KR, Sauer M, Eschenhagen T, Carrier L (2012b) Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 107: 235
- Schlossarek S, Schuermann F, Geertz B, Mearini G, Eschenhagen T, Carrier L (2012c) Adrenergic stress reveals septal hypertrophy and proteasome impairment in heterozygous Mybpc3-targeted knock-in mice. *J Muscle Res Cell Motil* 33: 5-15
- Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP (2008) S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med (Berl)* 86: 507-522
- Schneider M, Kostin S, Strom CC, Aplin M, Lyngbaek S, Theilade J, Grigorian M, Andersen CB, Lukanidin E, Lerche Hansen J, Sheikh SP (2007) S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 75: 40-50
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404: 770-774
- Schwalm A (2015) Charakterisierung von mit Hypertropher Kardiomyopathie-assoziierten FHL2-Varianten.
- Seidman CE, Seidman JG (2011) Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circ Res* 108: 743-750
- Shirani J, Pick R, Roberts WC, Maron BJ (2000) Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 35: 36-44
- Spaich S, Will RD, Just S, Spaich S, Kuhn C, Frank D, Berger IM, Wiemann S, Korn B, Koegl M, Backs J, Katus HA, Rottbauer W, Frey N (2012) F-box and leucine-rich repeat protein 22 is a cardiac-enriched F-box protein that regulates sarcomeric protein turnover and is essential for maintenance of contractile function in vivo. *Circ Res* 111: 1504-1516
- Spirito P, Bellone P, Harris KM, Bernabo P, Bruzzi P, Maron BJ (2000) Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 342: 1778-1785
- Syed IS, Glockner JF, Feng D, Araoz PA, Martinez MW, Edwards WD, Gertz MA, Dispenzieri A, Oh JK, Bellavia D, Tajik AJ, Grogan M (2010) Role of cardiac magnetic resonance imaging in the detection of cardiac amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging* 3: 155-164

Tamaki Y, Iwanaga Y, Niizuma S, Kawashima T, Kato T, Inuzuka Y, Horie T, Morooka H, Takase T, Akahashi Y, Kobuke K, Ono K, Shioi T, Sheikh SP, Ambartsumian N, Lukanidin E, Koshimizu TA, Miyazaki S, Kimura T (2013) Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 57: 72-81

Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, Alcalai R, Wang L, Wakimoto H, Nayor M, Konno T, Gorham JM, Wolf CM, Kim JB, Schmitt JP, Molkentin JD, Norris RA, Tager AM, Hoffman SR, Markwald RR, Seidman CE, Seidman JG (2010) Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *J Clin Invest* 120: 3520-3529

Thottakara T, Friedrich FW, Reischmann S, Braumann S, Schlossarek S, Kramer E, Jühr D, Schluter H, van der Velden J, Munch J, Patten M, Eschenhagen T, Moog-Lutz C, Carrier L (2015) The E3 ubiquitin ligase Asb2beta is downregulated in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy and targets desmin for proteasomal degradation. *J Mol Cell Cardiol* 87: 214-224

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19: 94-102

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354

Valente AM, Lakdawala NK, Powell AJ, Evans SP, Cirino AL, Orav EJ, MacRae CA, Colan SD, Ho CY (2013) Comparison of echocardiographic and cardiac magnetic resonance imaging in hypertrophic cardiomyopathy sarcomere mutation carriers without left ventricular hypertrophy. *Circ Cardiovasc Genet* 6: 230-237

van Dijk SJ, Dooijes D, Dos Remedios C, Michels M, Lamers JM, Winegrad S, Schlossarek S, Carrier L, Ten Cate FJ, Stienen GJ, van der Velden J (2009) Cardiac Myosin-Binding Protein C Mutations and Hypertrophic Cardiomyopathy. Haploinsufficiency, Deranged Phosphorylation, and Cardiomyocyte Dysfunction. *Circulation* 119: 1473-1483

van Rijsingen IA, Bekkers SC, Schalla S, Hermans-van Ast JF, Snoep G, Alzand BS, Arens YH, van den Wijngaard A, Crijns HJ, Pinto YM (2011) Exercise related ventricular arrhythmias are related to cardiac fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers. *Neth Heart J* 19: 168-174

Varshavsky A (2006) The early history of the ubiquitin field. *Protein Sci* 15: 647-654

Vignier N, Schlossarek S, Fraysse B, Mearini G, Kramer E, Pointu H, Mougnot N, Guiard J, Reimer R, Hohenberg H, Schwartz K, Vernet M, Eschenhagen T, Carrier L (2009) Nonsense-Mediated mRNA Decay and Ubiquitin-Proteasome System Regulate Cardiac Myosin-Binding Protein C Mutant Levels in Cardiomyopathic Mice. *Circ Res* 105: 239-248

Vu Manh TP, Mokrane M, Georgenthum E, Flavigny J, Carrier L, Semeriva M, Piovant M, Roder L (2005) Expression of cardiac myosin-binding protein-C (cMyBP-C) in *Drosophila* as a model for the study of human cardiomyopathies. *Hum Mol Genet* 14: 7-17

Xie R, Schlumbrecht MP, Shipley GL, Xie S, Bassett RL, Jr., Broaddus RR (2009) S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF-beta1 signaling. *Lab Invest* 89: 937-947

Yamasaki R, Berri M, Wu Y, Trombitas K, McNabb M, Kellermayer MS, Witt C, Labeit D, Labeit S, Greaser M, Granzier H (2001) Titin-actin interaction in mouse myocardium: passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1. *Biophys J* 81: 2297-2313



Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13: 952-961

Zhang L, Mmagu O, Liu L, Li D, Fan Y, Baranchuk A, Kowey PR (2014) Hypertrophic cardiomyopathy: Can the noninvasive diagnostic testing identify high risk patients? *World J Cardiol* 6: 764-770

Zimmer DB, Wright Sadosky P, Weber DJ (2003) Molecular mechanisms of S100-target protein interactions. *Microsc Res Tech* 60: 552-559

## 7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAV6	Adeno-assoziiertes Virus 6, („Adeno-Associated Virus 6“)
Abb.	Abbildung
ACTA1	Genname $\alpha$ -skeletales Aktin
AG	Arbeitsgruppe
AMVM	adulte Maus-Ventrikelkardiomyozyten
ANP	atriales Natriuretisches Peptid, („Atrial natriuretic peptide“)
AraC	Arabinofuranosyl Cytidin
ARVC	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
Asb2 $\beta$	$\beta$ -Isoform der E3-Ligase Asb2 („ <i>ankyrin repeat-containing protein with a suppressor of cytokine signaling box 2</i> “)
BL 21	E.coli-Stamm
bp	Basenpaar
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cdNA	komplementäre DNA, („ <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> “)
cMyBP-C	kardiales, „ <i>cardiac</i> “ Myosin-bindendes Protein C-Gen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col1a1, Col3a1	Gennamen von Kollagentypen
CMV	Cytomegalievirus
Cos-7	Zelllinie aus affenartigem Nierengewebe („ <i>CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material</i> “)
Ctgf	<i>connective tissue growth factor</i>
DCM	Dilatative Kardiomyopathie, („ <i>dilated cardiomyopathy</i> “)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid, Trägermedium für Epoxomicin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTT	Dithiothreitol
dsDNA	Doppelstrang-DNA („ <i>double strand DNA</i> “)
E.coli	Escherichia coli
EHT	Künstliches Herzgewebe („ <i>engineered heart tissue</i> “)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
et al.	et alteri
EV	Leervektor („ <i>empty vector</i> “)
Fc-Fragment	Teil des Antikörpers, („ <i>crystalline fragment</i> “)
FCS	fötales Kälberserum, („ <i>fetale bovine serum</i> “)
FN	Fibronectin

Fsp1	Alternative Bezeichnung für S100A4 („ <i>fibroblast specific protein</i> “)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie, („ <i>hypertrophic cardiomyopathy</i> “)
HECT	Bindungsdomäne von E3-Ligasen (Homolog zum E6-AP Carboxyl Terminus)
HEK	Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen („ <i>human embryonic kidney</i> “)
HIS	Histidin
HW/BW	<i>heart weight/body weight</i>
ICD	Implantierbarer Kardioverter/Defibrillator
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
KI	<i>knock-in</i>
KO	<i>knock-out</i>
L	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LV	linker Ventrikel
LVOT	<i>left ventricular outflow tract</i> (Linksventrikulärer Ausflusstrakt)
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Mmol/Liter
mmol	Millimol
μN	Mikronewton
MOI	Anzahl der Viruspartikel pro Zelle, („ <i>Multiplicity of infection</i> “)
MP	Milchpulver
mRNA	Boten-RNA, („ <i>Messenger RNA</i> “)
MRT	Magnetresonanztomografie
Mut	Mutant
μl	Mikroliter
<i>MyBPC3</i>	Myosin-bindendes Protein C-Gen
<i>MYH7</i>	β-Myosin-schwere-Kette-Gen
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NMCM	Neonatale Maus-Kardiomyozyten („ <i>neonatal mouse cardiac myocytes</i> “)
NPPA	Genname ANP
NPPB	Genname BNP
NRCM	Neonatale Ratten-Kardiomyozyten („ <i>neonatal rat cardiac myocytes</i> “)

NT	Nicht-transfiziert/ Nicht-transduziert
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
o.g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PBS	Proteinbiosynthese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion, („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RING	Bindungsdomäne von E3-Ligasen („ <i>really interesting new gene</i> “)
RNA	Ribonukleinsäure, („ <i>ribonucleic acid</i> “)
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SCD	Plötzlicher Herztod („ <i>sudden cardiac death</i> “)
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat, („ <i>sodium dodecyle sulfate</i> “)
sek	Sekunde
S.O.C.	<i>super optimal broth (SOB) with catabolite repression</i>
TAE	Puffer-Mix aus Tris Base, Essigsäure und EDTA
TAC	<i>Transverse aortic constriction</i>
TASH	Transkoronare Ablation der Septumhypertrophie
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline</i> + Tween 20
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TOP 10-Zellen	E.coli-Stamm
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV-Licht	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

## 8. Verwendete Lösungen und Materialien

Acrylamid 40%, Bio-Rad  
Agarose, Invitrogen  
Alkalische Phosphatase, Fermentas  
Ampicillin, SERVA *Electrophoresis* GmbH  
Ammoniumpersulfat, APS, Bio-Rad  
Anti-Flag-Polyklonaler Antikörper, Sigma Aldrich  
Anti-GAPDH-Polyklonaler Antikörper, HyTest  
Anti-GFP-Polyklonaler Antikörper, Abcam  
Anti-Kaninchen-Antikörper, Sigma  
Anti-Maus-Antikörper, Sigma  
Anti-S100A4-Polyklonaler Antikörper, Abcam  
Anti-S100A4-Polyklonaler Antikörper, *custom made* Eurogentec  
Anti-Total ERK-Polyklonaler Antikörper, Cell Signaling  
Anti-V5-Polyklonaler Antikörper, Invitrogen  
Aqua ad iniectabilia, Baxter  
Bromphenolblau, Merck  
BSA, Sigma Aldrich  
Gene Ruler 100 bp Plus, 1 kb, Fermentas  
DMEM, Invitrogen  
dNTP-Mix, PCR-Reagenzien, Fermentas  
DTT, Sigma Aldrich  
ECL-Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare  
Epoxomicin, CalBiochem  
Ethanol, J.T. Baker  
Ethidiumbromid, Fluka Biochemica  
Fast Digest Enzyme, Fermentas  
Fibrinogen, Sigma  
Fötale Kälberserum FCS, Invitrogen  
Gel Extraction Kit, Qiagen  
Glukose, Roth Chemie GmbH  
Glycerin, Merck KgaA  
HBSS, Invitrogen  
Hefeextrakt, Becton  
Hepes, Sigma  
Horse Serum, hitze-inaktiviert, Invitrogen  
Isotonische 0.9% Natriumchlorid-Lösung  
Laminin, Roche  
6x *loading dye* (Ladepuffer), Fermentas  
Maxiprep Kit, Macherey Nagel  
Methanol, J.T. Baker  
Milchpulver, Roth  
Miniprep Kit, Macherey Nagel  
MgSO<sub>4</sub>: Merck KgaA  
MnCl<sub>2</sub>: Merck KgaA  
Natriumlaurylsulfat, Sigma  
NucleoBond Xtra Plasmid Purification Kit, Marcherey-Nagel

NucleoSpin Plasmid-Kit, Macherey Nagel  
Oligonukleotide (Primer), Invitrogen  
Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase, Agilent Technologies  
Phusion Hot Start II DNA Polymerase, Biozym Scientific  
Ponceau, Serva  
Precision Plus Protein Standard, Biorad  
QIAquick Gel Extraction-Kit, Qiagen  
*Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit*, Stratagene  
*Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit XL*, Stratagene  
pEF5/FRT/V5 Directional Expression Kit, Invitrogen  
Penicillin, Invitrogen  
Pepton, Becton  
Phenylephrin, Sigma  
PBS, Invitrogen  
Ponceau S 0,1%, Sigma  
Precision Blue Protein Standard, Biorad  
PrimeStar Polymerase, Mobitec  
Penicillin/Streptomycin, Invitrogen  
SOC Medium, Invitrogen  
T4 Ligase, Fermentas  
TEMED, Biorad  
Tris Base, Sigma  
Tris-HCl, Sigma  
TOPO-Cloning PEF5/FRT/V5, Invitrogen  
Trypsin, Invitrogen  
Trypton, Becton  
Tween 20, Sigma  
West Dura Detection Kit, Thermo Fisher Scientific  
Xyloncyanol, Sigma

## 9. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die in irgendeiner Weise zur erfolgreichen Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen haben.

Prof. Thomas Eschenhagen danke ich für die Möglichkeit, im Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie arbeiten zu dürfen. Prof. Lucie Carrier danke ich für das Überlassen des Themas. Das professionelle und konstruktive Klima innerhalb Deiner Arbeitsgruppe bei zugleich stets angenehmem Umgangston hat den Laboralltag sehr erleichtert.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Felix Friedrich. Dein schier grenzenloser Optimismus sowohl in Bezug auf diese Arbeit als auch in Bezug auf den HSV war unglaublich inspirierend. Möge die Uhr niemals ausgehen!

Außerdem möchte ich Silke Reischmann und Elisabeth Krämer danken. Eure Geduld bei meiner Einarbeitung war endlos, Eure Hilfe bei der Durchführung der Experimente unentbehrlich. Weiterhin gilt mein Dank: Dr. rer. nat. Giulia Mearini, Dr. rer. nat. Sonja Singh, Dr. rer. nat. Saskia Schlossarek und Dr. rer. nat. Frederik Flenner aus der AG Carrier für all die geduldigen Antworten. Aber auch allen anderen Mitarbeitern des gesamten Instituts für ihre immense Hilfsbereitschaft und die stets offenen Türen.

Meiner gesamten Familie und besonders meiner Eltern möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Studiendauer derart auszudehnen. Euer Glaube an mich und die stete uneingeschränkte Unterstützung haben mich zu dem Menschen werden lassen, der ich jetzt bin.

Zu guter Letzt danke ich Marie. Aufzuzählen wofür, lässt sich unmöglich in Worte fassen. Ohne diese Arbeit gäbe es uns vermutlich nicht, ohne Dich sicher keine Arbeit.

## **10. Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen entfernt



## **11. Eidesstattliche Versicherung**

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.

Hamburg, den 08.12.2016

Simon Braumann