

Aus dem Bereich Molekulare Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Untersuchungen zur Rolle des Muskel-LIM-Proteins (MLP) bei der Entstehung von Kardiomyopathien

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2018

vorgelegt von: Monika Barth-Schäuble
geb. am: 11.01.1986 in Worms

Meiner Familie gewidmet

I. Inhaltsverzeichnis

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
III. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	14
III.1. Zusammenfassung.....	14
III.2. Summary	16
IV. EINLEITUNG	18
IV.1. Kardiomyopathie.....	18
IV.1.1. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)	20
IV.1.2. Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)	21
IV.1.3. Ischämische Kardiomyopathie (ICM).....	24
IV.2. Das Sarkomer	24
IV.3. Die Z-Scheibe	27
IV.3.1. Aufbau der Z-Scheibe	27
IV.3.2. Die Z-Scheibe und ihre Bedeutung für verschiedene Signalkaskaden.....	28
IV.4. Das Muskel-LIM-Protein (MLP)	31
IV.5. Einfluss von MLP auf die Entstehung von Herzerkrankungen.....	35
IV.6. G_q/G₁₁-abhängige, hypertrophe Signalwege im Herzen	38
IV.7. Ziele der Arbeit.....	41
V. MATERIAL UND METHODEN.....	42
V.1. Material	42
V.1.1. Geräte.....	42
V.1.2. Chemikalien	44

I. INHALTSVERZEICHNIS

V.1.3. Puffer und Lösungen	46
V.1.4. Kits und Transfektionsreagenzien	48
V.1.5. Enzyme und sekundäre Antikörper.....	48
V.1.6. Primäre Antikörper	49
V.1.7. Messsysteme	50
V.1.8. Oligonukleotide	51
V.1.8.1. PCR-Primer	51
V.1.9. Plasmide	55
V.1.9.1. Plasmide zur Genexpression in Säugetierzellen	55
V.1.10. Bakterienstämme	55
V.1.11. Zelllinien.....	55
V.1.12. Transgene Mäuse.....	56
V.1.12.1. Herzspezifisch induzierte $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout-Mäuse	56
V.1.12.2. MLP-Knockout-Mäuse	56
V.2. Methoden	57
V.2.1. Biochemische Analysemethoden.....	57
V.2.1.1. Proteinextraktion.....	57
V.2.1.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	57
V.2.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
V.2.1.4. Elektrottransfer von Protein auf PVDF-Membran (Western-Blot).....	58
V.2.1.5. Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	59
V.2.1.6. Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	60
V.2.2. Molekularbiologische Analysemethoden	62
V.2.2.1. RNA-Isolation	62
V.2.2.2. cDNA-Synthese	62
V.2.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	62
V.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	63
V.2.2.5. Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	64
V.2.2.6. Restriktion von Plasmid-DNA	64
V.2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten	65
V.2.2.8. Transformation von Bakterien	65
V.2.2.9. Kultivierung von Bakterien.....	66
V.2.2.10. Klon-PCR.....	66
V.2.2.11. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	66
V.2.2.12. Bestimmung der Reinheit und Konzentration isolierter DNA.....	67
V.2.2.13. Sequenzierung	67
V.2.2.14. Quantitative real time PCR (qPCR).....	67

I. INHALTSVERZEICHNIS

V.2.3. Zellkulturtechniken	73
V.2.3.1. Isolation von Maus-Kardiomyozyten.....	73
V.2.3.2. Isolation von Ratten-Kardiomyozyten.....	75
V.2.3.3. Kultivierung von humanen iPS Kardiomyozyten (CM).....	75
V.2.3.4. Kultivierung von Zelllinien	75
V.2.3.5. Zellzählungsmethoden	76
V.2.3.6. Immunfluoreszenz	77
V.2.3.7. Gentransfer in Zellkultur	78
V.2.3.8. Plasmid-Transfektion.....	79
V.2.3.9. PEI Transfektion	80
V.2.3.10. Virenherstellung.....	81
V.2.3.11. Virusamplifikation	82
V.2.3.12. Transduktion von Ratten-Kardiomyozyten und iPS-CM.....	83
V.2.3.13. Konfokalmikroskopie	83
V.2.3.14. Fura-2 Calcium-Messung	84
V.2.3.15. Statistische Analyse von Daten	86
 VI. ERGEBNISTEIL	88
 VI.1. Analyse von Signalwegen in $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ Knockout Herzen mit quantitativer Realtime PCR.....	88
VI.1.1. Ermittlung geeigneter „housekeeping“-Gene und Optimierung der qPCR-Methode	88
VI.1.2. Expressionsanalyse des EZM-Signalwegs in $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout-Herzen	91
VI.1.3. Expressionsanalyse des CMC-Signalweges in $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout-Herzen	95
 VI.2. Untersuchungen der Protein- und mRNA-Expression relevanter Kandidaten des CMC-Signalweges.....	99
 VI.3. Expressionsanalyse von Isoproterenol-induzierten und aortenkonstriktionierten Mäusen.....	105
 VI.4. Expressionsanalyse von humanem Herzgewebe	109
 VI.5. Expressionsanalyse der <i>CSRP3</i>-Volllänge humaner Herzohren unterschiedlichen Alters	116
 VI.6. Herstellung und Testung spezifischer MLP-Antikörper.....	121

VI.7. Protein-Protein-Interaktionsstudien.....	124
VI.8. Lokalisation und Ca²⁺-Messungen nach Expression von MLP-TagRFPT-Isoformen in Kardiomyozyten	130
VI.8.1. Expression und Lokalisation von TagRFPT-MLP	131
VI.8.2. Ca ²⁺ -Messungen an Kardiomyozyten nach Überexpression von MLP-Varianten	138
VII. DISKUSSION	142
VII.1. Hypothetisches Modell	143
VII.2. G_{αq}/G_{α11}-Knockout führt zu veränderten Expressionsmustern in Kardiomyozyten-Signalkaskaden	146
VII.3. Knockout von G_{αq}/G_{α11} führt zur Abnahme der MLP-Expression.....	151
VII.4. Kardiale Hypertrophie stimuliert die <i>CSRP3</i>-Gen-Expression	152
VII.5. Herzzellen von Kardiomyopathie-Patienten weisen verschiedene Splice-Varianten von MLP auf.....	154
VII.5.1. Der Expressionslevel von <i>CSRP3</i> korreliert mit dem Alter von Patienten	158
VII.5.2. MLP fungiert als zellulärer Stress- bzw. Dehnungs-Sensor	160
VII.6. MLP interagiert mit Muskelaktivität-assoziierten Proteinen und Proteinen der zellulären Energiegewinnung	162
VII.7. Eine verkürzte MLP-Isoform zeigt eine veränderte Lokalisationen in Ratten-Kardiomyozyten sowie iPS-CM.....	164
VII.8. Die Überexpression von MLP-Varianten verstärkt die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung in Kardiomyozyten	167
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	169
IX. DANKSAGUNG	185
X. ANHANG	187

X.1. Patientendaten	187
X.2. Statistische Analyse der Massenspektrometrie-Daten (hMLP vs. rMLP) ..	189
X.3. Daten der MS-Analyse von Rattenkardiomyozyten mit und ohne Überexpression von HA-getaggttem hMLP.....	202

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$A_{260\text{ nm}}$	Absorption bei 260 Nanometern
$A_{280\text{ nm}}$	Absorption bei 280 Nanometern
Abl1	Tyrosinkinase ABL1
AMP	Adenosinmonophosphat
AM	Acetoxymethylester
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
AngII	Angiotensin II
AOTF	Acousto Optic Tunable Filter
AS	Aminosäure
AT1	Angiotensin I-Rezeptor
ATOF	Acousto optical tunable filter
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
BSA	bovines Serumalbumin
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
$\text{Ca}^{2+}/[\text{Ca}^{2+}]$	Calciumion/Calciumionenkonzentration
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CMC	Cardiac Muscle Contraction
CnA	Calcineurin
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CRP	Cystein-reiche LIM-Domänen Proteine
Ct	Cycle threshold

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CTD	Calcium-Transientendauer
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
dKO	Doppelknockout
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“ (= Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	deoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Dur	Duration
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii bzw. et alie (= und andere, je nach Genus)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	„fetal calve serum“ (= fetales Kälberserum)
Fura2	Calcium-Indikator
g	Gramm
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
h	„hour“ (= Stunde)

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

H ₂ O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid (= Salzsäure)
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HK	„housekeeping“ (Gen)
HLM	Herz-Lungen-Maschine
Hsp	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
Ig	Immunglobulin
ILK	Interleukin
ip	Intraperitoneal
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	„knockout“
l	Liter
LB	„lysogeny broth“
m	milli (10 ⁻³)
M	Molarität [mol/l]
mA	Milliampere
min	Minute
MLP	Muskel LIM Protein
MMP	Matrix Metallo Proteasen
mRNA	„messenger“-RNA (= Boten-RNA)

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Mr	„molecular ratio“ (Molekulargewicht)
N	nano (10^{-9})
N-Terminus	Amino-Terminus
Na ⁺	Natrium-Ion
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NGS	Next generation sequencing
NLS	Nukleares Lokalisationssignal
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
OD _{260nm}	Optische Dichte bei 260 nm
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“ (= Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBST	PBS mit 1 % Tween-20
PCR	„polymerase chain reaction“ (= Polymerasekettenreaktion)
PEI	Polyetherimid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative „real-time“ PCR (= quantitative Echtzeit-PCR)
R	„ratio“ (= Verhältnis)
RGS	Regulators of G protein
RNA	„ribonucleic acid“ (= Ribonukleinsäure)
ROX	Rhodamine Red™
rpm	„rotations per minute“ (= Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	„sodium dodecyl sulfate“ (= Natriumdodecylsulfat)

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
sKO	Einzelknockout
StSt	Steady State
TAC	Transverse aortic constriction
tagRFPT	TagRFP S158T, RFP-Derivat (Rot fluoreszierendes Protein)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	„volume/volume“ (= Volumenprozent)
w/v	„weight/volume“ (= Gewichtsprozent)
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil
μ	mikro (10 ⁻⁶)

Abkürzungsverzeichnis der analysierten Gene

<i>ADAMTS1</i>	A Disintegrin-Like And Metalloprotease (Reprolysin Type)
<i>ANGPT14</i>	Angiopoietin-like 4
<i>ANXA2</i>	Annexin A2
<i>ATP1A1</i>	ATPase Na ⁺ /K ⁺ Transporting Subunit Alpha 1
<i>BGN</i>	Biglycan
<i>BMP4</i>	Bone Morphogenetic Protein 4
<i>C1QA</i>	Complement Component 1, Q Subcomponent, A Chain
<i>C1QB</i>	Complement Component 1, Q Subcomponent, B Chain
<i>C1QC</i>	Complement Component 1, Q Subcomponent, C Chain
<i>C1QTNF9</i>	Complement C1q And Tumor Necrosis Factor-Related Protein 9
<i>CFL2</i>	Cofilin 2
<i>CLEC3B</i>	C-Type Lectin Domain Family 3 Member B
<i>CO3A1</i>	Collagen Type III Alpha 1
<i>COL3A1</i>	Collagen Type III Alpha 1 Chain
<i>COL4A1</i>	Collagen Type IV Alpha 1 Chain
<i>COLEC11</i>	Collectin Subfamily Member 11
<i>CRTAP</i>	Cartilage Associated Protein
<i>CSRP3</i>	Cysteine and Glycine Rich Protein 3
<i>CTGF</i>	Connective Tissue Growth Factor
<i>CYR61</i>	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
<i>DCN</i>	Decorin
<i>ECM1</i>	Extracellular Matrix Protein 1
<i>EEF2</i>	Eukaryotic elongation factor 2
<i>EFEMP1</i>	EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1
<i>EMILIN2</i>	Elastin Microfibril Interfacer 2

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>FAM122B</i>	Family With Sequence Similarity 122B
<i>FBLN2</i>	Fibulin 2
<i>FBN1</i>	Fibrillin 1
<i>FGF1</i>	Fibroblast Growth Factor 1
<i>FN1</i>	Fibronectin 1
<i>GATA4</i>	GATA Binding Protein 4
<i>GSTO1</i>	Glutathione S-Transferase Omega 1
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
<i>ITGA6</i>	Integrin Subunit Alpha 6
<i>LAMA2</i>	Laminin Subunit Alpha 2
<i>LAMA5</i>	Laminin Subunit Alpha 5
<i>LTBP4</i>	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 4
<i>LUM</i>	Lumican
<i>MATN2</i>	Matrilin 2
<i>MFAP5</i>	Microfibril Associated Protein 5
<i>MGP</i>	Matrix Gla Protein
<i>MMRN2</i>	Multimerin 2
<i>MRF4</i>	Myogenic Factor
<i>MYBPC3</i>	Myosin Binding Protein C
<i>MYOD</i>	Myogenic Factor 3
<i>N-RAP</i>	Nebulin-Related Anchoring Protein
<i>PICOT</i>	Glutaredoxin-3 oder PKC-interacting cousin of Thioredoxin
<i>PKC</i>	Proteinkinase C
<i>PLN</i>	Phospholamban
<i>PP2A</i>	Protein phosphatase 2
<i>PXDN</i>	Peroxidasin
<i>RPL10A</i>	Ribosomal Protein L10a

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>SCN1B</i>	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 1
<i>SCN5A</i>	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5
<i>SDC2</i>	Syndecan 2
<i>SDC4</i>	Syndecan 4
<i>SERPINE1</i>	Serpin Family E Member 1
<i>SMOC2</i>	SPARC Related Modular Calcium Binding 2
<i>SPARC</i>	Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich
<i>SPARCL1</i>	SPARC Like 1
<i>T-CAP</i>	Telethonin
<i>TGFB1</i>	Transforming Growth Factor Beta 1
<i>TGFB1</i>	Transforming Growth Factor Beta Induced
<i>TIMP</i>	Metallopeptidase Inhibitor 1
<i>TIMP2</i>	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2
<i>TIMP3</i>	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3
<i>TINAGL1</i>	Tubulointerstitial Nephritis Antigen Like 1
<i>TRF</i>	transferrin
<i>VEGFA</i>	Vascular Endothelial Growth Factor A
<i>VTN</i>	Vitronectin
<i>VWA1</i>	Von Willebrand Factor A Domain Containing 1
<i>VWF</i>	Von Willebrand Factor

III. Zusammenfassung / Summary

III.1. Zusammenfassung

Unter Kardiomyopathien werden sämtliche Erkrankungen des Herzens, der Blutgefäße und des Blutkreislaufsystems zusammengefasst, wobei zwischen angeborenen und erworbenen unterschieden wird. Die hypertrophe (HCM) und die dilatative Kardiomyopathie (DCM) zählen zu den verbreitetsten Herzerkrankungen und gehen mit einer mechanischen bzw. elektrischen, kardialen Dysfunktion einher. In bis zu 50 % der Fälle wird dabei eine familiäre Häufung beobachtet. Die Identifikation und Charakterisierung damit assoziierter Gene und molekularer Signalwege sind Grundlage für die Entwicklung spezifischer Therapiekonzepte. Es wird angenommen, dass G-Protein-gekoppelte Signalwege an der Entstehung und Manifestierung pathologischer Erscheinungsbilder des Herzens beteiligt sind. Im Mausmodell konnten Untersuchungen von Herzen bzw. Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) mit $G_{\alpha q}$ bzw. $G_{\alpha 11}$ knockout *in vivo* sowie *in vitro* (z.B. über Echokardiographie, Histologie, Fluorometrie oder Elektrophysiologie) eine Reihe neuer Erkenntnisse erzielen, welche den Ausgangspunkt für eine Transkriptomanalyse isolierter Kardiomyozyten mittels "deep sequencing" bildeten. Hierbei wurde das Expressionsmuster zwischen Wildtyp (WT) und dKO verglichen, um Gene zu identifizieren welche mit der kardialen Insuffizienz in Zusammenhang mit $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ assoziiert sind. Aus insgesamt 25000 identifizierten Genen konnten 3100 mit verändertem Expressionsniveau identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Gene, besonders im Hinblick auf relevante, kardiale Signalwege klassifiziert, mittels quantitativer Realtime PCR (qPCR) verifiziert und genauer analysiert werden. Insbesondere der CMC („cardiac muscle contraction“) Signalweg zeigte hierbei deutliche Unterschiede, insbesondere in der Expression des *CSRP3*-Gens, welches für das „muscle LIM protein“ (MLP) kodiert und auf welches in dieser Arbeit ein besonderer Fokus gelegt wurde, da es ein potentielles Schlüsselgen im Kontext der molekularen Mechanismen bei der Entstehung von Kardiomyopathien darstellen könnte. MLP gehört zu den Cysteinreichen LIM-Domänen Proteine (CRPs) und wird im Herzen sowie in der quergestreiften Skelettmuskulatur exprimiert, wo es u.a. an der sogenannten Z-Scheibe des Sarkomers lokalisiert ist. Diese spielt eine besondere Rolle im Herzmuskel, da Dysfunktionen damit assoziierter Proteine u.a. zu Störungen der kardialen Mechano-sensation und Signaltransduktion, der mechanischen Kraftweiterleitung sowie der mitochondrialen Energiegewinnung führen. In den vergangenen Jahren konnten auch eine Reihe von Mutationen von MLP als Ursache für Kardiomyopathien identifiziert werden.

Analysen eines MLP-KO Mausmodells zeigen beim homozygotem KO, dass etwa 70 % der Tiere im Alter von fünf bis zehn Tagen diastolische Dysfunktionen aufweisen und dass diese durchschnittlich 24 h später sterben (früher Phänotyp). Die überlebenden Mäuse entwickeln zwei bis vier Wochen nach ihrer Geburt eine dilatative Kardiomyopathie mit Hypertrophie und Herzinsuffizienz (adulte Phänotyp). Vergleicht man das Herzgewebe dieser Tiere mit WT-Herzen, ist dieses im MLP-KO insgesamt weicher und zeigt eine stark verminderte Muskelspannung. Die Glanzstreifen und Z-Scheiben erscheinen desorganisiert und verbreitert. Ähnliche Strukturveränderung findet man auch bei humaner Herzinsuffizienz. Neueste Erkenntnisse im Menschen zeigen, dass Veränderungen der MLP-Expression zur Entstehung von chronischen Herz-erkrankungen beitragen. Interessanterweise wurden sowohl bei Patienten mit DCM als auch HCM MLP-Mutationen gefunden, wobei diese vermutlich über Defekte in der kardialen Mechanosensation mit diesem Krankheitsbild assoziiert sind. Durch ein Screening von humanen DCM-, ICM-, HCM- Herzohr-Proben auf mRNA-Ebene konnten in dieser Arbeit neue Splice-Varianten des *CSRP3*-Gens gefunden werden. Diese resultieren in trunkierten Protein-Sequenzen, denen LIM-Domänen (Interaktion) fehlen. Des Weiteren ist die NLS (Nukleäres Lokalisationssignal) betroffen, was potentiell einen Transport in den Zellkern reduziert. Zudem korreliert die Menge an *CSRP3* mRNA mit dem Alter bzw. dem Grad der Erkrankung von Patienten und kann binnen sehr kurzer Zeiträume an die Umgebungsbedingungen adaptieren. Mittels adenoviraler Konstrukte wurden C-terminal mit tagRFPT fusionierte MLP-Isoformen (MLP-Volllänge und ohne Exon 3) in Kardiomyozyten eingeschleust, um deren Lokalisation sowie Einfluss auf die Zellphysiologie in adulten Ratten-Kardiomyozyten sowie humanen iPS-Zellen (zu Kardiomyozyten differenziert) zu untersuchen. Bereits die Überexpression von MLP resultiert in einer relativen Reduktion des Proteins am Sarkomer, während es weiterhin stabil an der Zellperipherie lokalisiert ist. Die Variante ohne Exon 3, und damit ohne LIM-Domäne 2, zeigt eine starke Misslokalisierung sowie eine Desorganisation des Sarkomers. Beide MLP-Varianten scheinen hingegen einen vergleichbaren Einfluss auf die Calcium-Homöostase zu haben, welcher sich in einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration, einem erhöhten Transienten und einem verminderten "Post-Rest"-Verhalten niederschlägt. Zusammengefasst hat sowohl die Menge als auch die Art der Isoform (Splice-Form) von MLP einen großen Einfluss auf kardiale, hypertrophe Signalwege, was die postulierte Schlüsselrolle dieses Proteins für die kardiale Physiologie und Pathophysiologie unterstreicht.

III.2. Summary

Cardiomyopathies comprise all diseases of the heart, blood vessels and blood circulatory system. They can be differentiated between congenital and acquired heart diseases. Hypertrophic (HCM) and dilatative cardiomyopathies (DCM) are among the most common hereditary diseases associated with mechanical and/or electrical cardiac dysfunction. Up to 50 % of the incidents show a familial background. The elucidation of responsible genes and molecular signalling pathways can help driving the development of specific therapeutic concepts. It is assumed that the G protein-coupled signalling pathways are involved in the development and manifestation of pathological responses in the heart, such as cardiomyopathies. Investigations of $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha 11}$ knock out mice or isolated cardiac muscle cells by using *in vivo* and *in vitro* methods (i.e. echocardiography, histology, fluorometry and electrophysiology) led to new, unexpected results. Based on this outcome, the expression patterns of wildtype (WT) and double knockout (dKO) cardiomyocytes were compared by transcriptome analysis of isolated cardiac myocytes, employing so-called "deep sequencing" in order to understand the genetic basis of the identified phenotypes. Among 25000 genes 3100 genes with significant differences in the expression levels between WT and dKO were identified, whereas genes of relevant cardiac signalling pathways should be verified and further investigated by using quantitative real-time PCR (qPCR). The analysis of the CMC (cardiac muscle contraction) signalling pathway revealed marked differences in the expression of the *CSRP3* gene coding for the muscle LIM protein (MLP), to which a special focus was drawn in context of this work. MLP belongs to the family of cysteine-rich LIM domain proteins (CRPs) and is expressed exclusively in the heart as well as in striated skeletal muscle cells, where it is located at the so-called Z-disc, which seems to play an important role, because dysfunction of this structure leads to defects, for example in cardiac mechanosensitivity and signal transduction, mechanical force transmission and mitochondrial energy production. A number of mutations of MLP have been identified as a cause of cardiomyopathies recently. Analysis of an established MLP-KO mouse model provides possible insights in MLP-associated mechanisms that can lead to cardiomyopathies. In homozygous MLP-KO mice, approximately 70 % of the animals aged five to ten days show signs of fatigue and die an average 24 hours later (early phenotype). The remaining MLP-KO mice develop a DCM with hypertrophy and cardiac insufficiency (adult phenotype) two to four weeks after birth. Comparing the heart tissue of such mutants with the wild type, it is softer in the MLP-KO and shows a strongly reduced muscle tension. In the MLP-KO mouse, the intercalated disc and Z-discs appear disorganized and are arranged wider. Similar structural changes are also found in human heart failure.

In humans, recent findings show that changes in MLP expression are involved in the development of chronic heart disease. Interestingly, MLP mutations have been found in both DCM and HCM patients and are likely to lead to defects in cardiac mechanosensitivity in these diseases. A screening of human DCM, HCM and control samples at the mRNA level revealed new splice variants resulting in a truncated amino acid sequence, which is missing LIM domains, leading to an impaired interaction capability, and the NLS (nuclear localization signal), which potentially impairs transport into the cell nucleus. In addition, the amount of *CSRP3* mRNA correlates with the age or degree of disease of patients and can adapt to the environmental conditions within a very short period of time. Using adenoviral constructs, MLP isoforms (MLP full-length and without exon 3) tagged with tagRFPT were introduced into cardiomyocytes in order to investigate their localization and influence on cell physiology in adult rat cardiomyocytes and human IPS cells (differentiated to cardiomyocytes). Already the overexpression of MLP has an influence on the localization of MLP at the sarcomere while it is still stably located at the cell periphery. The variant without exon 3, and thus without LIM domain 2, shows a strong mislocalization and a disorganization of the sarcomere. However, both MLP variants seem to have a comparable influence on calcium homeostasis, resulting in an increased intracellular calcium level, increased transients and reduced post-rest behaviour. In summary, both the amount and the degree of splicing of MLP have a major impact on cardiac, hypertrophic signalling pathways, underscoring the postulated key role of this protein in cardiac physiology and pathophysiology.

IV. Einleitung

Zu den meistverbreiteten Herzerkrankungen zählen die Kardiomyopathien, die mit einer mechanischen oder elektrischen kardialen Dysfunktion einhergehen. Hierbei werden verschiedene Formen unterschieden, die hypertrophe (HCM), die dilatative (DCM) und die ischämische (ICM) Kardiomyopathie. Zudem wird in 50 % der Fälle eine Häufung dieser Erkrankungen innerhalb von Familien beobachtet. In den letzten Jahren konnten einige ursächliche Mutationen für diese Krankheiten identifiziert werden. Hauptsächlich handelt es sich um Mutationen in Proteinen des Sarkomers, aber auch in Zellmembranproteinen, Proteinen des Zytoskeletts und des Nukleus. Eine wichtige Komponente des Sarkomers, die Z-Scheibe, spielt dabei offensichtlich eine entscheidende Rolle da diese bei Fehlfunktion zu Defekten in beispielsweise der kardialen Mechanosensation, der Signaltransduktion, der mechanischen Kraftweiterleitung sowie der mitochondrialen Energiegewinnung führt (Frey & Olson 2003; Reuter 2004; Knöll et al. 2003; Riecker 2013; Maron & Lever 2009).

IV.1. Kardiomyopathie

Die Kardiomyopathie ist definiert als eine Erkrankung, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergeht (Richardson et al. 1996). Diese ist oft durch eine pathologische Vergrößerung oder Verdickung des Herzmuskels charakterisiert, welche durch eine Zunahme der Kardiomyozytengröße und Veränderungen andere Herzmuskelkomponenten, wie z.B. der extrazellulären Matrix, bedingt wird (siehe Abb.1). Die Kardiomyopathie wird typischerweise durch eine Reihe von Erkrankungen stimuliert, darunter zählen langjährige Hypertonie, Myokardinfarkt oder Ischämie mit koronarer Herzkrankheit, Klappeninsuffizienz und Stenose, durch Infektionen verursachte Myokarditis, sowie vererbte Kardiomyopathien. Letztere umfassen hypertrophe, dilatierte, arrhythmogene, rechtsventrikuläre, restriktive und nicht klassifizierte Kardiomyopathien. Die Entdeckung zahlreicher krankheitsassoziierter Gene hat gezeigt, dass diese Kardiomyopathien eine wesentliche genetische Ätiologie aufweisen. Die frühzeitige Erkennung von Kardiomyopathien, durch molekulargenetische Diagnosen, kann schwerere Komplikationen wie Herzinsuffizienz und Arrhythmie bei Patienten verhindern (Anon 2014; Heineke & Molkentin 2006). Eine Reihe dieser Herzerkrankungen, welche sich als Folge von Mutationen entwickeln, beeinflussen zudem nachweislich das Splice-Verhalten herzspezifischer Gene (Lara-Pezzi et al. 2013).

Das alternative Splicing ist der Hauptmechanismus, der die Proteindiversität antreibt und die Expression verschiedener Proteine aus ein und dem selben Gen ermöglicht. Neuste Erkenntnisse zeigen, dass die Identifizierung eines Proteins, das in einem pathologischen Zustand differentiell exprimiert wird, nicht ausreichend ist, sondern dass es wichtig ist auch die Isoform/en eines solchen Proteins zu identifizieren. Denn durch den Prozess des alternativen Splittings kann die Proteinstruktur, -lokalisierung, -regulation und -funktion verändert werden, was zu Kardiomyopathien, Arrhythmien und anderen Pathologien führt (Matkovich 2016; Lara-Pezzi et al. 2013).

Das Titin-Gen im Menschen besteht beispielsweise aus 363 Exons, welche alternativ gespliced werden und so die Elastizität des resultierenden Proteins und folglich des Sarkomers beeinflussen (Bang et al. 2001a; Bang et al. 2001b). Etwa ein Drittel der Titin-Mutationen, die bei Patienten mit DCM gefunden wurden, verändern das Splice-Verhalten. Es kommt zu einer Verschiebung des Leserahmens, so dass ein verkürztes Titin entsteht. Die Abnahme dieser federartigen Elemente führt zu einer erhöhten passiven Steifigkeit des Herzens, was letztlich in einer DCM endet (Makarenko et al. 2004).

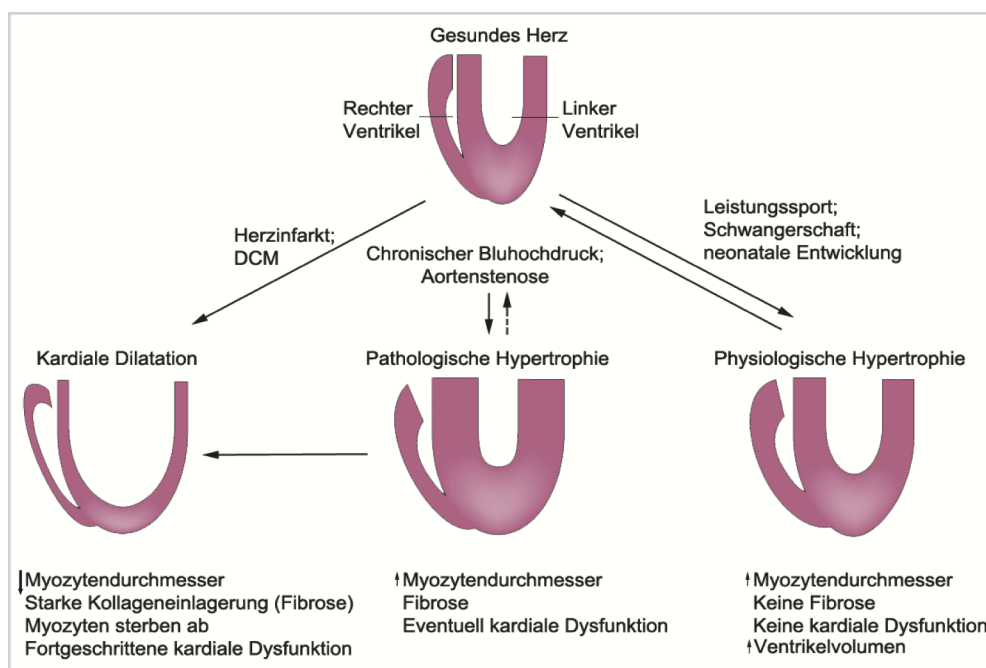


Abb. 1: Schematische Darstellung der Entstehung physiologischer und pathologischer Hypertrophie.
Abbildung modifiziert nach Heineke & Molkentin 2006.

IV.1.1. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) bezeichnet eine Erkrankung des Herzmuskels bei der es sich um eine Erweiterung (Dilatation) des linken Ventrikels oder beider Ventrikel handelt (siehe Abb. 2). Dies resultiert aus der fortschreitenden Verminderung der Leistungsfähigkeit und letztlich des Abbaus der Herzmuskelzellen (J. G. Seidman & C. Seidman 2001). In den Vereinigten Staaten tritt DCM etwa bei 1:2500 Menschen auf und ist eine der meisten Ursache für Herzinsuffizienz und Arrhythmie. Erhebliche Morbidität und vorzeitige Mortalität sind mit dieser Krankheit assoziiert (Mestroni et al. 1999; Carrier et al. 1993). Das Herz schafft es hierbei nicht mehr wegen seiner eingeschränkten Leistung den Körper ausreichend mit Blut und damit mit Sauerstoff zu versorgen. Als Folge hiervon staut sich das Blut in den Blutgefäßen die zum Herzen führen und es versorgen.

Bis zu 48 % aller Fälle von dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sind durch genetische Einflüsse verursacht. In solchen Fällen werden insbesondere autosomal-dominante, gelegentlich aber auch X-chromosomale bzw. mitochondriale Vererbungsmuster beobachtet (J. G. Seidman & C. Seidman 2001; Burkett & Hershberger 2005). Aufgrund der genetischen Heterogenität und Vielfalt der zellulären Prozesse, die bei DCM-Patienten betroffen sind, ist die Pathophysiologie komplex und teilweise noch unklar (Watkins et al. 2011). DCM wird überwiegend durch Mutationen in Genen verursacht, die für Proteine des Zytoskeletts und des Sarkomers kodieren (Tabelle 1). Diese Mutationen führen offenbar zu Defekten verschiedener Prozesse, wie beispielsweise fehlerhafte Übertragung von kontraktile Kraft auf die extrazelluläre Matrix, beeinträchtigte Aktivierung der normalen Transkriptionsreaktion auf mechanische Belastung oder verminderte Viabilität der Zellen während der mechanischen Belastung (Ahmad et al. 2005). Mutationen in Genen, die für Zytoskelettproteine kodieren, beeinflussen auch Prozesse, die nicht mit Muskelaktivität assoziiert sind und führen z.B. zur Akkumulation von Amyloid und schließlich zur Zytotoxizität (Sanbe et al. 2004). Im Gegensatz zu HCM-assoziierten Mutationen scheint die Pathogenese von sarkomeren Mutationen in DCM eine verminderte motorische Funktion sowie eine Störung der Reaktion des Sarkomers auf die Calcium-Signalgebung zu bewirken (Debold et al. 2007; Schmitt et al. 2006).

IV.1.2. Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die am häufigsten vorkommende Erbkrankheit des Herzens, mit einer geschätzten Prävalenz von 1:500 (Maron & Lever 2009). Diese Art der Kardiomyopathie ist die häufigste Ursache für einen plötzlichen Herztod bei jungen Athleten und ist charakterisiert durch eine links oder weniger häufig auch rechts ventrikuläre Hypertrophie, d.h. eine übermäßige Verdickung des Myokards (siehe Abb. 2) (Teare 1958). Das Ausmaß und der betroffene Bereich der Wandverdickung sind sehr variabel und meist asymmetrisch. Eine solche Größenzunahme der Herzwand führt dazu, dass diese steifer wird und dadurch die Blutversorgung der Muskelzellen deutlich verschlechtert wird. Besonders wenn das Herz schneller schlägt, gelangt nicht genügend Blut über die Herzkranzgefäße zu den einzelnen Zellen. Zudem kommt es bei einer HCM zu Fibrosen, d.h. neben der Vergrößerung der Muskelzellen wird auch vermehrt Bindegewebe in den Herzmuskel eingebaut. Dies hat zur Folge, dass die linke Herzkammer unelastischer wird, mit Konsequenzen für die Diastole und Systole.

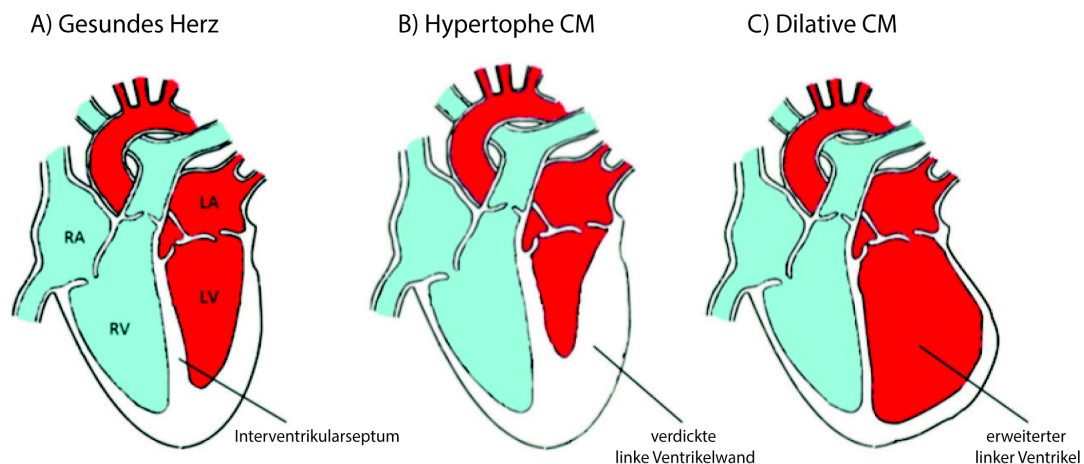


Abb. 2: Remodellierung des Herzens in HCM und DCM. A) Die Anatomie eines gesunden menschlichen Herzens besteht aus dem rechten Atrium (RA) und dem rechten Ventrikel (RV), die vom linken Atrium (LA) und dem linken Ventrikel (LV) durch das interventrikuläre Septum getrennt werden. Die in der asymmetrischen HCM (B) auftretende kardiale Remodellierung ist durch Hypertrophie (Verdickung) der LV-Wand charakterisiert und schließt das interventrikuläre Septum ein. Eine biventrikuläre Hypertrophie kann ebenfalls auftreten, ist jedoch selten und daher nicht dargestellt. Im Gegensatz dazu ist die DCM (C) durch eine linksventrikuläre Vergrößerung gekennzeichnet, die mit einer Ausdünnung der linken Ventrikelwand einhergeht. Die atriale Vergrößerung in DCM wird gelegentlich als sekundäre Folge des expandierten Ventrikels beobachtet (aus Anon 2014 modifiziert).

IV. EINLEITUNG

Neue Studien lassen vermuten, dass es bei dieser Art der Kardiomyopathie zuerst zur Entstehung von Fibrosen kommt und die Muskelverdickung eine Art Reparaturmechanismus darstellt, um die Pumpleistung des Herzens aufrechtzuerhalten.

Dieser Hypertrophieprozess wird vermutlich durch Mutationen sarkomerer Proteine bzw. deren kodierender Gene ausgelöst. HCM wird in der Regel autosomal-dominant vererbt, wobei Hunderte von Mutationen von mehr als 20 Genen bekannt sind (siehe Tabelle 1) (Prinz et al. 2011).

Zudem können beispielsweise Störungen der kontraktilen Einheit, Veränderungen der Energie-Homöostase wie auch von Calcium-Zyklen die Eigenschaften einzelner sarkomerer Proteine verändern und zu einer hypertrophen Remodellierung führen (Frey et al. 2011; Ahmad et al. 2005; Watkins et al. 2011; Anon 2014).

Tabelle 1: Krankheitsgene, die im Kontext von HCM und DCM gefunden wurden (Auswahl: J. G. Seidman & C. Seidman 2001; Elliott & McKenna 2009; Anon 2014; Kimura 2016)

	Gen	Protein	Proteinlokalisierung
DCM	<i>ABCC9</i>	ATP-binding cassette	Sarkolemma
	<i>ACTG1</i>	Actin, gamma 1	Zytoskelett
	<i>ACTN2</i>	Actinin, alpha2	Z-Scheibe
	<i>ANKRD1</i>	Ankyrin repeat domain1	Z-Scheibe
	<i>CAV3</i>	Caveolin 3	Sarkolemma
	<i>CRYAB</i>	Crystallin, alpha B	Zytoskelett
	<i>CSRP3</i>	Cysteine and glycine-rich protein 3	Z-Scheibe
	<i>CTF1</i>	Cardiotrophin 1	Intra/extratelluar-Zytokine
	<i>DAG1</i>	Dystroglycan 1	Dystrophin-assoziiertes Proteinkomplex
	<i>DMD</i>	Dystrophin	Zytoskelett
	<i>EMD</i>	Emerin	Kernmembran
	<i>FHL2</i>	Four and a half LIM domains 2	Z-Scheibe
	<i>FKTN</i>	Fukutin	Dystrophin-assoziiertes Proteinkomplex
	<i>FKRP</i>	Fukutin-related protein	Dystrophin-assoziiertes Proteinkomplex
	<i>GATAD1</i>	GATA zinc finger domain containing 1	Nukleus
	<i>ILK</i>	Integrin-linked kinase	Sarkolemma
	<i>LAMA4</i>	Laminin alpha 4	Membran
	<i>LAMP2</i>	Lysosomal-associated membrane protein 2	Zytoplasma
	<i>LDB3</i>	LIM-domain binding 3	Z-Scheibe
	<i>LMNA</i>	Lamin A/C	Nukleus
	<i>MYBPC3</i>	Myosin-binding protein C, cardiac	Sarkomer
	<i>MYH6</i>	Myosin, heavy polypeptide 6	Sarkomer
	<i>MYH7</i>	Myosin, heavy chain 7	Sarkomer
	<i>MYPN</i>	Myopalladin	Z-Scheibe
	<i>NEBL</i>	Nebulette	Z-Scheibe
	<i>NEXN</i>	Nexilin	Z-Scheibe
	<i>PDLIM3</i>	PDZ and LIM domain 3	Zytoskelett

IV. EINLEITUNG

	Gen	Protein	Proteinlokalisation
DCM			
	<i>PKP2</i>	Plakophilin 2	Desmosom
	<i>PLN</i>	Phospholamban	Sarkoplastisches Retikulum
	<i>PSEN1</i>	Presenilin 1	Transmembran
	<i>RBM20</i>	RNA-binding motif protein 20	Nukleus
	<i>SCN5A</i>	Sodium channel, voltage-gated, type V	Sarkolemma
	<i>SGCG</i>	Sarcoglycan	Dystrophin-assoziiertes Proteinkomplex
	<i>TAZ</i>	Tafazzin	Mitochondrien
	<i>TCAP</i>	Titin cap	Z-Scheibe
	<i>TMPO</i>	Thymopoietin	Nukleus
	<i>TNNC1</i>	Troponin C type 1	Sarkomer
	<i>TPM1</i>	Tropomyosin	Sarkomer
	<i>TTN</i>	Titin	Sarkomer
	<i>VCL</i>	Vinculin	Z-Scheibe
HCM			
	<i>GLA</i>	Galactosidase	Zytoplasma
	<i>JPH2</i>	Junctophilin 2	Sarkoplastisches Retikulum
	<i>ACTN2</i>	Actinin, alpha2	Z-Scheibe
	<i>ANKRD1</i>	Ankyrin repeat domain1	Z-Scheibe
	<i>CAV3</i>	Caveolin 3	Sarkolemma
	<i>PRKAG2</i>	Protein Kinase	Intrazelluläre Kinase
	<i>CSRP3</i>	Cysteine and glycine-rich protein 3	Z-Scheibe
	<i>RYR2</i>	Ryanodine receptor 2	Sarkoplastisches Retikulum
	<i>LAMP2</i>	Lysosomal-associated membrane protein 2	Zytoplasma
	<i>LDB3</i>	LIM domain binding 3	Z-Scheibe
	<i>MYBPC3</i>	Myosin-binding protein C, cardiac	Sarkomer
	<i>MYH6</i>	Myosin, heavy polypeptide 6	Sarkomer
	<i>MYH7</i>	Myosin, heavy chain 7	Sarkomer
	<i>MYPN</i>	Myopalladin	Z-Scheibe
	<i>NEXN</i>	Nexilin	Z-Scheibe
	<i>PLN</i>	Phospholamban	Sarkoplastisches Retikulum
	<i>TCAP</i>	Titin cap	Z-Scheibe
	<i>TNNC1</i>	Troponin C type 1	Sarkomer
	<i>TPM1</i>	Tropomyosin	Sarkomer
	<i>TTN</i>	Titin	Sarkomer
	<i>VCL</i>	Vinculin	Z-Scheibe

IV.1.3. Ischämische Kardiomyopathie (ICM)

Neben DCM und HCM ist die ischämische Kardiomyopathie (ICM) die am häufigsten in Deutschland vorkommende koronare Herzerkrankung. Die ICM wird durch eine ischämische Schädigung, beispielsweise infolge einer koronaren Herzkrankheit ausgelöst (Katz 2010). Diese Art der Herzmuskelschwäche ist die Folge langer Minderdurchblutung des Herzmuskelgewebes mit einhergehendem Gewebsuntergang. Dabei wird funktionelles Herzmuskelgewebe durch Bindegewebe ersetzt (Ersatzfibrose). Folgen sind Herzleistungsschwächen und eine Ausweitung der betroffenen Herzkammern (Dilatation) (Richardson et al. 1996).

IV.2. Das Sarkomer

Wenn das Herz als effiziente Blutpumpe fungieren soll, muss die Erzeugung von Aktionspotentialen und die anschließende myokardiale Kontraktion in einen regelmäßigen, sich wiederholenden und organisierten Prozess koordiniert werden. Das Sarkomer ist sozusagen der Motor des Herzens und stellt die kleinste kontraktile Einheit der Kardiomyozyten dar, die diesen Prozess aufrechterhält.

Das Sarkomer setzt sich hauptsächlich aus drei Myofilamenttypen zusammen, Aktin, Myosin und Titin. Dabei spricht man stark vereinfacht von den dünnen Filamenten (Aktin) und den dicken Filamenten (Myosin). Durch die exakte Anordnung dieser Filamente erscheint das Sarkomer unter dem Mikroskop als typisches Muster aus hellen (I-Bande) und dunklen Banden (A-Bande) (siehe Abb. 3), welche das Schlüsselement des Gleitfilamentmodelles bildet (Fahlke et al., 2008, Fürst et al., 1988).

In der erschlafften Muskulatur sind I- und A-Banden etwa gleich breit, in der kontrahierten Muskelfaser werden die I-Banden je nach Kontraktionsgrad immer schmaler. Damit verkürzen sich folglich die Fibrillen bzw. die komplette Muskelfaser (Koecke et. al., 2000).

Ein weiteres Strukturelement, die Z-Scheibe, stellt die Abgrenzung zwischen zwei Sarkomeren dar und ist zu beiden Seiten mit den relativ dünnen und daher hellen Aktinfilamenten verankert, zwischen deren Enden wiederum die dicken Myosinfilamente liegen. Somit ragt ein Aktinfilament in zwei benachbarte Sarkomere. Das große Protein, Titin (codiert durch das *TTN*-Gen), verbindet die Z-Scheibe mit der M-Linie (M-Streifen), so dass ein einzelnes Titin-Protein die Hälfte der Länge eines Sarkoms überspannt.

IV. EINLEITUNG

Titin ist das größte menschliche Protein und verbindet die Myosinfilamente von zwei benachbarten Z-Scheiben. Dadurch treffen sich die zwei Titin-Moleküle an der M-Linie im Zentrum des Sarkomers.

Es wird angenommen, dass M-Linie und Z-Scheiben der mechanischen Querstabilisierung der Aktin- und Myosinfilamente dienen. Der Bereich um die M-Linie wird als H-Zone bezeichnet, und enthält nur Myosinfilamente. Zusammenfassend sieht die Sequenz aus Zonen, Scheiben und Linien der Sarkomerabschnitte wie folgt aus:

Z – I – A – H – M – H – A – I – Z (siehe Abb. 3).

Neben der Interaktion mit Proteinen der Z-Scheibe und der M-Linie wechselwirkt Titin auch mit einigen anderen Proteinen, welche im Wesentlichen als Adhäsionsplattform für die Assemblierung eines funktionellen, kontraktile Komplexes in der Muskelzelle dienen.

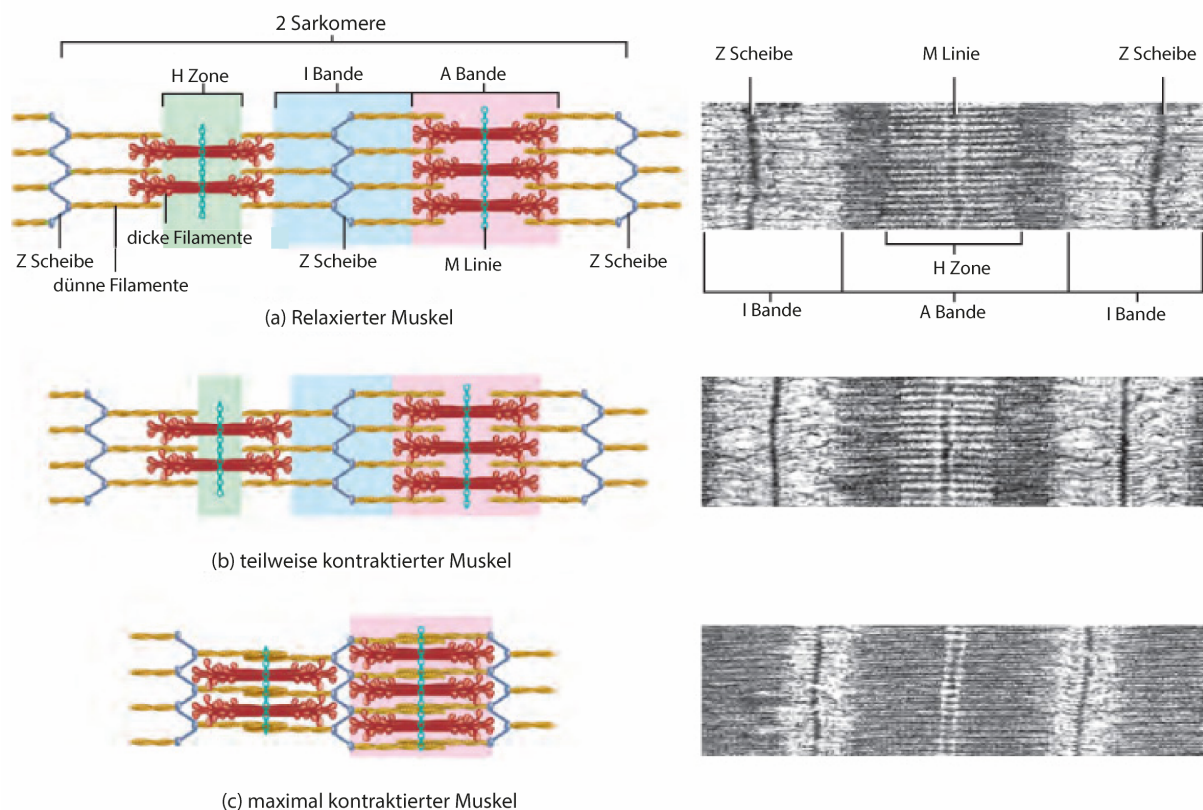


Abb. 3: Aufbau des Sarkomers im quergestreiften Muskel. (A) Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahme des relaxierten Sarkomers. **(B)** Analoge Darstellungen eines teilweise kontrahierten sowie **(C)** eines maximal kontrahierten Sarkomers. (Abbildung nach Mescher 2009).

Bei einer Muskelkontraktion bewegen sich die Aktinfilamente zusammen mit der Z-Scheibe in Richtung der M-Linie und schieben sich zwischen die Myosinfilamente. Damit es zu diesem Vorgang kommt werden bei der Erregung von Muskelfasern zunächst kurzzeitig Calcium-Ionen (Ca^{2+}) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) der Muskelzellen (sarkoplasmatisches Retikulum) freigesetzt. Die freien Ca^{2+} gelangen durch Diffusion an die Troponin-Moleküle, welche sich zwischen Aktin- und Myosinfilamenten befinden, und gebunden werden.

Infolgedessen verändert Troponin allosterisch seine Struktur, was eine Freilegung der Myosin-Bindestellen an Aktin unter einem zweiten Protein, dem Tropomyosin, bewirkt, welches im Komplex mit Troponin vorliegt.

Myosin, welches im ATP-gebundenen Zustand vorliegt, kann nun mit Aktin interagieren und sogenannte Querbrücken bilden, was indirekt zur Aktivierung der Myosin-ATPase führt. Durch die ATP-Hydrolyse verändern die beweglichen Einheiten der Myosinfilamente, die Myosinköpfchen, ihre Konformation und es kommt zur Krafterzeugung (elektromechanische Kopplung). Hierbei winkeln sich die Myosinköpfchen ab, wodurch sie die gebundenen Aktin-Filamente um etwa 10 nm in Richtung der M-Linie ziehen. Somit gleiten die Filamente, gemäß der Gleitfilamenttheorie, aneinander vorbei. Dadurch verkürzen sich die Filamente der Sarkomere, wodurch sich in der Summe, durch koordiniertes, synchrones Zusammenziehen aller Kardiomyozyten, der Herzmuskel kontrahiert (Systole). Eine erneute Bindung von ATP an das Myosinköpfchen überführt dieses wieder in den weniger abgewinkelten Zustand und bereitet damit den nächsten Zyklus vor. Hierbei sind somit die Aktin- und Myosinfilamente für die Entstehung der aktiven Kontraktionskraft im Sarkomer von Herzmuskelzellen verantwortlich (Linke 2007).

Titin sowie Kollagenfasern sind bekannt für ihre mechanischen Funktionen und spielen bei der passiven Federkraft, Steifigkeit und Viskoelastizität des Herzens eine entscheidende Rolle (Linke 2007; Bang et al. 2001b; Voelkel & Linke 2011). Titin besitzt eine Vielzahl von direkten und indirekten Verknüpfungen zu Signalmolekülen und ist zudem mit einer Reihe von Phosphorylierungsstellen im Bereich der Z-Scheiben-, I-Band- und M-Band-Segmente maßgeblich in die myokardiale Signalgebung eingebunden. Es wird angenommen, dass dieser Komplex bei der konformationsregulierten Mechanosensorik am Umwandlungsprozess von mechanischen Reizen in biochemische Signale beteiligt ist (Knöll, Hoshijima & Chien 2002; Frank et al. 2006; Linke 2007; Voelkel & Linke 2011).

IV.3. Die Z-Scheibe

IV.3.1. Aufbau der Z-Scheibe

Die Z-Scheibe stellt eine komplexe subzelluläre Struktur dar, die von großer Bedeutung für die Funktion des Herzens ist (Frank et al. 2006). Sie besteht aus Hunderten verschiedener Proteine und ist damit eine der komplexesten makromolekularen Strukturen in der Biologie (Zou et al. 2006). Sie ist an den Seitengrenzen von Sarkomeren lokalisiert, wobei das Zentrum einer Z-Scheibe aus Aktinfilamenten besteht, die von den benachbarten Sarkomeren ausgehen und mit α -Aktinin-Molekülen quervernetzt sind (Luther 1991). Die Z-Scheiben sind mit konventioneller Lichtmikroskopie schwer zu erkennen. Mittels Elektronenmikroskopie erscheint die Z-Scheibe im Längsschnitt als dichtes Zackenbandmuster, da die benachbarten Sarkomere, wie oben beschrieben, versetzt zueinander angeordnet sind (siehe Abb.3 und Abb. 4).

In der Queransicht erscheinen sie als kleine quadratische Gitter (Luther et al. 2002). F-Aktinfilamente, welche durch das „Capping“-Protein CapZ abgeschlossen werden, sowie Titin und das Strukturprotein Nebulin sind direkt mit der Z-Scheibe verbunden und dienen ihrer Stabilität. Wichtig in der Sarkomermechanik sind die α -Aktinin-Brückenbindungen. Die daran beteiligten Aktinmoleküle und α -Aktinin-Homodimere sind in exakten Winkeln zueinander ausgerichtet. Diese Ausrichtung der Brückenbindungen ändert sich bei Kontraktion des Sarkomers (Golenhofen et al. 2002; Voelkel & Linke 2011). Im Querschnitt kann die Z-Scheibe ihre Struktur ändern und zwei Konformationen annehmen, die man als "Korbwiege" oder "kleines quadratisches Gitter" bezeichnet.

Das "kleine quadratische Gitter" findet man in einem ruhenden Muskel, wohingegen im aktiven Muskel die engmaschige Korbgeflechtstruktur zu sehen ist (Luther et al. 2002; Goldstein et al. 1987; Goldstein et al. 1990). Eine Studie von α -Aktinin-Brückenbindungen an Aktin innerhalb der Z-Scheibe ergab, dass die Winkel zwischen beiden Proteinen vorzugsweise zwischen 60 und 120 Grad variierten (Knöll et al. 2011). Sowohl die Konformationsänderung der Z-Scheibe während der Kontraktion als auch die Veränderungen der Winkel zwischen α -Aktinin und Aktin könnten Teil eines Stress-Sensor-Mechanismus sein (Knöll et al. 2011). Ferner wird vermutet, dass verschiedene Titinisoformen Einfluss auf die Konformation der Z-Scheibe haben (Voelkel & Linke 2011).

An der Z-Scheibe sind je zwei Titinmoleküle eines Halbsarkomers parallel angeordnet und werden über Telethonin/T-Cap miteinander verbunden, welches indirekte Wechselwirkungen zwischen dem N-Terminus von Titin und verschiedenen Z-Scheiben-assoziierten Signalproteinen steuert (Zou et al. 2006; Krüger & Linke 2009; Gregorio et al. 1998).

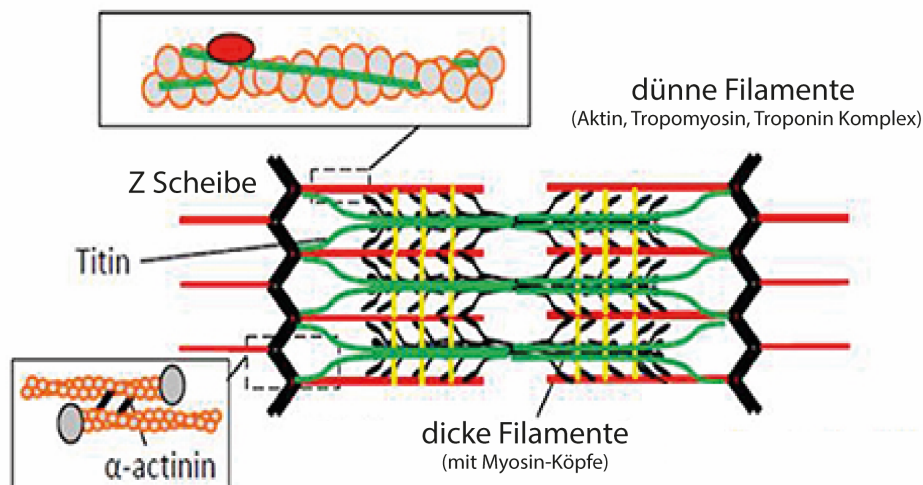


Abb. 4: Das Sarkomer, eine hochgeordnete, funktionelle Einheit der gestreiften Muskulatur mit den wichtigsten Proteinkomponenten (Månsson 2014).

IV.3.2. Die Z-Scheibe und ihre Bedeutung für verschiedene Signalkaskaden

In den letzten Jahren stieg das Wissen in Bezug auf die Struktur und Funktion der Z-Scheibe. Mittlerweile ist klar, dass die Z-Scheibe des Sarkomers Knotenpunkt verschiedener biochemischer Signalkaskaden ist. Sie ist verbunden mit dem T-tubulären System, dem sarkoplastischen Retikulum und mehreren E3-Ubiquitin-Ligasen, welche auf der Z-Scheibe lokalisiert sind (Knöll et al. 2011; Hoshijima et al. 2006; Hoffmann et al. 2014). Neuartige Strategien zum Screening von Protein-Protein-Wechselwirkungen, verbesserte Imaging-Technologien und vielseitige transgene Mausmethoden zeigen, dass die Z-Scheibe und die Titinfilamente in komplizierte sensorische und modulatorische Mechanismen involviert sind (Hoshijima et al. 2006).

Es wird vermutet, dass sie als Sensoren fungieren, welche mitunter die Transformation von mechanischen Reizen in biochemische Signale vermitteln (Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002; Pyle & Solaro 2004; Heineke & Molkentin 2006; Hoshijima et al. 2006). Bei diesem Prozess interagieren die Titinfilamente sowohl direkt als auch indirekt mit diversen Signalmolekülen (Krüger & Linke 2009; Linke 2007; Voelkel & Linke 2011).

Die genaue Position der Z-Scheiben-assozierten Signalproteine ist schwer zu definieren, je nach Entwicklungsstadium und physiologischen Umständen können diese an mehreren Positionen innerhalb des Sarkomers gefunden werden (Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002). Zudem können diese Signalproteine auch im Zellkern vorliegen, wo sie u.a. mit Transkriptionsfaktoren interagieren, und dadurch die Genexpression modulieren (Hoshijima et al. 2006; Krüger & Linke 2009). Mutationen oder Defekte dieser Z-Scheiben-Proteine, die zur Dysregulation der assoziierten Signalwege führen, führen zu verschiedenen Formen von Herzmuskelerkrankungen (Frank et al. 2006; Luther 2009; Claeys et al. 2009; Krüger & Linke 2009). Signalproteine die mit der Z-Scheibe assoziiert sind und deren Defekte zur Entstehung von Kardiomyopathien beitragen sind z.B. Calsarcin-1, Calcineurin (CnA), Proteinkinase C (PKC) und das Muskel-LIM-Protein (MLP) (siehe Abb. 5). Calsarcin-1 ist eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin-Threoninphosphatase, die eine wichtige Rolle bei der Transduktion von Ca^{2+} -abhängigen Signalen in einer Vielzahl von Zelltypen spielt (Anon 2000) und u.a. mit α -Aktinin, γ -Filamin, Cypher-1 und T-Cap interagiert (Pyle & Solaro 2004). CnA ist eine Serin-Threoninphosphatase, die aus zwei Untereinheiten besteht, der katalytischen Untereinheit A, welche die Phosphatase-Domäne enthält, und die regulatorische Untereinheit B, welche Ca^{2+} bindet. Es gibt drei eng verwandte Isoformen der A-Untereinheit: α , β und γ . Im Säugetierherz werden die α - und die β -Isoform exprimiert (Gooch 2004). An der Z-Scheibe kann CnA u.a. mit MLP, Calmodulin (CaM) und Calsarcin-1 interagieren (Pyle & Solaro 2004; da Costa et al. 2007). Die Proteinkinase C, kurz PKC, ist ein Mitglied der Familie der Serin-Threonin-Kinasen. In Kardiomyozyten regulieren diese u.a. die Kontraktion sowie verschiedene physiologische Hypertrophie-Signalwege (Frank et al. 2006). An der Z-Scheibe bindet $\text{PKC}\epsilon$ an MLP, Cypher, CapZ und die fokale Adhäsionskinase, kurz FAK (Edmondson et al. 2002; Robia et al. 2001). MLP, welches sowohl Struktur- als auch Signalprotein ist, interagiert an der Z-Scheibe als Multimer u.a. mit T-Cap, CnA, α -Aktinin und $\text{PKC}\epsilon$ (Arber & Caroni 1996; Knöll et al. 2010) (siehe Kapitel IV. 4.).

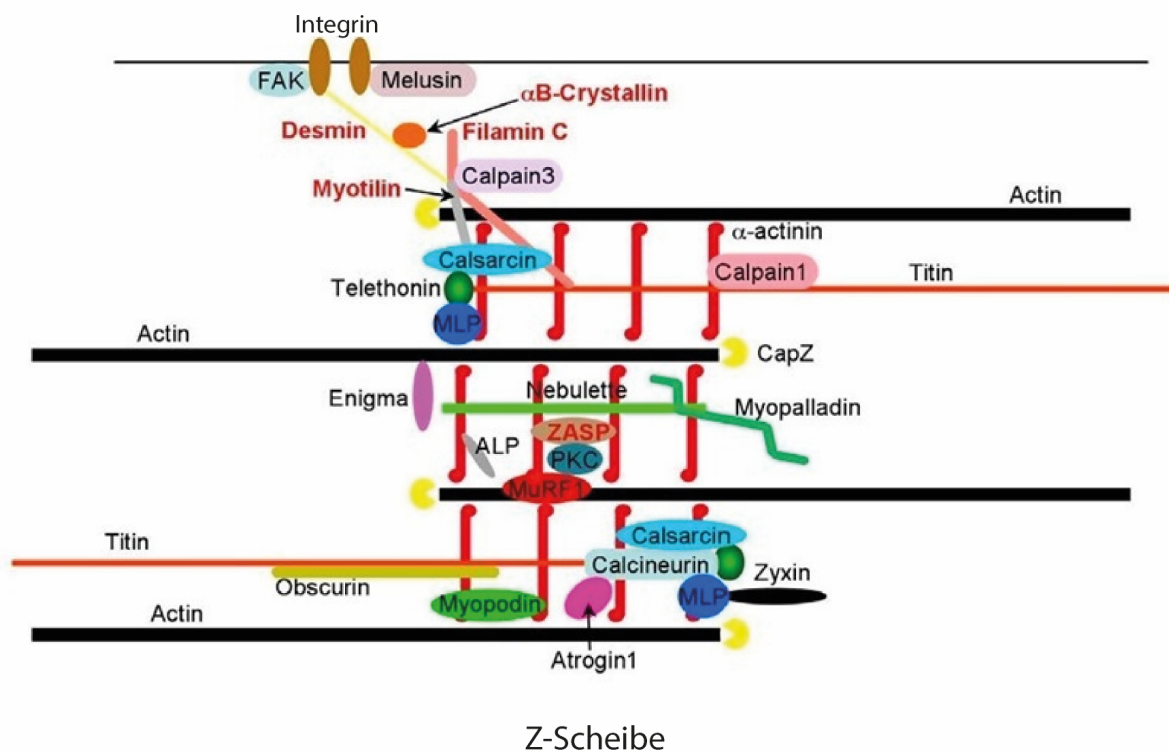


Abb. 5: Schematische Darstellung der Hauptproteine, die am strukturellen Aufbau und der Funktion der Z-Scheibe beteiligt sind. Insbesondere die Proteinkinase C (PKCε), Cypher-1, Calcineurin (CnA), Calsarcin-1 und das Muskel-LIM-Protein (MLP) gehören zu den Z-Scheiben-assoziierten Signalproteinen, deren Defekte zur Entstehung von Herzerkrankung beitragen (Abbildung modifiziert nach Anon 2018).

IV.4. Das Muskel-LIM-Protein (MLP)

Das *CSRP3* Gen kodiert für das Cystein- und Glycin-reiche Protein 3 (CSRP3 oder CRP3) oder auch Muskel-LIM-Protein genannt, kurz MLP. Das Protein ist ein Mitglied der Crp-Familie, welche zudem aus CRP1 und CRP2 besteht. Im Gegensatz zu MLP (CSRP3), welches in der quergestreiften Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert wird, sind CRP1 und CRP2 in der glatten Muskulatur vorzufinden (Vafiadaki et al. 2009; Vafiadaki et al. 2014, Anon 1995; Anon 1997).

Die Genstruktur von *CSRP3* wurde erstmals 1994 in Rattenzellen identifiziert. 1995 wurde das menschliche *CSRP3* Gen dem Chromosom 11p15-1 zugeordnet und aus einer menschlichen, kardialen cDNA-Bibliothek isoliert (Fung et al. 1996; Fung et al. 1995; Arber et al. 1994). Das menschliche Gen besteht aus einer 20 kb genomischen DNA, einem 0,8 kb großem Transkript und ist in 6 Exons organisiert welche zusammen ein Protein mit einer Länge von 195 Aminosäuren kodieren. (siehe Abb.6) (Fung et al. 1996; Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002). MLP ist demnach ein relativ kleines Protein mit einer molekularen Masse von ca. 21 kDa.

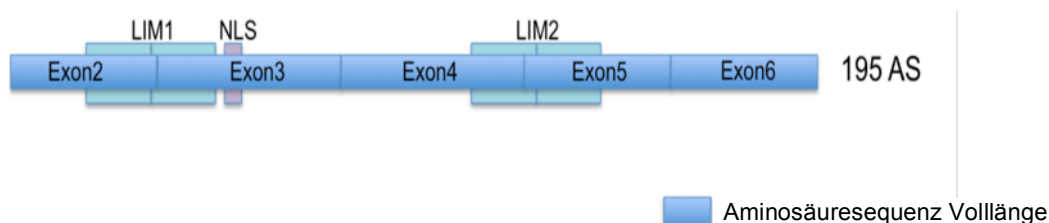


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenz von MLP.

Strukturell gehört MLP zur LIM-Familie, einer großen Proteinfamilie mit diversen funktionellen Rollen, wie beispielsweise der Transkriptionsregulation, der Zelladhäsion und -motilität, der Zytoskelettorganisation sowie der Signaltransduktion (Vafiadaki et al. 2015; Anon 2003b; Kadrmas & Beckerle 2004). Diese Proteine können eine oder auch mehrere LIM-Domänen besitzen, wobei MLP zwei dieser LIM-Domänen aufweist (siehe Abb. 7). Der Name dieser Proteindomäne ist abgeleitet aus den Anfangsbuchstaben von Lin-11, Isl-1 und Mec-3, welche die ersten drei Mitglieder dieser Proteinfamilie darstellen (Schmeichel & Beckerle 1994; Kadrmas & Beckerle 2004). LIM-Domänen umfassen ca. 50-60 Aminosäuren und besitzen zwei charakteristische Zinkfingerdomänen, bestehend aus acht hochkonservierten Cystein- und Histidinresten (Zheng & Zhao 2007).

IV. EINLEITUNG

Eine LIM-Domäne ist gekennzeichnet durch eine Konsensus-Sequenz $[C(X)_2C(X)_{16-23}(H/C)(X)_{2-4}(C/HCE)(X)_2C(X)_2C(X)_{14-21}(C/H)(X)_{2/1/3}(C/H/D/E)X]$, die in der 3D-Proteinstruktur ein tandemartiges, Zink-bindendes Motiv bildet (Arber & Caroni 1996; Kadrmas & Beckerle 2004; Zheng & Zhao 2007).

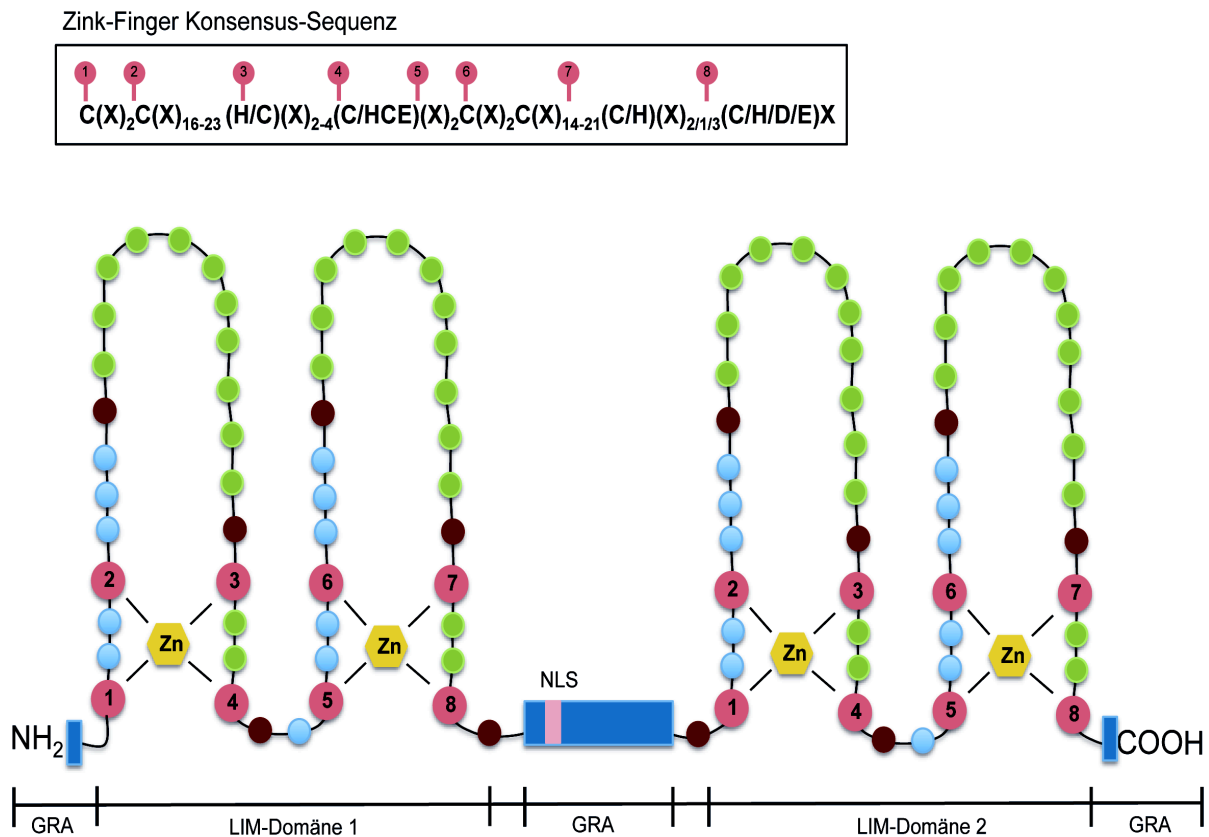


Abb. 7: Schematische Darstellung der MLP-Struktur mit der Zinkfinger-Konsensussequenz. GRA: Glycinreicher Abschnitt; NLS: nukleäres Lokalisationssignal; NH₂: N-Terminus; COOH: C-Terminus. Zahlen 1 bis 8 kennzeichnen eine LIM-Domäne und zeigen die Stellen der acht hochkonservierten Cystein- und Histidinresten. (Abbildung verändert nach Kadrmas & Beckerle 2004).

Das Verhältnis dieser Glycin-reichen Wiederholungen (LIM1 und LIM2) ist für alle Crp-Familienmitglieder charakteristisch (Vafiadaki et al. 2015). Während die Strukturanalysen von CRP1 und CRP2 vor einigen Jahren abgeschlossen wurden, ist die Proteinstruktur von MLP weitgehend unerforscht (Pérez-Alvarado et al. 1994; Konrat et al. 1997; Kontaxis et al. 1998; Vafiadaki et al. 2015). Kernmagnetresonanzspektroskopie-Analysen (NMR) lassen erahnen, dass die beiden MLP-LIM-Domänen als eigenständige Einheit agieren und dass die benachbarte Linkerregion vollständig flexibel ist (Schallus et al. 2007; Schallus et al. 2009). Diese strukturellen Merkmale deuten darauf hin, dass die LIM-Domänen als Adaptoren dienen, welche die Bindung von makromolekularen Komplexen erleichtert.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die beiden MLP-LIM-Domänen Wechselwirkungen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine an verschiedenen subzellulären Orten vermitteln (Vafiadaki et al. 2015). Bereits identifizierte Interaktionspartner von MLP sind zytoskelettale Proteine wie Aktin, α -Aktinin, N-RAP, Telethonin (T-Cap) und Spektrin sowie die Skelettmuskel-Transkriptionsfaktoren MyoD, MRF4 und Myogenin (Arber & Caroni 1996; Flick & Konieczny 2000; Ehler et al. 2001; Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002; Kong et al. 1997).

Aufgrund dieser Wechselwirkungen und dem Vorhandensein eines nukleären Lokalisierungssignals wird vermutet, dass MLP in Kardiomyozyten zum einen als signaltransduzierendes Protein zwischen den Myofilamenten oder dem Zytoplasma und dem Nukleus fungiert und zum anderen aufgrund der Wechselwirkungen mit Strukturproteinen als ein Gerüstprotein für das Sarkomer und das Aktin-basierte Zytoskelett dient (Geier et al. 2008; Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002; Arber et al. 1997; Arber & Caroni 1996; Ehler et al. 2001). Im Zellkern fungiert MLP als positiver Regulator der Zelldifferenzierung und Myogenese. Studien zeigen, dass es während der embryonalen Entwicklung im Nukleus von Myotuben akkumuliert (Arber et al. 1994; Boateng et al. 2007; Boateng et al. 2009; Kong et al. 1997; Schallus et al. 2009).

Im adulten Herzen ist MLP in vielen subzellulären Kompartimenten detektierbar, jedoch ist die genaue Lokalisation noch weitgehend unklar, da insbesondere unter Verwendung verschiedener Antikörper keine eindeutigen Ergebnisse diesbezüglich gezeigt werden konnten. Lange Zeit wurde vermutet, dass MLP nur im Sarkoplasma lokalisiert sei, jedoch zeigten im weiteren Verlauf viele Studien, dass MLP in vielen anderen Kompartimenten der Zelle detektierbar ist, an der Z-Scheibe, der M-Linie, dem I-Band aber auch an Stressfasern und an der Zellmembran (Gehmlich et al. 2008; Gehmlich et al. 2010; Geier et al. 2008; Arber et al. 1994; Arber et al. 1997; Arber & Caroni 1996; Flick & Konieczny 2000; Knöll & Buyandelger 2012; Kong et al. 1997). An der Zellmembran und am Zytoskelett bildet MLP über die MLP-C-Termini Multimere, wohingegen es im Nukleus als Monomer zu finden ist. Studien belegen, dass zyklische Dehnungen und hypertrophe Stimulationen des adulten Herzens zur verstärkten Translokation von MLP Monomeren in den Nukleus führen. Dies impliziert die Reininitialisierung der MLP-assoziierten Genexpression (Boateng et al. 2007; Boateng et al. 2009; Knöll et al. 2010; Ecartot-Laubriet et al. 2000). Boateng et al. postulieren, dass eine Hemmung des Transports von MLP in den Nukleus zur Desorganisation der Sarkomerstruktur führt, was letztlich die gesamte zelluläre Organisation aus dem Gleichgewicht bringt (Boateng et al. 2009).

IV. EINLEITUNG

Es wird vermutet, dass eine Reihe von LIM-Proteinen infolge spezifischer Reize in den Zellkern wandern, wo sie dann zur Genexpressionsregulation beitragen (siehe Abb. 8). Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch weiterhin unklar.

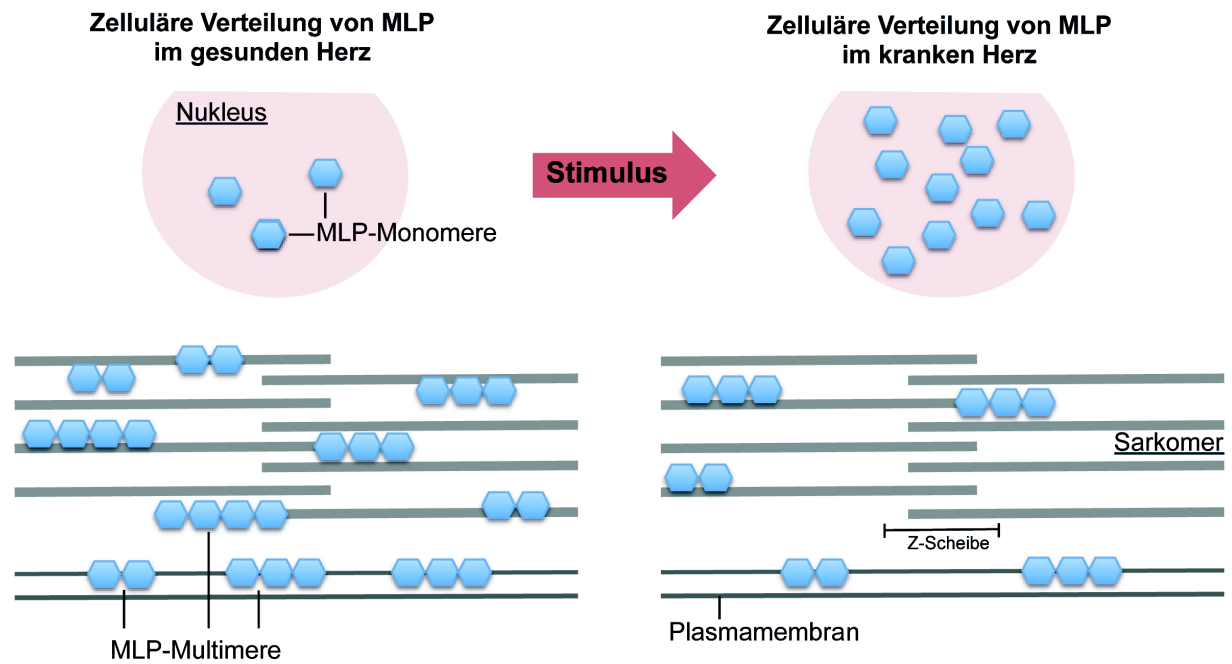


Abb. 8: Subzelluläre Verteilung von MLP im gesunden und insuffizienten Herzen. (Abbildung verändert nach Boateng et al. 2007).

IV.5. Einfluss von MLP auf die Entstehung von Herzerkrankungen

Da die genaue Lokalisation von MLP noch sehr umstritten ist, sollte bei der Betrachtung der genetischen Ursache bzw. Entstehung der Kardiomyopathien beachtet werden, dass das klassische Konzept „ein Gen, ein Protein, eine Funktion“ in diesem Fall nicht zutrifft (Knöll R., Der Kardiologe, Oktober 2009, Volume 3). Vielmehr sollten die Kardiomyozyten im Kontext des gesamten Herzens gesehen werden. Auch sind die pathogenetischen Prinzipien der DCM/HCM am ganzen „Z-Scheiben, I-Banden-Konstamer-Komplex“ zu analysieren (Knöll R., Der Kardiologe, Oktober 2009, Volume 3).

Bekannt ist, dass eine veränderte MLP-Expression Einfluss auf die Entwicklung chronischer Herzerkrankungen haben kann (Frank et al. 2006). Murine und humane Herzen mit chronischer Insuffizienz zeigen eine gesteigerte Proteinexpression von MLP. Auch führen hypertrophe Stimulationen zu einer Zunahme von MLP in Kardiomyozyten (da Costa et al. 2007; Frank et al. 2006; Kostek et al. 2007; Boateng et al. 2007; Grzeskowiak et al. 2003). Manche Studien zeigen jedoch gegensätzliches und berichten von einer Reduktion der MLP-Proteinmenge bei fortgeschrittener kardialer Insuffizienz (Ecarnot-Laubriet et al. 2000; Zolk et al. 2000). Im gesunden Herzen unterliegt die MLP-Expression starken Schwankungen, was der Grund dafür ist, dass es nicht als diagnostischer Biomarker verwendet werden kann. Denn nicht nur Änderungen der MLP-Expression sondern auch Mutationen in MLP werden mit chronischen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht (Zolk et al. 2000).

Letztlich führen langfristige und starke Veränderungen des MLP-Expressionslevel zu chronischen Herzerkrankungen, welche meist mit Mutationen in MLP assoziiert sind (siehe Abb. 9). Bisher sind elf Mutationen (zehn „Missense“- und eine „Frameshift“-Mutation) bekannt und werden mit der Entwicklung von HCM und DCM in Verbindung gebracht (Geier et al. 2008; Geier et al. 2003; Mohapatra et al. 2003; Hershberger et al. 2008; Vafiadaki et al. 2015). Alle bekannten Mutationen liegen interessanterweise in den ersten 100 Aminosäuren des Proteins, keine im C-Terminus (siehe Abb. 9). Die am häufigsten in Patienten mit Herzinsuffizienz auftretende Mutation ist die W4R (Trp4→Arg) (Mohapatra et al. 2003; Newman et al. 2005; Geier et al. 2008; Knöll et al. 2010). Biochemische Analysen implizieren, dass diese Mutation zu einem vollständigen Verlust der Bindung von MLP an T-Cap führt, was eine Destabilisierung der Z-Scheibe zur Folge hat (Knöll, Hoshijima & Chien 2002).

Mäuse mit einem homozygoten MLP-W4R knock-in entwickeln im Alter von einem Jahr eine HCM (Knöll, Hoshijima & Chien 2002). Bei den restlichen Mutationen sind zur Zeit noch keine genaueren Mechanismen bekannt, und es bleibt zu klären, ob es sich bei ihnen um Polymorphismen handelt, die keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben, oder um krankheitsauslösende Veränderungen.

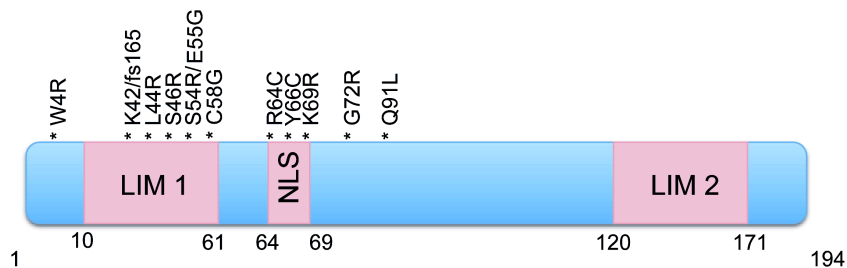


Abb. 9: Schematische Darstellung von MLP mit der Lokalisation der bekannten menschlichen Mutationen. Gezeigt sind die Positionen der beiden LIM-Domänen (LIM 1 und LIM 2) sowie das nukleare Lokalisierungssignal (NLS). (Abbildung verändert nach Vafiadaki et al. 2015).

Analysen eines etablierten MLP-KO-Mausmodells dokumentieren die Wichtigkeit von MLP und liefern mögliche Hinweise auf MLP-assoziierte Mechanismen, die letztlich zu Kardiomyopathien führen können (siehe Abb. 10). Bei homozygoten MLP-KO Mäusen zeigen sich zwei typische Phänotypen, zum einen der frühe Phänotyp, bei dem ca. 70 % der Versuchstiere im Alter von fünf bis zehn Tagen Ermüdungserscheinungen zeigen und anschließend etwa 24 h später sterben, und zum anderen der späte Phänotyp, bei dem die überlebenden MLP-KO-Mäuse zwei bis vier Wochen nach der Geburt eine DCM mit Hypertrophie und Herzinsuffizienz entwickeln (Arber et al. 1997; Knöll, Hoshijima & Chien 2002). Die Herzfunktion von Mäusen mit MLP-KO des adulten Phänotyps ist nach der Geburt vorerst normal. Vergleicht man jedoch das Herzgewebe dieser Mäuse mit dem des Wildtyps so ist dieses im MLP-KO insgesamt weicher und weist eine stark reduzierte Muskelspannung auf (Knöll, Hoshijima & Chien 2002). Die Glanzstreifen, bei denen es sich um laterale Verbindungen von Zellen handelt die der mechanischen Verankerung benachbarter Kardiomyozyten und der Verankerung von Intermediärfilamenten dienen, erscheinen in der MLP-KO-Maus desorganisiert und sind breiter angeordnet (siehe Abb. 10) (Arber et al. 1997; Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002; Esposito et al. 2000; van den Bosch et al. 2005).

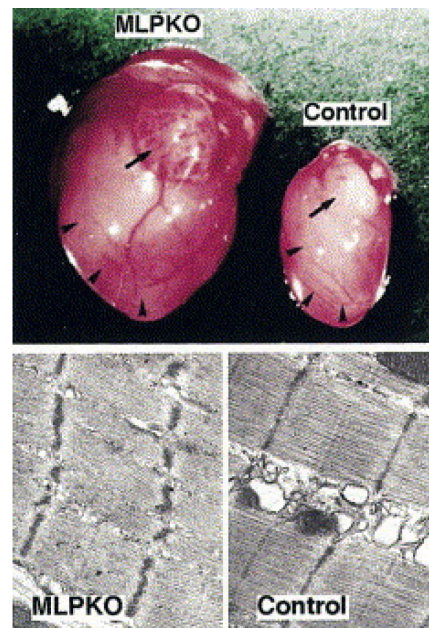


Abb. 10: Darstellung der Unterschiede eines MLP-KO-Herzens und eines Kontroll-Herzens. Gezeigt ist das Ganzherz sowie die mikroskopische Aufnahme der Anordnung der Glanzsteifen und Z-Scheiben eines MLP-KO-Mausherzens im Vergleich zu einem gesunden Mausherzen (Hoshijima et al. 2006).

Ähnliche Strukturveränderung findet man auch bei humaner Herzinsuffizienz. Neueste Studien am Menschen zeigen, dass veränderte MLP-Expressionslevel im Kontext von chronischen Herzerkrankungen stehen. Interessanterweise wurden MLP-Mutationen sowohl bei HCM- als auch bei DCM-Patienten gefunden und führen sehr wahrscheinlich über Defekte in der kardialen Mechanosensorik zu diesen Krankheitsbildern (Su et al. 2001; Zolk et al. 2000; Geier et al. 2003; Frey & Katus 2007; Springer Medizin Verlag 2007; R. Knöll, Der Kardiologe, 2009). Diese Hypothese kann durch die Lokalisation von MLP an verschiedenen Knotenpunkten der zellulären Signalweiterleitung sowie die hohe Mobilität des Proteins aufgestellt werden (Knöll, Hoshijima & Chien 2002; Frank et al. 2006; Heineke & Molkentin 2006; Gehmlich et al. 2008; Gehmlich et al. 2010; Geier et al. 2003; Gunkel et al. 2009; Voelkel & Linke 2011).

Bestätigt werden konnte diese Annahme jedoch noch nicht und es bleibt unklar, ob mechanischer Stress überhaupt bis zu MLP weitergeleitet wird, da keine direkte Interaktion von MLP mit Titin besteht. Titin hingegen spielt bekannterweise eine wichtige Rolle im zellulären Stress- bzw. Dehnungs-Sensing (Voelkel & Linke 2011). Möglicherweise fungiert MLP auch als Adapterprotein und beeinflusst die Weiterleitung von Signalen, welche durch Sensoren detektiert und umgewandelt werden und ist somit indirekt ein Teil des Stress- bzw. Dehnungssensors (Voelkel & Linke 2011).

In diesem Zusammenhang könnte der G_q/G_{11} -abhängige Signalweg im Herzen eine bedeutende Rolle spielen (siehe Abschnitt IV.6). Im Allgemeinen ist bekannt, dass $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Proteine Veränderungen in der Genexpression vermitteln, die zu Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften führen (Heineke & Molkentin 2006). Schon lange wird vermutet, dass Mutationen beteiligter Gene und somit Missregulationen dieses Signalweges Auslöser für die Entstehung von Herzerkrankungen sein könnten. Eine Schlüsselrolle in diesem Signalweg könnte MLP darstellen.

IV.6. G_q/G_{11} -abhängige, hypertrophe Signalwege im Herzen

Hypertrophe Stimulationen aktivieren verschiedene Transmembranproteine im Sarkolemma von Kardiomyozyten. Eine große Gruppe dieser Transmembranproteine stellen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) dar. Diese Art der Signalweiterleitung trägt zu vielen wichtigen physiologischen Reaktionen von Kardiomyozyten bei. G-Proteine sind heterotrimere GTP-bindende Proteine bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. G_α enthält ein gebundenes Guaninnukleotid und wird je nach Art in 4 Gruppen klassifiziert, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12/13}$ (siehe Abb. 11) (Wiesen et al. 2016). Kommt es zur Bindung von Liganden wie Epinephrin, Endothelin-1 oder Angiotensin-II an die GPCRs, folgt eine Konformationsänderung am Rezeptor, die es dem GPCR ermöglicht, als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor zu agieren (Bian et al. 2001). Der somit aktivierte Rezeptor tauscht das an G_α gebundene GDP gegen GTP aus, was zur G_α -Aktivierung sowie zur Dissoziation von den $\beta\gamma$ -Untereinheiten führt (Katz 2010; Berg et al. 2002). Das aktivierte $G_{\alpha q}$ stimuliert hierbei PLC β , ein Enzym, das PIP $_2$ zu IP $_3$ und DAG hydrolysiert. IP $_3$ induziert die Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und DAG aktiviert cPKCs und nPKCs. Beide Effekte, d.h. die intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Erhöhung und PKC-vermittelte Phosphorylierungen, modulieren die Kontraktilität der Kardiomyozyten (siehe Abb. 11) (Akhter et al. 1998; Molkentin & Dorn 2001).

Dies belegen auch Studien an einem globalen $G_{\alpha11}$ -Knockout und einem neuartigen, induzierbaren kardial-spezifischen $G_{\alpha q}$ -Knockout, sowie einer kombinierten Doppel-Knockout (dKO) Mauslinie (Wiesen et al. 2016). In der Arbeit weisen Echokardiographie und telemetrische EKG-Aufnahmen darauf hin, dass im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, Herzen von $G_{\alpha q}/G_{\alpha11}$ -dKO-Mäusen eine reduzierte Ejektionsfraktion und eine verminderte Herzfrequenz besitzen. Histologische Analysen der extrazellulären Matrix im Herzen zeigen eine verminderte Anwesenheit von Kollagen in alternden Herzen von dKO-Mäusen. Die Ergebnisse einer Transkriptomanalyse an isolierten ventrikulären Herzmyozyten zeigen Veränderungen der Aktivität von Genen, die an der $G_{\alpha q}/G_{\alpha11}$ -abhängigen Regulation der extrazellulären Matrix beteiligt sind, wie beispielsweise das matrizelluläre Protein Cyr61 (Wiesen et al. 2016).

Weitere Ergebnisse zeigen, dass auch RGS (Regulator of G-Protein Signaling), ein GTPase-aktivierendes Protein, die $G_{\alpha q}/G_{\alpha11}$ -Transduktion durch Induktion der GTP-Hydrolyse hemmen kann und so die hypertrophe Reaktion gestoppt wird (Roderick & Bootman 2007). Neben den genomischen scheint die $G_{\alpha q}/G_{\alpha11}$ -Transduktion auch nicht-genomische pathologische Reaktionen auf das Herz auszuüben. Beispielsweise führt eine Aktivierung des IP_3 -Rezeptortyps 2 (IP_3 -R2) zur $SR-Ca^{2+}$ -Freisetzung und letztlich zu fehlerhaften arrhythmogenen Störungen einer Zelle (Li 2005; Lipp et al. 2000; Mackenzie et al. 2002). Viele Studien belegen, dass $G_{\alpha q}/G_{\alpha11}$ -Signalwege eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung von Genaktivitätsmustern spielen und für das Herz eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Herzhypertrophien spielt (Wiesen et al. 2016).

IV.7. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mittels qPCR (quantitative Realtime PCR) Ergebnisse eines NGS-Screens verifiziert werden, welcher an isolierten Herzzellen von $G_{\alpha q}/G_{11}$ Knock out Mäusen durchgeführt wurde. Ferner sollten interessante Kandidaten aus den im NGS identifizierten 3100 Genen mit signifikant verändertem Expressionsniveau zwischen Wildtyp (WT) und Doppel-Knockout (dKO) nach erfolgreicher Verifizierung näher untersucht und hinsichtlich der betroffenen kardialen Signalwege analysiert werden. Diese Analysen sollten ein verbessertes Gesamtverständnis der Rolle dieser Signalwege bei physiologischen Vorgängen liefern, vor allem aber auch bei pathologischen Veränderungen im Verlauf von Herzkrankheiten. Mit Hilfe dieses Ansatzes sollten sowohl bekannte Phänotypen molekular erklärt werden, als auch kardiale Signalwege verfolgt werden, insbesondere auch solche die $G_{\alpha q}/\alpha_{11}$ -abhängig sind und die für die Physiologie und Pathophysiologie des Herzens von zentraler Bedeutung sind.

Die Betrachtung der EZM- und CMC- Signalwege konnte die Anzahl relevanter Kandidaten auf einige wenige reduzieren, wobei sich im Rahmen dieser Arbeit auf MLP (*CSRP3*) konzentriert wurde (u.a. mittels molekularbiologischer Methoden wie Western-Blot und Immunofluoreszenz), da dessen molekulare Mechanismen noch weitgehend unklar sind. Nach einem Screening von Herzohrproben und den dabei gefundenen neuen MLP-Splice-Varianten, sollten zudem neue Antikörper gegen diese vier Varianten des MLP-Proteins hergestellt werden, um die jeweilige Expressionsstärke auf Proteinebene zu analysieren. Denn durch das Splicing wird die Aminosäuresequenz teilweise so verändert, dass mit gängigen Antikörpern keine Detektion möglich ist. Erste Ergebnisse auf mRNA-Ebene zeigen auch, dass sich die Expression der *CSRP3*-Splice-Varianten zwischen Proben aus Kontrollgewebe und erkranktem Gewebe deutlich unterscheiden. Daher sollten zudem adenovirale Konstrukte hergestellt werden, welche cDNA verschiedener *CSRP3*-Isoformen mit einem c-terminalen tagRFPT enthalten, und in Herzmuskelzellen eingeschleust werden. Hiermit sollte der Einfluss von verschiedenen MLP-Splice-Varianten auf die Physiologie und Lokalisation (u.a. mittels Immunfluoreszenz und Calcium-Imaging) in adulten Ratten-Kardiomyozyten sowie in differenzierten iPS-Zellen untersucht werden.

V. Material und Methoden

V.1. Material

V.1.1. Geräte

Hersteller:

Artikel:

Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Bibby Scientific, USA

Biocompare, USA

Biorad, München

Cybio AG., Deutschland

DAKO, Dänemark

Deutschland: Agilent Technologies, USA

Vilber Lourmat, Deutschland

Duran, Mainz

EliTechGroup USA

Eppendorf, Hamburg

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Heidolph Instruments GmbH & Co.KG,

Heidolph, Deutschland

Heraeus, Hanau

Isotherm KGW, Karlsruhe

Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau

Klinkner & Partner GmbH, Deutschland

MircoAmp-96-well Reaction Plate

Falcon 35mm, 60mm

Flexigene Techne, Thermocycler

Pipetboy, MATRIXcell

Trans-Blot™ Electrophoretic Transfer Cell
(Nass-Blot-Apparatur für SDS-Gele)

Selma Autom Pipetting CyBio-TipTray96,
25 µl, PCR-certified, pre-sterilized, filter

Eindeckmittel, Fluorescent Mounting
Medium

Stratagene Mx3000P QPCR System

Fusion-FX7 Spectra

Laborglasflaschen 100 ml, 250 ml, 500 ml
und 1000 ml

Vapro Vapor Pressure Osmometer 5520

Thermomixer 5320, 2 ml Reaktionsgefäße

Zellkulturschalen Ø 3,5 cm, 6 cm und 10 cm,
Gewebe- und Suspensionskultur-Flaschen
250 ml (75 cm²), 6 well-, 12 well-Zellkultur-
Multiwellplatten

Reagenzglasschüttler Reax top

MR3001K Magnetrührer

Brutschränke Hera cell 150; Werkbank

HERAsafe, Biofuge primo, Biofuge primo R

Flüssigstickstoff-Behälter

Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO

HLC - HBT 130 Heizblock

Hersteller:

Labnet International, Inc.
Liebherr, Ochsenhausen
Marienfeld, Deutschland
Millipore GmbH, Deutschland
NAPCO
Neolab, Heidelberg
Optik-Labor, Görlitz
peqlab, Deutschland

Perkin Elmer, USA
Phoenix Instrument, Deutschland
Saartorius, Deutschland
Sarstedt, Nürnberg

Schleicher & Schüll, Dassel
Scientific Industries, Bohemia , USA
SensoQuest, Deutschland
Systec GmbH, Wettenberg
Thermo Scientific, Dreieich

VWR, Darmstadt
Waters-Millipore, Milford, USA
Werkstatt Anatomie
Whatman GmbH, Dassel
Xylem, England
Ziegra, Isernhagen

Artikel:

Minizentrifuge
Premium No Frost Gefrierschrank
Deckgläser
Immobilon Transfer Membran (PVDF)
Kühlzentrifuge 2028R und 2019R
Deckglas (Ø 25 mm), Eisbad 1-6031
Neubauer Zählkammer
Minilys Arbeitsplatz-Homogenisator
Precellys Ceramic Kit 1.4 mm (0,5 ml tubes)
LambdaBio+ Spektrometer
3D Schüttler RS - DS.5
Feinwage CPA225D
1,5 ml Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml
Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen
Filterpapiere, Sterilfilter (0,2 µm)
Vortex-Mixer (Genie 2™)
Laborcycler
Autoklav DX-65
Accuspin micro17
96-well Segmented PCR Plate, Semi-skirted, white, CapStrips, 8-Well, flat, optical clear
PCR Single Cap 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos
Pasteur-Pipetten Glas 150 mm
Milliporewasseranlage Milli-Q
Elektrophoresekammern (Eigenbau)
Whatman FP30/0,2 CA-S rotrand (0,2 µm)
InoLab WTW pH-Meter
Eismaschine

V.1.2. Chemikalien

Hersteller:

Biochrom AG, Berlin
Carl Roth, Karlsruhe
GE Healthcare Uppsala, Schweden
GibcoBRL, Heidelberg
Invitrogen, Karlsruhe
Life technologies, Deutschland

Merck, Darmstadt

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
New England Biolabs
Riedel de Haën, Hannover
Roche, Mannheim

Serva, Heidelberg

Sigma-Aldrich, Steinheim

Artikel:

Fetales Kälberserum (FCS)
LB-Medium (Lennox),
ECL-Western Blot Detektionssystem
Agarose
Gibco® DMEM, 1 x PBS
NuPAGE Bis-Tris Mini Gels 12 % und 3 %,
NuPAGE Mops SDS Running Buffer (20x)
Tris Acetate SDS Running Buffer (20x)
NuPAGE Antioxidant, LDS Sample Buffer (4x), Fura-2 AM
Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA, DMSO, Glycerin, Essigsäure, Ethanol, Glycin, Natriumchlorid, Magnesiumacetat, Kaliumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Methanol, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trypsininhibitor (aus Sojabohne)
Bovine serum albumine (BSA)
Aceton, Essigsäure, Kaliumacetat
1,4-Dithiothreitol (DTT), PhosStop, CompleteMini
Acrylamid, Bromphenolblau, Ethanol, Ammoniumpersulfat, Bisacrylamid, Kaliumdihydrogenphosphat, Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, SDS, Natriumchlorid, TEMED, TritonX-100,
Ampicillin, β -Mercaptoethanol, Bovines Serumalbumin (BSA), Phenylmethan-sulfonylfluorid (PMSF), 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Tween-20, Ethidiumbromid-Lösung (95 %), Phenylephedrine, Endothelin-1

Hersteller:**Artikel:****Thermo Fisher Scientific, Dreieich**Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %) in PBS 1 x,
Penicillin/Streptomycin 100 x, ,PageRuler™
Prestained Protein Ladder,**TSI GmbH, Zeven**Dynabeads® M-280 Sheep Anti-Rabbit IgG
Sucofin Magermilchpulver

Sonstige Chemikalien wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) oder der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

V.1.3. Puffer und Lösungen

Name der Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung/Antikörperlösung	PBS + Tween® + 5 % (w/v) Magermilchpulver bzw. PBS + Tween® + 5 % BSA (w/v)
6x Protein Ladepuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 30 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 50 µl/ml β-Mercaptoethanol
SDS Laufpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 10 g/l SDS,
MES-Puffer	Fertiglösung 1:20-fach mit AquaDest auffüllen
MOPS-Puffer	Fertiglösung 1:20-fach mit AquaDest auffüllen
Transferpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 20 % (v/v) Methanol
PBS Tween®	PBS, 0,1 % (v/v) Tween® 20
PBS Triton X-100	1,5 % Triton X-100 in PBS (w/v)
Tris-Borsäure-EDTA (TBE)- Laufpuffer	50 mM Tris, 50 mM Borsäure, 1,25 mM EDTA, pH 8,3
Extraktionspuffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,5 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, 0,05 % (v/v) Triton X-100, Complete Protease Inhibitor Cocktail
CoIP Waschpuffer	74,4 mg EDTA, 50 mg BSA ad. 100 ml PBS
Lösung A	134 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM MgSO ₄ , 11 mM Glukose, 1,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM HEPES, pH 7,3
Lösung A+	Lösung A, 0,2 mM EGTA, pH 7,3
Lösung A++	100 µl DNase ad. 100 ml Lösung A
10x Loading-Dye Solution (ohne Bromphenolblau)	20 mg Xylencynanol, 6 ml Glycerol mit AquaDest auf 20 ml auffüllen
Natrium Acetat Lösung	3 M, pH 5,2

Name der Lösung	Zusammensetzung
Tyrode	3,95 g NaCl 0,2 g KCl 0,9 g Glucose 900 µl CaCl ₂ (1 M) 500 µl MgCl ₂ (1 M) mit AquaDest auf 500 ml auffüllen (pH 7,35)
LB-Medium	5 g Trypton / Pepton 2,5 g Hefe 2,5 g NaCl ad. 500 ml AquaDest (pH 7,0)
LB Medium + Agar Agar	5 g Trypton / Pepton 2,5 g Hefe 2,5 g NaCl 7,5 g Agar Agar ad. 500 ml AquaDest (pH 7,0)

V.1.4. Kits und Transfektionsreagenzien

<i>Hersteller:</i>	<i>Artikel:</i>
Bioline, Deutschland	ISOLATE II RNA Micro Kit ISOLATE II DNA/RNA/Protein-Kit SensiFast cDNA Synthesis Kit SensiFast SYBER Lo-ROX Kit
Cell BioLABS, USA	RAPAD [®] CMV Adenoviral Expressions System
Novagen, USA	NanoJuice Transfection Kit
Qiagen, Deutschland	Miniprep Kit, QIAGEN Plasmid Maxi Kit QIAquick Gel Extraction Kit, QIAprep Spin
Thermo Scientific, Deutschland	CloneJET PCR Cloning Kit

V.1.5. Enzyme und sekundäre Antikörper

<i>Hersteller:</i>	<i>Artikel:</i>
Abcam, England	Donkey Anti-Goat IgG H&L (HRP)
Fermentas	GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder T4-Ligase mit Ligase Puffer
Santa Cruz Biotechnology	Goat-anti-rabbit, Goat-anti-mouse, Goat-anti-rat, Donkey-anti-goat, anti-GAPDH, anti-Rabbit 649, anti-Maus 649
ThermoFisher	<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase mit <i>Phusion</i> HF-Puffer, <i>PacI</i> mit <i>PacI</i> Puffer, <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> Puffer

V.1.6. Primäre Antikörper

Neben den kommerziell erworbenen Antikörpern wurden auch Antikörper am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Universität des Saarlandes) hergestellt. Hierbei handelte es sich um Peptidantikörper, die aus Serum von Kaninchen gewonnen wurden und im Labor von PD Dr. Martin Jung generiert wurden (Tabelle 2). Alle sekundären Antikörper waren entweder Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Esel-anti-Schaf-, Ziege-anti-Kaninchen- oder Ziege-anti-Maus-Antikörper (siehe Punkt 1.5). Zur Immunfluoreszenz (IMF) wurden zudem anti-Rabbit 649 und anti-Maus 649 Antikörper verwendet. Alle Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Als Ladekontrolle für die Proteinmenge im Western-Blot wurde GAPDH verwendet, welches mit Hilfe eines anti-GAPDH-Antikörpers und einem sekundären HRP-gekoppelten Donkey anti-Goat-Antikörper detektiert wurde.

Tabelle 2: Primäre Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden (UdS = Universität des Saarlandes). Nicht gekennzeichnete Antikörper wurden für Western Blot Analysen eingesetzt (IMF = Immunfluoreszenz)

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
Atp1a1 anit goat IgG (Na ⁺ /K ⁺ - ATPase1 (N-15))	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	1:200 1:50 (IMF)
CTGF (L-20) anit goat IgG	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	1:200 1:50 (IMF)
CSRP3 (G-16) anit goat IgG	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	1:200 1:50 (IMF)
Scn1b anit goat IgG (Na ⁺ /CP type I ₋ (Y-18))	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	1:200 1:50 (IMF)
Anti-SCN5A anti rabbit IgG	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
MybPc3 (M-190) anit mouse IgG	Maus	Santa Cruz Biotechnology	1:200 1:50 (IMF)
Purified Mouse Anti-PKCi	Maus	BD Biosciences	1:1000
PKC iota	Kaninchen	Proteintech	1:1000
PP2A-A α / β (4G7)	Maus	Santa Cruz Biotechnology	1:200
PKC (A-9)	Maus	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Telethonin (G-11)	Maus	Santa Cruz Biotechnology	1:200

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
Spectrin all (C-11)	Maus	Santa Cruz Biotechnology	1:200
GAPDH (L-18)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	1:500
α -Aktinin	Kaninchen	Abcam	1:1000
α -Aktinin	Kaninchen	Abcam	1:1000
Anti-Csrp3	Kaninchen	Abcam	1:200
Anti-Telethonon	Kaninchen	Abcam	1:100
Anti-beta 1 Spectrin	Kaninchen	Abcam	1:100
Csrp3 WT	Kaninchen	UdS	1:100
Csrp3 ohne 3b 4a	Kaninchen	UdS	1:100
Csrp3 ohne 3	Kaninchen	UdS	1:100
Csrp3 ohne 3 und 4	Kaninchen	UdS	1:100

V.1.7. Messsysteme

- Leica TCS SP5 II Konfokal-Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Zell-/Sarkomerlängenmesssystem (IonOptix Corp., Milton, USA)
- Video Imaging System (TILL Photonics GmbH, Gräfeling, Deutschland)

V.1.8. Oligonukleotide

V.1.8.1. PCR-Primer

PCR-Primer sind kurze DNA-Oligonukleotide, welche als Startsequenz für DNA-Polymerasen in einer PCR verwendet werden. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zudem sind Primer aufgeführt, in die eine Restriktionsschnittstelle angefügt wurde um so eine anschließende Klonierung zu ermöglichen (siehe V.2.2.).

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten PCR-Primer und deren Nukleotidsequenz

qPCR-Analysen		
Bezeichnung	Sequenz 5'→3' (Forward)	Sequenz 5'→3' (Revers)
Abl1	AAATTCCCCATCAAATGGAC	CCAGAGCAATACTCCAAATG
Acta2	AAATGACCCAGATTATGTTTGA	TCCAGCACAATACCAGTT
Acta2	AAATGACCCAGATTATGTTTGA	TCCAGCACAATACCAGTT
Acta2	CATCTTTCATTGGGATGGAG	TTAGCATAGAGATCCTTCCTG
Adams1	ACACAATGAGAGAATGTGAC	CGTTTTTCCGTTATTGTCTG
Adra1b	GTTCTCCAGGGAAAAGAAAG	CAGAACTACCTTGAATACG
Angptl4	ATGGAGTAGACAAGACTTCG	TCACAGTTGACCAAAAATGG
Anxa2	CTCCAGAAAGTGTTGAAAAG	TTCTAATCAGGACCTTGTCTC
Atp1a1	ACATGTGGTTTGACAATCAG	TACTGCCCGCTTAAGAATAG
Atp2a1	TACCTCTGTCATCTGTTCTG	GGCTTATCATTCTTCAAGACC
Bgn	CATGAACTGCATTGAGATGG	ATAGCCTGGATTTTGTGTG
Bmp4	TTTCCATCACGAAGAACATC	GAGATCACCTCATTCTCTGG
C1qa	ACGTGGTTATCTTTGACAAG	GATAAACAGACAAAGGTCCC
C1qb	AGAACACCAGGATTCCATAC	CATGGAGAAAACCTAGAAGC
C1qc	AAACAGTATGTTCTGTCTG	CCATCCTGAGGGTGTAAAG
C1qtnf9	ACGAGAAGTGATTCTCCC	CATCTGCTCCTGGTTCTC
Cacna1c	AAACAGAAGGGAACCTAGAG	AGTACTCTTGGATCAGGAAG
Cacna2d1	CTATATGATGTACGCAGAAGAC	TTCTAACATCTCGGAGACAG
Cacnb3	TCTCTAGCCAAGCAGAAG	ATGTCCGTACCTCATAG
Cald1	GGAACACCCAATAAGGAAAC	GTGACCTTATCCACAGATTG
Casq2	TGTGAAGGAACATCAAAGAC	TCTAGGAACTCATAGCCATC
Cav1	CTCAGTTCTCTTAAATCACAGC	CATACACTTGCTTCTCAGTC
Clec3b	CAAATGCCAAGAAAGATTGG	ATGGAAGGTCTTCGGTTG
Col3a1	ACTCAAGAGTGAGAAATACTG	AACATGTTTCTTCTCTGCAC
Col4a1	TTCTCTTCTGCAACATCAAC	GAATCTGAATGGTCTGACTG
Colec11	AGGAGAAAAGGGAGACAAAG	TCCGATATCACCAGAATCTC
Cox6a2	ATCTTCAAATTGGCCTTCTG	ACCTTTATTGAGCTTGAAC
Crtap	AACAGAACCTGGTGTACTATC	TAAAGAACTGAACTGCTTCG
Csrp3	GTTCCAACAATCCCCAAAG	CTCCCATGACCTTCTCAG

qPCR-Analysen		
Bezeichnung	Sequenz 5'→3' (Forward)	Sequenz 5'→3' (Revers)
Csrp3 h	ATGCCAAACTGGGGCGGAGG	TCATTCTTTCTTTTCCACTTGTTGTGTAAGG
Csrp3 M	ATGCCAAACTGGGGTGGAGG	TCACTCCTTCTTTTCCACTTGCTGTGTAAG
Csrp3 R	ATGCCGAACTGGGGCGGAGG	TCACTCCTTCTTTTCCACTTGCTGTGTAAG
Ctgf	GAGGAAAACATTAAGAAGGGC	AGAAAAGCTCAAACCTTGACAG
Ctgf	GAGGAAAACATTAAGAAGGGC	AGAAAAGCTCAAACCTTGACAG
Cyc1	CAGAAGTCTTGAGTATGATG	ATCAACAACATCTTGAGACC
Dcn	CTAAACTGGGATTGAGCTTC	ACGACCTGGATATACTTATGC
Ecm1	TCCTTAGCAAGCATAAACAG	TGCTTATCTTCAGGAGACAG
Eef2	AGAACATATTATTGCTGGCG	CAACAGGGTCAGATTTCTTG
Efemp1	GATATGAACTAAGCAGTGACAG	CATCTTCTCGGCATTTCATTG
Emcn	AATATGCTGGAAGAGAGACC	ATGTCAGTTCTTGTTTTCC
Emilin2	CAAGATAGTGACACAGTTGG	CTGTATCTGTGGGCTTTCTTC
Entpd2	GAACCTTCATCAAGTATGGCTG	CGCAAATGGACCTCATTATC
Fam122b	GACATTTTTCAAGGAGGAGC	CATCTCCATTTCCCTTTTC
Fbln2	AGTGACATCTGTAGGATAGC	CATTGCTTGAGAGTGAGAC
Fbn1	GTGAAGATATTGACGAGTGC	GACATTTGCAGAAGTAGCTG
Fgf1	CTAGGAACTACAAAAAGCCC	CGTACCCTTTATATACACTTCG
Fn1	CCTATAGGATTGGAGACACG	GTTGGTAAATAGCTGTTCCG
Fn1	CGAACAGCTATTTACCAACC	TTGAATTGCCACCATAAGTC
GAPDH	CGACTTCAACAGCAACTC	GTAGCCGTATTTCATTGTCAT
Gata4	CTGAATAAATCTAAGACGCCAG	GACACAGTACTGAATGTCTG
Gsto1	GGGCATGGATAATTACAAGAG	TCAATTTTGAGAGGATGC
Hprt1	AGATATAATTGACACTGGTA	CAAATCCAACAAAGTCTG
Il1rl1	AAACAACCAATTGATCACCG	CTATATTCTCTCCAGAACAGAGC
Itga6	GGTCACTATTTTCAGATCCC	AAACAGGCTTTAACCTTGAG
Lad1	CAACTCAGAAACACCCCTTAAC	TGGTATCTCTCCGTTTCTC
Lama2	CCCTGCAACAAATAAATCAC	CATCATAATAGCATTCCCTCAGC
Lama5	TTGAACTTCTCCTACTCACC	GATGCTGTAATAATACCTGCG
Loxl1	CAAGTACATTGTTCTGGAGTC	CTTTTCAAGGAGAGACAAGG
Ltbp4	CCCATTCTTCGAAATATCACC	GAAAACCCTCTGAACCATAAG
Lum	TCAAGAGAGTAAGGTCACAG	TGAAGAGAGGGATGTCATAATC
Matn2	CTCTTGAAGATGGAGAAGATG	TTATTCTCACAGGAACTCTCC
Mesp1	GTACACGCTCTAAAGATGAAG	TTTTGACACTAGCACAATCG
Mfap5	GATCCCTCTACAGACGATAC	GTACAAGCAAACCTTCTTCATCC
Mgp	TCCTATGAAATCAGTCCCTTC	CCTCTCTGTTGATCTCGTAG
MHC_alpha	GCTGATACCGGTGACAGTGGA	CCCGGTGGAGAGCAGACA
MHC_beta	GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC	TGCAAAGGCTCGGTCTGAGGGC
Mlc1	TAATTTCAACCTCATCCTGC	CTACCACAGAGTAGGACTTTAG
Mmp14	CTTCTTCAAAGGAGATAAGCAC	CCCTGAATTCTTCATTGAACC
Mmrn2	GAGAAATTCCTGGTCCATTC	ACTCGATACATGACTCTGAC

qPCR-Analysen		
Bezeichnung	Sequenz 5'→3' (Forward)	Sequenz 5'→3' (Revers)
Mybpc3	TTGACAGCTGTAACCTTCAAC	GGAAACTGTCTCTCTTCTTC
Nav2	CAGTAAAGAACATCGCAGAC	CTAATGTGCTGTGTGTAACC
Neb	GTTGCCTTGAGTTTGTAG	TGTCTCCTCTGTTGTAGTA
Neb	CAGAGTGACAATGTCTACAAAG	GTAAGTTGGGATAGTTGGC
Neb	GTTGCCTTGAGTTTGTAG	TGTCTCCTCTGTGTAGTA
Nepn	CAGTTGTGATTCTGATGCAGTC	GAAGTTAGATAGCTGAAGGTG
Nid1	GGCAGACTTGCTATGATATTG	GTTTCACAGTAGTTGATGGG
Olfml2b	TTCGGAATGTGATAGGAAGG	CAGTGTGTTGCCATAGTAATAG
Pcsk6	CTCTAGAAGCAAACAACCAG	CAAATCCATAGAGATGGCTAAC
Pln	CTTCATACAGCTTCATGCTC	CTTCTTTTAGGAGACCTGTTAG
Pln	CTTCATACAGCTTCATGCTC	CTTCTTTTAGGAGACCTGTTAC
Postn	CCATTAACGGAATCAAGATGG	AACTTGTTTGGCAGAATCAG
Prelp	CCTCAACAACAATAGCATAGAG	TCAGAAAATTTTCATCAGC
Pxdn	GAAGAGCTGAACTGTGAAAG	GCTCAACTCGTTATTGTTTC
Rpl10a	ACCCTCAGAAGGACAAAC	CTTCTTAGCCAGCTTCTTG
Ryr2	ACAGACAATTCCTTCCTCTAC	ATTATGGGTAAGTGAAGACAG
Scn1b	GGAATTTGTCAAGATCCTACG	TTATCAAAGAAGAGGAGACGG
Scn5a	TGATGGTCCTTACTGTCTTC	CATTCTTGAGTAGGTAATTGGC
Sdc2	CAATAGTCCATTGAGGAAG	TCTCTATGTCTTCATCAGCTC
Sdc4	CAACAAAGTATCCATGTCCAG	TTTGTAGATGGGTTTCTTGC
Serpine1	CATGCCTGACATGTTTAGTG	GTCTATAACCATCTCCGTGG
Smoc2	GAAGAAGATATTGCCTCACG	CACTACATTGTCATTCTTGGG
Sparc	CGAGACTTTGAGAAGAACTAC	GGACAGGTACCCATCAATAG
Sparcl1	CCTATTACCTCAAATATGGCG	GTCCCCTTTTACATTGGAAG
Tgfb1	GGATACCAACTATTGCTTCAG	TGTCCAGGCTCCAAATATAG
Tgfb1	TTCTGTGTTCAAAGATGGTG	CAGAGTACAGATACTTGGAGG
Tgfb1	GGATACCAACTATTGCTTCAG	TGTCCAGGCTCCAAATATAG
Timp2	GGATTACAGTATGAGATCAAGC	GCCTTTCCZGCAATTAGATAC
Timp3	GCTAGAAGTCAACAAATACCAG	TAGTAGCAGGACTTGATCTTG
Tinagl1	ATGAGATTTATACGGTGCTG	TCCCAAAGAATGGATAGAGAC
Tnn	CCCTCACAGAAATTGACA	GTAGCTTACCACATACCT
Tnn	GACATAGACAAGTATGTGGTG	GACTGTCAATTTCTGTGAGG
Tnn	CCCTCACAGAAATTGACA	GTAGCTTACCACATACCT
TNN	GCTTTGAAGAGCTTCAGGACCTATGC	TGCAATCTCAGTGATGTTCTTGGTGAC
Tpm4	GGAAGAAGAGCTCAAGAATG	GTTTTTCTTCCAGGTCATCG
Trf	TGAAAAGATTGTGAACGGAG	CACGGCATAATACCCTTTAG
Uqcrq	TCTACCTGATCTACACATGG	TCATTTTCATACATGGCTGG
Vegfa	TAGAGTACATCTTCAAGCCG	TCTTTCTTTGGTCTGCATTC
Vim	GAACCTGAGAGAACTAACC	GATGCTGAGAAGTCTCATTG

qPCR-Analysen		
Bezeichnung	Sequenz 5'→3' (Forward)	Sequenz 5'→3' (Revers)
Vtn	TACTTGTTCAAGGGTAGTCAG	ATCAACATTGTCTGGTATGC
Vwa1	GATGATCTTCCTATCATTGCC	CAATTCCAGCACGTAGTAAC
Vwf	CCTGTCTATCAATGAAGTGTG	TTCTGCAGATACAAGTGTG
Vwf	GACTGCAACACTTGTATCTG	CTATGACAATGGAGAAAGTGTG
PCR - HA-MLP-Fusionsprotein		
Bezeichnung	Sequenz 5'→3' (Forward)	Sequenz 5'→3' (Revers)
MLP	ATGCCAAACTGGGGCGGAGG	TCATTCTTTCTTTTCCACTTGTGTGTAAGG
MLP Pnested	GAGTCCACACAGGCAGACTTGAC	GGGAAAGGTATCGATCTGTGCAGG
Csrp3 <i>HindIII</i>	AGAGAGAAGCTTCCAAACTGGGGCGGAGGC	
Csrp3 <i>EcoRI</i>		AGAGAGGAATTCTCATTCTTTCTTTTCCACTTGTGTGTA
Csrp3 <i>KpnI</i>	AGAGAGGGTACCGCCACCATGCCAACTGGG GCGGAGG	
Csrp3 <i>XhoI</i>		AGAGAGCTCGAGTTCTTTCTTTTCCACTTGTGTGTGTAAGG
<i>KpnI</i> ATG HA	agagagGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAG ATT	
<i>XbaI</i> HA		agagagTCTAGATACCCATACGATGTTCCAGATTACG
PCR - MLP-tagRFPT Fusionsprotein		
Bezeichnung	Sequenz 5'→3' (Forward)	Sequenz 5'→3' (Revers)
<i>KpnI</i> ATG tag	agagagGGTACCATGGTGTCTAAGGGCGAAGAG	
<i>XhoI</i> tag		agagagCTCGAGCTTGACAGCTCGTCCATGCC
<i>XbaI</i> Csrp3	agagagTCTAGACCAAACCTGGGGCGGAGG	
<i>NotI</i> STOP Csrp3		agagGCGGCCGCTCATTCTTTCTTTTCCACTTGTGTGT
<i>XbaI</i> tag	agagagTCTAGAGTGTCTAAGGGCGAAGAG CTG	
<i>NotI</i> STOP tag		agagagGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTTCCATGC
<i>KpnI</i> ATG Csrp3	agagagGGTACCATGCCAACTGGGGCGGA	
tagRFPT <i>HindIII</i>	AGAGAGAAGCTTGTGTCTAAGGGCGAAGAGCT GATTA	
tagRFPT <i>EcoRI</i>		AGAGAGGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCA

V.1.9. Plasmide

Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, welche sich autonom replizieren und in der Molekularbiologie zur Überexpression von cDNA-Kopien ausgewählter Gensequenzen eingesetzt werden.

V.1.9.1. Plasmide zur Genexpression in Säugetierzellen

Zur Expression von cDNA in Säugetierzellen wurden Plasmide verwendet, welche sowohl Säugetier-spezifische Promotoren (z.B. CMV-Promotor) als auch Startcodons enthalten. Um diese Plasmide zunächst in *E.coli*-Zellen zu amplifizieren weisen sie zusätzlich einen bakteriellen Replikationsursprung („origin of replication“) sowie mit ein Antibiotika-Resistenzgen zur Selektion auf. Über eine Multiple Klonierungsstelle (MCS) hinter dem Säugetier-spezifischen Promotor können gewünschte DNA-Sequenzen (z.B. PCR-Amplifikate) einkloniert werden.

V.1.10. Bakterienstämme

Zur Klonierung wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (F⁻ ϕ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZ*YA-*argF*)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(rk⁻ mk⁺) *phoA*, *supE44* λ ⁻ *thi-1* *gyrA96* *relA1*) verwendet. Die Zellen wurden der Stammsammlung des Institutes für Molekulare Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen.

V.1.11. Zelllinien

Zur Durchführung von Experimenten auf zellulärer Ebene wurde die etablierte, humane Zelllinie HEK293 ("Human Embryonic Kidney"-Zellen) verwendet. Bei diesen immortalisierten, adhären Zellen handelt es sich um menschliche, embryonale Nierenzellen. HEK293-Zellen wurden in DMEM + GlutaMAXTM-I kultiviert. Dem Medium wurde zusätzlich 5 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin zugefügt. Die Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

V.1.12. Transgene Mäuse

V.1.12.1. Herzspezifisch induzierte $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout-Mäuse

Die herzspezifischen, induzierbaren $Cre^{tg/0}$ -Mäuse und die $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -transgenen Mäuse wurden von Prof. Dr. Stefan Offermanns (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Transgenen $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Mäuse wurden wie in der Veröffentlichung von Pahlavan et al. 2012 beschrieben erzeugt. Es handelt sich dabei um eine neu generierte Mauslinie, in der Cre von einer mutierten Östrogenrezeptorbindungsdomäne (Cre-ER) flankiert und durch den α -MCH- (α -myosin heavy chain) Promotor kontrolliert wird.

$G_{\alpha q}$ -Knockout wurde durch 5-tägige konsekutive Tamoxifen-Injektion (50 mg/kg Körpergewicht, ip) induziert, welches nach 21 Tagen erreicht ist.

V.1.12.2. MLP-Knockout-Mäuse

Die MLP-defizienten Mäuse wurden von Frau Dr. Katja Gehmlich (University of Oxford, Functional Genetics Facility, The Wellcome Trust Centre of Human Genetics) zur Verfügung gestellt. Die transgenen Tiere wurden wie in Arber et al. 1997 beschrieben generiert.

V.2. Methoden

V.2.1. Biochemische Analysemethoden

V.2.1.1. Proteinextraktion

Um Proteinextrakte zu gewinnen wurde Herzmuskelgewebe zerkleinert, mit Hilfe eines Mörsers pulverisiert und anschließend mit 200 µl Extraktions-Puffer behandelt. Zuvor vereinzelte Zelllinien und Kardiomyozyten (siehe Abschnitt V.1.11 und V.1.12) wurden direkt mit Extraktions-Puffer versetzt. Dieser dient zum aktiven Aufbrechen von Zellen, um so Proteine und DNA aus den Zellinneren freizusetzen. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte eine 30 min Zentrifugation, (14.000 rpm bei 4 °C). Der dadurch gewonnene Überstand wurde als löslicher Protein-Rohextrakt verwendet und in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Bradford-Methode (siehe Abschnitt V.2.1.2.).

V.2.1.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford diente zur Messung von Proteinmengen in Proteinextrakten. Dazu wurde 1000 µl Bradford-Reagens (BioRad Protein Assay) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 1 µl der zu messenden Proteinprobe vermischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte der Lösung mittels Photometer bei 595 nm. Durch den Vergleich mit einer Kalibrierkurve, die mit einer Messreihe einer definierten Verdünnungen einer BSA-Lösung bekannter Konzentration erstellt wurde, konnte die Konzentration der gemessenen Werte ermittelt werden.

V.2.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Größe von Proteinen wurde eine modifizierte Methode nach Lämmli (Laemmli 1970) angewandt. Hierbei werden die Proteine im elektrischen Gleichspannungsfeld in einem diskontinuierlichen Gel (bestehend aus Trenn- und Sammelgel) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Möglich ist dies durch die Wechselwirkung zwischen der hydrophoben Alkylkette des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und den hydrophoben Aminosäureresten eines Proteins.

Die resultierenden SDS-Protein-Komplexe weisen ein gleiches Ladung-zu-Masse-Verhältnis auf. Das im Lämmli-Puffer enthaltene Detergenz und β -Mercaptoethanol sowie die hohen Temperaturen beim Erhitzen der Lämmli-Proben bewirken zusätzlich eine Denaturierung der Proteine. Somit werden Proteine nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Laufstrecke, welche ein Protein dabei im Gel zurücklegt, gibt Aufschluss über seine molekulare Masse. Für den Großteil aller Proteine gilt der empirisch ermittelte lineare Zusammenhang, dass die Migrationsstrecke proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts ist. Je weiter ein Protein in einem bestimmten Zeitintervall im Gel wandert, desto kleiner sein Molekulargewicht (Andrews 1986). Die zur Proteinauftrennung verwendeten SDS-Gele bestehen aus einem unterem, engmaschigen Trenngel, welches von einem weniger vernetzten Sammelgel überschichtet wurde. Die verwendeten Gele besitzen eine Größe von 15 cm x 11 cm x 0,1 cm. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1 x Lämmli-Probenpuffer versetzt und es wurden in der Regel 20 μ g Protein pro Gelspur verwendet. Nach Erhitzen für 10 min bei 70 °C wurden die Proben für 15 s bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und in die dafür vorgesehenen Aussparungen des Sammelgels pipettiert. Die SDS-Gele wurden in einer Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V für 1 h. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Marker-Proteinmarker VI (10-245) PageRuler Prestained von Thermo Fisher verwendet.

V.2.1.4. Elektrotransfer von Protein auf PVDF-Membran (Western-Blot)

Mit Hilfe der Western-Blot-Methode können Proteine im Anschluss an eine SDS-PAGE (V.2.1.3) für weitere Analysen, z.B. eine immunologische Detektion (V.2.1.5) zugänglich gemacht werden. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden hierzu auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) transferiert. Hierbei verläuft der Stromfluss senkrecht zum Polyacrylamidgel, wodurch die Proteine direkt auf die PVDF-Membran transferiert und über hydrophobe Assoziationen und polare Wechselwirkungen immobilisiert werden. Dadurch bleibt die Verteilung der im Gel aufgetrennten Proteine stabil erhalten (Renart et al. 1979; Southern 1975). Bei dem verwendeten Mini-Protean Tetra System (Biorad, München) handelt es sich um einen sogenannten Nass-Blot, welcher wie ein Sandwich zusammengesetzt wird. Das Zusammenbauen des Systems setzte sich aus folgenden Schritten zusammen.

Zuerst wurde die PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Polyacrylamidgel aufgelegt, und dann zwischen zwei puffergetränkte Filterpapiere gepackt, welche wiederum von zwei Schwämmen umschlossen wurden. Diese Konstruktion wurde im Anschluss in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Apparatur überführt, so dass das Gel zur Kathode (-) und die PVDF-Membran zur Anode (+) orientiert war. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V für 1 h oder über Nacht mit einer konstanten Stromstärke von 0,12 V.

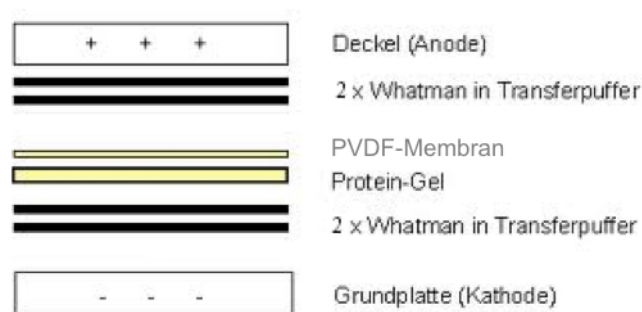


Abb. 12: Zusammenbau und Anordnung der einzelnen Bauteile einer Blot-Kammer

V.2.1.5. Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die immunologische Proteindetektion beruht auf der Verwendung spezifischer Antikörper gegen ausgewählte Proteine (siehe Tabelle 2). Diese Primärantikörper binden spezifisch an ihr Antigen auf der Membran. Hierdurch ist es möglich Proteine quantitativ zu charakterisieren. Nach dem Western-Blot (siehe Abschnitt V.2.1.4) erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran in einer Blockierlösung für ca. 15 min, wodurch unspezifische Bindungsstellen gesättigt wurden. Danach wurde der primäre Antikörper (in Blockierlösung) hinzugegeben und der Ansatz entweder für 90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Waschen der Membran erfolgte durch kurzes Abspülen mit Waschpuffer und anschließend einem zweimaligen Waschen für 5 min mit Waschpuffer bei RT. Die Detektion erfolgte durch Verwendung eines Sekundärantikörpers, ebenfalls verdünnt in Blockierlösung. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit 1 ml einer 1:1 Mischung von "luminol/enhancer" und "stable peroxide buffer" des ECL-Detektionskits überschichtet und 1 min, abgedunkelt, bei RT inkubiert. Die durch die enzymatisch katalysierte Chemilumineszenz (durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase) wurde mit Hilfe der FujiFilm Intelligent Darkbox mit der LAS1000 Kamera detektiert.

V.2.1.6. Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Co-Immunpräzipitation (Co-IP) ist eine Technik, um physiologisch relevante Protein-Protein-Wechselwirkungen zu identifizieren. Mit Hilfe von zielproteinspezifischen Antikörpern können Proteine indirekt erfasst werden, welche an ein spezifisches Zielprotein gebunden sind. Diese Proteinkomplexe können dann analysiert werden, um neue Bindungspartner, Bindungsaffinitäten, die Kinetik der Bindung und die Funktion des Zielproteins zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich die Dynabeads® M-280 (Sheep anti-Rabbit IgG, Thermofisher) verwendet. Diese bestehen aus 2,8 µm großen supermagnetischen Kügelchen (Beads) mit affinitätsgereinigten polyklonalen Anti-Kaninchen-IgG, welche kovalent an die Bead-Oberfläche gebunden sind. Mit Hilfe dieser Beads ist eine einfache und effiziente Bindung von Kaninchen-IgG-Subklassen an das Zielprotein (HA) möglich (siehe Abb. 13).

Zu Beginn wurden die Beads zweimal mit dem Co-IP-Puffer gewaschen. Jeweils 50 µl Beads wurden mit der gleichen Menge Waschpuffer durch vorsichtiges pipettieren gewaschen und der Überstand mit Hilfe des Magnetständers abgenommen. Es folgte ein sogenanntes „PreClearing“, indem die vorher gewaschenen Beads in das Proteinextrakt überführt und 2-3 h, bei 4 °C unter ständigem rotieren inkubiert wurden. Dieses „Preclearing“ dient dazu im Vorfeld unspezifische Bindungen zu minimieren. Im Anschluss wurde das nun vorgereinigte Proteinextrakt in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit dem Zieltarget Antikörper (2 µg Antikörper pro Probe) und 50 µl frischen, gewaschenen Beads versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 4 °C auf dem Rotor wurde der Überstand verworfen und die Beads 5 mal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden diese in Ladepuffer aufgenommen, bei 70 °C für 10 min erhitzt und auf dem Vortex-Mixer gut durchmischt, um so die gebundenen Proteinkomplexe vollständig von den Beads zu lösen. Danach waren die Proben bereit für eine SDS-Page mit anschließender Western-Blot-Analyse und Immundetektion, um das Targetprotein sowie dessen Bindungspartner zu detektieren (siehe Abschnitt V.2.1.3. – V.2.1.5.).

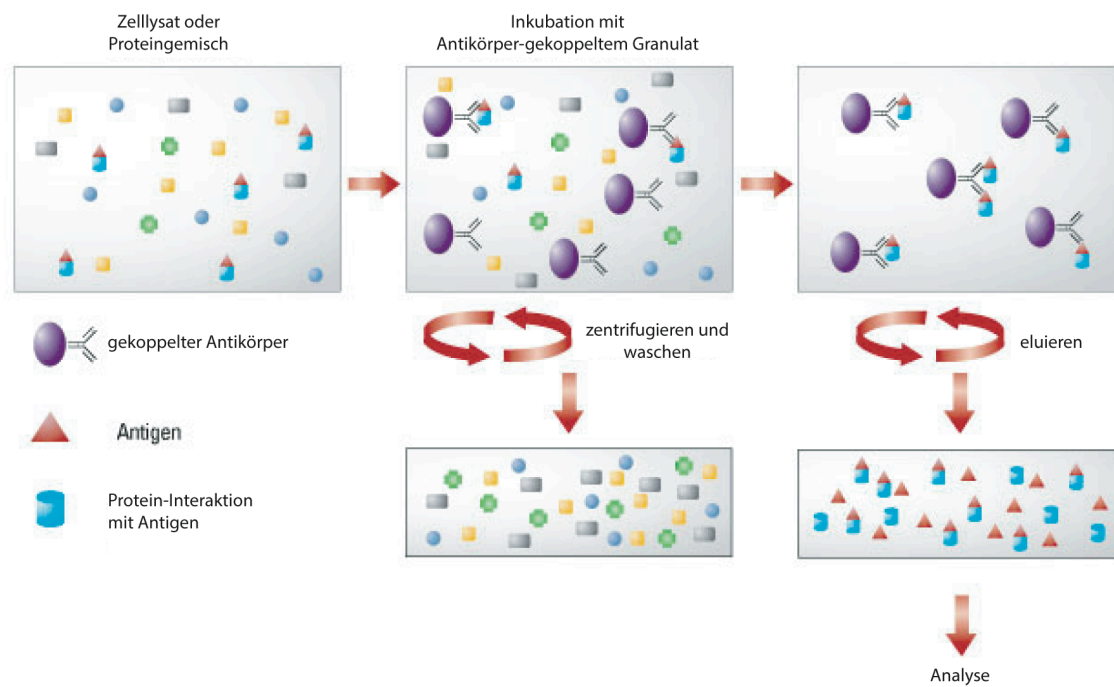


Abb. 13: Prinzip der Co-IP (<https://www.thermofisher.com>)

V.2.2. Molekularbiologische Analysemethoden

V.2.2.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation von Herzmuskel-Zellen erfolgte nach der Zellisolation. Für die Isolation wurde der ISOLATE II RNA Micro Kit (Bioline) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Nach Elution konnte die RNA-Konzentration mit Hilfe des LambdaBio+ Spektrometer, bei 280 nm gemessen und die Probe bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert werden.

V.2.2.2. cDNA-Synthese

Das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgte mit dem SensiFast cDNA Synthesis Kit (Bioline, Deutschland), einem Gemisch aus Oligo-dT Primern und Random Hexamer-Primern. Die Synthese nutzt den Poly-A-Schwanz der mRNA, um diese mit Hilfe der Oligo-dT Primer durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Um exakt gleiche Bedingungen und damit gleiche Effizienz der Reaktionen zu gewährleisten, wurden alle Proben zusammen verarbeitet. Für Proben, die später direkt verglichen werden sollten (dKO versus WT und Kontrolle versus erkrankt), war es wichtig zudem jeweils gleiche Mengen an RNA in die cDNA Synthese einzusetzen.

V.2.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur Amplifikation von Nukleinsäuren mittels einer DNA-Polymerase.. In einer Reihe von Zyklen aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation wird eine ausgewählte DNA-Sequenz gezielt vervielfältigt. Zunächst wird in einem Denaturierungsschritt die doppelsträngige DNA bei 95 °C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Danach erfolgt die Anlagerung spezifischer Primer an die DNA-Einzelstränge bei ca. 65.°C (Annealing). Die DNA-Polymerase verlängert im dritten Schritt (Elongation) bei einer optimalen Katalysetemperatur von 72 °C den Primer komplementär zum Matrizenstrang in 5'→3'-Richtung. Diese Schritte werden ca. 30 mal durchlaufen, wobei die Kopienzahl unter optimalen Bedingungen exponentiell steigt. Die PCR-Reaktion kann anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt V.2.2.4) analysiert werden. Das gewünschte DNA-Fragment kann für nachfolgende Versuche durch Ausschneiden aus dem Agarosegel gewonnen werden.

Beispiel für ein PCR-Programm:

Schritte	Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
Erste Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	30 sec	30
Annealing	65	30 sec	
Extension	72	1 min	
Finale Extension	72	10 min	1
Hold	4		

V.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle nach ihrer Größe im Bereich von 0,25 bis 25 kb in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Ladung und wandern somit zur Anode. Da jedes Nukleotid jeweils eine Phosphatgruppe enthält ist das Verhältnis zwischen Größe und Ladung der Moleküle direkt proportional, d.h. je kleiner das DNA-Molekül ist, desto schneller wandert es durch das Gel.

In dieser Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach RT-PCR oder Restriktionsspaltung bzw. zur DNA-Isolation sowie zur Qualitätskontrolle von DNA verwendet. Die Auftrennung erfolgte in horizontalen 0,5 bis 2,5 %igen (w/v) Agarose-Gelen. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst, mit Ethidiumbromid (10 µl/400 ml) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Loading-Dye-Solution (10 x) versetzt. Das Auftragsvolumen betrug 12 µl pro Probetasche. Als Größenstandard dienten 5 µl des GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Deutschland). Die Elektrophorese wurde bei 260 V durchgeführt bis der Farbmarker die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hatte. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht.

V.2.2.5. Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Nach einer Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente, welche für weitere Klonierungsschritte verwendet werden sollten, mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel isoliert. Im ersten Schritt wurde die Agarose in einem speziellen Puffer bei 50 °C aufgelöst und die Lösung anschließend auf eine Säule gegeben. Die DNA wurde dabei an die Säulenmatrix gebunden. Im Anschluss folgten zwei Waschschriffe sowie die Elution der DNA von der Säule. Die DNA wurde in 30 µl Wasser aufgenommen.

V.2.2.6. Restriktion von Plasmid-DNA

Mit Hilfe der Restriktionsanalyse können durch die spezifische Position von Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme zu untersuchte DNA-Moleküle charakterisiert werden. Jedes Restriktionsenzym besitzt eine spezifische DNA-Erkennungssequenz zur Spaltung der doppelsträngigen DNA. Die Spezifität eines Restriktionsenzyms bei einem Verdau ist abhängig vom verwendeten Puffer. Die nach dem Restriktionsverdau (bei 37 °C, 2 h) entstandenen Fragmente haben eine definierte Größe und können durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden.

Tabelle 4: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsendonuklease	Hersteller	Schnittstelle
<i>HindIII</i>	Fermentas	A↓AGCTT
<i>EcoRI</i>	Fermentas	GAT↓ATC
<i>KpnI</i>	Fermentas	GGTAC↓C
<i>XhoI</i>	Fermentas	C↓TCGAG
<i>XbaI</i>	Fermentas	T↓CTAGA
<i>NotI</i>	Fermentas	GC↓GGCCGC

V.2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Als Ligation wird die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mittels einer Ligase bezeichnet. Hierbei wird durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen linearisierte Vektor-DNA mit einem DNA-Fragment verknüpft, die über eine PCR hergestellt wurden oder die durch Restriktionsspaltung und anschließender Gelextraktion isoliert worden sind. Bei der PCR wurde die *Phusion*-Polymerase mit dem HF-Puffer (ThermoFisher) benutzt. Für die anschließende Ligation wurde der „CloneJET“-PCR Cloning-Kit (ThermoFisher) verwendet. Vektor und Insert wurden im Verhältnis von 1:10 eingesetzt. Pro Ansatz (20 µl) wurde mit 1 µl T4-DNA Ligase (4 U) versetzt und bei 22 °C 5 min inkubiert. Zudem erfolgte eine Ligation auch in den pacAD5 Vektor. Hierzu wurde das entsprechende PCR-Produkt sowie der Vektor mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Der komplette Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

V.2.2.8. Transformation von Bakterien

Unter Transformation versteht man einen Mechanismus des Gentransfers bzw. die genetische Veränderung von Bakterien. Gram-negative Bakterien wie *E.coli* können auf natürliche Weise keine DNA aufnehmen und müssen zuvor für die Transformation kompetent gemacht werden, entsprechend einer abgewandelten Prozedur nach Hanahan und Meselson (Hanahan & Meselson 1983). Im Anschluss daran kann die DNA mittels Hitzeschock eingebracht werden. Für eine Transformation wurden zu 100 µl Suspension kompetenter DH5α-Zellen 20 µl Ligationsansatz (siehe Abschnitt V.2.2.7) pipettiert und der Ansatz 30 min auf Eis vorgekühlt. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 40 °C wurden die Zellen direkt wieder auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und die Zellen 1 h bei 37°C im Rotationsschüttler inkubiert. Hierbei konnte sich die auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz auszubilden. Danach wurden die Zellen 1 min zentrifugiert und 750 µl des Überstandes verworfen. Die übrigen Zellen wurden im restlichen Volumen des Mediums resuspendiert, auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten (siehe Abschnitt V.2.2.9) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

V.2.2.9. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen erfolgte bei 37 °C in LB-Medium im Rotationsschüttler bzw. auf LB-Agarplatten im Brutschrank. Zur Zellselektion nach Plasmidtransformation wurde den LB-Agarplatten bzw. dem Medium 1:1000 einer Ampicillin-Lösung (100 mg/ml) hinzugegeben.

V.2.2.10. Klon-PCR

Bei der Klon-PCR soll nachgewiesen werden, ob sich das gewünschte DNA-Fragment (Insert) mit dem Plasmid in einer Bakterien-Einzelkolonie befindet. Anstatt isolierter DNA wurde als Ausgangspunkt für die Amplifikation die Bakterienkultur selbst verwendet, dies ist eine zeitsparende und effektive Methode um Klone zu identifizieren. Die nach erfolgreicher Transformation gewachsenen Kolonien werden mit einem Zahnstocher gepickt und zur weitem Anzucht auf eine frische Platte gebracht. Der Zahnstocher wurde anschließend in ein PCR-Mix getaucht. Dabei gelangen genügend Bakterien mit Plasmid-DNA für einen Nachweis in die PCR-Reaktion.

V.2.2.11. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte ausgehend von einer einzelnen Bakterienkolonie, welche in Flüssigkultur mit dem geeigneten Antibiotikum kultiviert wurde. Je nach Bedarf wurde entweder das QIAprep®Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) mit 2 bis 5 ml Bakterienkultur oder das QIAGEN®Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) mit 100 bis 600 ml Bakterienkultur nach Herstellerprotokoll verwendet. Im Anschluss wurde die Konzentration der in Wasser gelösten Plasmid-DNA photometrisch bestimmt.

V.2.2.12. Bestimmung der Reinheit und Konzentration isolierter DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Proben erfolgte eine photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm. Hierbei entspricht eine optische Dichte bei 260 nm ($OD_{260\text{ nm}}$) von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/µl und einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl. Die Reinheit der Probe ergibt sich aus dem Verhältnis $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$. Das optimale Absorptionsverhältnis für eine proteinfreie Nukleinsäure-Probe liegt zwischen 1,8 und 2,0. Die Messungen erfolgten mit der Hellma Tray Cell Küvette, für die nur 3 µl Probe verwendet werden müssen.

V.2.2.13. Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse und zur Kontrolle von Klonierungsschritten wurden Sequenzierungen durchgeführt. Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1992) durchgeführt. Dazu wurde isolierte Plasmid-DNA (siehe Abschnitt V.2.2.5) zusammen mit dem entsprechenden Primer in einer Konzentration von 80-100 ng/µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch die Firma GATC Biotech AG analysiert.

V.2.2.14. Quantitative real time PCR (qPCR)

Die quantitative real time PCR ist eine spezielle Methode der PCR bei der die Amplifikation der Nukleinsäuren in Echtzeit verfolgt werden kann. Die Quantifizierung kann am Ende oder während eines jeden PCR-Zyklus erfolgen. Diese basiert auf die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Das in dieser Arbeit verwendete qPCR-Protokoll basierte auf der DNA-Bindung des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green, welches sich durch eine hohe Sensitivität auszeichnet.

qPCR-Reaktion:

In die qPCR-Reaktion wurden jeweils 2,5 ng cDNA eingesetzt. Zu einem vorgelegten Mastermix von 15 µl pro Reaktion in eine 96-Well Mikrotiterplatte kamen jeweils 5 µl Probe (mit 2,5 ng cDNA) oder Wasser als Kontrolle. Die Messung der Proben erfolgte in Triplikaten. Zusätzlich diente (für jedes gemessene Primerpaar) eine Wasserkontrolle („no template control“) um abzuschätzen, ob es zwischen den Primern zu Dimer-Bildungen kommt. Da SYBR Green unspezifisch in jede doppelsträngige DNA interkaliert, kann es so zu einem Fluoreszenzsignal kommen. Zusätzlich wurde mit Hilfe einer RNA-Kontrolle die Reinheit der RNA kontrolliert. Ist die RNA-Probe mit genomischer DNA kontaminiert kommt es ebenfalls zu einem Fluoreszenzsignal. Nur Messungen, bei denen beide Kontrollen (Wasser und RNA) negativ waren, wurden ausgewertet.

Der ROX-Referenzfarbstoff diente als dritte Kontrolle und war bereits in dem Mastermix enthalten. Bei diesem Fluorophor handelt es sich um einen passiven Referenzfarbstoff, welcher eingesetzt wird, um die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs (SYBR Green) zu normalisieren. Dieser erlaubt Pipettierfehler und gleicht Veränderungen der Geräteparameter aus (<https://de.lumiprobe.com/p/rox-reference-dye>).

Tabelle 5: qPCR-Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen	Finale Konzentration
2x SensiFAST SYBR Lo-ROX Mix	10 µl	1x
10 µM Forward Primer	0,8 µl	400 nM
10 µM Reverse Primer	0,8 µl	400 nM
Template	5 µl	2,5 ng
Wasser	3,4 µl	-

Die PCR-Reaktionen wurden im MX3000P Cyclyer von Stratagene mit dem Programm “SYBR-Green mit Dissoziationskurve” durchgeführt. Anhand der Dissoziationskurve wurde nach jedem Lauf die Zuverlässigkeit des Fluoreszenzsignals beurteilt. Nur wenn dieses einen eindeutigen Peak abbildete galt die Messung als zuverlässig und wurde ausgewertet.

qPCR Programm:

Abb. 14 zeigt ein Temperaturprofil für das qPCR-Programm „SYBR Green PCR mit Dissoziationskurve“, welches für diese Arbeit verwendet wurde. Im ersten Abschnitt erfolgt die initiale Denaturierung der cDNA. Der zweite Abschnitt beinhaltet die komplette Polymerase-Kettenreaktion mit 40 Zyklen, wobei nach jedem Zyklus eine Fluoreszenzmessung erfolgt. Zuletzt (dritter Abschnitt) wird die Schmelzkurve von jeder Probe aufgezeichnet.

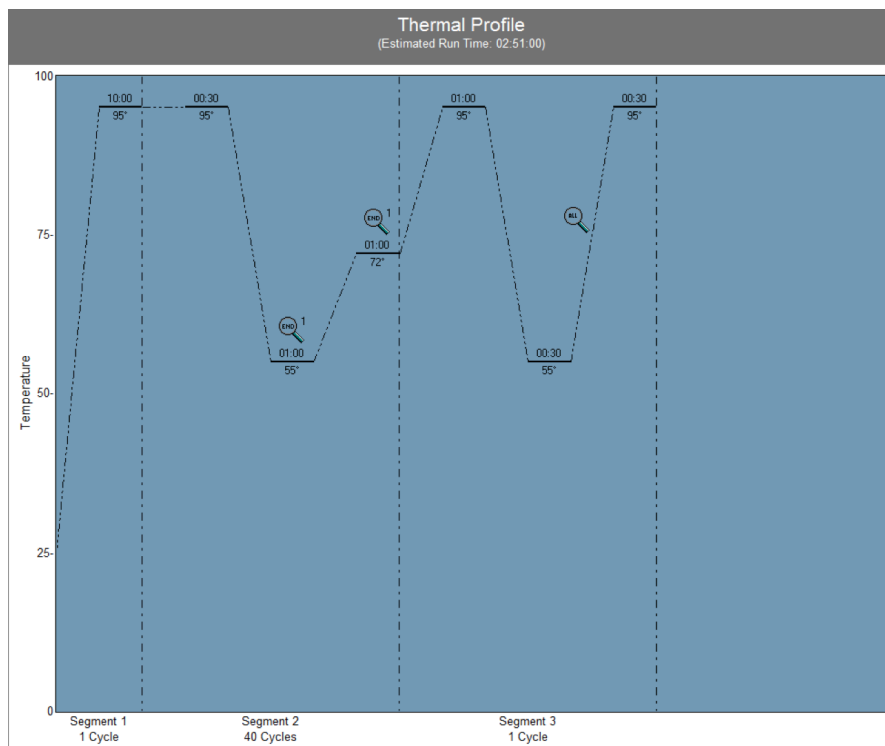


Abb. 14: Temperaturprofil der qPCR mit SYBR Green mit Dissoziationskurve. Die qPCR mit SYBR Green inklusiver Dissoziationskurven besteht aus 3 Segmenten: 1) initiale Denaturierung, 2) Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation 3) Erstellung der Schmelzkurve.

Die Schmelzkurvenanalyse wird nach jeder abgelaufener PCR durchgeführt und ist wichtig um die Spezifität der Amplifikate zu bestimmen. Dabei wird die DNA durch eine Temperaturerhöhung bis 95°C aufgeschmolzen. Bei einer für das spezifische Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur wird der DNA-Doppelstrang wieder aufgetrennt, der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme detektiert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten jedoch einen höheren Schmelzpunkt aufweisen als unspezifische Amplifikate kann so ein Unterschied detektiert werden.

Die Höhe des Schmelzkurven-Peaks gibt verglichen mit den mitgeführten Standards Auskunft über die Menge des gebildeten Fragmentes (<https://www.labor-gaertner.de>). Die Schmelzkurve (siehe Abb. 15) der PCR-Produkte kann unter „Analysis“ abgerufen werden. Diese sollte lediglich einen einzelnen scharfen Peak bei der Dissoziationstemperatur des spezifischen PCR-Produktes aufweisen. Sollten während der PCR-Reaktion Primer-Dimere oder unspezifische Produkte entstanden sein, die das Fluoreszenzsignal verfälschen, kann dies anhand der Dissoziationskurve ermittelt werden.

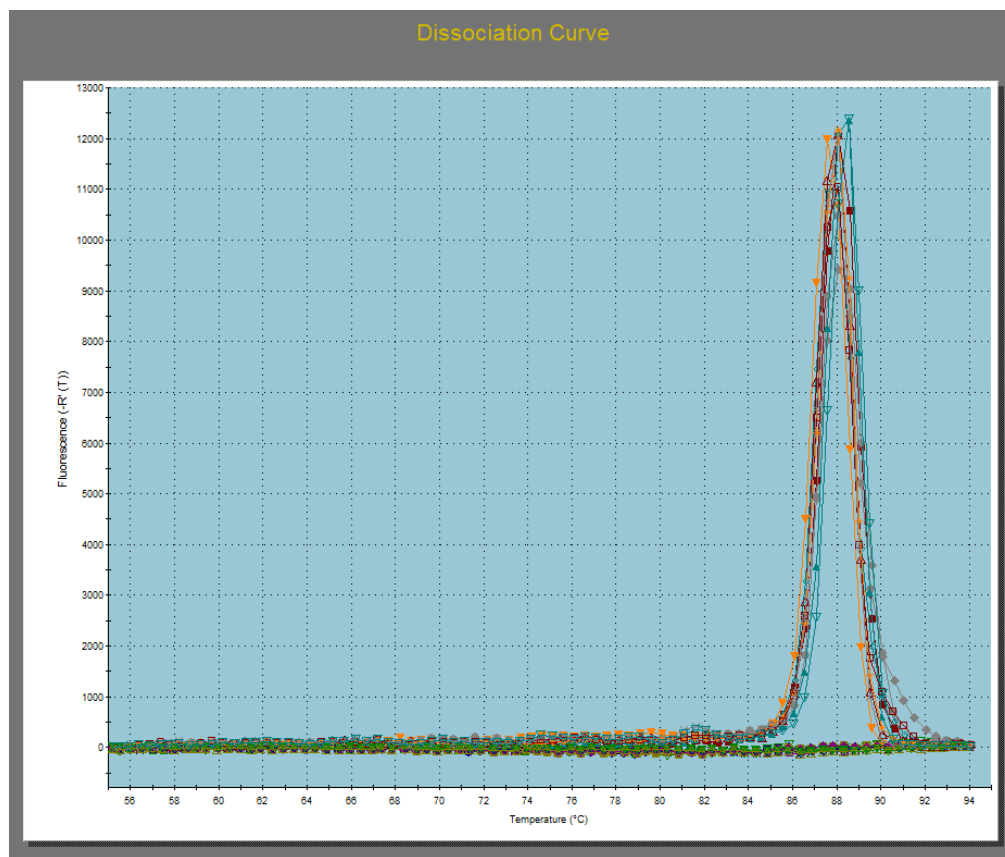


Abb. 15: Darstellung einer typischen Dissoziationskurve. Die Kurve zeigt deutlich, dass das Maximum (Schmelzpunkt des Amplifikats) bei 88 °C liegt. Die Graphik zeigt weiterhin, dass keine Verunreinigungen durch andere Produkte bei der PCR aufgetreten sind. Wären Verunreinigungen durch DNA oder Primer-Dimere vorhanden gewesen, wären neben dem erwarteten Amplifikat-Peak weitere Peaks an anderer Stelle aufgetreten.

qPCR-Auswertung:

Nach jedem PCR-Experiment wurden sowohl die Schmelzkurven als auch die Kurven des Referenzfarbstoffes ROX überprüft. Wiesen die Schmelzkurven, wie in Abb. 15 dargestellt, jeweils einen scharfen Peak auf und ließen die ROX-Daten keine Unregelmäßigkeiten erkennen, wurden die entsprechenden Ct/Cp ("cycle threshold") als Excel-Format exportiert (siehe Abb. 16).

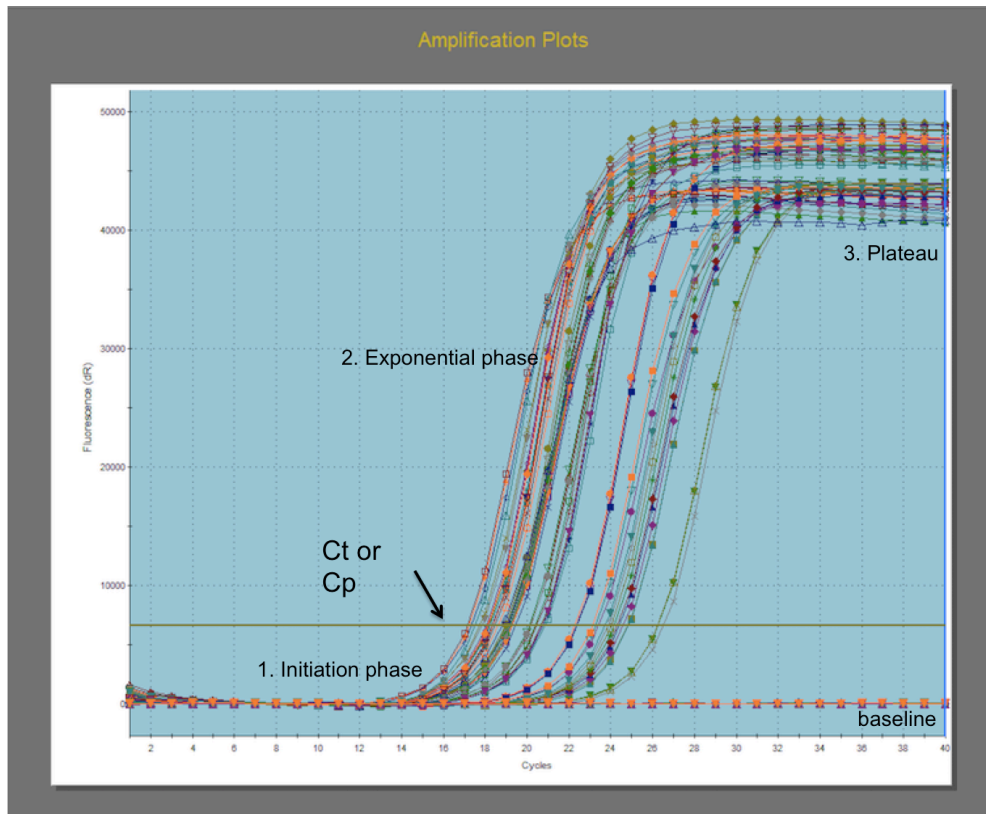


Abb. 16: Grafische Darstellung einer Real-Time PCR Kurve.

Der Ct-Wert bezeichnet hierbei den PCR-Zyklus (Cycle = C) bei dem die Fluoreszenz erstmals über den Schwellenwert („threshold“) tritt. Dies geschieht umso früher, je höher die Kopienzahl des untersuchten Gens ist (je niedriger der Ct-Wert ist, desto höher ist demnach die Kopienzahl). Dies impliziert eine logarithmische Zunahme der Anzahl der Kopien (Bsp.: Wenn im 9. PCR-Zyklus 128 DNA-Kopien gebildet worden sind dann sind es im 10. Zyklus bereits 256). Die so ermittelten Ct-Werte wurden anschließend auf die Ct-Werte von drei Housekeeping- (HK) Genen normiert. Diese wurden in vorherigen Versuchen auf ihre Tauglichkeit als solche überprüft.

Um eine genaue und zuverlässige Quantifizierung gewährleisten zu können wurden in dieser Arbeit drei HK-Gene für die Normierung der qPCR-Analyse verwendet und für die spätere Auswertung aus allen drei der arithmetischen Mittelwert berechnet.

Zur relativen Quantifizierung wurde die sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode gewählt (Pfaffl et al. 2004; Pfaffl 2001). Als unbehandelte Kontrollprobe diente die RNA aus den unbehandelten Proben bzw. der WT-Probe. Die relative Expression wurde jeweils für die behandelte bzw. die dKO-Probe und die Kontrollprobe nach folgenden Formeln bestimmt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct HK Mittelwert}$$

Anschließend wurde die Differenz dieser ΔCt -Werte gebildet:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandelt} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

Der relative Expressionsunterschied der behandelten Probe zur Kontrollprobe errechnet sich aus der Formel:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Um verlässliche Ergebnisse aus den qPCR-Daten zu erhalten wurden Qualitätskriterien definiert. Die Ct-Werte der Dreifachbestimmung dürfen sich nicht mehr als 0,75 Ct-Werte unterscheiden und sollten vor dem 35. PCR Zyklus erreicht werden (siehe Abb. 16).

V.2.3. Zellkulturtechniken

Unter geeigneten Bedingungen, mit speziellen Nährstoffen, sowie genau definierten Sauerstoff- und Stickstoff-Konzentrationen ist es möglich Zellen außerhalb des Organismus zu kultivieren. Prinzipiell unterscheidet man zwischen primären, unmittelbar aus einem Gewebe entnommen Zellen und kontinuierlichen (immortalisierten) Zelllinien. Primäre Zellen sind in der Regel nicht entartet, besitzen jedoch nur eine begrenzte Lebensdauer. Zelllinien hingegen können jedoch nahezu unendlich lang kultiviert werden, da sie sich meist durch wachstumsbegünstigende Mutationen aus einer kleinen Population der primären Zellen nach vielfacher Subkultivierung heraus entwickeln haben (Cieciura et al. 1956; Earle & Highhouse 1954; Puck & Fisher 1956).

V.2.3.1. Isolation von Maus-Kardiomyozyten

Die Isolation von Maus-Kardiomyozyten wurde gemäß einem im Labor von Prof. Dr. Peter Lipp etablierten Standardverfahren von Sabrina Hennig durchgeführt. Die Mäuse (31 Wochen alt) wurden durch Injektion einer Mischung von 85 mg/kg Ketamin Hydrochlorid und 15 mg/kg Xylazinhydrochlorid (ip) anästhesiert. Natriumcitrat-Dihydrat (10 ml/kg Körpergewicht) wurde verwendet, um Blutagglutination in den Herzgefäßen zu verhindern. Nach Erreichen tiefer Narkose wurde das Tier durch Dekapitation getötet. Die Brust wurde geöffnet und die Lungen entfernt. Das restliche Blut im Herzen wurde durch Spülen mit 2 ml eiskalter Lösung A in die Ventrikel herausgewaschen. Das Herz wurde großzügig entnommen und in eiskalter Lösung A aufbewahrt. Im Anschluss wurde Lunge und überschüssiges Gewebe vorsichtig entfernt und die Aorta frei präpariert, um diese aufzufädeln und mit einem Faden zu fixieren.

Das aufgefädelte Herz wurde nun an den Perfusionsapparat gehängt und mit Lösung A+ 6-8 min gespült und im Anschluss das Herz mit 1,25 mg Liberase unter O₂-Begasung "verdaut". Nach mehrmaligen Inkubationsschritten mit A++ Lösung wurde das Herzgewebe mit einer vorbereiteten Plastikpipette vorsichtig auf- und abpipettiert, so dass sich die Zellen herauslösten und sich das Gewebe auflöste. Die Ausbeute der Zellen wurde unter dem Mikroskop geprüft, auf zuvor geccoatete Platten überführt und mind. 30 min im Inkubator adhären gelassen (37 °C, 5 % CO₂). Zum Ernten der Zellen wurde die Lösung abgesaugt, die adhären Zellen mit kaltem PBS gespült und mit Hilfe eines Zellschabers geerntet.

Die Suspension wurde im Anschluss 10 min bei 4 °C und 2500 rpm zentrifugiert, das dabei entstandene Pellet mit PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und zuletzt das erneut entstandene Pellet bei -20 °C gelagert.

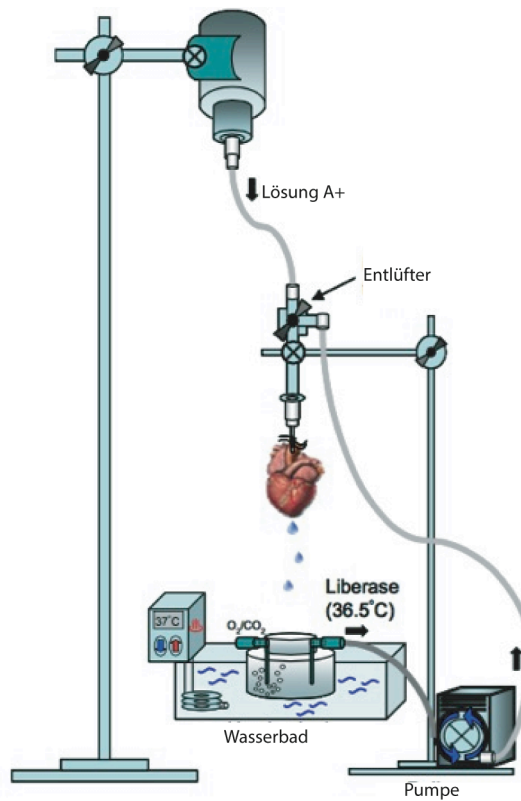


Abb. 17: Perfusionssystem zur Kardiomyozyten-Isolation (Modifiziert aus der Dissertation von Juan Eduardo Camacho Londoño)

V.2.3.2. Isolation von Ratten-Kardiomyozyten

Die Isolation von Ratten-Kardiomyozyten wurde gemäß dem in Abschnitt V.2.3.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

V.2.3.3. Kultivierung von humanen iPS Kardiomyozyten (CM)

Die Kultivierung von iPS Kardiomyozyten wurde gemäß einem im Labor von Prof. Dr. Peter Lipp etablierten Standardverfahren von Wenying Xian durchgeführt. Zur Kultivierung der Zellen wurde EB2 Medium verwendet. Diesem wurde 2 % FCS, GlutaMAXTM (L-Alanyl-L-Glutamin), MEM-NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) und 0,1 mM Beta-Me zugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte in 25 cm² Zellkulturflaschen.

V.2.3.4. Kultivierung von Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der adhärenenten Zelllinie HEK293 gearbeitet, welche der Stammsammlung des Institutes für Molekulare Zellbiologie (Universität des Saarlandes) entnommen wurden. Die Zellen wurden in DMEM („Dulbecco's Modified Eagle's Medium“) mit GlutaMAXTM (L-Alanyl-L-Glutamin), 5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte in 25 cm² Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden etwa alle zwei bis drei Tage subkultiviert. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA für ca. 1 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Zellkulturflasche mit 4 ml Medium aufgefüllt und 1/5 des Volumens der Zellsuspension in der Flasche belassen. Diese Suspension wurde anschließend erneut mit ca. 5 ml Medium befüllt und die Zellen weiter kultiviert.

V.2.3.5. Zellzählungsmethoden

Um sicherzustellen, dass die Anzahl der ausplattierten Zellen vor einer Transfektion (siehe Abschnitt V2.3.8. und V2.3.9.) im optimalen Verhältnis zum Volumen wie auch der Konzentration zugesetzter Lösungen vorlag war es erforderlich die Zellen zu quantifizieren. Nur so konnte zum einen eine maximale Effizienz garantiert werden und zum anderen eine gewisse Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Experimenten sichergestellt werden. Das Auszählen der Zellen erfolgte mit Hilfe der Neubauerzählkammer (Zellzahl pro Volumeneinheit).

Hierzu wurde ein kleiner Teil der Zellsuspension mit Trypanblaulösung verdünnt, was ein Blaufärben der toten Zellen bewirkt, da der Farbstoff die Plasmamembran nur bei fehlender zellulärer Integrität passieren kann. So konnte neben der eigentlichen Gesamtzellzahl der Anteil toter Zellen bestimmt werden.

Auf die staubfreie Neubauerzählkammer wurde ein Deckglas mit leichtem Druck im Querformat auf die beiden Auflagen aufgeschoben. Sind die sogenannten Newton'schen Ringe zu erkennen, sitzt das Deckglas richtig und der Abstand zwischen den Glasflächen ist korrekt. Im Anschluss wurden ca. 10 µl der Trypanblau-Zellsuspension am Rand des Deckglases in die Öffnung zwischen diesem und der Zählkammer pipettiert. Durch die Kapillarkraft saugt sich diese in den Zwischenraum und befindet sich in einer Schicht mit genau definierter Dicke. Nach anschließender mikroskopischer Auszählung der vier Zählfelder wurden die Werte gemittelt. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten wurde diese Zahl wiederum mit dem Faktor 10.000 multipliziert, da jedes der Zählfelder einem Flüssigkeitsvolumen von 0,1 µl entspricht.

V.2.3.6. Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz ist eine beliebte Methode, bei der bestimmte Proteine mit Antikörpern (Immunglobulin) markiert und mit einem Fluorophor sichtbar gemacht werden. Hierbei ist der Antikörper entweder direkt an ein Fluoreszenzmolekül gekoppelt (direkte Immunfluoreszenz) oder er wird über fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht (indirekte Immunfluoreszenz). Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Proteine sowie spezifische Strukturen in der Zelle bzw. im Gewebe genau lokalisieren.

Die zuvor auf Deckgläsern ausgesäten Kardiomyozyten oder iPS-CM wurden mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA 10 min bei Raumtemperatur fixiert. PFA bewirkt eine Quervernetzung der Proteine, wodurch die Zelle fixiert wird. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1,5 % Triton X-100, 10 min bei RT permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern wurden die Präparate mit 5 % (w/v) BSA in PBS für 20 min blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 bis 2 Stunden in einer feuchten Kammer. Diese bestand aus einer Petrischale mit feuchtem Filterpapier. Die Deckgläser wurden auf das Filterpapier gelegt und mit 50 µl Antikörperlösung überschichtet. Nach Inkubation bei RT wurden die Zellen dreimal mit PBST (0,1 %) für 10 min gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:400 in PBS) für eine Stunde ebenfalls in einer feuchten Kammer. Hier war es wichtig alle folgenden Schritte im Dunkeln durchzuführen, da dieser Antikörper das Fluorophor enthält und so ein Ausbleichen des Farbstoffs vermieden werden sollte. Zuletzt wurden die Zellen erneut dreimal mit PBST für 10 min gewaschen und kurz in AquaDest getaucht, um der Bildung von Salzkristallen vorzubeugen. Es folgte das Eindecken der Zellen mit 10 µl ProLongGold Antifade Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) auf den Objektträgern. Dadurch wurden die Zellen konserviert und das Antifade-Reagenz verhinderte ein schnelles Ausbleichen der Fluorophore. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 6: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
MLP	1:200	Abcam
α -Aktinin	1:200	Abcam
tagRFPT	1:200	Abcam
Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
antiMouse 649	1:500	ThermoFisher
antiRabbit 594	1:500	ThermoFisher

V.2.3.7. Gentransfer in Zellkultur

Gentransfer beschreibt das Übertragen von genetischer Information (DNA oder RNA) in Zellen. Es lassen sich zwei Ansätze des Gentransfers unterscheiden. Der direkte Transfer bei dem die genetische Information direkt in den Organismus gebracht wird, wohingegen beim indirekten Gentransfer zuerst Zellen modifiziert und dann in den Organismus transplantiert werden. Neben den viralen Techniken, z.B. Adenoviren, gibt es nichtvirale Techniken wie die Calciumphosphat-Präzipitation, Elektroporation, sowie die Lipofektion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Lipofektamin- und PEI-Transfektion durchgeführt. Mit diesen Methoden können Nukleinsäuren mittels Liposomen bzw. Polymeren in die Zelle eingeschleust werden. Die DNA bzw. RNA wird hierbei entweder in Vesikeln eingeschlossen oder an der Oberfläche kationischer Vesikel angelagert und anschließend in die Zielzelle abgegeben.

V.2.3.8. Plasmid-Transfektion

Plasmide sind extragenomische, zirkuläre DNA-Moleküle und dienen als Vektor zur Amplifikation und Expression von Genen. Um einen effizienten Transfer von Plasmiden in Kulturzellen zu gewährleisten wurde in dieser Arbeit das NanoJuice™ Transfektionskit (Novagen) verwendet. Durch Komplexierung der DNA mit Lipidmolekülen wird ein wirkungsvoller Eintritt ins Zellinnere und letztlich zum Nukleus, dem Ort der Transkription der genetischen Information, ermöglicht. Die Transfektion von Zelllinien hatte im Rahmen dieser Arbeit den Zweck die cDNA mit unterschiedlicher Länge des *CSRP3*-Gens überzuexprimieren, um so mögliche zelluläre Veränderungen analysieren zu können.

Zur Transfektion eines aus *E. coli* DH5α aufgereinigten Expressionsplasmids wurden HEK293-Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^4 Zellen/well eingestellt und in eine 12-well Zellkulturplatte ausgesät. Diese wurden anschließend vor der eigentlichen Transfektion für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am darauffolgenden Tag erfolgte das Ansetzen des Transfektionsansatzes in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß:

DMEM	50 µl
Transfektions-Reagenz	0,5 µl
Booster	2 µl
Plasmid DNA	0,8 µg
<hr/>	
Gesamt	53,3 µl

Der Ansatz wurde mittels Vortex-Mixer gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 0,8 µg Plasmid-Dann hinzugegeben. Zur Komplexbildung des gesamten Ansatzes mit Plasmid-DNA erfolgte eine Inkubation für 15 min bei RT. Danach wurde dieser tropfenweise auf die bereits am Vortag ausgesäten adhärenen HEK293-Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken der Kulturschale gleichmäßig im Medium verteilt. Die transfizierten Zellen wurden zur Expression des Plasmids 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Zellen wurden nach erfolgter Kultivierung für entsprechende Experimente eingesetzt und ein Teil der Probe wurde zur Expressionkontrolle mittels SDS-PAGE separiert (siehe Abschnitt V.2.1.3). Dieser wurde nach Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (siehe Abschnitt V.2.1.4) immunologisch analysiert (siehe Abschnitt V.2.1.5). Als Negativ-Kontrolle dienten untransfizierte Zellen.

V.2.3.9. PEI Transfektion

DNA kann ebenfalls durch Transfektion mit Polyethylenimin (PEI), einem stabilen kationischen Polymer, in eine Zelle eingebracht werden. Im Gegensatz zu Lipiden besitzen kationische Polymere keine hydrophoben Reste, sind also wasserlöslich. PEI kondensiert DNA zu positiv geladenen Partikeln, es bilden sich Polyplexe, die an anionische Zelloberflächen binden. Dadurch werden die PEI-DNA-Komplexe von den Zellen endozytiert und die DNA ins Zytoplasma abgegeben, wo sie letztlich in den Zellkern wandern kann (Wightman et al. 2001). Nach Aufreinigung der zu transfizierenden Plasmid-DNA erfolgte die eigentliche PEI-Transfektion. Hierzu wurden folgende Lösungen zusammenpipettiert:

Plasmid DNA	2 µg
PEI Solution	60 µl
ad. NaCl-Lösung	200 µl
<hr/> Inkubation bei RT für 30 min	

Nach 30 min erfolgte die Transfektion, indem der komplette Ansatz auf die am Vortag in 6-Well Platten ausgesäten HEK293-Zellen pipettiert wurde. Die PEI-Transfektion wurde verwendet um rekombinante Viren in HEK293-Zellen herzustellen, die einer nachfolgenden Virus-Transduktion von Zellen zur Expression von cDNA dienen (V.2.3.9.).

An Tag 2 nach Transfektion wurden die Zellen auf eine Zellkulturflasche (25 cm²) expandiert. Um im Fall einer Virusproduktion keine Viren zu verlieren, wurde das Medium abgenommen und komplett in die Flasche überführt. Die Zellen wurden ohne Waschen mit Trypsin behandelt, in frischem DMEM resuspendiert und in die Flasche gegeben. Das Ernten der Zellen erfolgte durch einfaches Abspülen an Tag 7. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Einfrieren bei -80 °C und Auftauen bei 37 °C. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 8000 x g zentrifugiert und der Überstand durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm sterilfiltriert. Die Lagerung der Viren-Suspension erfolgte bei -80 °C. Aus diesem Virusstamm konnten jederzeit durch Infektion von HEK293-Zellen neue Viren hergestellt werden (Amplifikation).

V.2.3.10. Virenherstellung

Die Verwendung von Adenovirus-abgeleiteten Vektoren ist durch deren günstige Eigenschaften begründet. Diese weisen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe Transduktionseffizienz auf. Sie infizieren eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, einschließlich nicht-teilender Zellen, wie beispielsweise die in dieser Arbeit untersuchten Ratten-Kardio-myozyten. Das rekombinante Adenovirus ist attenuiert, indem diesem in der DNA-Sequenz essentielle Gene (E1 und E3) deletiert wurden. Durch das Fehlen dieser Gene können die Viren zwar Zielzellen infizieren, sich jedoch nicht unkontrolliert replizieren. Da HEK293-Zellen die entsprechenden Proteine selbstständig synthetisieren können, sie diese bereitstellen und dem Virus als Vehikel zur Replikation dienen.

Zur Herstellung adenoviraler Vektoren diente das RAPAD® CMV Adenoviral Expression-system (Cell BIOLABS, USA). Dieses besteht aus zwei verschiedenen Plasmiden, zum einen dem pacAd5 Shuttle-Vektor, in den die gewünschten rekombinanten Gene kloniert werden, sowie ein Backbone-Plasmid, das aus einem modifizierten Adenovirus 5-Plasmid gewonnen wurde. Zu Beginn mussten die zuvor hergestellten Plasmide (siehe Abschnitt V.2.2.) mittels *PacI*-Restriktionsverdau (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) linearisiert und anschließend mit Phenol/Chloroform aufgereinigt werden. Hierdurch werden die invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (ITR) freigelegt, welche sich an den Genomenden befinden und eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und somit der Virusproduktion spielen.

Pro Ansatz wurde je 5 µg DNA des Shuttle-Vektors bzw. des Backbone-Plasmids wie folgt pipettiert:

Plasmid DNA	5 µg
10 x Puffer	5 µl
100 x BSA	0,5 µl
<i>PacI</i>	0,75 µl
<hr/>	
AquaDest	ad. 50 µl

Es erfolgte eine Inkubation von 2 h bei 37 °C und 20 min bei 60 °C. Danach wurde die Probe mit AquaDest auf 200 µl Endvolumen aufgefüllt. Zur Aufreinigung wurde das Gemisch mit 200 µl Phenol/Chloroform versetzt und 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl NaAc und 500 µl Ethanol (absolut) gemischt und erneut zentrifugiert (10 min bei 4 °C, 13000 rpm).

Das entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min, 4 °C und 13000 rpm) und luftgetrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 10,5 µl AquaDest resuspendiert. Zur Virusproduktion wurden HEK293-Zellen der Passage 4 mit folgendem Ansatz mittels PEI (siehe Abschnitt V 2.3.9) transfiziert:

Shuttle-Vektor (mit rekombinatem Gen)	10 µl
Backbone-Plasmid	10 µl
PEI	60 µl
NaCl-Lösung	120 µl
AquaDest	ad. 200 µl

Nach vier Tagen Inkubation erfolgte ein Passagieren der Zellen. Nach weiteren fünf Tagen wurden die transfizierten Zellen mitsamt dem Medium geerntet und amplifiziert (siehe V.2.3.11).

V.2.3.11. Virusamplifikation

Zur Amplifikation wurde das Medium von etwa 50 % konfluenten HEK293-Zellen mit 1 ml Virus-Suspension versetzt und wie zuvor 7 Tage inkubiert. Es erfolgte die Zellernte sowie der Zellaufschluss durch dreimaliges Einfrieren bei -80 °C und Auftauen bei 37 °C. Ein Teil der zweiten Amplifikation wurde direkt verwendet, um die Herzmuskelzellen zu transduzieren und molekularbiologisch zu untersuchen. Der Rest wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

V.2.3.12. Transduktion von Ratten-Kardiomyozyten und iPS-CM

Chemische Methoden zur Transfektion von ausdifferenzierten Primärzellen wie Kardiomyozyten weisen eine schlechte Effizienz auf. Besser eignen sich virale Vektoren als Hilfsmittel, um fremde Gene in diese Zellen einzubringen. Bei dieser Technik ist besonders zu beachten, dass die Viren nicht in der Lage sind, sich zu replizieren, und dass es unter Umständen zur Rekombination zu Wildtyp (WT)-Viren kommen kann. In dieser Arbeit wurden replikations-inkompetente Adenoviren verwendet um *CSRP3*-Gene in adulte Ratten-Kardiomyozyten einzuschleusen und diese somit zu infizieren, sodass es zur Expression des eingeschleusten Gens kommt.

Da eine Deletion im Virusgenom vorliegt, können sich diese allerdings nicht selbstständig vermehren. Zu den Primärzellen wurden 50 µl Virus-Suspension pro 12-well gegeben und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ für zwei Tage. Die Expression der Fusionsproteine wurde an Tag 3 fluoreszenz-mikroskopisch bestätigt. Sämtliche Messungen fanden daher an Tag 3 nach Transduktion statt.

V.2.3.13. Konfokalmikroskopie

Die MLP- und α -Aktinin-Lokalisation in adulten Ratten-Kardiomyozyten sowie in humanen iPS-CM wurde mit Hilfe der Konfokalmikroskopie untersucht. Das Prinzip der Konfokalmikroskopie besteht darin das Präparat mittels Lichtpunkt gleich-mäßig abzutasten. Somit wird die Fluoreszenz nur an einem Punkt angeregt und das Streulicht minimiert. Zudem besitzt jedes Konfokalmikroskop eine sich vor dem Detektor befindliche Lochblende („Pinhole“). Dieses zusätzliche optische Element blendet das „Out of Focus“- Licht aus und ermöglicht so, dass nur Licht aus der Fokusebene den Detektor erreichen kann. Diese starke Einschränkung ermöglicht eine sehr gute räumliche Auflösung auch in Z-Richtung. Dadurch sind optische Schnitte und 3D-Rekonstruktionen des Objektes möglich. Die Detektion erfolgte mit einem hoch sensitiven Prismen-Spektrometer. Für die Anregung von tagRFPT und Atto 550 wurde ein Feststofflaser (561 nm) verwendet. Die Anregung von DyLight 649 erfolgte mit einem Helium-Neon Laser. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte über die Leica Anwendungssoftware (LASAF). Der Aufbau und das Funktionsprinzip des Konfokalmikroskops sind nochmals schematisch in Abb. 18 dargestellt.

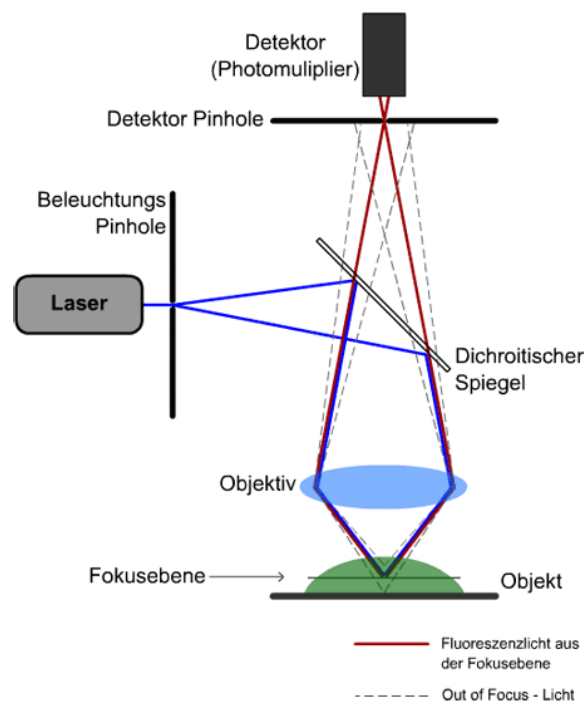


Abb. 18: Schematische Darstellung und Funktionsprinzip des Konfokalmikroskops.
(<http://www.univie.ac.at>)

V.2.3.14. Fura-2 Calcium-Messung

Fura-2 zählt zu den fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatoren und wird für quantitative intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen verwendet. Der Absorptionspeak von Fura-2 verschiebt sich von 340 nm im Ca^{2+} -gebundenen Zustand zu 380 nm im Ca^{2+} -freien Zustand. Der Fluoreszenz-Emissionspeak liegt für beide Anregungswellenlängen bei 510 nm. Durch vorherige Kalibrierung kann mit Hilfe des Verhältnisses der Fluoreszenz bei 340 und 380 nm die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration berechnet werden. Fura-2 passiert in veresteter Form die Zellmembran, wobei in der Zelle die Estergruppe durch zelluläre Esterasen hydrolytisch abgespalten wird. Zur Messung wurde eine 1 mM Stammlösung mit 50 μg Fura-2 AM in 50 μl 20 % (w/v) Pluronic F-127 (in DMSO) gelöst. Die eingesetzte Konzentration zur Beladung der Zellen betrug 1 μM .

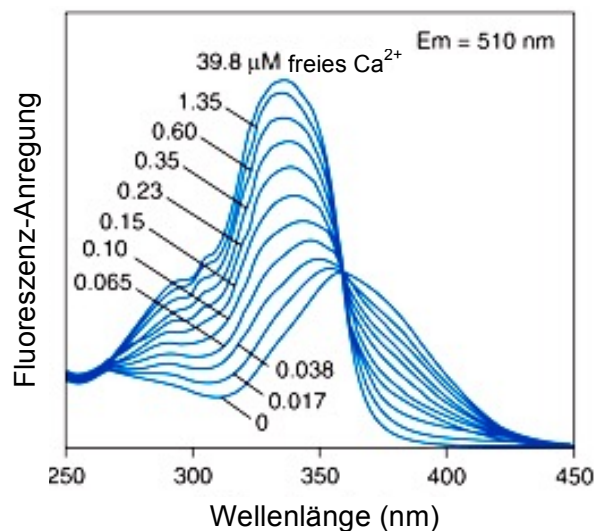


Abb. 19: Anregungsspektren von Fura-2 bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Bindung von Ca^{2+} an Fura-2 führt zur Verschiebung der Anregungswellenlänge des Fluorophors im Bereich von 300 und 400 nm. Die Emission bleibt konstant bei 510 nm (<http://www.invitrogen.com>).

In dieser Arbeit diente die Fura-2 Messung der Untersuchung, ob die Transduktion von Rattenkardiomyozyten mit unterschiedlichen tagRFP-fusionierten MLP-Splice-Varianten (Volllänge und ohne Exon 3) einen Einfluss auf die Erregungs-Kontraktions-Kopplung dieser Zellen hat. Die Kardiomyozyten wurden am Tag der Isolation für 1 Stunde mit dem entsprechenden Virus transduziert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel. Am Tag 3 erfolgte die Fura-2 Messung. Dazu wurden die Deckgläser mit den transduzierten Zellen in eine Messkammer eingespannt. Die Beladung der Zellen mit 1 μM Fura-2 erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Die anschließende Deesterifizierung in Tyrode dauerte 20 min. Die Messung erfolgte bei 37 °C.

Zur Messung diente ein Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE2000-U, Nikon, Japan), die Detektion erfolgte mit einer CCD-Kamera (SCMOS-Kamera Flash4, HAMAM). Mit Hilfe eines Monochromators (Polychrome IV, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing) wurde die gewünschte Anregungswellenlänge generiert, die wiederum von einem dichroischen Spiegel reflektiert und mit einem 20 x Ölobjektiv (CFI Plan Fluor, Nikon, Japan) auf die Zelle fokussiert wurde. Zur Bedienung wurde die Software TILLvisiON v4.0 verwendet. Zu Beginn der Messung erfolgte eine Bildaufnahme bei 561 nm, um so die transduzierten Zellen von den untransduzierten unterscheiden zu können und die gemessenen Signale später auf die Expressionsniveaus der MLP-Isoformen normieren zu können.

Zur Normierung der Autofluoreszenz der Zellen diente ein Bild bei 540 nm.

Das anschließend gestartete Protokoll sah ein ständiges Wechseln der Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm vor, wobei Bilder 40 s lang mit ca. 35 Aufnahmen pro Sekunde aufgenommen wurden. Nach 2-3 s wurde mit der elektrischen Stimulation (3 Hz) der Zelle begonnen. Im Anschluss folgte eine Phase von 3 min ohne Aufzeichnung von Signalen. In dieser Zeit wurden die Zellen weiter elektrisch stimuliert. Abschließend erfolgte eine erneute Aufzeichnung von 40 s. Aus diesen Signalen wurden anschließend charakteristische Kenngrößen ermittelt:

- Amplitude des 1. Transienten nach Ruhe
- „Steady State“ Amplitude
- Dauer der Ca^{2+} -Transienten („calcium transient duration“ - CTD)

V.2.3.15. Statistische Analyse von Daten

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Programm Graphpad Prism, Version 5 (Graphpad Software Inc., la Jolla, USA) . Größere Datenmengen wurden statistisch mittels ungepaartem t-Test (Zwei-Stichproben-t-Test) ausgewertet. Dieser prüft anhand des Mittelwerts, ob sich zwei unabhängige Stichprobensätze signifikant voneinander unterscheiden. Voraussetzung des t-Tests ist, dass die Stichproben einer normalverteilten Grundgesamtheit mit gleicher Varianz entstammen und dass es einen ausreichend großen Stichprobenumfang gibt. Die aus einem Hypothesentest ermittelte Wahrscheinlichkeit (p-Wert oder Signifikanzwert), welche Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann, muss oberhalb eines festgelegten Signifikanz-niveaus liegen, um die Nullhypothese (d.h. der Fall, dass kein Unterschied zwischen den Stichprobensätzen besteht) zu widerlegen.

Die Signifikanzniveaus sind wie folgt definiert:

$p > 0,05 \triangleq$ n.s. (nicht signifikant)

$p < 0,05 \triangleq$ *

$p < 0,01 \triangleq$ **

$p < 0,001 \triangleq$ ***

Die in allen Diagrammen angegebenen Fehlerbalken zeigen den Standardfehler („standard error of the mean“, SEM), welches eine Schätzung des Mittelwerts der Grundgesamtheit aus dem Mittelwert der Stichprobe darlegt (Maß für die Streuung um den entsprechenden Mittelwert der analysierten Daten). Dieser wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{SEM} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

σ ist die Standardabweichung der Stichproben und ist definiert als:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

n = Anzahl der Stichproben

x = Wert einer Stichprobe

\bar{x} = Mittelwert aller Stichproben

VI. Ergebnisteil

VI.1. Analyse von Signalwegen in $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ Knockout Herzen mit quantitativer Realtime PCR

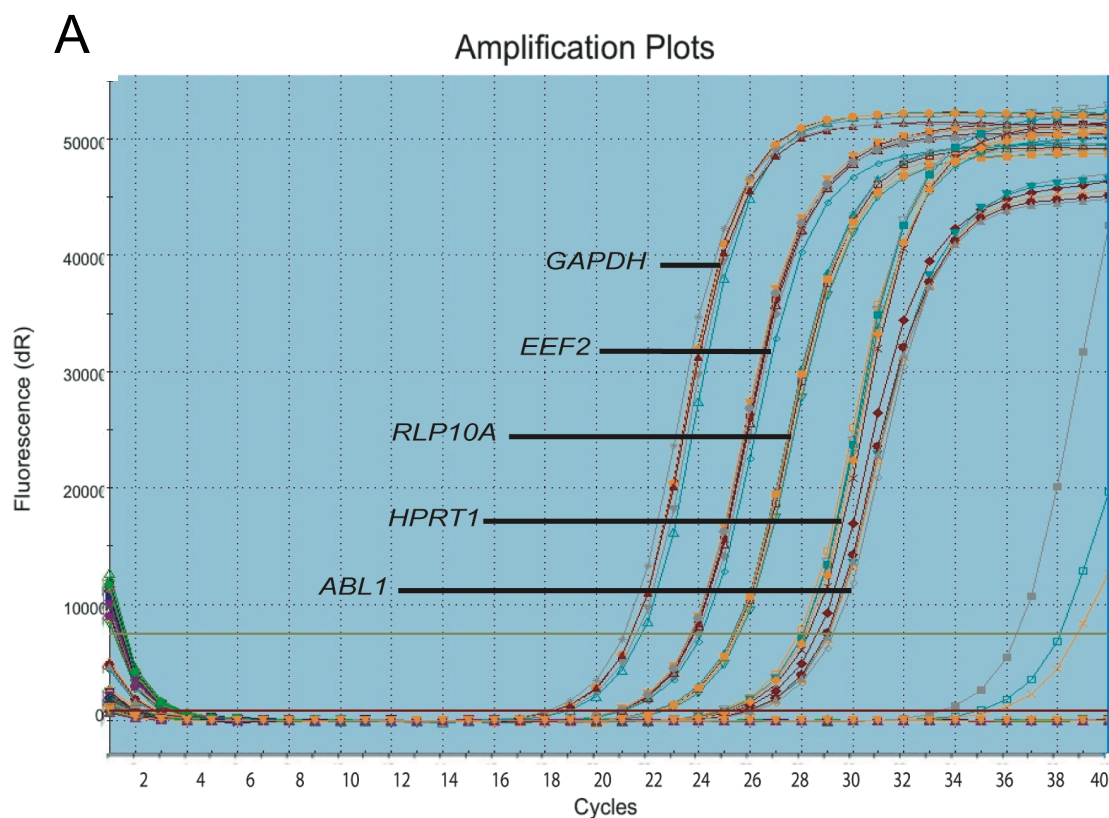
Mit isolierten Ventrikelzellen von $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout Mäusen wurde im Vorfeld der vorliegenden Dissertation innerhalb der Arbeitsgruppe Lipp ein "next-generation sequencing" (NGS) Screen durchgeführt. Mit dieser Methode konnten 3.100 Gene identifiziert werden, deren Expressionsniveau signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp (WT) und Doppel-Knockout (dKO) aufwiesen. Im Kontext dieser Doktorarbeit sollten mit Hilfe der quantitativen Realtime PCR (qPCR) die vorangegangenen Ergebnisse verifiziert und wichtige Signalwege, die von Veränderungen im Expressionsmuster betroffen sind, identifiziert und näher untersucht werden. Diese gezielten Analysen sollten ein verbessertes Gesamtverständnis der Rolle dieser Signalwege bei physiologischen Vorgängen ermöglichen, insbesondere bei der Entstehung und dem Verlauf von Herzkrankheiten.

VI.1.1. Ermittlung geeigneter „housekeeping“-Gene und Optimierung der qPCR-Methode

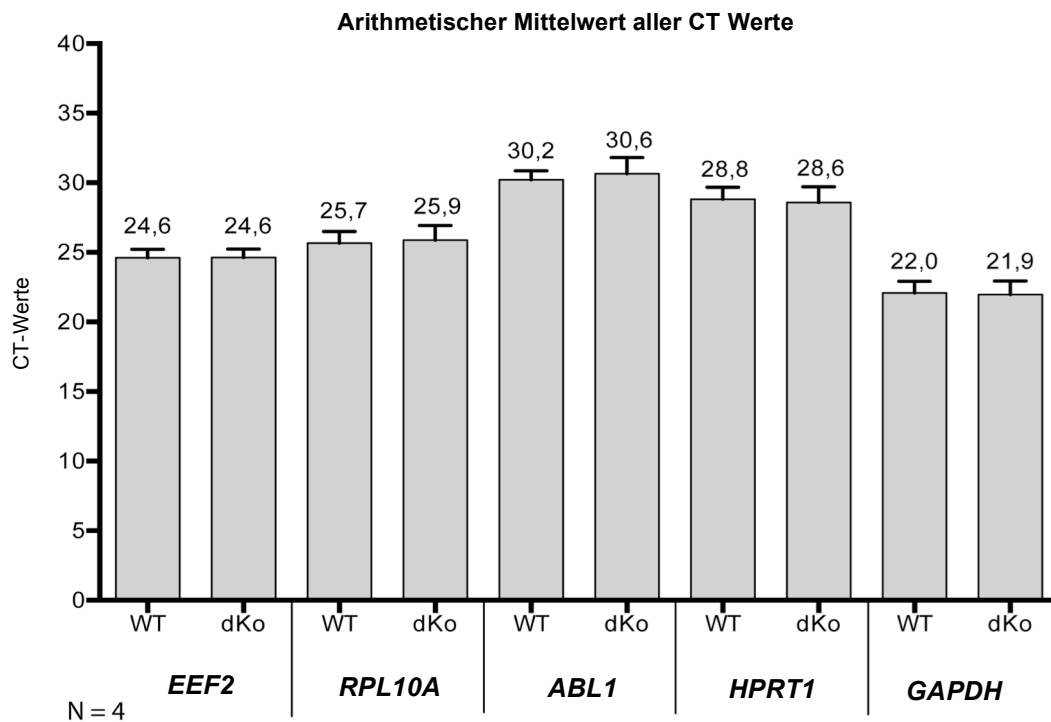
Zu Beginn sollte zunächst die qPCR-Methode und die damit verbundenen Abläufe etabliert werden. Dies beinhaltete die Recherche und Etablierung geeigneter Systeme zur RNA-Isolation aus Herzzellen der jeweiligen Genotypen, der anschließenden cDNA-Synthese, sowie letztlich eines geeigneten qPCR-Protokolls. Da nur geringe Mengen an Probenmaterial zur Verfügung standen war es wichtig die optimale Methoden-Kombination zu ermitteln, um eine maximale Ausbeute und Qualität des cDNA-Produktes zur Durchführung der qPCR zu gewährleisten. Nach Optimierung der Methode (Testung verschiedener PCR-Kits, Einstellung der RNA- bzw. cDNA-Konzentration etc.) erfolgte die Suche und Testung geeigneter "housekeeping"-Gene als Ladekontrolle zur Verifizierung für die qPCR, um die vorliegenden NGS-Daten zuverlässig überprüfen zu können. Die Auswahl der "housekeeping"-Gene, die zur Normierung der qPCR-Daten benötigt werden, ist sehr wichtig, da "housekeeping"-Gene, im Gegensatz zu regulierten Genen, im Idealfall unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden.

Somit galt es "housekeeping"-Gene zu finden, welche sowohl in WT-Proben als auch in $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ dKO-Proben die gleiche Expressionsstärke aufweisen.

Nach intensiver Literaturrecherche wurden zehn mögliche "housekeeping"-Gene identifiziert, wovon vier Kandidaten (*GAPDH*, *EEF2*, *RPL10A*, *HPRT1*) letztlich nach Überprüfung (d.h. keine Veränderungen zwischen WT und dKO) und Optimierung für die Analysen als interne mRNA-Kontrolle verwendet wurden (Abb. 20). Die restlichen „housekeeping“-Gene wurden aufgrund schlechter Expressionswerte, wie am Beispiel von *ABL1* in Abb.20 A gezeigt, verworfen. *ABL1* hatte zwar einen Ct-Wert vergleichbar zu *HPRT1*, zeigte jedoch ein weniger spezifisches Dissoziationsprofil (siehe Abschnitt V.2.2.14, Abb. 15). Alle Primer wurden nach bestimmten Vorgaben designt, beispielsweise müssen Exon-Exon Grenzen überspannt werden, eine spezifische Primerlänge und die Schmelztemperatur eingehalten werden usw. (Details siehe KiCqStartPrimers, SIGMA).



B



C

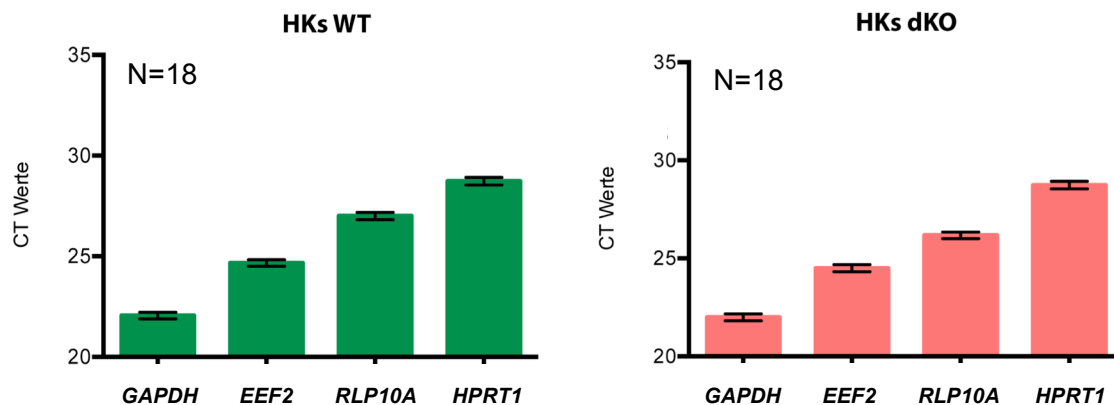


Abb. 20: Test geeigneter "housekeeping"-Gene. PCR-Zyklus. A) Typischer Verlauf von Amplifikationskurven in einer qPCR. Es wurden fünf "housekeeping"-Gene (HK) von WT und G_{aq}/G_{a11} dKO Proben gemessen. Diese unterscheiden sich in ihrem jeweiligen Ct-Wert. **B)** Darstellung der Mittelwerte aller CT-Werte (relative Expressioniveaus) einer exemplarischen qPCR-Messung von WT und dKO-Proben. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der unterschiedlichen HK-Gene aus WT und dKO-Proben. **C)** Auswertung der CT-Werte von jeweils 18 Versuchstieren pro Genotyp (WT bzw. dKO). Es wurden jeweils 3 Proben pro Versuchstier getestet. Die Abbildung zeigt die gemittelten Ergebnisse für die jeweiligen HK Gene, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

VI.1.2. Expressionsanalyse des EZM-Signalwegs in $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -

Knockout-Herzen

Nach der Optimierung der Methoden und Testung der „housekeeping“-Gene folgte die Auswahl zu untersuchender Signalwege/Interaktionen und die damit verbundene Analyse der Gene, welche im NGS nach $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -dKO als verändert identifiziert wurden. Die erste Untersuchung galt den Genen die mit der Extrazellulären Matrix (EZM) assoziiert sind, Bereits in histologischen Untersuchungen der extrazellulären Matrix weisen alternde Herzen von dKO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verminderte Anwesenheit von Kollagen auf. Die Ergebnisse des NGS zeigten ebenfalls Veränderungen der Aktivität von Genen, die an der $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -abhängigen Regulation der EZM beteiligt sind (Wiesen et al. 2016). Die EZM stellt kein statisches Konstrukt dar, sondern bildet ein fein reguliertes, komplexes Netzwerk, welches auf vielfältige Weise mit den dazwischen befindlichen Zellen interagiert (Bijata et al. 2017). Viele Proteine, die zur EZM gehören reagieren und interagieren mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche (siehe Abb. 21). Dazu gehören die Matrix-Metalloproteinasen, welche am Umbau der EZM beteiligt sind. Sie spielen bei der Narbenbildung und Wundheilung (Remodelling) am Herzen nach Herzkrankheiten (Myokarditis, Herzinfarkt usw.) eine entscheidende Rolle. Für die Analyse ausgewählter Gene im Zusammenhang mit der EZM wurde die mRNA von jeweils drei Tieren pro Genotyp (WT und dKO) mit Hilfe der qPCR untersucht und anschließend mit den NGS-Daten verglichen (siehe Abb. 22)

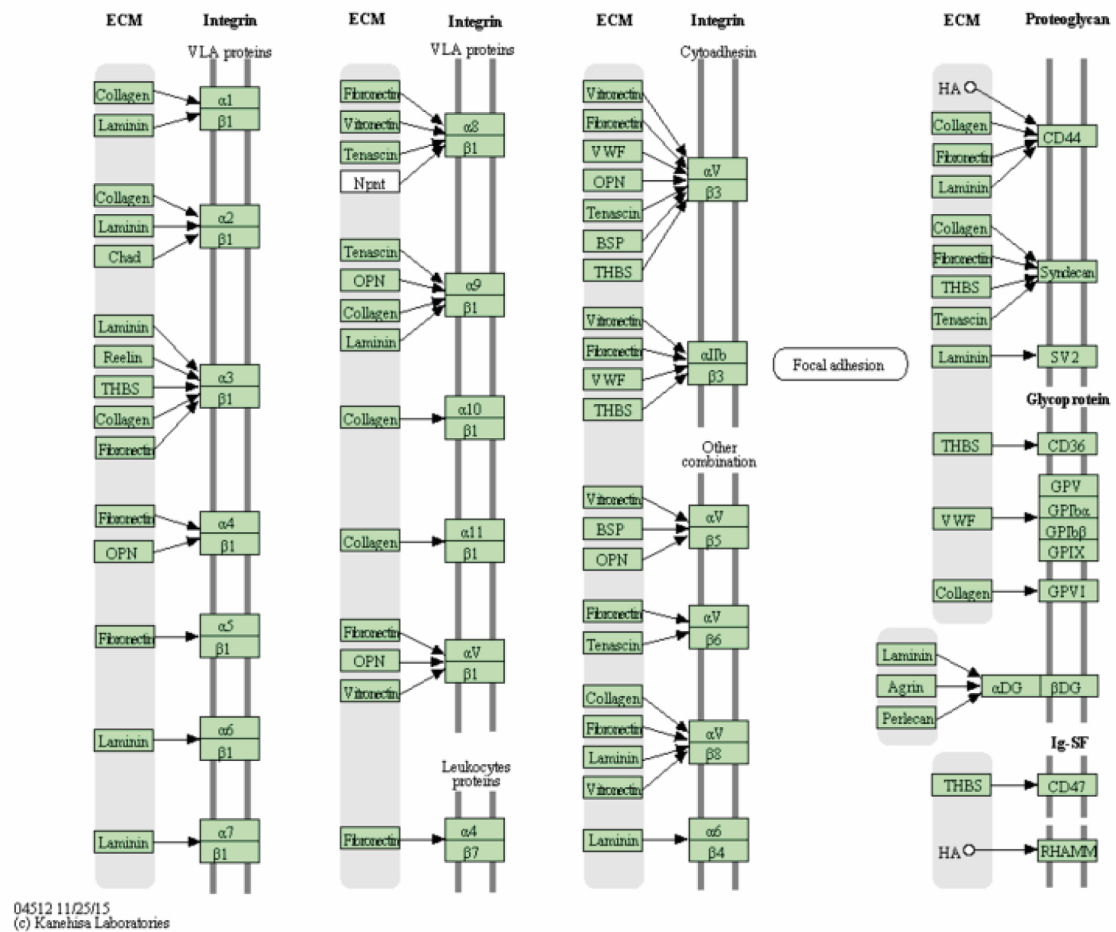
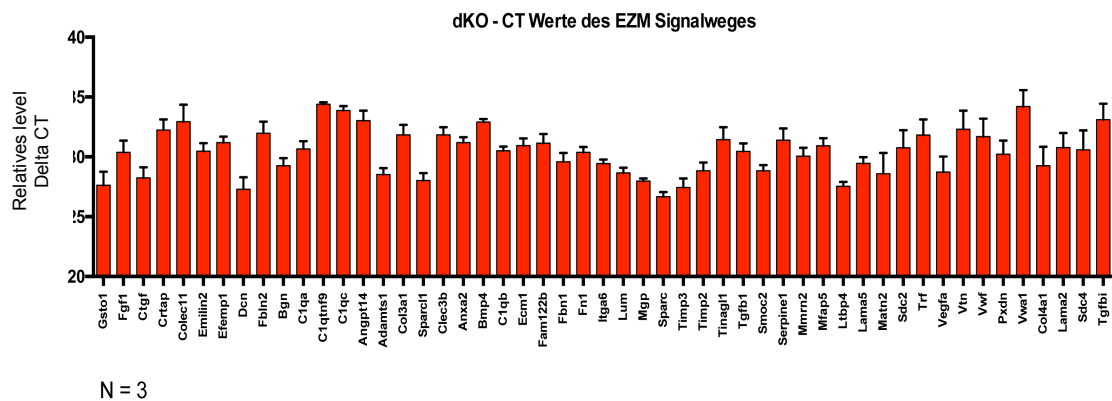
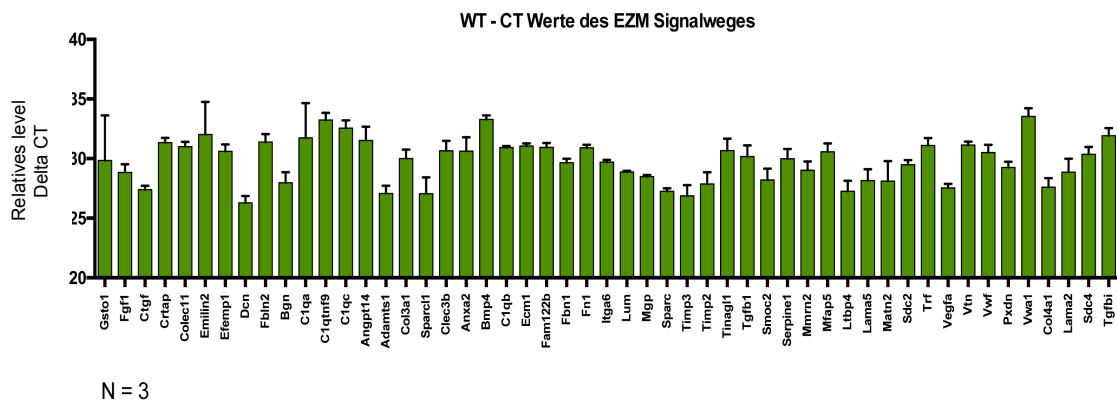


Abb. 21: Schematische Darstellung der Extrazellulären Matrix (EZM)-Rezeptor-Interaktionen.
(<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>)

A



B



C

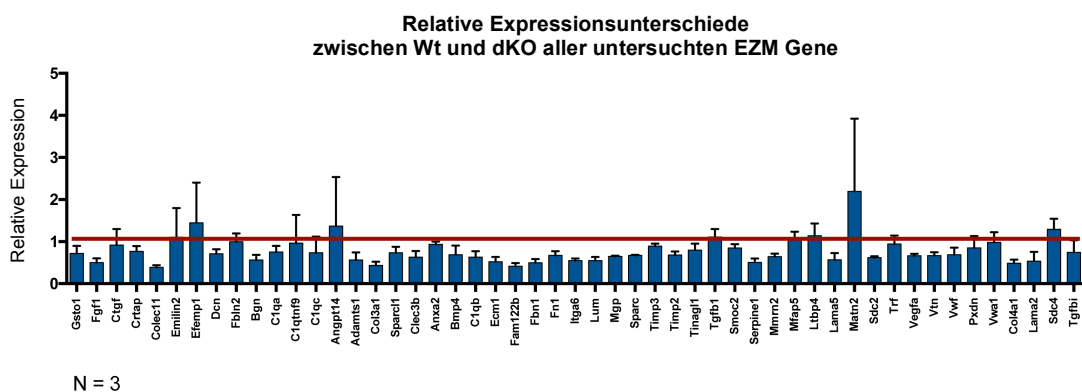


Abb. 22: Darstellung der Delta CT-Werte sowie der relativen Expressionswerte von verschiedenen Genen des EZM-Signalweges. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der Expressionsunterschiede verschiedener Gene in Wildtyp und dKO-Proben. Delta CT-Werte werden errechnet, indem man von den CT-Werten den Mittelwert aller korrespondierenden CT-Werte der "housekeeping"-Gene subtrahiert. In **A**) sind alle CT-Werte der gemessenen WT-Proben des EZM-Signalweges aufgeführt, in **B**) korrespondierend zu A) alle CT-Werte der dKO-Proben. **C**) Relative Expression der gemessenen Werte. Diese ergibt sich aus den mit zwei potenzierten $2^{\Delta\Delta CT}$ -Werten (Subtraktion der WT- (Kontroll- bzw. unbehandelte Maus) Delta CT-Werte von den Delta CT-Werten der dKO-Mäuse). Jede der einzelnen Proben wurde dreimal gemessen und gemittelt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die rote Linie bei 1 veranschaulicht eine Amplifikationseffizienz von 100%.

Die in Abb. 22 gezeigte Expressionsanalyse von Genen des EZM-Signalweges in isolierten Herzzellen zeigte Unterschiede im Expressionsniveau zwischen WT- und $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout Mäusen. Auch nach Errechnung der relativen Expression, d.h. dem Normieren auf die HKs, können Veränderungen einzelner Gene in dessen Expressionsniveau zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Demnach konnte die qPCR-Analyse die NGS-Daten bestätigen und eindeutige Unterschiede im Expressionslevel der getesteten Gene zwischen WT- und dKO zeigen. Somit wurden die Daten von Wiesen et al. 2016 auf molekularer Ebene bestätigt, welche bereits histologische Unterschiede der extrazellulären Matrix in Herzen beider Genotypen feststellten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nicht tiefergehend auf den EZM-Signalweg eingegangen und stattdessen der Fokus auf den kardialen Muskel-Kontraktions-Signalweg („Cardiac-muscle contraction pathway“ (CMC)) gelegt, da dieser Signalweg als relevanter erschien, um mögliche Schlüsselgene in Bezug auf Herzerkrankungen identifizieren zu können. Die entsprechenden Analysen werden im nachfolgenden Kapitel betrachtet.

VI.1.3. Expressionsanalyse des CMC-Signalweges in $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout-Herzen

Der kardiale Muskel-Kontraktions-Signalweg („Cardiac-muscle contraction pathway“ (CMC)) (siehe Abb. 23) ist ein komplexer Prozess, der durch die elektrische Erregung kardialer Myozyten ausgelöst wird und somit für die koordinierte Kontraktion der Herzmuskelzellen verantwortlich, welche letztlich das Herz-Kreislauf-System aufrechterhält (Kuo & Ehrlich 2015). Auslöser für die Entstehung von Herzkrankheiten sind sowohl Mutationen beteiligter Gene, als auch Fehlregulationen und Fehlexpressionen von Genprodukten dieses Signalweges, was ihn für genauere Untersuchungen im Kontext dieser Arbeit sehr interessant machte.

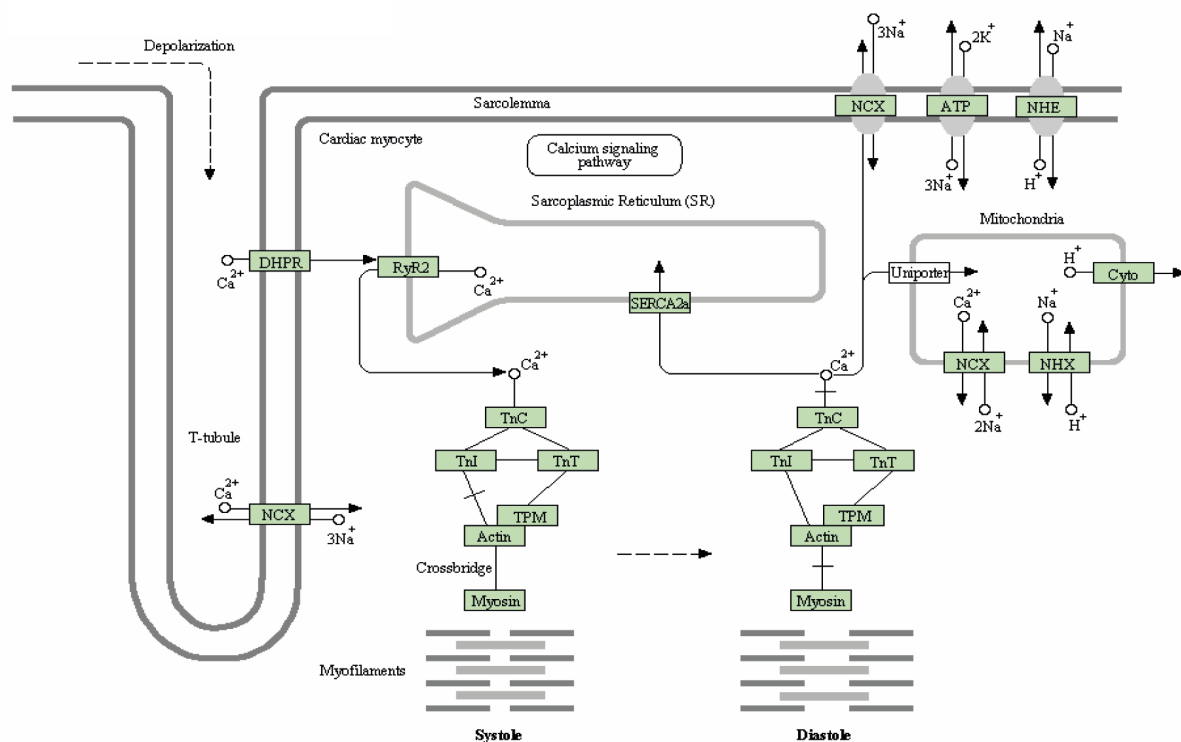


Abb. 23: Schematische Darstellung des Signalwegs der kardialen Muskel-Kontraktion (CMC). (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>)

Die Expressionsanalyse von Genen des CMC-Signalweges in isolierten Herzzellen mittels qPCR zeigte deutliche Unterschiede zwischen WT- und $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout Mäusen für eine Reihe von Genen, wovon acht der identifizierten Gene genauer analysiert wurden (siehe Abb. 24).

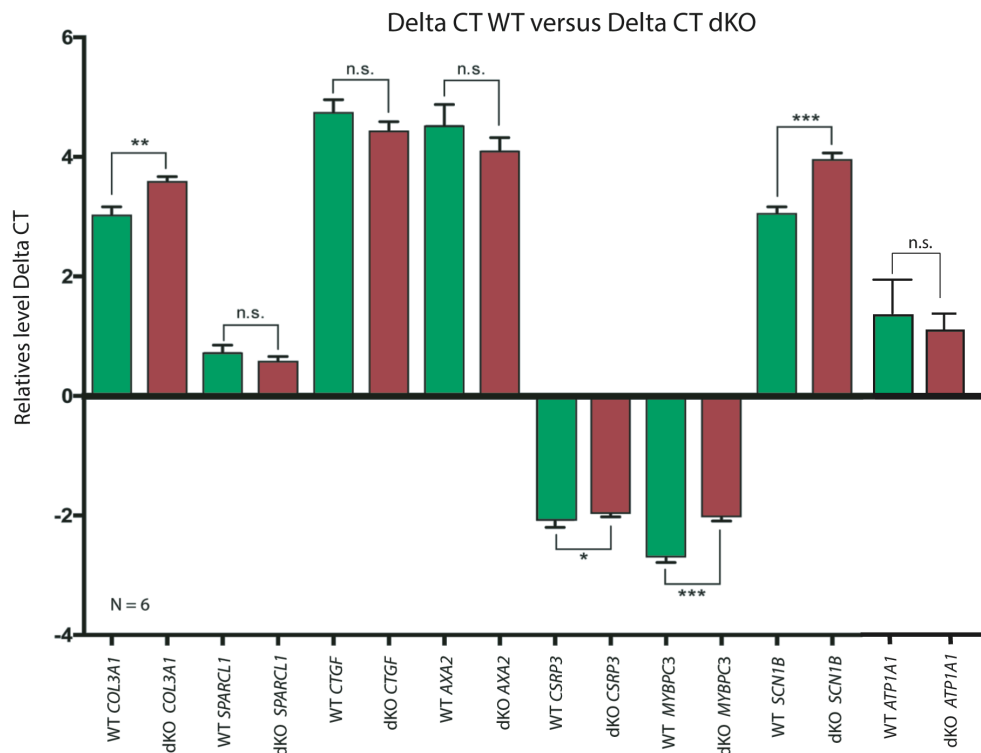


Abb. 24: Darstellung der Delta CT-Werte ausgewählter Kandidaten-Gene des CMC-Signalweges.
A) Quantitative Auswertung verschiedener Kandidaten-Gene des CMC-Signalweges in Wildtyp und dKO-Proben. Delta CT-Werte werden errechnet, indem man von den CT-Werten den Mittelwert aller korrespondierenden CT-Werte der "housekeeping" Gene subtrahiert. Zum statistischen Vergleich der Experimente zwischen WT und dKO Proben wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von mindestens 95 % kalkuliert und P-Werte < 0,001 durch drei Sterne (***), P-Werte < 0,01 durch zwei Sterne (**) und P-Werte < 0,05 durch einen Stern (*) markiert. Nicht signifikant unterschiedliche Stichproben wurden mit „n.s.“ markiert. Pro Gen wurden N=6 Proben (Versuchstiere) im Triplikat analysiert.

Hierbei wurden auf Basis der CT-Werte der qPCR die Delta CT-Werte bestimmt, d.h. die Differenz aus den CT-Werten der qPCR-Analyse und dem Mittelwert aller "housekeeping"-Gene. Die Ergebnisse der jeweiligen qPCR-Ansätze wurden mittels eines Hypothesentests (ungepaarter T-Test) statistisch analysiert. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen WT und dKO wurden demnach bei den Genen *COL3A1*, *MYBPC3*, *SCN1B* sowie *CSRP3* beobachtet.

Diese Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und dKO-Proben deuten auf eine Veränderung im CMC-Signalweg hin. Um die Auswirkungen der Deletion des $G_{\alpha 11}/G_{\alpha q}$ -Rezeptors auf den CMC-Signalweg genauer zu untersuchen wurden zusätzlich analoge qPCR-Analysen an Herzen mit Single-Knockout (sKO) durchgeführt.

Diese Messungen sollten zeigen, ob signifikante Expressionsänderungen ausschließlich nach dem Ausschalten beider G_{α} -Proteine auftreten oder ob bereits eine Deletion von $G_{\alpha11}$ oder $G_{\alpha q}$ alleine ausreichend ist, um die Expression von Genen des CMC-Signalwegs zu verändern.

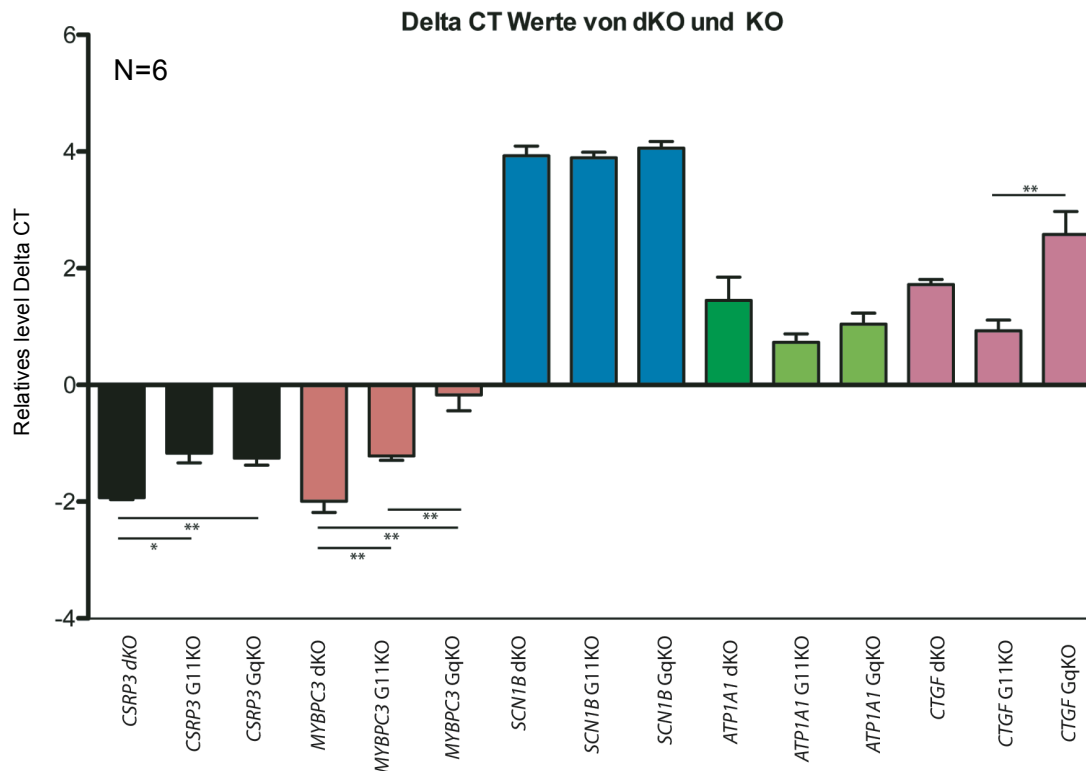


Abb. 25: Darstellung der Delta CT-Werte ausgewählter Kandidaten-Gene des CMC-Signalweges. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der Expressionsunterschiede verschiedener Kandidaten-Gene in dKO und sKO. Delta CT-Werte werden errechnet, indem man von den CT-Werten den Mittelwert aller korrespondierenden CT-Werte der "housekeeping"-Gene subtrahiert. Es wurden von dKO- und sKO-Proben pro Gen (*CSRP3*, *MYBPC3*, *SCN1B*, *ATP1A1* und *CTGF*) N=6 Proben im Triplikate analysiert. Die gemessenen CT-Werte wurden gemittelt und die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum statistischen Vergleich der Experimente zwischen dKO und sKO-Proben wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von mindestens 95 % kalkuliert und P-Werte < 0,001 durch drei Sterne (***), P-Werte < 0,01 durch zwei Sterne (**) und P-Werte < 0,05 durch einen Stern (*) markiert. Nicht signifikant unterschiedliche Stichproben wurden nicht markiert.

Abb. 25 zeigt, dass in allen Fällen der untersuchten Kandidaten-Gene, die im $G_{\alpha q}/G_{\alpha11}$ -dKO einen signifikanten Unterschied zeigten, auch bereits ein sKO ausreichend ist, um Veränderungen in der Genexpression hervorzurufen (*CSRP3* und *MYBPC3*, *SCN1B*). Interessanterweise ist jedoch die Genexpression im Fall von *CSRP3* und *MYBPC3* noch stärker erniedrigt, wenn lediglich $G_{\alpha11}$ oder $G_{\alpha q}$ alleine ausgeschaltet werden.

Bei *MYBPC3* (Myosin binding protein C 3) handelt es sich um ein bereits sehr gut erforschtes Gen, welches in Herzmuskel-Zellen vorzufinden ist und dort mit dem Sarkomer, der Grundeinheit des Muskelkontraktionsapparates, assoziiert ist. Im Fall von *SCN1B* zeigt sich kein Unterschied zwischen dKO und sKOs. *ATP1A1* zeigt eine leicht erhöhte Genexpression im Fall beider sKOs, welche jedoch nicht statistisch signifikant ist. *CTGF* weist im Fall eines $G_{\alpha 11}$ -KOs eine erhöhte Genexpression gegenüber dem dKO auf, während diese bei einem $G_{\alpha q}$ -KO interessanterweise gegenüber dem dKO sogar erniedrigt ist.

Beim anschließenden direkten Vergleich der NGS-Daten mit den qPCR-Daten zeigte sich, dass im Fall der Gene *CSRP3*, *MYBPC3* und *CTGF* das Verhältnis, welches aus beiden Daten errechnet wurde, indem die Werte der jeweiligen dKO-Mäuse durch die Werte der WT-Mäuse dividiert wurden, keine bzw. nur geringe Abweichungen der qPCR- von den NGS-Daten aufwiesen (Abb. 26).

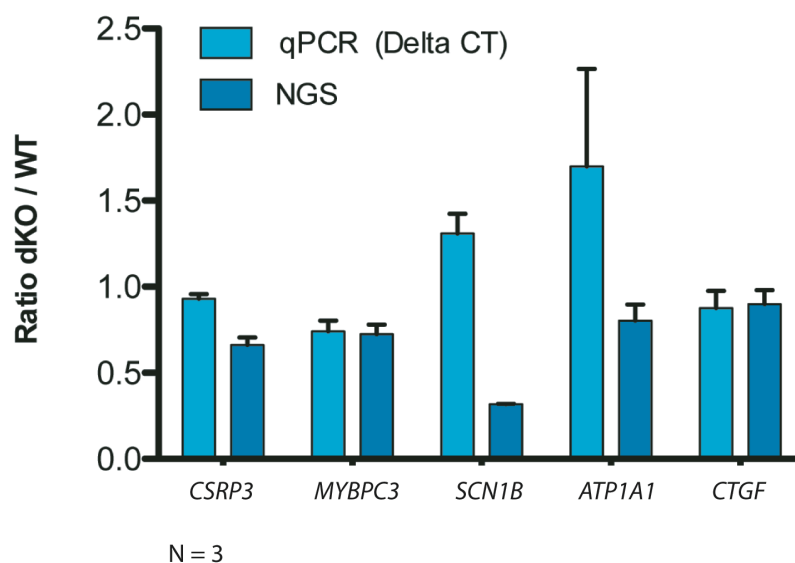


Abb. 26: Vergleich der NGS- und qPCR-Daten von verschiedenen Kandidaten-Genen. Dargestellt ist das Verhältnis von dKO- zu WT-Mäusen. Dieses Verhältnis wurde von den NGS- und qPCR-Daten gebildet und miteinander verglichen.

VI.2. Untersuchungen der Protein- und mRNA-Expression relevanter Kandidaten des CMC-Signalweges

Nach der Identifikation und Verifizierung von Kandidaten-Genen mittels qPCR-Analyse wurden diese nun zusätzlich auf Proteinebene, mittels Western-Blot (WB), weiter analysiert. Dabei sollten bereits vorhandene Erkenntnisse sowohl bestätigt als auch molekular weiter aufgeklärt werden, aber vor allem auch kardiale Signalwege verfolgt werden, die $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -abhängig sind und für die Physiologie und Pathophysiologie des Herzens von zentraler Bedeutung sind.

Im Vorfeld sollte zudem untersucht werden, ob es Unterschiede in den relativen Proteinmengen zwischen vollständigem Herzen, also dem kompletten Gewebe und somit einem Zellgemisch, sowie den isolierten Kardiomyozyten gibt. Dadurch sollte geklärt werden, ob sich die Regulation der untersuchten Gene nur spezifisch auf Kardiomyozyten beschränkt oder auch umliegendes Gewebe betrifft und ob es wichtig ist im Vorfeld der Analysen eine zeitlich aufwendige Isolation von Kardiomyozyten durchzuführen.

Im Ersten Schritt wurde eine qPCR-Analyse mit spezifischen Herzmarkern (Kardiomyozyten-spezifische mRNA) durchgeführt, um sicherzustellen, dass in dem Zellgemisch (Ganzherz) ausreichend Kardiomyozyten für eine adäquate Untersuchung vorhanden sind und dass im Vergleich zu isolierten Kardiomyozyten keine Unterschiede in der relativen Expression der Markergene zu sehen ist. Folgende Gene wurden als Zelltypmarker für diesen Versuch ausgewählt:

- *CALD1*: kodiert für ein Calmodulin- und Aktin-bindendes Protein und spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Kontraktion von glatter Muskulatur sowie Herzmuskeln
- von-Willebrand-Faktor (*vWF*): ein sehr bekannter Marker für Endothelzellen
- *FN1*: kodiert für Fibronectin, ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches auch von Endothelzellen gebunden wird
- *GATA4*: kodiert für ein Mitglied der GATA-Familie von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren

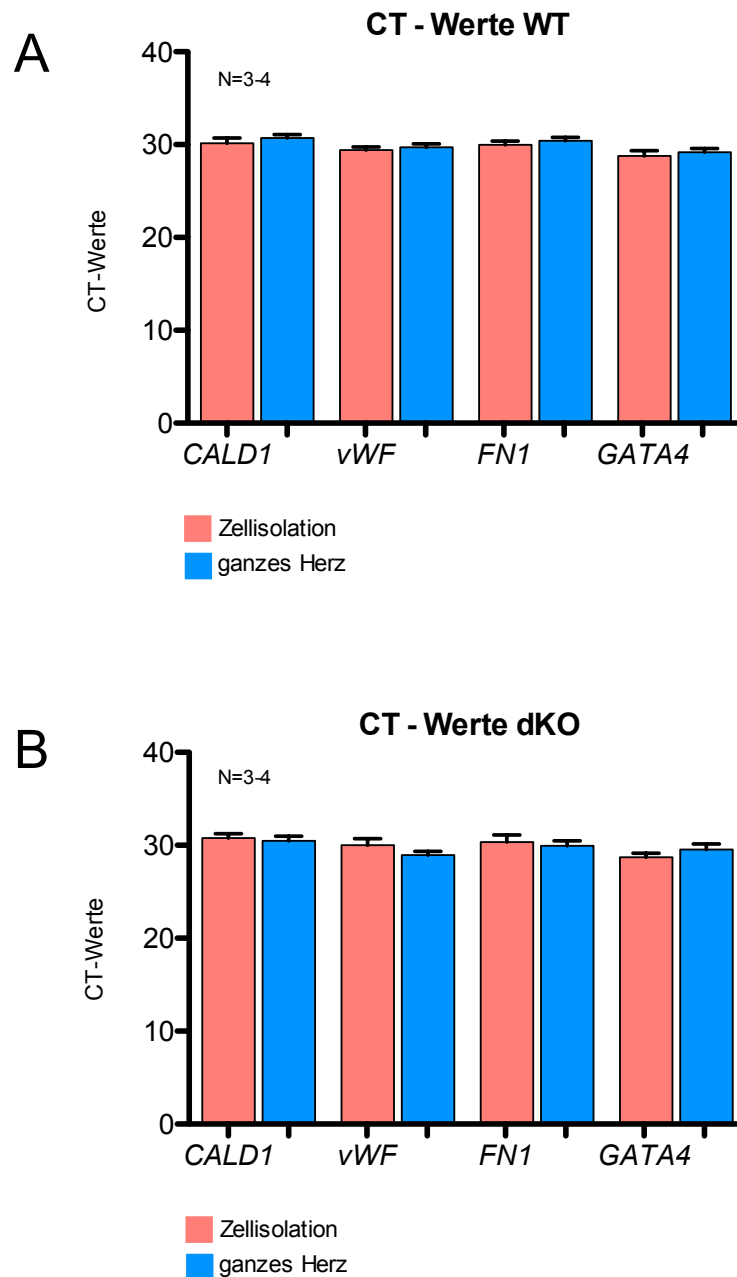
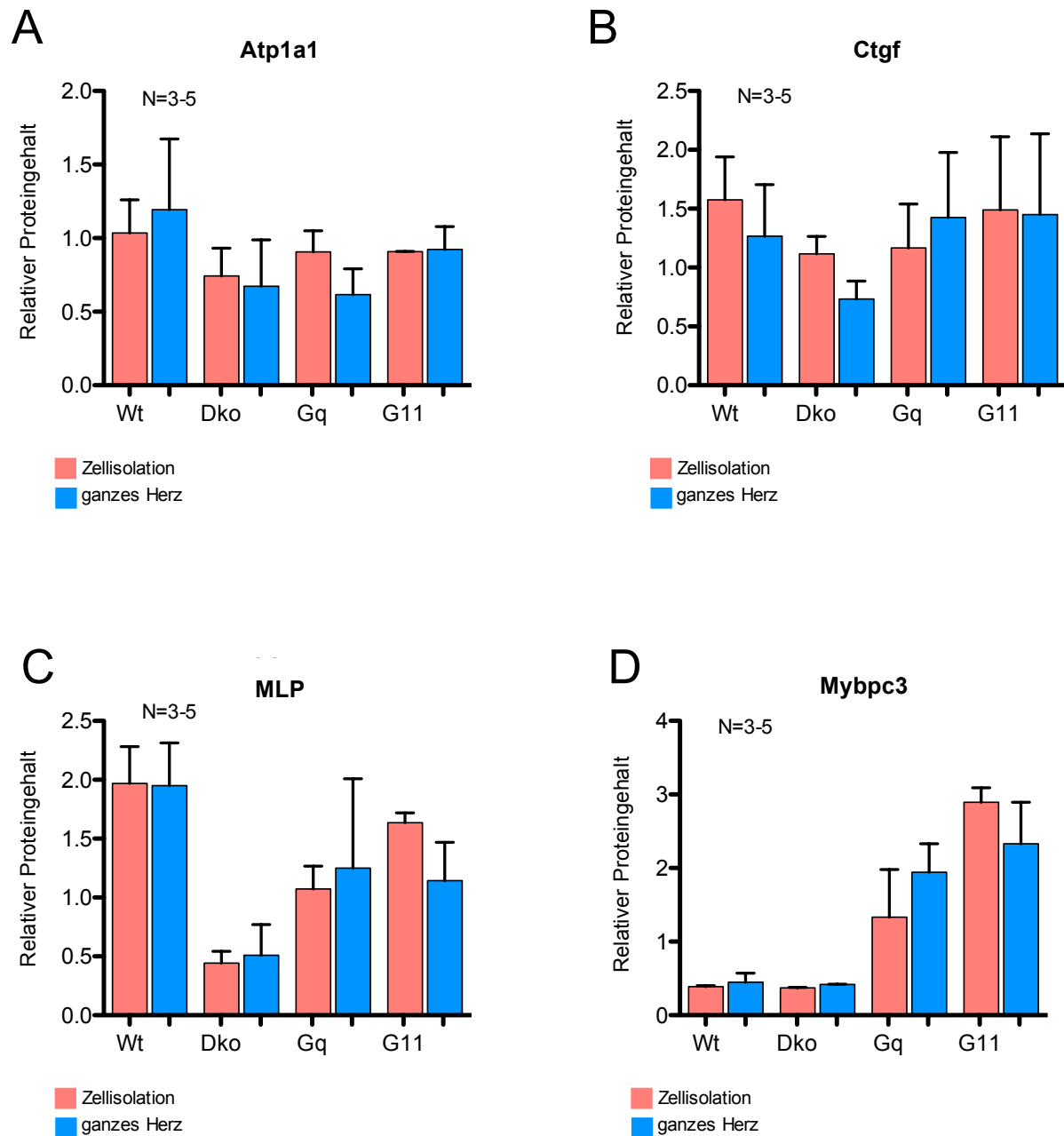


Abb. 27: Vergleich des Expressionslevel (qPCR) zwischen Ganzherz und isolierten Herzmuskelzellen für vier Herzmarker bei WT und dKO von $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$. Dargestellt ist der CT-Wert von je drei-vier Ganzherzen (in blau) bzw. drei Kardiomyozyten-Zellisolationen (in rot) der jeweiligen Genotypen. **A)** CT-Werte aller mit Herzmarkern gemessenen WT-Proben, **B)** CT-Werte aller mit Herzmarkern gemessenen dKO-Proben. Zum statistischen Vergleich der Experimente zwischen Ganzherzen und Zellisolation wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Bei der Bestimmung des mRNA-Levels wird deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem vollständigen Herzgewebe und einer reinen Kardiomyozyten-Population gibt. In allen Fällen zeigen die Proben eine vergleichbare Expression der ausgewählten Zelltyp-Marker (Abb. 27).

Die Analysenreihe in Abb. 28 sollte nun Aufschluss darüber geben, ob es durch die Verwendung von vollständigem Herzgewebe ebenfalls zu keiner Beeinflussung (z.B. Verlust) auf Proteinebene im Vergleich zu einer Kardiomyozyten-Isolation kommt, und somit reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Hierzu wurden die bereits auf mRNA-Ebene getesteten fünf Kandidaten (Kapitel VI.1.3.) untersucht.



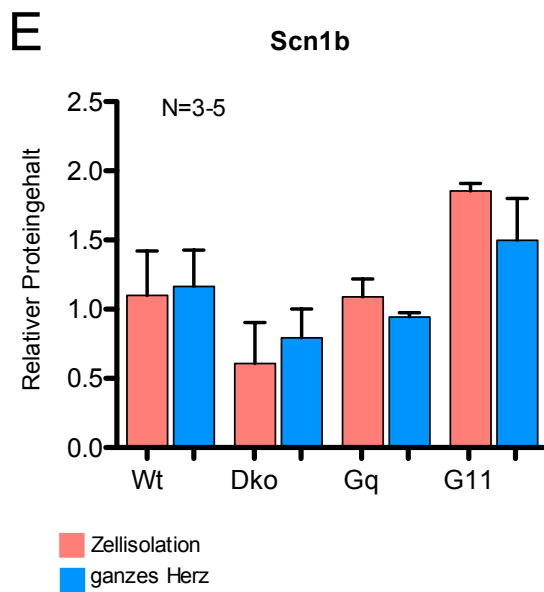


Abb. 28: Vergleich der relativen Proteinmengen der fünf untersuchten Kandidaten des CMC-Signalweges zwischen Ganzherz und isolierten Herzmuskelzellen von Versuchsmäusen mit $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -WT, -dKO sowie den jeweiligen sKOs. Dargestellt ist das auf die Ladekontrolle *GAPDH* normierte Proteinlevel von je drei Ganzherzen (in blau) bzw. drei Zellisolationen (in rot) der jeweiligen Genotypen. **A)** Vergleich von *Atp1a1* **B)** *Ctgf*, **C)** *MLP*, **D)** *Mybpc3* und **E)** *Scn1b*. Pro Genotyp und Ausgangsmaterial wurden N = 3-4 Proben/Tiere analysiert. Die gemessenen Proteinmengen wurden gemittelt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum statistischen Vergleich der Experimente zwischen Zellisolation und Ganzherz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Wie schon bei der Analyse der mRNA-Level zeigen auch die Untersuchungen auf Proteinebene, dass auf eine zeitaufwendige Zellisolation verzichtet werden kann, da es weder beim WT noch bei den jeweiligen Knockouts zu starken Unterschieden im relativen Proteingehalt zwischen ganzem Gewebe und isolierten Zellen kommt. Bis auf wenige Ausreißer (ohne statistische Signifikanz), ist in allen Fällen eine weitgehend homogene Verteilung zwischen Ganzherzen und isolierten Kardiomyozyten zu beobachten und die Schwankungen sind wahrscheinlich auf das jeweilige Versuchstier zurückzuführen. Nach diesen Voruntersuchungen wurden, wie in Abb. 29 dargestellt, *ATP1A1*, *CSRP3*, *CTGF*, *MYBPC3* und *SCN1B* nochmals final auf Proteinebene (Verwendung von Ganzherzen) analysiert und ausgewertet. Hierbei wurden je zwei Versuchstiere pro Genotyp (WT, dKO und sKO) getestet.

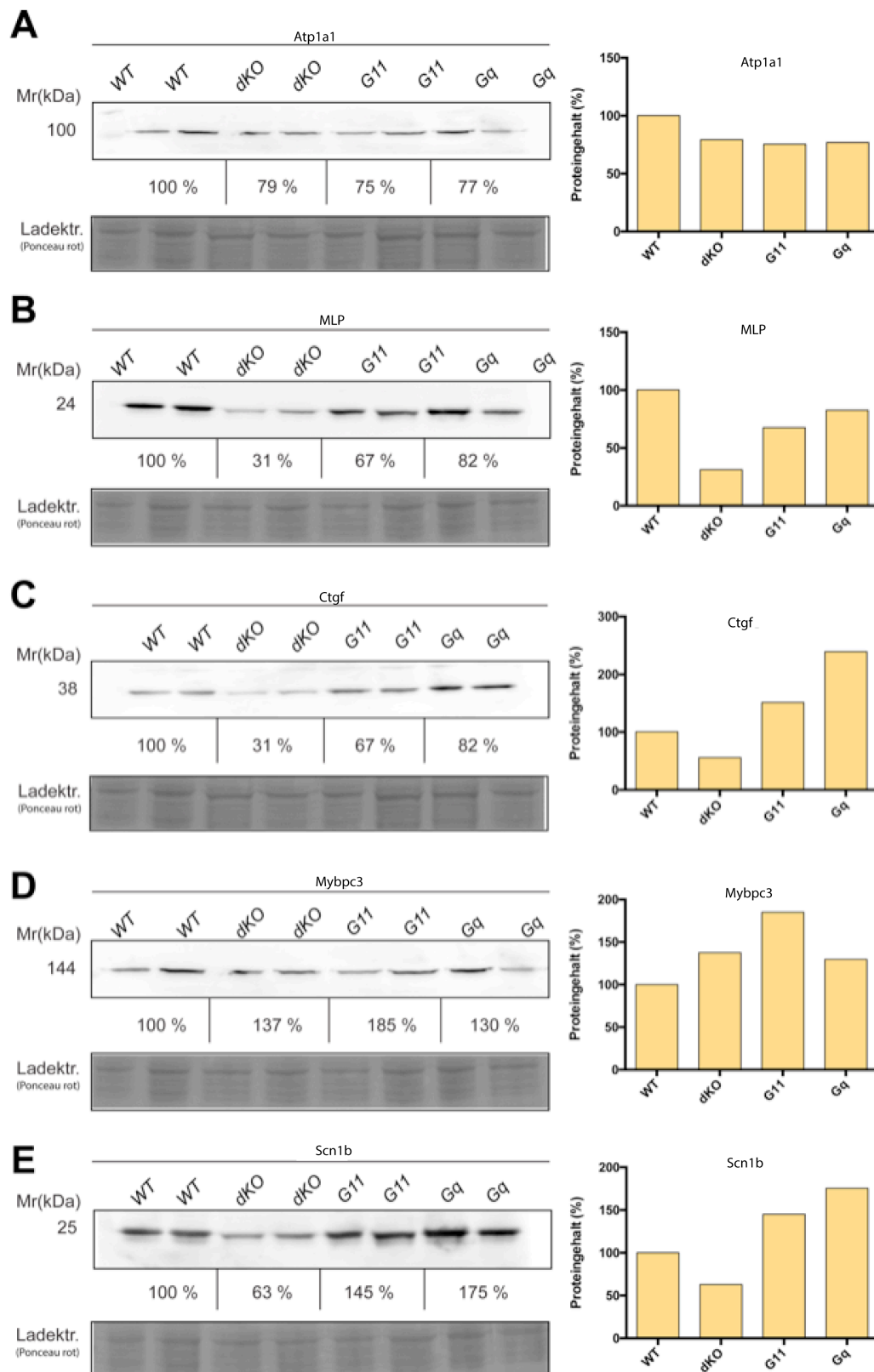


Abb. 29: Western-Blot-Analyse des relativen Proteingehaltes der fünf zuvor mittels qPCR untersuchten Kandidaten in unterschiedlichen Genotypen (WT, dKO und sKO) und semi-quantitative Auswertung. Herzgewebe von je zwei Versuchstieren pro Genotyp. **A)** Western-Blot Analyse von Atp1a1, **B)** von MLP, **C)** von Ctgf, **D)** von Mybpc3 und **E)** von Scn1b (Ladekontr. (Ponceau rot) = Ladekontrolle zur Normierung des Proteingehaltes).

Die Western-Blot-Analyse zeigt eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes bei dKO-Tieren im Fall von MLP und Ctgf sowie eine leichte Reduktion im Fall von Scn1b und Atp1a1. Eine Ausnahme bildet dagegen Mybpc3, welches eine Erhöhung des Proteingehaltes (137 %) bei dKO Tieren aufweist. Am deutlichsten ist die Reduktion im Fall von MLP zu beobachten. Im Vergleich zu den WT-Proben liegt die Proteinmenge bei dKO-Herzen bei nur noch 31 %, bei $G_{\alpha 11}$ sKO-Herzen bei 67 % und bei $G_{\alpha q}$ sKO-Herzen bei 82 %. Auf Proteinebene ist demnach der regulatorische Effekt am stärksten ausgeprägt, wenn beide Gene, $G_{\alpha 11}$ und $G_{\alpha q}$, ausgeschaltet sind.

Aufgrund dieser abgestuften Expressionsregulation und des offensichtlich additiven Effekts der beiden sKOs wurde im Folgenden das Gen *CSRP3* mit seinem Genprodukt MLP in den weiteren Fokus der Untersuchungen gestellt. *CSRP3* bzw. MLP (muscle LIM protein) gehört zur Gruppe der Cystein-reichen LIM-Domänen Proteine (CRPs) und wird ausschließlich im Herzen und in der quergestreiften Skelettmuskulatur exprimiert. MLP ist ein relativ kleines, aus 194 Aminosäuren bestehendes Protein. Die Struktur besteht aus zwei LIM-Domänen, die jeweils von Glycin-reichen Sequenzabschnitten umgeben sind (Arber et al. 1994). Die so genannten LIM-Domänen dienen hauptsächlich der Vermittlung von Protein-Protein- aber auch Protein-Nukleinsäuren-Interaktionen, wobei diese sowohl strukturelle als auch signalweiterleitende Funktionen erfüllen können. Es wird vermutet, dass viele LIM-Proteine als Antwort auf spezifische Signale in den Zellkern wandern, wo sie dann zur Regulation der Genexpression beitragen (Arber et al. 1994; Boateng et al. 2009; Qi & Boateng 2006). Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch weitgehend unklar. Analysen eines etablierten MLP-KO Mausmodells untermauern die Bedeutung von MLP und liefern Hinweise auf mögliche MLP-assoziierte Mechanismen, die letztlich zu Kardiomyopathien führen können (Henderson et al. 2003).

VI.3. Expressionsanalyse von Isoproterenol-induzierten und aortenkonstriktionierten Mäusen

Isoproterenol (Isoprenalin) ist ein synthetisches, racemisches Noradrenalin-Derivat, welches ausschließlich die β -Adrenozeptoren aktiviert, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Die Wirkung auf das Herz erfolgt durch die Stimulation der β_1 -Adrenozeptoren. Die Transduktion des Signals über den Rezeptor in das Zytosol bewirkt die Aktivierung der Adenylylcyclase, welche die Synthese des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) katalysiert. Durch Erhöhung der cAMP-Konzentration wird wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche die Phosphorylierung diverser Zielproteine katalysiert und die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostasen beeinflusst. Dazu gehören u.a. spannungsabhängige Ca^{2+} -Ionenkanäle in der Plasmamembran, RyR-Rezeptoren (Ryanodin) im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) sowie Phospholamban, welches im dephosphorylierten Zustand die SERCA (Ca^{2+} -Pumpe in der SR-Membran) deaktiviert. Diese sind zusammen für eine Zunahme des Ca^{2+} -Einstroms während der Zell-Depolarisation verantwortlich. Die erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration führt letztlich zu einer erhöhten Herzmuskelkontraktion.

In Tierexperimenten ist die Verabreichung hoher Dosen Isoproterenol ein etabliertes Modell zur Induktion von DCM (Spallek 2012; Fahlke et al. 2012). Diese Wirkung von Isoproterenol wurde sich zu Nutze gemacht, um die Expression von *CSRP3* in einem dilatativen Herzen zu analysieren. Schon länger ist bekannt, dass eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) durch Mutationen sarkomerer Proteine, Proteine der Zellmembran, des Zytoskeletts und des Zellkerns verursacht sein können (Ahmad et al. 2005; Frey & Katus 2007; Mestroni et al. 1999; Pyle & Solaro 2004). Eine wichtige Komponente des Sarkomers, die Z-Scheibe, scheint dabei eine sehr wichtige Rolle zu spielen, denn Mutationen von MLP, welches unter anderem an der Z-Scheibe sitzt, inhibiert die Bindung des MLP/T-Cap-Proteinkomplexes an die Z-Scheibe (Frey & Katus 2007; Ardehali et al. 2004). Dieser Komplex ist offenbar von hoher Bedeutung, was auch eine etablierte MLP-KO Mauslinie zeigt (van den Bosch et al. 2005). Analysen dokumentieren, dass bei einem frühen Phänotyp 50-70 % der Versuchstiere 24 h nach der Geburt sterben. Im adulten Phänotyp entwickeln die Mäuse zwei bis vier Wochen nach der Geburt eine DCM. Das Herzgewebe ist weicher und zeigt eine stark verminderte Muskelspannung, zudem sind die Glanzstreifen und Z-Scheiben desorganisiert und verbreitert (Hoshijima et al. 2006; Knöll, Hoshijima & Chien 2002).

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte im Rahmen dieser Arbeit die MLP-Expression bei herzkranken, an DCM leidenden Mäusen untersucht werden. Dazu wurden sechs Wochen alte Kontrollmäuse (BL6) fünf Tage lang täglich 200 mg/kg bzw. 300 mg/kg Isoproterenol injiziert. Im Anschluss, nach weiteren 19 Wochen, erfolgte die Herzisolation.

Zudem wurden fünf Wochen alte Mäuse untersucht, welche operativ eine Nachlasterhöhung durch Aortenkonstriktion („aortic banding/transverse aortic constriction“, TAC) des linken Ventrikels erhielten. Eine erhöhte Nachlast entsteht im Menschen z.B. durch eine Erhöhung des peripheren Widerstandes. Dies entsteht im Fall einer peripheren Verschlusskrankheit sowie bei einer erhöhten Restriktivität des Gefäßsystems. Eine erhöhte linksventrikuläre Nachlast ist eine häufige Ursache für eine chronische linksventrikuläre Hypertrophie (Rockman et al. 1994; Rockman et al. 1991). Diese hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) kann durch eine monogen erbliche Erkrankung verursacht sein und gehört wie die DCM zu der großen Gruppe der Kardiomyopathien. Sie stellt daher einen interessanten Ansatzpunkt dar, um ebenfalls die Expression von *CSRP3*/MLP zu analysieren.

21 Tage nach dem operativen Eingriff (TAC) wurde das Herz final entnommen und untersucht. Als Kontrolle dienten sogenannte Sham Mäuse, welcher einer „sham“ (= Schein-Operation, d.h. Thoraxöffnung ohne Aortenkonstriktion) unterzogen wurden.

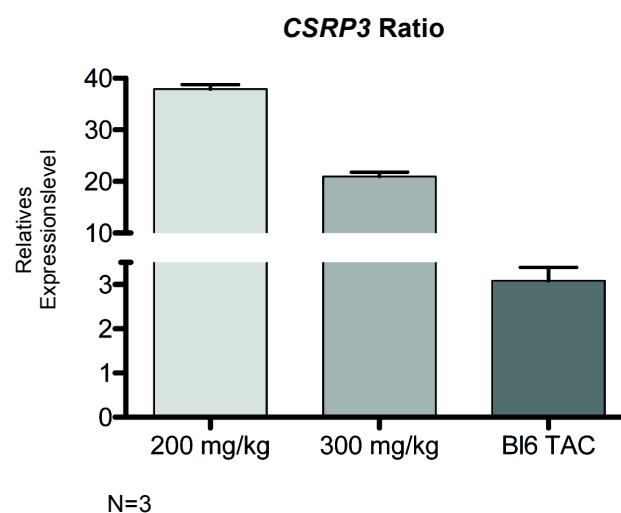


Abb. 30: Darstellung des relativen *CSRP3*-Expressionslevel von Isoproterenol behandelten sowie „TAC“ Mäusen. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Expressionsunterschiede verschieden behandelter Mäuse (31 Wochen alt). Die relative Expression errechnet sich aus den CT-Werten. Dazu wurde zuerst von den CT-Werten den Mittelwert aller korrespondierenden CT-Werte der „housekeeping“-Gene subtrahiert. Im Anschluss ergibt sich der 2-Delta CT-Wert aus der Subtraktion der Delta CT-Werte der Kontrollmaus (unbehandelte Maus), welcher im nächsten Schritt mit zwei potenziert wird.

Das Ergebnis in Abb. 30 zeigt eine drastische Expressionssteigerung auf mRNA-Level (qPCR-Analyse) von *CSRP3* im Fall der mit Isoproterenol induzierten DCM-Mäuse, wobei die niedrigere Konzentration (200 mg/kg) den höchsten Effekt erzielt (2-Delta CT = 37,5). Interessanterweise kann dieser Effekt nur gering bei TAC-Mäusen reproduziert werden. Im Vergleich zu den Isoproterenol injizierten Mäusen zeigen die TAC-Mäuse eine nur relativ geringe Expressionserhöhung von *CSRP3* (2-Delta CT = 3,0).

Zur internen Kontrolle der erfolgreich ausgeführten Aortenkonstriktion (TAC) wurden zum einen Normalisierungsparameter zur Bestimmung des Verhältnisses Herzgewicht/Tibiallänge bzw. Körpergewicht/Herzgewicht analysiert, und zum anderen drei Hypertrophie- bzw. Risiko-Marker mittels qPCR getestet (Anon 2017c). Bei diesen Markern handelt es sich um Interleukin 1, TGF β 1 sowie Phospholamban. Interleukin 1 ist ein Zytokin, welches eine zentrale Rolle in vielen wichtigen Entzündungskrankheiten in der Medizin einnimmt. Bei Kardiomyopathien kommt es zu einer erhöhten Interleukin-Ausschüttung (Anon 2017a). TGF β 1 („transforming growth factor beta“) ist wie Interleukin ebenfalls ein Zytokin, welches im Körper viele Funktionen übernimmt und in eine Vielzahl von Pathomechanismen involviert ist. Insbesondere wird es mit kardialem Remodeling und Herzversagen nach Myokardinfarkt in Verbindung gebracht. Der dritte Hypertrophie- bzw. Risiko-Marker, das Polypeptid Phospholamban, steuert die Ca²⁺-Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) und ist somit direkt in der Herzmuskelzelle zu finden. Dort ändert es, je nachdem ob es phosphoryliert ist seinen Aktivitätszustand und verhindert so (im dephosphorylierten Zustand) die Ca²⁺-Aufnahme ins SR während der Ruhephase des Myokards. Neuste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Mutationen von Phospholamban zur einer dilatativen Kardiomyopathie führen (Haghighi et al. 2014; Qian et al. 2011).

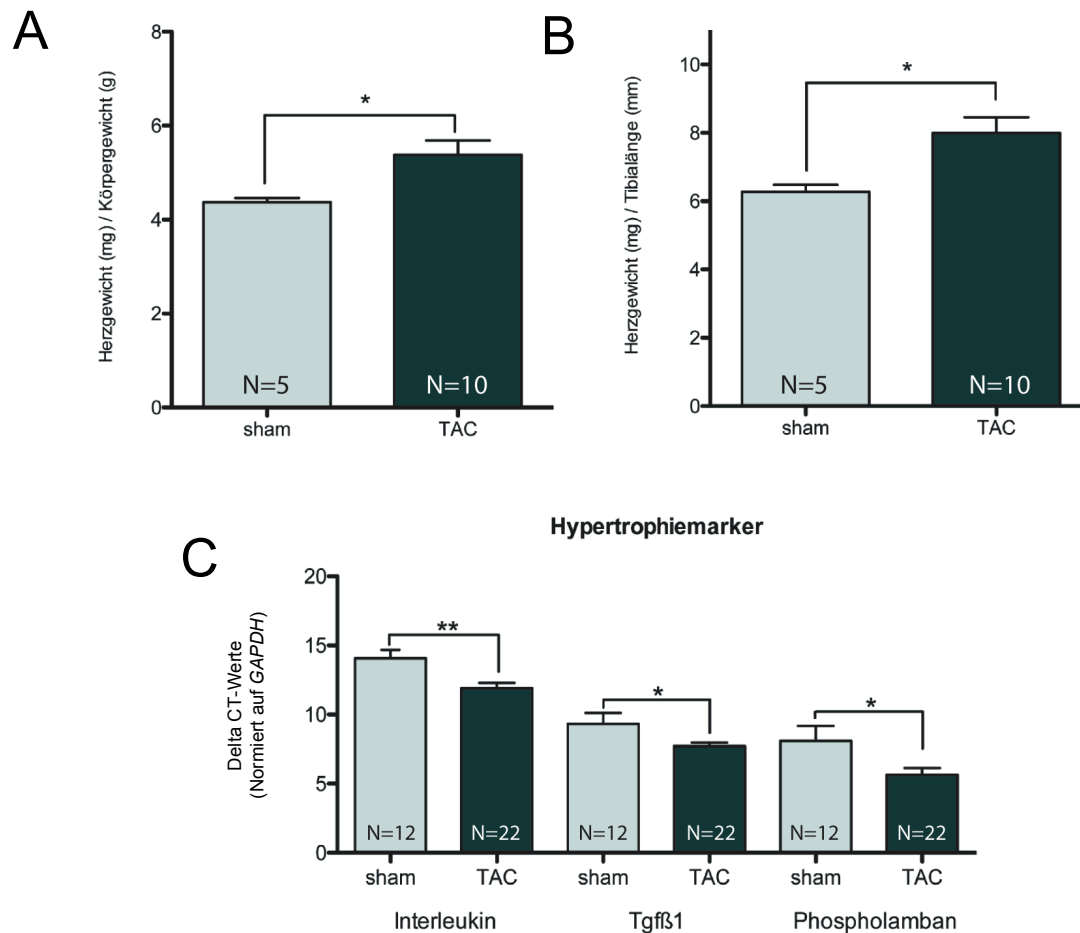


Abb. 31: Darstellung der internen Kontrolle von Normalisierungsparametern sowie der Genexpressionsbestimmung ausgewählter Hypertrophiemarker bei „TAC“ und Kontroll- (Sham) Mäusen. A), B) und C) dient zur internen Kontrolle und zeigt den **(A)** Anstieg des Herzgewichtes in Relation zum Körpergewicht und zur **(B)** Tibialänge, sowie **(C)** die quantitative Auswertung der Expressionsunterschiede typischer Hypertrophiemarker (Interleukin, Tgfbeta1 und Phospholamban) der Kontroll- und „TAC“-Mäuse. Zum statistischen Vergleich der Experimente zwischen den unterschiedlich behandelten Mäusen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% kalkuliert und P-Werte < 0,001 durch drei Sterne (***), P-Werte < 0,01 durch zwei Sterne (**) und P-Werte < 0,05 durch einen Stern (*) markiert.

Abb. 31 zeigt deutlich, dass die Aortenkonstriktion (TAC) erfolgreich war (n = 10 Versuchstiere). Sowohl Abb. 31 A als auch Abb. 31 B zeigt einen signifikanten Unterschied in den Normalisierungsparametern Körpergewicht/Herzgewicht bzw. Herzgewicht/Tibialänge zwischen TAC und Sham-Mäusen, was für ein vergrößertes Herz und somit für eine erhöhte Nachlast spricht. Die Hypertrophiemarker (n = 12), welche auch eine wichtige interne Kontrolle darstellen bestätigen erstere Ergebnisse. Abb. 31 C zeigt signifikante Expressionsunterschiede einzelner Hypertrophiemarker zwischen Sham- und TAC-Mäusen. In allen drei Fällen kommt es nach TAC-OP zu einer Erhöhung der jeweiligen Genexpression, zu erkennen an den jeweils signifikant verringerten Delta-CT-Werten.

VI.4. Expressionsanalyse von humanem Herzgewebe

Ähnliche Strukturveränderungen wie es durch Hoshijima et al. 2006 in der MLP-KO-Maus gezeigt wurde, findet man auch bei humanen Herzinsuffizienz-Patienten (weiches Herzgewebe mit verminderter Muskelspannung). Im Menschen zeigen neuste Studien, dass Veränderungen der MLP-Expression an der Entstehung von chronischen Herzerkrankungen beteiligt sein kann. Interessanterweise wurden Mutationen im Muskel-LIM-Protein (MLP) sowohl bei HCM- als auch bei DCM-Patienten gefunden. Diese führen sehr wahrscheinlich über Defekte in der kardialen Mechanosensorik zu diesen Krankheitsbildern (Su et al. 2001; Geier et al. 2008; Riecker 2013; Reuter 2004).

Untersuchungen von humanem Herzgewebe bzw. Herzohr-Proben sollten mögliche Unterschiede in der Expression zwischen Kontrollpatienten (Bypass) und erkrankten Personen (kardiale Hypertrophien) aufklären. Diese Untersuchungen wurden aufgrund der geringen Mengen an Patientenproben lediglich auf mRNA-Ebene durchgeführt (siehe Abb. 32).

Herzohren (*auricula atril*) sind Ausstülpungen der Herzvorhöfe (Atria). Da Herzoperationen (z.B. Bypass-OP, Aortenklappenrekonstruktion) nur bei einem stillgelegten Herzen durchführbar sind, wird eines der Herzohren entnommen, um dort die Kanüle der Herz-Lungen-Maschine (HLM) einzuführen. Die HLM ermöglicht einen Kreislaufstillstand, da die Maschine für einen bestimmten Zeitraum Funktionen wie Pumparbeit des Herzens, Gasaustauschfunktionen der Lunge, Temperaturregulation, Nierenfunktion und bei Bedarf auch die Wasserausscheidung für den Körper übernimmt. Die entnommenen Herzohren wurden uns von Prof. Dr. Schäfers, Herzchirurgie (Universitätsklinikum des Saarlandes) zur Verfügung gestellt (Details siehe Anhang XI1). Diese wurden wie oben beschrieben zur mRNA-Expressions-Analyse eingesetzt. Die verwendeten Primer binden am Anfang und am Ende der Nukleotidsequenz von *CSRP3* (siehe Abb. 33). Abb. 32 A und B zeigen, dass zusätzlich zum Volllänge-MLP (585 bp) kürzere DNA-Fragmente gefunden werden konnten (416 bp, 385 bp und 282 bp), wobei es sich vermutlich um unterschiedliche Splice-Varianten von MLP handelt. Zur Bestätigung dieser These wurden die gefundenen Fragmente mittels DNA-Sequenzierung (GATC-Biotech AG, Köln) untersucht. Dabei handelt es sich bei dem Fragment bei 416 bp um eine Splice-Variante ohne Exon 3, bei dem Fragment auf Höhe von 385 bp um eine Variante ohne Exon 3b und 4a, und bei dem Fragment bei 282 bp um eine *CSRP3*-Splice-Variante ohne Exon 3 und 4.

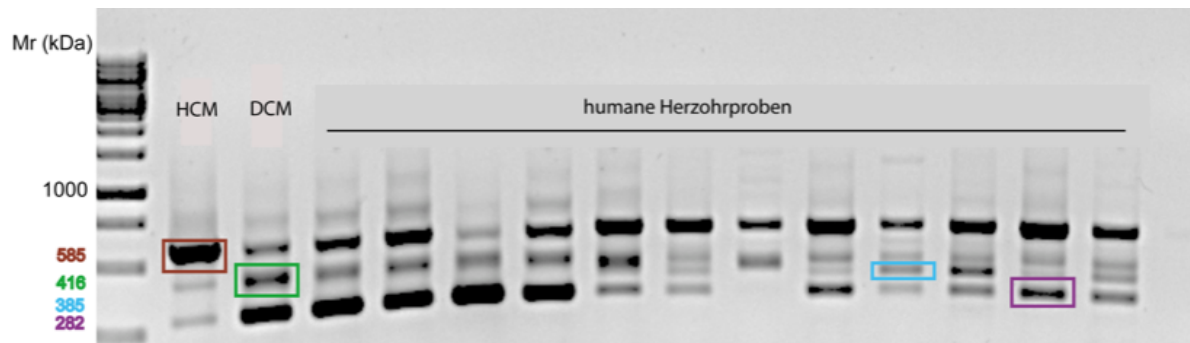


Abb. 32: Screening von humanen HCM- DCM- und Herzohr-Proben verschiedener Patienten auf mRNA-Ebene. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate zeigt neben dem *CSRP3*-Volllänge mRNA weitere verkürzte Fragmente, Splice-Varianten von *CSRP3*. Die *CSRP3*-Volllänge mRNA (rot) beträgt 585 bp und ist bei allen Proben sichtbar. Die Splice-Variante ohne Exon 3 (grün) läuft bei 416 bp, die Variante ohne Exon 3b und 4a (blau) bei 385 bp. Die Splice-Variante ohne Exon 3 und 4 (lila) befindet sich bei 282 bp und ist bei allen Patienten unterschiedlich stark exprimiert.

Abb. 33 zeigt die detaillierte DNA-Sequenz von *CSRP3* mit seiner kompletten Nukleotidabfolge (SnapGene®). Insgesamt besteht *CSRP3* aus 585 bp. In grün unterlegt sind die einzelnen Exons (E2 bis E6). Rot markiert sind in der Abb. 33 die gefundenen Splice-Varianten:

- Splice-Variante 1 - ohne Exon3 und 4 (283 bp)
- Splice-Variante 2 - ohne Exon 3b und 4a (387 bp)
- Splice-Variante 3 - ohne Exon3 (481 bp)

Bei den in Abb. 32 und 33 gezeigten Splice-Varianten ergibt sich eine teilweise veränderte Aminosäuresequenz im korrespondierenden Protein. Hierbei sind die LIM-Domänen nicht mehr oder nur noch teilweise vorhanden. Dies könnte zu einem funktionellen Verlust der Interaktionsdomänen und somit zu einem Verlust von Interaktionspartnern von MLP in der Zelle führen. Neben den LIM-Domänen ist in den Splice-Varianten ebenfalls die NLS (Nukleäres Lokalisationssignal) betroffen. Sie fehlt komplett, so dass der Kern-Transport von MLP eingeschränkt sein könnte. All dies macht deutlich, dass die einzelnen Splice-Varianten nicht nur strukturell, sondern auch deutlich in ihrer Funktion verändert bzw. beeinträchtigt sein könnten.

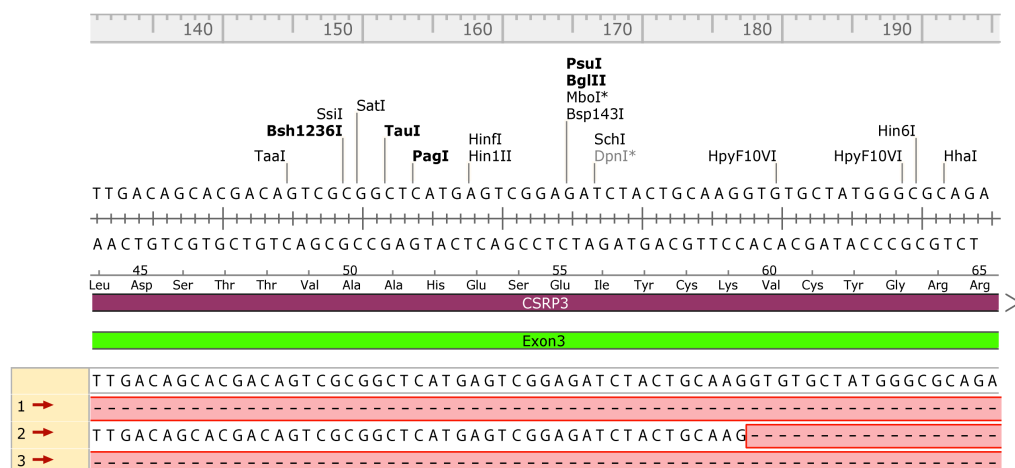
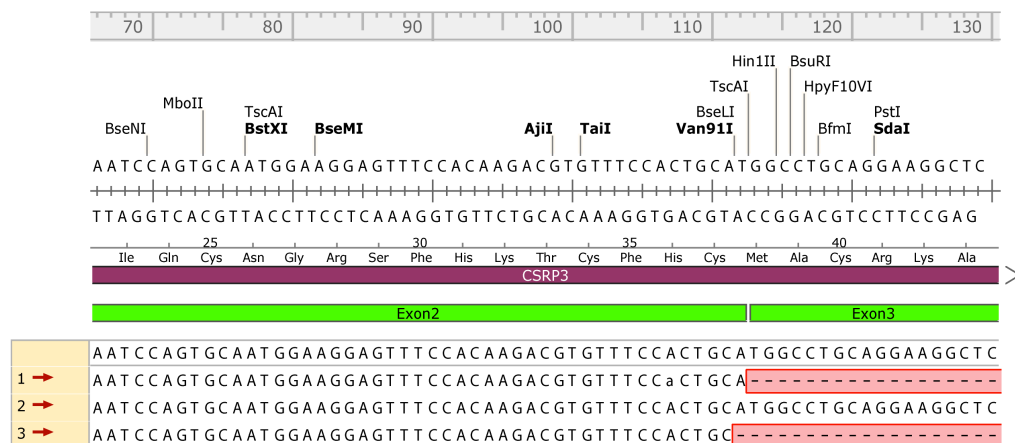
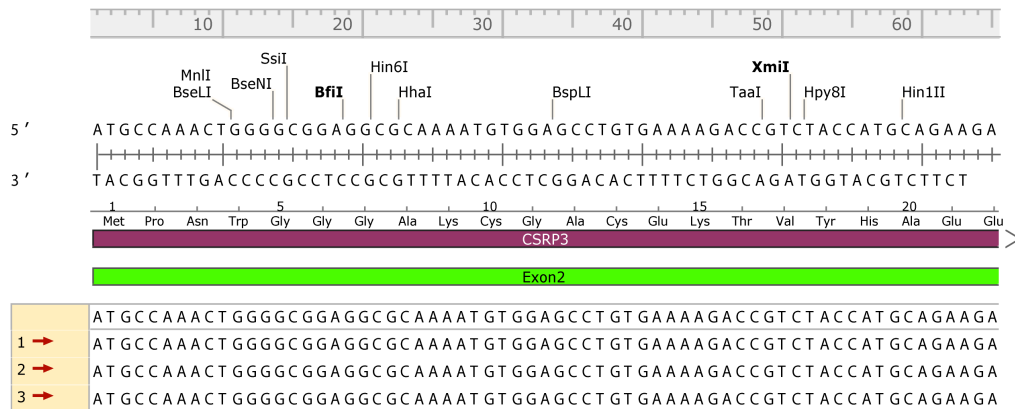
Da noch keine Proteinstruktur von MLP bekannt ist wurden bekannte Strukturen von LIM-Proteinen verwendet, um ein 3D-Homologie-Modell von MLP sowie den gefundenen Splice-Varianten zu erstellen (Verwendete Software: RaptorX). Eine Kristallstrukturanalyse könnte in zukünftigen Ansätzen noch mehr Klarheit über die Strukturen der gefundenen Proteinvarianten bringen. Mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse kann die räumliche Anordnung der Atome in kristallinen Festkörpern durch Röntgen-, Elektronen-, Synchrotron-, Protonen- oder Neutronenstrahlen, deren Wellenlängen etwa den Atomabständen in Kristallgittern entsprechen, ermittelt werden. Die häufigste Form der Kristallstrukturanalyse, die Röntgenstrukturanalyse, beruht auf der Beugung und Interferenz von Röntgenstrahlen an den Elektronen der Gitteratome (Röntgenbeugung) (Schwedt et al. 2016; Anon 2003a).

Abb. 34 veranschaulicht das für MLP ermittelte 3D-Homologiemodell. Zudem ist die detaillierte Aminosäuresequenz von MLP inklusive der relevanten Protein-Domänen dargestellt.

VI. ERGEBNISTEIL

Sequence: CSRP3-201 cDNA.dna (Linear / 585 bp)
 Enzymes: ThermoFisher (Fermentas) (206 of 653 total)
 Features: 6 visible, 6 total

Unique Cutters **Bold**



VI. ERGEBNISTEIL

CSRP3-201 cDNA.dna (Linear / 585 bp)



VI. ERGEBNISTEIL



Abb. 33: Detaillierte Darstellung der Nukleotidsequenz von CSRP3 mittels SnapGene®. Unterhalb der Nukleotid-Sequenz ist zusätzlich die komplette Aminosäureabfolge (Drei-Buchstaben-Code) von Csrp3/MLP entsprechend der 585 bp der kodierenden Gen-Sequenz dargestellt. In grün unterlegt sind die einzelnen Exons (E2 bis E6). Rot markiert sind die gefundenen Splice-Varianten. Splice-Variante 1 ohne Exon 3 und 4 (283 bp), Splice-Variante 2 ohne Exon 3b und 4a (387 bp) und Splice-Variante 3 ohne Exon 3 (481 bp).

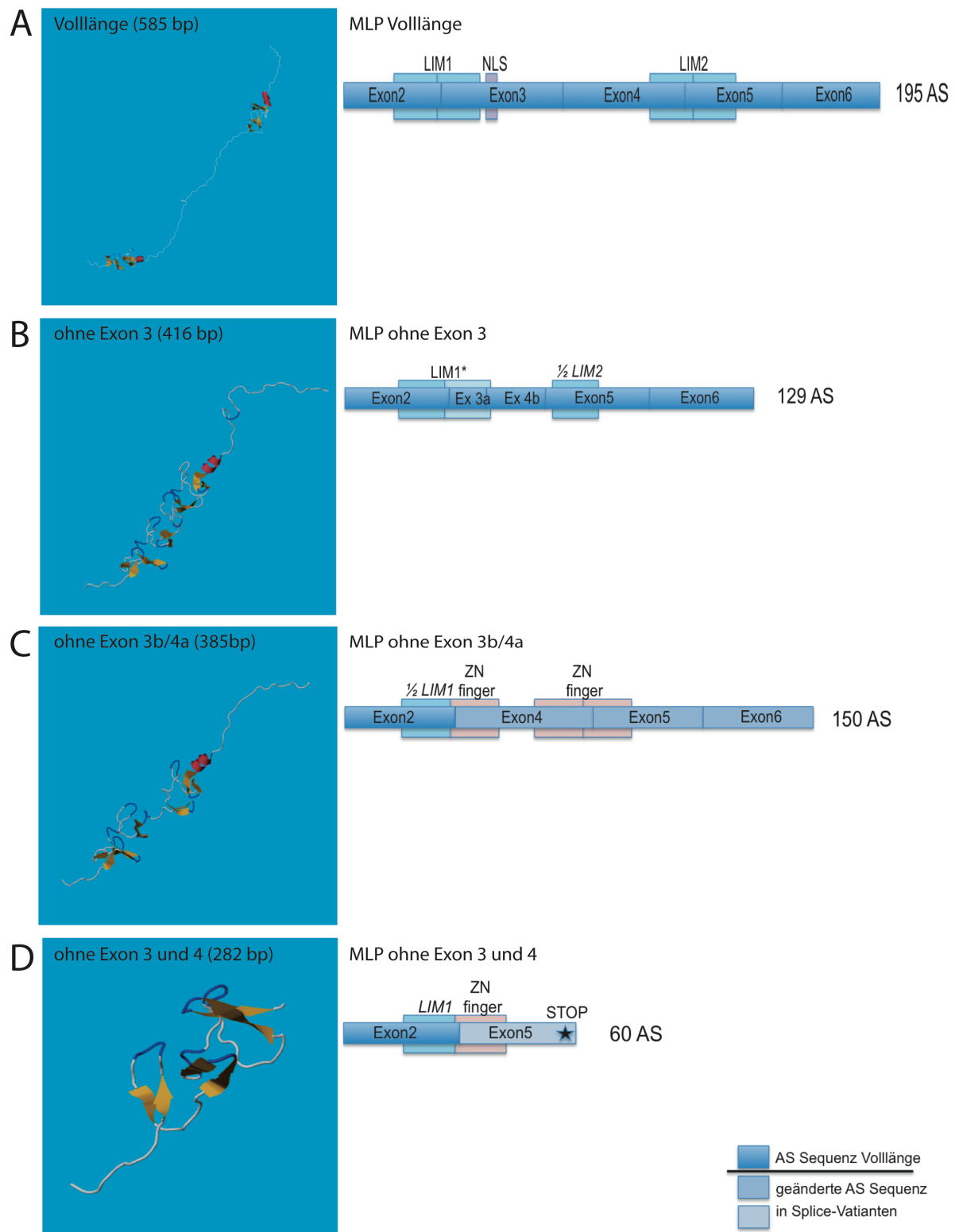
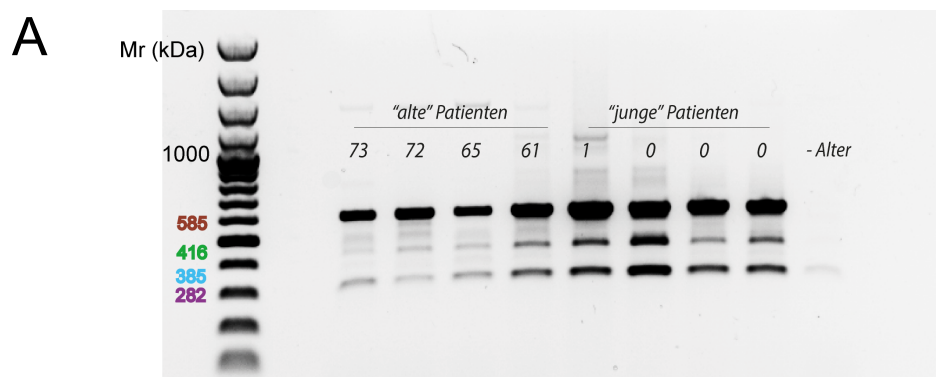


Abb. 34: 3D-Struktur-Darstellung neuer Splice-Varianten von MLP mittels 3D-Homologie-Modellierung (RaptorX). Modell des MLP-Proteins sowie der jeweiligen Splice-Varianten mit den korrespondierenden Aminosäure-Sequenzen. **A)** MLP Volllänge (195 AS) mit seinen zwei vollständig intakten LIM Domänen. **B)** Splice-Variante ohne Exon 3 (129 AS). Hierbei kommt es zu einer unvollständigen LIM-Domäne. **C)** MLP-Variante ohne Exon 3b und 4a (150 AS), in der sowohl die LIM-Domäne, als auch die ZINK-Finger-Domäne unvollständig sind. **D)** MLP ohne Exon 3 und 4 (60 AS) und somit die kleinste MLP-Splice-Variante. Dieses Protein besteht nur noch aus einer LIM-Domäne und einem Teil einer Zink-Finger-Domäne.

VI.5. Expressionsanalyse der *CSRP3*-Volllänge humaner Herzhoren unterschiedlichen Alters

Anhand bisheriger Kenntnisse wird vermutet, dass die Regulation der Kontraktion der Sarkomere größtenteils über die Z-Scheibe abläuft. MLP wird als ein Z-Scheiben-assoziiertes Signal- bzw. Adapterprotein postuliert, das infolge einer Stimulation vermutlich seine Konformation ändert bzw. monomerisiert und in den Kern transloziert, wo es mit Transkriptionsfaktoren interagiert, um die Genexpression zu modulieren (Hoshijima et al. 2006; Voelkel & Linke 2011; Frank et al. 2006). Dementsprechend führt ein Defekt bzw. eine Mutation von *CSRP3* zur Dysregulation dieser Signalwege. Wie in Abb. 34 deutlich zu sehen ist besitzen die MLP-Splice-Varianten zum Teil nur noch Bruchstücke von LIM-Domänen oder sie fehlen vollständig, was die Protein-Protein-Interaktionen potentiell stark verändert. Zudem fehlt in allen Splice-Varianten das Kernlokalisierungssignal (NLS), was eine Translokation des Proteins in den Zellkern inhibiert. All dies lässt vermuten, dass Mutationen bzw. veränderte Splice-Varianten von *CSRP3* die Signalweiterleitung verändern, was potentielle Veränderung der zellulären Homöostase bewirken kann.

Da alle in Abb. 32 gezeigten Patientenproben große Unterschiede in der vorhandenen mRNA-Menge aufzeigten, galt es dies genauer zu analysieren und mögliche Rückschlüsse auf die Erkrankungen zu ziehen. Die in Abb. 32 gezeigte Untersuchung wurde mit humanen Proben von Patienten im Alter von 40–80 Jahren durchgeführt, welche von Prof. Dr. Schäfers und Prof. Dr. Abdul-Khaliq Herzchirurgie / Universitätsklinikum des Saarlandes zur Verfügung gestellt wurden. Eine interessante Frage, die sich in diesem Zusammenhang stellte, war, ob sich die vermeintlich „gesunde“ Variante, die Volllänge von MLP/*CSRP3*, mit dem Alter und im Rahmen der Erkrankung in ihrer Menge bzw. im Verhältnis zu den anderen Splice-Varianten verändert. Um dies zu untersuchen wurden humane Herzproben junger und alter Patienten hinsichtlich der mRNA-Expression der *CSRP3*-Volllänge mittels qPCR untersucht (siehe Abb. 35 A, B und C).



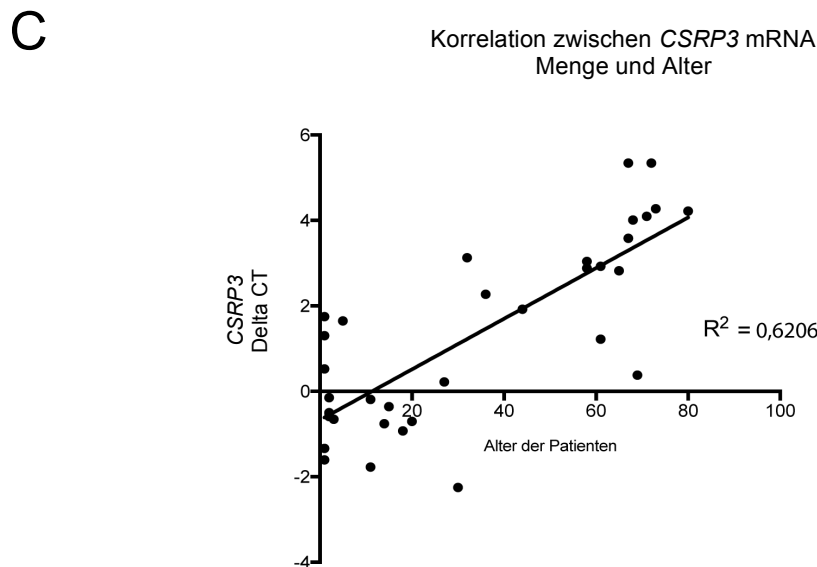
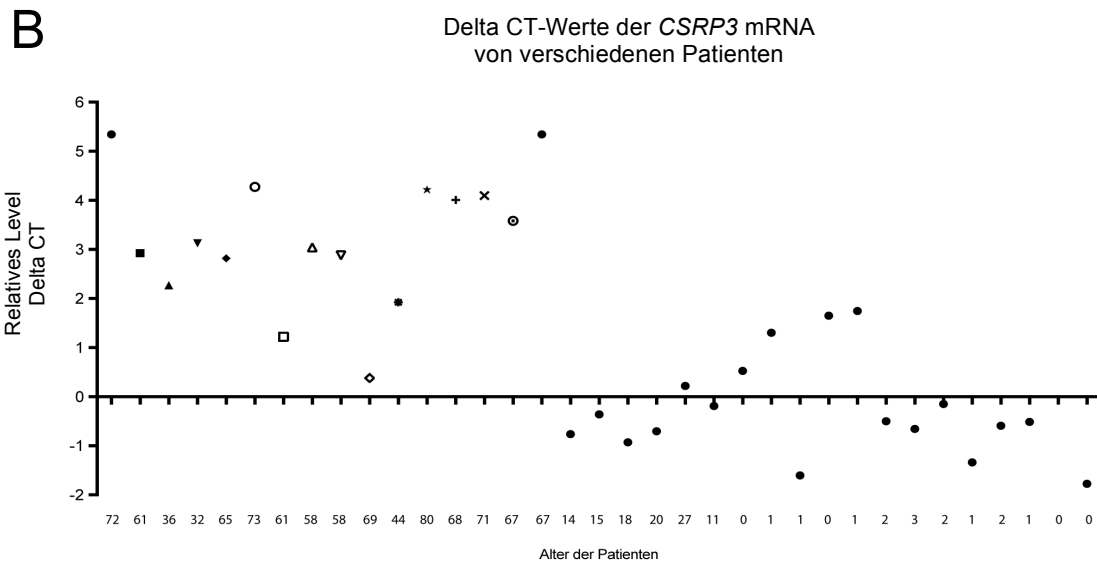
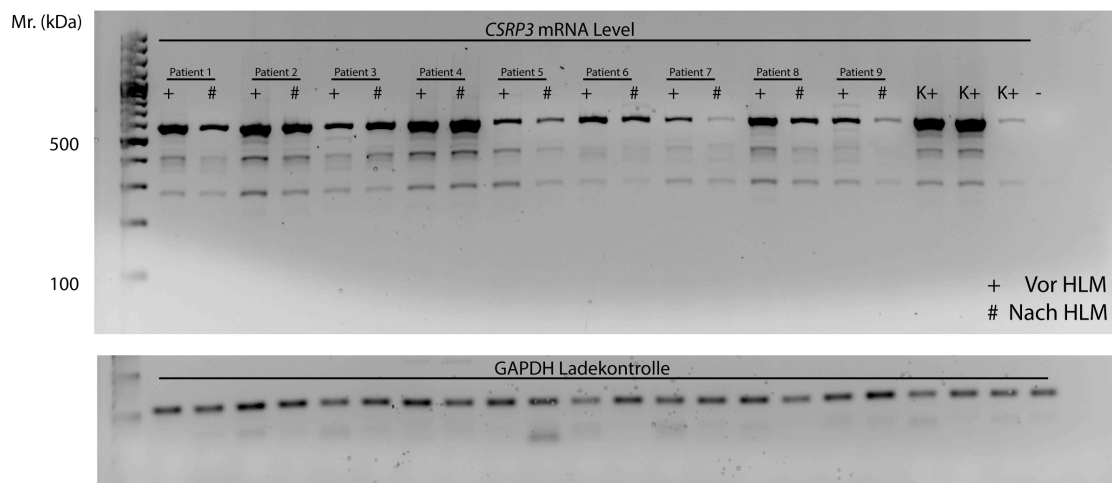


Abb. 35: Darstellung der Splice-Varianten auf mRNA-Ebene sowie der Delta CT-Werte von *CSRP3* verschiedener Patienten unterschiedlichen Alters. A) Splice-Varianten von *CSRP3* verschiedener Patienten unterschiedlichen Alters. Die *CSRP3*-Volllänge mRNA (rot) mit 585 bp ist bei allen Proben sichtbar. Die Splice-Variante ohne Exon 3 (grün) läuft bei 416 bp, die Splice-Variante ohne Exon 3b und 4a (blau) bei 385 bp, die Splice-Variante ohne Exon 3 und 4 (lila) befindet sich bei 282 bp. **B)** Quantitative Auswertung der Expressionsunterschiede verschiedener Patienten, gemessen wurden Triplikate von 35 verschiedenen Proben. Delta CT-Werte werden errechnet, indem von den CT-Werten den Mittelwert aller korrespondierenden CT-Werte der „housekeeping“-Gene subtrahiert werden. **C)** Korrelation zwischen Alter und Expressionsniveau (Delta-CT-Wert) von *CSRP3* (R^2 = Korrelationskoeffizient zur Beschreibung des linearen Zusammenhangs der zu vergleichenden Parameter; $0 \triangleq$ kein Zusammenhang; $1 \triangleq$ 100% Zusammenhang).

In Abb. 35 A wird deutlich, dass die mRNA Menge von *CSRP3*-Volllänge bei jungen Patienten deutlich höher ist als bei älteren Patienten. Rückschlüsse auf die Art der Erkrankung können jedoch nicht hergestellt werden. Allerdings scheint die Menge der Expression von MLP-Volllänge mit dem Alter der Personen zu korrelieren ($R^2 = 62\%$; siehe Abb. 35 C). Dies könnte darauf hindeuten, dass mit zunehmendem Alter die Anzahl der Mutationen bzw. der Grad des Splicings zunimmt und das Gleichgewicht zugunsten der *CSRP3*/MLP-Splice-Varianten verschoben wird.

Im Rahmen der vergleichenden Untersuchungen des Expressionsniveaus von *CSRP3* zwischen jungen und alten Patienten wurden weitere Proben hinzugezogen, um eine breitere Alterspanne abzudecken und noch eindeutiger Ergebnisse zu erhalten. Hierbei wurden zusätzliche Patienten-Proben (null bis 2 Jahre) verwendet, bei denen Herzvorhöfe vor und nach Anschluss an die HLM (Herz-Lungen-Maschine) entnommen wurden. Untersucht werden sollte, ob durch die Stilllegung des Herzens mit der HLM und die damit fehlende Kontraktionsleistung des Herzens die Anforderungen an die Signalweiterleitung über MLP sinkt, was sich somit in einer geringeren Genexpression äußern könnte. Interessanterweise zeigen diese Untersuchungen deutliche Unterschiede in der Expression der *CSRP3*-Volllänge auf mRNA-Ebene. Nach Anschluss der HLM für ca. 2 h (Dauer der Herzoperation) wurden im Durchschnitt 53,1 % niedrigere *CSRP3*-Expressionswerte ermittelt (siehe Abb. 36). Dieses Ergebnis spricht für eine kurzfristige Adaption der *CSRP3*/MLP-Expression an die Umgebungsbedingung des Herzens. Die in Abb. 36 A gezeigten Expressionsmuster auf mRNA-Ebene einzelner Patienten vor und nach HLM weisen auf keine Veränderungen der Splice-Varianten auf.

A



B

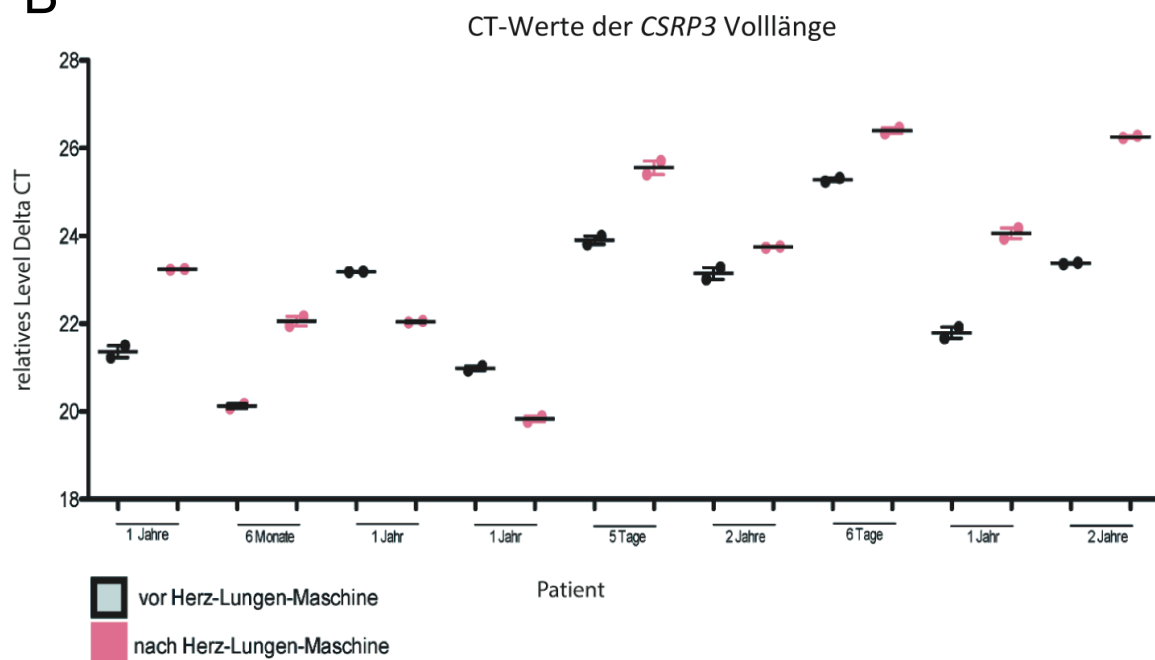


Abb. 36: Darstellung der CSRP3-Expression verschiedener Patienten unterschiedlichen Alters vor und nach HLM. A) Screening von humanen Herzohr-Proben auf mRNA-Ebene vor und nach HLM. Die CSRP3-Volllänge mRNA beträgt 585 bp und ist bei allen Proben sichtbar, jedoch nach HLM weniger stark exprimiert. Die Splice-Variante ohne Exon 3 läuft bei 416 bp, die Splice-Variante ohne Exon 3b und 4a bei 385 bp, die Splice-Variante ohne Exon 3 und 4 befindet sich bei 282 bp und ist bei allen Pateinten unterschiedlich stark exprimiert bzw. nicht vorhanden. **B)** Quantitative Auswertung der Expressionsunterschiede (Delta CT-Werte) von CSRP3 nach qPCR-Analyse von verschiedenen Patienten vor und nach HLM, gemessen wurden Triplikate von 18 Proben.

Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der *CSRP3*-Menge mit dem Alter, wie in Abb. 35 C gezeigt, ein generelles Phänomen darstellt wurde zudem die Menge an *CSRP3*-Volllänge in Rattenzellen von drei alten Tieren (sechs bis 21 Monate) und sechs Neugeborenen (ein Tag) mittels qPCR-Messungen analysiert (siehe Abb. 37). Auch hier ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem *CSRP3*-Expressionsniveau junger und alter Individuen festzustellen. In den nur wenigen Stunden alten Ratten ist eine höhere Expression von *CSRP3* zu sehen, wohingegen die alten Tiere eine geringere Expression aufweisen. Dennoch ist der Unterschied nicht so ausgeprägt wie in den humanen Proben (Abb. 36).

Jedoch bleibt anzumerken, dass es sich bei den humanen Proben um erkrankte Menschen handelt (Patienten mit Kardiomyopathien) und somit auch eine genetische Vorbelastung besteht. Ferner beträgt der Altersunterschied der humanen Proben bis zu 40 Jahre, wohingegen sich die Zeitspanne bei den Ratten auf lediglich maximal 21 Monate beläuft. Die in Abb. 37 gezeigten Messungen wurden mit gesunden Ratten durchgeführt, ohne jegliche Vorerkrankungen des Herzens.

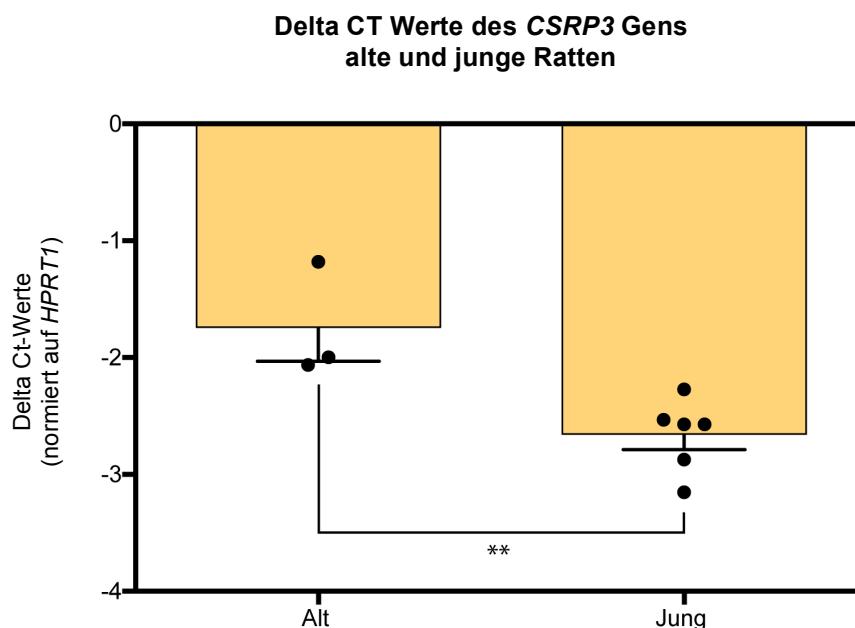


Abb. 37: Darstellung der Delta CT-Werte nach qPCR-Analyse von *CSRP3* von Ratten mit unterschiedlichem Alter. Quantitative Auswertung der *CSRP3*-Expressionsunterschiede verschiedener Ratten unterschiedlichen Alters. Die Delta CT-Werte werden errechnet, indem man von den CT-Werten den Mittelwert aller korrespondierenden CT-Werte der „housekeeping“-Gene subtrahiert. Angezeigt ist zudem der Standardfehler aller 3 bzw. 6 gemessenen Proben. Zum statistischen Vergleich der Messung zwischen Alt und Jung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von 95 % kalkuliert und P-Werte < 0,01 durch zwei Sterne (**) markiert.

VI.6. Herstellung und Testung spezifischer MLP-Antikörper

Die Ergebnisse aus Abb. 33 und Abb. 34 zeigen, dass es wichtig ist, spezifische Antikörper gegen die gefundenen Splice-Varianten zu generieren, damit die verschiedenen Isoformen auf Proteinebene zu unterscheiden sind und in Patientenproben analysiert werden können. Die Vorhersage der jeweiligen Epitope erfolgte mittels der Online-Software SVMTrip, welches lineare Sequenzen ohne Berücksichtigung räumlicher Strukturen analysiert (siehe Abb. 38).

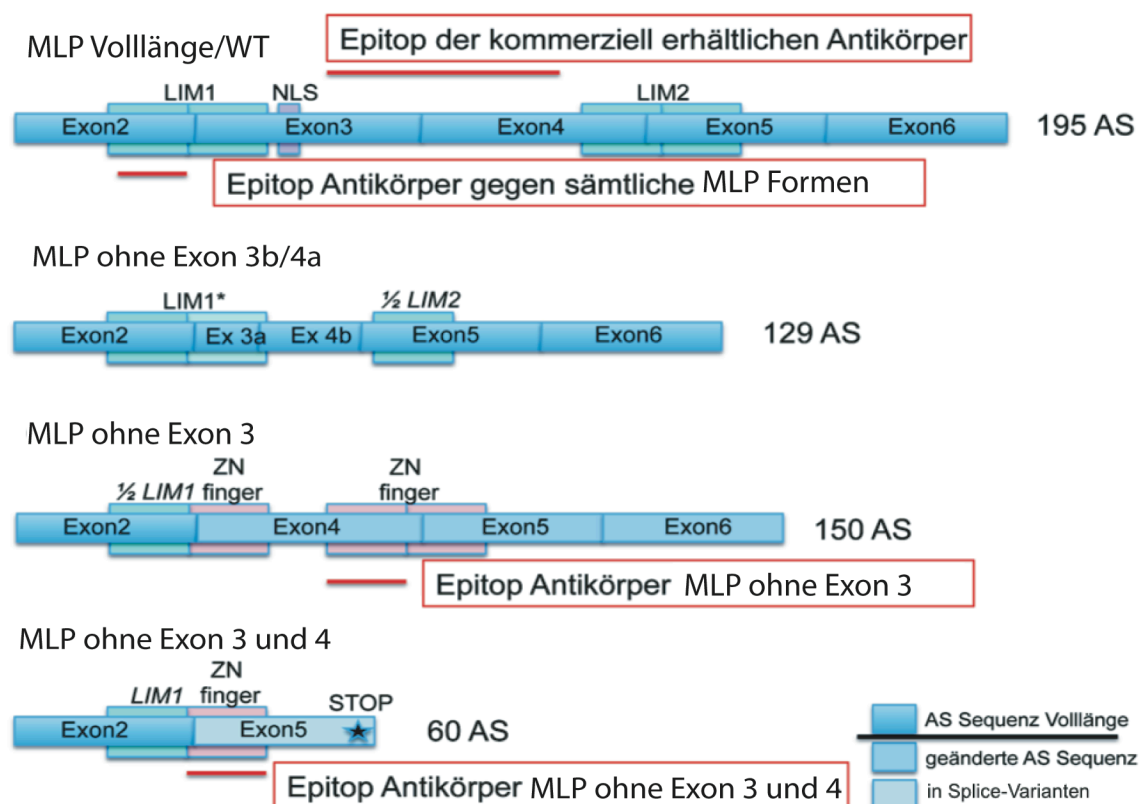


Abb. 38: Bericht der Aminosäuresequenz einzelner Splice-Varianten mit dazugehörigen Epitopen der jeweiligen Antikörper. Basierend auf den Sequenzanalysen wurden mittels SVMTrip die Epitope der jeweiligen Antikörper ermittelt.

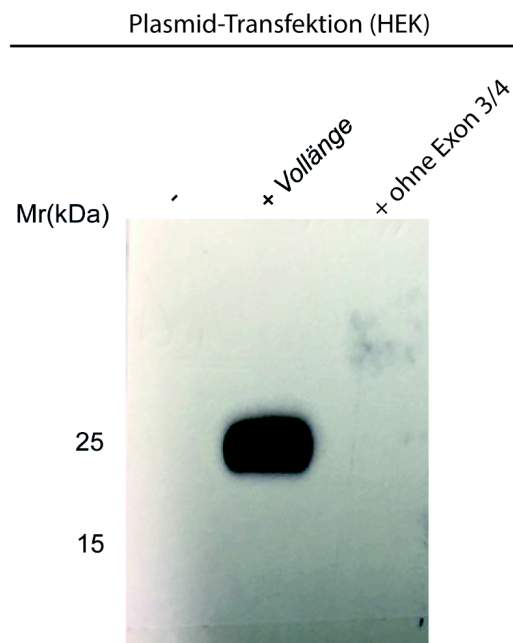


Abb. 39: Western-Blot-Analyse zur Überprüfung spezifischer MLP-Antikörper gegen das Volllänge-MLP-Protein sowie die Splice-Variante ohne Exon 3 und 4 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden zur Überexpression von MLP-Volllänge sowie der MLP-Splice-Variante ohne Exon 3 und 4 mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Lediglich die mit Volllänge transfizierten HEK293-Zellen zeigen ein Signal bei 25 kDa. Die mit der Splicevariante ohne Exon 3 und 4 transfizierten HEK293-Zellen zeigen kein Signal bei der erwarteten Höhe von 15 kDa. Die untransfizierten HEK293-Zellen dienten als Negativkontrolle.

Da das Protein nur in Herzmuskelzellen zu finden ist und postuliert wird, dass es dort mit Z-Scheiben-Proteinen interagiert, ist die Expression in gängigen Zelllinien wie z.B. HEK293 Zellen („human embryonic kidney“) nicht für funktionale Studien geeignet. Zur Testung von Antikörpern konnte dieses System jedoch in Kombination mit einer Plasmid-gestützten Überexpression von MLP sowie der MLP-Splice-Variante herangezogen werden. Bereits vorhandene Antikörper (Firma Abcam), welche in Kaninchen hergestellt wurden erkennen zwar das Volllänge MLP-Protein, jedoch nicht die Splice-Variante ohne Exon 3 und 4 (siehe Abb. 39).

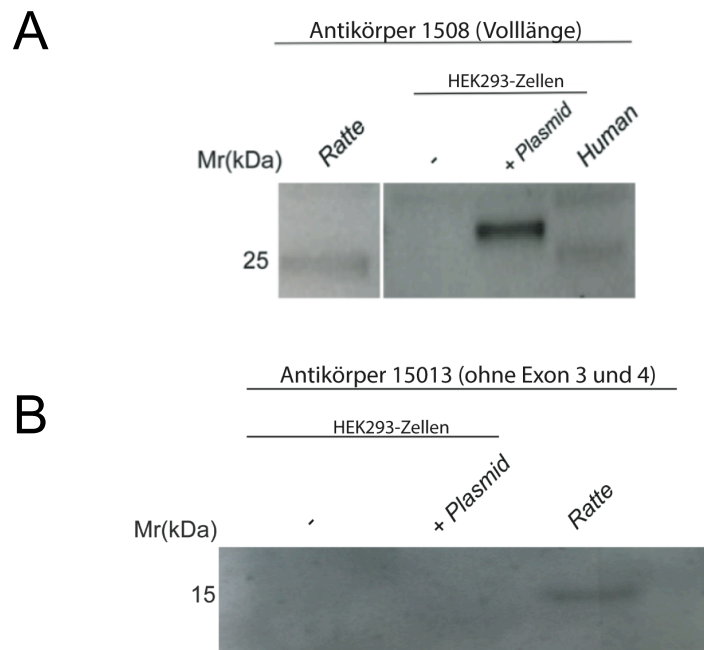


Abb. 40: Western-Blot-Analyse zur Überprüfung spezifischer MLP-Antikörper gegen das Volllänge-Protein sowie die Splice-Variante ohne Exon 3 und 4 in HEK293-Zellen sowie in verschiedenen Ratten- bzw. humanen Proben. A) Rattenherzen bzw. HEK293-Zellen, welche die MLP-Volllänge überexprimieren sowie humane Herzproben. Alle Proben mit Ausnahme der untransfizierten HEK293-Zellen, welche als Negativkontrolle dienten, zeigen ein Signal bei 25 kDa bzw. 27 kDa (durch die zusätzliche Fusion eines HA-Tags). **B)** Signal des spezifischen Antikörpers gegen MLP ohne Exon 3 und 4. Dieses ist lediglich in Rattenzellen sichtbar. Die untransfizierten HEK293-Zellen dienten hierbei wiederum als Negativkontrolle.

Der in Abb. 40 A dargestellte Western-Blot zeigt die Detektion unterschiedlicher Proteine mit dem neu hergestellten Anti-MLP-Volllängen-Antikörper (PD Dr. Martin Jung, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie). In allen Proben ist eine deutliche Bande auf einer Höhe von 25 kDa bzw. 27 kDa (überexprimiertes MLP mit HA-tag) sichtbar, mit Ausnahme der Negativkontrolle (untransfizierte HEK293-Zellen). Abb. 40 B veranschaulicht erste Serumtestungen des zweiten, neu hergestellten Antikörpers (ohne Exon 3 und 4). Es handelt sich um das 3. Serum, somit ist die Antikörperproduktion noch nicht abgeschlossen, jedoch wird schon hier eine deutliche Bande bei ca. 15 kDa in der Rattenprobe sichtbar. Dies spricht für eine erfolgreiche Herstellung des Antikörpers.

VI.7. Protein-Protein-Interaktionsstudien

Um Interaktionen von MLP mit potentiellen Kandidaten zu identifizieren bzw. um Unterschiede im Interaktom zwischen den MLP-Varianten zu ermitteln, sollte eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) sowie anschließend eine Massenspektrometrie (MS) durchgeführt werden. Hierdurch sollten zum einen nur Proteine isoliert werden, die im Komplex mit MLP bzw. den Splice-Varianten vorliegen und zum anderen ermöglicht die anschließende MS ein Screening auf bislang unbekannte bzw. unerwartete Interaktionspartner sowie den Vergleich zwischen Volllänge-MLP mit den MLP-Splice-Varianten bezüglich ihrer Interaktionsmuster. Es wird vermutet, dass MLP als Adapterprotein fungiert. Die Interaktionen werden hierbei über die zwei LIM Domänen mit seinen jeweiligen Zinkfingerdomänen vermittelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass MLP u.a. direkt mit α -Aktinin, Telethonin, Colfilin-2 sowie der Integrin-linked-kinase (ILK) interagiert (Buyandelger et al. 2011). Einige dieser bekannten Proteininteraktionen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit über Co-IP und anschließende WB-Analyse erfolgreich nachweisen werden (siehe Abb. 41).

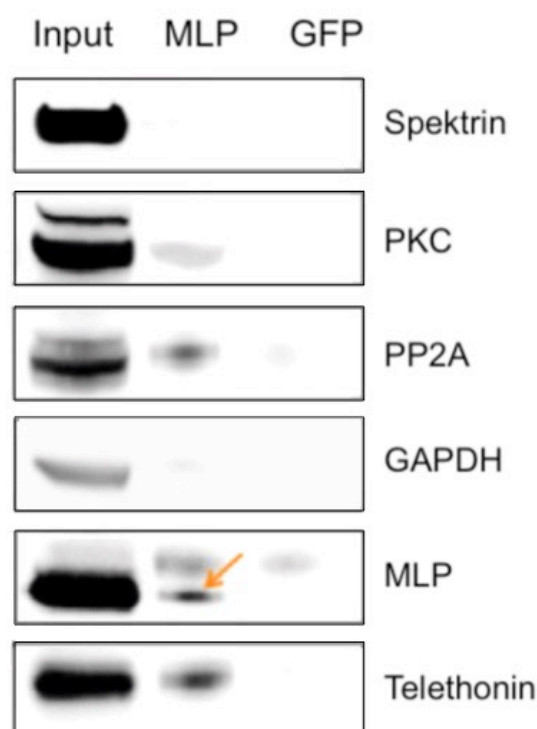


Abb. 41: Co-Immuno-Präzipitation (Co-IP) von Ratten-Kardiomyozyten nach MLP-HA-Überexpression mit α -HA-Antikörper bzw. α -GFP (Kontrolle). Anschließend erfolgte die Immun-Detektion mittels MLP-Antikörper sowie Antikörper gegen Spektrin, PKC, PP2A und Telethonin. Als Negativ-Kontrolle diente GAPDH (keine Interaktion/Komplexbildung mit MLP).

VI. ERGEBNISTEIL

Sequence: seq CSRP3 volla"nge.prot (195 aa)

Features: 20 visible, 20 total

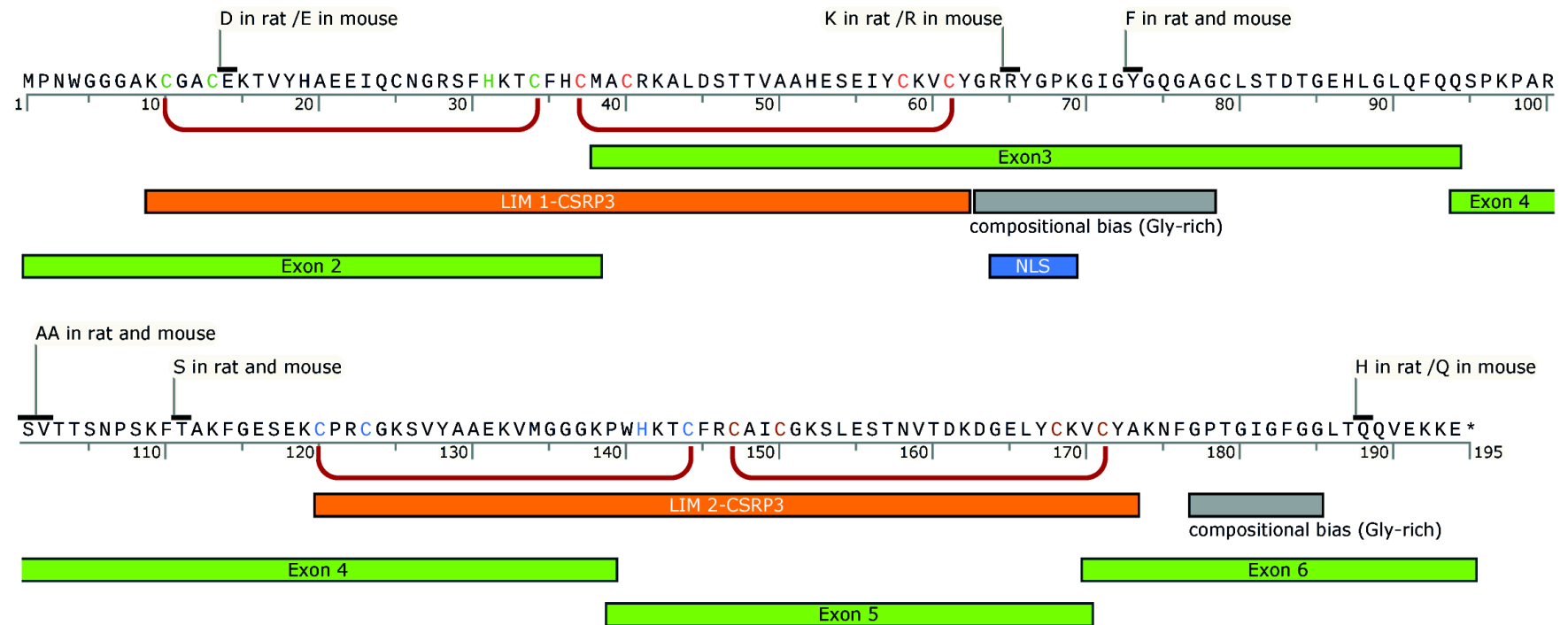


Abb. 42: Detaillierte Darstellung der humanen Proteinsequenz von MLP im Vergleich mit der Maus- bzw. Ratten-Sequenz (mittels SnapGene®). Gezeigt sind alle Aminosäure-Austausch-Stellen zwischen den Organismen. In grün unterlegt sind die einzelnen Exons (E2 bis E6). Die LIM-Domänen sind rot markiert und die NLS-Region ist in blau dargestellt. Wichtige Aminosäuren der ZinkFinger-Domänen (dargestellt durch je zwei rote Klammern pro LIM-Domäne) sowie Histidin und Cystein sind farblich hervorgehoben.

Um zu klären, ob es relevante Unterschiede zwischen MLP in Kardiomyozyten von Mensch und Maus bzw. Ratte gibt wurde die humane MLP-Proteinsequenz mit der Sequenz von Maus und Ratte verglichen. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass die Sequenzen und somit die nativen Proteine in ihrer Struktur und Funktion vergleichbar sind und zukünftige Experimente mit Ratte bzw. Maus durchführbar sind. Die Analyse der Sequenzen zeigte, dass ein Unterschied zwischen Maus/Ratte und Mensch in der ersten LIM Region besteht, wobei es sich um einen Austausch von Glutaminsäure (E) zu Asparaginsäure (D) handelt. Dieser Austausch hat wahrscheinlich sehr wenig Effekt auf die MLP-Funktion, da sich diese Aminosäuren in ihren Eigenschaften sehr ähnlich sind. Gleiches gilt für eine weitere Veränderung im NLS Bereich. Hier kommt es zum Austausch von Lysin (K) zu Arginin (R), wobei auch hier beide Aminosäuren ähnliche Eigenschaften besitzen. Lediglich in Bereichen ohne funktionale Domänen kommt es punktuell zum Austausch von Aminosäuren (insgesamt fünf Positionen) mit deutlich unterschiedlichen Eigenschaften. Diese Regionen haben jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die hier untersuchten Protein-Protein-Interaktionen (Abb. 42).

Um dennoch daraus resultierende, abweichende Eigenschaften ausschließen zu können sollten beide Proteine (Human und Ratte) in der Massenspektrometrie genauer analysiert werden, da für weitere Versuche die humane Sequenz verwendet werden sollte. Im ersten Schritt konnten beide Sequenzen sowohl mit dem HA-Antikörper als auch mit dem MLP-Antikörper nachgewiesen werden, was für eine erfolgreiche Fusion des HA-tags sowie die nachfolgende Transfektion spricht. Im Anschluss an die Transfektion erfolgte die Immuno-Präzipitation (IP). Hierfür wurden Ratten-Kardiomyozyten mit dem zuvor produzierten Virus (siehe Abschnitt V.2.3.11 und V.2.3.12) transduziert, welcher wiederum die cDNA des in Abb. 43 A gezeigten Konstruktes enthielt. Nach zweitägiger Inkubation mit dem Virus wurden die Zellen geerntet und das gewünschte Konstrukt mit einem α -HA-Antikörper aus dem Zellgemisch präzipitiert und isoliert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Western-Blotting erfolgte eine Detektion mittels MLP-Antikörper. Beide Konstrukte, HA-MLP human sowie HA-MLP Ratte, konnten spezifisch mittels IP isoliert und erfolgreich nachgewiesen werden.

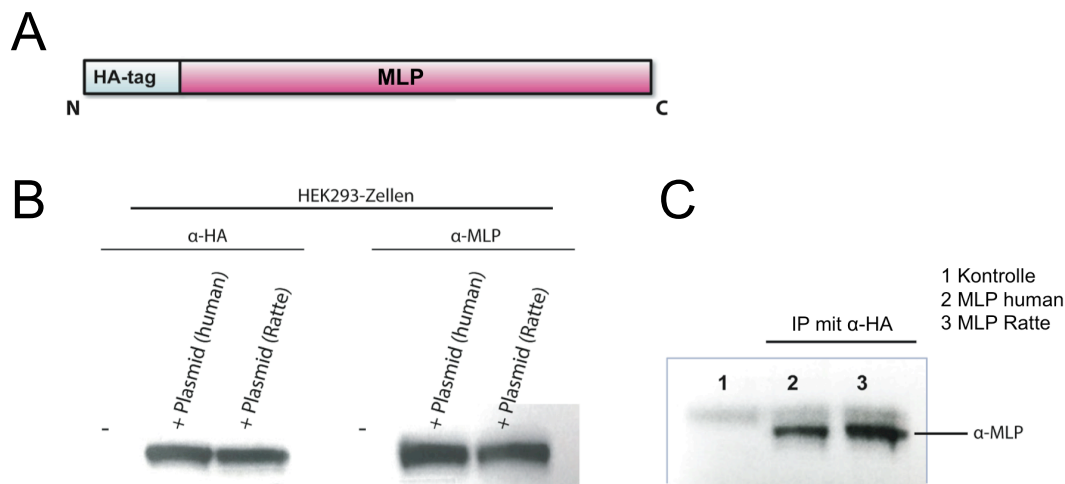


Abb. 43: Expression des MLP-Volllängen-Proteins in HEK293-Zellen und Ratten-Kardiomyozyten. **A)** Konstrukt aus N-terminalem HA-tag und Ratte- bzw. humaner MLP-Sequenz. Die kodierende cDNA-Sequenz wurde zur Transfektion und Virusproduktion verwendet. **B)** Veranschaulichung der erfolgreichen Transfektion und Expression von humanem sowie Ratten-MLP (Volllänge) in HEK293-Zellen. Dazu wurden HEK293-Zellen zwei Tage mit Transfektions-Ansatz inkubiert, anschließend lysiert, in Lämmli-Probenpuffer für 10 min bei 70 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE (20 μ g/Probentasche) aufgetrennt (12 % Bis-Tris). Anschließend wurden die Proben auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Hilfe einer Immundetektion analysiert. **C)** Immuno-Präzipitation von Ratten-Kardiomyozyten nach virus-vermittelter Überexpression der HA-MLP-Konstrukte mit α -HA-Antikörpern und Detektion mittels α -MLP-Antikörper.

Zur abschließenden Analyse wurden diese in der Co-IP getesteten Proben zusätzlich mittels Massenspektrometrie (MS) untersucht. Die erste Messung diente, wie oben beschrieben, zur Kontrolle. Es sollte sichergestellt werden, dass es trotz Aminosäureaustausch, keine Unterschiede in den Interaktionen der MLP-Proteine von Ratte und Mensch gibt (siehe Abb. 42). Eine statistische Analyse (Hypothesentest mit einem Signifikanz-Niveau/p-Wert < 0,05) bestätigte für alle relevanten Proteine (z.B. Muskelaktivität-assoziierte, Ca^{2+} -Haushalt, usw.), dass keine signifikanten Unterschiede in der Wiederfindungsrate zwischen Proben mit humaner und Ratten-Sequenz (hMLP und rMLP-Überexpression) bestehen (siehe Anhang XI2).

Nachdem auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte, dass es zu keinerlei Unterschieden im Interaktionsverhalten zwischen Ratten- und humanem MLP (rMLP und hMLP) kommt, sollten in einer zweiten Messung anhand der hMLP-Sequenz Interaktionspartner von MLP identifiziert bzw. analysiert werden. Hierzu wurde eine überexprimierte (HA-hMLP) sowie eine nicht transduzierte Probe gemessen und die dabei gefunden Proteine mittels MS miteinander verglichen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von Rattenkardiomyozyten nach Überexpression von HA-getagtem hMLP im Vergleich zu Kontrollzellen nach Immunopräzipitation mit anti-HA Antikörpern (Δ Proteine) Die Evaluation der Daten erfolgte mittels Scaffold (TM) version: Scaffold_4.5.1. Peptid-Grenzwert¹: 50 % minimum, Protein-Grenzwert²: 90 % minimum und zwei Peptide minimum³.

Proteine	Anzahl	Prozentual
Identifizierte Proteine gesamt	135	100%
Mit Muskelaktivität-assoziierte Proteine	20	15%
Muskel/Sarkomer	13	10%
Calcium-Haushalt	1	1%
Ionenkanäle	1	1%
Signalweiterleitung	3	2%
Ribosomale Proteine	9	7%
Mitochondriale Proteine	58	43%

¹Peptid-Grenzwert: Mindestanforderung für die berechnete Wahrscheinlichkeit einer Peptid-Identifikation

²Protein-Grenzwert: Mindestanforderung für die berechnete Wahrscheinlichkeit einer korrekten Protein-Identifikation.

³Peptid-Minimum: Anzahl individueller Peptide, die für 1 Protein gefunden werden müssen, um das Protein als identifiziert anzusehen.

In Tabelle 7 sind Proteine aufgelistet, welche mit einem Peptid-Grenzwert von minimum 50 %, einem Protein-Grenzwert von minimum 90 % sowie mit minimum zwei identifizierten Peptiden pro detektierter Proteinsequenz in der MS-Messung gefunden wurden (Analyse mittels Scaffold_4.5.1.) Alle unter den genannten Bedingungen identifizierten Proteine sind zu 25 % Muskelaktivität-assoziierte oder Sarkomer-Proteine, wie bzw. LRPPRC (Leucin-rich PPR motif-containing protein), welches eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Zytoskeletts bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen einnimmt, oder Myosin und Tropomyosin, welche beide an der Muskelkontraktion beteiligt sind (Liu & McKeehan 2002).

Fast die Hälfte aller gefundenen Proteine (43 %) haben einen mitochondrialen Hintergrund, z.B. ATPB (ATP synthase subunit beta), PRDX5 (Peroxisredoxin-5) oder THLL (Acetyl-CoA-Acetyltransferase). Dies ist nicht verwunderlich, da die Herzmuskelzelle einen großen Energiebedarf aufweist. Zudem wurde gezeigt, dass Mitochondrien zwischen den Sarkomerstrukturen, zwecks Energieversorgung, lokalisiert sind (siehe Abb. 44) und dass Proteine beider Strukturen miteinander assoziiert sind (Riecker 2013). Alle dargestellten MS-Messungen wurden von Frau Dr. Dipl. Ing. Claudia Fecher-Trost, Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes, durchgeführt.

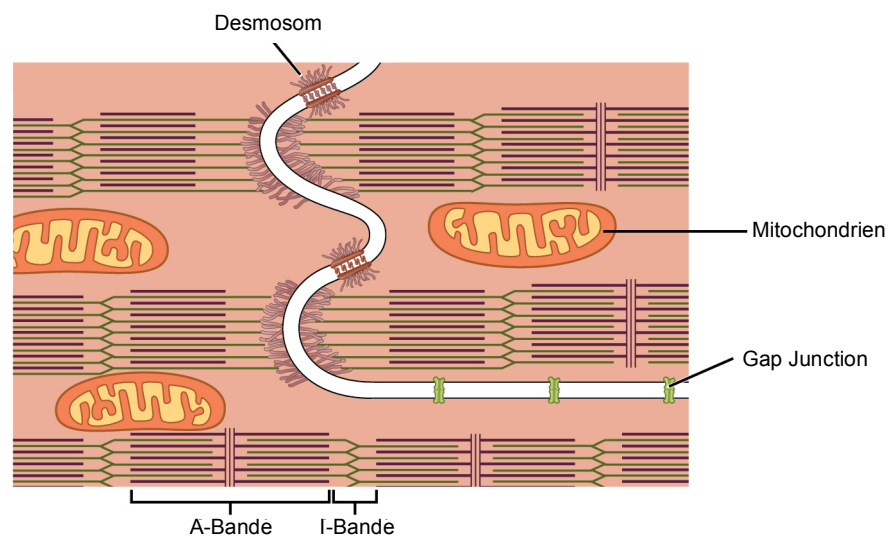


Abb. 44: Darstellung einer Herzmuskelzelle im Querschnitt mit Myofilamenten und Mitochondrien (<https://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46664.html>).

VI.8. Lokalisation und Ca^{2+} -Messungen nach Expression von MLP-TagRFPT-Isoformen in Kardiomyozyten

Um die Funktion und Lokalisation von MLP in Rattenkardiomyozyten bzw. humanen iPS-CM (induzierte, pluripotente Stammzellen - abgeleitete Kardiomyozyten) zu analysieren, sollten sowohl das Volllänge-MLP als auch die Splice-Variante ohne Exon 3 mit dem Fluoreszenzprotein TagRFPT fusioniert und die Zellen nach anschließender Überexpression analysiert werden (siehe Abb. 45 A).

TagRFP ist ein monomeres, im roten Emissionsbereich fluoreszierendes Protein, welches aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* isoliert wurde (Merzlyak et al. 2007). Es besitzt eine starke Fluoreszenz mit Anregungs-/Emissionsmaxima bei 555 bzw. 584 nm. Die Emission von TagRFP ist etwa dreimal heller als das des Fluoreszenzproteins mCherry (Shaner et al. 2004), womit es das bisher hellste monomere, rot fluoreszierende Protein ist, welches in einer Vielzahl von Organismen exprimiert werden kann. Säugetierzellen, die transient mit TagRFP-Expressionsvektoren transfiziert werden, weisen 10-12 Stunden nach der Transfektion eine starke Fluoreszenz auf. Es wurden keine zytotoxischen Effekte oder eine sichtbare Proteinaggregationen beobachtet (Shcherbo et al. 2009).

Für die Lokalisationsstudien und die nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen von Kardiomyozyten wurden nach der Herstellung von Viren mit den MLP-TagRFPT-Fusions-Konstrukten zunächst COS-Zellen transduziert und mittels WB untersucht (Abb. 45 A). Bereits nach zwölf Stunden konnte die erfolgreiche Transduktion des TagRFPT-MLP-Fusionsproteins (Volllänge und ohne Exon 3) unter dem Mikroskop nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). TagRFPT konnte ferner mit spezifischen Antikörpern erfolgreich detektiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass MLP durch die Fusion an TagRFPT nicht bei 25 kDa, sondern auf einer Bandenhöhe von 59 kDa und MLP ohne Exon 3 auf einer Höhe von 48 kDa läuft.

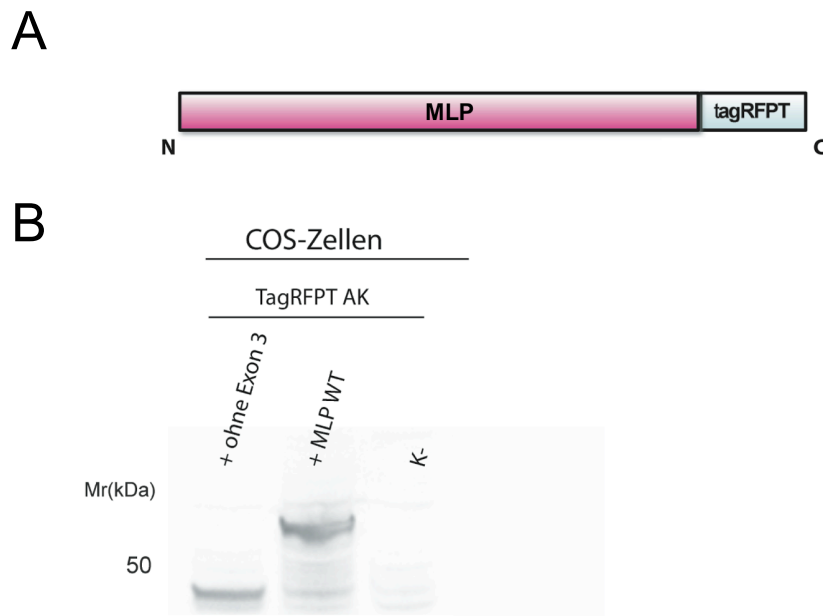


Abb. 45: Transduktion von MLP-Isoformen in COS-Zellen. **A)** Konstrukt mit C-terminalem TagRFPT zur Transfektion und Virusproduktion. **B)** Veranschaulichung der erfolgreichen Transduktion und Expression von MLP (Volllänge) und MLP ohne Exon 3 in COS-Zellen. COS-Zellen wurden zwei Tage mit dem konstruierten Virus inkubiert, anschließend lysiert, in Lämmli-Probenpuffer für 10 min bei 70 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE (20 µg/Probentasche) aufgetrennt (12 % Bis-Tris). Anschließend wurden die Proben auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Hilfe einer Immundetektion (TagRFPT-Antikörper) analysiert.

VI.8.1. Expression und Lokalisation von TagRFPT-MLP

Um die Funktion von MLP in Kardiomyozyten besser verstehen zu können und um zu untersuchen inwieweit die gefundenen Isoformen von MLP Unterschiede in der Funktion und Lokalisation in Kardiomyozyten aufweisen, wurden MLP-WT (Volllänge) und die MLP-Variante ohne Exon 3 mittels adenoviralen Vektoren in adulte Kardiomyozyten sowie in iPS-CM transduziert. Nach anschließender Expression wurde die Lokalisation der Proteine fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Es ist bekannt, dass MLP mit Telethonin und α -Aktinin interagiert (Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002; Gehmlich et al. 2010; Papalouka et al. 2009). Jedoch gibt es widersprüchliche Informationen über die Lokalisation von MLP in Herzmuskelzellen. Es wird vermutet, dass MLP ein Sarkomer-Protein ist, das an der Z-Scheibe, der I-Bande, der M-Linie und/oder der Zellmembran lokalisiert ist (Arber & Caroni 1996; Arber et al. 1997; Flick & Konieczny 2000; Knöll et al. 2010; Henderson et al. 2003).

Jedoch wurde auch berichtet, dass es ein nicht-sarkomeres Protein mit diffuser zytoplasmatischer Expression ist (Geier et al. 2008). Die Lokalisation des Proteins sollte daher im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Durch eine Western Blot-Analyse mit Zelllysaten transduzierter, humaner iPS-CM wurde zunächst die Expressionsrate der einzelnen MLP-Varianten bestimmt, um nachzuweisen, dass die Konzentration der Fusionsproteine in den Zellen zum Messzeitpunkt deutlich über dem endogenen MLP-Level lag (siehe Abb. 46). Hierzu wurden die iPS-CM mit der gleichen Menge an Viruslösung (50 µl pro 12 well Platte) transduziert, welche auch für alle nachfolgenden Experimente verwendet wurde. An Tag 3 nach der Transduktion erfolgte die Zellernte, die gelelektrophoretische Auftrennung sowie eine Western-Blot Analyse, um die Expression des endogenen MLP sowie der MLP-Fusionsproteine zu untersuchen.

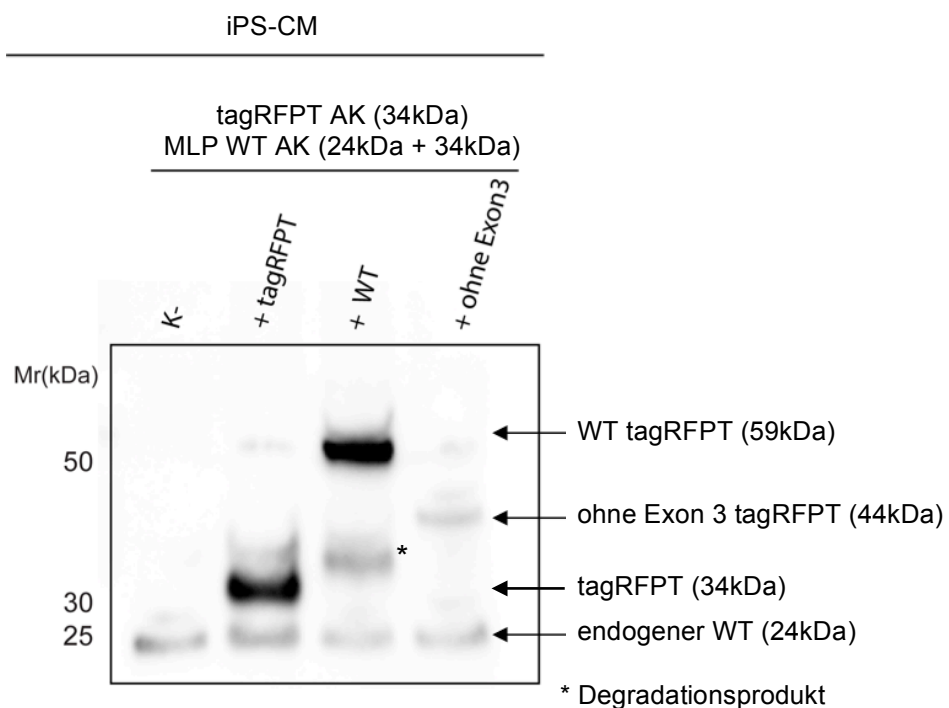


Abb. 46: Western-Blot zum Nachweis der Expression der MLP-tagRFPT-Varianten in humanen iPS-CM. Darstellung der erfolgreichen Transduktion von MLP-tagRFPT Varianten in humanen iPS-CM. Dazu wurden die iPS-CM drei Tage mit dem Virus inkubiert, anschließend lysiert, in Lämmli-Probenpuffer für 10 min bei 70 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE (20 µg/Probentasche) aufgetrennt (12 % Bis-Tris). Anschließend wurden die Proben auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Hilfe einer Immundetektion analysiert. Hierzu wurde zunächst ein α-MLP-Antikörper und anschließend ein α-tagRFPT-Antikörper verwendet, damit sowohl ungetaggetes, endogenes MLP als auch tagRFPT nachgewiesen werden konnte.

Der Western-Blot zeigt in allen vier iPS-CM Proben eine deutliche Bande bei 25 kDa, was dem endogenen MLP-Volllänge entspricht. Die Virustransduktion mit dem Fluoreszenzprotein (34 kDa) und dem MLP-WT-tagRFPT-Fusionsprotein zeigt eine starke Bandenintensität (59 kDa) und liegt in größerer Menge in den Zellen vor als die endogene MLP-Form. Die getaggte MLP-Variante ohne Exon 3 (44 kDa) ist im gleichen Verhältnis sichtbar wie die endogene Bande (Abb. 46). Wie erwartet, konnte gezeigt werden, dass das MLP-Fusionsprotein nach Überexpression die Proteinmenge des endogenen MLP deutlich übersteigt. Die MLP-Isoform ohne Exon 3 zeigt im Gegensatz dazu nur ein moderates Signal, was auf eine etwas schwächere Expression bzw. eine geringere Stabilität hindeuten könnte. Nachdem die spezifische Detektion auf Proteinebene erfolgreich war, wurden die gleichen Antikörper für immunzytochemische Analysen eingesetzt.

Die mit den MLP-Isoformen Virus-transduzierten Rattenkardiomyozyten sowie die iPS-CM wurden an Tag 3 fixiert und das Z-Scheiben-Protein α -Aktinin sowie MLP immunzytochemisch detektiert. Die Fixierung erfolgte mit 4 % Paraformaldehyd, was die komplexe Struktur der Herzmuskelzelle konserviert. Zur Detektion der an die Proteine gebundenen primären Antikörper wurden sekundäre Antikörper verwendet, die entweder mit dem Farbstoff DyLight 649 (α -Aktinin) oder DyLight 594 (MLP) gekoppelt waren.

Abb. 47 zeigt die immunzytochemische Färbung mit α -Aktinin- und MLP-Antikörpern von transduzierten Ratten-Kardiomyozyten. In beiden Fällen der untransduzierten sowie der MLP-WT transduzierten Zellen ist eine klare quergesteifte Struktur entsprechend der Sarkomerstruktur erkennbar, was durch das Fluoreszenzprofil von anti- α -Aktinin (rote Spur/Z-Scheiben Signal) und anti-MLP (grüne Spur) entlang der gestrichelten Linie deutlich wird. MLP scheint daher ein Sarkomer-Protein zu sein, das an der Z-Scheibe, I-Bande und M-Linie lokalisiert ist. Auch eine Virus-Transduktion mit Kontroll-Virus führt zu keiner Veränderung der Lokalisation von MLP an den Sarkomerstrukturen. Eine Überexpression von MLP ohne Exon 3 führte hingegen zu einer deutlich veränderten MLP-Lokalisation (rote Spur) welche nicht mehr mit anti- α -Aktinin (grüne Spur) übereinstimmt. Die Negativ-Kontrolle (unten in der Abbildung) diente dazu, das Ausmaß an Autofluoreszenz bzw. Hintergrund bewerten zu können.

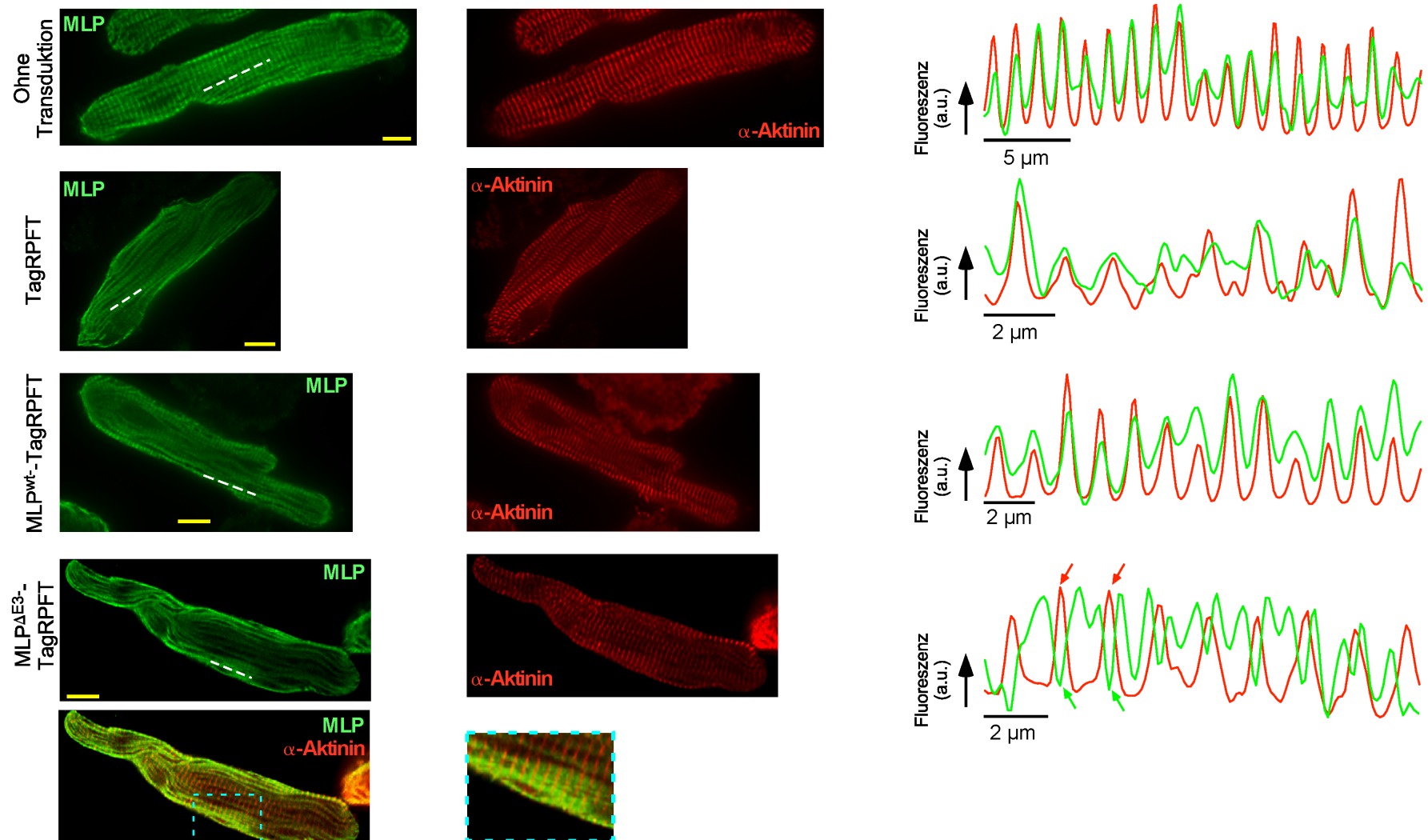




Abb. 47: Fluoreszenzaufnahmen zur Analyse der Lokalisation der endogenen MLP-Form sowie der beiden überexprimierten Isoformen von MLP (WT und ohne Exon 3) in adulten Kardiomyozyten der Ratte. An Tag 3 nach Isolation und Transduktion sowie mit 4 % PFA fixierte Zellen wurden mit anti-α-Aktinin sowie anti-MLP-Antikörper immunzytochemisch angefärbt. Das Fluoreszenzprofil von anti-α-Aktinin (rote Spur/Z-Scheiben Signal) und anti-MLP (grüne Spur) entlang der gestrichelten Linie zeigt zum Teil deutliche Kollokalisierungen beider Proteine. Mit roten Pfeilen gekennzeichnete Fluoreszenzpeaks von anti-α-Aktinin (rote Spur) soll die geringe Kollokalisierung von MLP (im Fall der MLP-Variante ohne Exon 3) deutlich machen. Der Skalierstrich entspricht 10 μm.

Zur Bestätigung der vorangegangenen Studie zur Lokalisation von MLP in adulten Ratten-Kardiomyozyten und zur Untermauerung der angeführten Analysen in humanen Proben (qPCR, WB- und PCR-Analysen) wurden die immunzytochemischen Färbungen analog in humanen iPS-CM durchgeführt. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) sind embryonalen Stammzellen sehr ähnlich. Sie werden durch Virus-induzierte Reprogrammierung von Fibroblasten gewonnen. Im vorliegenden Fall wurden diese anschließend zu Kardiomyozyten differenziert (iPS-CM; „cardiomyocytes“). Durch diesen Prozess ist es möglich gesunde, humane Herzmuskelzellen in Kultur zu erhalten. Die iPS-CM wurden von Prof. Moretti, Kardiologie, Klinik rechts der Isar / Technische Universität München zur Verfügung gestellt und von Wenying Xian in unserem Labor kultiviert. Wie bereits in Abb. 47 beschrieben wurden auch die iPS-CM nach Fixierung mit 4 % PFA mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert, um das endogene MLP als auch die überexprimierten Varianten zu visualisieren (Abb. 48).

Die Kontrolle zeigt im Fall der α -Aktinin-Antikörper-Färbung das typische quergestreifte Muster. Auch die MLP-Färbung machte diese Struktur sichtbar, wobei eine Kolo-kalisation auch hier durch das Fluoreszenzprofil bestätigt wird. Durch virale Transduktion mit dem MLP-WT (Volllänge) wird dieser Effekt im Fall dieser Zellen sogar verstärkt. Die MLP-Färbung zeigt eine vollständige Lokalisation an den Z-Scheiben. Ein gegenteiliger Effekt, ähnlich wie bei den Rattenkardiomyozyten, kann bei der Transduktion von MLP ohne Exon 3 beobachtet werden. Wobei hier sowohl bei der α -Aktinin-Färbung als auch bei der MLP-Färbung jegliche Querstreifenstrukturen verloren gehen. Es kommt zu einer Änderung der Lokalisation von MLP. Dieses ist nun vermehrt diffus längsstreifig entlang der Myofibrillen lokalisiert.

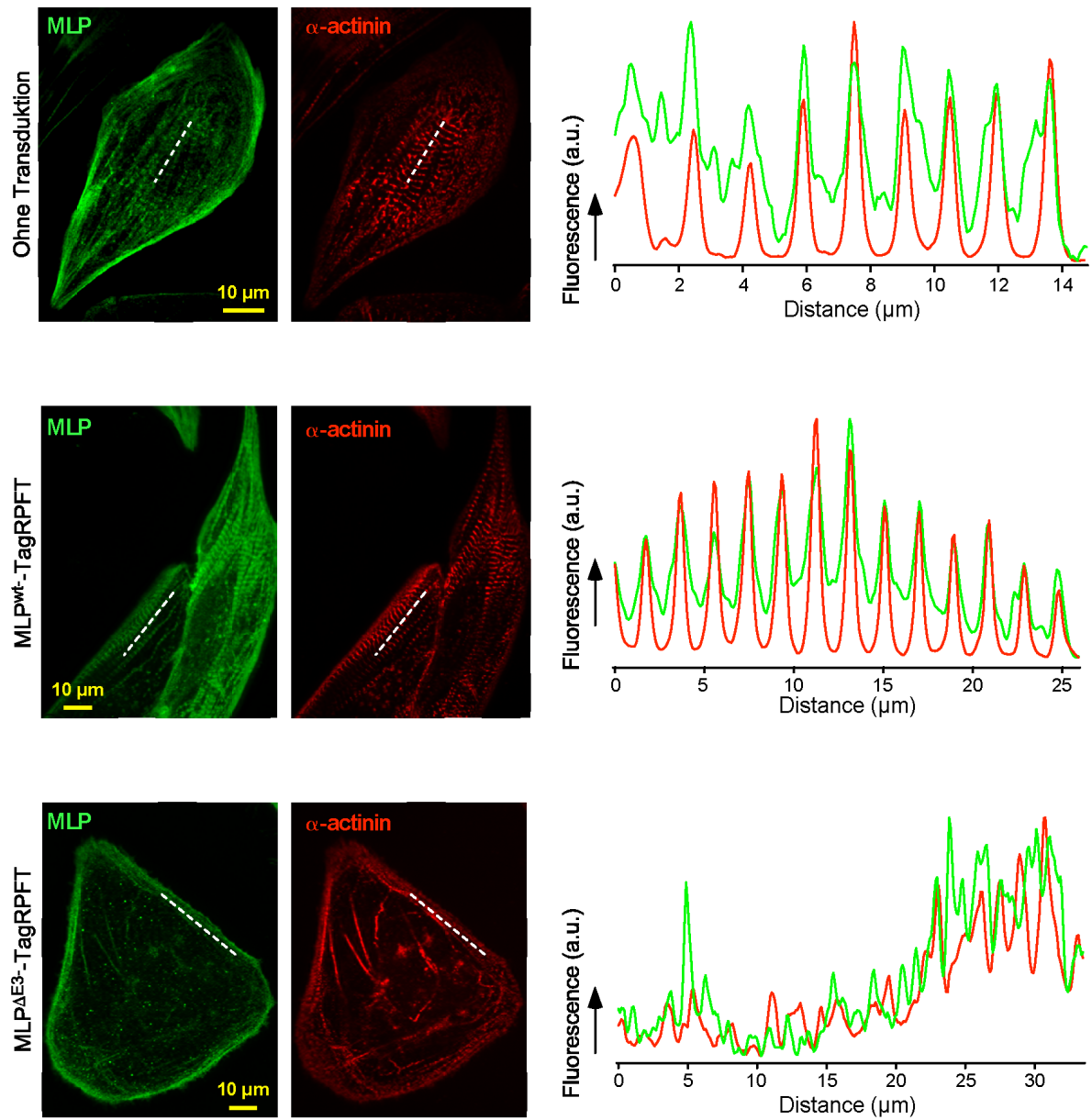


Abb. 48: Fluoreszenzaufnahmen zur Analyse der Lokalisation der endogenen MLP-Form sowie der beiden überexprimierten Isoformen von MLP (WT und ohne Exon 3) in humanen iPS-CM. An Tag 3 nach Transduktion und mit 4 % PFA fixierte Zellen wurden mit anti- α -Aktinin sowie anti-MLP-Antikörper immunzytochemisch angefärbt. Das Fluoreszenzprofil von anti- α -Aktinin (rote Spur) und anti-MLP (grüne Spur) entlang der gestrichelten Linie zeigt zum Teil deutliche Kolo-kalisationen beider Proteine. Der Skalierstrich entspricht 10 μ m.

VI.8.2. Ca^{2+} -Messungen an Kardiomyozyten nach Überexpression von MLP-Varianten

Mit Hilfe von Ca^{2+} -Messungen sollten mögliche Effekte von MLP auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase untersucht werden. Wie oben bereits gezeigt, scheint sowohl die Quantität der MLP-Expression wie auch die Qualität (d.h. Isoform-Zusammensetzung) im Herzen hoch dynamisch reguliert zu werden. Darüber hinaus werden in Berichten diese Änderungen der MLP-Expression in Zusammenhang mit diversen Herzkrankheiten gebracht (Canale et al. 2012). Im Tiermodell zeigt ein Total-KO dieses Proteins eine deutliche Herzpathologie (Wiesen et al. 2016). Zusammen mit Änderungen der Herzmorphologie (z.B: Hypertrophie) geht aber i.d.R. ebenfalls eine substanzielle Abnahme der Herzleistung, wie z.B. Schlagkraft, einher. Diese wird aber maßgeblich durch die Höhe und den zeitlichen Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bestimmt (Bodi et al. 2005). Daher wurde in der folgenden Serie von Experimenten untersucht, wie sich die Überexpression von zwei MLP-Isoformen (Volllänge (WT) und ohne Exon3) auf den Ca^{2+} -Haushalt der Herzmuskelzelle auswirkt. Hierzu wurden beide Isoformen mithilfe eines adenoviralen Expressionssystem in frisch isolierten ventrikulären Rattenherzzellen transduziert. Am dritten Tag nach Transduktion erfolgten Messungen der zellulären Ca^{2+} -Transienten mithilfe des ratiometrischen Ca^{2+} -Indikators Fura-2 (bei 37 °C und einer elektrischen Stimulationsfrequenz von 1 Hz). Als Kontrolle dienten Herzmuskelzellen, die ausschließlich mit einem tagRFPT-Virus (ohne MLP) transduziert wurden. Es wurden lediglich Zellen mit einer deutlichen tagRFPT Fluoreszenz ausgewertet.

Für die elektrische Stimulation der Zellen wurde ein Standardprotokoll gewählt, das es erlaubte möglichst viele Parameter des Ca^{2+} -Haushalts der Myozyten in einer Messung zu erhalten. Die Zellen wurde mindestens 5 min nicht stimuliert, um einen stabilen und vergleichbaren Ruhezustand zwischen den Messungen sicherzustellen. Danach erfolgte die elektrische Stimulation der Zellen (7-9 Volt, Rechtecksignale mit einer Dauer von 5 ms) für ca. 20 s. In dieser ersten Phase wurde die Fura-2-Fluoreszenz aufgezeichnet. Danach erfolgte ein Ausschalten der Fluoreszenz-Anregung, aber unter Beibehaltung der elektrischen Stimulation für 1 min. In dieser Zeit erreichten die Zellen einen Gleichgewichtszustand („steady state“ = St-St) und die Anregung wurde für die zweite Aufzeichnungsperiode wieder eingeschaltet. Die Fluoreszenz jeder einzelnen positiven Zelle wurde daraufhin ermittelt.

Die folgenden Parameter wurden aus den Messungen analysiert:

- Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration
- Diastolische Ca^{2+} -Konzentration im Gleichgewichtszustand (St-St)
- Amplitude des ersten Ca^{2+} -Transienten (ET) nach Ruhe
- Mittlere Amplitude der letzten 5 Transienten im St-St
- Post-Rest-Verhalten ($\text{Amp}^{\text{ET}}/\text{Amp}^{\text{St-St}}$)
- Dauer der Ca^{2+} -Transienten bis 80 % der Amplitude abgeklungen waren (CTD_{80}) des ersten Transienten
- CTD_{80} im St-St

Abb. 49 fasst die Ergebnisse dieser Studie zusammen. Hierbei zeigt Abb. 49 A typische Ca^{2+} -Transienten während der beiden oben erwähnten Aufzeichnungsperioden in Rattenkardiomyozyten, die mit tagRFPT, MLP^{wt} -tagRFPT und $\text{MLP}^{\Delta\text{E}3}$ -tagRFPT Virus-transduziert wurden.

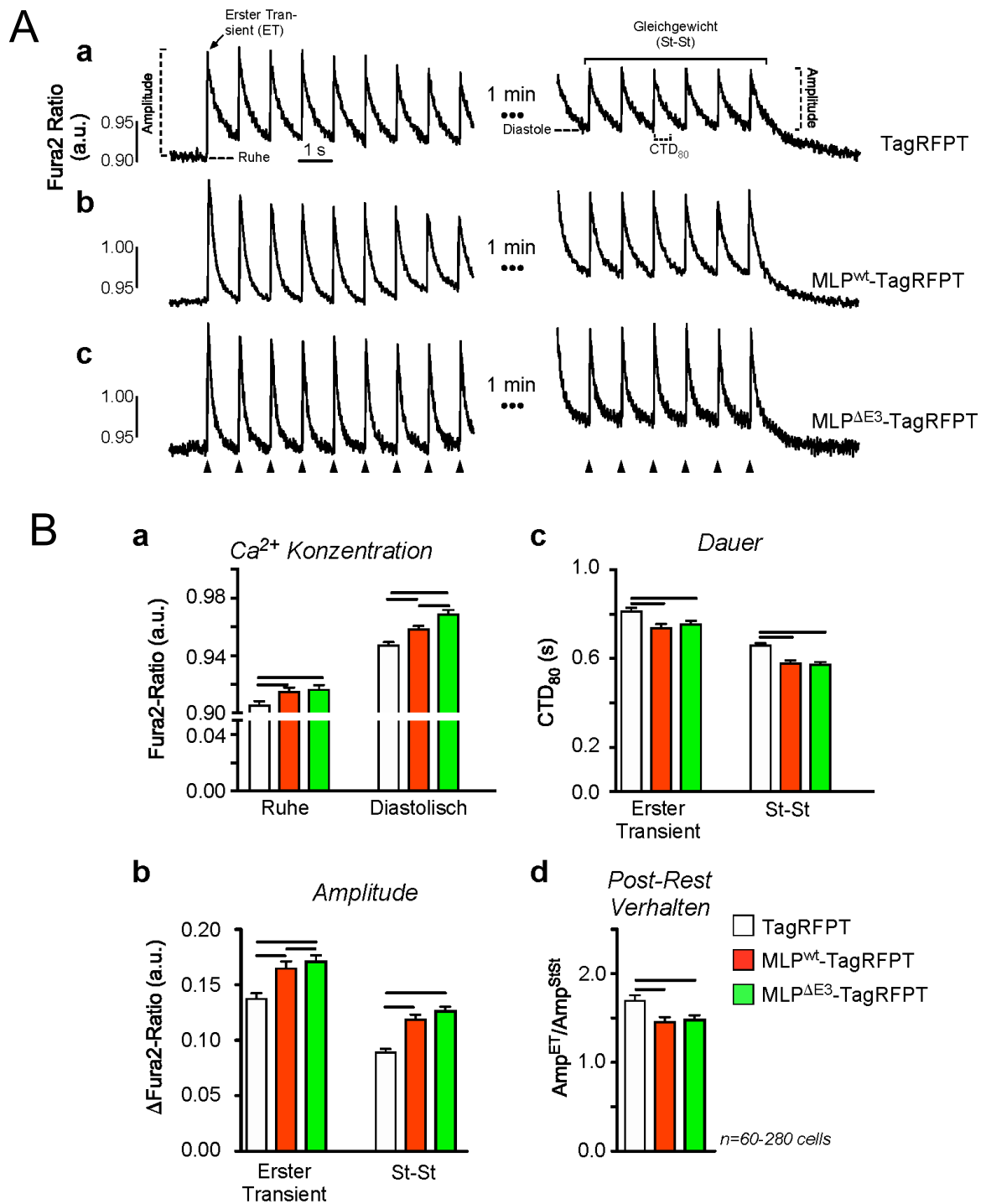


Abb. 49 A und B: Ca²⁺-Messungen an Virus-transduzierten (MLP-WT und MLP ohne Exon 3) adulten Kardiomyozyten der Ratte. Hier zeigt Abb. 49 A a-c typische Ca²⁺-Transienten von Rattenkardiomyozyten, die mit tagRFPT, MLP^{wt}-tagRFPT und MLP^{ΔE3}-tagRFPT transduziert wurden. Abb. 49 B a-d stellt die statistische Auswertung dieser Kohorte von Zellen dar. **a** Ca²⁺-Konzentration der Amplituden für „Resting“ und „Diastolic“. **b** Duration bei 80 % Recovery (CTD₈₀). **c** Amplitude im „Steady State“ sowie das „Post Rest“-Verhalten der Zellen. (a.u.: „arbitrary unit“ /relative Einheit, CTD: „Ca²⁺ transient duration at 80 % recovery“)

In Abb. 49 B ist die statistische Auswertung der Ca^{2+} -Messung gezeigt. Die Zellen weisen im Ruhezustand eine signifikante Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration auf, wenn sie zusätzliches MLP-WT wie auch MLP ohne Exon 3 ($\text{MLP}^{\Delta\text{E}3}$) im Vergleich zur Kontrolle besitzen. Während beide MLP-Varianten im Ruhezustand kaum unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen aufweisen erreichen die MLP-WT-Zellen einen deutlich höheren Ca^{2+} -Level in der Diastole (siehe Abb. 49 Ba).

Der Vergleich der Amplituden zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den MLP-Varianten und der Kontrolle. Zellen mit MLP bzw. $\text{MLP}^{\Delta\text{E}3}$ zeigen beide erhöhte Amplituden, sowohl nach Stimulation als auch im „Steady State“ (siehe Abb. 49 Bb). Die Charakterisierung der Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR erfolgte über die gemessene Dauer des Ca^{2+} -Transients bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses auf 80 % des Ausgangswertes (siehe Abb. 49 Bc). Virus-transduzierte Kardiomyozyten zeigen hierbei eine schnellere Wiederaufnahme von Ca^{2+} im Vergleich zur Kontrolle. Das „Post-Rest“-Verhalten, welches die Veränderung der Kontraktionskraft der Amplitude des ersten Schlages nach Wiedereinsetzen der elektrischen Stimulation im Anschluss an eine Stimulationspause beschreibt, zeigt deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen transfizierten Zellen. Die Kontrollzellen weisen dabei die gleiche Amplitude auf wie nach der ersten Stimulation. Die Zellen mit den beiden MLP-Varianten zeigen eine vergleichbare Abnahme des „Post-Rest“-Verhaltens, was für eine verminderte Ca^{2+} -Freisetzung spricht.

Allgemein weisen die mit den MLP-Varianten transduzierten Zellen eine gesteigerte Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulation auf, wodurch sie nach dem „Steady State“ nicht mehr in der gleichen Zeit in den Grundzustand zurückkehren wie die Kontrollzellen, welche hingegen das anfängliche Ca^{2+} -Level vor der Stimulation wieder erreichen. Im Rahmen der Ca^{2+} -Aktivierung scheint $\text{MLP}^{\Delta\text{E}3}$ noch fast vollständig die Funktion von MLP-WT übernehmen zu können, da hier für keinen der Parameter deutliche Unterschiede ermittelt werden konnten.

VII. Diskussion

Kardiomyopathien beschreiben verschiedene Gruppen von Erkrankungen des Herzmuskels. Als prominenteste Vertreter gelten hierbei die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) sowie die dilatative Kardiomyopathie (DCM). Beide Formen manifestieren sich zu einer Herzinsuffizienz und führen nicht selten zum plötzlichen Herztod (Anon 2012). Im Allgemeinen sind mehr als ein Drittel aller Fälle von Herzinsuffizienz ursächlich auf Kardiomyopathien zurückzuführen.

Forschungsergebnisse aus den letzten Jahren zeigen eine familiäre Häufung sowie einen ausgeprägten genetischen Zusammenhang, was je nach Form der Kardiomyopathie etwa 30 bis 50 Prozent dieser Erkrankungen ausmacht (Anon 2012; Abraityte et al. 2017). Bei den genetischen Komponenten handelt es sich um Mutationen von Genen, die Proteine kodieren, welche strukturell oder funktional mit dem Sarkomer assoziiert sind. Trotz intensiver Forschung sind jedoch die molekularen Ursachen und Entstehungsmechanismen der Kardiomyopathien noch weitgehend unklar (Anon 2012).

Neuesten Studien zufolge kommt der Z-Scheibe, als zentrale Komponente des Sarkomers, eine besondere Rolle zu. Mutationen von Proteinen der Z-Scheibe führen letztlich zu Defekten in der kardialen Mechanosensation, der Signaltransduktion, der mechanischen Kraftweiterleitung sowie der mitochondrialen Energiegewinnung (N. Frey, Springer Medizin Verlag 2007, R. Knöll, Der Kardiologe, 2009). Ein Schlüsselprotein innerhalb dieses molekularen Netzwerkes stellt möglicherweise das Muskel-LIM-Protein (MLP) dar, welches sowohl strukturell als auch funktional, d.h. als Adapter- bzw. Signaltransduktionsprotein, einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung von Kardiomyopathien haben könnte. MLP ist demnach vorwiegend an der Z-Scheibe lokalisiert und interagiert mit einer Reihe wichtiger Proteine des Sarkomers (z.B. T-Cap) (Knöll et al. 2010). Zudem wird davon ausgegangen, dass es an verschiedenen Knotenpunkten der Signalweiterleitung lokalisiert ist und in die Regulation der zellulären Stressantwort involviert ist (Gehmlich et al. 2010). Obgleich zahlreiche neue Hinweise zum Thema MLP publiziert wurden ist nach wie vor ungeklärt, welche Mechanismen genau durch MLP reguliert werden und wie die MLP-abhängige Signaltransduktion zustande kommt. Im Rahmen dieser Dissertation sollten daher Funktionen, Interaktionen und molekulare Mechanismen von MLP identifiziert und weiter charakterisiert werden. Als Ziel sollten Rückschlüsse auf die Entstehung von Kardiomyopathien gewonnen werden und letztlich neue Ansatzpunkte für potentielle Therapien identifiziert werden.

Im nachfolgenden Kapitel wird als Grundlage für die Diskussion und zum besseren Verständnis ein hypothetisches Modell von bisher bekannten Zusammenhängen im Rahmen der MLP-Funktion bzw. den assoziierten Mechanismen, einschließlich der in dieser Arbeit erworbenen, neuen Erkenntnisse dargestellt.

VII.1. Hypothetisches Modell

MLP spielt eine wichtige Rolle in dem Mechanosensor-Komplex von Herzmuskelzellen. Mutationen wie auch Veränderung der MLP Expression werden mit der Entwicklung von chronischen Herzerkrankungen assoziiert. Aktuell ist jedoch nicht klar, welche Mechanismen zur Regulation der MLP-Signaltransduktion beitragen.

Das in Abb. 50 dargestellte hypothetische Modell fasst nochmals, auf Grundlage bereits bestehender Erkenntnisse, alle in dieser Arbeit gewonnenen Aspekte zusammen.

Demnach kann MLP über verschiedene Wege in der hypertrophen Aktivierung involviert sein, zum einen über den $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signalweg, d.h. im Rahmen der Signaltransduktion und zum anderen über mechanische Signale durch die es über die EZM und Integrine, beispielsweise nach Dehnungen, aktiviert wird.

1. Die Aktivierung des $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signalweges führt zu einer Translokation von PKC ϵ an die Z-Scheibe. Dort interagiert es mit MLP und aktiviert möglicherweise die Translokation von MLP in den Zellkern, um dort die hypertrophe Genexpression anzuschalten bzw. die Genexpression von *CSRP3* selbst.

Durch einen Knockout des $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signalweges kommt es zu keiner PKC ϵ -MLP-Interaktion an der Z-Scheibe, was die Translokation in den Zellkern und somit die hypertrophe Genexpression hemmt. MLP an der Z-Scheibe kann so vermehrt mit PICOT bzw. CnA interagieren. Die MLP-CnA-Interaktion aktiviert wiederum die Genexpression, die allerdings durch eine MLP-PICOT Bindung blockiert wird. Ein Knockout dieses Signalweges führt letztlich zu einer Inhibition des hypertrophen Signalweges (Abb. 50).

2. MLP bildet vermutlich auch einen Teil des zellulären Stress- bzw. Dehnungs-Sensors. Es sitzt dabei an verschiedenen Knotenpunkten der zellulären Signalverarbeitung und besitzt aufgrund seiner Größe eine potentiell hohe Mobilität. MLP kann möglicherweise die kardiale Mechanosensation über die Position an den Costameren (fokale Adhäsionen) bzw. über Integrine beeinflussen, wo es schnell auf Veränderungen der Muskellänge/Kontraktion reagieren kann und in Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix steht. Über diesen Aktivierungsmechanismus transloziert MLP in den Nukleus, wo es wiederum die hypertrophe Genexpression aktivieren kann (Abb. 50).
3. MLP-Splice Varianten können die Funktionen nicht mehr vollständig aufrechterhalten, was letztlich zu Signalweiterleitungsstörungen führt. Kurz gesagt hat sowohl die Menge als auch die Ausprägung (Splice-Form) von MLP einen großen Einfluss auf kardiale, hypertrophe Signalwege.

Im anschließenden Teil der Diskussion wird nun nochmal im Einzelnen auf alle relevanten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie deren Interpretation im Detail eingegangen.

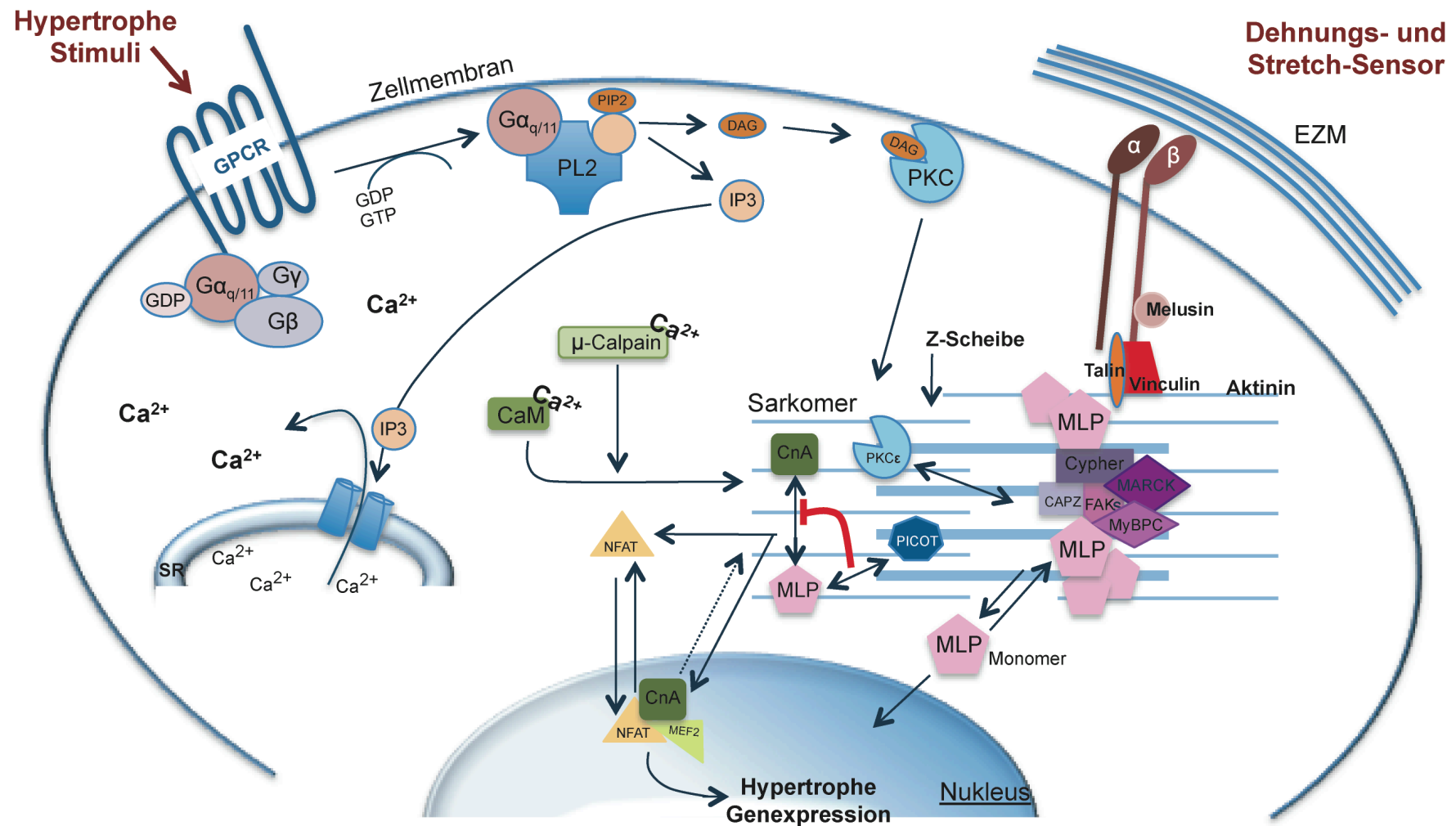


Abb. 50: Hypothetisches Modell des Zusammenspiels von MLP mit hypertrophen Signalwegen in Kardiomyozyten. ECM: Extrazelluläre Matrix, DAG: Diacylglycerin, CaM: Calmodulin, CnA: Calcineurin, GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor, MEF2: Myozyten Enhancer Faktor 2, IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat, NFAT: Nuklearer Faktor von aktivierten T-Zellen, PKC: Proteinkinase C, SR: Sarkoplasmatisches Retikulum, MLP: Muskel-LIM-Protein,

VII.2. $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout führt zu veränderten Expressionsmustern in Kardiomyozyten-Signalkaskaden

Die pathologische Rolle der $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signaltransduktion wurde eingehend am Herzen untersucht. Diese Studien profitierten von verschiedenen Arten von $G_{\alpha q}$ -Knockouts und Knockins (Akhter et al. 1998; D'Angelo et al. 1997; Rogers et al. 1999; Wettschureck et al. 2001). Nach heutigem Stand kann von einem Zusammenhang zwischen der $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signal-transduktion und der Entwicklung von Hypertrophien ausgegangen werden (Akhter et al. 1998; Wettschureck et al. 2001). Wird der $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signalweg dauerhaft leicht aktiviert, trägt dies zum Schutz vor pathophysiologischen Vorgängen in der Zelle bei. Eine chronische, starke Stimulation hingegen führt zur Entwicklung von Herzerkrankungen und Veränderungen der Genexpression (Wettschureck et al. 2001; Gusev et al. 2009; Domenighetti et al. 2005).

Untersuchungen von $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout-Herzen mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Methoden, wie z.B. Echokardiographie, Histologie, Elektrophysiologie und Fluorometrie (Ca^{2+} -Haushalt) isolierter Herzmuskelzellen belegen die vielfältigen Veränderungen auf mRNA bzw. Proteinebene. Ein Doppelknockout (dKO) von $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ weist starke Veränderungen auf Ganztier-, Organ-, Gewebe- sowie zellulärer Ebene auf (Pahlavan et al. 2012; Wiesen et al. 2016). Daraus lässt sich schließen, dass sowohl $G_{\alpha q}$ als auch $G_{\alpha 11}$ für die physiologischen Eigenschaften von Herzmuskelzellen von Bedeutung sind. Um genau dies besser verstehen zu können wurden isolierte Kardiomyozyten mittels einer Transkriptomanalyse ("deep sequencing", eine Form des „next generation sequencings“, NGS) untersucht und das Expressionsmuster von Wildtyp (WT) und dKO verglichen, um so die molekularen Mechanismen der daraus resultierenden Veränderungen verstehen zu können. Die dabei identifizierten 25.000 Gene wurden analysiert (Trapnell et al. 2013) und 3.100 Gene konnten identifiziert werden, deren Expressionsniveau sich signifikant zwischen WT und dKO unterschieden hat. Um hierbei entsprechende Kandidaten für eine Analyse weiter einzugrenzen, wurden Gene wichtiger Signalwege, die von den Veränderungen betroffen sind, selektiert. Mit Hilfe der quantitativen realtime PCR (qPCR) sollte im ersten Schritt das Expressionsniveau dieser Gene genauer untersucht werden und mit den vorhandenen NGS-Daten verglichen werden.

Einer der untersuchten kardialen Signalwege war der EZM-Signalweg (extrazelluläre Matrix) (siehe Abb. 21) des Herzens. Das Herzgewebe besteht zu mehr als zwei Drittel aus Kardiomyozyten, allerdings sind 70 % der Zellen im Myokard Fibroblasten, deren Aufgabe darin besteht die Synthese und die Regulation des Umsatzes der EZM-Bestandteile aufrechtzuhalten (Banerjee et al. 2007; Pelouch, Dixon, Sethi, et al. 1993; Pelouch & Jirmár 1993; Pelouch, Milerová, et al. 1993; Pelouch, Dixon, Golfman, et al. 1993). Untersuchungen zeigen, dass die kardiale extrazelluläre Matrix nicht nur ein einfaches Gerüst für die Zellen ist, sondern ein dynamisches Gebilde mit hoher struktureller und funktionaler Diversität. Sie steuert grundlegende zelluläre Prozesse wie die Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration (Lukashev & Werb 1998). Im gesunden Myokard dient die EZM neben der strukturellen Stabilität der Kraftübertragung zwischen den Myozyten (Weber et al. 1989). Im erkrankten Herz kommt es nach einem Herzinfarkt zu einem sogenannten „Remodeling“ von kardialen Gewebe. Dies führt zu einer verstärkten Ansammlung von extrazellulärem Matrixmaterial im Interstitium (Fibrose), was mit der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie des Myokards in Verbindung gebracht werden kann (Weber & Brilla 1993).

Um die zellulären und molekularen Mechanismen des EZM-Signalweges im Zusammenhang mit dem $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signalweg zu untersuchen, wurden entsprechende Gene, deren Expression im NGS von $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -KO Zellen als verändert identifiziert wurden, ebenfalls mittels qPCR analysiert. Die meisten der getesteten Gene zeigen hierbei eine veränderte Expression auf mRNA-Level, wodurch die NGS-Daten betätigt werden konnten. Die kardiale EZM ist ein großes Reservoir für bioaktive Moleküle wie Angiotensin II und Endothelin-1 und aktiviert wiederum, wie viele andere hormonelle Wege der zellulären Signalweiterleitung, unter anderem den G_q -gekoppelten Signalweg. Der EZM-Signalweg wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht tiefergehend analysiert, stellt aber dennoch einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen dar.

Ein weiterer Signalweg im Zusammenhang mit der Herzmuskelaktivität ist der „Cardiac muscle contraction“ Signalweg (CMC), dessen Aufgabe darin besteht die Hauptfunktionen der Herzmuskelzellen zu regulieren, und zwar die Fähigkeit zur Kontraktion und Relaxation (Kuo & Ehrlich 2015). Zur Aufrechterhaltung dieses Mechanismus spielen neben den kontraktilen Proteinen wie Aktin- und Myosin die Aktivierung von G-Proteingekoppelten Rezeptoren und die Ca^{2+} -Regulation eine zentrale Rolle. Kontrollierte Änderungen der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration dienen als Grundlage für die Kontraktion und Relaxation der Herzmuskulatur (Williams & Harlan 1987; Perry & Grand 1979). Die Menge an intrazellulär frei verfügbarem Ca^{2+} stellt so einen wichtigen Regulationsmechanismus der kardialen Kontraktilität dar und unterliegt einer komplexen Regulation aus verschiedenen Transportproteinen, Pumpen und intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (Morgan et al. 1991). Schon lange wird vermutet, dass Mutationen beteiligter Gene und somit Missregulationen dieses Signalweges Auslöser für die Entstehung von Herzerkrankungen sein können. Der CMC-Signalweg sollte daher im Rahmen dieser Arbeit als weiterer $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -abhängiger Signalweg untersucht werden.

Die Auswertung der qPCR-Analyse von $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -KO-Zellen hinsichtlich des CMC-Signalweges lieferte fünf Gene (*CTGF*, *MYBPC3*, *SCN1B*, *CSRP3* und *ATP1A1*), welche sich durch ihre Expressionsunterschiede zwischen WT und dKO von den anderen Genen unterschieden. Diese Ergebnisse lassen auf eine Veränderung im CMC-Signalweg infolge der $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Defizienz schließen (siehe Abb. 24 A, B). Besonders auffällig waren hierbei die Gene *MYBPC3* und *CSRP3*, da in beiden Fällen bereits der single Knockout (sKO) von $G_{\alpha q}$ oder $G_{\alpha 11}$ ausreichend war, um eine signifikant reduzierte Genexpression hervorzurufen. Auch beim direkten Vergleich mit den NGS-Daten zeigten beide Gene ein vergleichbares Ausmaß der Expressionsveränderung (siehe Ab. 26). Es lag daher die Vermutung nahe, dass beide Kandidaten Schlüsselgene darstellen könnten, welche an der Entstehung einer kardialen Hypertrophie beteiligt sind.

Kardiale Hypertrophie ist die adaptive Antwort des Myokards auf eine physiologisch oder pathologisch verursachte, erhöhte Belastung, welche sich in einer Größenzunahme einzelner Kardiomyozyten und einer Zunahme kontraktiler Proteine zeigt (McKinsey & Kass 2007; Takefuji et al. 2013). Diese sogenannte hypertrophe Stimulation wird durch verschiedene Membranrezeptoren im Sarkolemma von Kardiomyozyten aktiviert nachdem diese einen entsprechenden extrazellulären Stimulus erhalten haben.

Wichtige Vertreter dieser Transmembranproteine sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (Heineke & Molkentin 2006; Takefuji et al. 2012). GPCRs werden durch die Bindung von sympathischen (adrenerge GPCRs) oder parasympathischen Neurotransmittern (muskarinerge GPCRs) aktiviert, wodurch sich auch die Konformation der GPCR-assoziierten G-Proteine verändert. Durch die GPCR-abhängige Konformationsänderung im G-Protein können $G_{\alpha q}$ bzw. $G_{\alpha 11}$ verschiedene Signalmoleküle aktivieren oder inhibieren (Heineke & Molkentin 2006). Interessanterweise sind die korrespondierenden Proteine der beiden kodierenden Gene, welche, wie zuvor genannt, in der qPCR identifiziert wurden, am Sarkomer zu finden. MLP, welches durch *CSRP3* kodiert wird lokalisiert u.a. an der Z-Scheibe und Mybpc3 an den dicken Filamenten (Myosin).

MLP, welches von beiden weniger gut erforscht ist, fungiert dabei wohl in erster Linie als Adaptermolekül und interagiert mit Proteinen und potentiell mit Nukleinsäuren. Auch wird vermutet, dass es strukturelle und signalweiterleitende Funktionen erfüllt, z.B. transloziert es nach entsprechenden Reizen in den Nukleus, wo es zur Regulation der Genexpression beiträgt (Arber et al. 1997; Arber et al. 1994; Boateng et al. 2007; Qi & Boateng 2006). Im Fall von Mybpc3, welches direkt mit dem Sarkomer assoziiert, wird vermutet, dass es infolge adrenerger Stimulation durch regulatorische Phosphorylierung über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird. Mybpc3 bindet im aktiven Zustand an die Myosin-Filamente des Sarkomers und verhindert, dass diese degradiert werden. Wird die Phosphatgruppe entfernt, dann wird Mybpc3 abgebaut, gefolgt vom Abbau der Proteine der Myosin-Filamente, was letztendlich dazu führt, dass das Kontraktionspotential des Herzmuskels verringert wird.

Beide Proteine, MLP und Mybpc3, können über spezifische Stimuli aktiviert werden, wobei sie als Teil von Signalkaskaden fungieren, die jeweils mit der Aktivierung von GPCRs beginnen. Zu den in Kardiomyozyten relevanten Signalkaskaden zählen u.a. der Proteinkinase A- (PKA-), der CnA/NFAT-, der PKC- und der Mitogen-aktivierte Proteinkinase- (MAPK-) Signalweg (Bassel-Duby & Olson 2003; Frey et al. 2000; Molkentin & Dorn 2001).

Wie bereits im hypothetischen Modell dargestellt ist PKC in die $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signalkaskade involviert und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit in der MLP-Co-IP nachgewiesen werden (Abb. 41). PKC wird generell über $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ aktiviert und reguliert. $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ aktiviert zu Beginn PLC β , welches daraufhin die Hydrolyse von PIP $_2$ zu DAG und IP $_3$ vermittelt. DAG aktiviert am Sarkolemma letztlich unterschiedliche PKC-Isoformen, die in verschiedene subzelluläre Kompartimente translozieren (Barnett et al. 2007; Lipp & Reither 2011; Hui et al. 2014).

Die Isoform PKC ϵ transloziert nach Aktivierung an die Z-Scheibe und ist in Schutzmechanismen gegen kardiale Durchblutungsstörungen und möglicherweise in die Entstehung kardialer Hypertrophie involviert (Akita 2008; Braz et al. 2004; Gray et al. 1997; Frey & Olson 2003; Heineke & Molkentin 2006; Sabri & Steinberg 2003; X. Wang et al. 2006). In diesem Zusammenhang ist es bislang unklar inwieweit MLP und Mybpc3 involviert sind. Am Zytoskelett interagiert PKC ϵ direkt mit Aktin, Mybpc3, MARCKs, CapZ, Cypher, FAK und MLP (Akita 2008; Edmondson et al. 2002; Frank et al. 2006; Newton & Messing 2010; Pyle & Solaro 2004). Zudem kommt es durch hypertrophe Stimuli zu einer verstärkten Expression von PICOT (PKC-interagierende Cousin von Thioredoxin), welches mit CnA (Calcineurin) um die Interaktion mit MLP an der Z-Scheibe konkurriert. Interagiert MLP mit CnA bewirkt diese Verbindung eine Aktivierung des CnA/NFAT-Signalweges, welcher mit dem PKC-Signalweg assoziiert ist und im aktivierten Zustand über Transkriptionsfaktoren im Nukleus die hypertrophe Genexpression aktiviert (Molkentin & Dorn 2001). Die verstärkte Expression von PICOT, welcher die Interaktion von MLP mit CnA blockiert, könnte demnach erklären, warum bei einem G α_q /G α_{11} -dKO eine verringerte MLP Expression vorzufinden ist. Durch die nun reduzierte Interaktion von MLP mit CnA würde somit eine verminderte Stimulation der hypertrophen Genexpression durch den MLP/CnA-Komplex erfolgen. Da die MLP-Expression jedoch selbst durch Hypertrophie aktiviert wird, liegt es demnach auch weniger in der Zelle vor (Y.-J. Jeong et al. 2005; Voelkel & Linke 2011; Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002).

VII.3. Knockout von $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ führt zur Abnahme der MLP-Expression

Nach der Identifikation signifikant regulierter Gene des CMC-Signalweges nach $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout sollten nun insbesondere MLP und Mybpc3 auf Proteinebene weiter analysiert werden. Für diese Analysen wurde, wie im Ergebnissteil beschrieben, auf die aufwendige Isolation von Kardiomyozyten verzichtet und stattdessen ganzes Herzgewebe verwendet, da es hierbei sowohl in Bezug auf den relativen mRNA-Level (Herzmarker) als auch den relativen Proteinlevel keine Unterschiede gab (Abb. 27 und 28), obwohl der Herzmuskel neben Kardiomyozyten aus einem feinstrukturierten Bindegewebsnetzwerk besteht (Liebich 2004). Zusätzlich werden hier auch autonome Nervenfasern, zahlreiche Lymph- und Blutgefäße, Fibroblasten, Fibrozyten sowie Endothelzellen vorgefunden. Allerdings liegt der Anteil an Myozyten, je nach Spezies, mit 73,5 % bis 85 % sehr hoch, was das beschriebene Ergebnis erklärt (Masri et al. 2017). Nichtsdestotrotz spielt die Einhaltung des genauen Alters bei einer vergleichenden Analyse eine sehr große Rolle, da bekannt ist, da dies einen substanziellen Einfluss auf die Gewebezusammensetzung des Herzmuskels haben kann (Canale et al. 2012).

Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils zwei Versuchstiere pro Genotyp (WT, dKO und sKO) verwendet. Hierbei zeigte sich bei allen getesteten Kandidaten eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes (ca. 30-80 %) bei dKO-Tieren, mit Ausnahme von Mybpc3 welches eine Erhöhung aufwies. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der qPCR-Analyse, in der ähnliche relative mRNA-Mengen nachgewiesen werden konnten. Am deutlichsten ist die Reduktion des relativen Proteingehaltes für MLP zu beobachten. Im Vergleich zu den WT-Proben liegt die Proteinmenge bei dKO-Herzen bei nur noch 30 %, und bereits bei $G_{\alpha 11}$ sKO-Herzen bei 67 % und bei $G_{\alpha q}$ sKO-Herzen bei 82 % (siehe Abb. 25 und Abb.29). Anhand des Proteingehaltes wird deutlich, dass ein derartiger regulatorischer Effekt am stärksten ausgeprägt ist, wenn beide Gene, $G_{\alpha 11}$ und $G_{\alpha q}$, ausgeschaltet sind. Basierend auf diesem Ergebnis kann angenommen werden, dass bei einem $G_{\alpha 11}/G_{\alpha q}$ -dKO die Proteinbiosynthese von *CSRP3* entweder inhibiert ist oder obendrein dessen Proteindegradation gefördert wird. Die Bedeutung des $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signalweges für die Expression von MLP wird auch dadurch deutlich, dass bereits ein sKO eines der beiden G-Proteine ausreicht, um diesen Effekt partiell hervorzurufen.

Studien zeigen, dass es auch Hinweise auf eine ursächliche Rolle von MLP bei der Autophagie-Aktivierung gibt (Rashid et al. 2015). Ein Mangel an MLP beeinträchtigt die Autophagie im Skelettmuskel, was zu einer fehlerhaften Entfernung von Organellen oder defekten Proteinen führt. Dies wiederum führt dann zu einem Muskelabbau und zu Muskelschwäche. Daher wird vermutet, dass MLP eine Doppelfunktion einnimmt, zum einen als Strukturprotein und zum anderen bei der Signaltransduktion, u.a. im Autophagieprozess.

Für die folgenden Untersuchungen wurde nun weiter der Fokus ausschließlich auf *CSRP3*/MLP gelegt. Dieses Gen bzw. das korrespondierende Protein stellte sich als das interessanteste und vielversprechendste dar, da es noch weniger erforscht ist als *MYBPC3* und da die damit assoziierten molekularbiologischen Mechanismen noch weitestgehend unbekannt sind.

VII.4. Kardiale Hypertrophie stimuliert die *CSRP3*-Gen-Expression

Da bei einem $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Knockout, wie in Kapitel VI.1 und VI.2 gezeigt, eine erniedrigte mRNA-Expression von *CSRP3* und ein erniedrigter MLP-Level nachgewiesen werden konnte und der $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -Signalweg im Zusammenhang mit hypertropher Stimulation steht, sollte die Expression dieses Genes bei künstlich (chemisch und physikalisch) hypertrophierten Mäusen untersucht werden.

In C57BL/6N Charles River („black 6“, Standard-Modelstamm) Mäusen wurde hierzu auf zwei unterschiedlichen Wegen eine kardiale Hypertrophie induziert. Zum einen mechanisch durch eine Nachlast-Erhöhung / TAC („transverse aortic constriction“) und zum anderen chemisch durch chronische β -adrenerge Stimulation mit Hilfe von Isoproterenol-Injektion. Isoproterenol ist ein Katecholamin und die wiederholte Injektion dieser Substanz stellt das am meisten verwendete Modell dar, welches eine chronische, adrenerge Stimulation nachahmt und somit kardiale Hypertrophie induziert (Chowdhury et al. 2013; Molojavyi et al. 2010). Das synthetische, racemische Noradrenalin-Derivat, aktiviert ausschließlich die β_1 -Adrenozeptoren, welche zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (E et al. 2017; Krushna et al. 2017).

Die Bindung von Isoproterenol an β_1 -Rezeptoren (GPCR) bewirkt die Diffusion der $G_{\alpha q}$ -Untereinheiten, welche in der Folge die Adenylylcyclase aktiviert. Hierdurch kommt es wiederum zur Synthese von cAMP aus ATP. Die erhöhte cAMP-Konzentration im Zytosol führt zur Aktivierung der PKA, welche in der Folge diverse Zielproteine phosphoryliert, unter anderem spannungsabhängige Ca^{2+} -Ionenkanäle. Diese sind für den langsamen Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol während der Zell-Depolarisation verantwortlich. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration resultiert letztlich in einer erhöhten Herzmuskelkontraktion.

In Tierexperimenten führt die Verabreichung hoher Dosen Isoproterenol zu vielfältigen kardialen Pathologien, welche je nach Isoproterenol-Dosierung als Kardiomyopathie, Kardiomegalie (Hypertrophie), Myozytolyse oder infarktähnlich beschrieben wird (Spallek 2012; Fahlke et al. 2012). Hierbei erhöht sich auch das Herzgewicht (Leenen et al. 2001; Luckey et al. 2016). Die induzierte Hypertrophie mit Isoproterenol zeigt dabei auch Effekte auf molekularer Ebene und hat Auswirkungen auf die kardiale Proteinexpression im Bereich Muskelkontraktion, Transport, Chaperone, ATP-Biosynthese sowie DNA-Synthese (Chowdhury et al. 2013).

Als weitere Möglichkeit zur künstlichen Induktion von Hypertrophie wird eine operative Nachlasterhöhung durch Aortenkonstriktion durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine Konstriktion der *Aorta transversa* durchgeführt, weswegen sie auch als „transverse aortic constriction“, kurz TAC, bezeichnet wird (Martin et al. 2012). Durch die dabei entstehende Verengung der Aorta wird die Nachlast des linken Ventrikels erhöht. Selbiges Phänomen liegt auch bei peripheren Verschlusskrankheiten sowie bei einer erhöhten Restriktivität des Gefäßsystems durch chronisch erhöhten Blutdruck vor. Häufige Ursache für chronische linksventrikuläre Hypertrophie ist die erhöhte linksventrikuläre Nachlast, weswegen das beschriebene Tiermodell der TAC-OP in vielen Studien zur Erforschung der assoziierten Pathologien und ihren Behandlungsmethoden genutzt wird (Bradshaw et al. 2009; Hu et al. 2003; Rockman et al. 1991; Rockman et al. 1994). Sie stellt somit neben der Isoproterenol-Injektion einen interessanten Ansatzpunkt dar, pathologische Veränderung der Gen-Expression von *CSRP3* zu analysieren.

Die Ergebnisse in Abb. 30 zeigen einen substanziellen Genexpressionsanstieg von *CSRP3* im Fall der mit Isoproterenol induzierten Mäuse, wobei die niedrigere Konzentration (200 mg/kg) den höchsten Effekt erzielte (2-Delta CT = 37,5). Der etwas schwächere Effekt bei 300 mg/kg könnte entweder als unspezifische Variation interpretiert werden oder sogar die Auswirkung einer zu hohen und bereits degenerativen Wirkung sein, bei der die Kardiomyozyten schon beginnen apoptotisch zu werden.

Die starke Genexpression von *CSRP3* infolge des pathologisch-hypertrophen Stimulus könnte daher für eine wesentliche Beteiligung von MLP an der Herzmuskelkontraktion bzw. für eine Kompensation der Herzmuskelüberlastung sprechen.

Interessanterweise kann dieser starke Effekt bei TAC-induzierten Hypertrophie-Mäusen nur schlecht in gleicher Weise reproduziert werden. Im Vergleich zu den Isoproterenol injizierten Mäusen zeigen die TAC-Mäuse zwar eine deutliche, aber dennoch geringere Expressionserhöhung von *CSRP3*. Dies könnte sich jedoch dadurch erklären lassen, dass die durch die Aortenkonstriktion verursachte Nachlasterhöhung des linken Ventrikels einen direkten, mechanischen Einfluss auf die Zelle hat. Somit könnte es einerseits zu einer verlängerten Adaptiondauer im Vergleich zur β_1 -adrenergen Signaltransduktion kommen. Zum anderen kommt diese Situation auch dem realen Zustand (wie bei einer peripheren Verschlusskrankheit) wesentlich näher. Denn über die chemische Induktion mittels Isoproterenol wird vermutlich eine unnatürlich hohe bzw. maximale Reizung des β_1 -Adrenozeptors sowie des anschließenden Signalweges herbeigeführt wird. Dies hätte demnach eine unnatürlich hohe Expression von Hypertrophie-Genen wie *CSRP3* zur Folge. Schlussendlich kann jedoch festgestellt werden, dass sowohl eine chemisch als auch eine mechanisch herbeigeführte kardiale Hypertrophie zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von *CSRP3* führt. *CSRP3* spielt demnach eindeutig eine wichtige Rolle bei der Entstehung von kardialer Hypertrophie.

VII.5. Herzzellen von Kardiomyopathie-Patienten weisen verschiedene Splice-Varianten von MLP auf

Nachdem im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass eine induzierte Kardiomyopathie die Expression von *CSRP3* beeinflusst, sollte die Expression von *CSRP3* auch im humanen System untersucht werden. Mit Hilfe einer PCR-Analyse sollten mögliche Unterschiede in der *CSRP3*-Expression identifiziert werden. Diese Untersuchung wurde an humanen „Herzohren“ durchgeführt, die bei der Etablierung des Zugangs zur Herz-Lungen-Maschine im OP der Herz-Thorax-Chirurgie anfallen. Hierbei handelte es sich um Patienten, die unter verschiedenen Formen kardialer Hypertrophie litten (NYHA I-IV). Als Kontrollgruppe wurden solche Patienten definiert, die sich ausschließlich einer Bypass-Operation ohne ventrikuläre Komorbidität unterzogen. Es wurde bereits in früheren Berichten gezeigt, dass die MLP-Expression bei Patienten mit chronischer Herzkrankheit verändert ist.

So wurden z.B. Mutationen im *CSRP3*-Gen mit der Entstehung von erblichen Herzkrankheiten in Verbindung gebracht (Geier et al. 2003; Geier et al. 2008; Reuter 2004; Riecker 2013; Su et al. 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie zeigte auf, dass unterschiedlich große Varianten von *CSRP3* exprimiert werden. Sowohl Proben der Kontrollgruppe als auch die Proben der erkrankten Gruppe zeigten bis zur vier mRNA-Isoformen von *CSRP3*, welche mittels RNA-Sequenzierung identifiziert werden konnten. Eine detaillierte Sequenzanalyse ergab, dass diese Isoformen offensichtlich durch alternatives Splicing entstanden sind und daher als Splice-Varianten bezeichnet werden können. Es handelt sich hierbei um die Volllänge von *CSRP3* (bestehend aus 585 Basen), eine Isoform ohne Exon 3 und 4 (283 Basen), eine Variante ohne Exon 3b und 4a (387 Basen) und eine Isoform ohne Exon 3 (481 Basen).

Das alternative Splicing ist einer der Hauptmechanismen, der die Proteindiversität antreibt und die Expression verschiedener Proteine aus einem einzelnen Gen ermöglicht (Lara-Pezzi et al. 2013). Alternatives Splicing kann die Proteinstruktur, -lokalisierung, -regulation und -funktion verändern, was im Fall des Herzmuskels offensichtlich zu Kardiomyopathien, Arrhythmien und anderen Pathologien führen kann (Matkovich 2016; Lara-Pezzi et al. 2013). Die zugrundeliegenden posttranskriptionellen Regulatoren sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

Ein prominentes Beispiel für krankhafte Splice-Varianten ist das größte bekannte Protein Titin, welches als einer der Hauptbestandteile des Sarkomers die Struktur und biomechanischen Eigenschaften der quergestreiften Muskulatur bestimmt (Maatz et al. 2015). Bereits während der Entwicklung im gesunden Herzen verändert sich die Expression der Titin-Splice-Varianten. So findet man im jungen sich entwickelnden Herzen größere Splice-Varianten, welche später durch kleinere Isoformen ersetzt werden. Diese besitzen eine geringere Anzahl an Immunglobulin- und PEVK-reichen (Prolin, Glutamat, Valin, Lysin) Domänen, wobei letztere zur passiven Kraftentwicklung beitragen (Lahmers et al. 2004; Linke et al. 1998). Die Abnahme dieser federartigen Elemente führt zu einer erhöhten passiven Steifigkeit des Herzens (Makarenko et al. 2004). Etwa ein Drittel der Titin-Mutationen, die bei Patienten mit DCM gefunden wurden, beeinflussen das Splice-Verhalten, was zum Überspringen von Exons, Beibehalten von Introns oder anderen Splice-Veränderungen führt, die zu einer Verkürzung oder Verlängerung der Titin-Isoform führt (Herman et al. 2012; Lara-Pezzi et al. 2013).

Neueste Ergebnisse zeigen Splice-Varianten des kardialen Natriumkanals SCN5A, welche zu einer verringerten Erregbarkeit führen und an kardialen Dysfunktionen beteiligt sind (Freyermuth et al. 2016).

Eine detaillierte Analyse der MLP-Isoformen zeigt, dass hier ganz erhebliche Veränderungen in der Funktion des Proteins zu erwarten sind, da z.B. ganze LIM-Domänen fehlen. Diese LIM-Domänen sind aber für MLP-Protein-Protein Interaktionen von zentraler Bedeutung. Dieser Verlust von Interaktionen mit Partner-Proteinen hat wahrscheinlich einen substanziellen Einfluss auf die Sarkomerstruktur. Bekannte Bindungspartner wie T-Cap, α -Aktinin, Zyxin und N-RAP, welche alle den Aufbau der Sarkomerstruktur unterstützen, könnten durch das Fehlen der notwendigen LIM-Domänen keine Interaktion mehr mit MLP eingehen (Knöll et al. 2010; Heineke et al. 2005; Arber & Caroni 1996; Ehler et al. 2001; Henderson et al. 2003; D. Jeong et al. 2006; Anon 1997). Dies würde folglich eine Desorganisation der Z-Scheibe nach sich ziehen, was letztlich zu einer gestörten Muskelkontraktion führt. Diese Hypothese wird durch die Betrachtung der MLP/ β 1-Spektrin-Interaktion untermauert, welche spezifisch über die LIM-2-Domäne in MLP erfolgt und vollständig verloren geht, wenn nur noch die LIM-1-Domäne zur Verfügung steht (Flick & Konieczny 2000).

Alle im Rahmen dieser Arbeit gefundenen, kürzeren Splice-Varianten besitzen nur noch eine halbe bzw. keine LIM-2-Domäne mehr und würden damit eine MLP-Interaktion mit β 1-Spektrin ausschließen. Entsprechende zukünftige *in vitro* bzw. *in vivo* Untersuchungen sind noch notwendig. Durch die potentiell fehlenden Interaktionen wird somit die Signaltransduktionsfähigkeit von MLP substanziell beeinträchtigt. Studien zeigen, dass die Interaktion von MLP mit CnA für den CnA/NFAT-Signalweg essentiell ist, welcher ein fester Bestandteil der pathologischen und vermutlich auch der physiologischen Hypertrophie-Antwort ist. Patienten mit Kardiomyopathien zeigen eine stark erhöhte Aktivierung dieses Signalweges (Heineke et al. 2005; D. Jeong et al. 2006; Diedrichs et al. 2007; Haq et al. 2001). Wird der CnA/NFAT-Signalweg blockiert, führt dies auch zu einer Unterdrückung kardialer Hypertrophie (Bueno et al. 2004; Bueno et al. 2002). Jeong und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass PICOT mit CnA um die Bindungsstelle mit MLP konkurriert und diese Interaktion als Negativregulator des CnA/NFAT-Signalwegs dient. PICOT gehört zur Familie der Glutaredoxine, welche die Proteinfaltung sowie die Regulation zellulärer Stressantworten während der Differenzierung, Transkription und Apoptose unterstützt (Berndt et al. 2008).

Wird also die Interaktion von MLP zu diesen beiden Proteinen aus dem Gleichgewicht gebracht kann dies zu Veränderungen hypertropher Genregulation in Kardiomyozyten führen. Auch einer weiteren Interaktion von MLP, und zwar mit ILK (Interleukin 1), wird ein Einfluss auf in die kardiale Signaltransduktion zugeschrieben (Flick & Konieczny 2000; Postel et al. 2008). MLP nimmt in Myozyten wahrscheinlich zwei Funktionen wahr, einerseits spielt es eine strukturelle und signalweiterleitende Rolle, indem es mit anderen Signalmolekülen im Zytoplasma wechselwirkt und andererseits moduliert es, wenn es im Zellkern lokalisiert ist, die Genexpression durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (Chang et al. 2003; Buyandelger et al. 2011).

Bei den in dieser Arbeit identifizierten MLP-Splice-Varianten ist z.T. die NLS (Nukleäres Lokalisationssignal) betroffen, was einen Transport in den Zellkern nicht mehr möglich macht oder zumindest stark beeinträchtigt. Da es sich bei MLP um ein sehr kleines Protein von 194 Aminosäuren bzw. 25 kDa handelt, kann angenommen werden, dass es trotz fehlender NLS passiv in den Kern diffundieren kann, da die Kernpore erst eine vollständige Barriere für Proteine über 60 kDa dargestellt (R. Wang & Brattain 2007). Jedoch handelt es sich dabei nicht mehr um einen gerichteten, aktiven Transport. Boateng und Mitarbeiter konnten zeigen, dass MLP als Reaktion auf die zyklische Dehnung von Kardiomyozyten in den Kern und Nukleolus transloziert. Durch die Anwesenheit von MLP wird die ribosomale Proteinsynthese stimuliert, ein wichtiger Schritt in der hypertrophen Reaktion in Myozyten (Boateng et al. 2007).

Boateng und Mitarbeiter zeigten zudem, dass die Hemmung der MLP-Kerntranslokation in Kombination mit der zyklischen, mechanischen Belastung von Kardiomyozyten zu einem signifikanten Verlust der Sarkomerstruktur zusammen mit einer verminderten α -Aktinin-Expression führt (Boateng et al. 2007; Boateng et al. 2009). Bei einer humanen K69R-MLP-Mutation wird Arginin in der NLS-Region durch ein Lysin ersetzt, was zu einer Kardiomyopathie aufgrund einer veränderten zellulären MLP-Lokalisation führt (Mohapatra et al. 2003). Diese Ergebnisse sowie die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Splice-Varianten von MLP bei erkrankten Patienten, bei denen zum Teil die NLS komplett fehlt, bestätigen, dass das nukleäre MLP eine wichtige Funktion im menschlichen Herzen hat und für die Anpassung der Genexpression an hypertrophe Reize benötigt wird. In Bezug auf die gefunden Splice-Varianten von MLP wäre es wichtig die verschiedenen Splice-Regulatorelemente zu untersuchen. Alternatives Splicing wird durch eine Fülle von Splice-Faktoren reguliert (Maatz et al. 2015).

Diese erkennen regulatorische Elemente in der Prä-mRNA und aktivieren das Splicing eines Exons (Splice-Aktivatoren) oder unterdrücken dieses (Splice-Repressoren).

Zudem spielen auch positionsabhängige Effekte eine große Rolle. Beispielsweise kann ein Splice-Faktor als Aktivator wirken, wenn er an ein regulatorisches Element im Intron bindet, jedoch auch als Repressor, wenn er an ein regulatorisches Element im Exon bindet. Durch kombinatorisches Auftreten der verschiedenen regulatorischen Elemente entsteht eine große Komplexität was generell als Splice-Code bezeichnet wird (Maatz et al. 2015). Mit Hilfe der Entschlüsselung des Splice-Codes wäre es so möglich, ein Verständnis der molekularen Mechanismen von MLP zu bekommen und die damit assoziierten Krankheitsentwicklungen zu verstehen. Eine mögliche Herangehensweise stellt die in Maatz et al. 2015 beschriebene CLIP („cross-linking and immunoprecipitation“)-Methode dar, welche Interaktionen von Splice-Faktoren mit regulatorischen RNA-Sequenzen identifiziert. Hierbei werden die Proteine mittels UV-Strahlung kovalent an die RNA gebunden, mittels Antikörper präzipitiert und anschließend die durch das Protein geschützte RNA nach Restriktionsverdau sequenziert. Hierdurch wird die genaue Interaktionsstelle auf der mRNA identifiziert.

VII.5.1. Der Expressionslevel von *CSRP3* korreliert mit dem Alter von Patienten

Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass veränderte MLP-Formen großen Einfluss auf die Interaktion und Kernlokalisation des Proteins haben und damit Herzerkrankungen auslösen können sollte nochmals genauer im Hinblick auf die jeweiligen, untersuchten Patienten-Proben analysiert werden. Die in Abb. 32 gezeigten Proben, welche große Unterschiede in der vorhandenen mRNA-*CSRP3*-Mengen aufwiesen waren von Patienten im Alter von 40-80 Jahren. Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang war, ob die Expression der *CSRP3*/MLP-Volllänge-Variante mit dem Alter bzw. dem Grad der Erkrankung abnimmt. Bei Untersuchungen der Expression mittels qPCR wurde deutlich, dass die mRNA-Menge dieser Isoform bei jungen Patienten deutlich höher war als bei älteren Patienten. Rückschlüsse auf die Art der Erkrankung konnten jedoch mit diesen Ergebnissen bislang nicht hergestellt werden. Allerdings scheint der Expression-Level von *CSRP3*/MLP mit dem Alter zu korrelieren ($R^2 = 62\%$) (siehe Abb. 35 C). Gegebenenfalls könnte dies dafür sprechen, dass mit zunehmendem Alter der Grad des Splicings zunimmt und das Gleichgewicht somit zugunsten der kleineren *CSRP3*-Splice-Varianten verschoben wird, wodurch die Wahrscheinlichkeit für Herzerkrankungen zunimmt.

Um diese Hypothese zu stützen bedarf es jedoch noch weitere Untersuchungen (Bspw. Northern-Blot-Analysen, um eine Zunahme der Splice-Varianten quantitativ zu zeigen).

Die Menge an *CSRP3*-mRNA (Volllänge) wurde ebenfalls in Rattenzellen von drei alten Tieren (6 bis 21 Monate) und sechs Neugeborenen (1 Tag) mittels qPCR-Messung analysiert (siehe Abb. 37). Auch hier wurde in den wenigen Stunden alten Ratten eine höhere Expression von *CSRP3* gefunden als in alten Tieren. Dieser Unterschied war zwar signifikant, jedoch nicht so deutlich wie in den humanen Proben. Doch es bleibt anzumerken, dass es sich bei den humanen Proben, im Gegensatz zu den Rattenherzzellen, um erkrankte Menschen handelt (Patienten mit Kardiomyopathien) und somit auch eine genetische Vorbelastung bestanden haben könnte.

Die gleichzeitige, quantitative Zunahme des Expressionsniveaus einzelner Splice-Varianten konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden, da keine geeigneten Primer identifiziert wurden, die nur an den Bereichen der entsprechenden Isoformen binden. Dies stellte sich angesichts der geringen Länge der Sequenz als sehr schwierig heraus, da die *CSRP3*-Volllänge in entsprechenden Vorversuchen stets mit erkannt wurde (Daten nicht gezeigt). Es bleibt daher unklar, ob die Abnahme der *CSRP3*-Volllänge-Expression im Alter mit einer gesteigerten Expression der Splice-Varianten einhergeht oder ob es hierfür eine andere Ursache gibt. Zukünftige Analysen mittels Northern-Blotting könnten weiteren Aufschluss über die Mengen der verschiedenen Isoformen bringen.

Bekannt ist, dass nicht nur Änderungen des MLP-Expressionslevel mit der Entstehung von chronischen Herzerkrankungen assoziiert sein können, sondern auch Mutationen des Proteins (Bos et al. 2006; Knöll, Hoshijima & Chien 2002; Knöll et al. 2010; Hershberger et al. 2008; Mohapatra et al. 2003). Ein prominentes Beispiel ist die MLP-W4R-Mutation (Tryptophan-4→Arginin). Die genetische Ursache ist eine „missense“-Mutation (Thymin→Cytosin) im Exon 2. Tryptophan-4 liegt innerhalb der N-terminalen T-Cap-Bindungsdomäne von MLP. Demnach hat die W4R Mutation einen negativen Einfluss auf die Interaktion von MLP und T-Cap (Knöll et al. 2010; Knöll, Hoshijima & Chien 2002). Untersuchungen mit MLP^{W4R/W4R} Mäusen zeigten im Alter von einem Jahr erste Anzeichen einer HCM. Die Transkription und Translation war sowohl in heterozygoten als auch in homozygoten MLP^{W4R/W4R} Knock-in Herzen im Vergleich zu WT-MLP Herzen vermindert (Knöll et al. 2010). Jedoch wurde diese Mutation nicht nur in Herzen von Patienten mit Kardiomyopathie nachgewiesen, sondern auch in Herzen von vermeintlich gesunden Patienten (Bos et al. 2006; Geier et al. 2008). Daher ist bislang kritisch zu betrachten, ob – und wenn ja wie stark – die W4R Mutation kausal mit Kardiomyopathie im Zusammenhang steht (Bos et al. 2006; Knöll, Hoshijima & Chien 2002; Gehmlich et al. 2008; Gehmlich et al. 2010; Geier et al. 2008; Gunkel et al. 2009; Newman et al. 2005).

Dennoch sind bislang zehn Mutationen von MLP bekannt, welche mit zunehmenden Alter verstärkt zu einer Dysregulationen der mRNA oder des Proteins beitragen können, was eine Abnahme der MLP-Vollängen Expression erklären könnte.

VII.5.2. MLP fungiert als zellulärer Stress- bzw. Dehnungs-Sensor

Im Rahmen der Untersuchungen des Expressionslevel der *CRSP3*-mRNA (Volllänge) zwischen jungen und alten Patienten wurden weitere Proben hinzugezogen, um eine breitere Alterspanne abzudecken. Hierbei wurden zusätzlich Patienten-Proben (null bis zwei Jahre) verwendet, denen Vorhofspitzen vor und nach Anschluss an eine Herz-Lungen-Maschine (HLM) entnommen wurden.

Interessanterweise zeigten diese Analysen deutliche Unterschiede in der Expression der MLP-Vollänge auf mRNA-Ebene. Nach Anschluss der HLM für ca. 1 h (Dauer der Herzoperation) wurden im Durchschnitt ca. 53,1 % niedrigere Expressionswerte ermittelt (siehe Abb. 36). Dieses Ergebnis spricht für eine schnelle, kurzfristige Adaption von *CRSP3*/MLP an die Umgebungsbedingung bzw. Aktivität des Herzens. Durch den Anschluss an die HLM, die damit verbundene Stilllegung des Herzens und fehlende Kontraktionsleistung sinken vermutlich die Anforderungen an MLP an dessen Funktion bei der Signalweiterleitung.

Schon lange wird diskutiert, ob MLP Teil eines zellulären Stress- oder Dehnungs-Sensors ist (Gunkel et al. 2009; Gehmlich et al. 2010). Aufgrund seiner Lokalisation spricht vieles dafür. MLP u.a. sitzt an verschiedenen Knotenpunkten der zellulären Signalverarbeitung und besitzt auf Grund seiner Größe eine hohe potentielle Mobilität (Knöll, Hoshijima & Chien 2002; Frank et al. 2006; Heineke & Molkentin 2006; Gehmlich et al. 2008; Gehmlich et al. 2010; Geier et al. 2008; Gunkel et al. 2009; Voelkel & Linke 2011). Jedoch ist unklar, ob mechanischer Stress bis zu MLP weitergeleitet wird. Titin, von dem angenommen wird, dass es in der zellulären Stress- bzw. Dehnungs-Sensorik eine zentrale Funktion übernimmt, interagiert beispielsweise nicht direkt mit MLP (Voelkel & Linke 2011).

Jedoch zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass MLP zumindest eine bedeutende Rolle im Rahmen der Stress- bzw. Dehnungssensorik von Kardiomyozyten zu spielen scheint, da die *CSR3*-Expression offensichtlich binnen kürzester Zeit an die erforderliche Herzleistung adaptiert werden kann.

Das Augenmerk sollte vielmehr auch auf Interaktion von MLP mit den Costameren liegen. Costamere sind Proteinkomplexe, deren Aufgabe in der quergestreiften Muskulatur darin besteht, die bei der Kontraktion von Sarkomeren entstehende Kraftübertragung von Myofibrillen auf die extrazelluläre Matrix sicherzustellen (Estrella & Naya 2014; Samarel 2005). MLP kann möglicherweise die kardiale Mechanosensation über diese Position an den Costameren (fokale Adhäsionen) beeinflussen, wo es schnell auf Veränderungen der Muskellänge/Kontraktion reagieren kann und auch in indirekter Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix steht (Buyandelger et al. 2011). Der genaue Mechanismus und die Rolle von MLP sind in diesem Prozess jedoch immer noch unklar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MLP eine Vielzahl an Funktionen haben könnte. So könnte dieses Protein als Teil eines oder sogar mehrerer verschiedener Mechanotransduktions-Signalwege dienen. Einer dieser potentiellen Komplexe befindet sich an den Costameren, wo MLP mit ILK, Zyxin, β 1-Spektrin und α -Aktinin interagiert und an der Druck- und Dehnungs-Wahrnehmung beteiligt sein könnte. Ein anderer Komplex sitzt an der sarkomerischen Z-Scheibe, wo MLP möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von Signalen spielt (Voelkel & Linke 2011; Buyandelger et al. 2011).

VII.6. MLP interagiert mit Muskelaktivität-assoziierten Proteinen und Proteinen der zellulären Energiegewinnung

Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation gefolgt von einer Massenspektrometrie (MS) sollten Interaktionspartner von MLP identifiziert werden. Das Adapterprotein MLP interagiert mit anderen Proteinen über seine beiden LIM-Domänen, welche jeweils zwei Zinkfinger-Domänen enthalten (Buyandelger et al. 2011). Es konnten im Rahmen dieser Arbeit bekannte Interaktionspartner über eine Co-Immunopräzipitation erfolgreich verifiziert werden (siehe Abb. 41). Hierzu wurde die humane MLP-Sequenz sowie die Ratten-Sequenz jeweils über Virus-vermittelte Transduktion in Rattenkardiomyozyten überexprimiert (Abb. 43). Um zu untersuchen, ob zwischen der humanen und der Ratten-MLP-Sequenz Unterschiede bezüglich der Protein-Protein-Interaktionen bestehen, wurden beide Varianten nach Co-Immunopräzipitation über ein fusioniertes HA-tag sowie anschließender Massenspektrometrie analysiert, da für weitere Versuche die humane Sequenz verwendet werden sollte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass trotz einiger Aminosäureaustausche keine Unterschiede in den Co-präzipitierten Proben beim Vergleich zwischen Ratte und Mensch in der MS festgestellt wurden, was für einen hohen funktionalen Konservierungsgrad des Proteins spricht (siehe Abb. 43 und Anhang XI2).

Im Anschluss sollten anhand der humanen Sequenz alle Interaktionspartner des MLP-Volllänge-Proteins analysiert werden und dabei potentielle neue Interaktionspartner identifiziert werden. Hierzu wurde in einem zweiten Ansatz eine überexprimierte sowie eine nicht transduzierte Probe nach erfolgter Co-IP mittels MS gemessen, die Proben miteinander verglichen und die dabei gefundenen Proteine auf Unterschiede analysiert (siehe Tabelle 7 und Anhang XI3).

Fast die Hälfte, aller gefundenen, mit MLP komplexierten Proteine (43 %) besitzen demnach einen mitochondrialen Hintergrund. Da die Herzmuskelzelle einen großen Energiebedarf aufweist und da Mitochondrien nachweislich zwecks Energieversorgung zwischen Sarkomeren lokalisiert sind (Riecker 2013), war es nicht unerwartet viele dieser Proteine im Komplex mit MLP vorzufinden. Wird das Herz einem physiologischen oder pathologischen Stress ausgesetzt, durchläuft es einen Prozess des Remodellings, der das Kardiomyozytenwachstum einbezieht, aber auch Veränderungen in anderen Zelltypen, u.a. Veränderungen der intrazellulären und extrazellulären Struktur, Proteinexpression, Signalwege, Energiestoffwechsel, Vaskularisierung (Anon 2017b). Muskel-Mitochondrien liegen wie bereits erwähnt als lateral ausgerichtete Stränge zwischen Myofibrillen und sind am Intermediärfilament (IF)-Netzwerk der Z-Linie verankert.

Zytoskelettdefekte können dabei die Mitochondrienzahl und -funktion durch Veränderungen der Interaktionen zwischen äußeren mitochondrialen Membranproteinen und spezifischen Zytoskelett-assoziierten Proteinen beeinflussen (Rappaport et al. 1998). Die Integrität dieser Kontaktstellen (Capetanaki 2002) und der damit verbundenen funktionellen Komplexe mit Sarkomeren und dem sarkoplasmatischen Retikulum sind wichtig für eine Vielzahl von mitochondrialen Funktionen wie der Energiekopplung und dem oxidativen Metabolismus (Kaasik et al. 2001; Appaix et al. 2003; Weisleder et al. 2004; Jacobson & Duchon 2004). Die Ergebnisse der Massenspektrometrie belegen auch nochmals die Lokalisation von MLP an den Z-Scheiben der Sarkomere, wo das Protein entweder direkt oder vermutlich indirekt über die Interaktion mit anderen Sarkomerproteinen ebenfalls in Kontakt mit Mitochondrien steht. Ob und wie MLP mit diesen Proteinen interagiert ist bisweilen nicht bekannt, jedoch zeigen frühere Studien, dass das Fehlen von MLP einen lokalen Verlust der Mitochondrien verursacht (van den Bosch et al. 2005). Das Fehlen von MLP führt überdies zu einer Desorganisation der Z-Linien und Myofibrillen und zu einer gestörten Interaktion zwischen Zytoskelett und Mitochondrien, was zu einer Beeinträchtigung der Energieübertragung führt und letztlich in einer Kardiomyopathie resultiert (van den Bosch et al. 2005).

Diese auf mitochondrialen OXPHOS (oxidative Phosphorylierung)-Aktivitätsmessungen beruhenden Ergebnisse zeigen einen Energiemangel im Myokard von MLP-KO-Mäusen, welcher sich in einer Abnahme der gesamten mitochondrialen OXPHOS-Aktivität äußert. Auch ist die Gesamtgröße der Mitochondrien verringert und pathologisch ist das Herzgewebe dieser Mäuse im Vergleich mit dem des Wildtyps insgesamt weicher und zeigt eine stark verminderte Muskelspannung. (Ventura-Clapier et al. 2004; Knöll, Hoshijima & Chien 2002).

Inwieweit MLP auf molekularer Ebene mit den Mitochondrien wechselwirkt ist noch unklar, da durch die Co-IP nur gezeigt werden konnte, dass diese offenbar in einem gemeinsamen Komplex vorliegen. Eine direkte Interaktion von MLP mit mitochondrialen Proteinen müsste in zukünftigen Experimenten, beispielsweise über Cross-linking nachgewiesen werden. Neben der Vielzahl an mitochondrialen Proteinen konnten in der Massenspektrometrie zudem wie erwartet einige mit Muskelaktivität-assoziierte Proteine (15 %) sowie sarkomere Proteine (10 %) identifiziert werden (z.B. Myosin, Troponin, Tropomyosin). Neben einigen wenigen Proteinen des Calcium-Haushaltes (1 %) sowie Bestandteile von Ionenkanälen (1 %) konnten interessanterweise auch Proteine der Signaltransduktion (2 %) sowie eine Vielzahl von ribosomalen Proteinen (7 %) nachgewiesen werden. Dies untermauert nicht nur die These, dass MLP mit dem Sarkomer bzw. der Z-Scheibe assoziiert und dort als Sensorprotein an der Signalweiterleitung beteiligt ist, sondern spricht auch für eine zweite Funktion.

MLP kann als Reaktion auf mechanischen Stress über seine NLS (Abb. 42) in den Zellkern diffundieren, wo es u.a. in den Nukleolus transloziert. Dort stimuliert es die ribosomale Proteinsynthese im Rahmen der hypertrophen Reaktion in Myozyten (Boateng et al. 2007). Da ribosomale Proteine nach ihrer Synthese im Zytoplasma in den Zellkern zum Nukleolus transportiert werden, um dort mit der transkribierten rRNA zu ribosomalen Untereinheiten assembliert zu werden, ist die hohe Wiederfindungsrate ribosomaler Proteine in der MLP-Immunopräzipitation ein plausibles Ergebnis (Peña, Hurt and Panse, 2017).

Zusammenfassend belegen die gefundenen Interaktionspartner die für MLP postulierten Funktionen im Zusammenhang mit der hypertrophen kardialen Signalweiterleitung und die Rolle als Dehnungssensor. Da dies nur für das Volllängenprotein gezeigt werden konnte, bleibt nach wie vor zu klären welche Funktionen die MLP-Splice-Varianten übernehmen können.

VII.7. Eine verkürzte MLP-Isoform zeigt eine veränderte Lokalisationen in Ratten-Kardiomyozyten sowie iPS-CM

Ein weiter Teilaspekt dieser Arbeit war die Frage wo bzw. ob sich die Lokalisation von MLP-WT (Volllänge) von der Lokalisation der MLP-Splice-Varianten unterscheidet.

Es ist bekannt, dass MLP mit Telethonin, α -Aktinin und Cofilin2 (intrazelluläres Aktin modulierendes Protein) interagiert (Knöll, Hoshijima, Hoffman, et al. 2002; Gehmlich et al. 2010; Papalouka et al. 2009). Jedoch gibt es widersprüchliche Informationen bezüglich der Lokalisation von MLP in Herzmuskelzellen. Es wird vermutet, dass MLP ein Sarkomer-Protein ist, das an der Z-Scheibe, I-Bande, M-Linie oder an der Zellmembran lokalisiert ist und Teil einer mechanischen Belastungssensor- und Signalmaschinerie ist (Arber & Caroni 1996; Arber et al. 1997; Flick & Konieczny 2000; Knöll et al. 2010; Henderson et al. 2003). Eine Lokalisation von MLP an den subzellulären Strukturen wie der Z-Scheibe und den Constameren würde die These, dass dem Protein eine Schlüsselrolle in der Mechanosensation und -transduktion zukommt untermauern.

Zur Untersuchung des Proteins *in vivo* wurde in dieser Arbeit folgender Ansatz gewählt. Nach der Fusion eines tagRFPT an die MLP-Isoformen (C-terminal) wurden die Konstrukte über adenovirale Vektoren in isolierte, adulte Kardiomyozyten der Ratte bzw. in humane iPS-CM eingeschleust. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte die erfolgreiche Expression verfolgt werden.

Im Anschluss erfolgten an Tag 3 nach Transduktion die Lokalisationstudien, wofür die Zellen zunächst fixiert und die zu analysierenden Proteine anschließend mit geeigneten Antikörpern visualisiert wurden. Eine N-terminale Fusion von tagRFPT konnte bislang noch nicht getestet werden, soll in zukünftigen Versuchen jedoch überprüft werden, um zu untersuchen, ob die Stelle des Tags Einfluss auf die Funktionalität des Proteins hat, da bekannt ist, dass ein „Tagging“ von kleinen Proteinen, je nach Position des Tags die Funktionalität des Proteins verändern kann (Ledent et al. 1997; Hurst et al. 2018).

Es konnte in dieser Arbeit anhand der Immunfluoreszenz-Untersuchungen gezeigt werden, dass es durch eine Überexpression der MLP-WT-Variante (Volllänge) zu keiner Veränderung der Lokalisation im Vergleich zum endogenen MLP in untransduzierten Ratten-Kardiomyozyten kommt. In beiden Fällen ist das Protein hauptsächlich an der Z-Scheibe lokalisiert. Auch die Transduktion mit dem Kontrollvirus, welches lediglich das tagRFPT beinhaltet, führte zu keiner Veränderung der Lokalisation, wodurch ein möglicher Nebeneffekt der Virus-Transduktion sowie des Fluoreszenz-Tags unwahrscheinlich ist. Die Lokalisation an der Z-Scheibe bzw. an den Sarkomeren konnte klar durch das quergestreifte Muster der Färbung identifiziert und zusätzlich durch die eindeutige Kolo-kalisation mit dem Z-Scheiben assoziierten Protein α -Aktinin verifiziert werden.

Eine Überexpression von MLP ohne Exon 3 (MLP^{AE3}) hat jedoch einen deutlichen Effekt. Hier geht die quergestreifte Struktur (Z-Scheiben-Lokalisation) vollständig verloren, während das Protein nun, im Gegensatz zur unveränderten α -Aktinin-Lokalisation, eher diffus und längs an den Myofibrillen orientiert verteilt vorliegt, was ein vollständiges Fehlen der Interaktion mit T-Cap bzw. mit der Z-Scheibe impliziert. Hoffmann et. al. konnten kürzlich zeigen, dass MLP durch seine N-terminale LIM-Domäne Multimere bilden kann, während es durch seine C-terminale LIM-Domäne an Aktinfilamente bindet. Da es bei der MLP-Isoform ohne Exon 3 zu einem Verlust der C-terminalen LIM Domäne, sowie der halben N-terminalen LIM-Domäne kommt, könnte dies ein Grund für die fehlende Kolo-kalisationen mit α -Aktinin sein.

Da es jedoch zu keinem verstärkten Signal im Kern kommt, lässt dies vermuten, dass die halbe N-terminale LIM Domäne ausreichend ist, damit MLP mit sich selbst assoziieren kann und somit noch Multimere bilden kann. Somit liegen vermutlich nicht vermehrt MLP-Monomere vor, welche so, wie in Boateng et. al. beschrieben, bevorzugt in den Zellkern translokieren. Andererseits fehlt MLP^{AE3} jedoch auch die NLS, weswegen es trotz einer monomeren Form nicht mehr translokations-kompetent wäre und somit lediglich über passive Diffusion in den Zellkern gelangen könnte.

Weiterhin ist davon auszugehen, dass die halbe LIM-Domäne noch mit Membran-Proteinen und Rezeptoren wie Integrine und Constamere interagiert kann, da es trotz der fehlenden Sarkomer- bzw. Z-Scheiben-Lokalisation nach wie vor zu einem starken MLP-Signal entlang der Myofibrillen bzw. Zellperipherie kommt.

Analog dazu waren die Lokalisationsstudien von MLP und dessen Isoform in humanen iPS-CM ebenfalls von großer Bedeutung, um die in Ratten-Kardiomyozyten gefundenen Interaktionen bzw. Lokalisationen im humanen Zellsystem zu bestätigen. Zudem sollten mögliche Rückschlüsse auf die zuvor gezeigten Expressions-Analysen in humanen Biopsien gezogen werden. Wie auch in Ratten-Kardiomyozyten zeigen die Analysen, dass in den Kontroll-transfizierten iPS-CM endogenes MLP mit α -Aktinin kolokalisiert. Anhand der Untersuchungen führt eine Überexpression von MLP-WT (Volllänge) zu keiner grundlegenden Veränderung, vielmehr kommt es zu einer stärkeren Kolokalisation. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass es sich um Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien handelt. Die Rattenzellen befinden sich in einem ausdifferenzierten Stadium, wohingegen die iPS-CM noch ganz am Anfang stehen.

Da MLP als Regulator der Myotubenbildung postuliert wird, könnte dies das erhöhte Signal von MLP an der Z-Scheibe bei den iPS-CM im Vergleich zu den Ratten-Kardiomyozyten erklären (Geier et al. 2008). Die MLP-Variante ohne Exon 3 zeigt jedoch, wie im Rattensystem, einen kompletten Verlust der Sarkomer- bzw. Z-Scheiben-Lokalisation. Durch das Fehlen des MLP-Signals kann demnach auch hier angenommen werden, dass die Isoform MLP ^{Δ E3} nicht mehr die Funktion eines Z-Scheiben-assozierten Mechanosensors ausführen und auf hypertrophe Stimuli reagieren kann. Als Folge dessen käme es zu einer Destabilisierung der Z-Scheibe.

Zusammenfassend lassen die Daten vermuten, dass MLP zur Aufrechterhaltung der Kardiomyozyten-Zytoarchitektur durch einen Mechanismus beiträgt, der seine Selbstassoziation und die Aktinfilamentvernetzung involviert.

VII.8. Die Überexpression von MLP-Varianten verstärkt die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung in Kardiomyozyten

Um den Einfluss von MLP und seiner Isoform ohne Exon 3 auf zelluläre Ca^{2+} -Transienten bei der Erregungs-Kontraktions-Kopplung zu untersuchen, wurden Ca^{2+} -Messungen mit dem ratiometrischen Farbstoff Fura-2 durchgeführt. Insgesamt zeigen die Analysen, dass Überexpression von MLP-WT sowie der MLP-Splice-Variante ohne Exon 3 einen substanziellen Einfluss auf die diastolische Ca^{2+} -Konzentration und die Dauer der Ca^{2+} -Transienten haben. Signifikante Unterschiede wurden ebenfalls in der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten im „Steady State“ ermittelt. Da Herzmuskelzellen unter physiologischen Bedingungen im Organismus permanent kontrahieren, ist zu beachten, dass der „Steady State“ den physiologischeren Zustand widerspiegelt, während das „Post-Rest“-Verhalten eine künstlich herbeigeführte Situation darstellt, welche es ermöglicht, die zelluläre Ca^{2+} -Homoeostase zu analysieren.

Die Expression beider MLP-Varianten führte sowohl im Ruhezustand als auch in der Diastole zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, was eine verstärkte Kontraktionskraft der Kardiomyozyten implizieren könnte. Durch die MLP-Überexpression wäre auch eine Reduktion der SERCA-Aktivität (bzw. -Expression) denkbar. Da die SERCA den Hauptmechanismus zur Entfernung des zytosolischen Calciums und der Wiederbefüllung des Ca^{2+} -Speichers bildet, könnte eine verringerte SERCA-Aktivität den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zur Folge haben (Hasenfuss et al. 1994; Schatzmann 1989). Die Aktivität der SERCA wird ferner durch Phospholamban (PLB) reguliert. Dabei inhibiert dephosphoryliertes PLB die Aktivität der SERCA.

Aufgrund der Tatsache, dass die Zellen mit MLP-Überexpression im Gegensatz zu den Kontroll-Zellen ein deutlich vermindertes „Post-Rest“-Verhalten aufweisen, würde dies für eine Erschöpfung des Ca^{2+} -Speichers sprechen, und somit potentiell für eine reduzierte SERCA-Aktivität. Auch bei experimenteller Herzinsuffizienz infolge eines MLP-Knockouts wurden in der Vergangenheit bereits Veränderungen des SERCA2-Expressionslevels, Beeinträchtigungen des SERCA2/PLN-Verhältnisses sowie veränderte Level der phosphorylierten Form von PLN dokumentiert (Hoshijima et al. 2006). Durch Western-Blot-Analysen wäre ein Nachweis mit Antikörpern gegen SERCA2 und gegen die dephosphorylierte Form der PLN möglich. Somit könnte man einen potentiellen Anstieg von PLN bzw. eine Reduktion von SERCA2 auf Proteinebene nach MLP-Überexpression untersuchen.

Die Messung der Dauer des Ca^{2+} -Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenz-Verhältnisses zu 80 % (CTD 80) des Ausgangswertes zeigte eine leicht beschleunigte Ca^{2+} -Clearance in den mit MLP-transduzierten Kardiomyozyten. Wenn von einer reduzierten SERCA-Aktivität ausgegangen wird, würde dies folglich für eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung über die Plasmamembran sprechen. Dies müsste allerdings in weiteren Ca^{2+} -Messungen sowie durch Expressionsanalysen der potentiell beteiligten Proteine untersucht werden.

Sollte MLP also den Ergebnissen zufolge auch einen Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt haben, dann scheint diese Funktion nicht durch die fehlende LIM-Domäne im Fall der Isoform $\text{MLP}^{\Delta\text{E}3}$ beeinträchtigt zu sein. Andererseits könnte die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration und -Freisetzung jedoch auch ein Nebeneffekt der Transduktion und Überexpression sein. Daher müssten zur weiteren Aufklärung, wie bereits erwähnt, noch weitere Expressionsanalysen und auch Interaktionsstudien mit potentiell beteiligten Proteinen sowie Ca^{2+} -Messungen im Vergleich mit weiteren MLP-Varianten durchgeführt werden. Um einen tatsächlich physiologischen Effekt der unterschiedlichen MLP-Expression auf die Zellen zu ermitteln sollte ferner untersucht werden, ob sowohl die unterschiedlichen MLP-Mengen als auch die jeweiligen MLP-Isoformen einen Einfluss auf die Kontraktionsstärke der Muskelzellen haben.

VIII. Literaturverzeichnis

Internetquellen:

www.kup.at/kardiologie. (2017). www.kup.at/kardiologie, 1–6.

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/co-immunoprecipitation-co-ip.html>

<http://www.univie.ac.at>

<http://www.invitrogen.com>

<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>

<https://de.lumiprobe.com/p/rox-reference-dye>

[https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/echtzeit-pcr-\(real-time-pcr\)/?ui=&type=98](https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/echtzeit-pcr-(real-time-pcr)/?ui=&type=98)

<https://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46664.html>

Abraityte, A. et al., 2017. Wnt5a is associated with right ventricular dysfunction and adverse outcome in dilated cardiomyopathy. *Scientific reports*, 7(1), p.3490.

Adams, J.W. et al., 1998. Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), pp.10140–10145.

Ahmad, F., Seidman, J.G. & Seidman, C.E., 2005. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annual review of genomics and human genetics*, 6(1), pp.185–216.

Akhter, S.A. et al., 1998. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5363), pp.574–577.

Akita, Y., 2008. Protein kinase C ϵ : multiple roles in the function of, and signaling mediated by, the cytoskeleton. *FEBS Journal*, 275(16), pp.3995–4004.

Andrews, A.T., 1986. *Electrophoresis*, Oxford University Press, USA.

Anon, 2000. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. pp.1–6.

Anon, 1997. Comparison of Three Members of the Cysteine-rich Protein Family Reveals Functional Conservation and Divergent Patterns of Gene Expression*. pp.1–9.

- Anon, 2017a. Deutsches Ärzteblatt: Archiv "Zytokinforschung: Interleukin 1 ist im Visier" (19.04.2013). *aerzteblatt.de*. Available at: <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=137293> [Accessed November 7, 2017a].
- Anon, 2012. DZHK: Kardiomyopathien. pp.1–4.
- Anon, 2017b. Is Inhibition of Hypertrophy a Good Therapeutic Strategy in Ventricular Pressure Overload?, pp.1–11.
- Anon, 2003a. *Lexikon der Physik - Sonderausgabe (Buch- und CD-Rom-Ausgabe)*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Anon, 1995. The Cysteine-rich Protein Family of Highly Related LIM Domain Proteins*. pp.1–10.
- Anon, 2014. The genetics of cardiomyopathy, new technologies and the path to personalised medicine. pp.1–10.
- Anon, 2003b. The LIM Domains a Modular Protein-Binding Interface. pp.1–9.
- Anon, 2018. World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher. pp.1–32.
- Anon, 2017c. www.kup.at/kardiologie. pp.1–6.
- Appaix, F. et al., 2003. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Experimental physiology*, 88(1), pp.175–190.
- Arber, S. & Caroni, P., 1996. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes & development*, 10(3), pp.289–300.
- Arber, S. et al., 1997. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, 88(3), pp.393–403.
- Arber, S., Halder, G. & Caroni, P., 1994. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell*, 79(2), pp.221–231.
- Ardehali, H. et al., 2004. Endomyocardial biopsy plays a role in diagnosing patients with unexplained cardiomyopathy. *American Heart Journal*, 147(5), pp.919–923.
- Banerjee, I. et al., 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(3), pp.H1883–91.
- Bang, M.L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A.J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C.C., Labeit, D., Gregorio, C.C., Granzier, H. & Labeit, S., 2001a. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circulation research*, 89(11), pp.1065–1072.
- Bang, M.L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A.J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C.C., Labeit, D., Gregorio, C.C., Granzier, H. & Labeit, S., 2001b. The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual 700-kDa Titin Isoform, and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Linking System. 89(11), pp.1065–1072.

- Barnett, M.E., Madgwick, D.K. & Takemoto, D.J., 2007. Protein kinase C as a stress sensor. *Cellular signalling*, 19(9), pp.1820–1829.
- Bassel-Duby, R. & Olson, E.N., 2003. Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 311(4), pp.1133–1141.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2002. *Biochemistry, Fifth Edition*, W. H. Freeman.
- Berndt, C., Lillig, C.H. & Holmgren, A., 2008. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(4), pp.641–650.
- Bian, J., Cui, J. & McDonald, T.V., 2001. HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circulation research*, 89(12), pp.1168–1176.
- Bijata, M. et al., 2017. Synaptic Remodeling Depends on Signaling between Serotonin Receptors and the Extracellular Matrix. *Cell reports*, 19(9), pp.1767–1782.
- Boateng, S.Y. et al., 2007. Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 292(1), pp.H259–69.
- Boateng, S.Y. et al., 2009. Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 47(4), pp.426–435.
- Bodi, I. et al., 2005. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *The Journal of clinical investigation*, 115(12), pp.3306–3317.
- Bos, J.M. et al., 2006. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Molecular genetics and metabolism*, 88(1), pp.78–85.
- Bradshaw, A.D. et al., 2009. Pressure overload-induced alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in post-synthetic procollagen processing. *Circulation*, 119(2), pp.269–280.
- Braz, J.C. et al., 2004. PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure., 10(3), pp.248–254.
- Bueno, O.F. et al., 2004. Calcineurin Abeta gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction. *Circulation research*, 94(1), pp.91–99.
- Bueno, O.F. et al., 2002. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta - deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), pp.4586–4591.
- Burkett, E.L. & Hershberger, R.E., 2005. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(7), pp.969–981.

- Buyandelger, B. et al., 2011. MLP (muscle LIM protein) as a stress sensor in the heart. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 462(1), pp.135–142.
- Canale, E.D., Campbell, G.R. & Smolich, J.J., 2012. *Cardiac Muscle*, Berlin, Heidelberg: Springer Science & Business Media.
- Capetanaki, Y., 2002. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends in cardiovascular medicine*, 12(8), pp.339–348.
- Carrier, L. et al., 1993. Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. 4(3), pp.311–313.
- Chang, D.F. et al., 2003. Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors. *Developmental cell*, 4(1), pp.107–118.
- Chowdhury, D. et al., 2013. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats. *Journal of translational medicine*, 11(1), p.130.
- Cieciura, S.J., Marcus, P.I. & Puck, T.T., 1956. Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues. *The Journal of experimental medicine*, 104(4), pp.615–628.
- Claeys, K.G. et al., 2009. Differential involvement of sarcomeric proteins in myofibrillar myopathies: a morphological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathologica*, 117(3), pp.293–307.
- Cleutjens, J.P.M. & Creemers, E.E.J.M., 2002. Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *Journal of cardiac failure*, 8(6 Suppl), pp.S344–8.
- D'Angelo, D.D. et al., 1997. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), pp.8121–8126.
- da Costa, N. et al., 2007. Calcineurin differentially regulates fast myosin heavy chain genes in oxidative muscle fibre type conversion. *Cell and tissue research*, 329(3), pp.515–527.
- Debold, E.P. et al., 2007. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy mutations differentially affect the molecular force generation of mouse alpha-cardiac myosin in the laser trap assay. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(1), pp.H284–91.
- Dell'Italia, L.J. et al., 1997. Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *The Journal of clinical investigation*, 100(2), pp.253–258.
- Diedrichs, H. et al., 2007. Activation of the calcineurin/NFAT signalling cascade starts early in human hypertrophic myocardium. *The Journal of international medical research*, 35(6), pp.803–818.
- Domenighetti, A.A. et al., 2005. Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension*, 46(2), pp.426–432.

- E, M.P. et al., 2017. Molecular assessment of protective effect of *Vitex negundo* in ISO induced myocardial infarction in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 92, pp.249–253.
- Earle, W. & Highhouse, F., 1954. Culture flasks for use with plane surface substrate tissue cultures. *Journal of the National Cancer Institute*, 14(4), pp.841–851.
- Ecarnot-Laubriet, A. et al., 2000. Downregulation and nuclear relocation of MLP during the progression of right ventricular hypertrophy induced by chronic pressure overload. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 32(12), pp.2385–2395.
- Edmondson, R.D. et al., 2002. Protein kinase C epsilon signaling complexes include metabolism- and transcription/translation-related proteins: complimentary separation techniques with LC/MS/MS. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 1(6), pp.421–433.
- Ehler, E. et al., 2001. Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *The Journal of cell biology*, 153(4), pp.763–772.
- Elliott, P. & McKenna, W.J., 2009. How should hypertrophic cardiomyopathy be classified?: Molecular diagnosis for hypertrophic cardiomyopathy: Not ready for prime time. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(1), pp.87–9– discussion 89.
- Ergul, A. et al., 2000. ET-1 in the myocardial interstitium: relation to myocyte ECE activity and expression. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 278(6), pp.H2050–6.
- Esposito, G. et al., 2000. Cellular and functional defects in a mouse model of heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 279(6), pp.H3101–12.
- Estrella, N.L. & Naya, F.J., 2014. Transcriptional networks regulating the costamere, sarcomere, and other cytoskeletal structures in striated muscle. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(9), pp.1641–1656.
- Fahlke, C. et al., 2012. *Taschenatlas Physiologie*, Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Flick, M.J. & Konieczny, S.F., 2000. The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta1-spectrin. *Journal of cell science*, 113 (Pt 9), pp.1553–1564.
- Frank, D. et al., 2006. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 84(6), pp.446–468.
- Frey, N. & Katus, H.A., 2007. Dilated cardiomyopathy as a genetic disease: molecular and clinical aspects. *Der Internist*, 49(1), pp.43–50.
- Frey, N. & Olson, E.N., 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology*, 65(1), pp.45–79.
- Frey, N., Luedde, M. & Katus, H.A., 2011. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nature reviews. Cardiology*, 9(2), pp.91–100.
- Frey, N., Richardson, J.A. & Olson, E.N., 2000. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), pp.14632–14637.

- Freyermuth, F. et al., 2016. Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nature communications*, 7, p.11067.
- Fung, Y.W. et al., 1995. Mapping of a human LIM protein (CLP) to human chromosome 11p15.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 28(3), pp.602–603.
- Fung, Y.W., Wang, R. & Liew, C.C., 1996. Characterization of a human cardiac gene which encodes for a LIM domain protein and is developmentally expressed in myocardial development. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 28(6), pp.1203–1210.
- Gehrmlich, K. et al., 2010. “MLP: A Stress Sensor Goes Nuclear” by Sylvia Gunkel, Jörg Heineke, Denise Hilfiker-Kleiner, Ralph Knöll, J Mol Cell Cardiol. 2009;47(4):423-5. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(2), pp.424–5– author reply 426–7.
- Gehrmlich, K. et al., 2008. Back to square one: what do we know about the functions of muscle LIM protein in the heart? *Journal of muscle research and cell motility*, 29(6-8), pp.155–158.
- Geier, C. et al., 2008. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Human molecular genetics*, 17(18), pp.2753–2765.
- Geier, C. et al., 2003. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 107(10), pp.1390–1395.
- Goldstein, M.A. et al., 1987. Z band dynamics as a function of sarcomere length and the contractile state of muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1(2), pp.133–142.
- Goldstein, M.A., Schroeter, J.P. & Sass, R.L., 1990. Two structural states of the vertebrate Z band. *Electron microscopy reviews*, 3(2), pp.227–248.
- Golenhofen, N. et al., 2002. Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(3), pp.309–319.
- Gooch, J.L., 2004. Differential Expression of Calcineurin A Isoforms in the Diabetic Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(6), pp.1421–1429.
- Gray, M.O., Karliner, J.S. & Mochly-Rosen, D., 1997. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*, 272(49), pp.30945–30951.
- Gregorio, C.C. et al., 1998. The NH 2Terminus of Titin Spans the Z-Disc: Its Interaction with a Novel 19-kD Ligand (T-cap) Is Required for Sarcomeric Integrity. *The Journal of cell biology*, 143(4), pp.1013–1027.
- Grzeskowiak, R. et al., 2003. Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular research*, 59(2), pp.400–411.
- Gunkel, S. et al., 2009. MLP: a stress sensor goes nuclear. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 47(4), pp.423–425.

- Gusev, K. et al., 2009. Angiotensin II-mediated adaptive and maladaptive remodeling of cardiomyocyte excitation-contraction coupling. *Circulation research*, 105(1), pp.42–50.
- Haghighi, K., Bidwell, P. & Kranias, E.G., 2014. Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 77, pp.160–167.
- Hanahan, D. & Meselson, M., 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods in enzymology*, 100, pp.333–342.
- Haq, S. et al., 2001. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation*, 103(5), pp.670–677.
- Hasenfuss, G. et al., 1994. Influence of the force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. *European heart journal*, 15(2), pp.164–170.
- Heineke, J. & Molkentin, J.D., 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(8), pp.589–600.
- Heineke, J. et al., 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), pp.1655–1660.
- Henderson, J.R. et al., 2003. ALP and MLP distribution during myofibrillogenesis in cultured cardiomyocytes. *Cell motility and the cytoskeleton*, 54(3), pp.254–265.
- Herman, D.S. et al., 2012. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, 366(7), pp.619–628.
- Hershberger, R.E. et al., 2008. Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clinical and translational science*, 1(1), pp.21–26.
- Hoffmann, C. et al., 2014. Human muscle LIM protein dimerizes along the actin cytoskeleton and cross-links actin filaments. *Molecular and cellular biology*, 34(16), pp.3053–3065.
- Hoshijima, M. et al., 2006. Reversal of calcium cycling defects in advanced heart failure toward molecular therapy. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(9 Suppl 1), pp.A15–23.
- Hu, P. et al., 2003. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(3), pp.H1261–9.
- Hui, X. et al., 2014. Targeted activation of conventional and novel protein kinases C through differential translocation patterns. *Molecular and cellular biology*, 34(13), pp.2370–2381.
- Hurst, C.H. et al., 2018. Variable Effects of C-Terminal Fusions on FLS2 Function: Not All Epitope Tags Are Created Equal. *Plant Physiol.*, 177(2), pp.522–531.
- Jacobson, J. & Duchen, M.R., 2004. Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling. *Molecular and cellular biochemistry*, 256-257(1-2), pp.209–218.

- Jeong, D. et al., 2006. PICOT inhibits cardiac hypertrophy and enhances ventricular function and cardiomyocyte contractility. *Circulation research*, 99(3), pp.307–314.
- Jeong, Y.-J. et al., 2005. Optimization of real time RT-PCR methods for the analysis of gene expression in mouse eggs and preimplantation embryos. *Molecular reproduction and development*, 71(3), pp.284–289.
- Kaasik, A. et al., 2001. Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circulation research*, 89(2), pp.153–159.
- Kadmas, J.L. & Beckerle, M.C., 2004. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(11), pp.920–931.
- Katz, A.M., 2010. *Physiology of the Heart*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Kimura, A., 2016. Molecular genetics and pathogenesis of cardiomyopathy., 61(1), pp.41–50.
- Knöll, R. & Buyandelger, B., 2012. Z-disc Transcriptional Coupling, Sarcomeroptosis and Mechanoptosis. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 66(1), pp.65–71.
- Knöll, R. et al., 2010. A common MLP (muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy., 106(4), pp.695–704.
- Knöll, R., Buyandelger, B. & Lab, M., 2011. The Sarcomeric Z-Disc and Z-Discopathies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011(5), pp.1–12.
- Knöll, R., Hoshijima, M. & Chien, K., 2003. Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 81(12), pp.750–756.
- Knöll, R., Hoshijima, M. & Chien, K.R., 2002. Muscle LIM protein in heart failure. *Experimental and clinical cardiology*, 7(2-3), pp.104–105.
- Knöll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H.M., et al., 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), pp.943–955.
- Kong, Y. et al., 1997. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Molecular and cellular biology*, 17(8), pp.4750–4760.
- Konrat, R. et al., 1997. Solution structure of the carboxyl-terminal LIM domain from quail cysteine-rich protein CRP2. *The Journal of biological chemistry*, 272(18), pp.12001–12007.
- Kontaxis, G. et al., 1998. Structure and intramolecular dynamics of the amino-terminal LIM domain from quail cysteine- and glycine-rich protein CRP2. *Biochemistry*, 37(20), pp.7127–7134.
- Kostek, M.C. et al., 2007. Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32. *Physiological genomics*, 31(1), pp.42–52.

- Krushna, G.S. et al., 2017. In vivo and molecular docking studies using whole extract and phytochemicals of Aegle marmelos fruit protective effects against Isoproterenol-induced Myocardial infarction in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 91, pp.880–889.
- Krüger, M. & Linke, W.A., 2009. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(4), pp.490–498.
- Kuo, I.Y. & Ehrlich, B.E., 2015. Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(2), p.a006023.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lahmers, S. et al., 2004. Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circulation research*, 94(4), pp.505–513.
- Lara-Pezzi, E. et al., 2013. The alternative heart: impact of alternative splicing in heart disease. *Journal of cardiovascular translational research*, 6(6), pp.945–955.
- Ledent, P. et al., 1997. Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. *FEBS letters*, 413(2), pp.194–196.
- Lee, J. et al., 2002. Factors affecting warfarin therapy following cardiac valve surgery. *The Annals of pharmacotherapy*, 36(12), pp.1845–1850.
- Lee, P.D. et al., 2002. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome research*, 12(2), pp.292–297.
- Leenen, F.H., White, R. & Yuan, B., 2001. Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 281(6), pp.H2410–6.
- Li, X., 2005. Endothelin-1-Induced Arrhythmogenic Ca²⁺ Signaling Is Abolished in Atrial Myocytes of Inositol-1,4,5-Trisphosphate(IP3)-Receptor Type 2-Deficient Mice. *Circulation research*, 96(12), pp.1274–1281.
- Liebich, H.-G., 2004. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*, Schattauer Verlag.
- Linke, W., 2007. WITHDRAWN: Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovascular research*, pp.1–12.
- Linke, W.A. et al., 1998. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), pp.8052–8057.
- Lipp, P. & Reither, G., 2011. Protein kinase C: the “masters” of calcium and lipid. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), pp.a004556–a004556.
- Lipp, P. et al., 2000. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Current biology : CB*, 10(15), pp.939–942.

- Liu, L. & McKeehan, W.L., 2002. Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytosolic shuttling, and chromosome activity. *Genomics*, 79(1), pp.124–136.
- Luckey, S., McLaughlin, N. & Soo, S., 2016. Exercise and Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy in Aged Mice. *The FASEB Journal*, 30(1 Supplement), pp.1239.5–1239.5.
- Lukashev, M.E. & Werb, Z., 1998. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in cell biology*, 8(11), pp.437–441.
- Luther, P.K., 2009. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *Journal of muscle research and cell motility*, 30(5-6), pp.171–185.
- Luther, P.K., 1991. Three-dimensional reconstruction of a simple Z-band in fish muscle. *The Journal of cell biology*, 113(5), pp.1043–1055.
- Luther, P.K., Barry, J.S. & Squire, J.M., 2002. The three-dimensional structure of a vertebrate wide (slow muscle) Z-band: lessons on Z-band assembly. *Journal of molecular biology*, 315(1), pp.9–20.
- Maatz, H., Heinig, M. & Hübner, N., 2015. Alternatives Spleißen im Herzen. *BIOspektrum*, 21(1), pp.53–56.
- Mackenzie, L. et al., 2002. The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca(2+) signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *The Journal of physiology*, 541(Pt 2), pp.395–409.
- Makarenko, I. et al., 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circulation research*, 95(7), pp.708–716.
- Maron, B.J. & Lever, H., 2009. In defense of antimicrobial prophylaxis for prevention of infective endocarditis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(24), pp.2339–40– author reply 2340.
- Martin, T.P. et al., 2012. Surgical optimization and characterization of a minimally invasive aortic banding procedure to induce cardiac hypertrophy in mice. *Experimental physiology*, 97(7), pp.822–832.
- Masri, Al, S. et al., 2017. Comparative Quantitative Studies on the Microvasculature of the Heart of a Highly Selected Meat-Type and a Wild-Type Turkey Line. D. Tang, ed. *PloS one*, 12(1), p.e0170858.
- Matkovich, S.J., 2016. Transcriptome analysis in heart failure. *Current opinion in cardiology*, 31(3), pp.242–248.
- Månsson, A., 2014. Hypothesis and theory: mechanical instabilities and non-uniformities in hereditary sarcomere myopathies. pp.1–10.
- McKinsey, T.A. & Kass, D.A., 2007. Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(8), pp.617–635.

- Mende, U. et al., 1998. Transient cardiac expression of constitutively active Galphaq leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), pp.13893–13898.
- Merzlyak, E.M. et al., 2007. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature methods*, 4(7), pp.555–557.
- Mescher, A., 2009. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition : Text and Atlas*, McGraw-hill.
- Mestroni, L. et al., 1999. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. *Journal of the American College of Cardiology*, 34(1), pp.181–190.
- Mohapatra, B. et al., 2003. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Molecular genetics and metabolism*, 80(1-2), pp.207–215.
- Molkentin, J.D. & Dorn, G.W., 2001. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual review of physiology*, 63(1), pp.391–426.
- Molodtsov, A. et al., 2010. Myoglobin-deficient mice activate a distinct cardiac gene expression program in response to isoproterenol-induced hypertrophy. *Physiological genomics*, 41(2), pp.137–145.
- Morgan, J.P., Perreault, C.L. & Morgan, K.G., 1991. The cellular basis of contraction and relaxation in cardiac and vascular smooth muscle. *American Heart Journal*, 121(3 Pt 1), pp.961–968.
- Newman, B. et al., 2005. W4R variant in CSRP3 encoding muscle LIM protein in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Molecular genetics and metabolism*, 84(4), pp.374–375.
- Newton, P.M. & Messing, R.O., 2010. The substrates and binding partners of protein kinase Cepsilon. *The Biochemical journal*, 427(2), pp.189–196.
- Pahlavan, S. et al., 2012. Gq and G11 contribute to the maintenance of cellular electrophysiology and Ca²⁺ handling in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular research*, 95(1), pp.48–58.
- Papalouka, V. et al., 2009. Muscle LIM protein interacts with cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. *Molecular and cellular biology*, 29(22), pp.6046–6058.
- Pauschinger, M. et al., 2002. [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz*, 27(7), pp.677–682.
- Pelouch, V. & Jirmár, R., 1993. Biochemical characteristics of cardiac collagen and its role in ventricular remodelling following infarction. *Physiological research*, 42(5), pp.283–292.
- Pelouch, V., Dixon, I.M., Golfman, L., et al., 1993. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Molecular and cellular biochemistry*, 129(2), pp.101–120.

- Pelouch, V., Dixon, I.M., Sethi, R., et al., 1993. Alteration of collagenous protein profile in congestive heart failure secondary to myocardial infarction. *Molecular and cellular biochemistry*, 129(2), pp.121–131.
- Pelouch, V., Milerová, M., et al., 1993. Protein profiling of human atrial and ventricular musculature: the effect of normoxaemia and hypoxaemia in congenital heart diseases. *Physiological research*, 42(4), pp.235–242.
- Perry, S.V. & Grand, R.J., 1979. Mechanisms of contraction and the specialized protein components of smooth muscle. *British medical bulletin*, 35(3), pp.219–226.
- Pérez-Alvarado, G.C. et al., 1994. Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nature structural biology*, 1(6), pp.388–398.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.
- Pfaffl, M.W. et al., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), pp.509–515.
- Postel, R. et al., 2008. Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Developmental biology*, 318(1), pp.92–101.
- Prinz, C. et al., 2011. The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Deutsches Arzteblatt international*, 108(13), pp.209–215.
- Puck, T.T. & Fisher, H.W., 1956. GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS : I. DEMONSTRATION OF THE EXISTENCE OF MUTANTS WITH DIFFERENT GROWTH REQUIREMENTS IN A HUMAN CANCER CELL STRAIN (HELA). *The Journal of experimental medicine*, 104(3), pp.427–434.
- Pyle, W.G. & Solaro, R.J., 2004. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circulation research*, 94(3), pp.296–305.
- Qi, L. & Boateng, S.Y., 2006. The circadian protein Clock localizes to the sarcomeric Z-disk and is a sensor of myofilament cross-bridge activity in cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 351(4), pp.1054–1059.
- Qian, J. et al., 2011. Small heat shock protein 20 interacts with protein phosphatase-1 and enhances sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *Circulation research*, 108(12), pp.1429–1438.
- Rappaport, L., Oliviero, P. & Samuel, J.L., 1998. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. *Molecular and cellular biochemistry*, 184(1-2), pp.101–105.
- Rashid, M.M. et al., 2015. Muscle LIM protein/CSRP3: a mechanosensor with a role in autophagy. *Cell death discovery*, 1, p.15014.

- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G.R., 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), pp.3116–3120.
- Reuter, P., 2004. *Springer Lexikon Medizin*, Springer.
- Richardson, P. et al., 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93(5), pp.841–842.
- Riecker, G., 2013. *Klinische Kardiologie* G. Riecker, ed., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Robia, S.L. et al., 2001. Localization and kinetics of protein kinase C-epsilon anchoring in cardiac myocytes. *Biophysical journal*, 80(5), pp.2140–2151.
- Rockman, H.A. et al., 1994. ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *The American journal of physiology*, 266(6 Pt 2), pp.H2468–75.
- Rockman, H.A. et al., 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 of the United States of America*, 88(18), pp.8277–8281.
- Roderick, H.L. & Bootman, M.D., 2007. Pacemaking, arrhythmias, inotropy and hypertrophy: the many possible facets of IP₃ signalling in cardiac myocytes. *The Journal of physiology*, 581(Pt 3), pp.883–884.
- Rogers, J.H. et al., 1999. RGS4 causes increased mortality and reduced cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *The Journal of clinical investigation*, 104(5), pp.567–576.
- Sabri, A. & Steinberg, S.F., 2003. Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. *Molecular and cellular biochemistry*, 251(1-2), pp.97–101.
- Samarel, A.M., 2005. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(6), pp.H2291–301.
- Sanbe, A. et al., 2004. Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), pp.10132–10136.
- Schallus, T. et al., 2007. ¹H, ¹³C, and ¹⁵N assignment of the muscular LIM protein MLP/CRP3. *Biomolecular NMR assignments*, 1(1), pp.41–43.
- Schallus, T. et al., 2009. Structure and dynamics of the human muscle LIM protein. *FEBS letters*, 583(6), pp.1017–1022.
- Schatzmann, H.J., 1989. The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum. *Annual review of physiology*, 51(1), pp.473–485.

- Schmeichel, K.L. & Beckerle, M.C., 1994. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*, 79(2), pp.211–219.
- Schmitt, J.P. et al., 2006. Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), pp.14525–14530.
- Schwedt, G., Schmidt, T.C. & Schmitz, O.J., 2016. *Analytische Chemie*, John Wiley & Sons.
- Seidman, J.G. & Seidman, C., 2001. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, 104(4), pp.557–567.
- Shaner, N.C. et al., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12), pp.1567–1572.
- Shcherbo, D. et al., 2009. Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins. *BMC biotechnology*, 9(1), p.24.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), pp.503–517.
- Spallek, B., 2012. *Antiarrhythmische Wirkung einer transgenen Überexpression des humanen CYP2J2 in Mausmodellen der Herzhypertrophie*,
- St John Sutton, M.G. et al., 2003. Effect of cardiac resynchronization therapy on left ventricular size and function in chronic heart failure. *Circulation*, 107(15), pp.1985–1990.
- Su, Z. et al., 2001. Effects of deletion of muscle LIM protein on myocyte function. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280(6), pp.H2665–73.
- Takefuji, M. et al., 2012. G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure. *Circulation*, 126(16), pp.1972–1982.
- Takefuji, M. et al., 2013. RhoGEF12 controls cardiac remodeling by integrating G protein- and integrin-dependent signaling cascades. *The Journal of experimental medicine*, 210(4), pp.665–673.
- Teare, D., 1958. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *British heart journal*, 20(1), pp.1–8.
- Tilley, D.G., 2011. G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function., 109(2), pp.217–230.
- Trapnell, C. et al., 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature biotechnology*, 31(1), pp.46–53.
- Vafiadaki, E. et al., 2014. Muscle lim protein isoform negatively regulates striated muscle actin dynamics and differentiation. *The FEBS journal*, 281(14), pp.3261–3279.
- Vafiadaki, E. et al., 2009. The role of SERCA2a/PLN complex, Ca(2+) homeostasis, and anti-apoptotic proteins in determining cell fate. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 457(3), pp.687–700.

- Vafiadaki, E., Arvanitis, D.A. & Sanoudou, D., 2015. Muscle LIM Protein: Master regulator of cardiac and skeletal muscle functions. *Gene*, 566(1), pp.1–7.
- van den Bosch, B.J.C. et al., 2005. Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice. *Cardiovascular research*, 65(2), pp.411–418.
- Van Meter, T.E. et al., 2004. Induction of membrane-type-1 matrix metalloproteinase by epidermal growth factor-mediated signaling in gliomas. *Neuro-oncology*, 6(3), pp.188–199.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V., 2004. Energy metabolism in heart failure. *The Journal of physiology*, 555(Pt 1), pp.1–13.
- Voelkel, T. & Linke, W.A., 2011. Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 462(1), pp.143–154.
- Wang, R. & Brattain, M.G., 2007. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS letters*, 581(17), pp.3164–3170.
- Wang, X. et al., 2006. A role for muscle LIM protein (MLP) in vascular remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 40(4), pp.503–509.
- Watkins, H., Ashrafian, H. & Redwood, C., 2011. Inherited cardiomyopathies. *The New England journal of medicine*, 364(17), pp.1643–1656.
- Weber, K.T. & Brilla, C.G., 1993. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clinical cardiology*, 16(5 Suppl 2), pp.II10–4.
- Weber, K.T. et al., 1989. Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. A case for interstitial heart disease. *American journal of hypertension*, 2(12 Pt 1), pp.931–940.
- Weisleder, N., Taffet, G.E. & Capetanaki, Y., 2004. Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), pp.769–774.
- Wettschureck, N. et al., 2001. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nature medicine*, 7(11), pp.1236–1240.
- Wiesen, K. et al., 2016. Cardiac remodeling in Gαq and Gα11 knockout mice. *International journal of cardiology*, 202, pp.836–845.
- Wightman, L. et al., 2001. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *The journal of gene medicine*, 3(4), pp.362–372.
- Williams, R.S. & Harlan, W., 1987. Effects of inhibition of mitochondrial protein synthesis in skeletal muscle. *The American journal of physiology*, 253(6 Pt 1), pp.C866–71.

- Zheng, Q. & Zhao, Y., 2007. The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biology of the cell*, 99(9), pp.489–502.
- Zolk, O., Caroni, P. & Böhm, M., 2000. Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation*, 101(23), pp.2674–2677.
- Zou, P. et al., 2006. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature*, 439(7073), pp.229–233.

IX. Danksagung

„Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben“.

Mein großer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Lipp, der mir nicht nur dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat, sondern mich zudem stets gefördert hat und ein besserer Mentor für meine wissenschaftliche Wegbereitung nicht hätte sein können.

Vielen Dank Peter!

Ich bedanke mich bei PD Dr. Lars Kästner und Dr. Anke Scholz für die Unterstützung in der Anfangszeit meiner Doktorarbeit, die sehr dazu beigetragen hat das Fundament dieser Arbeit zu legen.

Des weiteren Danke ich vielmals Dr. Sandra Ruppenthal, die mich von Beginn an unterstützt hat, für das Korrekturlesen meiner Arbeit, die vielen produktiven Ratschläge und Verbesserungsvorschläge.

Weiterhin möchte ich mich natürlich bei allen Mitarbeitern der AG Lipp für die tolle und angenehme Zeit im Labor bedanken, Karin Schumacher, Cornelia Fess, Tanja Kuhn, Wenying Xag, Jia Guo, Sabrina Hennig, Laura Schröder, Elisabeth Kaiser, Julia Schweizer, Laura Hertz, Polina Petkova-Kirova, Katja Flügel, Qinghai Tian und Xin Hui.

Hervorzuheben sind Cornelia Fess und Julia Schweizer für die IT-Betreuung. Karin Schuhmacher für das „Rundumsorglospaket“ was die personellen und organisatorischen Sachen anbelangte. Wenying Xag für das Bereitstellen der iPS-Zellen. Tanja Kuhn für die gemeinsamen sehr lustigen Stunden im Tierstall, die Unterstützung im Labor und die ThermoFisher-Brause. Last but not least meine Kolleginnen Sabrina Hennig und Laura Hertz. Danke Sabrina für die endlos vielen Maus- und Ratten-Präparationen und die Hilfe im Labor. Danke Laura für die Leica-Hilfestellungen und das gemeinsame Leiden endlos scheinender Schreibphasen. Darüberhinaus danke ich euch beiden für die ausschweifenden Abende die immer mit einer Überraschung endeten und dazu dienten, sein Hirn zu „resetten“.

Nicht zuletzt danke ich meiner tollen Familie! Meinen Eltern, Margret und Karl-Heinz danke ich für die einzigartige Unterstützung. Zusammen mit meinen Brüdern Matthias, Johannes und Lukas wart Ihr immer für mich da und habt mir Mut gemacht.

Ganz Besonders Danke ich meinem Mann Nico, der einige Wochenenden damit zugebracht hat meine Arbeit Korrektur zu lesen. Du hast fest daran geglaubt, dass das mit mir und dem Doktor ein gutes Ende nimmt. Danke!

X. Anhang

X.1. Patientendaten

Nummer	Alter	♂ / ♀	Größe (cm)	Gewicht (kg)	OP-Art
1	58	♂	193	86,2	AKR, Asc. Ers. re.
2	65	♂	170	66,6	AKR, Asc. Ers. re.
3	61	♂	190	94,9	AKR, Asc. Ers. re.
4	32	♂	188	91,5	AKR/E re.
5	61	♂	193	92,0	AKR re.
6	73	♂	182	81,8	AI, KHK, AKR, Asc. Ers, re.
7	72	♂	179	72,0	AKE + ACB re.
8	36	♂	199	84,5	AKR
9	11	-	-	-	Vor HLM
10					Nach HLM
11	0	-	-	-	Vor HLM
12					Nach HLM
13	0	-	-	-	Vor HLM
14					Nach HLM
15	0	-	-	-	Vor HLM
16					Nach HLM
17	0	-	-	-	Vor HLM
18					Nach HLM
19	2	-	-	-	Vor HLM
20					Nach HLM
21	0	-	-	-	Vor HLM
22					Nach HLM
23	0	-	-	-	Vor HLM
24					Nach HLM
25	1	-	-	-	Vor HLM
26					Nach HLM
27	2	-	-	-	Vor HLM
28					Nach HLM
29	3	-	-	-	Vor HLM
30					Nach HLM
31	2	-	-	-	Vor HLM
32					Nach HLM
33	69	♂	184	80,3	ACB re., VH-Abl.
34	58	♂	172	-	ACB re
35	73	♂	174	93,0	ACB re., VH-Abl.
36	44	♂	175	71,0	ACB re
37	64	♂	180	87,0	ACB re

XI ANHANG

38	70	♂	186	90,0	AKE re
39	39	♂	162	61,3	AKR, Asc. Ers. re.
40	70	♂	180	80,5	Pulmonale Thrombentart. re.
41	73	♂	163	78,0	ACB re.
42	66	♂	176	83,8	ACB re.
43	67	♂	180	81,7	Carotis TEA, AKE + ACB re.
44	72	♂	185	81,5	AKE re.
45	26	-	-	-	Ross-OP
46	67	♂	175	91,0	AKE re.
47	45	-	-	-	Bypass
48	56	♂	-	-	MKR
49	74	-	-	-	Klappenersatz
50	61	-	-	-	Klappenersatz + Bypass
51	53	♂	-	-	MKR
52	79	♂	-	-	Klappenersatz
53	65	♂	170	72,0	LIMA-LAD, Asc. Ers., AKR
54	76	♂	181	105,0	ACB re.

X.2. Statistische Analyse der Massenspektrometrie-Daten (hMLP vs. rMLP)

Experiment: MB1-6_mammalia		90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count									
		Probability Legend:								Human Rat control	
		<div>over 95%</div> <div>80% to 94%</div> <div>50% to 79%</div> <div>20% to 49%</div> <div>0% to 19%</div>								M...	M...
#	Visible? Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys				Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile	File Name: MB2_1_hum_Top10_94...	File Name: MB5_1_hum_Top10_94...
1	✓	ADP/ATP translocase 4 OS=Mus musculus GN=Slc25a31 PE=2 SV=1				ADT4_MOUSE	35 kDa	★ 0.020	↑	2	2
2	✓	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Mus musculus GN=Slc25a12 PE=1 SV=1				CMC1_MOUSE	75 kDa	0.057		3	2
3	✓	TITIN_MOUSE-DECOY				TITIN_MOUSE-DECOY	?	★ 0.11		4	3
4	✓	Electron transfer flavoprotein subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Etfb PE=2 SV=3				ETFB_RAT	28 kDa	0.13		7	5
5	✓	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mi...				ODP2_RAT	67 kDa	0.14		4	3
6	✓	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Tufm PE=1 SV=1				EFTU_RAT	50 kDa	0.14		5	2
7	✓	ES1 protein homolog, mitochondrial OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2				ES1_RAT	28 kDa	0.16		5	2
8	✓	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase co...				ODO2_MOUSE (+1)	49 kDa	0.19		4	3
9	✓	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Slc25a3 PE=1 SV=1				MPCP_MOUSE	40 kDa	★ 0.22		8	4
10	✓	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6				K1C10_HUMAN	59 kDa	★ 0.22		7	11
11	✓	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4				ALBU_BOVIN	69 kDa	★ 0.25		61	58
12	✓	Histone H2A type 2-A OS=Homo sapiens GN=HIST2H2AA3 PE=1 SV=3				H2A2A_HUMAN (+2)	14 kDa	★ 0.27		5	3
13	✓	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Atp2a2 PE=1 SV=...				AT2A2_RAT	115 kDa	★ 0.27		43	36
14	✓	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aco2 PE=1 SV=2				ACON_RAT	85 kDa	0.29		23	17
15	✓	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Mesocricetus auratus GN=ALDH2 PE=1 SV=1				ALDH2_MESAU	54 kDa	0.30		8	5
16	✓	Dynein heavy chain 2, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH2 PE=2 SV=3				DYH2_HUMAN	508 kDa	★ 0.30		3	2
17	✓	Citrate synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cs PE=1 SV=1				CISY_RAT	52 kDa	0.31		6	5
18	✓	Mitochondrial carrier homolog 2 OS=Mus musculus GN=Mtch2 PE=1 SV=1				MTCR2_MOUSE	33 kDa	0.31		2	2
19	✓	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acat1 PE=1 SV=1				THIL_RAT	45 kDa	0.32		6	5
20	✓	Serum albumin OS=Canis familiaris GN=ALB PE=1 SV=3				ALBU_CANFA	69 kDa	★ 0.32		2	2
21	✓	Myosin-15 OS=Homo sapiens GN=MYH15 PE=1 SV=5				MYH15_HUMAN	225 kDa	★ 0.33		3	2
22	✓	Alpha-actinin-2 OS=Mus musculus GN=Actn2 PE=1 SV=2				ACTN2_MOUSE	104 kDa	★ 0.35		36	26
23	✓	MICOS complex subunit Mic60 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Immt PE=1 SV=1				MIC60_RAT	67 kDa	0.35		6	3
24	✓	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspd1 PE=1 SV=1				CH60_MOUSE (+1)	61 kDa	★ 0.36		14	7
25	✓	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Aib PE=1 SV=2				ALBU_RAT	69 kDa	★ 0.37		2	2

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile						Human	Rat	control
								File Name: MB2_1_hum_Top10_94...	File Name: MB5_1_hum_Top10_94...	File Name: MB1_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB4_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB3_1_Kontr_Top10_...	File Name: MB6_1_Kontr_Top10_...	M...	M...	M...
Probability Legend:																
over 95%																
80% to 94%																
50% to 79%																
20% to 49%																
0% to 19%																
26	✓	✓	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=2 SV=1	THIM_RAT	42 kDa		0.38	12	6	6	7	2	2			
27	✓	✓	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Oxc...	SCOT1_RAT	56 kDa		0.38	8	6	5	6					
28	✓	✓	Sarcalumenin OS=Mus musculus GN=Srl PE=1 SV=1	SRCA_MOUSE	99 kDa	★	0.40	7	6	6	3	2	3			
29	✓	✓	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Nnt PE=1 SV=2	NNTM_MOUSE	114 kDa		0.40	16	10	7	11	2	14			
30	✓	✓	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	K2C1_HUMAN	66 kDa	★	0.40	15	20	8	17	..	28			
31	✓	✓	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Uqcrc2 PE=1 SV=2	QCR2_RAT	48 kDa	★	0.41	5	2	3						
32	✓	✓	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Idh2 PE=1 SV=2	IDHP_RAT	51 kDa		0.42	28	20	..	18	..	15			
33	✓	✓	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Bckdhh ...	ODBB_RAT	43 kDa		0.42			2						
34	✓	✓	A-kinase anchor protein 6 OS=Homo sapiens GN=AKAP6 PE=1 SV=3	AKAP6_HUMAN	257 kDa		0.42	2								
35	✓	✓	A-kinase anchor protein 9 OS=Homo sapiens GN=AKAP9 PE=1 SV=3	AKAP9_HUMAN	454 kDa		0.42			3						
36	✓	✓	ALPK2_HUMAN-DECOY	ALPK2_HUMAN-DECOY	?		0.42					2				
37	✓	✓	ANR32_BOVIN-DECOY	ANR32_BOVIN-DECOY	?		0.42	3								
38	✓	✓	APOB_MOUSE-DECOY	APOB_MOUSE-DECOY	?	★	0.42			2						
39	✓	✓	ASPM_COLGU-DECOY	ASPM_COLGU-DECOY	?	★	0.42	3					3			
40	✓	✓	AT1A1_HORSE-DECOY	AT1A1_HORSE-DECOY	?		0.42	3								
41	✓	✓	ATP synthase subunit q, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5l PE=1 SV=2	ATP5L_RAT	11 kDa		0.42	2								
42	✓	✓	ATP-binding cassette sub-family A member 13 OS=Homo sapiens GN=ABCA13 PE=2 SV=3	ABCAD_HUMAN	576 kDa		0.42			2						
43	✓	✓	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens GN=DHX9 PE=1 SV=4	DHX9_HUMAN (+2)	141 kDa		0.42				2					
44	✓	✓	Acetyl-CoA carboxylase 1 OS=Bos taurus GN=ACACA PE=2 SV=1	ACACA_BOVIN (+3)	265 kDa		0.42		2							
45	✓	✓	Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acsf2 PE=2 SV=1	ACSF2_RAT	68 kDa	★	0.42	6								
46	✓	✓	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acot2 PE=1 SV=2	ACOT2_MOUSE	50 kDa		0.42	2								
47	✓	✓	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Aprt PE=1 SV=1	APT_RAT	20 kDa		0.42	2								
48	✓	✓	Alpha-1-acid glycoprotein OS=Bos taurus GN=ORM1 PE=2 SV=1	A1AG_BOVIN	23 kDa		0.42				2	4	3			
49	✓	✓	Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapie...	ARAP2_HUMAN	193 kDa	★	0.42			2						
50	✓	✓	Asporin OS=Mus musculus GN=Aspn PE=1 SV=1	ASPN_MOUSE	43 kDa		0.42			2						

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

		Probability Legend:								Human Rat control			
		over 95%								M... M...M...M...M...M...			
		80% to 94%											
		50% to 79%											
		20% to 49%											
		0% to 19%											
#	Visible? Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile	File Name: MB2_1_hum_Top10_94...	File Name: MB5_1_hum_Top10_94...	File Name: MB1_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB4_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB3_1_Kontr_Top10_...	File Name: MB6_1_Kontr_Top10_...
51	<input checked="" type="checkbox"/>	Beta-casein OS=Bos taurus GN=CSN2 PE=1 SV=2	CASB_BOVIN (+1)	25 kDa		0.42							
52	<input checked="" type="checkbox"/>	Beta-lactoglobulin OS=Ovis orientalis musimon GN=LGB PE=1 SV=1	LACB_OVIMU	18 kDa	★	0.42							
53	<input checked="" type="checkbox"/>	CATF_HUMAN-DECOY	CATF_HUMAN-DECOY	?		0.42				2			
54	<input checked="" type="checkbox"/>	CCD89_MOUSE-DECOY	CCD89_MOUSE-DECOY	?		0.42	2						
55	<input checked="" type="checkbox"/>	CD151_MOUSE-DECOY	CD151_MOUSE-DECOY	?		0.42	2						
56	<input checked="" type="checkbox"/>	CE162_HUMAN-DECOY	CE162_HUMAN-DECOY	?		0.42				2			
57	<input checked="" type="checkbox"/>	CE295_RAT-DECOY	CE295_RAT-DECOY	?		0.42				2			
58	<input checked="" type="checkbox"/>	CENPE_MOUSE-DECOY	CENPE_MOUSE-DECOY	?	★	0.42			2				
59	<input checked="" type="checkbox"/>	CEP89_HUMAN-DECOY	CEP89_HUMAN-DECOY	?		0.42			2				
60	<input checked="" type="checkbox"/>	CING CANFA-DECOY	CING CANFA-DECOY	?		0.42	2						
61	<input checked="" type="checkbox"/>	Caveolin-1 OS=Felis catus GN=CAV1 PE=3 SV=1	CAV1_FELCA (+1)	21 kDa		0.42			2			3	2
62	<input checked="" type="checkbox"/>	Chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Adck3 PE=2 SV=...	ADCK3_RAT	72 kDa		0.42	2						
63	<input checked="" type="checkbox"/>	Cilia- and flagella-associated protein 53 OS=Homo sapiens GN=CFAP53 PE=1 SV=2	CFA53_HUMAN	62 kDa		0.42	3						
64	<input checked="" type="checkbox"/>	Cingulin OS=Callithrix jacchus GN=CGN PE=3 SV=2	CING_CALJA (+2)	136 kDa		0.42	2						
65	<input checked="" type="checkbox"/>	Circadian locomotor output cycles protein kaput OS=Homo sapiens GN=CLOCK PE=1 SV=1	CLOCK_HUMAN (+1)	95 kDa	★	0.42	2						
66	<input checked="" type="checkbox"/>	Complement C3 OS=Cavia porcellus GN=C3 PE=1 SV=2	CO3_CAVPO	186 kDa		0.42			2				
67	<input checked="" type="checkbox"/>	Copper-transporting ATPase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Atp7a PE=1 SV=1	ATP7A_RAT	162 kDa		0.42			2				
68	<input checked="" type="checkbox"/>	Cytochrome b-c1 complex subunit 8 OS=Rattus norvegicus GN=Uqcqr PE=3 SV=1	QCR8_RAT	10 kDa		0.42	2						
69	<input checked="" type="checkbox"/>	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cox4i1 PE=...	COX41_RAT	20 kDa		0.42	3						
70	<input checked="" type="checkbox"/>	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Bos taurus GN=COX5A PE=1 SV=2	COX5A_BOVIN (+6)	17 kDa		0.42	2						
71	<input checked="" type="checkbox"/>	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Dync1h1 PE=1 SV=2	DYHC1_MOUSE	532 kDa		0.42	2						
72	<input checked="" type="checkbox"/>	DNA repair protein RAD50 OS=Rattus norvegicus GN=Rad50 PE=1 SV=1	RAD50_RAT	154 kDa		0.42	3						
73	<input checked="" type="checkbox"/>	DYH8_MOUSE-DECOY	DYH8_MOUSE-DECOY	?		0.42				2			
74	<input checked="" type="checkbox"/>	DYHC1_MOUSE-DECOY	DYHC1_MOUSE-DECOY (+1)	?		0.42				2		2	
75	<input checked="" type="checkbox"/>	Dedicator of cytokinesis protein 10 OS=Mus musculus GN=Dock10 PE=1 SV=3	DOC10_MOUSE	246 kDa		0.42			2				

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile	Human Rat control M... M...M...M...M... M...					
									File Name: MB2_1_hum_Top10_94...	File Name: MB5_1_hum_Top10_94...	File Name: MB1_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB4_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB3_1_Kontr_Top10_...	File Name: MB6_1_Kontr_Top10_...
<div>Probability Legend:</div> <div><div>over 95%</div><div>80% to 94%</div><div>50% to 79%</div><div>20% to 49%</div><div>0% to 19%</div></div>														
76	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dnaja3 PE=1 SV=1	DNJA3_MOUSE	52 kDa		0.42	<div>2</div>						
77	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Dopamine beta-hydroxylase OS=Canis familiaris GN=DBH PE=2 SV=1	DOPO_CANFA	70 kDa		0.42				<div>2</div>			
78	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Dystonin OS=Homo sapiens GN=DST PE=1 SV=4	DYST_HUMAN	861 kDa	★	0.42				<div>2</div>			
79	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Dystonin OS=Mus musculus GN=Dst PE=1 SV=2	DYST_MOUSE	834 kDa	★	0.42				<div>2</div>			
80	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Dystrophin OS=Mus musculus GN=Dmd PE=1 SV=3	DMD_MOUSE	426 kDa	★	0.42			<div>2</div>				
81	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 14 OS=Homo sapiens GN=EFCAB14 PE=2 S...	EFC14_HUMAN	55 kDa		0.42	<div>2</div>						
82	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	EVPL_HUMAN-DECOY	EVPL_HUMAN-DECOY	?		0.42		<div>2</div>					
83	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1	ECHM_RAT	32 kDa		0.42				<div>2</div>			
84	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Filamin-A-interacting protein 1 OS=Mus musculus GN=Filip1 PE=1 SV=2	FLIP1_MOUSE (+1)	138 kDa		0.42	<div>2</div>						
85	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Formin-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Fmn12 PE=2 SV=2	FMNL2_MOUSE	123 kDa		0.42			<div>2</div>				
86	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GCC2_MOUSE-DECOY	GCC2_MOUSE-DECOY	?		0.42	<div>2</div>						
87	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GOGA4_MOUSE-DECOY	GOGA4_MOUSE-DECOY	?	★	0.42					<div>3</div>		
88	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GOGB1_HUMAN-DECOY	GOGB1_HUMAN-DECOY	?		0.42				<div>3</div>			
89	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GP179_HUMAN-DECOY	GP179_HUMAN-DECOY	?		0.42					<div>2</div>		
90	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GULP1_MOUSE-DECOY	GULP1_MOUSE-DECOY (+1)	?		0.42	<div>2</div>						
91	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Gamma-tubulin complex component 3 OS=Homo sapiens GN=TUBGCP3 PE=1 SV=2	GCP3_HUMAN	104 kDa		0.42				<div>2</div>			<div>2</div>
92	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Glycogen phosphorylase, muscle form OS=Homo sapiens GN=PYGM PE=1 SV=6	PYGM_HUMAN	97 kDa		0.42	<div>6</div>						
93	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Golgin subfamily A member 4 OS=Rattus norvegicus GN=Golga4 PE=1 SV=2	GOGA4_RAT	260 kDa		0.42	<div>2</div>						
94	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HYDIN_HUMAN-DECOY	HYDIN_HUMAN-DECOY	?		0.42		<div>3</div>					
95	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Heat shock protein beta-6 OS=Rattus norvegicus GN=Hspb6 PE=1 SV=1	HSPB6_RAT	18 kDa		0.42	<div>2</div>						
96	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Hemoglobin subunit alpha-1 OS=Bos mutus grunniens PE=1 SV=1	HBA1_BOSMU (+3)	15 kDa		0.42	<div>2</div>						
97	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Hexokinase-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hk1 PE=1 SV=4	HXX1_RAT	102 kDa		0.42	<div>4</div>						
98	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Histone H2B type 1-L OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BL PE=1 SV=3	H2B1L_HUMAN (+1)	14 kDa		0.42	<div>3</div>						
99	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Histone H3.2 OS=Bos taurus PE=1 SV=2	H32_BOVIN (+3)	15 kDa	★	0.42	<div>5</div>	<div>3</div>	<div>4</div>				
100	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Histone H4 OS=Bos taurus PE=1 SV=2	H4_BOVIN (+6)	11 kDa		0.42	<div>3</div>					<div>4</div>	<div>4</div>

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile						Human	Rat	control	
							File Name: MB2_1_hum_Top10_94...	File Name: MB5_1_hum_Top10_94...	File Name: MB1_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB4_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB3_1_Kontr_Top10_...	File Name: MB6_1_Kontr_Top10_...	M...	M...	M...	M...
				Probability Legend:												
				over 95%												
				80% to 94%												
				50% to 79%												
				20% to 49%												
				0% to 19%												
101	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Homeobox protein cut-like 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cux1 PE=1 SV=2	CUX1_RAT (+1)	165 kDa	0.42										
102	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hsd12 PE=2 SV=1	HSDL2_RAT	58 kDa	0.42										
103	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	IFT81_MOUSE-DECOY	IFT81_MOUSE-DECOY (+1)	?	0.42										
104	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Ig gamma chain C region OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	IGHG_RABIT	35 kDa	0.42										
105	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Ig kappa chain V region K29-213 OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KV15_RABIT	12 kDa	0.42										
106	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Integrin alpha-D OS=Homo sapiens GN=ITGAD PE=1 SV=2	ITAD_HUMAN	127 kDa	0.42										
107	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Bos taurus GN=ITI4 PE=1 SV=1	ITI4_BOVIN	102 kDa	0.42										
108	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial (Fragment) OS=Macaca fascicularis...	IDH3G_MACFA	39 kDa	0.42										
109	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ivd PE=1 SV=2	IVD_RAT	46 kDa	0.42										
110	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	K1107_HUMAN-DECOY	K1107_HUMAN-DECOY	?	0.42										
111	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	K2C74_BOVIN-DECOY	K2C74_BOVIN-DECOY	?	0.42										
112	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	KAL1L_HUMAN-DECOY	KAL1L_HUMAN-DECOY	?	0.42										
113	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	KIF4B_HUMAN-DECOY	KIF4B_HUMAN-DECOY	?	0.42										
114	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	KMT2D_MOUSE-DECOY	KMT2D_MOUSE-DECOY	?	0.42										
115	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	K22E_HUMAN	65 kDa	0.42										
116	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Kinectin OS=Mus musculus GN=Ktn1 PE=2 SV=1	KTN1_MOUSE	153 kDa	0.42										
117	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	LRCH1_MOUSE-DECOY	LRCH1_MOUSE-DECOY	?	0.42										
118	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	LYST_BOVIN-DECOY	LYST_BOVIN-DECOY	?	0.42										
119	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Lrpprc PE=1 ...	LPPRC_RAT	157 kDa	0.42										
120	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	MACF1_MOUSE-DECOY	MACF1_MOUSE-DECOY	?	0.42										
121	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	MBB1A_MOUSE-DECOY	MBB1A_MOUSE-DECOY	?	0.42										
122	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	MICOS complex subunit Mic19 OS=Mus musculus GN=Chchd3 PE=1 SV=1	MIC19_MOUSE	26 kDa	0.42										
123	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	MY18B_HUMAN-DECOY	MY18B_HUMAN-DECOY	?	0.42										
124	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	MYH7B_MOUSE-DECOY	MYH7B_MOUSE-DECOY	?	0.42										
125	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Meiosis-specific nuclear structural protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Mns1 PE=2 SV=1	MNS1_RAT	61 kDa	0.42										

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile	Human Rat control M... M...M...M...M...M...				
									File Name: MB2_1_hum_Top10_94...	File Name: MB5_1_hum_Top10_94...	File Name: MB1_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB4_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB3_1_Kontr_Top10_...
Probability Legend:													
over 95%													
80% to 94%													
50% to 79%													
20% to 49%													
0% to 19%													
126	✓	☆	Microtubule-actin cross-linking factor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Macf1 PE=1 SV=1	MACF1_RAT	620 kDa	★	0.42						
127	✓	☆	Myomesin-1 OS=Homo sapiens GN=MYOM1 PE=1 SV=2	MYOM1_HUMAN	188 kDa	★	0.42				2		
128	✓	☆	Myosin heavy chain, skeletal muscle (Fragments) OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=2	MYSS_RABIT	125 kDa	★	0.42	2					
129	✓	☆	Myosin-11 OS=Mus musculus GN=Myh11 PE=1 SV=1	MYH11_MOUSE	227 kDa	★	0.42	4					
130	✓	☆	Myosin-3 OS=Homo sapiens GN=MYH3 PE=1 SV=3	MYH3_HUMAN	224 kDa	★	0.42				2		
131	✓	☆	Myosin-4 OS=Homo sapiens GN=MYH4 PE=1 SV=2	MYH4_HUMAN	223 kDa	★	0.42	2					
132	✓	☆	Myosin-7 OS=Equus caballus GN=MYH7 PE=2 SV=1	MYH7_HORSE	223 kDa	★	0.42	2					
133	✓	☆	Myosin-7 OS=Rattus norvegicus GN=Myh7 PE=2 SV=2	MYH7_RAT	223 kDa	★	0.42	3					2
134	✓	☆	Myosin-8 OS=Mus musculus GN=Myh8 PE=2 SV=2	MYH8_MOUSE	223 kDa	★	0.42	4					
135	✓	☆	Myosin-9 OS=Mus musculus GN=Myh9 PE=1 SV=4	MYH9_MOUSE	226 kDa	★	0.42	2					2
136	✓	☆	Myozenin-2 OS=Mus musculus GN=Myoz2 PE=1 SV=1	MYOZ2_MOUSE	30 kDa		0.42			2			
137	✓	☆	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial OS=Rattus norv...	NDUA9_RAT	43 kDa	★	0.42	3					
138	✓	☆	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ndufv1 P...	NDUV1_MOUSE	51 kDa		0.42	4					
139	✓	☆	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUF...	NDUS2_BOVIN (+2)	53 kDa		0.42	2					
140	✓	☆	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS=Mus musculus GN=N...	NDUS3_MOUSE	30 kDa		0.42	2					
141	✓	☆	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 OS=Rattus norvegicus GN=Mtnd4 PE=3 SV=2	NU4M_RAT	52 kDa		0.42	2					
142	✓	☆	NAL4C_MOUSE-DECOY	NAL4C_MOUSE-DECOY (+2)	?		0.42	2					
143	✓	☆	NEK11_MOUSE-DECOY	NEK11_MOUSE-DECOY	?		0.42				2		
144	✓	☆	NPY1R_RAT-DECOY	NPY1R_RAT-DECOY	?		0.42	2					
145	✓	☆	Nebulette OS=Homo sapiens GN=NEBL PE=1 SV=1	NEBL_HUMAN	116 kDa		0.42				3		
146	✓	☆	Nesprin-2 OS=Homo sapiens GN=SYNE2 PE=1 SV=3	SYNE2_HUMAN	796 kDa	★	0.42	2					
147	✓	☆	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2	AHNK_HUMAN	629 kDa		0.42	4				...	5
148	✓	☆	Origin recognition complex subunit 6 OS=Homo sapiens GN=ORC6 PE=1 SV=1	ORC6_HUMAN	28 kDa		0.42	2					
149	✓	☆	PEPL_MOUSE-DECOY	PEPL_MOUSE-DECOY	?		0.42	3					
150	✓	☆	PHF20_HUMAN-DECOY	PHF20_HUMAN-DECOY	?		0.42	2					

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile	Human Rat control				
									M...	M...	M...	M...	M...
Probability Legend:													
over 95%													
80% to 94%													
50% to 79%													
20% to 49%													
0% to 19%													
151	✓	✗	PHTF1_HUMAN-DECOY	PHTF1_HUMAN-DECOY	?		0.42		File Name: MB2_1_hum_Top10_94...				
152	✓	✗	PKHH2_HUMAN-DECOY	PKHH2_HUMAN-DECOY	?	★	0.42		File Name: MB5_1_hum_Top10_94...	2			
153	✓	✗	PLCB3_MOUSE-DECOY	PLCB3_MOUSE-DECOY	?		0.42		File Name: MB1_1_Rat_Top10_94...		2		
154	✓	☆	Phosphatidate phosphatase LPIN3 OS=Homo sapiens GN=LPIN3 PE=1 SV=3	LPIN3_HUMAN	94 kDa		0.42		File Name: MB4_1_Rat_Top10_94...			2	
155	✓	☆	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52 OS=Homo sapiens GN=DDX52 PE=1 SV=3	DDX52_HUMAN	68 kDa		0.42	3	File Name: MB3_1_Kontr_Top10...				
156	✓	☆	Probable helicase with zinc finger domain OS=Mus musculus GN=Helz PE=1 SV=2	HELZ_MOUSE	220 kDa		0.42		File Name: MB6_1_Kontr_Top10...				
157	✓	☆	Protein FAM186A OS=Homo sapiens GN=FAM186A PE=2 SV=3	F186A_HUMAN	263 kDa		0.42	2					
158	✓	☆	Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2	SHRM3_HUMAN	217 kDa		0.42						
159	✓	☆	Protein polybromo-1 OS=Homo sapiens GN=PBRM1 PE=1 SV=1	PB1_HUMAN (+1)	193 kDa		0.42	2					
160	✓	☆	Protein-arginine deiminase type-4 OS=Homo sapiens GN=PADI4 PE=1 SV=2	PADI4_HUMAN	74 kDa		0.42					2	
161	✓	☆	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Bos taurus GN=DHX30 PE=2 SV=1	DHX30_BOVIN	136 kDa		0.42	2					
162	✓	✗	RAI1_HUMAN-DECOY	RAI1_HUMAN-DECOY	?		0.42	2					
163	✓	☆	RING finger protein 112 OS=Bos taurus GN=RNFI12 PE=2 SV=1	RN112_BOVIN	67 kDa		0.42					2	
164	✓	☆	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=RALGAPA1 PE=1 SV=1	RGPA1_HUMAN	230 kDa		0.42	2					
165	✓	✗	SACS_HUMAN-DECOY	SACS_HUMAN-DECOY	?	★	0.42					3	
166	✓	✗	SCN4A_MOUSE-DECOY	SCN4A_MOUSE-DECOY	?	★	0.42					2	
167	✓	✗	SP16H_HUMAN-DECOY	SP16H_HUMAN-DECOY (+1)	?		0.42	2					
168	✓	✗	SPEF2_MOUSE-DECOY	SPEF2_MOUSE-DECOY	?	★	0.42	5					
169	✓	✗	SVS2_RAT-DECOY	SVS2_RAT-DECOY	?		0.42	2					
170	✓	✗	SYCP1_MOUSE-DECOY	SYCP1_MOUSE-DECOY	?		0.42					2	
171	✓	✗	SYNE1_HUMAN-DECOY	SYNE1_HUMAN-DECOY	?	★	0.42					4	
172	✓	☆	Schlafen family member 12-like OS=Homo sapiens GN=SLFN12L PE=2 SV=4	SN12L_HUMAN	67 kDa		0.42					2	
173	✓	☆	Serum albumin OS=Ovis aries GN=ALB PE=1 SV=1	ALBU_SHEEP	69 kDa	★	0.42					3	3
174	✓	✗	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acads PE=1 ...	ACADS_MOUSE	45 kDa	★	0.42					2	
175	✓	✗	Solute carrier organic anion transporter family member 1A1 OS=Mus musculus GN=Slco1a1 PE=2 ...	SO1A1_MOUSE	74 kDa		0.42					2	

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammailia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile	Human Rat control										
									M...	M...	M...	M...	M...	M...					
										Probability Legend:									
										over 95%									
										80% to 94%									
										50% to 79%									
										20% to 49%									
										0% to 19%									
176	✓	✖	Spermatogenesis-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=SPATA2 PE=1 SV=2	SPAT2_HUMAN	58 kDa		0.42												
177	✓	✖	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sudc2 PE=1 SV=2	SUCB1_MOUSE	50 kDa		0.42			4	2	2	2						
178	✓	✖	Synaptonemal complex protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sycp1 PE=2 SV=2	SYCP1_RAT	117 kDa	★	0.42			2									
179	✓	✖	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1 OS=Mus musculus GN=Tiam1 PE=1 SV=2	TIAM1_MOUSE	178 kDa		0.42				2								
180	✓	✖	TBC1 domain family member 9B OS=Homo sapiens GN=TBC1D9B PE=1 SV=3	TBC9B_HUMAN	141 kDa		0.42			2									
181	✓	✖	TITIN_HUMAN-DECOY	TITIN_HUMAN-DECOY	?	★	0.42			4									
182	✓	✖	TRDN_RABIT-DECOY	TRDN_RABIT-DECOY	?		0.42				2								
183	✓	✖	TRI10_PIG-DECOY	TRI10_PIG-DECOY	?		0.42						2						
184	✓	✖	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Prdx3 PE=1 SV=2	PRDX3_RAT	28 kDa		0.42			3									
185	✓	✖	Transformation/transcription domain-associated protein OS=Homo sapiens GN=TRRAP PE=1 SV=3	TRRAP_HUMAN	438 kDa		0.42						2						
186	✓	✖	Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein OS=Homo sapiens GN=TNRC6C PE=1 SV=3	TNR6C_HUMAN	176 kDa		0.42						2						
187	✓	✖	Tubulin beta-4B chain OS=Bos taurus GN=TUBB4B PE=2 SV=1	TBB4B_BOVIN (+13)	50 kDa		0.42			3	3	3	2	5					
188	✓	✖	Tyrosine-protein kinase ZAP-70 OS=Homo sapiens GN=ZAP70 PE=1 SV=1	ZAP70_HUMAN	70 kDa		0.42			2									
189	✓	✖	UACA_CANFA-DECOY	UACA_CANFA-DECOY	?		0.42			3									
190	✓	✖	UBF1_MOUSE-DECOY	UBF1_MOUSE-DECOY (+1)	?		0.42						2						
191	✓	✖	UCKL1_HUMAN-DECOY	UCKL1_HUMAN-DECOY	?		0.42						2						
192	✓	✖	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD OS=Bos taurus GN=CYLD PE=2 SV=1	CYLD_BOVIN (+1)	107 kDa		0.42						2						
193	✓	✖	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Bos taurus GN=UBA52 PE=1 SV=2	RL40_BOVIN (+9)	15 kDa		0.42						3						
194	✓	✖	Unconventional myosin-IXa OS=Mus musculus GN=Myo9a PE=2 SV=2	MYO9A_MOUSE (+1)	292 kDa		0.42						2						
195	✓	✖	Uracil phosphoribosyltransferase homolog OS=Bos taurus GN=UPRT PE=2 SV=1	UPP_BOVIN (+3)	33 kDa		0.42					2							
196	✓	✖	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Vdac3 PE=1 SV=2	VDAC3_RAT	31 kDa	★	0.42			2									
197	✓	✖	WD repeat-containing and planar cell polarity effector protein fritz homolog OS=Homo sapiens GN=FRITZ	FRITZ_HUMAN	85 kDa		0.42			2									
198	✓	✖	WDR35_RAT-DECOY	WDR35_RAT-DECOY	?		0.42						2						
199	✓	✖	ZEP1_MOUSE-DECOY	ZEP1_MOUSE-DECOY	?		0.42							2					
200	✓	✖	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit OS=Mus musculus GN=Prkar1a P...	KAP0_MOUSE (+1)	43 kDa		0.42						2						

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible? Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile						Human	Rat	control	
							File Name: MB2_1_hum_Top10_94...	File Name: MB5_1_hum_Top10_94...	File Name: MB1_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB4_1_Rat_Top10_94...	File Name: MB3_1_Kontr_Top10...	File Name: MB6_1_Kontr_Top10...	M...	M...	M...	M...
<div>Probability Legend:</div> <div>over 95%</div> <div>80% to 94%</div> <div>50% to 79%</div> <div>20% to 49%</div> <div>0% to 19%</div>																
201	✓	Desmin OS=Rattus norvegicus GN=Des PE=1 SV=2	DESM_RAT	53 kDa	★	0.45	31	22	...	23	...	12				
202	✓	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Acsl1 PE=1 SV=1	ACSL1_RAT	78 kDa		0.46	10	5	6	4	2	2				
203	✓	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Uqcrc1 PE=1 SV=1	QCR1_RAT	53 kDa		0.46	5	3	5							
204	✓	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sptan1 PE=1 SV=2	SPTN1_RAT	285 kDa		0.47	4		2	2	9					
205	✓	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hadha PE=1 SV=2	ECHA_RAT	83 kDa		0.48	19	16	...	11	9	6				
206	✓	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5o PE=1 SV=1	ATPO_RAT	23 kDa	★	0.50	12	6	7	6		2				
207	✓	Myomesin-1 OS=Mus musculus GN=Myom1 PE=1 SV=2	MYOM1_MOUSE	185 kDa	★	0.50	9	4	5	4	3					
208	✓	Ig kappa-b4 chain C region OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KAC4_RABIT	11 kDa		0.51	4	3	3	3	4	3				
209	✓	Titin OS=Homo sapiens GN=TTN PE=1 SV=4	TITIN_HUMAN	3816 ...	★	0.52	25	19	...	22	...	10				
210	✓	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 PE=1 SV=2	ATPA_RAT	60 kDa		0.53	32	26	...	23	...	18				
211	✓	ADP/ATP translocase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a4 PE=1 SV=3	ADT1_RAT	33 kDa	★	0.54	17	13	...	14	...	12				
212	✓	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acad...	ACADV_RAT	71 kDa	★	0.54	6	5	6	5						
213	✓	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Pd...	ODPB_RAT	39 kDa		0.54	9	3	5	5	4	4				
214	✓	Plectin OS=Mus musculus GN=Plec PE=1 SV=3	PLEC_MOUSE	534 kDa	★	0.54	2		2	2						
215	✓	Titin OS=Mus musculus GN=Ttn PE=1 SV=1	TITIN_MOUSE	3906 ...	★	0.55	4...	1...				
216	✓	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hadhb PE=1 SV=1	ECHB_RAT	51 kDa		0.55	13	10	...	8	3	4				
217	✓	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5c1 PE=1 SV=2	ATPG_RAT	30 kDa	★	0.57	10	4	7	5	2	3				
218	✓	Troponin T, cardiac muscle OS=Rattus norvegicus GN=Tnnt2 PE=1 SV=2	TNNT2_RAT	36 kDa	★	0.57	6		8	3	4					
219	✓	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspa9 PE=1 SV=3	GRP75_RAT	74 kDa		0.57	8		3							
220	✓	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	K1C9_HUMAN	62 kDa	★	0.57	4	4		4	...	17				
221	✓	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform OS=Mus musculus GN=My12 P...	MLRV_MOUSE (+1)	19 kDa		0.58	18	12	...	13	...	7				
222	✓	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN152 PE=1 SV=2	CASA2_BOVIN	26 kDa		0.58		3	2	5	4	11				
223	✓	Hemoglobin fetal subunit beta OS=Bos taurus PE=1 SV=1	HBBF_BOVIN	16 kDa	★	0.59	5	2	2	3						
224	✓	Myomesin-2 OS=Homo sapiens GN=MYOM2 PE=1 SV=2	MYOM2_HUMAN	165 kDa		0.59	7	6	9	8	2	3				
225	✓	Tubulin alpha-1B chain OS=Bos taurus PE=1 SV=2	TBA1B_BOVIN (+11)	50 kDa		0.59	2	2	2		2					

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile						
								Human	Rat	control	M...	M...	M...	
									Probability Legend:					
									over 95%					
									80% to 94%					
									50% to 79%					
									20% to 49%					
									0% to 19%					
226	✓	☆	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5f1 PE=1 SV=...	AT5F1_RAT	29 kDa		0.60	7	5	7	4		2	
227	✓	☆	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Mus musc...	ODPA_MOUSE	43 kDa		0.61	10	4	8	5	4	3	
228	✓	☆	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acadm PE=...	ACADM_MOUSE (+1)	46 kDa	★	0.61	6		2	2			
229	✓	☆	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=1 SV=2	ATPB_RAT	56 kDa		0.63	30	25	...	25	...	20	
230	✓	☆	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acadl PE=...	ACADL_RAT	48 kDa		0.63	7	6	9	7	2	2	
231	✓	☆	Ryanodine receptor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ryr2 PE=1 SV=2	RYR2_RAT	563 kDa	★	0.64	20	5	...	8	8		
232	✓	☆	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3	G3P_RAT	36 kDa		0.64	10	4	9	7	6	2	
233	✓	☆	Myosin-7 OS=Mus musculus GN=Myh7 PE=1 SV=1	MYH7_MOUSE	223 kDa	★	0.65	9	6	6	11	2	6	
234	✓	☆	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1 OS=Homo sapiens GN=A...	AIMP1_HUMAN	34 kDa		0.65	2			2	2		
235	✓	☆	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Bos taurus GN=EEF1A2 PE=2 SV=1	EF1A2_BOVIN (+4)	50 kDa		0.67	2	3	4	3	2		
236	✓	☆	Myosin-6 OS=Mus musculus GN=Myh6 PE=1 SV=2	MYH6_MOUSE	224 kDa	★	0.68	12	6	...	7	6	8	
237	✓	☆	Myosin-6 OS=Rattus norvegicus GN=Myh6 PE=1 SV=2	MYH6_RAT	224 kDa	★	0.68	1...	1...	
238	✓	☆	ATP synthase subunit f, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5j2 PE=1 SV=1	ATPK_RAT	10 kDa		0.70	2	2	2	2	2		
239	✓	☆	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform OS=Rattus norvegicus GN=Cpt1b PE=1 SV=1	CPT1B_RAT	88 kDa		0.70	2	2	4	2			
240	✓	☆	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Dld PE=1 SV=1	DLDH_RAT	54 kDa		0.70	4			2			
241	✓	☆	Succinyl-CoA liqase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=...	SUCA_RAT	36 kDa		0.70	4	2	2				
242	✓	☆	Myosin light chain 3 OS=Rattus norvegicus GN=Myl3 PE=2 SV=2	MYL3_RAT	22 kDa		0.71	14	11	...	11	...	9	
243	✓	☆	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hadh PE=2 SV=...	HCDH_RAT	34 kDa		0.72	4	4	5				
244	✓	☆	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Bos taurus GN=TPM1 PE=2 SV=1	TPM1_BOVIN	33 kDa	★	0.72	28	15	...	15	...	13	
245	✓	☆	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ogdh PE=1 SV=1	ODO1_RAT	116 kDa		0.74	14	6	8	11	3	14	
246	✓	☆	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ndu...	NDUS1_RAT	79 kDa		0.74	9		5				
247	✓	☆	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	TRYP_PIG	24 kDa		0.75	4	4	4	4	6	5	
248	✓	☆	Apolipoprotein A-II OS=Bos taurus GN=APOA2 PE=1 SV=2	APOA2_BOVIN	11 kDa		0.76	2			2			
249	✓	☆	Cytochrome c oxidase subunit NDUF44 OS=Mus musculus GN=Ndufa4 PE=1 SV=2	NDUA4_MOUSE	9 kDa		0.76	4		2		2		
250	✓	☆	Desmoplakin OS=Mus musculus GN=Dsp PE=1 SV=1	DESP_MOUSE	333 kDa		0.76	4		3				

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia				90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count											
#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile	Human Rat control						
									M...	M...	M...	M...	M...	M...	
Probability Legend:															
over 95%															
80% to 94%															
50% to 79%															
20% to 49%															
0% to 19%															
251	✓	✗	NAV3_HUMAN-DECOY	NAV3_HUMAN-DECOY	?		0.76	2	2						
252	✓	✗	Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2	CASA1_BOVIN	25 kDa	★	0.77	2	5	2	5	8	9		
253	✓	✗	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial OS=Rattus norvegicus G...	MMSA_RAT	58 kDa		0.78	5	2	4					
254	✓	✗	ELOA1_MOUSE-DECOY	ELOA1_MOUSE-DECOY	?		0.81	2		3					
255	✓	✗	Fumarate hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Fh PE=1 SV=1	FUMH_RAT	54 kDa		0.81	3		2					
256	✓	✗	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Pongo abelii GN=HSPA8 PE=2 SV=2	HSP7C_PONAB	71 kDa	★	0.81	3		2					
257	✓	✗	PRC2B_HUMAN-DECOY	PRC2B_HUMAN-DECOY	?	★	0.81	3		2					
258	✓	✗	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS=Rattus norvegicus ...	SDHA_RAT	72 kDa		0.81	4		5	2		2		
259	✓	✗	Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Acomys wilsoni GN=MT-CO2 PE=3 SV=1	COX2_ACOWI (+19)	26 kDa		0.82	5	3	4	3		2		
260	✓	✗	Calsequestrin-2 OS=Mus musculus GN=Casq2 PE=1 SV=3	CASQ2_MOUSE	48 kDa		0.83	3		2	2				
261	✓	✗	MAP7 domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=MAP7D3 PE=1 SV=2	MA7D3_HUMAN	98 kDa		0.83	3		2	2	2			
262	✓	✗	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5h PE=1 SV=3	ATP5H_RAT	19 kDa		0.84	6	2	6	2				
263	✓	✗	Serum albumin OS=Sus scrofa GN=ALB PE=1 SV=2	ALBU_PIG	70 kDa	★	0.85		2	2		2			
264	✓	✗	ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5d PE=1 SV=1	ATPD_MOUSE (+1)	18 kDa		0.86	2			2				
265	✓	✗	ATP synthase subunit e, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5i PE=1 SV=3	ATP5I_RAT	8 kDa		0.86	3		2	2				
266	✓	✗	Alpha-enolase OS=Bos taurus GN=ENO1 PE=1 SV=4	ENOA_BOVIN	47 kDa		0.86	2		2					
267	✓	✗	Troponin I, cardiac muscle OS=Rattus norvegicus GN=Tnni3 PE=1 SV=2	TNNI3_RAT	24 kDa		0.86	7	2	8	2	6			
268	✓	✗	Plectin OS=Rattus norvegicus GN=Plec PE=1 SV=2	PLEC_RAT	534 kDa	★	0.87	6	2	8	5	2			
269	✓	✗	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial (Fragment) OS=Macaca fascicularis G...	IDH3A_MACFA (+3)	38 kDa		0.88	4	3	4	3				
270	✓	✗	Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3	LACB_BOVIN	20 kDa	★	0.89		6		8	...	13		
271	✓	✗	Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1	CASK_BOVIN	21 kDa	★	0.89	3	2	2	3	4	5		
272	✓	✗	Actin, cytoplasmic 1 OS=Bos taurus GN=ACTB PE=1 SV=1	ACTB_BOVIN (+17)	42 kDa	★	0.90	2	2	3	3	6	4		
273	✓	✗	Obscurin OS=Mus musculus GN=Obscn PE=2 SV=2	OBSCN_MOUSE	966 kDa		0.90	11	5	...	7	7			
274	✓	✗	Myosin-7B OS=Mus musculus GN=Myh7b PE=3 SV=1	MYH7B_MOUSE	222 kDa	★	0.92		2		2				
275	✓	✗	Alpha-crystallin B chain OS=Rattus norvegicus GN=Cryab PE=1 SV=1	CRYAB_RAT	20 kDa		0.96	12	9	...	10	4	3		

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile					
							Human M...	M...	M...	M...	M...	M...
				Probability Legend:								
				over 95%								
				80% to 94%								
				50% to 79%								
				20% to 49%								
				0% to 19%								
276	✓	★	Creatine kinase S-type, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ckmt2 PE=1 SV=1	KCRS_MOUSE	47 kDa	0.96	8	5	2	2	3	
277	✓	★	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Bos taurus GN=ACTC1 PE=2 SV=1	ACTC_BOVIN (+3)	42 kDa	★ 0.97	29	23	22	21		
278	✓	★	Myosin-binding protein C, cardiac-type OS=Rattus norvegicus GN=Mybpc3 PE=2 SV=2	MYPC_RAT	141 kDa	★ 0.97	38	23	18	10		
279	✓	★	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Decr1 PE=1 SV=2	DECR_RAT	36 kDa	1.00	2	2				
280	✓	★	ADA19_MOUSE-DECOY	ADA19_MOUSE-DECOY	?	1.00				2		
281	✓	★	Anionic trypsin OS=Canis familiaris PE=2 SV=1	TRY2_CANFA	26 kDa	1.00				2	2	
282	✓	★	Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	30 kDa	1.00				3	2	
283	✓	★	BCD1_HUMAN-DECOY	BCD1_HUMAN-DECOY (+1)	?	1.00				2		
284	✓	★	Butyrophilin subfamily 1 member A1 OS=Bos taurus GN=BTN1A1 PE=1 SV=2	BT1A1_BOVIN	59 kDa	1.00					2	
285	✓	★	Carnitine O-acetyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Crat PE=1 SV=1	CACP_RAT	71 kDa	1.00	3	2				
286	✓	★	Coiled-coil domain-containing protein 158 OS=Mus musculus GN=Ccdc158 PE=2 SV=1	CD158_MOUSE	127 kDa	1.00					2	
287	✓	★	Creatine kinase M-type OS=Canis familiaris GN=CKM PE=1 SV=3	KCRM_CANFA	43 kDa	1.00	4	2	6			
288	✓	★	Cytochrome c oxidase subunit 6C-2 OS=Rattus norvegicus GN=Cox6c2 PE=1 SV=3	CX6C2_RAT	8 kDa	1.00	2	2				
289	✓	★	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Bos taurus GN=DPYSL2 PE=1 SV=1	DPYL2_BOVIN (+2)	62 kDa	1.00				2		
290	✓	★	Dynein heavy chain 1, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH1 PE=2 SV=4	DYH1_HUMAN	494 kDa	1.00				2		
291	✓	★	EMAL5_HUMAN-DECOY	EMAL5_HUMAN-DECOY (+...	?	1.00				2		
292	✓	★	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Etfa PE=1 SV=1	ETFA_RAT	35 kDa	1.00	9	6	8	8	4	
293	✓	★	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1 OS=Bos taurus GN=GLYCAM1 PE=1 SV=2	GLCM1_BOVIN	17 kDa	1.00					2	
294	✓	★	Ig kappa chain V region 3315 OS=Orctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KV02_RABIT	12 kDa	1.00				3		
295	✓	★	Ig mu chain C region secreted form OS=Orctolagus cuniculus PE=2 SV=1	IGHM_RABIT (+1)	50 kDa	1.00					3	
296	✓	★	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	K1C14_HUMAN	52 kDa	★ 1.00					5	
297	✓	★	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus GN=Krt1 PE=2 SV=1	K2C1_RAT	65 kDa	★ 1.00					2	
298	✓	★	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1	K2C5_MOUSE (+1)	62 kDa	★ 1.00					2	
299	✓	★	Lactadherin OS=Bos taurus GN=MFG8 PE=1 SV=2	MFGM_BOVIN	47 kDa	1.00					7	
300	✓	★	Lactoperoxidase OS=Bos taurus GN=LPO PE=1 SV=1	PERL_BOVIN (+1)	81 kDa	1.00					2	

XI ANHANG

Experiment: MB1-6_mammalia

90% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (323/326) Including 69 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	T-Test (p-value) (p < 0.05)	Quantitative Profile					
								Human M...	Rat M...	control M...	Human M...	Rat M...	control M...
				Probability Legend:									
				over 95%									
				80% to 94%									
				50% to 79%									
				20% to 49%									
				0% to 19%									
301	✓	☆	Lactotransferrin OS=Bos taurus GN=LTF PE=1 SV=2	TRFL_BOVIN	78 kDa	★	1.00						13
302	✓	☆	Laminin subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Lama1 PE=1 SV=1	LAMA1_MOUSE	338 kDa	★	1.00					3	4
303	✓	☆	Laminin subunit beta-1 OS=Mus musculus GN=Lamb1 PE=1 SV=3	LAMB1_MOUSE	197 kDa		1.00						6
304	✓	☆	Laminin subunit gamma-1 OS=Mus musculus GN=Lamc1 PE=1 SV=2	LAMC1_MOUSE	177 kDa		1.00					2	5
305	✓	☆	Lipoprotein lipase OS=Bos taurus GN=LPL PE=1 SV=2	LIPL_BOVIN (+1)	53 kDa		1.00						2
306	✓	☆	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 OS=Homo sapiens GN=MACF1 PE=1 ...	MACF1_HUMAN	838 kDa	★	1.00		2	2		2	
307	✓	☆	NF1_RAT-DECOY	NF1_RAT-DECOY	?		1.00						2
308	✓	☆	Neurofilament medium polypeptide OS=Mus musculus GN=Nefm PE=1 SV=4	NFM_MOUSE	96 kDa	★	1.00						2
309	✓	☆	Pericentrin OS=Mus musculus GN=Pcnt PE=1 SV=2	PCNT_MOUSE	329 kDa		1.00			2	2		
310	✓	☆	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Equus caballus GN=PGK1 PE=1 SV=2	PGK1_HORSE	45 kDa		1.00	2			2		
311	✓	☆	Polymerase I and transcript release factor OS=Mus musculus GN=Ptrf PE=1 SV=1	PTRF_MOUSE (+1)	44 kDa		1.00					2	
312	✓	☆	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Bos taurus GN=PIGR PE=2 SV=1	PIGR_BOVIN	82 kDa		1.00						4
313	✓	☆	RB6I2_HUMAN-DECOY	RB6I2_HUMAN-DECOY (+1)	?		1.00	2		3			
314	✓	☆	Rho GTPase-activating protein 31 OS=Mus musculus GN=Arhgap31 PE=1 SV=1	RHG31_MOUSE	155 kDa		1.00						2
315	✓	☆	SOC57_HUMAN-DECOY	SOC57_HUMAN-DECOY (+1)	?		1.00						2
316	✓	☆	SPTA1_MOUSE-DECOY	SPTA1_MOUSE-DECOY	?		1.00					2	
317	✓	☆	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	ALBU_MOUSE	69 kDa	★	1.00						2
318	✓	☆	Telomerase-binding protein EST1A OS=Mus musculus GN=Smg6 PE=1 SV=1	EST1A_MOUSE	161 kDa		1.00					2	
319	✓	☆	Transferrin OS=Bos taurus GN=TTR PE=1 SV=1	TTHY_BOVIN	16 kDa		1.00					4	3
320	✓	☆	Vimentin OS=Bos taurus GN=VIM PE=1 SV=3	VIME_BOVIN (+7)	54 kDa	★	1.00					2	3
321	✓	☆	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Mus musculus GN=Vdac1 PE=1 SV=3	VDAC1_MOUSE (+1)	32 kDa	★	1.00	5		2			
322	✓	☆	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Mus musculus GN=Vdac2 PE=1 SV=2	VDAC2_MOUSE (+1)	32 kDa	★	1.00	5	3	5	2		
323	✓	☆	Xanthine dehydrogenase/oxidase OS=Bos taurus GN=XDH PE=1 SV=4	XDH_BOVIN	147 kDa		1.00						5

X.3. Daten der MS-Analyse von Rattenkardiomyozyten mit und ohne Überexpression von HA-getaggttem hMLP

Experiment: 11April2016			95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count			
			Probability Legend:			
			over 95%	80% to 94%	50% to 79%	20% to 49%
			0% to 19%			
#	Visible?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	IP contr... IP_Kontrolle_(SP138-40)	IP spez IP_Positiv_(SP135-7)
1	✓	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	ALBU_BOVIN	69 kDa	81	81
2	✓	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	K2C1_HUMAN	66 kDa	38	49
3	✓	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	TRYP_PIG	24 kDa	4	4
4	✓	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	K1C10_HUMAN	59 kDa	31	39
5	✓	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2	ALBU_RAT	69 kDa	4	2
6	✓	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	K22E_HUMAN	65 kDa	28	36
7	✓	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	K1C9_HUMAN	62 kDa	30	19
8	✓	Ig gamma chain C region OS=Orctolagus cuniculus PE=1 SV=1	IGHG_RABIT	35 kDa	11	14
9	✓	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Lpprc PE=1 SV=2	LPPRC_MOUSE	157 kDa		64
10	✓	Actin, aortic smooth muscle OS=Bos taurus GN=ACTA2 PE=1 SV=1	ACTA_BOVIN (+8)	42 kDa	9	22
11	✓	Ig kappa-b4 chain C region OS=Orctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KAC4_RABIT	11 kDa	3	3
12	✓	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5b PE=1 SV=2	ATPB_MOUSE	56 kDa	13	20
13	✓	Myosin-6 OS=Mus musculus GN=Myh6 PE=1 SV=2	MYH6_MOUSE	224 kDa	32	21
14	✓	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	ALBU_MOUSE	69 kDa	12	24
15	✓	Myoglobin OS=Mus musculus GN=Mb PE=1 SV=3	MYG_MOUSE	17 kDa	6	14
16	✓	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial OS=Mus musculus GN=Idh2 PE=1 SV=3	IDHP_MOUSE (+1)	51 kDa	16	20
17	✓	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	K2C5_HUMAN	62 kDa	14	19
18	✓	Serum albumin OS=Ovis aries GN=ALB PE=1 SV=1	ALBU_SHEEP	69 kDa	8	7
19	✓	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	ATPA_MOUSE	60 kDa	16	19
20	✓	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	K1C14_HUMAN	52 kDa	13	19
21	✓	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Aco2 PE=1 SV=1	ACON_MOUSE	85 kDa	12	25
22	✓	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mdh2 PE=1 SV=3	MDHM_MOUSE	36 kDa	14	16
23	✓	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadha PE=1 SV=1	ECHA_MOUSE	83 kDa	16	19
24	✓	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acaa2 PE=1 SV=3	THIM_MOUSE	42 kDa	15	15
25	✓	ADP/ATP translocase 1 OS=Mus musculus GN=Slc25a4 PE=1 SV=4	ADT1_MOUSE	33 kDa	15	16
26	✓	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Tufm PE=1 SV=1	EFTU_MOUSE	50 kDa	20	15
27	✓	Cysteine and glycine-rich protein 3 OS=Mus musculus GN=Csrp3 PE=1 SV=1	CSR3_MOUSE	21 kDa	5	11
28	✓	Creatine kinase 5-type, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ckmt2 PE=1 SV=1	KCRS_MOUSE	47 kDa	5	12
29	✓	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Gapdh PE=1 SV=2	G3P_MOUSE	36 kDa	8	13

XI ANHANG

Experiment: 11April2016

95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Probability Legend:		Protein Grouping Ambiguity	IP contr... IP_Kontrolle_(SP138-40)	IP spez IP_Positiv_(SP135-7)
						over 95%	80% to 94%			
30	✓	✗	Transferrin OS=Bos taurus GN=TTR PE=1 SV=1	TTHY_BOVIN	16 kDa				5	5
31	✓	✗	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Mus musculus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	TPM1_MOUSE (+2)	33 kDa					23
32	✓	✗	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadhb PE=1 SV=1	ECHB_MOUSE	51 kDa				8	15
33	✓	✗	Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3	DESP_HUMAN	332 kDa					22
34	✓	✗	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Canis familiaris GN=ATP2A2 PE=2 SV=1	AT2A2_CANFA (+3)	110 kDa				8	11
35	✓	✗	Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2	CASA1_BOVIN	25 kDa	★			4	4
36	✓	✗	Vimentin OS=Mus musculus GN=Vim PE=1 SV=3	VIME_MOUSE	54 kDa	★			23	
37	✓	✗	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Etfa PE=1 SV=2	ETFA_MOUSE	35 kDa				5	11
38	✓	✗	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4	K1C16_HUMAN	51 kDa	★			6	8
39	✓	✗	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=1 SV=3	K2C6C_HUMAN	60 kDa	★			9	5
40	✓	✗	Creatine kinase M-type OS=Mus musculus GN=Ckm PE=1 SV=1	KCRM_MOUSE (+1)	43 kDa	★			7	11
41	✓	✗	Electron transfer flavoprotein subunit beta OS=Mus musculus GN=Etfb PE=1 SV=3	ETFB_MOUSE	28 kDa				5	12
42	✓	✗	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Got2 PE=1 SV=1	AATM_MOUSE	47 kDa				7	13
43	✓	✗	Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Acomys wilsoni GN=MT-CO2 PE=3 SV=1	COX2_ACOWI (+19)	26 kDa				5	5
44	✓	✗	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acadl PE=1 SV=2	ACADL_MOUSE	48 kDa				5	11
45	✓	✗	Apolipoprotein A-II OS=Bos taurus GN=APOA2 PE=1 SV=2	APOA2_BOVIN	11 kDa				4	4
46	✓	✗	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Mus musculus GN=Aldoa PE=1 SV=2	ALDOA_MOUSE	39 kDa				3	10
47	✓	✗	Citrate synthase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cs PE=1 SV=1	CISY_MOUSE	52 kDa				4	10
48	✓	✗	Polymerase I and transcript release factor OS=Mus musculus GN=Ptrf PE=1 SV=1	PTRF_MOUSE (+1)	44 kDa				6	7
49	✓	✗	Calsequestrin-2 OS=Mus musculus GN=Casq2 PE=1 SV=3	CASQ2_MOUSE	48 kDa				4	5
50	✓	✗	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1	S10A9_HUMAN	13 kDa					6
51	✓	✗	Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	30 kDa				8	9
52	✓	✗	Alpha-1-acid glycoprotein OS=Bos taurus GN=ORM1 PE=2 SV=1	A1AG_BOVIN	23 kDa				6	5
53	✓	✗	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Got1 PE=1 SV=3	AATC_MOUSE	46 kDa				6	9
54	✓	✗	Actin, cytoplasmic 1 OS=Bos taurus GN=ACTB PE=1 SV=1	ACTB_BOVIN (+21)	42 kDa	★			2	8
55	✓	✗	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Mus musculus GN=Ldhb PE=1 SV=2	LDHB_MOUSE	37 kDa	★			2	10
56	✓	✗	Beta-enolase OS=Mus musculus GN=Eno3 PE=1 SV=3	ENOB_MOUSE (+1)	47 kDa				2	14
57	✓	✗	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Idh3a PE=1 SV=1	IDH3A_MOUSE	40 kDa					6
58	✓	✗	Desmin OS=Mus musculus GN=Des PE=1 SV=3	DESM_MOUSE	53 kDa	★			17	

XI ANHANG

Experiment: 11April2016

95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible? Starred?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	IP contr... IP spez	
						IP_Kontrolle_(SP138-40)	IP_Positiv_(SP135-7)
<div>Probability Legend:</div> <div><div>over 95%</div><div>80% to 94%</div><div>50% to 79%</div><div>20% to 49%</div><div>0% to 19%</div></div>							
59		Ig mu chain C region secreted form OS=Oryctolagus cuniculus PE=2 SV=1	IGHM_RABIT (+1)	50 kDa			7
60		Alpha-crystallin B chain OS=Mus musculus GN=Cryab PE=1 SV=2	CRYAB_MOUSE	20 kDa	★	3	5
61		Fatty acid-binding protein, heart OS=Rattus norvegicus GN=Fabp3 PE=1 SV=2	FABPH_RAT	15 kDa	★	4	5
62		Acyl-CoA dehydrogenase family member 10 OS=Mus musculus GN=Acad10 PE=1 SV=1	ACD10_MOUSE	119 kDa		7	6
63		Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform OS=Mus musculus GN=Cpt1b PE=2 SV=1	CPT1B_MOUSE	88 kDa		5	7
64		Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Mdh1 PE=1 SV=3	MDHC_MOUSE (+1)	37 kDa	★	5	7
65		60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Cricetulus griseus GN=HSPD1 PE=2 SV=1	CH60_CRIGR (+2)	61 kDa			5
66		Cytochrome c oxidase subunit NDUF4A OS=Mus musculus GN=Ndufa4 PE=1 SV=2	NDUA4_MOUSE	9 kDa		3	4
67		Apolipoprotein C-III OS=Bos taurus GN=APOC3 PE=1 SV=2	APOC3_BOVIN	11 kDa		3	3
68		Pyruvate kinase PKM OS=Mus musculus GN=Pkm PE=1 SV=4	KPYM_MOUSE	58 kDa		2	6
69		Caveolin-1 OS=Mus musculus GN=Cav1 PE=1 SV=1	CAV1_MOUSE	21 kDa		7	
70		Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1	S10A8_HUMAN	11 kDa			5
71		Cytochrome c, somatic OS=Mus musculus GN=Cytc PE=1 SV=2	CYC_MOUSE (+1)	12 kDa		3	5
72		Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Uqcrc1 PE=1 SV=2	QCR1_MOUSE	53 kDa		4	6
73		Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadh PE=1 SV=2	HCDH_MOUSE	34 kDa		2	6
74		Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1	CASK_BOVIN	21 kDa		2	
75		Ig lambda chain V-I region HA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	LV102_HUMAN	12 kDa		2	2
76		Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Idh3B PE=1 SV=1	IDH3B_RAT	42 kDa		3	4
77		Dystrophin OS=Mus musculus GN=Dmd PE=1 SV=3	DMD_MOUSE	426 kDa		5	2
78		Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2	CASA2_BOVIN	26 kDa		3	
79		SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Slirp PE=1 SV=2	SLIRP_MOUSE	13 kDa			4
80		Fumarate hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Fh PE=1 SV=3	FUMH_MOUSE	54 kDa			10
81		Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Uqcrc2 PE=1 SV=1	QCR2_MOUSE	48 kDa		5	5
82		Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cox4i1 PE=1 SV=2	COX41_MOUSE	20 kDa		6	3
83		Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Mus musculus GN=Vdac1 PE=1 SV=3	VDAC1_MOUSE (+1)	32 kDa	★	5	3
84		Triosephosphate isomerase OS=Mus musculus GN=Tpi1 PE=1 SV=4	TPIS_MOUSE	32 kDa		2	5
85		40S ribosomal protein S3 OS=Bos taurus GN=RP53 PE=2 SV=1	RS3_BOVIN (+5)	27 kDa		2	9
86		Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acadm PE=1 SV=1	ACADM_MOUSE	46 kDa		2	9
87		ATPase family AAA domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Atad3 PE=1 SV=1	ATAD3_MOUSE	67 kDa		4	

XI ANHANG

Experiment: 11April2016

95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible? Starred?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	IP contr... IP spez	
						IP_Kontrolle_(SP138-40)	IP_Positiv_(SP135-7)
<div>Probability Legend:</div> <div>over 95%</div> <div>80% to 94%</div> <div>50% to 79%</div> <div>20% to 49%</div> <div>0% to 19%</div>							
88	✓	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Suc1a2 PE=1 SV=2	SUCB1_MOUSE	50 kDa		2	8
89	✓	Troponin I, cardiac muscle OS=Mus musculus GN=Tnni3 PE=1 SV=2	TNNI3_MOUSE	24 kDa			7
90	✓	Tubulin beta-4B chain OS=Bos taurus GN=TUBB4B PE=2 SV=1	TBB4B_BOVIN (+3)	50 kDa		5	6
91	✓	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Slc25a3 PE=1 SV=1	MPCP_MOUSE	40 kDa		2	8
92	✓	Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1	FILA2_HUMAN	248 kDa		2	3
93	✓	Hemoglobin subunit alpha OS=Cricetomys gambianus GN=HBA PE=1 SV=2	HBA_CRIGA (+1)	15 kDa		3	5
94	✓	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a11 PE=2 SV=3	M2OM_RAT	34 kDa		2	2
95	✓	Serum albumin OS=Macaca fascicularis GN=ALB PE=2 SV=1	ALBU_MACFA (+1)	69 kDa	★	2	3
96	✓	Serum albumin OS=Canis familiaris GN=ALB PE=1 SV=3	ALBU_CANFA	69 kDa	★	2	2
97	✓	ADP/ATP translocase 2 OS=Bos taurus GN=SLC25A5 PE=2 SV=3	ADT2_BOVIN (+3)	33 kDa	★	4	5
98	✓	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Eci1 PE=1 SV=2	ECI1_MOUSE	32 kDa		3	5
99	✓	Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Mus musculus GN=Krt77 PE=1 SV=1	K2C1B_MOUSE (+1)	61 kDa	★	2	2
100	✓	Adenylate kinase isoenzyme 1 OS=Mus musculus GN=Ak1 PE=1 SV=1	KAD1_MOUSE	22 kDa			6
101	✓	Peroxisome oxidase 5, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Prdx5 PE=1 SV=2	PRDX5_MOUSE	22 kDa			7
102	✓	Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Homo sapiens GN=PURA PE=1 SV=2	PURA_HUMAN (+1)	35 kDa		5	4
103	✓	von Willebrand factor A domain-containing protein 8 OS=Mus musculus GN=Vwa8 PE=2 SV=2	VWA8_MOUSE	213 kDa		4	2
104	✓	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ogdh PE=1 SV=3	ODO1_MOUSE (+1)	116 kDa		2	4
105	✓	Serum albumin OS=Meriones unguiculatus GN=ALB PE=2 SV=1	ALBU_MERUN	69 kDa	★	2	2
106	✓	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Mus musculus GN=Hbb-b1 PE=1 SV=2	HBB1_MOUSE	16 kDa	★	2	4
107	✓	Troponin T, cardiac muscle OS=Mus musculus GN=Tnni3 PE=1 SV=2	TNNI3_MOUSE	36 kDa			6
108	✓	Parathyroid hormone-related protein OS=Bos taurus GN=PTHLP PE=2 SV=1	PTHR_BOVIN (+5)	20 kDa		2	2
109	✓	Cytochrome c oxidase subunit 6B1 OS=Mus musculus GN=Cox6b1 PE=1 SV=2	CX6B1_MOUSE	10 kDa		4	2
110	✓	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5o PE=1 SV=1	ATPO_MOUSE	23 kDa	★	2	5
111	✓	ER6L2_HUMAN-DECOY	ER6L2_HUMAN-DE...	?			2
112	✓	Serum albumin OS=Oryctolagus cuniculus GN=ALB PE=1 SV=2	ALBU_RABIT	69 kDa	★		2
113	✓	Ryanodine receptor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ryr2 PE=1 SV=2	RYR2_RAT	563 kDa		3	
114	✓	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Decr1 PE=1 SV=1	DECR_MOUSE	36 kDa			6
115	✓	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acadvl PE=1 SV=3	ACADV_MOUSE	71 kDa			8
116	✓	Galectin-7 OS=Homo sapiens GN=LGALS7 PE=1 SV=2	LEG7_HUMAN	15 kDa			5

XI ANHANG

Experiment: 11April2016

95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Probability Legend:		IP contr...	IP spez
						over 95%	80% to 94%		
Protein Grouping Ambiguity									
IP_Kontrolle_(SP138-40)									
IP_Positiv_(SP135-7)									
117	✓		Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Oxct1 PE=1 SV=1	SCOT1_MOUSE	56 kDa				4
118	✓		Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Bos taurus GN=HSPA8 PE=1 SV=2	HSP7C_BOVIN (+7)	71 kDa		4		3
119	✓		Muscle-related coiled-coil protein OS=Mus musculus GN=Murc PE=2 SV=1	MURC_MOUSE	41 kDa		3		5
120	✓		Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pdhb PE=1 SV=1	ODPB_MOUSE	39 kDa		2		4
121	✓		Ig kappa chain V region K29-213 OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KV15_RABIT	12 kDa	★	2		2
122	✓		ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5c1 PE=1 SV=1	ATPG_MOUSE	33 kDa	★	3		4
123	✓		Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2	AMY1_HUMAN	58 kDa		2		
124	✓		Junction plakoglobin OS=Bos taurus GN=JUP PE=2 SV=1	PLAK_BOVIN (+4)	82 kDa				6
125	✓		Annexin A2 (Fragments) OS=Mesocricetus auratus PE=1 SV=1	ANXA2_MESAU	22 kDa				2
126	✓		Cysteine-rich protein 2 OS=Mus musculus GN=Crip2 PE=1 SV=1	CRIP2_MOUSE	23 kDa		2		2
127	✓		Peptidoglycan recognition protein 1 OS=Bos taurus GN=PGLYRP1 PE=1 SV=1	PGRP1_BOVIN	21 kDa		3		2
128	✓		60S ribosomal protein L12 OS=Bos taurus GN=RPL12 PE=2 SV=1	RL12_BOVIN (+4)	18 kDa		3		2
129	✓		Phosphoglycerate kinase 1 OS=Cricetulus griseus GN=PGK1 PE=2 SV=2	PGK1_CRIGR (+3)	45 kDa		2		2
130	✓		Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Prdx3 PE=1 SV=1	PRDX3_MOUSE	28 kDa		2		3
131	✓		Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sod2 PE=1 SV=3	SODM_MOUSE (+1)	25 kDa		2		2
132	✓		Myosin light chain 3 OS=Mus musculus GN=My13 PE=1 SV=4	MYL3_MOUSE	22 kDa		3		
133	✓		FAN1_HUMAN-DECOY	FAN1_HUMAN-DE...	?		2		
134	✓		Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Bos taurus GN=COX5A PE=1 SV=2	COX5A_BOVIN (+5)	17 kDa		3		
135	✓		Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cox5b PE=1 SV=1	COX5B_MOUSE	14 kDa		4		
136	✓		Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Opa1 PE=1 SV=1	OPA1_RAT	111 kDa		4		
137	✓		Ig kappa chain C region OS=Mus musculus PE=1 SV=1	IGKC_MOUSE	12 kDa		3		
138	✓		Nucleoside diphosphate kinase B OS=Mus musculus GN=Nme2 PE=1 SV=1	NDKB_MOUSE (+1)	17 kDa				4
139	✓		NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ndufs3 PE=1 SV=1	NDUS3_MOUSE	30 kDa		3		3
140	✓		NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial OS=Mus musculus GN=NDUAA PE=1 SV=1	NDUAA_MOUSE	41 kDa		2		3
141	✓		DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial OS=Mus musculus GN=DnaJ3 PE=1 SV=1	DNJA3_MOUSE	52 kDa		2		2
142	✓		Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform OS=Homo sapiens GN=MYL2 PE=1 SV=3	MLRV_HUMAN (+3)	19 kDa		3		2
143	✓		ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5f1 PE=1 SV=1	AT5F1_MOUSE	29 kDa		2		3
144	✓		Cardiac phospholamban OS=Bos taurus GN=PLN PE=1 SV=1	PPLA_BOVIN (+6)	6 kDa		2		
145	✓		60S acidic ribosomal protein P0 OS=Bos taurus GN=RPLP0 PE=2 SV=3	RLA0_BOVIN (+4)	34 kDa		2		3

XI ANHANG

Experiment: 11April2016

95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	IP contr...	IP spez
							IP_Kontrolle_(SP138-40)	IP_Positiv_(SP135-7)
				Probability Legend:				
				over 95%				
				80% to 94%				
				50% to 79%				
				20% to 49%				
				0% to 19%				
146	✓		Elongation factor 1-alpha 2 OS=Bos taurus GN=EEF1A2 PE=2 SV=1	EF1A2_BOVIN (+4)	50 kDa			3
147	✓		Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acat1 PE=1 SV=1	TH1L_MOUSE	45 kDa			3
148	✓		40S ribosomal protein S19 OS=Bos taurus GN=RPS19 PE=2 SV=3	RS19_BOVIN (+4)	16 kDa			4
149	✓		Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	IGHA1_HUMAN	38 kDa			5
150	✓		14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus GN=YWHAZ PE=1 SV=1	1433Z_BOVIN (+5)	28 kDa	★		3
151	✓		40S ribosomal protein S20 OS=Bos taurus GN=RPS20 PE=3 SV=1	RS20_BOVIN (+6)	13 kDa			3
152	✓		Serpin B3 OS=Homo sapiens GN=SERPINB3 PE=1 SV=2	SPB3_HUMAN (+1)	45 kDa			2
153	✓		Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondr...	ODP2_MOUSE	68 kDa		2	3
154	✓		Fatty acid-binding protein, adipocyte OS=Mus musculus GN=Fabp4 PE=1 SV=3	FABP4_MOUSE	15 kDa			3
155	✓		Complement factor B OS=Bos taurus GN=CFB PE=1 SV=2	CFAB_BOVIN	85 kDa		2	
156	✓		NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial OS=Gorilla gorilla gorilla GN=NDUFS1 P...	NDUS1_GORGO (+7)	79 kDa		2	
157	✓		SOCS7_HUMAN-DECOY	SOCS7_HUMAN-D...	?			2
158	✓		Cytochrome c oxidase subunit 6C OS=Mus musculus GN=Cox6c PE=1 SV=3	COX6C_MOUSE	8 kDa		3	
159	✓		ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5h PE=1 SV=3	ATP5H_MOUSE	19 kDa			5
160	✓		Ig gamma-3 chain C region OS=Mus musculus PE=1 SV=2	IGHG3_MOUSE	44 kDa	★	3	
161	✓		Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitoch...	ODB2_MOUSE	53 kDa		5	
162	✓		Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Mus musculus GN...	ODPA_MOUSE (+1)	43 kDa			3
163	✓		Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sucd1 PE=1...	SUCA_MOUSE	36 kDa			4
164	✓		Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dld PE=1 SV=2	DLDH_MOUSE	54 kDa			3
165	✓		Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3	LACB_BOVIN	20 kDa	★	4	
166	✓		Small proline-rich protein 2B OS=Homo sapiens GN=SPRR2B PE=2 SV=1	SPR2B_HUMAN (+1)	8 kDa			3
167	✓		Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Uqcrcf1 PE=1 SV=1	UCRI_MOUSE	29 kDa			2
168	✓		Antithrombin-III OS=Ovis aries GN=SERPINC1 PE=2 SV=1	ANT3_SHEEP	53 kDa			2
169	✓		MICOS complex subunit MIC19 OS=Homo sapiens GN=CHCHD3 PE=1 SV=1	MIC19_HUMAN	26 kDa		2	
170	✓		Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Echs1 PE=1 SV=1	ECHM_MOUSE	31 kDa			3
171	✓		NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ndufs8 PE...	NDUS8_MOUSE	24 kDa			2
172	✓		ATP synthase subunit f, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5j2 PE=1 SV=3	ATPK_MOUSE	10 kDa			2
173	✓		Sarcalumenin OS=Mus musculus GN=Srl PE=1 SV=1	SRCA_MOUSE	99 kDa		2	
174	✓		Thrombospondin-1 OS=Bos taurus GN=THBS1 PE=2 SV=2	TSP1_BOVIN	130 kDa			2

XI ANHANG

Experiment: 11April2016

95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Probability Legend:		IP contr...	IP spez
						over 95%	80% to 94%		
Protein Grouping Ambiguity									
IP_Kontrolle... (SP138-40)									
IP_Positiv... (SP135-7)									
175	✓		Stress-70 protein, mitochondrial OS=Bos taurus GN=HSPA9 PE=2 SV=1	GRP75_BOVIN (+6)	74 kDa				3
176	✓		MICOS complex subunit Mic60 OS=Mus musculus GN=Immt PE=1 SV=1	MIC60_MOUSE	84 kDa			3	
177	✓		Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ech1 PE=1 SV=1	ECH1_MOUSE	36 kDa				4
178	✓		Protein POF1B OS=Homo sapiens GN=POF1B PE=1 SV=3	POF1B_HUMAN (+1)	68 kDa				3
179	✓		Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ptcd3 PE=2 SV=1	PTCD3_MOUSE	78 kDa				2
180	✓		Heat shock protein HSP 90-beta OS=Equus caballus GN=HSP90AB1 PE=2 SV=3	HS90B_HORSE (+5)	83 kDa				3
181	✓		Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4	S10A7_HUMAN	11 kDa				3
182	✓		Peroxiredoxin-2 OS=Mus musculus GN=Prdx2 PE=1 SV=3	PRDX2_MOUSE (+1)	22 kDa				4
183	✓		28S ribosomal protein S34, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps34 PE=2 SV=1	RT34_MOUSE	26 kDa				3
184	✓		Glucose-6-phosphate isomerase OS=Mus musculus GN=Gpi PE=1 SV=4	G6PI_MOUSE	63 kDa				2
185	✓		Protein transport protein Sec16A OS=Homo sapiens GN=SEC16A PE=1 SV=3	SC16A_HUMAN	234 kDa			2	
186	✓		Ig mu chain C region OS=Mus musculus GN=Ighm PE=1 SV=2	IGHM_MOUSE	50 kDa			2	
187	✓		Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Mus musculus GN=Vdac2 PE=1 SV=2	VDAC2_MOUSE (+1)	32 kDa	★		2	
188	✓		Cytochrome c oxidase subunit 7A1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cox7a1 PE=2 SV=1	CX7A1_MOUSE	9 kDa			2	
189	✓		60S ribosomal protein L11 OS=Bos taurus GN=RPL11 PE=2 SV=3	RL11_BOVIN (+5)	20 kDa				2
190	✓		Peroxiredoxin-6 OS=Mus musculus GN=Prdx6 PE=1 SV=3	PRDX6_MOUSE	25 kDa				2
191	✓		Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5 OS=Mus musculus GN=Usmg5 PE=1 SV=1	USMG5_MOUSE	6 kDa				2
192	✓		ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5d PE=1 SV=1	ATPD_MOUSE (+1)	18 kDa				2
193	✓		E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Mus musculus GN=Trim21 PE=1 SV=1	RO52_MOUSE	54 kDa			2	
194	✓		ATP synthase subunit e, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5i PE=1 SV=2	ATP5I_MOUSE (+1)	8 kDa				2
195	✓		6.8 kDa mitochondrial proteolipid OS=Mus musculus GN=Mp68 PE=2 SV=1	68MP_MOUSE	7 kDa				2
196	✓		Dihydropyrimidinase-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mi...	ODO2_BOVIN (+5)	49 kDa				2
197	✓		Heat shock protein beta-1 OS=Sus scrofa GN=HSPB1 PE=2 SV=1	HSPB1_PIG	23 kDa	★			2
198	✓		PLCE1_HUMAN-DECOY	PLCE1_HUMAN-DE...	?				2
199	✓		28S ribosomal protein S9, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps9 PE=2 SV=3	RT09_MOUSE	45 kDa				3
200	✓		28S ribosomal protein S23, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps23 PE=1 SV=1	RT23_MOUSE	20 kDa				3
201	✓		NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ndufs2 PE=1 SV=1	NDUS2_MOUSE (+1)	53 kDa			3	
202	✓		28S ribosomal protein S27, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps27 PE=2 SV=2	RT27_MOUSE	48 kDa				2
203	✓		Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=6	TRFL_HUMAN	78 kDa				3

XI ANHANG

Experiment: 11April2016

95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

		Probability Legend:							
		over 95%							
		80% to 94%							
		50% to 79%							
		20% to 49%							
		0% to 19%							
#	Visible? Starred?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	IP contr... IP_Kontrolle_(SP138-40)	IP spez IP_Positiv_(SP135-7)		
204	✓	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Mus musculus GN=Gstm1 PE=1 SV=2	GSTM1_MOUSE	26 kDa			2		
205	✓	Unconventional myosin-Ic OS=Mus musculus GN=Myo1c PE=1 SV=2	MYO1C_MOUSE (+1)	122 kDa			2		
206	✓	Caveolin-2 OS=Mus musculus GN=Cav2 PE=1 SV=1	CAV2_MOUSE	18 kDa	2				
207	✓	40S ribosomal protein S5 OS=Bos taurus GN=RP55 PE=2 SV=3	RS5_BOVIN (+1)	23 kDa			2		
208	✓	Hemoglobin subunit beta OS=Spermophilus beecheyi PE=1 SV=1	HBB_SPEBE	16 kDa	★		2		
209	✓	Hemoglobin subunit delta OS=Tarsius syrichta GN=HBD PE=2 SV=2	HBD_TARSY	16 kDa	★		2		
210	✓	Histone H4 OS=Bos taurus PE=1 SV=2	H4_BOVIN (+6)	11 kDa			2		
211	✓	Keratinocyte proline-rich protein OS=Homo sapiens GN=KPRP PE=1 SV=1	KPRP_HUMAN	64 kDa			3		
212	✓	Peroxiredoxin-1 OS=Mus musculus GN=Prdx1 PE=1 SV=1	PRDX1_MOUSE	22 kDa			2		
213	✓	Acyl-coenzyme A thioesterase 13 OS=Mus musculus GN=Acot13 PE=1 SV=1	ACO13_MOUSE	15 kDa			2		
214	✓	Ig gamma-2A chain C region secreted form OS=Mus musculus PE=1 SV=1	GCAB_MOUSE	37 kDa	2				
215	✓	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4	HNRH1_HUMAN (+6)	49 kDa	2				
216	✓	Microsomal glutathione S-transferase 3 OS=Mus musculus GN=Mgst3 PE=1 SV=1	MGST3_MOUSE	17 kDa	2				
217	✓	28S ribosomal protein S7, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps7 PE=2 SV=1	RT07_MOUSE (+1)	28 kDa			2		
218	✓	Ig gamma-2B chain C region OS=Mus musculus GN=Igh-3 PE=1 SV=3	IGG2B_MOUSE	44 kDa	2				
219	✓	28S ribosomal protein S15, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps15 PE=2 SV=2	RT15_MOUSE	29 kDa			2		
220	✓	Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2	ANXA5_HUMAN (+2)	36 kDa			2		
221	✓	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Chlorocebus aethiops GN=RPS4X PE=2 SV=3	RS4X_CHLAE (+10)	30 kDa			2		
222	✓	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Homo sapiens GN=ACSL1 PE=1 SV=1	ACSL1_HUMAN (+2)	78 kDa			2		
223	✓	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acot2 PE=1 SV=2	ACOT2_MOUSE (+1)	50 kDa			2		
224	✓	Hemoglobin subunit beta OS=Microtus pennsylvanicus PE=1 SV=1	HBB_MICPE	16 kDa	★		2		
225	✓	Heat shock protein beta-6 OS=Mus musculus GN=Hspb6 PE=2 SV=1	HSPB6_MOUSE	18 kDa			2		
226	✓	Lysozyme C OS=Gorilla gorilla gorilla GN=LYZ PE=2 SV=1	LYSC_GORGO (+5)	17 kDa			2		
227	✓	28S ribosomal protein S26, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps26 PE=1 SV=1	RT26_MOUSE	23 kDa			2		
228	✓	Ig lambda chain C region OS=Orctolagus cuniculus PE=1 SV=2	LAC_RABIT	11 kDa	2				
229	✓	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	DCD_HUMAN	11 kDa			2		
230	✓	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12 OS=Mus musculus GN=Ndufa12 PE=2 ...	NDUAC_MOUSE	17 kDa		2			
231	✓	Ig heavy chain V region AC38 205.12 OS=Mus musculus PE=1 SV=1	HVM51_MOUSE	13 kDa	2				
232	✓	BBOF1_MOUSE-DECOY	BBOF1_MOUSE-DE...	?			2		

Experiment: 11April2016

95% probability, 2 peptide minimum, displaying Exclusive Unique Peptide Count

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (234) Including 7 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	IP contr... IP spez	
						Protein Grouping Ambiguity	
233			WNK3_MOUSE-DECOY	WNK3_MOUSE-DE...	?		2
234			SMHD1_HUMAN-DECOY	SMHD1_HUMAN-D...	?	2	