

Analyse der Funktion des Miz1-Gens bei

Kardiomyopathie

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

an der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Josée Nadine Vouffo Nguimeya

aus Douala (Kamerun)

Göttingen 2011

Referent:Professor Dr. Ernst WimmerKorreferent:Professor Dr. Dr. Wolfgang EngelTag der mündlichen Prüfung:08.02.2012

Was wir wissen, ist ein Tropfen. Was wir nicht wissen, ist ein Ozean.

(Isaac Newton)

1	Einl	eitung1
	1.1	Definition und Pathophysiologie von Kardiomyopathie1
	1.2	Kandidatengene für dilatative und hypertrophe Kardiomyopathie 2
	1.3	Rolle der sarkomerischen Z-Scheibe bei Kardiomyopathien 4
	1.4	Molekulare Merkmale von Kardiomyopathien7
	1.4.	1 Hypertrophie des Myokards7
	1.4.	2 Myokard-Apoptose 9
	1.5	Miz1-Gen 10
	1.6	Ziel der vorliegenden Arbeit 13
2	Mat	erial15
	2.1	Verbrauchsmaterialien15
	2.2	Geräte 16
	2.3	Chemikalien16
	2.4	Enzyme 19
	2.5	Lösungen, Puffer und Medien 20
	2.6	Gebrauchsfertige Kits
	2.7	Verwendete Plasmide
	2.8	Verwendete Oligonukleotide
	2.9	Antikörper 27
	2.9.	1 Primäre Antikörper 27
	2.9.	2 Sekundäre Antikörper 28
	2.10	Molekulargewichtsstandards
	2.11	Biologische Materialien 29
	2.12	Tierhaltung
	2.13	Patientenmaterial
3	Met	hoden
	3.1	Mausmodelle
	3.1.	1 Generierung der konditionalen Miz1-Knockout-Mäuse

	3.1.2	Generierung der herzspezifischen Miz1 transgenen Mäuse	32
	3.1.3	Genotypisierung der Mäuse	33
	3.1.4	Experimentelles Mausmodell der Herzhypertrophie	33
	3.1.5	Echokardiografische Analysen	34
3	.2 Zelll	biologische Methoden	35
	3.2.1	Handhabung und Stammhaltung von Bakterien	35
	3.2.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen	37
	3.2.3	Isolierung und Kultivierung primärer Zellen	40
3	.3 Mol	lekularbiologische Methoden	45
	3.3.1	Nukleinsäure Präparationen	45
	3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
	3.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
	3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	49
	3.3.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	50
	3.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	50
	3.3.7	5´-Dephosphorylierung von Vektoren	50
	3.3.8	DNA-Sequenzanalyse	51
	3.3.9	Southern Blot-Analyse	51
	3.3.10	cDNA-Synthese	52
	3.3.11	Real Time-PCR	53
3	.4 Prot	tein-analytische Methoden	54
	3.4.1	Protein-Isolierung aus eukaryotischen Zellen	54
	3.4.2	Protein-Isolierung aus Gewebe	54
	3.4.3	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	54
	3.4.4	Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
Т	abelle 16:	Pipettierschema von Sammel und Trenngelen für SDS-PAGE	55
	3.4.5	Western Blot	56
	3.4.6	Detektion von membran-gebundenem Protein	57

	3.4.	.7	Koimmunpräzipitation	58
	3.5	Son	stige Methoden	59
	3.5.	.1	Bioinformatische Analyse und Werkzeuge	59
	3.5.	.2	Statistische Auswertungen von Daten	59
4	Erg	ebnis	se6	50
	4.1	Mut	tationen der Miz1 kodierenden Sequenz bei Patienten mit dilatativ	er
	Kardio	omyo	pathie6	50
	4.2	In V	<i>itro</i> -Analyse der Miz1-Funktion6	52
	4.2.	.1	Calcineurin Luciferase-Assay in JEG-3-Zellen	52
	4.3	Koir	nmunopräzipitation von Miz1 und seinen potenziellen Bindungspartnern	54
	4.4	Sub	zelluläre Lokalisation von endogenem Miz1 in adulten Maus-Kardiomyozyten 6	55
	4.5	Unt	ersuchung der Miz1-Funktion in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten6	56
	4.5.	.1	Die Überexpression von Miz1 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führt zu	ur
	Akt	ivieru	ng von NFATc26	56
	4.5.	.2	Zelluläre Hypertrophie durch Miz1-Überexpression in neonatalen Ratte	n-
	Kar	diom	yozyten e	58
	4.5.	.3	Verhinderung Staurosporin induzierter Apoptose durch Miz1-Überexpression	in
	neo	onatal	en Ratten-Kardiomyozyten	70
	4.6 Herzh	Unt vnert	ersuchung der Miz1-Expression im experimenellen Mausmodell de	er 72
	/ 7	Unt	ersuchung der Miz1-Expression in verschiedenen Organen und während d	or
	Embry	/onale	entwicklung	74
	4.7.	.1	Miz1-Expression in embryonalen Entwicklungsstadien der Maus und in adulte	en
	Ma	usorg	anen	74
	4.7.	.2	Miz1 mRNA-Expression während der Herzentwicklung der Ratte	75
	4.8	Unt	ersuchung von Miz1 im Mausmodell	76
	4.8.	.1	Konditionaler Knockout von Miz1	76
	4.8.	.2	Herzspezifische Überexpression von Miz1 im Mausmodell	34
5	Disl	kussic	on	€1
	5.1	Zusa	ammenfassung der Ergebnisse	€1

	5.2	Miz1-Gen und die Entstehung von Kardiomyopathien	93		
	5.3	Miz1 in seiner Funktion als sarkomerisches Z-Scheiben-Protein	94		
	5.4	Funktion der Miz1-Überexpression in isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	95		
	5.5	Miz1-Funktion <i>in vivo</i>	97		
	5.6	Perspektiven	. 98		
6	Zusa	ammenfassung	100		
7	Lite	raturverzeichnis	102		
Da	Danksagung				

Abkürzungsverzeichnis

А	Ampere
АТР	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
gDNA	genomische DNA
СуЗ	Cyanin-3
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukle ot idtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigungskonstante
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanos intriphosphat
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
L	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	mikro = 10 ⁻⁶
m	milli = 10 ⁻³
Μ	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
Mio	Million

mRNA	messenger RNA = Boten-RNA
n	nano = 10 ⁻⁹
OD	Optische Dichte
р	$pico = 10^{-12}$
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
рН	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tah	Tabollo
100.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
Taq Tris	Thermus aquaticus Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Taq Tris U	Thermus aquaticus Tris-hydroxymethyl-aminomethan Unit = definierte Enzymeinheit
Taq Tris U U/min	Thermus aquaticus Tris-hydroxymethyl-aminomethan Unit = definierte Enzymeinheit Umdrehung pro Minute
Taq Tris U U/min ü. N.	Thermus aquaticus Tris-hydroxymethyl-aminomethan Unit = definierte Enzymeinheit Umdrehung pro Minute über Nacht
Taq Tris U U/min ü. N. UV	Thermus aquaticus Tris-hydroxymethyl-aminomethan Unit = definierte Enzymeinheit Umdrehung pro Minute über Nacht ultraviolettes Licht
Taq Tris U U/min ü. N. UV V	Thermus aquaticus Tris-hydroxymethyl-aminomethan Unit = definierte Enzymeinheit Umdrehung pro Minute über Nacht ultraviolettes Licht Volt
Taq Tris U U/min ü. N. UV V V	Thermus aquaticus Tris-hydroxymethyl-aminomethan Unit = definierte Enzymeinheit Umdrehung pro Minute über Nacht ultraviolettes Licht Volt Volumen pro Volumen
Taq Tris U U/min ü. N. UV V V V Vol	Thermus aquaticus Tris-hydroxymethyl-aminomethan Unit = definierte Enzymeinheit Umdrehung pro Minute über Nacht ultraviolettes Licht Volt Volumen pro Volumen Volumen

1 Einleitung

1.1 Definition und Pathophysiologie von Kardiomyopathie

Die weitaus häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Im Jahr 2002 entstanden in Deutschland durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen Kosten von 35 Milliarden Euro, was einem Sechstel der gesamten Krankheitskosten entspricht (statistisches Bundesamt, 2004). Eine wesentliche Ursache für Herzinsuffizienz im jüngeren Alter stellen Kardiomyopathien dar (Hayashi *et al.*, 2004).

Von Herzinsuffizienz spricht man dann, wenn das Herz keinen adäquaten Blutfluss gewährleisten kann, um den Organismus zu versorgen. Als Kardiomyopathien bezeichnet man isoliert auftretende Erkrankungen des Herzmuskels, die oftmals zu einer Herzinsuffizienz (Herzschwäche) und zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen führen. Man unterscheidet primäre Kardiomyopathien mit meist unklarer Genese von sekundären Kardiomyopathien, die durch Entzündungen oder Intoxikationen bzw. infolge anderer Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Bluthochdruck oder Herzinfarkt entstehen (*American Heart Association* (AHA), 2006).

Unter der Schirmherrschaft der WHO (*World Health Organisation*) wurde eine Einteilung der Kardiomyopathien verfasst, welche die Kardiomyopathien gemäß wichtiger klinischer Charakteristika unterscheidet.

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) geht mit einer extremen Verdickung der Herzwand einher, ohne dass dies jedoch mit einer Erhöhung der Kontraktionskraft verbunden ist (Seidman und Seidman, 2001). Die Wandverdickung führt zusätzlich zu einer Herabsetzung der Durchblutung, sodass der Herzmuskel an ständigem Sauerstoffmangel leidet. Molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass dabei insbesondere die Struktur und Funktion des kontraktilen Apparates im Herzmuskel aufgrund Mutationen verändert sind. Man geht heute davon aus, dass die der hypertrophen Kardiomyopathie zugrundeliegenden Mutationen zu einem erheblichen Anteil (bis zu 50 %) vererbt werden (Marian und Roberts, 1995).

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist gekennzeichnet durch massiv erweiterte Herzkammern bei zunehmender Verringerung der Pumpleistung trotz ungestörter Herzdurchblutung ist (Seidman und Seidman, 2001). Diese Erkrankung hat eine sehr ungünstige Prognose, die derjenigen vieler Tumorerkrankungen entspricht. Häufig kommt es zu Rhythmusstörungen, Ödembildungen oder zu Thromboembolien (Maron *et al.*, 2006). Auch die dilatative Kardiomyopathie weist in 20-40 % aller Fälle einen familiären Hintergrund auf, sodass eine genetische Ursache in diesen Fällen anzunehmen ist. Es wurden bereits zahlreiche krankheitsrelevante Gene identifiziert, die letztlich für strukturelle Veränderungen im Aufbau der Herzmuskelzelle verantwortlich sind.

Dilatative und hypertrophe Kardiomyopathien sind die weitaus häufigsten Formen der Herzmuskelerkrankungen (Ahmad *et al.*, 2005; Maron *et al.*, 2006). Wesentlich seltener kommt die restriktive Kardiomyopathie vor, die durch eine Störung der elastischen Eigenschaften des Herzmuskels, insbesondere bei der diastolischen Füllung des Herzens, gekennzeichnet ist (Mandinov *et al.*, 2000). Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie tritt ebenfalls vergleichsweise selten auf. Hier kommt es zu einer bindegewebig-fettigen Degeneration des Herzmuskels (Yamamoto *et al.*, 2000). Auf der Basis entstehender Rhythmusstörungen besteht die Gefahr des plötzlichen Herztodes. Die Krankheit wird offenbar bei den meisten Patienten vererbt. Betrofene Gene sind zum Beispiel *Desmoplakin* und *Plakophilin*.



Abbildung 1: Die Kardiomyopathien HCM und DCM nach Seidman und Seidman 2001. A. Normales Herz. B. Herz einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) mit Muskelverdickung und Versteifung. Die linke Herzkammer ist deutlich verkleinert C. Herz einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) mit Herzerweiterung (verdünnte Herzwand) und Pumpschwäche.

1.2 Kandidatengene für dilatative und hypertrophe Kardiomyopathie

Kandidatengene für HCM und DCM sind Gene, welche Proteine kodieren, die im Herzen eine wichtige Funktion ausüben. Hierzu zählen die Proteine des Sarkomers und des Zytoskeletts (Watkins *et al.*, 2003).

Die Herzmuskelzelle ist für die Kraftentwicklung und deren Weiterleitung an die extrazelluläre Matrix zuständig. Ein Defizit in einem der Bestandteile dieses Prozesses führt zu kardialem Remodeling (Hypertrophie oder Dilatation) und im Weiteren zur Herzinsuffizienz. Da diese Prozesse für die normale Herzfunktion wichtig sind, ist es naheliegend, dass auch besonders viele Mutationen in Genen gefunden wurden, die für Proteine kodieren, die in die myokardiale Kraftentwicklung und seine intrazelluläre Weiterleitung involviert sind.

Ursache für eine autosomal dominante hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) können Mutationen in 19 Genen sein, die in erster Linie für sarkomere Proteine kodieren (Tabelle 1) (Thierfelder *et al.*, 1994; Richard *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2008): β-*Myosin heavy chain* (MYH7), *Myosin essential light chain* (MYL3), *Myosin regulatory light chain* (MYL2), *CardiacTroponin T* (TNNT2), *Troponin I* (TNNI3), *Troponin C* (TNNC1), α-*Tropomyosin* (TPM1), α-*Cardiac Actin* (ACTC), *Cardiac Myosin binding protein C* (MYBPC3), *Titin* (TTN) und *MLP* (CSRP3).

Die autosomal dominant vererbte dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist nach dem heutigen Erkenntnisstand durch Mutationen in über 20 verschiedenen Genen und chromosomalen Erkrankungsloci verursacht (Maron *et al.*, 2006). Krankheitsassoziierte Gene kodieren unter anderem für kontraktile, zytoskelettale und Kalzium regulierende Proteine (Ahmad *et al.*, 2008). Mutationen in MYH7 treten trotz der großen genetischen Heterogenität bei idiopathischer DCM am häufigsten auf und gelten in 10 % der Fälle als krankheitsverursachend (Villard *et al.*, 2005).

Demnach liegen dem kardialen Remodeling bei HCM und DCM zu einem wesentlichen Anteil Mutationen in einzelnen Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, zugrunde. Nicht nur die genannten Mutationen, sondern auch die exprimierten Isoformen sarkomerer Protein, insbesondere die Re-Expression des fetalen Genprogrammes können die funktionellen Eigenschaften des Myokards verändern.

Protein	Gen-	Lokus	Häufigkeit	Kardiomyopathie
	Symbol		%	
ß-Myosin-Schwerkette	MHY7	14q11.2	25-50	HCM/DCM
Myosinbindungsprotein C3	MYBP-C	11p11.2	40	НСМ
Troponin T	TNNT2	1q32	3-20	HCM/DCM
Troponin I	TNNI3	19p13.4	5	HCM/DCM
Troponin C	TNNC1	3p21.1	selten	НСМ
α-Tropomyosin	TPM1	15q22.1	0,5-5	HCM/DCM
Regulatorische Myosin-	MYL2	12q23-q24.3	2,5-5	HCM/DCM
Leichtkette				
Essentielle Myosin-	MYL3	3p21.2-p21.3	0,5	HCM/DCM
Leichtkette				

•	Tabelle 1: Proteine mit HCM und DCM-verursachenden Mutatione	n. Auswahl	nach (Richa	rd <i>et al</i> .	, 2003),
	(Maron <i>et al.,</i> 2006) und (Ahmad <i>et al.,</i> 2008)				

Protein	Gen-	Lokus	Häufigkeit	Kardiomyopathie
	Symbol		%	
ß-Myosin-Schwerkette	MHY7	14q11.2	25-50	HCM/DCM
Aktin	ACTC	15q14	selten	HCM/DCM
Titin	TTN	2q24.3	selten	HCM/DCM
α-Myosin-Schwerkette	MYH6	14q11.2-q12	selten	НСМ
Caveolin-3	CAV3	3p26.1	selten	НСМ
Muskel-LIM-Protein	MLP	11p15.1	selten	HCM/DCM
Telethonin	ТСАР	17q12q21.1	selten	НСМ
AMP-aktivierende	PRKAG2	7q36.1	?	HCM/DCM
Proteinkinase				
Myosinleichtketten-Kinase 2	MYLCK	20q13.3	?	НСМ
Lysosom-assoziiertes	LAMP2	Xq24	?	HCM/DCM
Membranprotein				
Mitochondriale DNA	MTTI	?	?	НСМ
Vinculin	VCL	10q22.2	selten	НСМ
α-Actinin2	ACTN2	1q42-q43	selten	НСМ
Phospholamban	PLN	6q22.1	selten	НСМ
Myozenin2	MYOZ2	10q22.1	Selten	НСМ
Junctophilin	JPH2	20q13.12	selten	нсм

1.3 Rolle der sarkomerischen Z-Scheibe bei Kardiomyopathien

Als Z-Scheibe bezeichnet man die Schnittstelle zwischen Sarkomer und Zytoskelett. Diese vernetzt damit nicht nur die aus Aktin und Myosin bestehenden Sarkomereinheiten longitudinal, sondern gewährleistet durch intermediäre Filamentproteine wie Desmin auch eine laterale Aufhängung an der Zellmembran. Dass die Z-Scheibe auch eine wichtige Rolle in der Entstehung von Herzmuskelerkrankungen spielt, kann aus den Befunden von Frank *et al.*, 2006, 2007abgeleitet werden:

Mutationen vieler Z-Scheiben assoziierter Proteine wie Desmin, MLP, Telethonin/T-Cap und Cypher/ZASP können beim Menschen Kardiomyopathien auslösen.

- Die DCM auslösenden Mutationen in Titin und Aktin (welche selbst nicht nur an der Z-Scheibe lokalisiert sind) betreffen häufig Epitope dieser Moleküle, die ihrerseits mit anderen Komponenten der Z-Scheiben interagieren.
- Durch einen experimentellen Knockout von Z-Scheiben Proteinen, wie z. B. von ALP (Actinin-associated LIM protein) kann eine Kardiomyopathie im Mausmodell erzeugt werden.

Jüngste Befunde deuten zudem darauf hin, dass die sarkomerische Z-Scheibe über eine rein mechanische Funktion hinaus auch eine Schlüsselrolle in der myokardialen Signaltransduktion spielen könnte. So wurde gezeigt, dass verschiedene Isoformen der in der Pathogenese der Myokardhypertrophie bedeutsamen Proteinkinase C via Bindung an das Z-Scheiben Molekül Cypher/ZASP im Sarkomer lokalisiert sind (Frank et al., 2007). Brancaccio et al. konnten 2003 mit Melusin ein neues muskelspezifisch exprimiertes Sarkomerprotein identifizieren, welches direkt mit Integrin-B1 interagiert. Genetisch modifizierte Mäuse, denen das Melusin-Gen fehlt, entwickeln sich normal und zeigen zunächst keinen offensichtlichen Phänotyp. Werden diese Tiere jedoch durch eine chronische Nachlasterhöhung (Konstriktion der Aorta, TAC) einem hämodynamischen Stress ausgesetzt, entwickelt sich eine dilatative Kardiomyopathie mit kontraktiler Dysfunktion. Das Fehlen von Melusin scheint somit die Adaption des Herzen an biomechanischen Stress zu inhibieren, was auf die Existenz eines Z-Scheiben assoziierten Mechanorezeptors hindeutet. Diese Hypothese wird auch durch andere Arbeiten unterstützt: DCM assoziierte Mutationen im MLP- bzw. Telethonin/T-Cap-Gen inhibieren die Bindung des MLP/T-Cap-Proteinkomplexes an die Z-Scheibe. Interessanterweise können MLP defiziente Kardiomyozyten der Maus auf einen Dehnungsreiz nicht mehr mit einer vermehrten Expression von BNP reagieren (Knöll et al., 2002). Diese Befunde implizieren, dass ein bisher unbekannter kardialer Dehnungsrezeptor in der Z-Scheibe lokalisiert ist, welcher wahrscheinlich aus einem multimeren Proteinkomplex besteht.



Abbildung 2: Signalwege der Moleküle in der kardialen Z-Scheibe nach Frank und Frey 2011. Schematische Darstellung einer kardialen Z-Scheibe und der angrenzenden Strukturen, die an der Signalübertragung beteiligt sind, einschließlich sarkolemmalen und Kernstrukturen. Abkürzungen: AT1R: Angiotensin-II-Typ 1-Rezeptor, ENH: Enigma-like-Homolog, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, ILK: Integrin-linked kinase, Lmcd1: LIM und Cyctein-reiche Domänen 1, MLP: Muskel LIM Protein, MURF: Muskel-Ring-Finger-, NFAT: nuclear faktor von aktivierten T-Zellen, PKC: Proteinkinase C, SR: sarkoplasmatisches Retikulum, T-cap: Telethonin Kappe.

1.4 Molekulare Merkmale von Kardiomyopathien

Ebenso variabel wie die Auslöser einer Herzinsuffizienz sind auch die molekularen Veränderungen, die zu einer Myokard-Dysfunktion führen können. Kardiomyozyten sind terminal differenzierte Zellen, die die Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben. Als zwei wichtige Mechanismen der Myokard-Dysfunktion können die Hypertrophie und die Apoptose genannt werden.

1.4.1 Hypertrophie des Myokards

Die kompensatorische Zunahme der Myokardmasse bei Herzinsuffizienz ist auf eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zurückzuführen, die Vergrößerung der Zellen geht mit einer Steigerung der RNA- und Proteinsynthese einher (Sudgen und Clerk, 1998; Yamazaki *et al.*, 1998). Zudem kommt es zu einer qualitativen Veränderung der Genexpression, welche durch eine charakteristische Steigerung der Expression von Genen, die während der Embryonalentwicklung im Herzen exprimiert werden, gekennzeichnet ist. Die Sekretion der Peptid-Hormone *brain natriuretic peptide* (BNP) und des *atrial natriuretic factor* (ANF) stellen diagnostisch verwendete Marker der Herzinsuffizienz dar (Dao *et al.*, 2001). Der MAPK- und der Calcineurin-NFAT-Signalweg verkörpern die wichtigsten Mechanismen der Hypertrophie-Induktion, wobei sich die beiden Signalwege gegenseitig beeinflussen (Molkentin *et al.*, 2000).

1.4.1.1 MAPKs-Signalwege

MAPKs (mitogen-aktivated protein kinase) Signalwege stellen eine wichtige Verbindung zwischen den externen Stimuli und dem Zellkern über die Phosphorylierung und Regulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren dar. MAPKs können in drei Subfamilien eingeteilt werden: ERK (extracellular-signalregulated kinase), JNKs (Jun N-Terminal kinases) und p38 MAPKs (Lim und DeWindt, 2000). MAPK-Signalwege werden durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin-Kinase Rezeptoren, Proteinkinase C, Kalzium- oder Stress-Stimuli aktiviert (Lim und Molkentin 1999; McKinsey und Olson 1999). Nachgeschaltet erfolgt die Aktivierung einer Kaskade von Kinasen, welche schließlich in der Phosphorylierung und Aktivierung der drei terminalen MAP-Kinasen (ERK, JNK, p38) münden. Diese können wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren und damit die Transkription von Genen induzieren, die z. B. bei der Hypertrophie hochreguliert werden (Yang *et al.*, 2001; Molkentin *et al.*, 2000).

7

1.4.1.2 Calcineurin-NFAT-Signalweg

Die Kalzium-abhängige Protein-Phosphatase Calcineurin wurde vor 13 Jahren als ein wichtiges Hypertrophie-regulierendes Protein entdeckt (Molkentin *et al.*, 1998). Es ist ein Heterodimer, bestehend aus Calcineurin A (CnA), einer 58 - 61 kDa großen katalytischen und Calmodulinbindenden Untereinheit, und Calcineurin B (CnB), einer 19 kDa großen Ca²⁺bindenden regulatorischen Untereinheit, welche fest mit CnA verbunden ist. Die Calcineurin-Isoformen, die im Säugetier exprimiert sind, heißen CnA α , CnA β und CnB1.

Bei der Suche nach interagierenden Faktoren des kardialen Transkriptionsfaktors GATA-4 wurde eine spezifische Interaktion zwischen der Zinkfingerdomäne von GATA-4 und der DNA-Bindungsdomäne von NFAT (Nuclear Factor of activated T-Cells) beobachtet. GATA-4 reguliert als Transkriptionsfaktor fetale kardiale Gene nicht nur vor der Geburt, sondern aktiviert diese auch als Reaktion auf Stresssignale im adulten Herzen (Hasagewa *et al.*, 1997; Rusnak *et al.*, 2000). Daher wurde angenommen, dass die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin und der nachgeschaltete transkriptionelle Effektor NFAT eine spezifische Rolle bei der hypertrophen Reaktion im Herzen spielen.

Eine Vielzahl von Stimuli kann den Calcineurin-Signalweg über eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Ionen-Konzentration und anschließende Bindung von Ca²⁺/Calmodulin (CaM) an CnA aktivieren. Die Phosphatase-Aktivität des Calcineurins führt zur Dephosphorylierung von NFAT mit nachfolgender nukleärer Translokation der Transkriptionsfaktoren und Förderung der Hypertrophieentwicklung. Weitere Substrate von Calcineurin sind einige mitochondriale Proteine (mitochondriales Membran Potential) und die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Die Inhibition von Calcineurin ist mit Cyclosporin (CsA/FK506) und durch endogene Inhibitoren, wie Cain/Cabin, AKAP79 und MCIP1 möglich. GSK3β bezeichnet eine der Kinasen, welche NFAT rephosphorylieren und damit inaktivieren können.



Abbildung 3: Calcineurin-Signalweg in der Herzzelle. Verschidene Signale an der Zelloberfläche, wie z .B. Dehnungsstress führen zu einem intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration, wodurch die Phosphatase Calcineurin aktiviert wird. Calcienurin dephosphoryliert den Transkriptionsfactor NFAT, der darauhin in der Zellkern transloziert. Nach Bindung an die Promotorregion wird die Expression hypertrophierelevante Gene aktiviert. Die Immunsupressiva CsA und FK506 hemmen Calcineurin und können somit denAblauf der Signalkaskade stoppen (Becher, 2006).

1.4.2 Myokard-Apoptose

Der Tod von Zellen des Myokards durch Apoptose scheint sowohl für die Entstehung als auch für das Fortschreiten vieler kardiovaskulärer Erkrankungen von großer Bedeutung zu sein. Bei verminderter Anzahl der Kardiomyozyten ist die Fähigkeit des Myokards, die kontraktile Funktion aufrechtzuerhalten, herabgesetzt. Bei Herzversagen im Endstadium konnte gezeigt werden, dass der durch Apoptose bedingte Verlust an Kardiomyozyten zur Ausbildung einer kardialen Dysfunktion beiträgt (Narula *et al.*, 1996). Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird durch extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli initiiert, die über Proteine der Bcl2-Familie zu den Mitochondrien transmittiert werden. Dazu gehört unter anderem das proapoptotische Protein Bax, welches nach Stimulation in die Mitochondrien translokiert und dort durch Permeabilisierung

Einleitung

der äußeren Mitochondrien-Membran zu einer Freisetzung von Cytochrom C und weiteren proapoptotischen Proteinen führt. Dies initiiert im Cytoplasma die Bildung eines Apoptosoms unter Beteiligung von APAF-1, Cytochrom C und Procaspase-9 und schließlich die Aktivierung der Caspasen-3 und -8 (Crow *et al.*, 2004).

Antiapoptotische Proteine wie Bcl2 und BclxL besitzen therapeutisches Potenzial für die Behandlung von Herzerkrankungen, da diese myokardiale Zellen vor verschiedenen Stressfaktoren schützen können. Für Bcl2 wurde beispielsweise gezeigt, dass es die durch p53 vermittelte Apoptose in kardialen Myozyten verhindern kann (Kirshenbaum und de Moissac, 1997). Obwohl Bcl2 in Kardiomyozyten nur gering exprimiert wird, ist es ein vielversprechendes therapeutisches Agens, da es den durch Ischämie verursachten Zelltod verhindern kann und die Fähigkeit der Mitochondrien erhöht, hohe Kalzium-Konzentration zu tolerieren. Zudem wurde gezeigt, dass die Überexpression von Bcl2 in Maus-Herzen die kardiale Funktion in Desmin-Knockout Mäusen entscheidend verbessert (Weisleder *et al.*, 2004). Mäuse ohne Desmin, ein muskelspezifisches Mitglied der Familie der intermediären Filamente, entwickeln Kardiomyopathien, welche durch den ausgeprägten Tod von Kardiomyozyten, Fibrose, Kalzifizierung und eventuelles Herzversagen charakterisiert sind. Die ersten ultrastrukturellen Defekte wurden bei diesen Tieren in den Mitochondrien beobachtet. Weisleder *et al.* (2004) zeigten, dass die mitochondrialen Störungen die primäre Ursache der Kardiomyopathie darstellen, und dass diese Defekte durch die Überexpression von Bcl2 verbessert werden können.

1.5 Miz1-Gen

Miz1 (Myc-interacting zincfinger protein 1) wurde in einem *yeast two hybrid screen* als Interaktionspartner des Carboxyterminus von c-Myc identifiziert (Peukert *et al.*, 1997).

Das Miz1-Gen ist auf Chromosom 1 in der Region 1p36.1 bis 1p36.2 lokalisiert (Tommerup *et al.*, 1995). Es kodiert für ein 803 Aminosäuren großes Protein. Sein Molekulargewicht beträgt zwischen 90 und 105 kDa. Es handelt sich dabei um ein Zinkfingerprotein mit 13 Zinkfingern vom Cys2-His2-Typ, von denen zwölf unmittelbar nacheinander in Tandem-Wiederholungen angeordnet sind. Der 13. Zinkfinger ist von der zentralen Gruppe durch eine Sequenz von 80 Aminosäuren abgetrennt. Diese Region formt eine α -Helix und ist hoch konserviert. Am Aminoterminus besitzt Miz1 eine POZ- oder BTB-Domäne (für Poxvirus und Zinkfinger bzw. Bric á brac, Tramtrack, Broad Complex) (Peukert *et al.*, 1997). Die POZ-Domäne von Miz1 kann sowohl die Selbstassoziation von Miz1 als auch die Bindung an Partner ohne POZ-Domäne vermitteln. Die

10

Röntgenstrukturanalyse der POZ-Domäne von Miz1 zeigte zudem, dass durch eine Assoziation von zwei POZ-Domäne-Dimeren eine Bildung von Tetrameren möglich ist.

Im Gegensatz zu vielen anderen POZ-Domänen-Proteinen, die im Zellkern zu schwerlöslichen Aggregaten assoziieren, liegt Miz1 als lösliches Protein überwiegend im Zytoplasma vor (Bardwell und Treisman, 1994; Peukert *et al.*, 1997). Eine Kernlokalisierungssequenz ist in Miz1 nicht enthalten. Erst die ektopische Koexpression von Myc führt zum Kernimport von Miz1 und zur Ausbildung subnukleärer Aggregate, in denen die beiden Proteine kolokalisiert sind. Durch die Assoziation von Myc werden demnach die physikalischen Eigenschaften von Miz1 verändert. Für diese Veränderungen ist eine intakte POZ-Domäne notwendig (Peukert *et al.*, 1997).



Abbildung 4: Schematische Darstellung des Proteins Miz1 (Myc-interacting zincfingerprotein 1). Die Darstellung zeigt die verschiedenen Domänen des Miz1 Proteins. Die ersten 108 Aminosäuren des N-terminalen Endes bilden die POZ-Domäne (Pox-virus und Zinkfinger). Das Protein besitzt außerdem 13 Carboxyterminale Zinkfinger. Der 13. Zinkfinger ist durch eine Zwischensequenz von 80 Aminosäuren von den anderen separiert. Diese Trennregion bildet strukturell eine α -Helix und stellt die Interaktionsfläche zwischen Myc und Miz1 dar.

Miz1 bindet in unmittelbarer Nähe der transkriptionellen Startpunkte verschiedener RNA-Polymerase-II abhängiger Promotoren. Dazu zählen der Cyclin-D1-Promotor, der AdML-Promotor (Adenovirus Major Late-Promotor) (Peukert *et al.*, 1997) sowie die Promotoren der P15INK4B-(P15)- und P21CIP1- (P21) Gene (Staller *et al.*, 2001; Seoane *et al.*, 2001).

Die Überexpression von Miz1 löst in humanen Zellen und in Nagerzellen einen Wachstumsarrest aus. Die Myc-Expression *in vivo* unterdrückt die Transaktivierung durch Miz1 und überwindet den Miz1 induzierten Wachstumsarrest (Peukert *et al.*, 1997). Konstitutive Knockout Mäuse zeigen eine Letalität in der frühen Embryonalzeit (E7.5), die mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht. Die Miz1 deletierten Embryonen sind kleiner als vergleichbare Wildtyp-Exemplare, während heterozygote Mäuse in den ersten zwei Jahren keinen auffälligen Phänotyp aufweisen (Adhikary *et al.*, 2003).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass das Onkoprotein Myc in der Lage ist, einen Arrest des Zellzyklus zu überwinden (Wanzel *et al.*, 2003; Gartel und Shchors, 2003). Das Myc-Protein

bezeichnet einen wichtigen Regulator vieler zellulärer Prozesse, wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Grandori *et al.*, 2000). Während Zellen, denen das Onkoprotein Myc fehlt, im Wachstum beeinträchtigt sind (Trumpp *et al.*, 2001), stimuliert eine deregulierte Expression von Myc die Proliferation in Abwesenheit von externen Wachstumsfaktoren (Eilers *et al.*, 1991). Diese vielfältigen zellulären Funktionen von Myc beruhen auf der Fähigkeit, die Transkription verschiedener Gene sowohl zu aktivieren als auch zu reprimieren.

Im Fall von Miz1 wurde in mehreren Studien gezeigt, dass durch die Assoziation mit Myc die Transaktivierung der p15- und p21-Gene, die beide für Cdk-Inhibitoren codieren, negativ reguliert wird (Seoane *et al.*, 2001, 2002; Staller *et al.*, 2001; Herold *et al.*, 2002; van de Wetering *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Das liegt zum Teil an der Konkurrenz zwischen Miz1 und Myc um die Bindung des Kofaktors p300 (Staller *et al.*, 2001). Zusätzlich interagiert Myc aber auch direkt mit Smad-Proteinen und kann auf diese Weise womöglich verschiedene TGF-β-abhängige Promotoren inhibieren (Wanzel *et al.*, 2003).

Der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21 ist ein wichtiger Mediator des durch p53 induzierten Zellzyklusarrests. Der p21-Promotor ist nicht p53-abhängig, wobei der Transkriptionsfaktor Miz1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der p21-Expression spielt. Ebenso wie p53 kann auch Miz1 durch Stress aktiviert werden, und beide Transkriptionsfaktoren sind für die Induktion der p21-Expression erforderlich (Herold *et al.*, 2002; Seoane *et al.*, 2002; van de Wetering *et al.*, 2002). Die Interaktion von Myc und Miz1 führt auch in Anwesenheit von p53 zu einer unterdrückten p21-Expression. p21 hat die Fähigkeit Zellen vor der p53 vermittelten Apoptose zu schützen, und der Verlust von p21 könnte somit zur Apoptose führen.

In Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die p53 vermittelte Apoptose durch Bcl2 verhindert werden kann (Kirshbaum und de Moissac, 1997). Vor kurzem wurde berichtet, dass der Transkriptionsfaktor Miz1 die Transkription von Bcl2 in primären humanen Zellen aktiviert. Zudem wurde gezeigt, dass die Hemmung der Miz1/Bcl2-Interaktion ein essenzielles Ereignis der durch c-Myc vermittelten Apoptose ist (Patel und McMahon, 2007). Es wurde kürzlich gezeigt, dass die POZ-Domäne von Miz1 mit der DBD-Domäne (DBD = DNA Binde Domäne) von p53 interagiert und somit seine Transkriptionsaktivitäten blockiert (Miao et al., 2009).

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Der Transkriptionsfaktor Miz1 wurde in einem *yeast two hybrid screen* als Interaktionspartner des sarcomerischen Mechanosensor-Proteins MLP identifiziert (Knöll, unpubliziert). Daraufhin wurde im Vorfeld dieser Arbeit die Expression von Miz1 in humanen Kardiomyopathien untersucht. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie eine signifikante Herunterregulierung von Miz1 im Vergleich zu gesunden Probanden aufweisen. Hinzu kommt, dass Miz1 antiapoptotische Eigenschaften hat, indem es Bcl2 aktiviert (Patel und McMahon, 2007) und die Transkriptionsaktivität von p53 hemmt (Miao *et al.*, 2009). Bislang ist die funktionelle Bedeutung des Miz1-Gens im Herzen komplett unbekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob Miz1 direkt oder indirekt an der Entstehung von Kardiomyopathien beteiligt ist und welche Funktion es auf die kardiale Signaltransduktion hat. In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1) Sind Mutationen im Miz1-Gen an der Entstehung von Kardiomyopathie beteiligt?

Zu Beginn dieser Arbeit sollten die Miz1 kodierenden Sequenzen auf Mutationen bei DCM-Patienten untersucht werden. Falls Mutationen gefunden werden, sollte geklärt werden ob sie krankheitsrelevant sind.

2) Welche Proteine sind potenzielle Interaktionspartner von Miz1?

In einem Luciferase-Assay sollte der hypothetische Einfluss von Miz1 auf die Calcineurin-Aktivität geklärt werden. Daraufhin sollten mittels einer *in vivo* Koimmunopräzipitation potenzielle Miz1 interagierende Proteine bestimmt werden. Schließlich sollte eine subzelluläre Lokalisation von Miz1 in adulten Kardiomyozyten untersucht werden.

3) Wie beeinflusst Miz1 hypertrophe und apoptotische Signaltransduktionswege in Kardiomyozyten?

In diesem Zusammenhang galt es zunächst zu untersuchen, ob eine differenzielle Regulation von Miz1 während der Entstehung einer Myokardhypertrophie erfolgt: Miz1-Expression in Myokardproben von Hypertrophie-Mausmodellen. Durch Überexpression von Miz1 in primären Kardiomyozyten sollte zu einem die Wirkung von Miz1 auf die NFAT-Signaltransduktion untersucht werden und zum anderen, ob Miz1 auf die zelluläre Hypertrophie Einfluss nimmt. Der antiapoptotische Charakter von Miz1 sollte nach einer Apoptose-Stimulation gezeigt werden. 4) Wie ist Miz1 während der Entwicklung generell und besonders während der Herzentwicklung exprimiert?

Der Expressionsverlauf eines Proteins in Organen einer Spezie liefert wichtige Informationen über seine Funktion. Es sollte durch Real Time-PCR die Miz1-Expression während der embryonalen Entwicklung und in verschiedenen Organen der Maus untersucht werden. Mit der gleichen Methode sollte speziell die Miz1-Expression während der Rattenherzentwicklung analysiert werden.

5) Was bewirkt ein herzspezifischer Miz1-Knockout oder die herzspezifische Überexpression von Miz1 *in vivo*?

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Miz1 konditionale Knockout-Mäuse sowie Miz1 transgene Mäuse generiert und phänotypisiert werden. Um die Funktion von Miz1 näherer zu untersuchen, ist geplant, in diesen Mäusen mittels TAC-Operationen kardiale Hypertrophie zu induzieren und anschließend eine echokardiografische Untersuchung durchzuführen.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
6-Well cell culture cluster	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well-Microtiterplatten, klar	Nunc, Wiesbaden
96-Well-PCR-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Real-Time-PCR-Platten	Bio-Rad Laboratories, München
Blottingpapier GB 003	Schleicher & Schüll, Dassel
Einfrierröhrchen Cryo®Tubes	Nunc, Wiebaden
Elektroporationsküvetten	Biozym Scientific, Oldendorf
Falcon Culture-slides	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon [®] Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
Hyperfilm MP	GE-Healthcare, München
Küvetten, UVette	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulose Membran	Whatman, Dassel
Objektträger und Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger, superfrost	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, Super RX	Fujifilm GmbH, Düsseldorf
Sepharose Säulen	GE-Healthcare, München
Sterilfilter	Millipore, Bad Schwalbach
Sterilfilter	Millipore, USA
SuperFect [®] Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.2 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Firma
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Easyjec T Elektroporationsgerät	Wolf Laboratories Limited, York, England
Evolution RC Superspeed Centrifuge	Sorvall, Newtown, USA
epMotion 5075	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Hamburg
Gelelektrophoresekammer SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, München
iQ5 [™] Multicolor <i>Real-Time</i> PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, München
L-70 Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Hamburg
Mithras LB 940 Multimode Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Multi Image Light Cabinet	AlphaInnotech Inc., San Leandro, USA
µQuant Universal Microplate-Spektralphotometer	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA

2.3 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Firma
Aceton	Sigma-Aldrich, München
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose Sea Plaque [®] GTG	Biozym Scientific, Oldendorf
Agarose, low melting GQT	Severn Biotech, Kidderminster (UK)
Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Anilinblau	Sigma-Aldrich, München
Antibiotic/Mycotic-Solution	Invitrogen, Karlsruhe

Chemikalie	Firma
Aprotinin	Roche, Mannheim
Bacto-Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Calyculin	Sigma-Aldrich, München
Carbenicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carnitin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
CHAPS	Sigma-Aldrich, München
Cytosin-β-D-arabinofuranosid Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
dNTPs (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, München
DPBS	Invitrogen, Karlsruhe
E-64	Sigma-Aldrich, München
Eisen(III)-chlorid, wasserfrei	Sigma-Aldrich, München
Endothelin 1	Sigma-Aldrich, München
EosinY-disodium	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Flag-Peptid	Sigma-Aldrich, München
Formalin	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Fuchsin Acid	Sigma-Aldrich, München
Glukose (Dextrose)	AppliChem, Darmstadt
Glutamin säure, D-,L-	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin nach Mayer	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm

Chemikalie	Firma
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, München
Isoprenaline hydrochloride	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
Kollagenase CLS-2	Biochrom, Berlin
Laminin	Sigma-Aldrich, München
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepstatin	Biomol, Hamburg
Phenol	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, München
Phosphomolybdänsäure	Sigma-Aldrich, München
Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Rapid-Hyb-Puffer	GE-Healthcare, München
RNasin RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
Röntgen Superfix	Tetenal AG, Norderstedt
Roti [®] -Blue	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Sepharose A/G	Pierce Biotechnology, Rockfort, USA
SuperFect [®] Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Taurin	Sigma-Aldrich, München

Chemikalie	Firma
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris-Base)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, München
Urea	Sigma-Aldrich, München
Vecta Shield ohne DAPI	VectorLab, Burlingame (USA)
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl a-D-	Biomol, Hamburg
Galactopyranosid)	
XRay-Developer LX24	Kodak, Darmstadt
Xylenxyanol FF	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Sigma-Aldrich, München
ZVAD-FMK	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

2.4 Enzyme

Tabelle 5: Enzyme

Enzym	Firma
Collagenase Typ II	Worthington, Lakewood NJ (USA)
aTaq DANN-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
DNase, RNase-free	Qiagen, Hilden
DNase, RNase-free	Qiagen, Hilden
Fast-LinkTM DNA-Ligase	Biozym Scientific, Oldendorf
iScript [™] Reverse Transkriptase	Bio-Rad Laboratories, München
Pfu Polymerase	Fermentas, St Leon-Rot
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	NEB, Promega
RNase A	Roche, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

2.5 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 6: Lösungen, Puffer und Medien

Lösung / Puffer/Medium	Zusammensetzung
10x TBS	0,2 M Tris 2 M NaCl pH 7,5
10x Thyrodepuffer	137 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	1,2 mM MgSO ₄
	1,2 mM Na₂HPO₄
	20 mM HEPES
1x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
1x Thyrodepuffer mit Kalzium	1 M CaCl ₂ in Thyrodepuffer ohne Ca ²⁺
1x Thyrodepuffer ohne Kalzium	10 % 10x Thyrodepuffer
	2,7 g/l Glukose
	1 % 100x Penicillin/Streptomycin
1x Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris
	150 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
	рН 8,3
20x SSC	3 M NaCl
	0,3 M Tri-Natriumcitrat
	pH 7,0 mit NaOH
2x HBS-Puffer	250 mM Nacl
	50 mM HEPES
	$1,5 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$
5x PAGE-Laufpuffer	125 mM Tris Base
	96 mM Glycin 0,5 % (w/v) SDS

Lösung / Puffer/Medium	Zusammensetzung
5x TBE-Puffer	445 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	445 mM Borsäure
ATP-Puffer für Luciferase-Messung	Glycyl-Glycin-Puffer
	K-Phosphat-Puffer
	DTT
	АТР
Blot-Puffer	mM Tris/HCl, pH 8,3;
	192 mM Glycin;
Carbonicillin Stammlösung	10 % (v/v) Methanol
	$100 \text{ mg Carbenchinn/min m}_20$
Giycyi-Giyciii-Pullel	
HEPES-Puffer	10 MM HEPES
	2 mM CaCl2:
	pH 7,4
Kaliumaharahat Duffar	
Kanamycin-Stammlosung	50 mg Kanamycin in H ₂ O
Kollagenaselösung	60 mM Taurin 8 mM D. L. Glutaminsäure
	2 mM D. L-Carnitin
	1,3 mg/ml Kollagenase II
	26 μg/ml Protease XIV
	0,025 mM CaCl2
	in 1x Thyrodeputter ohne Ca2+
	рН 7,54
Komnetente Zellen Puffer1	100 mM CaCl
	2 mM Tris
Kompetente Zellen Puffer?	
	2 mM Tris
	10% (v/v) Glycerin
K-Dhosphat-Duffer	100 mM KH-PD.
K-FIIOSpilat-Fuller	$100 \text{ mM} \text{ Km}_2\text{-}04$

Lösung / Puffer/Medium	Zusammensetzung
Kratz-Puffer	150 mM Nacl
	1 mM EDTA
	40 mM Tris/Hcl
Ladepuffer für DNA-Elektrophorese	40 % Sucrose 1 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylenxyanol FF
Laemmli-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCL pH 6,8 50 % Glycerol 10 % SDS 150 mM DTT 5 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau
Lysepuffer für Zellen/Gewebe (Homogenisierungspuffer)	1 % (v/v) NP 40 10 % (v/v) Glycerol 137 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4 10 mM EDTA pH 8,0 1 mM EGTA pH 7,0 20 mM NaF 1 mM Natrium-Orthovanadat 1 mM Natrium-Pyrophosphat 50 mM β-Glycerophosphat 4 µg/ml Aprotinin 4 µg/ml Leupeptin 4 µg/ml Pepstatin A 1 mM PMSF
Medium für <i>E.coli</i> -Transformation	SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) 2 % Tryptone 0.5 % Yeast Extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
Medium für adulte Kardiomyozyten	M199 (Sigma-Aldrich, München) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung 1 % (v/v) L-Glutamin

Lösung / Puffer/Medium	Zusammensetzung
	5 mM Taurin
	5 mM D-, L-Carnitin
	5 mM Creatin
	DMEM (Invitrogen, Karlsruhe)
Medium für COS7- und NIH3T3-Zellen	10 % FKS
	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung
	LB (Luria-Bertani)-Medium (Carl Roth, Karlsruhe)
	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
Medium für <i>E.coli</i>	10 g/l NaCl
	In Wasser lösen und autoklavieren
	Carbenicillin Endkonzentration 100 μg/ml
	Kanamycin Endkonzentration 50 μg/ml
Medium für HeLa und QBI-HEK293A	basal Iscove Medium (Biochrom AG, Berlin)
Medium für neonatale Kardiomyozyten	4 Teile DMEM (Sigma-Aldrich, München) 1 Teil M199, Sigma-Aldrich 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung 1 % (v/v) L-Glutamin
NP40-Lysepuffer	100 mM Tris pH 7 4
	150 mM NaCl
	1 % (v/v) NP-40
	20 mM NaF
	50 mM β-Glycerolphosphat
	5 μg/ml Aprotinin
	5 μg/ml Leupeptin
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS

2.6 Gebrauchsfertige Kits

Tabelle 7: Gebrauchsfertige Kits

Reaktionssystem	Firma
BCA [™] Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockfort, USA
HiSpeed [®] Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Immobilon [™] Western Chemiluminescent	
Substrate	Millipore Corporate, Billerica, USA
iQ [™] SYBR [®] Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
ProFound™ HA Tag IP/Co-IP Kit	Pierce Biotechnology, Rockfort, USA
QIAamp Blood Maxi Kit QIAGEN	Qiagen, Hilden
QIAamp [®] DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAEXT [®] II Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent	
Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Topo TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Leek, Holland

2.7 Verwendete Plasmide

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
A1	αMHC-Flag-Miz1	diese Arbeit
Clone 26	pBSII KS+αMHC Promotor	Jeffrey Robbins
CndelB	pXP2+ luc-flu+B	diese Arbeit
CndelC	pXP2+ luc-flu+C676	diese Arbeit
CndelD	pXP2+ luc-flu+D988	diese Arbeit
CndelE	pXP2+ luc-flu+E1481	diese Arbeit
CndelF	pXP2+ luc-flu+F2048	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
P130	pXP2+ luc-flu	Bröckmöler
P177	pGL3+CnAβ2.3	J. Molkentin
P180	pXP2+ luc-flu+ CnAβ2.3	diese Arbeit
P230	pcDNA3+hMiz1	diese Arbeit
P231	pcDNA3-HA+hMLP	diese Arbeit
P59	pcDNA3+Miz1-Flag	diese Arbeit
P59m	pcDNA3+Miz1(A188V)	diese Arbeit
P6b	pDC515+Flag-Miz1	diese Arbeit
P76	pGADT7+hMiz1	diese Arbeit
P78	pcDNA3-Myc-His+hMLP	diese Arbeit
pDC515	Adenovirus Vektor	Microbix, Toronto, Kanada

2.8 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

	Sequenz 5´➔3´
Primer	(Restriktionsenzym)
Cn-For	CTTTTGCTCGAGCTTGCTCTTTTCTTCTGGGG (Xhol)
Cn-N10	CTTTTGCTCGAGTCTCTGCTTTCCATTTTT
Cn-N12	CTTTTGCTCGAGATTGGGTTTTCCCTCCTTA
Cn-N17	CTTTTGCTCGAGAAGAGTCTTTCCCTCTTGT
Cn-N4	CTTTTGCTCGAGAGGCCTGGGAAATTCTGAG
Cn-N7	CTTTTGCTCGAGTTAGACTTTTCCAGCTGAA
Cn-Prom-F2	GCGCAAGCTTCTTGGCTGCAAGCACCTTTAT (HindIII)
Cn-Prom-F3	GCGCAAGCTTCATATATTTGTCTAGGCCTGG (HindIII)
Cn-Prom-R1	GCGCCTCGAGCTACCAGAGCCAAGCGGCGG (Xhol)
Cn-Prom-R2	GCGCCTCGAGAGGCTTCGGGTACCTCTCAC (Xhol)
Cn-Prom-R3	GCGCCTCTAGCATGGCGGACCCTCTTTCCCTT (Xhol)
Cn-Rev	CGATATAAGCTTCTACCAGAGCCAAGCGGCGG (HindIII)

	Sequenz 5´➔3´		
Primer	(Restriktionsenzym)		
Cre1832	GTTCGCAAGAACCTGATGGACA		
Cre2171AS	CTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC		
hMiz1-F1	GTGGCCACTTTCCTCCAAATG		
	GCGCGTCGACATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGACTTTCCCCAGCA		
hMiz-Flag-F	CAGCCA		
hMiz-R3	GCGCGTCGACTCACTCGGCAGGCGGGGGACATT		
m-18s-For	CGAAAGCATTTGCCAAGAAT		
m-18s-Rev	GAGGTTTCCCGTGTTGAGTC		
m-ANF-For	TGATAGATGAAGGAGGAAGCCGC		
m-ANF-Rev	AGGATTGGAGCCCAGACTGGACTAGG		
m-BNP-For	TCTCCAGAGCAATTCAAGAT		
m-BNP-Rev	AACAACTTCAGTGCGTTACA		
mCIP-For	CCAATCCCGACAAACAGTTC		
mCIP-Rev	AGTGGTGTCTGTCGCTGCATGC		
m-Gapdh-For	GCAGTGGCAAAGTGGAGATT		
m-Gapdh-Rev	TCTCCATGGTGGTGAAGACA		
MHC-Miz1-R1	CCACGAAGAGCATCTTGAAGT		
MHC-Miz-F1	GAGAGCTCGGAGCAAGAAATG		
MHC-PKP2-F1	GCACTTTACATGGAGTCCTGG		
m-h-Miz1-For	GACTGCACCTTTGTGGTGGAC		
m-h-Miz1-Rev	AGGTGCACCACGTCCTTCTG		
Miz1-P3	CGTTGACTTCAAGGCTCACA		
Miz1-P4	GTCCACGTTCTCAGGGCTAA		
Miz1-P5	GGCAGTTACAGGCTCAGGTG		
Miz1-P6	GGCAGAGAACTCAAGGAGGA		
Miz1-P7	GTCCGTCTTCTCCTTTGCTG		
MizloxP3-For	GTATTCTGCTGTGGGGCTATC		
MizloxP3-Rev	GGCTGTGCTGGGGGAAAT		
Miz-neo3	GGCAGTTACAGGCTCAGGTG		
mRT-Bcl2-For	CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG		

26

	Sequenz 5´➔3´		
Primer	(Restriktionsenzym)		
mRT-Bcl2-Rev	ACTTGTGGCCCAGATAGGCACCCAG		
mRT-P21-For	CAGACCAGCCTGACAGATTT		
mRT-P21-Rev	CCTGACCCACAGCAGAAGAG		
mRT-P53-For	GACATTTTCAGGCTTATGCA		
mRT-P53-Rev	ATGCAGTGAGGTGATGGCA		
pLuc-pFlupXP2-Rev	CCATTTTACCAACAGTACCG		
seq-pDC515-ap1	AGCTGCGTTCTACGTGGGTA		
seq-pDC515-ap2	TGCTCCGAGCTCTCGGACAA		
seq-pDC515-ap3	CCGAGGAGAACGAGAATGAG		
seq-pDC515-ap4	AACTGTCGCTGGCAGTGGAT		
seq-pDC515-ap5	GTGAGAAGCCATGCCAGTGT		
seq-pDC515-ap6	TTGTGAAATTTGTGATGCTA		
Serca-ERev	GTCCAGGTCTGGAGGATTGA		
Serca-For	AGATGGTCCTGGCAGATGAC		
Sk-act-for	CCTGCCATGTATGTGGCTATC		
Sk-act-Rev	GCTTCAGCTGTGGTCACGAAG		

2.9 Antikörper

2.9.1 Primäre Antikörper

Tabelle 10: Verwendete Primäre Antikörper

Antikörper	Spezie	Herkunft
ANP	Rabbit, Polyklonal	Abcam, Cambrige, UK
anti- α Actinin (Sarcomeric)	Mouse, Monoklonal	Sigma-Aldrich, München
Calcineurin	Rabbit, Polyklonal	Upstate Biotech, USA
CRSP3 (MLP)	Rabbit, Polyklonal	Proteintech, Chicago, USA
Flag M2	Mouse, Monoklonal	Sigma-Aldrich, München
GAPDH (Clone 6C5)	Mouse, Monoklonal	Millipore, Billerica, USA
Antikörper	Spezie	Herkunft
--------------	--------------------	------------------------------
HA-tag (6E2)	Mouse, Monoklonal	Cell Signaling, Danvers, USA
Miz1 (10E2)	Mouse, Monoklonal	M. Eilers, IMT, Marburg
Miz1 (B-10)	Mouse, Monoklonal	SCBT, Santa Cruz, USA
Miz1 (H-190)	Rabbit, Polyklonal	SCBT, Santa Cruz, USA
Miz1 (N17)	Goat, Polyklonal	SCBT, Santa Cruz, USA
NFATc2	Mouse, Monoklonal	SCBT, Santa Cruz, USA

2.9.2 Sekundäre Antikörper

- Anti-mouse IgG, Horseradish peroxidase-linked whole Antibody from sheep (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Anti-mouse IgG FITC-linked Antibody, Alexa 488 (A21202), form donkey (Invitrogen, Karlsruhe)
- Anti-rabbit IgG Cy3-linked Antibody from goat (Dianova, Hamburg)
- Anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase-linked whole Antibody from donkey (Amersham Biosciences, Freiburg)

2.10 Molekulargewichtsstandards

- Gene Ruler[™] 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St-Leon Rot) Fragmentgrößen (bp): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000, 1500
- Gene Ruler[™] 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St-Leon Rot) Fragmentgrößen (bp): 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000,10000
- Precision Plus Protein Standards, (Bio-Rad Laboratories, München) Molekulare Massen (kDa): 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250

2.11 Biologische Materialien

Bakterienstämme

- Escherichia coli DH5a Invitrogen, Karlsruhe
- Escherichia coli XL1-blue Agilent Technologies, Santa Clara (USA)

Verwendete Tiere

- FVB/N Mäuse
- C57BL/6 Mäuse
- Wistar Ratten
- Konditionale Miz1-Knockout-Mäuse mit MLC2V-Promotor gesteuerter Cre-Rekombinase: Miz1-Knockout (Miz1-KO)
- Konditionale Miz1-Knockout-Mäuse mit αMHC-Promotor gesteuerter Cre-Rekombinase: Miz1-Knockout* (Miz1-KO*)
- Miz1 transgene Mäuse: Miz1 mit αMHC-Promotor gesteuert

Eukaryotische Zelllinien

- COS-7-Zellen LGC Prochem, London, England
- NIH3T3-Zellen ATCC, Rockville, USA
- JEG-3-Zellen Pharmakologie UMG Göttingen
- QBI-HEK-293A-Zellen Microbix, Toronto, Canada

Viren

- LacZ-Adenovirus: AdLacZ
- Miz1-Adenovirus: AdMiz1

2.12 Tierhaltung

Für die verschiedenen Versuche wurden Mäuse der Stämme FVB/N und C57BL/6 verwendet. Die Mausezucht wurde vom Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin und der Zentralen tierexperimentellen Einrichtungen (ZTE) der Universitätsmedizin in Göttingen durchgeführt. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von circa 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % gehalten. Die Untersuchung und Tötung der Mäuse sowie die Durchführung der Operationen wurden vom Landesamt für Verbraucherschutz (LAVES) in Oldenburg ordnungsgemäß beantragt und genehmigt.

2.13 Patientenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden molekularbiologische Untersuchungen an genomischer DNA aus Blut und Protein aus Myokardbiopsien von Pateinten mit dilatativer und hypertropher Kardiomyopathien durchgeführt. Sowohl die Proben der Kardiomyopathie-Patienten als auch die der gesunden Kontrollen wurden zum Zwecke der Grundlagenforschung aus der Abteilung Herz-Thorax-Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen und aus dem Herzzentrum Bad Oeynhausen bezogen. Die Verwendung der Proben wurde von der Ethikkommission der Universität Göttingen genehmigt, wobei die Patienten schriftlich ihre Zustimmung erklärten.

3 Methoden

3.1 Mausmodelle

3.1.1 Generierung der konditionalen Miz1-Knockout-Mäuse

Der konstitutive Miz1-Knockout (komplette Deletion beider Allele des Miz1-Gens) ist bei Mäusen innerhalb der ersten Embryonalphase (E7.5) letal (Adhikary *et al.*, 2003). Die Knockout Maus-Embryos unterliegen einer erhöhten Apoptoserate der ectodermalen Zellen um den Tag 7.5 der embryonischen Entwicklung im Vergleich zu Wildtypen oder Heterozygoten. Um diese Letalität zu umgehen, erfolgte die Generierung einer herzspezifischen Miz1-Knockout Maus.

Die Miz1-POZ-Domäne ist erforderlich für die Multimerization und die Interaktion mit anderen Proteinen (Staller *et al.*, 2001). Damit diese Transkriptionsregulator-Funktion von Miz1 ausgeschaltet werden konnte, wurden Mäuse generiert, deren Miz1-POZ-Domäne (Exon 3 und 4) mit den loxP-Sequenzen (loxP = *locus of crossing over (x)* aus *P1*) flankiert sind. Freundlicherweise stellte Professor Eilers von der Universität Marburg die durch homologe Rekombination erzeugten Miz1 "gefloxten" Mäuse MF+/+ zur Verfügung (Adhikary *et al.*, 2003, Gebhardt *et al.*, 2007). Gleichzeitig erfolgte unter Steuerung der herzspezifischen MLVC2- oder α MHC-Promotoren (MLVC2 = Myosin light chain, α MHC = alpha Myosin heavy chain) die Generierung von Cre-Rekombinase transgenen Mäusen.

Wie bereits der Name erkennen lässt, vermittelt die Cre-Rekombinase (*causes recombination*) die Rekombination zwischen zwei identischen Erkennungssequenzen, den loxP-Elementen. Die Miz1 konditionalen Knockout-Mäuse, die in dieser Arbeit benutzt wurden, resultierten aus der Verpaarung von MF^{+/+}-Mäusen (aus Marburg) und MLVC2-Cre-Mäusen (von Dr. Sylvia Gunkel generiert). Dabei wird mit dem sogenannten Cre/loxP-Rekombinationssystem gearbeitet. Die Grundlagen dieses Systems bilden kurze DNA-Sequenzen (loxP-Sequenz), die durch das Enzym Cre-Rekombinase erkannt werden, das daraufhin den DNA-Abschnitt zwischen zwei loxP-Sequenzen herausschneidet. Die Genotypisierung erfolgt diesbezüglich mittels PCR und Southern Blot.

3.1.2 Generierung der herzspezifischen Miz1 transgenen Mäuse

Im Gegensatz zu anderen genmodifizierten Tiermodellen ist eine transgene Maus durch die spezifische Überexpression eines bestimmten Gens charakterisiert.

Die humane cDNA von Miz1 (hMiz1-cDNA) wurde in einen Expressionsvektor (erhalten von Jeffrey Robbins) kloniert, der den Promtor für die schwere Kette des alpha-Myosins (α -MHC) sowie drei nicht kodierende Exone und das poly-Adenylierungssignal des humanen Wachstumshormons enthält (Subramaniam *et al.*, 1991). Die multicloning site (*Sal*I und *Hind*III) des alpha-MHC Clone 26 Vektors (Tabelle 8) wurde mit *Sal*I gespaltet. Die hMiz1-cDNA wurde mit Primern, die die zwei flankierenden *Sal*I-Schnittstellen sowie eine Flag-Tag-Sequenz aus dem p59-Plasmid enthielten, amplifiziert. Auf diese Weise konnten die *Sal*I-Schnittstellen in die Sequenz eingeführt werden. Nach enzymatischer Verdauung mit SalI und Reinigung des PCR-Produktes wurde die humane Miz1-cDNA in den mit *Sal*I geöffneten alpha-MHC Clone 26 Vektor kloniert. Anschließend wurden DH5 α -*E.coli*-Bakterien mit dem neuen Konstrukt transformiert. Das Schema des Transgen-Konstrukts ist im Ergebnissteil, Abbildung 4.16A dargestellt.

Die Plasmide wurden durch eine *Sal*I-Restriktionsanalyse getestet. Der Klon A1 wurde als positiver Klon mit der richtigen Orientierung ausgewählt. Das Plasmid wird im Folgenden als αMHC-Flag-Miz1 bezeichnet. Die DNA-Sequenzierung zeigte, dass die PCR-Amplifikation keine Mutation in der Miz1-cDNA verursacht hat.

Das DNA-Fragment wurde nach einer Linearisierung mit *Kpn*I mit dem QIAEXT II Extraction Kit (Qiagen) gereinigt und in einem Mikroinjektionspuffer (5 mM Tris pH 7,4/ 0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde auf 40 ng/µL eingestellt. In Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin Göttingen wurde die DNA in den Pronukleus von befruchteten Maus-Oozyten mikroinjiziert. Die intakten Zygoten wurden anschließend in die Ovidukte scheinschwangerer Mäuse der Linie FVB/N reimplantiert. Die Integration des DNA-Konstrukts ins Genom erfolgt statistisch ungerichtet, wodurch, in seltenen Fällen, auch lebenswichtige Gene zerstört werden können, was für den sich entwickelnden Organismus letal sein kann. Durch diese Methode können sehr viele (bis zu 100) Kopien des Genes eingebaut werden, wodurch Gendosiseffekte auftreten können.

Ob die Nachkommen wirklich transgen sind, kann nach der Geburt der Tiere mithilfe von PCRoder Southern Blot-Analysen genomischer DNA aus Gewebeproben (Schwanz- oder Herzbiopsie) überprüft werden, in welchen gezielt mittels geeigneter DNA-Sonden die transgene Sequenz nachgewiesen werden kann. Die transgenen Foundertiere wurden dann mit Wildtypmäusen vom FVB/N -Hintergrund verpaart und als Linie im Tierhaus (ZTE, Göttingen) etabliert.

3.1.3 Genotypisierung der Mäuse

Zur Feststellung des Genotyps auf molekularer Ebene wurde in dieser Arbeit sowohl PCR (*polymerase chain reaction*) als auch Southern Blot Analysen durchgeführt. Routinengemäß wurde die genomische DNA aus Mausschwanz- oder aus Herzbiopsien isoliert. Die PCR-Genotypisierung ist in seiner Durchführung relativ einfach (siehe Abschnitt 3.3.3) im Vergleich zu der Southern Blot-Genotypisierung, die deutlich hohe Zeit- und Arbeitsaufwand benötigt.

Zur schnellen Aufbreitung genomischer DNA aus den Schwanzbiopsien transgener Mäuse wurde das DirectPCR-tail-Reagent (PEQIab, Erlangen) verwendet. Zu den Schwanzbiopsien wurde jeweils 200 µl Lysepuffer mit Proteinase K gegeben. Nach einer Inkubation bei 55 °C über Nacht fand die Inaktivierung der Proteinase K bei 85°C für 45 min statt. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei 10000× g zentrifugiert und der Überstand, der als gDNA-Template diente, in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR mit spezifischen Primern.

3.1.4 Experimentelles Mausmodell der Herzhypertrophie

In den 90er-Jahren wurden viele Tierstudien zur experimentellen Induktion einer Herzinsuffizienz oder Herzhypertrophie durchgeführt. Es gibt große Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierspezies und Modellen, und nur wenige lassen sich direkt auf Menschen übertragen. Eine der am häufigsten angewendeten Methoden ist die transversale Aortenkonstriktion (*transverse aortic constriction, TAC*) (Rockman *et al.*, 1991). Hier wird die pathologische Herzhypertrophie durch chronische Druckbelastung erzielt. Wildtypen und genetisch manipulierte Mäuse wurden im Alter von vier Wochen einer TAC-Operation unterzogen. Als Kontrolle dienten scheinoperierte Mäuse (SHAM-Operation). Die Eingriffe an sich und die später folgende Echokardiografie nahmen technische Assistenten des Herzzentrums Göttingen vor. Die Größe der Gauge-Kanüle definiert den Durchmesser der um die Aorta gelegten Fadenschlinge und somit die Stärke der Konstriktion. Für die Experimente der zugrunde liegenden Arbeit wurden 25 bis 28 Gauge-Kanülen verwendet.



Abbildung 5: Schematische Darstellung der transversen Aortenkonstriktion (TAC) nach Rockman (Rockman et al., 1991). Die Aorta wurde distal des Truncus brachiocephalicus operativ verengt, um eine künstliche Aortenstenose zu induzieren (Pfeil). Durch die Nachlasterhöhung kommt es zu einer Zunahme der Ventrikelmasse.

3.1.5 Echokardiografische Analysen

Die Echokardiografie der Mäuse verlief unter Isofluran-Narkose im M-Mode entlang der longitudinalen Achse. Gemessen wurden folgende Parameter in Bezug auf eine Hypertrophie oder die Ejektionsfraktion: Hinterwanddicke, Septumdicke, linksventrikuläre enddiastolische (LVEDD), endsystolische Durchmesser (LVESD) und die Herzfrequenz (HF). Die Verkürzungsfraktion (Fractional Shortening FS) gibt Auskunft über die Pumpfunktion des linken Ventrikels. FS = [(LVEDD-LVESD)/LVEDD] × 100%

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Handhabung und Stammhaltung von Bakterien

3.2.1.1 Stammhaltung von Bakterien

Zur Stammhaltung von Bakterien über wenige Wochen genügte es, diese auf eine LB-Agarplatte auszuplattieren und sie über Nacht bei 37 °C zu inkubieren. Diese Platten konnten nun bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die gewachsenen Kolonien aus von Agarplatten wurden in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Dies diente der Vorkultur. Die Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen erfolgte durch die Herstellung von Glycerolstocks. 850 µl der Vorkultur wurden mit 150 µl Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerolstocks sind bei -80 °C über Jahre haltbar.

3.2.1.2 Herstellung chemisch- und elektro-kompetenter Zellen

Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Aus einer Übernachtkultur wurde ein 1 L-Schüttelkolben, der 250 ml LB-Medium enthielt, so angeimpft, dass die OD₆₀₀ einem Ausgangswert von ca. 0,2 entsprach. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 – 0,9 wurde die Kultivierung abgebrochen und die Zellen für 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 4000× g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. 10 ml eiskalter Puffer 1 konnten dazugegeben und die Zellen durch Schwenken resuspendiert werden. Danach wurden die Zellen erneut für 10 min bei 4000× g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. sodann gab man 10 ml eiskalten Puffer 2 hinzu und resuspendierte die Zellen durch Schwenken. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Herstellung elektro-kompetenter Zellen

Aus einer Übernachtkultur wurde ein 1 L-Schüttelkolben, der 250 ml LB-Medium enthielt, so angeimpft, dass die OD₆₀₀ einem Ausgangswert von ca. 0,1 entsprach. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Kultivierung abgebrochen und die Zellen für 15 min auf Eis gestellt. Im Anschluss daran wurden die Zellen 15 min bei 4000× g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rücklauf mit der Pipette abgesaugt. Die Medienreste spülte man vorsichtig mit 25 ml eiskaltem Wasser aus, ohne das Zellpellet zu resuspendieren. Nachfolgend resuspendiere man das Pellet durch Schwenken in 5 ml eiskaltem Wasser, und nach dem Lösen fügte man der Suspension 150 ml eiskaltes Wasser hinzu. Die Zellen wurden erneut 15 min bei 4000× g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das entstandene Pellet in 10 ml eiskaltem 15 %-igem Glycerin resuspendiert und anschließend auf 40 ml mit 15 %-igem Glycerin aufgefüllt. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 4000× g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in 1 ml 10 %-igem Glycerin durch Schwenken resuspendiert. Abschließend wurde die Suspension in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.3 Transformation von chemisch- und elektro-kompetenten Zellen

Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Ein 100 µl Aliquot chemisch-kompetenter *E.coli*-Zellen wurde langsam auf Eis aufgetaut, die DNA hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Bei dem nachfolgenden Hitzeschock von für 90 sec wurden die Zellen bei 42 °C inkubiert und dann wiederum für 2 min auf Eis gestellt. Im Laufe dieser Behandlung nahmen die Zellen die Plasmide auf. Anschließend wurden 500 µl SOC-Medium zu den Zellen gegeben und diese danach für 30 min bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit erholen sich die Bakterien wieder und exprimieren das Resistenzgen. Nach der Inkubation wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation elektro-kompetenter Zellen

Zunächst wurde ein 50 μl-Aliquot elektro-kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, 1-2 μl DNA hinzugefügt und schnell in eine auf -20 °C gekühlte *E.coli* Pulser® Cuvette (Bio-Rad Laboratories, München) überführt. Die Bakterien wurden dann einem elektrischen Impuls von 2,5 kV, 25 μF (EasyjecT basic Elektroporationssystem, Equi Bio, Kent (UK)) ausgesetzt. Anschließend wurden umgehend 500 μl SOC-Medium zugegeben, die Bakterien darin vorsichtig resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte unter Schütteln eine Inkubation für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden 50-100 μl der transformierten Zellen auf Agarplatten, die ein der Resistenz des transformierten Plasmids entsprechendes Antibiotikum enthielten ausgestrichen. Einzelkolonien zeigten sich nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C.

3.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.2.2.1 Allgemeine Zellkultur-Bediegungen

COS-7-, JEG-3- und die NIH3T3-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagels Vollmedium (DMEM) mit 10 % FKS (fötales Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die adhärent wachsenden QBI-HEK-293A Zellen (Microbix, Toronto) wurden in basal Iscove-Medium (Biochrom AG, Berlin) unter Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin und 8 % FKS in oberflächenbehandelten Gewebekulturflaschen kultiviert. Die allgemeine Kultivierung fand in Kunststoff-Zellkulturflaschen im Brutschrank in bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit Trypsin von den Flaschen abgelöst, vereinzelt und neu ausgesät. Alle Behandlungen der Zellen erfolgten in einer Sterilbank, um Kontaminationen zu vermeiden.

3.2.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Die bis zu einer Konfluenz von 80–90 % gewachsenen Zellen wurden mit DPBS gewaschen, mithilfe von Trypsin abgelöst und in einer entsprechenden Menge FKS mit 10 % DMSO resuspendiert. Anschließend folgte das schonende Einfrieren der Zellen in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox, in welcher eine langsame Abnahme der Temperatur mit einem Grad Celsius pro Minute stattfindet. Nach einer Woche Aufbewahrung bei -80 °C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff konserviert. Um die Zellvitalität der eingefrorenen Zellen während des Auftauvorgangs zu erhalten, ist es wichtig, einen osmotischen Schock zu vermeiden. Hierzu wurden die Zellen sehr schnell aufgetaut und in 15ml-Faclon-Röhrchen langsam zu frischem Medium pipettiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1300× g konnten die Zellen erneut in das Medium resuspendiert und zwecks Übernachtkultivierung in Zellkulturflaschen überführt werden. Am nächsten Morgen wurde das Medium zur vollständigen Entfernung von DMSO gewechselt.

3.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Bei der Bestimmung der Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer wurden die adhärenten Zellen von der Schale mithilfe von Trypsin abgelöst und eine Verdünnung in DMEM hergestellt. Die Verdünnung wurde in die Neubauer-Zählkammer eingebracht und anschließend die Zellen ausgezählt. Dabei wurden jeweils 2x 16 Quadrate ausgezählt und der Mittelwert pro Quadrat ermittelt.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte dann durch die folgende Formel:

 $Zelldichte_{\left[\frac{Zellen}{ml}\right]} = (Durchschnitt \ der \ 16 \ Quadrate)_{[Zellen]} \times Verd "unnung \times 10^4 \times ml^{-1}$

(10⁴ ist der Kammerfaktor)

3.2.2.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Transfektion mit Kalziumphosphat

In dieser Arbeit wurden nur die JEG-3-Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bildung eines DNA-Kalziumphosphat-Präzipitates, das sich auf der Oberfläche der Zellen ablagert und von diesen endozytotisch aufgenommen wird. Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so ausplattiert, dass am nächsten Tag eine Konfluenz von 40–50 % zu erwarten war. 4h vor der Transfektion erfolgte dann ein Mediumwechsel. Die Reaktionsansätze wurden in 15 ml-Reaktionsgefäßen zusammenpipetiert. In diesen wurden pro Ansatz 500 μl (6 cm-Platte) 2xHBS-Puffer vorgelegt. Dazu wurde tropfenweise die DNA-CaCl₂-Lösung gegeben, wobei das Reaktionsgefäß mit dem 2xHBS stark gevortext wurde. Das gebildete Präzipitat wurde resuspendiert und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 5h mit dem Präzipitat inkubiert, anschließend einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen. Nach 36–48h erfolgte die Ernte.

Transfektion mit FuGENE[®]6 (Roche, Mannheim)

Diese Transfektionsmethode eignet sich besonders für HEK293-, COS-7-, und die NIH3T3-Zellen. Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-Well-Platten oder in Zellkulturschalen (55 cm²) ausplattiert und in geeignetem Nährmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ herangezogen, bis sie eine Konfluenz von 60-80 % erreichten. Die Zellen wurden mit einer Ratio von 3:1 (Reagenz:DNA) nach Herstellerangaben transfiziert. Dabei wurde das Fugene-Reagenz in Optimem pipettiert und nach 5 min die entsprechende DNA Menge hinzugegeben. Nach 15 bis 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. Bei dieser Transfektionsmethode war im Gegensatz zur Transfektion mit Kalziumphosphat nach der Transfektion kein Wechsel des Mediums notwendig.

3.2.2.5 Luciferase-Reportergen-Assay

Genetische Reportersysteme werden häufig eingesetzt, um Genexpression zu studieren. Der Luciferase-Assay ist eine sensitive Methode, um die Luciferase-Expression in Zellen nachzuweisen, welche mit einem Luciferase-Reportervektor transfiziert wurden. Die Reaktion, die durch Luciferase katalysiert wird, ist die Oxydation von Luciferin, bei der ein Photon freigesetzt wird. Das dabei entstehende Licht lässt sich mithilfe eines Luminometers quantifizieren.

Die JEG-3-Zellen wurden 36-48h nach Kalziumphosphat-Transfektion mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml Kratzpuffer abgeschabt und für 3 min bei 4000× g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 µl K-Phosphatpuffer+5µl DTT aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C aufgeschlossen. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000× g für 10 min und 4 °C erfolgte die Trennung des Lysats von den unlöslichen Bestandteilen. Zur Messung der Aktivität der transfizierten Luziferase-Reporterkonstrukte wurde die Luziferase-Aktivität im Zelllysat bestimmt. Das Enzym Luziferase aus *Photinus pyralis* katalysiert unter Verbrauch von ATP die Oxidation des Substrates Luziferin unter Emission von Licht. Die Messung erfolgte in einem Gerät mit automatischer Injektion des Substrates (Luminometer). In ein Reaktionsröhrchen wurden 368 µl ATP-Reaktionspuffer vorgelegt und direkt vor der Messung wurden 50 µl des Überstandes zugegeben. Die Luziferin-Lösung (0,2mM D-Luziferin, 25mM Gly-Gly) wurde an den Ansaugschlauch des Luminometers angebracht. Die Menge des emittierten Lichts wurde während einer Zeitspanne von 20 sec nach automatischer Injektion gemessen. Die Messwerte sind Mittelwerte aus unabhängigen Triplikaten.

3.2.3 Isolierung und Kultivierung primärer Zellen

3.2.3.1 Isolierung adulter Ratten- oder Maus-Kardiomyozyten

Die Gewinnung adulter Kardiomyozyten erfolgte an der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage. Die Tiere wurden mittels Isofluran-Inhalation anästhesiert. Nach dem Eintritt der Anästhesie wurde schnellstmöglich der Thorax der Tiere eröffnet, das Herz freigelegt und 625 Injektionseinheiten (I.E.) Heparin in das linke Atrium injiziert. Anschließend wurde das Herz mit einem langen Aortenstumpf entnommen und das im Herzen verbleibende Blut sodann in einem Becherglas mit eisgekühlter Tyrodelösung (inklusive 1,25 mM Kalziumchlorid) behutsam ausgespült. Durch Einführen einer Kanüle in den Aortenstumpf erfolgte die Aufhängung des Herzens an der Langendorff-Apparatur zur Perfusion. Mithilfe einer Pumpe konnte das Herz mit einer Flussrate von 8-10 ml/min retrograd perfundiert werden (Langendorff-Perfusion). Die für die Perfusion verwendeten Lösungen wurden während des Isolationsprozesses mit 100 % Sauerstoff begast und auf 37 °C vorgewärmt. Die erstmals 1895 von Oscar Langendorff beschriebene Apparatur beruht auf dem Prinzip der Aufrechterhaltung der Herzfunktion durch die Zufuhr einer oxigenierten, alle notwendigen Nährstoffe enthaltenden Flüssigkeit über die Aorta ascendens. Die retrograde Applikation der Nährlösung über die Aorta ascendens bewirkt einen Verschluss der Aortenklappe und konsekutiv eine Perfusion der Koronargefäße (Langendorff et al., 1895). Zunächst erfolgte die Perfusion mit einer kalziumchloridhaltigen Tyrodelösung und zwar solange bis das Herz kräftig und regelmäßig zu schlagen begann. Im Anschluss folgte eine circa 5-minütige Perfusion mit 400 ml einer kalziumfreien Tyrodelösung bis zum vollständigen Sistieren der Perfusion. Danach wurde das Herz circa 15 bis 20 min mit einer kollagenasehaltigen Enzymlösung perfundiert, was dem Organ eine weiche Konsistenz verlieh. Jetzt konnten die Ventrikel vom Herz abgetrennt und in einem Erlenmeyerkolben mit der aufgefangenen Kollagenaselösung vorsichtig zerteilt werden.

Während der darauf folgenden 20-minütigen schüttelnden Inkubation bei 200 U/min und 37 °C wurde der Gewebeaufschluss fortgesetzt. Behutsames Auf- und Abpipettieren des verbleibenden Gewebes bewirkte, dass möglichst viele Zellen aus dem Zellverband gelöst werden konnten. Danach wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz gefiltert. Die Kollagenaselösung wurde in einer 1:1-Verdünnung mit Tyrodelösung mit 0,125 mM Kalzium verdünnt und eine Sedimentation der Zellen abgewartet. Nun wurde die Kollagenaselösung abgenommen, und es folgten mehrfache Waschvorgänge der Zellen mit Tyrodelösungen mit ansteigenden Kalziumkonzentrationen (0,125 mM, 0,24 mM, 0,5 mM und 1 mM). Nach dem letzten Sedimentationsschritt konnten die Zellen in M199-Medium mit Zusatz von 6 % Albumin überführt werden. Es folgte die Zellzählung nach Trypanblau-Färbung. Dafür wurden 40 µl Zellsuspension mit 40 µl Trypanblau-Lösung vermischt, um nicht-vitale Zellen kenntlich zu machen und die Morphologie der Zellen beurteilen zu können. Durchschnittlich betrug die Gesamtzahl an vitalen Zellen circa 4Mio bei einem Verhältnis von intakten Zellen zu der Gesamtzahl der mittels eines Mikroskops sichtbaren Zellen von etwa 70 %.

3.2.3.2 Isolierung und Kultivierung neonataler Ratten-Kardiomyozyten

Die Isolation neonataler Kardiomyozyten der Ratte erfolgte aus maximal zwei Tage alten Wistar-Ratten eines Wurfes aus der Tierzucht des European Neuroscience Institute, Göttingen.

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet, auf einer Styroporunterlage fixiert und mit Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde der Thorax eröffnet, das Herz freigelegt und die Ventrikel abgetrennt. Die Ventrikel wurden in einem Becherglas mit 1x PBS-Lösung gesammelt. Von nun an erfolgte die Isolation unter sterilen Bedingungen. Zu Beginn wurden die Herzen, die in eine 10 cm Zellkulturschale mit 3 ml einer Enzymlösung, bestehend aus 0,2 % Trypsin und 0,1 % Collagenase in 1x PBS überführt wurden, mechanisch mit einer Schere zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde dann in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Es folgten vier Inkubationsschritte, während derer das in der Enzymlösung befindliche Herzgewebe jeweils 14 min lang auf einer magnetischen Heizplatte bei 37 °C inkubierte und dabei mittels eines Rührmagneten mit einer Geschwindigkeit von 180 U/min gerührt wurde. Während dieser Phase der Isolation wurden die Zellen durch die Enzymaktivität aus dem Zellverband gelöst. Nach jedem abgeschlossenen Inkubationsschritt konnte der Überstand und damit die herausgelösten Zellen vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein vorbereitetes 50 ml Falcon-Röhrchen mit 37 °C warmen DMEM:F12-Medium überführt werden, welches dann im Zellkulturinkubator bei ebenfalls 37 °C gelagert wurde. Zu der im Erlenmeyerkolben verbleibenden Gewebesuspension wurden vor jedem Inkubationszyklus erneut 10 ml vorgewärmte Enzymlösung hinzugefügt. Die vier 50 ml Falcon-Röhrchen mit der Zellsuspension wurden nun bei 400× g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden in insgesamt 20 ml DMEM:F12-Medium resuspendiert und in einem der Röhrchen gesammelt. Um die Kardiomyozyten von anderen im Herzgewebe befindlichen Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten zu separieren, wurde die Zellsuspension für 45 min bei 37 °C in zwei 10 cm Zellkulturschalen inkubiert. Bei diesem so genannten Präplattieren adhärieren Fibroblasten im Gegensatz zu Kardiomyozyten rasch an unbeschichteten Oberflächen. Die im Medium-Überstand enthaltenen Kardiomyozyten wurden von den Platten abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Um verbleibende Fibroblasten im Folgenden am Wachstum zu hindern, wurde dem Kulturmedium ein Fibroblasten-Wachstumsinhibitor Cytosin-β-D-arabinofuranosid (AraC) zugefügt. Die Zellen konnten anschließend mithilfe einer Neubauer Zellzählkammer ausgezählt und auf zuvor mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert werden.

Die frisch isolierten Zellen wurden in 4:1-DMEM/M199-Medium ausplattiert. Nach 18h wurden die toten Zellen durch mehrmaliges Waschen mit DMEM-Medium entfernt und die adhärenten Zellen mit frischem 4:1-DMEM/M199-Medium versorgt. Im Anschluss daran erfolgte die adenovirale Transfektion der Zellen. Die Zellen wurden dann 24 bis 48h lang in einem Inkubationsschank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und im Anschluss im Rahmen des jeweiligen Versuchs weiterbearbeitet.

3.2.3.3 Herstellung des Miz1-Adenovirus AdMiz1

Um das Protein Miz1 in Kardiomyozyten überexprimieren zu können, wurden modifizierte Typ-5-Adenoviren als Gentransfervektoren hergestellt. Hierzu wurde die für das humane Miz1 kodierende cDNA mit einem N-Terminal Flag-Tag in einen Shuttle-Vektor (pCD515) kloniert. Dieser Vektor enthält neben der kodierenden DNA, unter Kontrolle eines CMV-Promoters (CMV = Zytomegalie-Virus) nur kurze Bereiche des viralen Genoms. Vervollständigt wird das virale Genom durch die sequenzspezifische Rekombination des Shuttle-Vektors mit einem größeren Vektor (pBHGfrtΔE1, 3FLP) (Hitt *et al.*, 2006) nach simultaner Lipofektion in QBI-HEK-293A-Zellen. Die Rekombination wird durch das Enzym FLP-Rekombinase katalysiert. QBI-HEK-293A-Zellen komplementieren das für die Virusreplikation essenzielle E1-Gen, welches aus dem Virus-Vektor deletiert wurde. Daher können sich die modifizierten Sicherheitsviren nur in diesen Zellen vermehren.

Die Transfektion der beiden Virusvektoren wurde basierend auf der Lipofektion-Methode durchgeführt. Hierzu wurden in 6-Well Schalen zu 80 % konfluent gewachsene QBI-HEK-293A-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Superfect (Qiagen, Hilden) für 2h mit je 0,5-1,5 µg DNA beider Plasmide und 8 µl Superfect pro Well transfiziert. Im Anschluss wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit einem Agarose-Medium-Overlay überschichtet. Dieser Overlay bestand aus je einem Teil Low Melting Point-Agarose (1,5 % LM GQT Agarose in ddH₂O, Severn Biotech Ltd.) und einem Teil zweifach konzentriertem basal Iscove-Medium. Nach circa 10-14 Tagen wurden Stellen lokaler Zelllyse im vorher konfluenten QBI-HEK-293A-Zellrasen (Plaques) mit einer Luer-Einwegspritze aus der Agarose einzeln ausgestanzt. Diese Plaques entsprechen jeweils einem Bereich, an dem es durch FLP-Rekombinase vermittelte Rekombination beider Plasmide zu einer klonalen Vermehrung des Virus in den Zellen gekommen

ist. Das Virus eines solchen Plaques wurde nun sukzessive vermehrt. Dafür wurden zuerst QBI-HEK-293A-Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale mit dem Virus infiziert und nach deren vollständiger Lyse der Überstand entnommen und damit eine größere Menge QBI-HEK-293A-Zellen in einer 175 cm Flasche infiziert. So entstand eine ausreichende Menge an virushaltigem Überstand für die Infektion von 15 cm-Zellkulturschalen. Die Kultur der infizierten HEK-Zellen erfolgte stets in basal Iscove-Medium mit 5 % FKS bei 37 °C und 5 % CO2. Nach der Lyse wurden die Zellen im Medium-Überstand geerntet und zur vollständigen Lyse der Zellen mit 0,1 % NP-40 versetzt und unter konstanter Bewegung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 25-minütige Zentrifugation bei 18000× g und 4 °C zur Pelletierung des Zelldetritus. Zum Überstand wurde anschließend ein halbes Vol 20 % Polyethylenglykol 8000/ 2,5 M NaCl zugegeben und die Suspension für 4h in einem 4°C kalten Eiswasserbad inkubiert, damit die Viruspartikel präzipitieren konnten. Die Viren wurden danach durch eine erneute 25-minütige Zentrifugation bei 18000 x g und 4 °C pelletiert und und im Anschluss daran unter kontinuierlicher Rotation in 11 ml PBS, pH 8,0, über Nacht gelöst. Die nachfolgende Zentrifugation bei 800× g für 2 min diente der Eliminierung von ungelösten Aggregaten. Durch Ultrazentrifugation bei 137000× g und 16 °C in einem Cäsiumchlorid-Dichtegradienten über 12h konnten reine Viruspartikel von beschädigten Viren und dem übrigen Zelldetritus getrennt werden. Das zelltoxische Cäsiumchlorid wurde durch zweifache Dialyse gegen je fünf Liter Sucrosepuffer (Nyberg-Hoffmann und Aguilar-Cordova, 1999) entfernt. Die Konzentrationsbestimmung des Virus erfolgte zunächst photometrisch bei 260 nm und diente als grober Anhaltspunkt für die Erstellung einer Verdünnungsreihe der Viruslösung. Diese wurden zur endgültigen Konzentrationsbestimmung in der oben beschriebenen Agarose-Overlay-Methode eingesetzt. Die Konzentration intakter Viruspartikel wurde in der Einheit plaque forming units (pfu)/ml bestimmt.

3.2.3.4 Adenovirale Transfektion von isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Bei dem adenoviralen Gentransfer handelt es sich um eine Methode der transienten Transfektion, bei der die DNA nicht in das Wirtsgenom integriert wird. Die Virusmenge für eine Transfektion wird in MOI (*multiplicity of infection*) angegeben. MOI ist definiert als die Anzahl aktiver Viruspartikel pro Zelle. Die biologische Aktivität eines hergestellten Virus basiert auf der im Plaque-Assay errechneten Viruskonzentration und wird gemessen in pfu/ml. Verschiedene MOI wurden zur Transfektion verwendet, um bestimmte Niveaus der genetischen Überexpression zu erreichen. Abhängig von der zu transfizierenden Zellzahl und der biologischen Virusaktivität wurde die benötigte Virusmenge für die gewünschte MOI berechnet und dem Kulturmedium der Zellen zugesetzt. Die neonatalen Kardiomyozyten wurden einen Tag nach der Isolation nach dem Abwaschen toter Zellen transfiziert und das Virus für 24 bis 48 h auf den Zellen belassen.

3.2.3.5 Immuncytochemische Färbung und Planimetrie von Kardiomyozyten neonataler Ratten

Durch α -adrenerge Stimulation können Kardiomyozyten neonataler Ratten zu hypertrophem Wachstum angeregt werden (Sugden und Clerk 1998). Für die Analyse der zellulären Hypertrophie wurden die Kardiomyozyten auf 2 Well Chamber Slides mit einer Permanox[™] Beschichtung ausplattiert (Nunc, Wiesbaden). Dabei dürfen sich kaum Kontakte zwischen den Zellen ausbilden, damit anschließend der Zellumfang von Einzelzellen bestimmt werden kann. Auf ein Well wurden jeweils 100000 Zellen ausplattiert. 18h nach der Zellisolation wurden die Zellen mehrfach gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Anschließend erfolgte der Adenovirale Gentransfer. Zur Induktion hypertrophen Wachstums wurde dem Medium Phenylephrin (10 mM) zugesetzt. 48h nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung in Methanol-Aceton im Verhältnis 7:3 bei -20 °C für 10 min Nach der Fixierung wurde erneut dreimal mit eiskaltem DPBS gewaschen, wobei der mittlere Waschschritt etwa 10 min bei RT inkubiert wurde. Daraufhin wurden die Zellen in 1 % BSA in DPBS bei 4 °C für mindestens 40 min geblockt. Dem Blocken schloss sich das erneute Waschen der Zellen in 1 % BSA in DPBS an. Die Permeabilisierung der Zellkerne erfolgte mit 0,1 % Triton X-100 in 1 % BSA in DPBS 10 min bei RT. Dann wurden die Zellen in 1 % BSA in DPBS für 30-40 min bei RT geblockt. Der primäre Antikörper Anti- α -Actinin (Sigma-Aldrich, München) ist spezifisch für α -kardiales Muskelactinin und wurde in einer 1:200-Verdünnung in 1 % BSA in DPBS eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 1h bei 37 °C. Nach drei erneuten Waschschritten wurde der Cy3 gekoppelte sekundäre Antikörper anti-mouse IgG in einer 1:600-Verdünnung ebenfalls für 1h bei 37 °C inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt fanden alle weiteren Inkubationsschritte im Dunkeln statt. Nach drei weiteren Waschschritten wurde DAPI zum Anfärben der Zellkerne in einer 1:5000-Verdünnung zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschritte in 1 % BSA in DPBS und ein Waschschritt in H₂O. Abschließend wurden zwei Tropfen VECTASHIELD Mounting Medium für Immunfluoreszenz (VectorLab, Burlingame, USA) zugegeben, Deckgläschen aufgesetzt und versiegelt. Die Auswertung des Versuches erfolgte verblindet. Für das Ausmessen der Kardiomyozyten wurde auf das Programm ImageJ Version 1.38 zurückgegriffen. Es wurden mindestens 200 Zellen pro Slide vermessen. Der Versuch wurde stets in Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Nukleinsäure Präparationen

3.3.1.1 Plasmid Mini-Präparation

Mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit wurden Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab vorgenommen. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse für den Aufschluss der Bakterien und macht sich die Eigenschaft von DNA zunutze in Anwesenheit eines hohen Salzgehaltes an eine Silica-Matrix zu binden (Birnboim und Doly, 1979; Birnboim, 1983). Einzelne Bakterienkolonien wurden dafür in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum aufgenommen und über Nacht in einem Schüttler bei ca. 250 U/min und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (4.000× g, 15 min, 4 °C). Das weitere Vorgehen vollzog sich nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Dabei baute sich bakterielle RNA bereits während der alkalischen Lyse durch die im Resuspendierungspuffer enthaltene RNase A ab. Plasmid-DNA wurde über Säulen, die mit einer Silica-Matrix in Membran-Format ausgestattet waren, und mehreren Zentrifugationsschritten aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde die Plasmid-DNA in 50 μl Elutionspuffer aufgenommen.

3.3.1.2 Plasmid Midi- und Maxi-Präparation

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde unter Verwendung des High Speed Midi-Kits oder High Speed Maxi-Kits eine Plasmidpräparation im großen Maßstab nach Angaben des Herstellers angefertigt. Zur Anzucht wurden 150 ml bzw. 250 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum und 300 µl bzw. 500 µl einer Vorkultur des gewünschten Klons inokuliert und bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien pelletiert (4.000× g, 20 min, 4 °C). Die Isolierung des Plasmids aus transformierten Bakterien beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Reinigung über Anionenaustauschersäulen. Die DNA wurde dabei unter geeigneten Niedrigsalz- und pH-Bedingungen an eine Anionenaustauschersäule gebunden. In einem Waschschritt bei mittlerer Salzkonzentration konnten RNA, Proteine, Farbstoffe und niedermolekulare Verunreinigungen entfernt werden. Die Plasmid-DNA wurde dann in einem Hochsalz-Puffer von der Anionenaustauschersäule eluiert. Die nachfolgende Isopropanol-Fällung diente dem gleichzeitigen Konzentrieren und Entsalzen. Die Plasmid-DNA wurde in einem letzten Schritt in einem Filter aufgefangen und nach einmaligem Waschen mit 70 %-igem Ethanol in 500 μ l Elutionspuffer aufgenommen und photometrisch vermessen.

3.3.1.3 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Die Ethanolfällung wurde eingesetzt, um DNA zu konzentrieren und sie von Salzverunreinigungen zu befreien. Alkoholische Lösungen haben im Vergleich zu wässrigen Lösungen niedrigere Dielektrizitätskonstanten. Dadurch wird die Bildung großer Molekülaggregate begünstigt. Durch Zugabe monovalenter Kationen werden die negativen Ladungen des Phosphatrückrats der DNA abgesättigt, die Abstoßung zwischen den Molekülen verringert und die Aggregatbildung verstärkt. Dadurch fällt die DNA aus. Damit die DNA konzentriert und von Salzverunreinigungen befreit werden konnte, wurde die Ethanolfällung eingesetzt. Zur Fällung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurde der Ansatz mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2), 2,5 Vol 96 %-igem Ethanol und 0,5 μ l Glycogen versetzt. Die Präzipitation erfolgte durch eine Übernachtinkubation bei -20 °C. Der Ansatz wurde für 20 min bei 13000× g zentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in einem entsprechenden Volumen H₂O aufgenommen.

3.3.1.4 Genomische DNA-Isolierung aus Patientenblut

Mittels des QIAamp Blood Maxi Kit QIAGEN (Hilden, Deutschland, 1997) ließ sich die DNA aus Vollblut isolieren. Hierzu wurden 5 ml tiefgefrorenes EDTA-Blut aufgetaut und mit 500 µl QIAGEN Protease und 6 ml Lysispuffer versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 70 °C im Wasserbad kamen 5 ml absolute Ethanol hinzu. Diese Lösung wurde gut gemischt, auf die QIAamp Maxi Säule gegeben und bei 3000x g 3 min zentrifugiert. Darauf folgten zwei Waschschritte, zuerst mit 5 ml Puffer AW1, dann mit 5 ml Puffer AW2 mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 5000x g für 1 bzw. 15 min Durch Hinzufügen von 600 µl Puffer AE und 5-minütiger Inkubation konnte nun die DNA von der Säule eluiert werden. Dies geschah wiederum durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000x g, um das gesamte Eluat zu gewinnen. Die DNA-Konzentration konnte nun photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt werden.

3.3.1.5 gDNA Isolierung aus Gewebe

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde benutzt um die genomische DNA (gDNA) aus Mausschwanzbiopsien, isolierten Kardiomyozyten oder Mäuseherzbiopsien zu extrahieren und dient der Reinigung der DNA von Proteinen und Membranbestandteilen (Kirby *et al.*, 1956; Marmur *et al.*, 1960). Die gefrorenen Proben wurden in Proteinase K-haltigem Puffer versetzt und über Nacht bei 56 °C lysiert. Die Herzbiopsien wurden vorab bis zu Pulver zermörsert. Die lysierten Proben wurden mit gleichen Volumina Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und 30 min lang sanft am Drehrad gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 16000× g für 2-5 min Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Extraktion nun mit 1 Vol Chloroform wiederholt. Die sich in der wässrigen Phase befindende DNA wurde anschließend einer Ethanolfällung unterzogen.

3.3.1.6 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen und Gewebe

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen und Gewebe wurde das peqGOLD TriFast[®] -Reagenz (PEQIab, Erlangen) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen (als trockenes Pellet oder direkt auf der trockenen Kulturschale) oder ca. 100 mg Gewebepulver wurden mit 1 ml Trizol-Reagenz aufgeschlossen, abgeschabt, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur 3 min inkubiert und zwischendurch gevortext. Dann erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 12000x g bei 4 °C. Der Überstand, ca. 950 µl, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden zur Phasentrennung 200 µl Chloroform zugesetzt, 15 sec vorsichtig geschwenkt, 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und bei 12000x g, 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol konnte die RNA gefällt und mit der RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben weiter bearbeitet werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Photometer (NanoDrop) bei einer Absorption von 260 nm.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde deren Absorption bei 260nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1cm) bestimmt. Eine Absorptionseinheit entspricht hier 50µg/ml DNA. Durch Messung bei 280nm und der Bestimmung des Quotienten A260/A280 kann die Reinheit einer DNA-Präparation abgeschätzt werden. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A260/A280 von 1,8±0,2 aufweisen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte ebenfalls bei einer Absorption von 260nm. Eine Absorptionseinheit entspricht hier 40µg/ml RNA. Zur Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA wurde außerdem das NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientifique) verwendet. Für dieses Gerät benötigt man keine Messküvetten, zur Konzentrationsbestimmung werden lediglich 1-2µl der wässrigen DNA- oder RNA-Lösung auf einen Messpunkt pipettiert. Infolge des Herunterklappens eines Messarms entsteht eine Flüssigkeitssäule über dem Messpunkt, durch die die Messung zwischen den Enden zweier optischer Fasern durchgeführt wird.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenereaktion (PCR) wurde ein DNA-Abschnitt mit der thermostabilen *Taq*-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, amplifiziert (Mullis *et al.*, 2005). Die PCR begann mit einem Denaturierungsschritt, der standardmäßig 4 min bei 94 °C erfolgt. Anschließend wurden 25 bis 30 Standardzyklen gefahren. Dabei wurde die DNA bei hohen Temperaturen denaturiert (94 °C für 1 min), anschließend wurden spezifische Oligonukleotide bei einer bestimmten Temperatur hybridisiert, und die Strangsynthese fand bei 72 °C statt, was dem katalytischen Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase entspricht.

Tabelle 11: Pipettierschema einer PCR

Komponente	Menge
DNA	200 ng
dNTP-Mix	0,5 μl
Primer for	1 μl
Primer rev	1 μl
Puffer Taq	5 μl
MgCl ₂	4 μl
Polymerase Taq	0,5 μl
H ₂ 0	Add to 50 µl

Die Amplifizierung erfolgte im Thermocycler mit folgenden Schritten:

Tabelle 12: Thermocycler-Ablauf einer PCR

	Reaktion	Zeitdauer	Temperatur	Zyklen
1.	Vordenaturierung	3 min	94°C	1X
2.	Denaturierung	1 min	94°C	J
3.	Annealing	1 min	Primer spezifisch	> 30X
4.	Elongation	5 min	72°C	J
5.	Denaturierung	30 sec	94°C	1X
6.	Hold	~	4°C	

Die PCR-Produkte wurden auf 1-2 %-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und analysiert.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese dient dem Nachweis und der Größenauftrennung von DNA. Dabei wird eine interkalierende Substanz, Ethidiumbromid, verwendet, die durch UV-Licht zur Fluoreszenz im sichtbaren Bereich angeregt wird. Je nach gewünschter Trenneigenschaft wurde die Agarose abgewogen (meistens 1 bis 2 % w/v) und in 1x TBE Puffer aufgekocht. Zu 100 ml der Agaroselösung wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 %-ig) gegeben und das Gel handwarm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit entsprechenden Volumina des 6x Probenpuffers versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 80 bis 120 Volt. Zur

Größenabschätzung wurde ein DNA-Standard GeneRuler Ladder Mix von Fermentas verwendet. Zur Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

3.3.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in einem DNA-Doppelstrang und schneiden beide Stränge an definierten Stellen (Restriktionsverdau). Pufferbedingungen und eingesetzte Enzymkonzentrationen erfolgten laut Herstellerangaben. Der analytische Restriktionsverdau wurde in Volumen von 10 bis 80 µl durchgeführt. Pro µg DNA wurden 0,5 bis 1 Enzym-Unit zugesetzt und der Reaktionsansatz für 1 bis 16h bei der vorgegebenen Temperatur (üblicherweise 37 °C) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung oder durch Zugabe von EDTA gestoppt. Die Vollständigkeit der Reaktion und das entstandene DNA-Fragmentmuster wurden durch Analyse von Aliquots auf Agarosegelen untersucht.

3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurden beide DNA-Fraktionen, die zuvor mit gleichartigen Restriktionsenzymen verdaut wurden, in hochreiner Form in einem Reaktionsvolumen von 10-20 μl vereinigt. Dabei wurden 20 bis 50 ng Vektor-DNA und ein 5- bis 10-facher Überschuss an Insert-DNA eingesetzt. Der Ligationsansatz mit T4 DNA-Ligase wurde entweder 12h bei 16 °C oder 1h bei 37 °C inkubiert.

3.3.7 5'-Dephosphorylierung von Vektoren

Um eine Religation linearisierter Plasmid-DNA zu verhindern, wurde falls nötig, eine Dephosphorylierung durchgeführt. Die endständigen 5'-Phosphatgruppen des DNA-Plasmids wurden mit Hilfe des Enzyms Shrimp Alkaline Phosphatase entfernt. Dazu wurde die DNA mit 1 U Shrimp Alkaline Phosphatase pro µg DNA für 1h bei 37 °C inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte für 15 min bei 65 °C.

3.3.8 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen von DNA führten die Abteilung Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen und die Firma Eurofins MWG Operon durch.

3.3.9 Southern Blot-Analyse

Für den Southern Blot wurden je 15-20 µg genomische DNA einer Restriktionsspaltung unterzogen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde im Gel mit Ethidiumbromid angefôrbt, fotografiert und danach bei RT unter Schötteln för 15 min in 0,25 M HCl inkubiert. Dadurch kommt es zur partiellen Depurinierung und infolgedessen zur Fragmentierung der DNA, wodurch der spôtere Transfer groier Fragmente verbessert wird. Anschlieiend erfolgte eine 30minótige Inkubation in Denaturierungsl¢sung und eine 45-minótige Inkubation in Neutralisierungsl¢sung. Die so behandelte einzelstrôngige DNA wurde durch ein modifiziertes Kapillarblotting-Verfahren mit einem Turbo-Blotter™ der Firma Schleicher & Schöll (Dassel) auf eine Hybond XL-Nylonmembran mit nukleinsõurebindenden Eigenschaften óbertragen und durch Quervernetzung mit UV-Licht (UV Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg, 254 nm, 120 mJ) fixiert (Southern, 1975). Der Southern Blot wurde den Herstellerangaben folgend mit 20X SSC als Transferpuffer durchgeföhrt und erfolgte för 6-16 h bei RT.

3.3.9.1 Random-prime-Markierung

Für die Markierung von DNA-Fragmenten mit [α 32P]-Isotopen wurde das RediprimeTM Random labelling Kit II (GE-Healthcare, München) verwendet. Die Methode basiert auf dem Prinzip des random priming, welches von Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelt wurde. Der Reaktionsmix enthält dATP, dGTP, dTTP, Klenow Fragment (4-8 U) und zufällige Oligodesoxyribonukleotide, hauptsächlich Nonamere. 25-50 ng der DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 45 µl bei 100 °C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Probe wurde dann in das Rediprime-Reaktionsgefäß überführt, 4 µl [α 32P] dCTP (40 µCi) zugegeben und gut gemischt. Die Markierungsreaktion erfolgte bei 37 °C für 30 bis 60 min Anschließend wurde die markierte DNA mithilfe einer MicroSpin S-200HR Säule (GE-Healthcare, München), den Herstellerangaben folgend, von nicht eingebautem [α 32P] dCTP befreit.

3.3.9.2 Hybridisierung membran-gebundener DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur Verminderung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit der fixierten DNA für mindestens 2h bei 65 °C mit denaturiertem Lachsspermien-DNA haltigem Rapid-Hyb-Puffer (GE-Healthcare, München) im Rollofen (Bachofer, Reutlingen) prähybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte Sonde zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter den gleichen Bedingungen wie die Prähybridisierung. Nach der Hybridisierung folgten mehrere Waschschritte: zunächst 15 min in 2× SSC, dann 10 min in 2× SSC mit 0,1 % SDS und zuletzt so lange in 0,2× SSC bei 65 °C, bis die Hintergrundaktivität ausreichend abgenommen hatte. Die Membran wurde getrocknet, eingeschweißt und mit einem Autoradiografie-Film in eine Kassette eingelegt. Der Film wurde dann bei -70 °C je nach Aktivität einen Tag bis eine Woche exponiert und anschließend entwickelt.

3.3.10 cDNA-Synthese

Um die Transkription eines Gens nachzuweisen, muss die abgelesene RNA untersucht werden. Daher wird zuerst eine reverse Transkription durchgeführt. Hierbei werden mithilfe einer RNAabhängigen DNA-Polymerase 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben, welche im Anschluss als Ausgangsmaterial in einer PCR verwendet werden kann, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Dazu wurde auf das SuperScript[™] First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Karlsruhe) zurückgegriffen und das Protokoll nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Loh *et al.*, 1989).

Komponente	Menge	Zeitdauer	Temperatur
RNA	500ng	5 min	25°C
Master-Mix	4 µl	30 min	42°C
Reverse transcriptase	1 µl	5 min	85°C
H ₂ 0	Add to 20 μl	Hold	4°C

Tabelle 13: Pipettierschema und Thermocycler-Ablauf einer cDNA-Synthese

3.3.11 Real Time-PCR

Im Vergleich zur der normalen PCR, bei der DNA-Produkte qualitativ nachgewiesen werden, ist es mittles der Real Time- oder quantitativen-PCR möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu machen. Bei der Real Time-PCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Amplifikation der DNA zu verfolgen. Die in dieser Arbeit verwendete Substanz ist das interkalierende SYBR Green, welches im interkalierten Zustand unter UV-Bestrahlung (494 nm) Licht bei 521 nm emittiert. Der Anstieg dieser Fluoreszenz ist hierbei proportional zur amplifizierten DNA-Menge und kann mit entsprechenden Photosensoren gemessen werden. Bei dem verwendeten *Lightcycler* handelte es sich um das iCycler™ iQ5- System von Bio-Rad. Die generierten Daten wurden mithilfe der iCycler™ iQ5 Optical Systemsoftware Version 2.0 von Bio-Rad ausgewertet.

Tabelle 14: Pipettierschema der Real Time-PCR

Komponente	Menge
cDNA (verd. 1:1)	2,5 μl
SYBR Green-Mix	10 µl
Primer for	1 µl
Primer rev	1 µl
H ₂ 0	5 <i>,</i> 5 μl

Tabelle 15: Thermocycler-Ablauf der Real Time-PCR

	Reaktion	Zeitdauer	Temperatur	Zyklen
1.	Vordenaturierung	3 min	95°C	1X
2.	Denaturierung	30 sec	94°C)
3.	Annealing	30 sec	58°C	} 40X
4.	Elongation	30 sec	72°C	J
5.	Denaturierung	1 min	95°C	1X
6.	Elongation	1 min	55°C	1X
7.	Schmelzkurve	+0,5°C/10 sec	55°C - 95°C	80X
8.	Hold	~	4°C	

3.4 Protein-analytische Methoden

3.4.1 Protein-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Zur Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten aus eukaryotischen Zellen wurden die bewachsenen Zellkulturschalen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde NP40-Puffer je nach Schalengröße und Zelldichte auf die Zellen gegeben (für 10 cm Schalen z.B. 150 μl) und 15 min auf Eis inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte mit einem Gummischaber. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 10000× g und 4 °C pelletiert. Die Protein-Konzentrationen im Überstand wurden ermittelt und der Gesamtzellproteinextrakt bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Protein-Isolierung aus Gewebe

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und sofort präpariert. Die Organe (meist Herz, Leber, Hirn, Skelettmuskel, Nieren und Milz) wurden entnommen, mit eiskaltem PBS gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung bis zur Probenaufbereitung erfolgte bei -80 °C.

Zur Isolierung der Proteine wurden zu 100-200 mg in Stickstoff gefrorenem Gewebe 300-500 µl frisch angesetzter Homogenisierungspuffer gegeben und das Material umgehend mittels eines Rotor-Stator Homogenisators der Firma ART Labortechnik (Mühlheim) auf höchster Stufe homogenisiert. Die nichtlöslichen Bestandteile wurden 10 min bei 8000× g abzentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde nach der Konzentrationsbestimmung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen wird mit der Bicinchoninsäure Methode ermittelt (Smith et al.,

1985). Die Reaktion wird in 96-Well-Mikrotiterplatten mit gebrauchsfertigen BCATM Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) durchgeführt. Zu je 25 μ l einer 1:20 verdünnten Proteinlösung wurden 200 μ l des BCA-Reagenz gegeben und die Ansätze für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsprinzip dieser Nachweismethode basiert darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu²⁺-Ionen zu Cu¹⁺-Ionen reduzieren, die dann mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden. Die Menge dieses Farbstoffkomplexes wird bei 562 nm in einem μ Quant Universal Microplate-Spektralphotometer (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA) bestimmt, wobei sich der lineare Messbereich von 0 bis 2 mg Protein/ml erstreckt.

3.4.4 Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen aufgrund ihrer relativen Molekulargewichte erfolgt mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970). Die Proteine werden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS Moleküle (SDS = sodium dodecyl sulfate) im Probenpuffer proportional zur Anzahl ihrer Aminosäuren mit negativen Ladungen besetzt, so dass sie in einem elektrischen Feld nach ihrer Ladung bzw. Größe aufgetrennt werden können. Die Auftrennung wird mit Acrylamid/Bisacrylamid-Sammelgelen von 4 % und Trenngelen von 8, 10 oder 12 % in einer Mini Protean II-Kammer (Bio-Rad, München) mit den Gelmaßen von 80 x 55 x 1,5 mm durchgeführt. Die Zusammensetzung des Sammelgels und der Trenngele ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Lösungen	Sammelgel 4 %	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
Acrylamid/Bisacrylamid	670 μl	3,75 ml	5 ml	6 ml
4x Sammelgelpuffer (Tris/SDS pH6,8)	1,25 ml	-	-	-
4x Trenngelpuffer (Tris/SDS pH8,8)	-	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml

Tabelle 16: Pipettierschema von Sammel und Trenngelen für SDS-PAGE

Lösungen	Sammelgel 4 %	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
Acrylamid/Bisacrylamid	670 μl	3,75 ml	5 ml	6 ml
ddH₂O	3,08 ml	7,5 ml	6,25 ml	5,25 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS (10 %)	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Die Proteinlysate werden mit 5-fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min auf 96 °C oder 65 °C erhitzt. Das Probenvolumen beträgt maximal 25 μl pro Tasche und eine Proteinmenge von 50 μg.

Die Elektrophorese erfolgt während des Einlaufens in das Sammelgel zunächst für etwa 15 min bei 20 mA, die eigentliche Auftrennung beginnt mit Erreichen des Trenngels und wird für etwa 60 min bei 40 mA durchgeführt. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde parallel zu den Proteinproben ein vorgefärbter Proteinstandard (Bio-Rad Laboratories, München) aufgetragen.

3.4.5 Western Blot

Um die Proteine immunologisch nachweisen zu können, erfolgte zunächst ein elektrophoretischer Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran® Nitrcellulose Transfer Membran, Whatman®, Dassel). Der Transfer wurde nach dem Tank-Blot-System der Firma Bio-Rad Laboratories (München) durchgeführt. Zwei Schwämme, vier Whatman GB003 Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) und eine Nitrozellulose-Membran wurden kurz in Transferpuffer getränkt. Nach dem Prinzip des Sandwich-Modells wurden auf einen Schwamm zwei Filterpapiere, die Membran und das PAGE-Gel luftblasenfrei in die Kassette gestapelt. Zwei weitere Filterpapiere und ein Schwamm wurden aufgelegt und die geschlossene Kassette in den mit Transferpuffer gefüllten Tank eingehängt. Die SDS-Protein-Komplexe wurden aus dem Gel auf die Membran in Richtung Anode bei 500 mA für 2h transferiert. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran im Anschluss mittels Ponceau-Rot reversibel gefärbt, während die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure gleichzeitig die Proteine auf der Membran fixierte.

3.4.6 Detektion von membran-gebundenem Protein

Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, wurde die Membran zunächst in 1x TBS-Tween (TBST) mit 5 % Magermilchpulver für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach kurzem Waschen in 1x TBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei einer für den jeweiligen Antikörper entsprechenden Verdünnung in 1x TBST/ 0,5 % Magermilchpulver bei 4 °C über Nacht oder für 1-2h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran 3x für 5 min in 1x TBST gewaschen und mit einem entsprechenden HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in 1x TBST/ 0,5 % Magermilchpulver für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 3x für 10 min in 1x TBST gewaschen. Währenddessen wurden pro Membran 4 ml ECL-Arbeitslösung (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) aus einer 1:1 Mischung von Luminol/Enhancer-Lösung und stabiler Peroxid-Lösung angesetzt. Die Lösung wurde auf die Membran gegeben und für 5 min inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz-Reaktion aus. Zuletzt wurde die abgetropfte Membran in Klarsichtfolie eingelegt und in eine Röntgenkassette gelegt. Ein Röntgenfilm (Super RX, Fujifilm, Düsseldorf) wurde in der Dunkelkammer aufgelegt und nach 1 min entwickelt. Je nach Intensität der Banden konnte die Belichtungszeit verlängert oder verkürzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Antikörper benutzt:

Tabelle 17: Gebrauchsanweisung von primären Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Inkubation
ANP	1:200	ü. N. 4 °C
anti-α Actinin (Sarcomeric)	1:2000	2h RT
Bcl2	1:1000	ü. N. 4 °C
Calcineurin	1:1000	ü. N. 4 °C

Primäre Antikörper	Verdünnung	Inkubation
ANP	1:200	ü. N. 4 °C
CRSP3 (MLP)	1:5000	2h RT
Cytochrom C	1:1000	ü. N. 4 °C
Flag M2	1:5000	2h RT
GAPDH (Clone 6C5)	1:20000	2h RT
HA-tag (6E2)	1:1000	ü. N. 4 °C
Miz1 (10E2)	1:200	ü. N. RT
Miz1 (B-10)	1:1000	ü. N. RT
Miz1 (H-190)	1:500	ü. N. 4 °C
Miz1 (N17)	1:500	ü. N. 4 °C
NFATc2	1:500	ü. N. 4 °C

3.4.7 Koimmunpräzipitation

Mithilfe der Koimmunpräzipitation kann man die Interaktion von Proteinen in Zellysaten aus der Zellkultur oder aus Organen untersuchen. Dabei kann man sowohl die Interaktion bekannter Partner analysieren als auch nach neuen Interaktionspartnern für ein Protein suchen.

Für die Immunpräzipitation wurde über Nacht 500 μg Proteinlysat mit 2 μg Antikörper bei 4 °C unter Schwenken am Drehrad inkubiert. Dann wurde das Protein-Antikörpergemisch auf eine vorher mit 500 μl Homogenisierungspuffer gewaschene Protein-Sepharose A/G gegeben und für 2h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Hierbei bildete der am Epitop gebundene Antikörper einen Komplex mit dem Protein A/G an der Sepharose aus.

Nach zwei Waschschritten, die zur Eliminierung unspezifisch bindender Proteine und Proteinen aus dem Überstand diente, wurde ein letzter Waschschritt mit Wasser durchgeführt. Um die gebundenen Proteinkomplexe von der Sepharose abzulösen und zu denaturieren, wurden 50 μ l 2× Laemmli-Puffer auf das Sepharose-Pellet gegeben und 5 min bei 65 °C gekocht. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand weiter mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.5 Sonstige Methoden

3.5.1 Bioinformatische Analyse und Werkzeuge

Tabelle 18: Bioinformatische Analyse und Werkzeuge

Programm	Verwendung
Axio-Vision 4.0	Fluoreszenzmikroskopie
(Carl Zeiss, Hamburg)	
BLAST-Programm (Altschul et al., 1990)	Analyse von DNA-Sequenzen
http://www.ncbi.nlm.nih.gov	
	Überprüfung der Spezifität von
BLAST-Search (Kent, 2002)	Primern
http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat	
Clone Manager Professional suite 8	Erstellung von Klonierungsstrategien
(Scientific & Educational software, USA)	und Veranschaulichen von Sequenzen
GraphPad Prism	Statistische Auswertungen
(Version 5.0)	
ImageJ1.38	Vermessung von Zelloberflächen
http://rsb.info.nih.gov/ij/	
IQ5	Auswertung von Real Time-PCR-Daten
(Bio-Rad Laboratories, München)	
Primer3	Auswahl von Oligonukleotiden für PCR
http://frodo.wi.mit.edu/cgi-	
bin/primer3/primer3_www.cgi	
	Auswahl von miRNAs
BLOCK-iT™ RNAi Designer	
https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/	

3.5.2 Statistische Auswertungen von Daten

Die statistischen Auswertungen der erhobenen Daten erfolgten unter Verwendung des Programms GraphPad-Prism, Version 5.0. Für die Berechnung von statistischen Signifikanzen wurde, wenn nicht anders angegeben, der Student's t-Test angewendet. Die Fehlerbalken in den Grafiken entsprechen, sofern nicht anders vermerkt, dem Standard error of the mean (SEM).

4 Ergebnisse

4.1 Mutationen der Miz1 kodierenden Sequenz bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie

Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Professor Knöll (Myocardial genetics, Imperial College London) wurden im Rahmen einer Studie nach Interaktionspartnern vom Muskel LIM Protein (MLP) gesucht. MLP spielt eine zentrale Rolle für die biomechanische Funktion des Herzmuskelapparates (Knöll *et.al*, 2002). Das *Myc-interacting zinc finger protein* 1 (Miz1) wurde durch ein *yeast two hybrid screen* als MLP interagierendes Protein identifiziert (Knöll, unpubliziert). Bei Miz1 handelt es sich um ein Protein mit bisher unbekannter Funktion. Das humane Miz1-Gen besteht aus 16 Exons und kodiert ein 803 Aminosäuren langes Protein. Miz1 enthält einen Poxvirus und eine Zinkfingerdomäne (POZ-Domäne) von 120 Aminosäuren am Amino-Terminus und 13 Zinkfingern des Cys2-His2-Typs.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde durch eine Western Blot-Analyse am Herzmaterial von Patienten mit ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie festgestellt, dass das Miz1-Protein bei diesen Patienten im Vergleich zu Kontrollen herunterreguliert ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Mutationen im Miz1-Gen direkt an der Entstehung dieser Erkrankungen beteiligt sind. Das Screening von gesunden und kranken Probanden wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Professor Knöll durchgeführt. Die Analyse und die Auswertung der Sequenzen erfolgten mit der Unterstützung von Dr. Sylvia Gunkel.

Alle 16 Exons der Miz1 kodierenden Sequenz wurden bei 94 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie auf Mutationen untersucht. Bei einer Patientin wurde eine Nukleotidsubstitution ($C \rightarrow T$) im Exon 6 gefunden, die einen Aminosäureaustausch (A188V-Miz1) bewirkt. An der Stelle 188 ist die Aminosäure Alanin (A) gegen Valin (V) ausgetauscht. Diese heterozygote A188V-Miz1 Mutation befindet sich in keiner der SNP-Datenbanken (SNP = single nucleotide polymorphism). Der Bereich der Mutation ist in der Evolution hoch konserviert. Der Sohn der 50-jährigen Indexpatientin trägt dieselbe Mutation, ist aber bis jetzt kardiologisch unauffällig. Der Stammbaum der Familie zeigt, dass Todesfälle durch plötzlichen Herztod sehr häufig bei Personen im Alter zwischen 53 und 78 Jahren vorkommen.



Abbildung 4.6: Mutation der Miz1 kodierenden Sequenz bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie: A. Die Sequenzanalyse von Exon 6 zeigt eine heterozygote Mutation C/T (roter Pfeil). Diese führt zu einem Aminosäureaustausch in Position 188 (A188V-Miz1). B. Der Speziesvergleich zeigt eine evolutionsbedingte Konservierung der mutierten Aminosäure 188 Alanin (A) (roter Pfeil). C. Der Familienstammbaum der Indexpatientin (schwarzer Pfeil) zeigt an, dass Todesfälle durch plötzlichen Herztod häufig vorkommen. Im Exon 6 des Miz1-Gens wurde eine Mutation gefunden (A188V-Miz1), die mit Kardiomyopathien in Zusammenhang gebracht werden könnte.

Um auszuschließen, dass es sich bei der identifizierten A188V-Miz1 Mutation in Exon 6 des Miz1-Gens um einen *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) handelt, wurden 350 gesunde Probanden auf diese Mutation untersucht. SNPs sind häufig vorkommende Varianten einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang, die monogenetisch harmlos sind. Keiner der 700 untersuchten Chromosomenabschnitte trug eine Mutation in der Aminosäure 188 des Miz1-Gens. Die A188V-Miz1-Mutation wurde trotz Analyse von 400 weiteren Patienten mit dilativer Kardiomyopatie und bei keinem diesen Patienten identifiziert. Somit stellt die seltene A188V-Miz1-Mutation keinen Polymorphismus dar.

Damit ausgeschlossen werden kann, dass die Kardiomyopathie der Indexpatientin auf Mutationen in anderen Kandidatengenen für dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie zurückzuführen ist, wurde die Patientin auf Mutationen in folgenden Genen untersucht: Myosin-binding protein C (MYBPC3), Myosin heavy chain 7 (MYH7), Myosin light chain 2 (MYL2), Troponin I typ 3 (TNNI3), Troponin T typ 2 (TNNT2) und Muscle LIM protein (MLP). Auch Gene, die für myokardiale Ionenkanäle kodieren, wie Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1 (KCNQ1), Potassium voltage-gated channel Vsk-related family member 1 und 2 (KCNE1 und KCNE2) und Sodium channel voltage-gated type V alpha Subunit (SCN5A), welche an der Entstehung von Herzrhythmusstörung beteiligt sein können, wurden sequenziert. Alle diese Gene waren frei von Mutationen und somit nicht an der Krankheit der Patientin beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dass die A188V-Miz1-Mutation der Indexpatientin warhscheinlich gezeigt, krankheitsauslösend ist.

4.2 In Vitro-Analyse der Miz1-Funktion

4.2.1 Calcineurin Luciferase-Assay in JEG-3-Zellen

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde Miz1 in einem *yeast two hybrid* screen als Interaktionspartner von MLP identifiziert (Knöll, unpubliziert). 2005 haben Heinecke und seine Mitarbeiter beobachtet, dass die Bindung von MLP und Calcineurin (CnA) an der Z-Scheibe für den NFAT-Signalweg von großer Bedeutung ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob Miz1 die CnA-Expression durch seine Interaktion mit MLP beeinflussen kann.

Der vollständige Promotor der Calcineurin A-beta-Untereinheit (CnAβ-Promotor 2322 bp) der Maus aus die Arbeit von Oka (2005) und freundlicherweise von Jeffery Molkentin zur Verfügung gestellt wurde in den Luciferase-Vektor pXP2 kloniert. Mitttels CaCl₂-Transfektion wurden die Plasmide pcDNA3-Miz1 bzw. pcDNA3-A188V-Miz1 in der Chorionkarzinom Zelllinie JEG-3 transient transfiziert. Um die Transfektionseffizienz beurteilen zu können, wurde ein GFP-Plasmid als Transfektionskontrolle immer mittransfiziert. Die Messung des Fluoreszenzsignals und der Luciferase-Aktivität erfolgte 36h bzw. 48h nach der Transfektion.

Die Kontrollzellen für die basale Luciferase-Aktivität wurden zusätzlich zu dem CnAβ-Promotor Luciferase-Plasmid mit einem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert. Es wurden jeweils 600 ng der Plasmid pcDNA3-Miz1 bzw. pcDNA3-A188V-Miz1 verwendet. Für die Auswertungen in Abbildung 4.2 wurden drei biologische Replikate ausgewertet. Bei der angegebenen RLU (*Relative Light Unit*) handelt es sich um eine einheitslose Größe der Luciferase-Aktivität. Die RLU wurden relativ zum Mittelwert des Luciferase-Signals der Kontrollzellen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Miz1 in der Lage war, die Luciferase-Aktivität des CnAβ-Promotors signifikant zu erhöhen. (Kontrolle 1,00±0,043; Miz1 4,895±1,04; n=3; *<0,05). Die A188V-Miz1 mutierte Variante, die oben beschrieben wurde, bewirkt nur eine Verdoppelung der CnAβ-Promotoraktivität im Vergleich zu der basalen Aktivität der Kontrollzellen.



Abbildung 4.2: Calcineurin Luciferase-Assay in JEG-3-Zellen. Es sollte untersucht werden, ob Miz1 durch seine mögliche Bindung an MLP einen Einfluss auf die Calcineurin-Aktivität hat. Dafür wurden zusätzlich zum GFP- und CnAβ-Promotor-Luciferase Plasmid folgende Plasmide transfiziert: pcDNA3-leer (Kontrolle), pcDNA3-Miz1 und pcDNA3-A188V-Miz1. Zwei Tage nach der CaCl₂-Transfektion wurden die JEG-3-Zellen lysiert und das Luciferase-Signal gemessen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die RLU (*Relative Light Unit*) wurde relativ zum Mittelwert des basalen Luciferase-Signals der Kontrollzellen gemessen. Es zeigte sich, dass Miz1 und A188V-Miz1 in der Lage waren den Calcineurin Promotor um das 5-fache bzw. das 2-fache. (*<0,05) zu aktivieren.
4.3 Koimmunopräzipitation von Miz1 und seinen potenziellen Bindungspartnern

Die Aufklärung des Interaktionsverhaltens von Miz1 kann einen wichtigen Beitrag zur funktionellen Charakterisierung dieses Moleküls leisten. Der Luciferase-Assay hat gezeigt, dass Miz1 in der Lage ist, den Calcineurin-Promotor zu aktivieren. Jetzt sollte durch eine Koimmunopräzipitation gezeigt werden, dass diese Proteine direkt oder indirekt miteinander interagieren. 500 µg Proteinlysat aus einem Mausherzen wurden mit Miz1 (B10)-Antikörper oder mit CnA-Antikörper immunpräzipitiert. Das Gemisch aus Proteinlysat und Antikörper wurde auf eine Protein A/G Sepharose gegeben. Nach mehreren Waschschritten wurde die Elutionsfraktion anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Für die Kontrolle des Herzlysats wurden als Input 30 µg Protein auf den SDS-PAGE aufgetragen. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt.

In der Probe, in der Miz1 immunpräzipitiert wurde, waren Calcineurin (CnA 61 KDa) und MLP (20 KDa) in der Elutionsfraktion detektierbar. Die Probe mit CnA Immunpräzipitation zeigte deutliche Miz1- (100 KDa) und MLP-Signale in der Elutionsfraktion. Somit wurde die Interaktion von CnA und MLP bestätigt. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch eine neue Interaktion von Miz1 mit MLP und Calcineurin im Herzen durch Immunpräzipitation gezeigt.



Abbildung 4.3: Interaktion von Miz1 mit MLP und Calcineurin durch Koimmunpräzipitation. 500 µg Myokardlysat von einer FVB-Maus wurde mit Miz1- oder CnA-Antikörper immunpräzipitiert. Als Kontrolle (Input) wurden 30 µg Herzlysat aufgetragen und mit der Elutionsfraktionen aus der Immunopräzipitation mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dargestellt ist ein Beispiel aus drei voneinander unabhängigen Versuchreihen. In der Elution des Miz1-Immunpräzipitats wurden CnA und MLP nachgewiesen. Das

Herzlysat, welches mit CnA immunpräzipitiert wurde, zeigte in der Elutionsfraktion Signale von Miz1 und MLP. Miz1 interagiert mit MLP und CnA im Herzen.

4.4 Subzelluläre Lokalisation von endogenem Miz1 in adulten Maus-Kardiomyozyten

Um den Aspekt der Interaktion von Miz1 mit MLP und Calcineurin näher zu beleuchten, wurde die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine in adulten Maus-Kardiomyozyten untersucht. Sowohl MLP als auch Calcineurin sind mit dem kardialen α-Actinin (Alpha-Actinin) an der Z-Scheibe kolokalisiert (Frey *et.al*, 2000; Heinecke *et.al*, 2005). In Vorversuchen zu diesem Experiment wurde festgestellt, dass Miz1 im adulten Mausherz auf der Proteinebene gut exprimiert ist. Deswegen wurden für dieses Experiment adulte Maus-Kardiomyozyten bevorzugt. 3h nach der Isolation wurden die Kardiomyozyten mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend mit den Antikörpern gegen alpha-Actinin, MLP und Miz1 einzeln gefärbt. Als gekoppelte sekundäre Antikörper wurden Cy3 (rot) für alpha-Actinin und MLP bzw. FITC (grün) für Miz1 benutzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die in Abbildung 4.4 dargestellten Färbungen von adulten Maus-Kardiomyozyten zeigen eine deutliche Lokalisation von alpha-Actinin und Miz1 an der Z-Scheibe. Die Färbung mit MLP weist eine globale cytoplasmatische Lokalisierung auf, da die Z-Streifen-Struktur nicht zu erkennen ist.



Abbildung 4.4: Subzelluläre Lokalisation von endogenem Miz1 in adulten Maus-Kardiomyozyten. Adulte Maus-kardiomyozyten wurden 3h nach der Isolation mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend mit alpha-Actinin (rot)-, MLP (rot)- und Miz1 (grün)- spezifischen Antikörpern inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Immunfluoreszenz-gefärbten Zellen wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung fotografiert. Insgesamt wurde die Versuchreihe drei Mal durchgeführt. Die einzelnen Färbungen mit alpha-Actinin und Miz1 zeigen eine Lokalisation an der Z-Scheibe (weiße Pfeile).

4.5 Untersuchung der Miz1-Funktion in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

4.5.1 Die Überexpression von Miz1 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führt zur Aktivierung von NFATc2

Da primäre Kardiomyozyten neonataler Ratten nicht durch Transfektionsmethoden, wie z. B. Lipofektion oder Elektroporation, effizient transfizierbar sind, wurde stattdessen der adenovirale Gentransfer verwendet. Damit die Funktion von Miz1 in Kardiomyozyten untersucht werden konnte, wurde ein Adenovirus zur Überexpression von Miz1 unter Kontrolle des CMV-Promotors hergestellt (AdMiz1). Die eingesetzte Virusmenge wird in MOI (multiplicity of infection) angegeben und beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis der eingesetzten Viruspartikel zur Anzahl

der Zielzellen. Um eine gleiche Viruslast pro Zelle zu garantieren, wurde ein Kontrollvirus, der LacZ (AdLacZ) unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert.

Eine Analyse mittels Western Blot zeigte eine dosisabhängige Expression von Miz1 durch AdMiz1 (Abbildung 4.5). Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurde bei weiteren Versuchen, sofern nicht anders angegeben, eine Überexpression von Miz1 durch adenovirale Transfektion mit MOI 5 (5 aktive Viruspartikel pro Zelle) durchgeführt. Um zu ermitteln, ob die Überexpression von Miz1 in Kardiomyozyten einen Einfluss auf den Calcineurin-NFAT Signalweg ausübt, wurde die Expression vom cytoplasmatischen NFAT (NFATc2) untersucht. Für die Auswertung wurde die Menge an Miz1 und NFATc2 auf GAPDH normalisiert und das Experiment mindestens drei Mal wiederholt. Die Überexpression von Miz1 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung von NFATc2.



Abbildung 4.5: Die Überexpression von Miz1 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führt zur Aktivierung von NFATc2. In neonatalen Ratten-Kardiomyozyten wurde Miz1 mithilfe eines Adenovirus (AdMiz1) überexprimiert. Die eingesetzte Virusmenge wird angegeben in MOI (multiplicity of infection). Ein Adenovirus zur Überexpression von LacZ (AdLacZ) diente dazu, alle Gruppen mit der gleichen Anzahl adenoviraler Partikel zu exponieren. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Es zeigte sich eine dosisabhängige Expression von Miz1 durch AdMiz1. Mittels eines NFATc2-Antikörpers wurde die Expression des cytoplasmatischen NFAT (NFATc2) gemessen. Dargestellt ist ein Beispiel von drei Versuchen, wo Miz1 und NFATc2 auf GAPDH normalisiert wurde. Die Überexpression von Miz1 in den neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung von NFATc2.

4.5.2 Zelluläre Hypertrophie durch Miz1-Überexpression in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Da dem Calcineurin-NFAT-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Hypertrophie zukommt, wurde der Effekt einer Miz1-Überexpression bezüglich einer zellulären Hypertrophie untersucht.

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden einen Tag nach der Isolation adenoviral transduziert. Die Kontrollzellen wurden mit dem Vehikel AdLacZ transduziert. Nach 48h wurden die Zellen fixiert und mithilfe des α-Actinin Antikörpers und DAPI angefärbt. Die so behandelten Zellen wurden mit einer 400-fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert und anschließend folgte die verblindete Bestimmung der relativen Zelloberfläche mit dem Programm Image J. Die Zelloberfläche wurde dabei relativ zum Mittelwert der Zelloberfläche der mit AdLacZ behandelten Zellen ermittelt. Es wurden drei biologische Replikate ausgewertet, wobei pro Gruppe etwa 200 Zellen ausgezählt wurden.

Die Untersuchung ergab, dass es durch Überexpression von Miz1 zu einer signifikanten Vergrößerung der relativen Zelloberfläche kommt (AdLacZ 1,00±0,02 n=653; AdMiz1 1,35±0,03 n=589; ***<0,0005).



Abbildung 4.6: Die Überexpression von Miz1 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten bewirkt eine zelluläre Hypertrophie. A. Repräsentative Bilder der mit AdMiz1 und AdLacZ (MOI 5) infizierten Kardiomyozyten. Die Zellen wurden fixiert und mit einem α-Actinin-Primärantikörper sowie mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Zellen wurden mit einer 400fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert und die Zelloberfläche mit der Software ImageJ bestimmt. **B.** Dargestellt ist das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen. Pro Gruppe wurden etwa 200 Zellen ausgemessen. Die Zelloberfläche wurde dabei relativ zum Mittelwert der Oberfläche der mit AdLacZ behandelten Zellen berechnet. AdMiz1 infizierte Kardiomyozyten haben eine signifikant vergrößerte Zelloberfläche (**<0,005).

4.5.3 Verhinderung Staurosporin induzierter Apoptose durch Miz1-Überexpression in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Die Arbeiten von Patel und McMahon 2007 zeigten, dass der Transkriptionsfaktor Miz1 die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl2 in primären humanen Zellen aktiviert. Um zu klären, ob eine Miz1-Überexpression antiapoptotisches Potenzial besitzt, sollte das Apoptose-Verhalten von Miz1-Adenovirus (AdMiz1) transduzierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach der Apoptose-Induktion beobachtet werden. Die Apoptose wurde für 24h mit 1 µM Staurosporin induziert. Die Bewertung der auftretenden Apoptose wurde mittels DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Bei dieser Methode wird die DNA angefärbt, wodurch die Morphologie des Chromatins sichtbar wird. In nicht apoptotischen Zellen ist der Zellkern dabei gleichmäßig angefärbt, wohingegen er bei apoptotischen Zellen durch Kondensation des Chromatins deutlich granuliert ist (Abbildung 4.7A). Nach 48h wurden die Zellen fixiert und mit DAPI angefärbt. Die so behandelten Zellen wurden mit einer 400-fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Anschließend folgten die verblindete Analyse und die Auszählung der gesamten Zellen und der apoptotischen Zellen. Die Apoptoserate wurde aus dem Verhältnis apoptotischen Zellen gegen gesamte Zellen ermittelt und in Prozent berechnet. Es wurden drei biologische Replikate ausgewertet, wobei pro Gruppe etwa 60 Zellen ausgezählt wurden.

Während in unbehandelten Kontrollzellen (AdLacZ) nur vereinzelt apoptotische Zellen auftraten, wies ein Großteil der mit AdLacZ transfizierten Zellen nach Behandlung mit Staurosporin (SP) stark kondensiertes Chromatin und eine Apoptoserate von circa. 54 % auf (AdLacZ 8,29±1,41; AdLacZ+SP 54,01±4,62; n=3; ***<0,0005). Bei Staurosporin behandelten Miz1 überexprimierenden neonatalen Ratten-Kardiomyozyten war dagegen eine deutliche Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen festzustellen. Dies erwirkte eine Senkung der Apoptoserate auf 35 % (AdLacZ+SP 54,01±4,62; AdMiz1+SP 35,64±3,19; n=3; *<0,05).



AdMiz1

AdMiz1+SP





Abbildung 4.7: Die Überexpression von Miz1 inhibiert die Staurosporin induzierte Apoptose: A. Repräsentative Bilder der mit AdMiz1 (MOI 5) und AdLacZ (MOI 5) infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Die Zellen wurden fixiert und die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Zellen wurden mit einer 400-fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert und ausgezählt. **B.** Pro Gruppe wurden etwa 60 Zellen gezählt. Die Apoptoserate in jeder Gruppe wurde aus dem Verhältnis der Anzahl an gesamten Zellen gegen die Anzahl an apoptotischen Zellen berechnet. Dargestellt sind Bilder der DAPI-Färbung mit apoptotischen Kernen (kondensiertes Chromatin) im Kreise und deren Vergrößerung im Kästchen. AdMiz1-Überexpression in Kardiomyozyten hat keinen Effekt auf die Zellkern-Morphologie. Die Stimulation der Apoptose durch Staurosporin führt zu einer erhöhten Anzahl an apoptotischen Zellen bei AdLacZ infizierten Zellen (***<0,0005). Miz1 überexprimierende neonatale Kardiomyozyten sind in der Lage die erhöhte Apoptoserate durch Staurosporin-Stimulation signifikant zu senken (*<0,05).

4.6 Untersuchung der Miz1-Expression im experimenellen Mausmodell der Herzhypertrophie

Für die Untersuchung der Miz1-Expression in einem experimentellen Mausmodell der Herzhypertrophie wurde das Modell der transversalen Aortenkonstriktion (TAC) verwendet. Durch eine permanente Verengung der Aorta kommt es hierbei zu einer erhöhten linksventrikulären Nachlast. Dies führt zu einer konzentrischen Hypertrophie und nachfolgend zur Herzinsuffizienz. Als Kontrolltiere wurden stets "scheinoperierte" Tiere (SHAM) verwendet, deren Brustkorb ebenfalls geöffnet wurde, die aber keine Aortenkonstriktion erhielten. Acht Wochen nach dem Eingriff wurden die Herzen entnommen. Die Tiere für die RNA-Isolierung wurden von Dr. Karl Toischer operiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Mausherzen für die Western Blot-Analyse wurden freundlicherweise von Dr. Axel Kaul bereitgestellt. Im Vorfeld wurden die Proben auf Hypertrophiemarker untersucht, dabei wurde eine 5-fache Erhöhung der BNP-Expression festgestellt. Für die Auswertung wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen mit jeweils sechs Tieren pro Gruppe verwendet. Für die Normalisierung der Proben auf die Ausgansmenge an RNA wurden 18S-RNA spezifische Primern verwendet. Die Untersuchung der isolierten mRNA mittels Real Time-PCR zeigte, dass die Expression von Miz1 auf RNA-Ebene in TAC-Modellen im Vergleich zu SHAM operierten Tieren signifikant erhöht war (Miz1/18S: SHAM 2,6E-3±2,4E-4 n=11; TAC 3,33E-3±1,5E-4 n=10; * <0,05). Für die Western Blot-Analyse wurden drei Versuche durchgeführt mit jeweils vier SHAM- und TAC-operienten Tieren.

Die Analyse der Miz1-Expression auf der Proteinebene zeigt ebenfalls eine Hochregulierung von Miz1 im hypertrophen Mausmodell.



Abbildung 4.8: Untersuchung der Miz1 Expression im hypertrophen Mausmodell. FVB-Mäuse wurden einer Aortenkonstriktion (TAC) oder Scheinoperation (SHAM) unterzogen. Nach acht Wochen wurden die Mäuse getötet, die Herzen entnommen und aus den Myokardproben RNA isoliert bzw. Proteinlysate hergestellt. **A.** Die RNA wurde in cDNA revers transkribiert und die Real Time-PCR mit Miz1-spezifischen Primern durchgeführt. Die cDNA-Menge an Miz1 wurde auf 18S normalisiert. Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl der untersuchten Mäuse. **B.** Die Proteinlysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse mit Miz1-spezifischem Antikörper detektiert. Für die Western Blot-Analyse wurden drei Versuche durchgeführt mit jeweils vier SHAM- und TAC-operienten Tiere. Hier ist ein repräsentativer Blot dargestellt. Sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene ist die Miz1-Expression bei TAC operierten Mäuse hochreguliert.

4.7 Untersuchung der Miz1-Expression in verschiedenen Organen und während der Embryonalentwicklung

4.7.1 Miz1-Expression in embryonalen Entwicklungsstadien der Maus und in adulten Mausorganen

Die Untersuchung der Expression eines Proteins in verschiedenen Organen und im Verlauf der Entwicklung eines Organismus kann wichtige Hinweise auf die Funktion dieses Proteins geben. Daher wurde die Miz1-Expression in verschiedenen Organen der adulten Maus und zu unterschiedlichen embryonalen Entwicklungsstadien untersucht. Die mRNA-Menge wurde mittels Real Time-PCR quantifiziert (Abbildung 4.9). Als Ausgangsmaterial wurde eine cDNA-Kollektion der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Auf mRNA-Ebene stieg die Miz1-Expression während der Embryonalentwicklung an und war in allen getesteten Organen gut detektierbar. Die höchste Expression konnte im Gehirn nachgewiesen werden. Skelettmuskel, Hoden und Niere zeigten ebenfalls eine überdurchschnittliche Expression der Miz1-RNA. Das Herz wies auf mRNA Ebene eine relative niedrige Miz1-Expression auf. (E7 0,272±0,097; E11 0,427±0,073; E15 0,596±0,013; E17 0,665±0,015; Gehirn 0,943±0,013; Herz 0,338±0,070; Niere 0,613±0,197; Leber 0,459±0,140; Lunge 0,503±0,068; sk. Muskel 0,868±0,082; Milz 0,765±0,020; Testis 0,707±0,136; n=3).



Abbildung 4.9: Miz1 mRNA-Expression in embryonalen Entwicklungsstadien und in adulten Maus Organen. Durch Real Time-PCR mit Miz1-spezifischen Primern wurde die Expression von Miz1 in 7, 11, 15 und 17 Tage alten Embryonen bestimmt. Ebenso wurde die Miz1-Expression in Gehirn, Herz, Niere, Leber, Milz und Skelettmuskel bestimmt.

4.7.2 Miz1 mRNA-Expression während der Herzentwicklung der Ratte

Aus Wistar Ratten in verschiedenen Entwicklungsstadien wurden Herzproben für die RNA-Isolation entnommen. Die Miz1-Expression wurde auf *Adiponectin Receptor* 1 (AR1) normalisiert, da AR1 während der Rattenherzentwicklung unverändert bleibt (Steinmetz *et al.*, 2005). Die Proben für diesen Versuch wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Quentin zur Verfügung gestellt. Es stellte sich heraus, dass die mRNA-Expression vom embryonalen Tag 17 (E17) bis zu 21 Tagen nach der Geburt unverändert blieb. Die Miz1-Expression im Vorhof und in den Herzkammern hatte keinen signikanten Unterschied.



Abbildung 4.10: Miz1 mRNA-Expression während der Herzentwicklung der Ratte. RNA wurde aus den Herzen von Wistar-Ratten in verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert: Embryonaltag 17 (E17), postnatales Alter 1 bis 21 Tage (d1, d7, d21) und 6 Wochen (6W). Verglichen wurde auch die Miz1 mRNA-Menge in Herzkammer (K) und im Vorhof 21 Tage und 6 Wochen nach der Geburt. Die Miz1 mRNA-Expression bleibt unverändert während der Herzentwicklung der Ratte.

4.8 Untersuchung von Miz1 im Mausmodell

4.8.1 Konditionaler Knockout von Miz1

4.8.1.1 Generierung und Charakterisierung einer konditionalen Miz1-Knockout Maus

Das *Myc-interacting zinc finger protein* 1 (Miz1) verändert seine physikalischen Eigenschaften durch die Assoziation mit Myc. Für diese Veränderungen ist eine intakte POZ-Domäne notwendig (Peukert *et al.*, 1997). Über POZ-Domänen kann sowohl die Ausbildung von Homodimeren als auch die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt werden (Dhordain *et al.*, 1995).

Da der konstitutive Miz1-Knockout in der embryonalen Phase E7.5 letal ist (Adhikary *et al.*, 2003), wurde die funktionelle Domäne von Miz1 (POZ-Domäne) herzspezifisch deletiert. Exon 3 und 4 kodieren die Miz1-POZ-Domäne und wurden durch homologe Rekombination mit loxP-Sequenzen (loxP = *locus of crossing over (x)* aus *P1*) flankiert. Diese Mäuse mit dem Genotyp *Miz1 floxed positiv* (MF^{+/+}) stellte Professor Eilers (Universität Marburg) zur Verfügung. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden transgene Mäuse von Dr. Sylvia Gunkel generiert, bei denen die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des herzventrikelspezifischen Promotors der Myosin light chain (MLC2V-Cre) exprimiert wird. Die Miz1-POZ-Domäne flankierten Mäuse mit dem Genotyp MF^{+/+} wurden mit den MLC2V-Cre transgenen Mäusen verpaart. Dadurch konnte eine *in vivo* Deletion der POZ-Domäne im Herz erzielt werden.

Die Nachkommen dieser Mäuse wurden mithilfe von zwei PCR-Reaktionen genotypisiert. Die erste PCR (MF-PCR) diente dazu zu bestimmen, welche der Mäuse die loxP-Sequenzen um die Miz1-POZ-Domäne auf beide Allelen tragen. Sie wurde mit den Primern Miz1loxP3for/ Miz1loxP3rev/ Mizneo durchgeführt. Bei der zweiten PCR (MLC2V-Cre-PCR) mit dem Primerpaar Cre1832S/ Cre2171AS konnten die Mäuse identifiziert werden, die Cre-Rekombinase überexprimieren. Als Template diente aus den Mausschwanzbiopsien isolierte genomische DNA (gDNA). Die Miz1-POZ-Domäne wird deletiert, wenn die Mäuse gleichzeitig homozygot für das rekombinierte Allele (MF^{+/+}) und positiv für die Cre-Rekombinase (MLC2V-Cre) sind. Abbildung 4.11 zeigt exemplarisch eine *Miz1 floxed*-PCR (MF-PCR) in 4.11A und eine *cause recombination*- PCR (MLC2V-Cre-PCR) in 4.11B. Die Amplifikation des Wildtyp-Fragments ergibt eine Größe von 277 bp. Durch den Einbau der loxP-Sequenzen in die rekombinierten Allele vergrößert sich das PCR-Fragment auf 327 bp. Die heterozygoten Mäuse, die die loxP-Sequenz nur auf einem Allel (MF^{+/-}) tragen, zeigen zwei Banden von 327 bp und 277 bp (Wildtyp-Bande). MF^{-/-}-Mäuse, die die loxP-Sequenz in keinem der beiden Allele tragen, zeigen nur die Wildtyp-Bande von 277 bp. Die MLC2V-Cre-PCR ergibt einen 350 bp großes PCR-Produkt, die nur Cre-Rekombinase überexprimierenden Tiere amplifizieren.

Die Maus Nummer 1 mit dem Genotyp MF+/+, welche positiv für die Cre-Rekombinase ist, gilt als Miz1-Knockout-Maus.



Abbildung 4.11: Generierung konditionaler Miz1-Knockout-Mäuse. A. MF-PCR Genotypisierung. Das Wildtyp-Fragment hat eine Größe von 277 bp und das rekombinierte eine Größe von 327 bp. **B.** MLC2V-Cre-PCR Genotypisierung. Mäuse, die die Cre-Rekombinase überexprimieren, zeigen ein PCR-Produkt der Größe 350 bp wie der positive Kontroll (+KT). Homozygote Mäuse für das rekombinierte Allele (MF^{+/+}), die gleichzeitig positiv für die Cre-Rekombinase (Cre⁺) sind, wie die Maus Nummer 1, gelten als Miz1-Knockout-Mäuse.

4.8.1.2 Charakterisierung der Miz1-Knockout-Mäuse mittels Southern Blot

Die Cre-Rekombinase wurde unter der Kontrolle des herzspezifischen MLC2V-Promotors exprimiert. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Rekombination und die Deletion der Miz1-POZ-Domäne nur im Herzmuskel stattfindet. Die Southern Blot-Analyse mit genomischer DNA (gDNA) aus dem Herzen diente nicht nur der Bestätigung der vorherigen PCR-Genotypisierung, sondern auch der Bestätigung der im Herz stattgefundenen Cre-Rekombination. Die zuvor genotypisierten Mäuse wurden verwendet, um die gDNA aus dem linken Ventrikel des Herzens zu isolieren. 27 µg gDNA wurden über Nacht mit *Xba*I und *Spe*I verdaut, auf ein 0,75 %-iges Agarosegel aufgetragen und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit der radioaktiv markierten Sonde pSKMiz3 (aus der Arbeitsgruppe von Professor Martin Eilers, Universität Marburg) der Größe 300 bp, die dem Exon 14 entspricht. Die Untersuchung der Rekombinationsereignisse ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Die Hybridisierung führte im Falle eines Wildtyp-Allels zur Detektion eines 11,8 kb großen Fragments, wogegen das durch Cre-

Rekombination erzeugte Fragment eine Länge von 11 kb aufwies. MF^{-/-}-Mäuse haben erwartungsgemäß keine loxP-flankierte POZ-Domäne und zeigen deswegen nur die Wildtyp-Bande. Nur die Miz1-Knockout-Mäuse haben das rekombinierte Allel.



Abbildung 4.12: Charakterisierung der Miz1-Knockout-Mäuse mittels Southern Blot. In der Abbildung ist ein repräsentatives Autoradiogramm nach dem Southern Blot-Verfahren von genomischer DNA aus dem linken Ventrikel des Herzens dargestellt. Die 11,8 kb großen Fragmente entsprechen dem Wildtyp, während die 8,5 kb großen Fragmente das loxP-flankierte Allel darstellen. Das rekombinierte Allel der Größe 11 kb ist nur bei der Miz1-Knockout-Maus zu sehen.

4.8.1.3 Bestimmung der Effektivität der Cre-Rekombinase auf mRNA- und genomische DNA Ebene

Zur Interpretation des durch konditionale Mutagenese entstandenen Phänotyps ist es notwendig, die Rekombination und damit die Expressionsänderung von Miz1 zu untersuchen. In den folgenden Experimenten sollte durch Real Time-PCR mit mRNA aus dem linken Ventrikel die Rekombinationsrate im Herz abgeschätzt werden. Eine weitere Southern Blot-Analyse mit dem Vergleich von genomischer DNA aus Kardiomyozyten und aus Fibroblasten diente dazu, zu bestimmen, wie kardiomyozytspezifisch die MLV2C-Cre-Rekombinase ist.

Auf die Real Time-PCR-Analyse wurde zurückgegriffen, um die Effektivität der Cre-Rekombinase auf der mRNA Ebene zu bestimmen (Abbildung 4.13A). mRNA wurde aus dem linken Ventrikel des Herzes isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit Primern innerhalb der POZ-Domäne (Miz1-P3 und Miz1-P4 siehe Tabelle 9). Dementsprechend weisen herzspezifische Miz1-Knockout-Mäuse (Miz1 KO = MF^{+/+},Cre⁺) ein signifikant niedrigeres Miz1-Signal im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT= MF^{+/+},Cre⁻) oder heterozygoten Mäusen (HET= MF^{+/-},Cre⁺) auf. Eine Normalisierung der Proben erfolgte auf die Referenz-cDNA von GAPDH. (Miz1/GAPDH: WT 9,17±0,84 n=4 ; KO 3,93±0,25 n=6; ***<0.0005). Es zeigte sich somit, dass die Rekombinationsrate auf der mRNA-Ebene etwa 43 % betrug.

MLC2V-Cre wird spezifisch in ventrikulären Myozyten exprimiert. Deswegen sollten die Spezifizität und die Effektivität der Cre-Rekombinase bestimmt werden. Es wurden die Kardiomyozyten aus zuvor PCR-genotypisierten Mäusen isoliert und anschließend eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Kardiomyozyten sind während des Isolationsprozesses im Sediment angereichert, im Überstand hingegen befinden sich mehr Fibroblasten und Endothelzellen. Es wurden drei Mäuse mit den Genotypen (MF^{-/-},Cre⁺), (MF^{+/-},Cre⁺) und (MF^{+/+},Cre⁺) untersucht.

Verglichen wurden die Genotypen der genomischen DNA aus dem letzten Sedimentationsschritt und aus dem Überstand. Abbildung 4.13B zeigt, dass das Signal des rekombinierten Fragments (11 kb) der Miz1-Knockout-Mäuse in den reinen Kardiomyozyten viel stärker ist als im Überstand. Der Kardiomyozyten-DNA entspricht eine DNA-Menge von ca. 24 % der gesamten Herz-DNA (Chen *et al.*, 1998).



Abbildung 4.13: Bestimmung der Effektivität und der Spezifizität der Cre-Rekombinase auf mRNA- und genomischer DNA Ebene. A. Real Time-PCR-Analyse mit mRNA aus dem linken Ventrikel des Herzens. Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl der untersuchten Mäuse. Auf mRNA-Ebene zeigt sich, dass das Miz1-Signal im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant herunterreguliert ist. Daraus resultiert eine Rekombinationsrate von ca. 43 %. B. Die Southern Blot-Analyse mit isolierter genomischer DNA aus Kardiomyozyten auf der einen Seite und aus Fibroblasten auf der anderen Seite zeigte eine erhöhte Menge des rekombinierten Allels in reinen Kardiomyozyten im Vergleich zu den Zellen im Überstand.

4.8.1.4 Echokardiografische Analyse der konditionalen Miz1-Knockout-Maus im TAC-Modell

Die Zahl der Nachkommen und die Lebenserwartung der Knockout-Mäuse waren unauffällig. Bei der ersten echokardiografischen Untersuchung zeigten die Miz1-Knockout-Mäuse keine Anomalien. Histologische Färbungen (Durchgeführt von Dr. Sylvia Gunkel) zur Detektion fibröser Gewebestrukturen durch eine Masson-Trichom-Färbung ergaben identische Strukturen des Herzmuskels in Wildtyp und in Miz1-Knockout-Mäusen. Der herzspezifische Knockout der Miz1-POZ-Domäne führte zu keinem spontanen auffälligen Phänotyp.

Daher wurden die Mäuse einer Druckbelastung des linken Ventrikels ausgesetzt. Mittels TAC (*transaortic constriction*) -Operation wurde eine permanente Verengung der Aorta erreicht. Nach Eröffnung des Thorax wurde der Aortenbogen freigelegt und mit einem Seidenfaden und einer Gauge-Nadel ligiert. Hierbei kommt es zu einer erhöhten linksventrikulären Nachlast. Dies führt zu einer konzentrischen Hypertrophie und nachfolgender Herzinsuffizienz (Rockman *et.al*, 1991). Als Kontrolltiere wurden stets "scheinoperierte" Tiere (SHAM) verwendet, deren Brustkorb ebenfalls eröffnet wurde, die aber keine eigentliche Intervention erhielten. Anschließend wurde untersucht, wie die Miz1-Knockout-Mäuse darauf reagieren. Die TAC-Operation wurde an 12 bis 16 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden 4 Wochen nach dem Eingriff echokardiografisch untersucht. Die Auswertung weiblicher Mäuse führt in der Regel zu schwankenden Ergebnissen, die wahrscheinlich hormonell bedingt sind. Daher wurden nur männliche Tiere in die Auswertung einbezogen.

Die Herzhypertrophie-Parameter, wie das Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht *heart weight/body weight* (HW/BW), die Septumdicke und die Hinterwanddicke zeigten lediglich einen Trend zur Zunahme, jedoch keine signifikanten Veränderungen weder bei den SHAM noch bei den TAC operierten Tieren. Die erwartete Hypertrophie nach der TAC-Operation wurde nicht erreicht.

Bei den Funktionsparametern zeigte sich allerdings nach der TAC-Operation in Wildtyp-Mäusen eine signifikante Abnahme des enddiastolischen und endsystolischen Durchmessers des linken Ventrikels (LVEDD [mm]: WT SHAM 3,73±0,1 n=7; WT TAC 3,44±0,05 n=8; *<0,05 und LVESD[mm]: WT SHAM 2,06±0,1 n=7; WT TAC 1,65±0,004 n=8; **<0,005).

Nach der Druckbelastung durch die TAC-Operation ist die Kontraktilität des Herzens erhöht, dadurch nimmt die Verkürzungsfraktion (*Fractional shortening* FS) zu. Im Vergleich zu den SHAM operierten Tieren wiesen die wildtypischen TAC operierten Mäuse eine signifikant erhöhte FS auf (FS[%]: WT SHAM 45,61±2,33 n=7; WT TAC 52,01±1,30 n=8; *<0,05). Bei den Miz1-Knockout-Mäuse konnten im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren nach TAC-Operation erhöhte linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Durchmesser (LVESD, LVEDD) (LVEDD [mm]:

WT TAC 3,44±0,05 n=8; KO TAC 3,73±0,05 n=10; **<0,005 und LVESD[mm]: WT TAC 1,65±0,004 n=8; KO TAC 2,00±0,08 n=10; **<0,005) und eine Abnahme der Verkürzungsfraktionen nachgewisen werden (FS[%]: WT TAC 52,01±1,30 n=8; KO TAC 46,46±1,99 n=10; *p<0,04). Diese Funktionsstörung bei den Miz1-Knockout-Mäusen deutet auf eine mangelhafte Anpassung an den hämodynamischen Stress nach der TAC-Operation hin.



Abbildung 4.14: Echokardiografische Analyse der konditionalen Miz1-Knockout-Mäuse: Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl der untersuchten Mäuse. Die Hypertrophie-Parameter (HW/BW, Septumdicke, und Hinterwanddicke) zeigen bei allen Tieren keine signifikanten Veränderungen. Somit wurde die erwartete Hypertrophie nach der TAC-Operation nicht erreicht. Dennoch zeigt sich unter TAC eine Abnahme der endsystolischen und enddiastolischen Diameter und eine Zunahme der Verkürzungsfraktionen. Die Miz1-Knockout-Mäuse wiesen im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistermäusen nach TAC erhöhte linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Durchmesser (LVESD, LVEDD) und eine Abnahme der Verkürzungsfraktionen (FS = *fractional shortening*) auf. Somit waren Miz1-Knockout-Mäuse nicht wie Wildtyp -Tiere in der Lage, die kompensatorischen Mechanismen im frühen Hypertrophie-Prozess zu leisten.

4.8.1.5 Analyse der Expression des Hypertrophiemarkers ANF in Miz1-Knockout-Mäusen

Eine weitere, spezifischere Reaktion auf hypertrophe Stimuli erfolgt durch die Re-Expression von Genen, die während der Embryonalentwicklung im Herzen exprimiert werden. Die Re-Expression des *Atrial Natriuretic Factor* (ANF) in den Myozyten ist sowohl bei konzentrischer als auch bei exzentrischer Hypertrophie charakteristisch (Calderone *et al.*, 1995). Analog zur Steigerung der ANF-Expression kommt es zu einer Steigerung der Expression des mit ihm nahe verwandten *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) (Hanford *et al.*, 1994). Die Sekretion der Peptid-Hormone BNP und ANF stellen diagnostisch verwendete Marker der Herzinsuffizienz dar (Dao *et al.*, 2001).

Hier wurde die ANF- mRNA-Expression im Myokard von Miz1-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach SHAM- oder TAC-Operation mittels Real Time-PCR bestimmt. Im Alter von zwölf Wochen wurden die Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse acht Wochen nach TAC- bzw. SHAM-Eingriffen getötet. Die Herzen wurden entnommen und RNA aus dem Myokard isoliert. Anschließend wurde eine cDNA-Synthese und Real Time-PCR mit ANF-spezifischen Primern durchgeführt. Die Abbildung 4.15 stellt eine Normalisierung der Proben erfolgte anhand der Referenz-cDNA von GAPDH dar. Bei Wildtyp-Mäusen war die ANF-Expression nach der Hypertrophie-Induktion durch die TAC-Operation, wie erwartet, erhöht (ANF/GAPDH: WT SHAM 0,61±0,06 n=12; WT TAC 1,01±0,20 n=10; *<0,05). Der Knockout der Miz1-POZ-Domäne bewirkte eine signifikante Senkung der ANF-Expression unabhängig von der TAC-Operation (ANF/GAPDH: WT SHAM 0,61±0,06 n=12; KO SHAM 0,35±0,03 n=12; *<0,05 und WT TAC 1,01±0,20 n=10; KO TAC 0,44±0,07 n=14; **<0,005). Die TAC-Operation hatte bezüglich der Hypertrophie-Induktion bei Miz1-Knockout-Mäusen keinen signifikanten Anstieg der ANF-Expression zur Folge.



Abbildung 4.15: Analyse der Expression des Hypertrophiemarkers ANF in Miz1-Knockout-Mäusen. Im Alter von 12 Wochen wurden die Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse 8 Wochen nach TAC- bzw. SHAM-Eingriffen getötet. Die Herzen wurden entnommen und RNA aus dem Myokard isoliert. Anschließend wurde eine cDNA-Synthese und Real Time-PCR mit ANF-spezifischen Primern durchgeführt. Dargestellt ist die ANF-Expression auf der mRNA-Ebene normalisiert auf GAPDH. Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl der untersuchten Mäuse. Die Expression des Hypertrophiemarkers ANF war in den Knockout-Mäusen signifikant herunterreguliert (*<0,005). Die TAC induzierte Hypertrophie bewirkt bei Miz1-Knockout-Mäusen keinen signifikanten Anstieg der ANF-Expression.

4.8.2 Herzspezifische Überexpression von Miz1 im Mausmodell

4.8.2.1 Generierung und Charakterisierung der Miz1 transgenen Mäuse

Um die Funktion von Miz1 in der Entstehung von Herzinsuffizienz *in vivo* zu untersuchen, wurde Miz1 herzspezifisch überexprimiert. Das Konstrukt ist in Abbildung 4.16A dargestellt. Die komplette Sequenz der humanen Miz1-cDNA wurde in den Blueskript Vektor (pBSIIsk+) mit dem herzspezifischen αMHC-Promotor kloniert. Zur besseren Detektion und Differenzierung des inserierten Miz1 vom endogenen Protein wurde die Miz1 humane cDNA am N-Terminus mit einem Flag-Tag fusioniert. Am 3'-Ende wurde die (Hgh)-PolyA-Sequenz des menschlichen Wachstumshormons reinkloniert. Das mit *Kpn*I linearisierte Konstrukt wurde nach der Aufreinigung in die Pronuklei von befruchteten Maus-Oozyten mikroinjiziert. Die intakten Zygoten wurden dann anschließend in die Ovidukte scheinschwangerer Mäuse der Linie FVB/N

reimplantiert. Diesen Vorgang führte das Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen durch.

Die Nachkommen wurden auf die Anwesenheit des Transgens mittels sequenzspezifischer PCR untersucht. Handelte es sich um eine Miz1 transgene Maus, so konnte ein 350 bp großes Fragment im Agarosegel detektiert werden (Abbildung 4.16B). Die positiven Tiere sind dann als Ursprung- oder FO-Generation (*founder generation*) bezeichnet, aus denen einzelne Mäuselinien gezüchtet werden.

Die Southern Blot-Analyse diente nicht nur der Bestätigung der durch PCR ermittelten Genotypen, sondern auch der Bestimmung der Integrationsstellen und der Kopieanzahl. Somit sollte sichergestellt werden, dass die Nachkommen aus einer Linie die gleiche Kopieanzahl wie der Founder aufweisen.

18 µg genomische DNA aus Mausschwanz-Biopsien wurden mit dem Restriktionsenzym *Nde*I geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Als Sonde fungierte ein mit dem Primerpaar hMizF3/ hMizR4 amplifiziertes Fragment, das sich auf das ganze Miz1-cDNA erstreckt. Die radioaktive Markierung und anschließende Hybridisierung mit der auf der Membran fixierten DNA, erfolgte wie im Methodenteil beschrieben.

Die Bestimmung der Kopieanzahl wurde mit Hilfe der aufgetragenen 1 (K1), 10 (K10) und 100 (K100) Kopien durchgeführt. Die transgenen Mäuse haben unterschiedlichen Kopienanzahlen und tragen schätzungsweise mehr als 50 Kopien. Die Insertion des gesamten Transgene-Konstrukts stellt die *head to tail insertion* dar und beträgt 11,4 Kb.Die Bande, welche die *single insertion* anzeigt, sollte mindestens 7,1 kb groß sein.



Abbildung 4.16: Generierung und Charakterisierung der Miz1 transgenen Mäuse. A. Das DNA-Konstrukt zur Herstellung der Miz1 transgenen Mäuse bestand aus dem αMHC-Promotor, der humanen Miz1-cDNA, der am 5'-Ende mit einer Flag-Tag-Sequenz fusioniert ist. Am 5'-Ende enthält das Konstrukt die Sequenz vom humanen Wachstumshormon (Hgh)-PolyA. Die Lage der verwendeten Southern Blot-Sonde erstreckte sich über die gesamte Miz1 humane cDNA und war somit 2,4 kb groß. Das mit *Kpn*I linearisierte Konstrukt wurde aufgereinigt und für die Injektion verwendet. **B.** PCR Charakterisierung der Miz1 transgenen Mäuse. Das trangene PCR-Produkt von 350 bp wurde erwartungsgemäß bei den transgenen Mäusen (TG) detektiert. Es wurden als positiv Kontrol (+KT) für die PCR das vorhin hergestellte transgene-Konstrukt und als negativ Kontrol (-KT) verwendet. **C.** Exemplarisches Ergebnis von Southern Blot-Analysen transgener Mäuse der Linie 3. Die Bestimmung der Kopieanzahl wurde mit Hilfe der aufgetragenen 1 (K1), 10 (K10) und 100 (K100) Kopien durchgeführt. Die genomische DNA aus Mausschwanz-Biopsien wurde mit dem Restriktionsenzym *Nde*I geschnitten und eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Die Insertion des gesamten transgene-Konstrukt stellt die *head to tail insertion* dar und beträgt 11,4 Kb Eine einzelne Insertionsstelle (*single insertion*) bei 9 kb ist zu sehen. Die transgenen Mäuse tragen schätzungsweise mehr als 50 Kopien und haben nicht die gleiche Kopienanzahl.

4.8.2.2 Nachweis der herzspezifischen Überexpression der Miz1 transgenen Mäuse

Die Untersuchung des Miz1-Expressionsniveaus wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene durchgeführt. Es wurden Herzen von transgenen und Wildtyp Mäusen isoliert. Die Isolation von mRNA aus dem Herzgewebe erfolgte wie im Methodenteil 3.3.1.6 beschrieben. Die Real Time-PCR wurde gleichzeitig unter Verwendung von Maus und Human Miz1-spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Es konnte daher lediglich die Expression der unterschiedlichen Linien zueinander verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass drei Linien auf mRNA-Ebene unterschiedlich viel Miz1 überexprimieren. Die drei Linien, Linie 1, Linie 3 und Linie 10 zeigten alle eine signifikant erhöhte Miz1-Expression im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

Die Expression des Miz1-Zielgens p21 (Seoane *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003) wurde ebenfalls untersucht, und es stellte sich heraus, dass nur die Linie 3 in der Lage war, die p21-Expression signifikant zu erhöhen. Aus diesem Grund wurde die Western Blot-Analyse mit Mäusen der Linie 3 durchgeführt. Es wurden mehr als zwölf Tiere untersucht und die Abbildung 4.17B ist eine repräsentative Darstellung von jeweil zwei transgenen und Wildtyp Mäusen. Leider ist auf der Proteinebene die Miz1-Überexpression ungleichmäßig innerhalb der Tiere der stabilisierten Linie 3. Der hier verwendete monoklonale Antikörper Miz1(10E2) aus ein Hybridoma-Überstand war qualitativ nicht optimal und erschwerte somit die Miz1 Detektion auf der Proteinebene.



Abbildung 4.17: Nachweis der herzspezifischen Überexpression von Miz1 in transgenen Mäusen. A. Miz1mRNA-Expression in transgenen Mausherzen. Die Real Time-PCR-Analyse von mRNA-Expression in Mausherzen zeigte, dass die generierten transgenen Linien, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, eine erhöhte Miz1-mRNA-Expression aufweisen (***<0,0005). Die Untersuchung des Miz1-Zielgens P21 zeigte eine signifikante Hochregulierung in Mäusen der Linie 3. Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl der untersuchten Mäuse. B. Die Miz1-Protein-Expression in transgenen Tieren der Linie 3. In Proteinlysaten aus dem Myokard transgener Mäuse (TG) wurde mittels der Western Blot-Analyse mit den Antikörpern gegen Miz1(10E2) (selbst hergestellt von Martin Eilers) und Flag-Tag überexprimiertes Miz1 detektiert. Zur Normalisierung der Proteinmenge wurde ein anti-GAPDH-Antikörper verwendet. Die Miz1-Überexpression auf der Proteinebene ist innerhalb der stabilisierten Linie 3 ungleichmäßig.

4.8.2.3 Echokardiografische Untersuchung der Miz1 transgenen Mäuse

Die histologischen Untersuchungen wurden mittels Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbungen durchgeführt. Dabei zeigten die Herzschnitten der Wildtyp-Mäuse keinen Unterschied zu denen der Miz1-Überexpressions-Mäuse (Daten nicht gezeigt). Die echokardiografische Analyse an 20 bis 25 Wochen alten Wildtyp- und transgenen Mäusen war unauffällig. Bei der Phänotypisierung der Miz1 transgenen Tiere zeigten sich keine offensichtlichen Auffälligkeiten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Die Mäuse waren fertil und zeigten keine verminderte Lebenserwartung. Die Überexpression von Miz1 im Herzen führte zu keinem spontanen Phänotyp. Wildtyp- und transgene Mäuse waren sowohl morphologisch als auch physiologisch kaum zu unterscheiden.

Anschließend wurde untersucht, ob die herzspezifische Miz1-Überexpression einen Einfluss auf die TAC induzierte Herzhypertrophie hat. 13 Wochen alte Wildtyp- und transgene Mäuse wurden der TAC- oder SHAM-Operation unterzogen, die acht Wochen danach einer echokardiografischen Untersuchung unterzogen wurden. Es stellte sich heraus, dass der TAC-Eingriff seine Wirkung verfehlte, da sowohl die Hypertrophie-Parameter (Septumdicke, Hinterwanddicke) als auch die Funktions-Parameter (Heart rate HR, Fractional shortening FS) keine signifikante Veränderungen zwischen den wildtypischen SHAM- und TAC operierten Mäusen aufwiesen. Somit ließ sich im Anschluss an die vorgenommene TAC-Operation keine Aussage in Bezug auf den Effekt der herzspezifischen Miz1-Überexpression treffen.



Abbildung 4.18: Echokardiografische Untersuchung der herzspezifischen transgenen Miz1-Mäuse. Die Zahlen in den Säulen kennzeichnen die Anzahl der untersuchten Mäuse. Die Echokardiografie-Daten 13 Wochen alter transgener Mäuse zeigten keine Auffälligkeiten. Selbst acht Wochen nach der TAC-Operation scheint die Überexpression von Miz1 im Herz keinen Effekt auf die Herzfunktion zu haben. Die Hypertrophie-Parameter (Septumdicke und Hinterwanddicke) und Funktions- parameter (Herzfrequenz HF und Fractional shortening FS) sind nach der TAC-Operation der Wildtyp-Mäuse nicht signifikant zu unterscheiden. Nur die bei Wildtyp Tiere ist die linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Durchmesser (LVESD, LVEDD) signifikant eröht.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mutationen in Z-Scheibe-Proteinen, wie z. B. MLP, beeinflussen die strukturelle Integrität sowie intrazelluläre Signalwege und führen zu dilatativer Kardiomyopathie (Heinecke *et.al*, 2005). Bei der Suche nach MLP-Interaktionspartnern wurde Miz1 identifiziert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche Funktion Miz1 sowohl bei der Entstehung als auch im Verlauf von Kardiomyopathien spielt.

Um zu ermitteln, ob Mutationen im Miz1-Gen an der Entstehung von Kardiomyopathie beteiligt sind, wurde nach Mutationen im Miz1-Gen 94 DCM-Patienten gesucht. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Screening wurde eine heterozygote A188V-Miz1-Mutation im Exon 6 entdeckt, die ein Auslöser von Kardiomyopathie ist.

Heinecke *et. al* identifizierten 2005 eine Interaktion zwischen MLP und Calcineurin an der Z-Scheibe. Die mögliche Interaktion von MLP und Miz1 führte zu der Hypothese, dass Miz1 die Aktivität von Calcineurin beeinflussen könnte. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit mittels eines Calcineurin-Promotor-Assays in JEG-3-Zellen bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass das wildtypische Miz1 die Calcineurin-Promotor Aktivität um das 5-fache erhöhte, wohingegen das mutierte A188V-Miz1 diese Aktivität nur um das 2-fache steigerte. Eine weitere Interaktionsanalyse wurde in Form einer *in vivo* Koimmunopräzipitation mit Herzlysaten der Maus durchgeführt. Dabei wurde bestätigt, dass MLP und Calcineurin direkte oder indirekte Interaktionspartner von Miz1 im Mausherz sind. Übereinstimmend damit zeigten unsere Experimente eine subzelluläre Lokalisation von Miz1 an der Z-Scheibe, wo bekanntlich α -Actinin, MLP und Calcineurin lokalisiert sind.

Die Untersuchung der Miz1-Funktion erfolgte anschließend in *ex vivo* Modellen mit isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Innerhalb dieser Arbeit wurde hierzu ein Adenovirus zur Miz1-Überexpression in diesen Zellen generiert. Die Überexpression von Miz1 in primären Kardiomyozyten bewirkte eine dosisabhängige Zunahme von cytoplasmatischem NFAT, was erwartungsgemäß eine zelluläre Hypertrophie auslöste. Neonatale Kardiomyozyten, die mit Miz1 transduziert wurden, zeigten eine signifikant vergrößerte Zelloberfläche. Damit stellt Miz1 einen potenten Aktivator der Calcineurin-NFAT-Signaltransduktion in Kardiomyozyten dar. Eine Vielzahl vorangegangener Studien weisen Miz1 antiapoptotische Eigenschaften zu (Adhikary *et.al*, 2003; Patel und McMahon *et.al*, 2007; Liu *et.al*, 2009; Miao *et.al*, 2010). Der Tod von myokardialen Zellen durch Apoptose scheint sowohl für die Entstehung als auch für das Fortschreiten vieler

kardiovaskulärer Erkrankungen von großer Bedeutung zu sein. Abgestorbene Kardiomyozyten werden nicht ersetzt. Ein besseres Verständnis des apoptotischen Prozesses im Myokard könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien führen. Der antiapoptotische Charakter von Miz1 wurde in dieser Arbeit unter Beweis gestellt. Es zeigte sich, dass die Apoptoserate von Miz1überexprimierenden neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach einer Staurosporin-Stimulation signifikant abnimmt.

Die kardiale Hypertrophie geht mit einer Reaktivierung von Genexpressionsmustern einher, von denen viele normalerweise nur in der fötalen Entwicklungsperiode des Myokards exprimiert werden (Hanford *et al.*, 1994; Calderone *et al.*, 1995). Daher wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit die Miz1-Expression mittels Real Time-PCR und Western Blot auf ihre Regulation im hypertrophen Myokard untersucht. Dazu wurde bei Mäusen durch einen operativen Eingriff eine permanente Verengung der Aorta (TAC) vorgenommen. Dies löste eine konzentrische Hypertrophie mit nachfolgender Herzinsuffizienz aus. Als Kontrolle fungierten nach gleichem Prinzip operierte Mäuse (SHAM), bei denen keine Intervention der Aorta erfolgte. Die Validität der Proben wurde durch die Untersuchung gängiger Marker der Hypertrophie bestätigt. Dabei stellte sich heraus, dass die Maus-Hypertrophie-Modelle eine erhöhte Miz1-Expression sowohl auf der mRNA- als auch der Proteinebene aufweisen. Daraufhin wurde die Miz1-Expression während der Mausentwicklung und spezifisch während der Rattenherzentwicklung untersucht. Real Time-PCR-Analysen zeigten eine unveränderte Miz1-Expression in der embryonalen Entwicklung und eine unterdurchschnittliche Miz1-Expression im Herzen im Vergleich zu anderen untersuchten Mausorganen.

Um den Effekt eines Fehlens beziehungsweise eines nicht funktionellen Miz1 *in vivo* zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit konditionale Miz1-Knockout-Mausmodelle generiert. Dadurch wurde die Letalität des kompletten Miz1-Knockout umgegangen. Der funktionelle Bereich von Miz1 (POZ-Domäne) wurde im Herzen der Maus mittels Cre-Rekombinase deletiert. Zur Generierung der Miz1-Knockout-Mäuse wurden homozygote Miz1-POZ-Domäne "gefloxte" Mäuse (MF^{+/+}) mit MLC2V-Cre transgenen Mäusen (Cre⁺) verpaart. Die Cre-Rekombinase unterlag der Regulation durch den herzspezifischen MLC2V-Promotor. Die Genotypisierung wurde mittels PCR und Southern Blot durchgeführt. Vor der Phänotypisierung der Mäuse sollte die Rekombinationsrate im Herzmuskel bestimmt werden. Dafür wurden in dieser Arbeit Real Time-PCR und Southern Blot-Analysen mit herzmuskelspezifischen Proben durchgeführt. Die Real Time-PCR mit mRNA aus dem linken Ventrikel des Herzens und mit Primern innerhalb der POZ-Domäne deutete auf eine Rekombinationsrate von circa 43 % hin. Die Southern Blot-Analyse mit genomischer DNA aus isolierten Kardiomyozyten und Fibroblasten wies eine deutlich erhöhte Rekombinationsrate in reinen Kardiomyozyten im Vergleich zu anderen

Herzzellen auf. Da Kardiomyozyten nur höchsten 30 % (Chen et al., 1998) der gesamten Zelltypen im Herz entsprechen, kann man die tatsätzliche Effektivität der Cre-Rekombinase auf mehr als 90 % schätzen. Die Miz1-Knockout-Mäuse zeigten keinen spontanen Phänotyp und waren kardiologisch unauffällig. Daraufhin wurden die Mausherzen mittels TAC-Operation in einen Hypertrophie-Zustand versetzt. Als Kontrolle wurden scheinoperierte Tiere (SHAM) verwendet. Die erwartete Hypertrophie nach der TAC-Operation trat tendenziell auf. Die wildtypischen Tiere passten sich an den hämodynamischen Stress der TAC-Operation mit signifikanter Abnahme der linksventrikulären Dimension und einer Verbesserung der Verkürzungsfraktion (FS) an. Miz1-Knockout-Mäuse hingegen konnten den hämodynamischen Stress nicht kompensieren und wiesen eine Funktionsstörung in Form von erhöhter LVEDD, LVESD und eine sinkende FS auf. Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Deletion der Miz1-POZ-Domäne einen negativen Einfluss auf die linksventrikuläre Dimension und Funktion nach einer Druckbelastung darstellt. Bei der Untersuchung des Hypertrophiemarkergens ANF wurde festgestellt, dass Miz1-Knockout-Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Tieren über eine signifikant erniedrigte ANF-Menge verfügen und nicht in der Lage sind, die ANF-Expression nach der TAC-Operation hochzuregulieren.

Um den Einfluss einer Steigerung der Miz1-Expression auf die Entwicklung einer Hypertrophie und Herzinsuffizienz *in vivo* zu beurteilen, wurden in dieser Arbeit transgene Mäuse, welche Miz1 kardiomyozytenspezifisch überexprimieren, generiert und phänotypisiert. Die humane Miz1-cDNA wurde unter der Steuerung des α-MHC-Promotors exprimiert. Es wurden drei unabhängige Mauslinien etabliert (Linie 1, Linie 3, Linie 10), die Miz1 auf der mRNA-Ebene unterschiedlich stark überexprimierten. Auf der Proteinebene war die Miz1-Expression in der stabilisierten Linie 3 ungleichmäßig. Ein Grund dazu könnte die Segregation unterschiedlichen Kopienzahlen. Die Miz1 transgenen Mäuse entwickelten sich normal und hatten keinen spontanen Phänotyp. Echokardiografische Überexpression von Miz1 keinen Einfluss auf das physiologische Wachstum des Herzens. Acht Wochen nach Druckbelastung durch die TAC-Operation war es nicht möglich, den Effekt einer Miz1-Überexpression unter hypertrophischen Bedingungen zu beurteilen, da die TAC-Operation nicht effektiv gewesen war.

5.2 Miz1-Gen und die Entstehung von Kardiomyopathien

Bislang ist die funktionelle Bedeutung von Miz1 für die Herzfunktion völlig unbekannt. In Vorarbeiten wurde mittels der Western Blot-Analyse an Herzmaterial von Patienten mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie gezeigt, dass das Miz1-Protein bei diesen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden herunterreguliert ist. Im Gegensatz hierzu zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiermodelle der Aortenkonstriktion sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene eine erhöhte Miz1-Expression.

Weitere Untersuchungen zur Klärung der Miz1-Beteiligung an der Entstehung von Kardiomyopathien wurden mittels genetischem Screening durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Mutation im Exon 6 des Miz1-Gens ein Auslöser von Kardiomyopathie ist. Die bei dem Screening von 94 DCM-Patienten gefundene A188V-Miz1-Mutation konnte Miz1 als Kandidatengen für die Auslösung von Kardiomyopathie identifizieren und somit die genetische Beratung und die Therapie dieser Herzerkrankung beeinflussen. Um sicherzustellen, dass Miz1 tatsächlich ein Kandidatengen für die Auslösung von Kardiomyopathie darstellt, müssten deutlich mehr Patienten und Familien einem Screening, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, unterzogen werden. Eine solche Studie ist jedoch langwierig und umstritten. Auf der Homepage des Journals "Nature" (http://www.nature.com/index.html) wird anhand der Studie von Morgan und Mitarbeitern ausdrücklich darauf hingewiesen, dass genetische Tests für das Herzerkrankungsrisiko nicht immer eindeutig ausgelegt werden können. Ledford und Mitarbeitern argumentieren, dass komplexe Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Fettsucht oder Herzerkrankungen keinem einzelnen veränderten Gen oder keinem einzelnen genetischen Pfad zugeordnet werden dürfen, da zusätzlich von anderen Einflüssen wie Umweltfaktoren und anderen genetisch prädisponierenden Faktoren ausgegangen werden muss. Oft tauchten in kleineren Studien falsch positive Gentestergebnisse auf, welche mit Studien an größeren Populationen widerlegt werden konnten (Morgan et al., 2007; Ledford et al., 2007).

Daher galt es zu erforschen, welche Funktion Miz1 im Herzen und während der Entwicklung einer Herzinsuffizienz einnimmt.

5.3 Miz1 in seiner Funktion als sarkomerisches Z-Scheiben-Protein

Jüngste Befunde deuten darauf hin, dass die sarkomerische Z-Scheibe neben einer rein mechanischen Funktion auch eine Schlüsselrolle in der myokardialen Signaltransduktion spielen könnte (Frey *et al.*, 2000, Frank und Frey, 2011). Im Vorfeld dieser Arbeit wurde Miz1 als möglicher Interaktionspartner des bedeutungsvollen Z-Scheibe-Proteins MLP identifiziert. Dieses muskelspezifische Protein MLP ist im Cytoplasma lokalisiert, wobei seine genaue cytoplasmatische Lokalisation in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Obwohl das Protein nach Arber *et al.* (1994, 1997) in den Z-Scheiben lokalisiert ist, deuten Arbeiten von Flick und Konieczny (2000) und die Bindungspartner Tcap (Knöll *et al.*, 2002), N-RAP (Ehler *et al.*, 2001) und β-Spectrin (Flick und Konieczny, 2000) darauf hin, dass MLP als *dual compartment protein* auch eine

funktionelle Rolle in den Strukturen der Kraftübertragung, z. B. in den Costameren und Glanzstreifen einnimmt und dort als Komponente eines Mechanosensors fungiert (Knöll et al., 2002). Sowohl Tcap als auch MLP binden an Mitglieder der Calsarcin-Familie (Frey und Olson, 2002; Heineke et al., 2005), welche wiederum mit der Ca2+/Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin interagieren (Frey et al., 2000; Frey et al., 2004). Ebenso haben Peukert et al. (1997) und Bardwell und Treismann (1994) herausgefunden, dass Miz1 sich als lösliches Protein im Zytoplasma befindet und nur im Zellkern vorliegt, wenn es an Myc gebunden ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Miz1 in adulten Maus Kardiomyozyten an der Z-Scheibe lokalisiert ist, wo bekanntlich auch α -Actinin und MLP zu finden sind (Abbildung 4.4). Nach einer *in vivo* Koimmunopräzipitation stellte sich heraus, dass Miz1 mit MLP und Calcineurin im Herzen interagiert. Somit korrelierte dieses Ergebnis mit der Literatur und führte zu der Hypothese, dass Miz1 durch seine Interaktion mit MLP und Calcineurin die Aktivität von Calcineurin beeinflussen könnte. Ein Calcineurin-Promotor-Assay zeigte daraufhin, dass Miz1 in der Lage war, den Calcineurin-Promotor zu aktivieren und dass die A188V-Miz1 mutierte Variante zu einer deutlich verminderten Aktivierung führte (Abbildung 4.2). Diese schwache Calcineurin-Promotor-Aktivierung könnte auf mögliche Konformations- und Strukturänderungen durch den Aminosäuretausch im mutierten Miz1 zurückzuführen sein. Um zu bestimmen, welche Regionen von Miz1 und Calcineurin für deren Interaktion verantwortlich sind, wurden in dieser Arbeit Deletionskonstrukten von Miz1 und Calcineurin generiert. Chromatinimmunopräzipitation (ChIp) sowie Luciferase-Assay-Experimente wurden begonnen, aber aus zeitlichen Gründen nicht abgeschlossen.

5.4 Funktion der Miz1-Überexpression in isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Miz1 exprimierender Adenovirus (AdMiz1) generiert, um den Effekt einer Miz1-Überexpression *ex vivo* zu untersuchen. In der Literatur ist Miz1 als Zellzyklusregulator bekannt und seine Überexpression löst in humanen und in Nagerzellen einen Wachstumsarrest aus (Seoane *et al.*, 2001, 2002; Staller *et al.*, 2001; Herold *et al.*, 2002; van de Wetering *et al.*, 2002; Wu et al., 2003). Innerhalb der vorliegenden Untersuchungen bewirkte die Überexpression von Miz1 in primären Kardiomyozyten neonataler Ratten eine dosisabhängige Zunahme der cytoplasmatischen NFAT (NFATc2)-Proteinmenge sowie eine zelluläre Hypertrophie (Abbildung 4.5 und 4.6). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass durch die Aktivierung von Calcineurin und/oder NFAT eine Myokardhypertrophie ausgelöst wird. Besondere Beachtung

verdient dabei die Arbeit von Molkentin 1998, der darlegen konnte, dass transgene Mäuse, die aktivierte Formen von Calcineurin oder NFATc3 überexprimierten, binnen zwei Monate an kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz verstarben. Bei transgenen Mäusen mit erhöhter Calcineurin-Aktivität, welche zusätzlich mit NFATc2-Knockout-Mäusen gekreuzt wurden, zeigte sich eine deutliche Abnahme von Calcineurin induziertem kardialem Wachstum. Bei den NFATc2-Knockout-Mäusen fehlte zudem ein durch Training beabsichtigtes physiologisches Wachstum des Herzens. Bourajjaj *et al.* konnten somit zeigen, dass NFATc2 eine wichtige Rolle beim pathologischen Umbau des Herzens spielt (Bourajjaj *et al.*, 2008).

Durch die Erkenntnis, dass Miz1 mit Calcineurin interagiert und den Calcineurin-Promotor aktiviert, wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass Miz1 einen Effekt auf den Calcineurin-NFAT-Signalweg hat. Ob andere Signalwege in der Hypertrophieantwort durch die Miz1-Überexpression involviert sind, sollte in Nachfolgestudien untersucht werden.

Für viele Herzerkrankungen wird als Folge des Umbauprozesses und der stärkeren Belastung der Kardiomyozyten eine erhöhte Sterberate festgestellt (Coutu et al., 2003). Dabei können in dilatativen Kardiomyopathien sowohl Zelltod durch Autophagie als auch Apoptose festgestellt werden (Knaapen et al., 2001). Zum Nachweis, dass Apoptose von Kardiomyozyten eine kausale Bedeutung bei der Entstehung dieser Krankheiten besitzt, wurden genetische und pharmakologische Ansätze zur Hemmung der Apoptose im Herzen verfolgt. Beispielsweise bewirkte eine kardiomyozytenspezifische Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in Mäusen eine verringerte Infarktgröße nach Myokardinfarkt-Operationen und eine verbesserte Herzfunktion nach Ischämie und anschließender Reperfusion (Brocheriou et al., 2000; Chen et al., 2001). Vor kurzem wurde bestätigt, dass der Transkriptionsfaktor Miz1 die Transkription von Bcl2 in primären humanen Zellen aktiviert. Zudem wurde gezeigt, dass die Hemmung des Miz1/Bcl2-Signals ein essenzielles Ereignis der durch c-Myc vermittelten Apoptose ist (Patel und McMahon, 2007). In Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die p53 vermittelte Apoptose durch Bcl2 verhindert werden kann (Kirshbaum und de Moissac, 1997). Wie p53 kann auch Miz1 durch Stress aktiviert werden und beide Transkriptionsfaktoren sind für die Induktion der p21-Expression erforderlich (Herold et al., 2002; Seoane et al., 2002; van de Wetering et al., 2002). Die Interaktion von Myc mit Miz1 führt auch in Anwesenheit von p53 zu einer unterdrückten p21-Expression. p21 hat die Fähigkeit, Zellen vor der p53-vermittelten Apoptose zu schützen, und der Verlust von p21 könnte somit zur Apoptose führen. Es stellte sich heraus, dass Miz1 durch seine Fähigkeit, p21 und Bcl2 zu aktivieren, ein antiapoptotisches Potenzial hat. Dieser Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen, und es wurde festgestellt, dass Miz1 überexprimierende neonatale Ratten-Kardiomyozyten in der Lage waren, die Apoptoserate nach einer StaurosporinStimulation erheblich zu vermindern. Somit wurde gezeigt, dass Miz1 antiapoptotische Eigenschaften besitzt.

5.5 Miz1-Funktion in vivo

Um die Miz1-Funktion *in vivo* zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein herzspezifischer konditionaler Miz1-Knockout und Miz1 transgene Mausmodelle generiert und charakterisiert. In den letzten Jahren wurden viele Mauslinien als Modelle für menschliche Kardiomyopathien generiert. Damit die Herzfunktionsparameter eindeutig bestimmt werden konnten, wurden die echokardiografischen Methoden und Geräte speziell an kleine Säugetiere mit einer hohen Herzfrequenz angepasst (Patten *et al.*, 2002). Bisher konnten für Herzkrankheiten bei Mäusen noch keine Referenzwerte evaluiert werden, jedoch zeigten die hier untersuchten Mäuse einige echokardiografisch auffällige Parameter.

Da die Mäuse keinen spontanen Phänotyp zeigten, wurden sie einer Druckbelastung mittels Konstriktion der Aorta (TAC) ausgesetzt, um eine Herzhypertrophie zu induzieren.

Die konditionalen Miz1-Knockout-Mausmodelle führten nach der TAC-Operation zu einer tendenziellen Zunahme der Herzhypertrophie-Parameter, sowohl bei den wildtypischen Tieren als auch bei den Miz1-Knockout-Mäusen. Die nur leichte Zunahme des Verhältnisses Herzgewicht/Körpergewicht, Septumdicke und Hinterwanddicke ist wahrscheinlich auf die technische Handhabung zurückzuführen, da das Ausmaß der Aortenkonstriktion durch die 25 Gauge-Kanüle stark genug war. Andererseits waren die zu Beginn einer Hypertrophie zu beobachtende Abnahme der enddiastolischen und endsystolischen Diameter und die Zunahme der Verkürzungsfraktion signifikant. Diese kompensatorischen Vorgänge wurden 2001 in den Arbeiten von Nakamura et al. dargestellt, indem diese eine Verbesserung der linksventrikulären Funktionen während der Hypertrophieentwicklung nach einer TAC-Operation beobachteten. Allerdings waren die Miz1-Knockout-Mäuse nicht in der Lage, diese kompensatorischen Vorgänge zu leisten und entwickelten dementsprechend eine systolische Dysfunktion mit signifikanter Zunahme der enddiastolischen und endsystolischen Diameter und eine Abnahme der Kontraktilität. Dies deutet auf einen ungünstigen Effekt des konditionalen Miz1-Knockouts auf die systolische Funktion unter Druckbelastung hin. Möglicherweise spielt hier die Apoptosehemmung unter Miz1 eine Rolle. Die Tatsache, dass der klassische Hypertrophiemarker ANF nicht signifikant im Anschluss an die TAC-Operation angestiegen ist, ist als kritischer Fehler dieses Experimentes zu werten. Allerdings wäre bei einer stärkeren Aorten Konstriktion mit einer höheren Mortalität zu rechnen gewesen.

Diskussion

Die Arbeiten von Gebhardt und seinen Mitarbeitern 2007 machten deutlich, wie unspezifisch der Antikörper Miz1 10E2 ist, indem eine Western Blot Analyse zur Detektion von Miz1 nicht sensitiv genug war und das Protein nur durch eine Immunpräzipitation nachgewiesen werden konnte. Dazu kommt die Tatsache, dass die Ergebnisse von Western-Blots nicht immer eindeutig sind, da es gerade bei Proteinlysate zu Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen oder Proteinfragmenten vor kommen kann (Bieberich *et al.*, 1994).

Die Miz1 transgenen Mäuse, welche innerhalb dieser Arbeit generiert wurden, befanden sich noch in der Anfangsphase der echokardiografischen Untersuchungen und lieferten wegen der geringen Anzahl an Versuchstieren keine signifikanten Daten. Weitere detaillierte Untersuchungen der Herzfunktion nach TAC-Operation bei Miz1 Knockout und transgenen Mäusen sind nötig. Zu erwarten wäre, in Anbetracht der *in vitro* Daten, eine Hypertrophieentwicklung der Miz1 transgenen Mäuse.

Dennoch weisen die in vivo Experimente auf die protektive Wirkung von Miz1 hin und sind somit konform mit den in vitro Experimenten. Bezüglich der pathophysiologischen Relevanz wurde Miz1, im Gegensatz zu dessen Interaktionspartner Myc bzw. c-Myc, als prognostisch günstiger Faktor identifiziert (Ikegaki *et al.*, 2007). Bei Auftreten eines Neuroblastoms, einem malignen Tumor, der aus sympathischen neuronalen Vorläuferzellen der Neurallleiste hervorgeht, korrlierte die hohe Expression von Miz1 mit einem günstigen Krankheitsverlauf.

5.6 Perspektiven

Die Entwicklung der Molekularkardiologie hat in den letzten Jahren neue, relevante Ansichten über die Pathophysiologie vererbbarer Herzerkrankungen hervorgebracht. Trotzdem ist die Mehrzahl der krankheitsverursachenden Mutationen in Genen, deren Expression an der Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie beteiligt ist, weiterhin unbekannt. Die Interaktion des Myc interagierenden Proteins 1 (Miz1) mit dem Z-Scheibe-Protein MLP und die Beteiligung von Miz1 an der Entstehung von Kardiomyopathie bildeten den Ansatz für die Untersuchung der Miz1-Funktion innerhalb dieser Arbeit.

Die hier beschriebene DCM auslösende A188V-Miz1-Mutation sollte in zukünftigen Arbeiten in einem Knock-in-Mausmodell generiert und charakterisiert werden, um die molekularen Mechanismen und den Krankheitsverlauf der DCM besser zu verstehen. Um zu klären, ob Miz1 als Kandidatengen für die Auslösung einer Kardiomyopathie infrage kommt, sollten weitere genetische Screenings und Kopplungsanalysen mit einer größeren Zahl an DCM-Patienten durchgeführt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* und *in vivo* erhobenen Daten zeigen, dass sich die Wirkung von Miz1 nicht nur auf den Calcineurin-NFAT-Signalweg beschränkt, sondern auch andere Signalwege betrifft. Die weitere Aufklärung der genauen Funktion von Miz1 und den involvierten Signalwegen wird in Zukunft ein Schritt zum Verständnis der Herzinsuffizienz- und Hypertrophieentwicklung sowie der Apoptosehemmung sein, der eine Übersetzung in therapeutische Ansätze ermöglichen könnte.
6 Zusammenfassung

Die sarkomerische Z-Scheibe ist die wichtigste Struktur des dezentralisierten Modells der Mechanotransduktion. Die darin verankerten Moleküle sind in der Lage, mechanische Informationen aufzunehmen und dadurch die myokardiale Funktion dynamisch zu beeinflussen. Diese Proteine sind demzufolge auch im Zusammenhang mit Kardiomyopathien von größtem Interesse. So fand man Kardiomyopathien verursachende Mutationen in mehreren Genen, die für die Z-Scheibe assoziierte Zytoskelettproteine kodieren. Ein Beispiel hierfür ist das Muskel-LIM-Protein MLP. Mutationen in MLP führen im Menschen und in der Maus zu dilatativen Kardiomyopathien. Um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären, wurden MLP interagierende Proteine gesucht und dadurch das Myc interagierende Zinkfinger Protein 1 (Miz1) identifiziert. Daraufhin wurde die Analyse der Miz1-Funktion im Herzen als Zielsetzung dieser Arbeit festgelegt.

Genetische Screening-Analysen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass eine Substitutionsmutation im Exon 6 des Miz1-Gens (A188V-Miz1) kardiomyopathieauslösend ist. Koimmunopräzipitation und subzelluläre Lokalisationsexperimente zeigten eine Lokalisierung von Miz1 an der Z-Scheibe, wo es mit MLP und Calcineurin interagiert. In einem in vitro Luciferase-Assay konnte Miz1 den Calcineurin-Promotor aktivieren. Die hier dargestellten Ergebnisse legen zum ersten Mal nahe, dass die Überexpression von Miz1 in isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten zu einer Aktivierung von NFATc2 und zur zellulären Hypertrophie führt. Zusätzlich wirkt die Miz1-Überexpression in den gleichen ex vivo Modellen antiapoptotisch. Durch die Tatsache, dass im Tiermodell der Aortenkonstriktion (TAC) die Miz1-Expression hochreguliert ist, bestätigt sich die Hypothese der Beteiligung von Miz1 an der Entstehung und an der Entwicklung von Kardiomyopathien. Dabei ist Miz1 kein ausschließlich während der Embryonalphase exprimiertes Gen, da seine Expression während der Herzentwicklung stabil bleibt. Für die Untersuchung der in vivo Miz1-Funktion wurden im Laufe dieser Arbeit herzspezifische konditionale Miz1-Knockout und Miz1 transgene Mäuse generiert. Die Analyse der konditionalen Miz1-Knockout-Tiere deutete auf einen protektiven Effekt von Miz1 hin: Die Miz1-Knockout-Mäuse waren nicht in der Lage die kompensatorischen Mechanismen vier Wochen nach einer TAC-Operation zu leisten. Stattdessen entwickelten diese Tiere direkt eine Herzinsuffizienz. Die Untersuchung der Miz1 transgenen Mäuse befindet sich noch in der Anfangsphase, zu erwarten wäre jedoch eine spontane Hypertrophieentwicklung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sich bei Miz1 um ein Z-Scheibe-Protein handelt, dessen Expression bei Herzhypertrophie hochreguliert ist, dessen Überexpression zur zellulären Hypertrophie führt und welches, dank seines antiapoptotischen Charakters, kardioprotektiv wirkt.

7 Literaturverzeichnis

Adhikary, S., K. Peukert H. Karsunky, V. Beuger, W. Lutz, H.-P. Elsasser, T. Moroy and M. Eilers. (2003). "Miz1 Is Required for Early Embryonic Development during Gastrulation." Mol. Cell. Biol. 23(21): 7648-7657

Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. (2005). "The genetic basis for cardiac remodeling." Annu Rev Genomics Hum Genet ;6:185-216

Ahmad F, S. K. Banerjee, M. L. Lage, X. N. Huang, S. H. Smith, S. Saba, J. Rager, D. A. Conner, A. M. Janczewski, K. Tobita, J. P. Tinney, I. P. Moskowitz, A. R. Perez-Atayde, B. B. Keller, M. A. Mathier, S. G. Shroff, C. E. Seidman and J. G. Seidman. (2008). " The Role of Cardiac Troponin T Quantity and Function in Cardiac Development and Dilated Cardiomyopathy." PLoS ONE 3(7): e2642. doi:10.1371/journal.pone.0002642

Arber, S., G. Halder, Caroni, P. (1994). "Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation." Cell 79(2): 221-231.

Arber, S., J. J. Hunter, J. Ross, M. Hongo, G. Sansig, J. Borg, J.-C. Perriard, K. R. Chien and P. Caroni (1997). "MLP-Deficient Mice Exhibit a Disruption of Cardiac Cytoarchitectural Organization, Dilated Cardiomyopathy, and Heart Failure." Cell 88(3): 393-403.

Assomull, R. G., S. K. Prasad, J. Lyne, G. Smith, E. D. Burman, M. Khan, M. N. Sheppard, P. A. Poole-Wilson and D. J. Pennell. (2006). "Cardiovascular Magnetic Resonance, Fibrosis, and Prognosis in Dilated Cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol 48(10): 1977-1985.

Bardwell, V. J. and R. Treisman (1994). "The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif." Genes & Development 8(14): 1664-1677.

Becher Jan (2006). "Untersuchung des Calcineurin Signalweges bei der Myokardhypertrophie" Dissertation

Bieberich, C.J.; Ngo, L.; Jay,G. (1994). "in Transgenic Animal Technology, A Laboratory Handbook" (Pinkert, C.A. ed.), Academic Press Inc., San Diego, CA

Birnboim H.C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol.; 100:243-55".

Birnboim H.C., Doly J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res.; 7(6):1513-23.

Bourajjaj, M., A.-S. Armand, P. A. da Costa Martins, B. Weijts, R. van der Nagel, S. Heeneman, X. H. Wehrens and L. J. De Windt. (2008). "NFATc2 Is a Necessary Mediator of Calcineurin-dependent Cardiac Hypertrophy and Heart Failure." Journal of Biological Chemistry 283(32): 22295-22303.

Bowen, H., T. E. Biggs, E. Phillips, S. T. Baker, V. H. Perry, D. A. Mann and C. H. Barton. (2002). "c-Myc Represses and Miz-1 Activates the Murine Natural Resistance-associated Protein 1 Promoter." Journal of Biological Chemistry 277(38): 34997-35006.

Brancaccio, M., L. Fratta, A. Notte, E. Hirsch, R. Poulet, S. Guazzone, M. De Acetis, C. Vecchione, G. Marino, F. Altruda, L. Silengo, G. Tarone and G. Lembo. (2003). "Melusin, a muscle-specific integrin [beta]1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload." Nat Med 9(1): 68-75.

Brocheriou, V., A. A. Hagège, A. Oubenaïssa, M. Lambert, V. O. Mallet, M. Duriez, M. Wassef, A. Kahn, P. Menasché and H. Gilgenkrantz. (2000). Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury, John Wiley & Sons, Ltd. 2: 326-333.

Calderone, A., N. Takahashi, N. J. Izzo, Jr, C. M. Thaik and W. S. Colucci. (1995). "Pressure- and Volume-Induced Left Ventricular Hypertrophies Are Associated With Distinct Myocyte Phenotypes and Differential Induction of Peptide Growth Factor mRNAs." Circulation 92(9): 2385-2390.

Chen, J., S. W. Kubalak, S. Minamisawa, R. L. Price, K. D. Becker, R. Hickey, J. Ross and K. R. Chien. (1998). "Selective Requirement of Myosin Light Chain 2v in Embryonic Heart Function." Journal of Biological Chemistry 273(2): 1252-1256. **Chen, Z., C. C. Chua, Y.-S. Ho, R. C. Hamdy and B. H. L. Chua. (2001).** "Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 280(5): H2313-H2320.

Coutu, P., J. C. Hirsch, M. L. Szatkowski and J. M. Metzger. (2003). "Targeting Diastolic Dysfunction by Genetic Engineering of Kalzium Handling Proteins." Trends in Cardiovascular Medicine 13(2): 63-67.

Crow, M. T., K. Mani, Y.-J. Nam and R. N. Kitsis. (2004). "The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis." Circ Res 95(10): 957-970.

Dao, Q., P. Krishnaswamy, R. Kazanegra, A. Harrison, R. Amirnovin, L. Lenert, P. Clopton, J. Alberto, P. Hlavin and A. S. Maisel. (2001). "Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting." Journal of the American College of Cardiology 37(2): 379-385.

De Windt, L. J., H. W. Lim, T. Taigen, D. Wencker, G. Condorelli, G. W. Dorn, R. N. Kitsis and J. D. Molkentin. (2000). "Calcineurin-Mediated Hypertrophy Protects Cardiomyocytes From Apoptosis In Vitro and In Vivo : An Apoptosis-Independent Model of Dilated Heart Failure." Circulation Research 86(3): 255-263.

Dhordain, P., S. Quief, D. I. Lantoine, J.-P. Kerckaert, O. Albagli, R. J. Lin and R. M. Evans. (1998). "The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression." Nucleic Acids Research 26(20): 4645-4651.

Ehler, E., R. Horowits, C. Zuppinger, R. L. Price, E. Perriard, M. Leu, P. Caroni, M. Sussman, H. M. Eppenberger and J.-C. Perriard. (2001). "Alterations at the Intercalated Disk Associated with the Absence of Muscle Lim Protein." The Journal of Cell Biology 153(4): 763-772.

Eilers, M., S. Schirm, and J. M. Bishop. (1991). "The MYC protein activates transcription of the alphaprothymosin gene." The EMBO journal 10(1): 133-41.

Flick, M. J. and S. F. Konieczny (2000). "The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of betal-spectrin." Journal of Cell Science 113(9): 1553-1564.

Frank, D., C. Kuhn, H. A. Katus and N. Frey. (2007). "Role of the sarcomeric Z-disc in the pathogenesis of cardiomyopathy." Future Cardiology 3(6): 611-622.

Frank, D., C. Kuhn, H. A. Katus and N. Frey. (2006). "The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease." Journal of Molecular Medicine 84(6): 446-468.

Frank, D. and N. Frey (2011) "Cardiac Z-disc Signaling Network." Journal of Biological Chemistry 286(12): 9897-9904.

Frey, N., H. A. Katus, E. N. Olson and J. A. Hill. (2004). "Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target?" Circulation 109(13): 1580-1589.

Frey, N. and E. N. Olson (2002). "Calsarcin-3, a Novel Skeletal Muscle-specific Member of the Calsarcin Family, Interacts with Multiple Z-disc Proteins." Journal of Biological Chemistry 277(16): 13998-14004.

Frey, N., J. A. Richardson, and E. N. Olson. (2000). "Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurinbinding proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences 97(26): 14632-14637.

Gartel, A. L. and K. Shchors (2003). "Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes." Experimental Cell Research 283(1): 17-21.

Gebhardt, A., C. Kosan, B. Herkert, T. Moroy, W. Lutz, M. Eilers and H.-P. Elsasser. (2007). "Miz1 is required for hair follicle structure and hair morphogenesis." Journal of Cell Science 120(15): 2586-2593.

Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James and R. N. Eisenman. (2000). "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." Annual Review of Cell and Developmental Biology 16: 653-699.

Hanford, D. S., D. J. Thuerauf, S. F. Murray and C. C. Glembotski. (1994). "Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes." Journal of Biological Chemistry 269(42): 26227-26233.

Hayashi, T., T. Arimura, M. Itoh-Satoh, K. Ueda, S. Hohda, N. Inagaki, M. Takahashi, H. Hori, M. Yasunami, H. Nishi, Y. Koga, H. Nakamura, M. Matsuzaki, B. Y. Choi, S. W. Bae, C. W. You, K. H. Han, J. E. Park, R. Knoll, M. Hoshijima, K. R. Chien and A. Kimura. (2004). "Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol 44(11): 2192-201.

Heineke, J. and J. D. Molkentin (2006). "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." Nat Rev Mol Cell Biol 7(8): 589-600.

Heineke, J., H. Ruetten, C. Willenbockel, S. C. Gross, M. Naguib, A. Schaefer, T. Kempf, D. Hilfiker-Kleiner, P. Caroni, T. Kraft, R. A. Kaiser, J. D. Molkentin, H. Drexler and K. C. Wollert. (2005). "Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(5): 1655-1660.

Herold, S., M. Wanzel, V. Beuger, C. Frohme, D. Beul, T. Hillukkala, J. Syvaoja, H.-P. Saluz, F. Haenel and M. Eilers. (2002). "Negative Regulation of the Mammalian UV Response by Myc through Association with Miz-1." Molecular Cell 10(3): 509-521.

Hitt, Marry M., Phillip, Ng, Graham, Frank L. (2006). "Construction and Propagation of Human Adenovirus Vectors" Cell Biologie Chap. 53.

Ikegaki, N., Gotoh, T., Kung, B., Riceberg, J.S., Kim, D.Y., Zhao, H., Rappaport, E.F., Hicks, S.L., Seeger, R.C., and Tang, X.X. (2007). "De novo identification of MIZ-1 (ZBTB17) encoding a MYC-interacting zinc-finger protein as a new favorable neuroblastoma gene." Clin Cancer Res 13, 6001-6009.

Kirby, K. S. (1956). "A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues." The Biochemical journal 64(3): 405-8.

Kirshenbaum, L. A. and D. de Moissac (1997). "The bcl-2 Gene Product Prevents Programmed Cell Death of Ventricular Myocytes." Circulation 96(5): 1580-1585.

Knaapen, M. W. M., M. J. Davies, M. De Bie, A. J. Haven, W. Martinet and M. M. Kockx. (2001). "Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure." Cardiovascular Research 51(2): 304-312.

Knöll, R., M. Hoshijima, H. M. Hoffman, V. Person, I. Lorenzen-Schmidt, M. L. Bang, T. Hayashi, N. Shiga,
H. Yasukawa, W. Schaper, W. McKenna, M. Yokoyama, N. J. Schork, J. H. Omens, A. D. McCulloch, A.
Kimura, C. C. Gregorio, W. Poller, J. Schaper, H. P. Schultheiss and K. R. Chien. (2002). "The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy." Cell 111(7): 943-55.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.

Langendorff, O. (1895). "Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen." Pflügers Archiv European Journal of Physiology 61(6): 291-332.

Ledford (2007). "Tests for heart-disease risk could be misleading." nature.

Lim, H. W., Molkentin, J. D., . (1999). "Calcineurin and human heart failure." Nature Medicine 5, 246-247 doi: 10.1038/6430

Liu, J., Y. Zhao, Y. Zhao, M. Eilers and A. Lin. (2009). "Miz1 is a signal- and pathway-specific modulator or regulator (SMOR) that suppresses TNF-α-induced JNK1 activation." Proceedings of the National Academy of Sciences 106(43): 18279-18284.

Loh, E.L., J.F. Elliott, S. Cwirla, L.L. Lanier, and M.M. Davis. (1989). " Polymerase chain reaction with single sided specificity: Analysis of T cell receptor delta chain." Science 243: 217-220.

Mandinov Lazar, Franz R. Eberli, Christian Seiler, and Otto M. Hess. (2000). "Diastolic heart failure" Cardiovasc Res 45(4): 813-825 doi:10.1016/S0008-6363(99)00399-5 **Marmur, J. (1961).** "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms." Journal of Molecular Biology 3(2): 208-218, IN1.

Marian A.J and R. Roberts (1995). "Recent Advances in the Molecular Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy." Circulation.; 92:1336-1347, doi:10.1161/01.CIR.92.5.1336

Maron, B. J., J. A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A. J. Moss, C. E. Seidman and J. B. Young. (2006). "Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies." Circulation 113(14): 1807-1816.

McKinsey, T. A. and E. N. Olson (1999). "Cardiac hypertrophy, sorting out the circuitry." Current Opinion in Genetics & amp; Development 9(3): 267-274

Miao, L., Z. Song, L. Jin, Y. M. Zhu, L. P. Wen and M. Wu. (2009). "ARF antagonizes the ability of Miz-1 to inhibit p53-mediated transactivation." Oncogene 29(5): 711-722.

Molkentin, J. D. (2000). "Calcineurin and Beyond : Cardiac Hypertrophic Signaling." Circ Res 87(9): 731-738.

Molkentin, J. D., J.-R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant and E. N. Olson. (1998). "A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy." Cell 93(2): 215-228.

Morgan, T. M., H. M. Krumholz, R. P. Lifton and J. A. Spertus. (2007). "Nonvalidation of Reported Genetic Risk Factors for Acute Coronary Syndrome in a Large-Scale Replication Study." JAMA: The Journal of the American Medical Association 297(14): 1551-1561.

Mullis, K., Saiki, R.K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., ScharF, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Erlich, H. A. (1985). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". Science. 239: 487-491. Narula, J., N. Haider, R. Virmani, T. G. DiSalvo, F. D. Kolodgie, R. J. Hajjar, U. Schmidt, M. J. Semigran, G. W. Dec and B.-A. Khaw. (1996). "Apoptosis in Myocytes in End-Stage Heart Failure." New England Journal of Medicine 335(16): 1182-1189.

Nyberg-Hoffman, C. and E. Aguilar-Cordova (1999). "Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies." Nat Med 5(8): 955-957.

Oka Toru, Yan-Shan Dai, and Jeffery D. Molkentin. (2005). "Regulation of Calcineurin through Transcriptional Induction of the calcineurin A β Promoter In Vitro and In Vivo." Mol. Cell. Biol. 25:6649-6659; doi:10.1128/MCB.25.15.6649-6659.

Patel, J. H. and S. B. McMahon (2005). "Targeting of MIZ-1 is essential for MYC mediated apoptosis." J. Biol. Chem.: M513038200.

Patel, J. H. and S. B. McMahon (2007). "BCL2 Is a Downstream Effector of MIZ-1 Essential for Blocking c-MYC-induced Apoptosis." Journal of Biological Chemistry 282(1): 5-13.

Patten, R. D., M. J. Aronovitz, P. Bridgman and N. G. Pandian. (2002). "Use of pulse wave and color flow Doppler echocardiography in mouse models of human disease." Journal of the American Society of Echocardiography 15(7): 708-714.

Peukert, K., P. Staller, A. Schneider, G. Carmichael, F. Hanel and M. Eilers. (1997). "An alternative pathway for gene regulation by Myc." EMBO J 16(18): 5672-5686.

Richard, P., P. Charron, L. Carrier, C. Ledeuil, T. Cheav, C. Pichereau, A. Benaiche, R. Isnard, O. Dubourg, M. Burban, J.-P. Gueffet, A. Millaire, M. Desnos, K. Schwartz, B. Hainque, M. Komajda and for the EUROGENE Heart Failure Project. (2003). "Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of Disease Genes, Spectrum of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy." Circulation 107(17): 2227-2232.

Rockman, H. A., R. S. Ross, A. N. Harris, K. U. Knowlton, M. E. Steinhelper, L. J. Field, J. Ross and K. R. Chien. (1991). "Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor

transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy." Proceedings of the National Academy of Sciences 88(18): 8277-8281.

Rusnak, F. and P. Mertz (2000). "Calcineurin: Form and Function." Physiological Reviews 80(4): 1483-1521.

Seidman, J. G. and C. Seidman (2001). "The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms." Cell 104(4): 557-67.

Seoane, J., C. Pouponnot, P. Staller, M. Schader, M. Eilers and J. Massague. (2001). "TGF[beta] influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b." Nat Cell Biol 3(4): 400-408.

Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." Journal of Molecular Biology 98(3): 503-517.

Statistisches Bundesamt Deutschland. (2004). "Jeder sechste Euro im Gesundheitswesen für Herz-Kreislauf-Erkrankungen." Pressemitteilung Nr.288 vom 06.07.2004

Steinmetz, M., T. Quentin, A. Poppe, T. Paul and C. Jux. (2005). "Changes in expression levels of genes involved in fatty acid metabolism: upregulation of all three members of the PPAR family (α , γ , δ) and the newly described adiponectin receptor 2, but not adiponectin receptor 1 during neonatal cardiac development of the rat." Basic Research in Cardiology 100(3): 263-269.

Subramaniam, A., W. K. Jones, J. Gulick, S. Wert, J. Neumann and J. Robbins. (1991). "Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice." Journal of Biological Chemistry 266(36): 24613-20.

Sugden, P. H. and A. Clerk (1998). "Stress-Responsive" Mitogen-Activated Protein Kinases (c-Jun N-Terminal Kinases and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases) in the Myocardium." Circ Res 83(4): 345-352.

Thierfelder, L., H. Watkins, C. MacRae, R. Lamas, W. McKenna, H. P. Vosberg, J. G. Seidman and C. E. Seidman. (1994). "Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere." Cell 77(5): 701-12.

Tommerup, N. and H. Vissing (1995). "Isolation and Fine Mapping of 16 Novel Human Zinc Finger-Encoding cDNAs Identify Putative Candidate Genes for Developmental and Malignant Disorders." Genomics 27(2): 259-264.

Trumpp, A., Y. Refaeli, T. Oskarsson, S. Gasser, M. Murphy, G. R. Martin and J. M. Bishop. (2001). "c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size." Nature 414(6865): 768-773.

van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A.-P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema and H. Clevers. (2002). "The [beta]-Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells." Cell 111(2): 241-250.

Villard, E., L. Duboscq-Bidot, P. Charron, A. Benaiche, V. Conraads, N. Sylvius and M. Komajda. (2005). "Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene." European Heart Journal 26(8): 794-803.

Wanzel, M., S. Herold and M. Eilers. (2003). "Transcriptional repression by Myc." Trends in Cell Biology 13(3): 146-150.

Watkins Hugh. (2003). "Genetic Clues to Disease Pathways in Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathies." Circulation.; 107:1344-1346, doi:10.1161/01.CIR.0000057860.52586.9C

Weisleder, N., G. Taffet and Y. Capetanaki. (2004). "Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy." PNAS 2004 101 (3) 769-774.

Wu, S., C. Cetinkaya, M. J. Munoz-Alonso, N. von der Lehr, F. Bahram, V. Beuger, M. Eilers, J. Leon and L.G. Larsson. (2003). "Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter." Oncogene 22(3): 351-360.

Yamamoto, S., V. G. Tsyplenkova, and T. N. James. (2000). "Morphological Patterns of Death by Myocytes in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia." The American Journal of the Medical Sciences 320(5): 310-319.

Yamazaki, T., I. Komuro and Y. Yazaki. (1998). "Signalling Pathways for Cardiac Hypertrophy." Cellular Signalling 10(10): 693-698.

Yang, G., T. Meguro, C. Hong, K. Asai, G. Takagi, V. L. Karoor, J. Sadoshima, D. E. Vatner, S. P. Bishop and S. F. Vatner. (2001). "Cyclosporine Reduces Left Ventricular Mass with Chronic Aortic Banding in Mice, Which Could be due to Apoptosis and Fibrosis." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 33(8): 1505-1514.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Gerd Hasenfuß für die reibungslose Übernahme der Anleitung, für die Möglichkeit in seiner Abteilung forschen zu dürfen und ganz besonders auch für seine konstruktive Kritik und sein Interesse an meinem Thema.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Ernst Wimmer und Herrn Professor Dr. Wolfgang Engel bedanken, nicht nur für die Betreuung und die Übernahme des Referats meiner Arbeit, sondern auch für den bemerkenswerten Einsatz bei der Rettung dieser Arbeit. Ohne Ihre Unterstützung würde diese Arbeit im Friedhof der abgebrochenen Promotionen begraben.

Herrn Professor Dr. Ralf Knöll danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die Anleitung in der ersten Hälfte dieser Promotion bis zu seinem Weggang nach London. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Sylvia Gunkel bedanken. Ich danke ihr für die vielen Anregungen und Ideen, für das Vertrauen und die freundschaftliche Unterstützung. Bei Dr. Byambajav Buyandelger, Dr. Snjezana Miocic, Alexandra Kirova, Sarah Rinkleff, Christiane Schulz und Anmar Al-Hassani bedanke ich mich für den Zusammenhalt während der turbulenten Zeiten im ehemaligen Labor der kardiovaskulären Molekulargenetik.

Ein spezieller und herzlicher Dank gilt Dr. Viacheslav Nikolaev und Dr. Tim Seidler, die mir Asyl gegeben und mir einen Labor- und Schreibplatz zur Verfügung gestellt haben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Dr. Nadine Kramann, Dr. Cornelia Grebe, Ruwan Perera, Julia Sprenger, Konrad Götz, Karina Zimmermann, Gudrun Müller, Anke Rutgeroth und Jessica Spitalieri für die wertvollen Anregungen zur praktischen Arbeit, für das unermüdliche Korrekturlesen, für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders Karina danke ich für die Herstellung des Miz1-Adenovirus. Gleiches gilt auch für die Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Guan und Lehnart.

Abschließend möchte ich meiner Familie Dank aussprechen, die mich trotz der Entfernung immer verstanden, unterstützt und motiviert hat. Ein großes Dankeschön geht an meinen Sohn Ian und meinen Partner Rodrigue für ihre Geduld und ihre Nachsicht in den stressigen Phasen meiner Arbeit.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:	
Name:	Josée Vouffo
Geburtsdatum:	08.02.1980
Geburtsort:	Douala (Kamerun)
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
<u>Schulbildung:</u>	
09/1986 – 06/1990	Ecole publique de Bepanda, Douala
09/1990 - 06/1998	College Alfred Saker, Douala
<u>Studium:</u>	
10/2000 – 07/2001	Technische Universität Berlin
	Fachrichtung Chemie
10/2001 – 07/2007	Universität Bielefeld
	Fachrichtung Molekulare Biotechnologie
01/2007 – 07/2007	Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Titel "Untersuchung proteolytisch destabilisierter Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP)" im Institut für Fermentationstechnik, Universität Bielefeld
08/2007 – 12/2011	Anfertigung einer Promotionsarbeit mit dem Thema: "Analyse der
	Funktion des Miz1-Gens bei Kardiomyopathie" in der Abteilung
	Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen