

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Pharmazeut Felix Armin Trogisch

aus Heppenheim

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2018

Beeinflussung der Herzfunktion
und kardialer Umbauprozesse
durch endogene Proteasom-Regulation
im murinen Hypertrophiemodell

Gutachter: Prof. Dr. Markus Hecker
Prof. Dr. Johannes Backs

*Gelobt sei der Herr täglich.
Gott legt uns eine Last auf, aber er hilft uns auch.*

(Psalm 68, 20)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Zusammenfassung.....	XV
Summary.....	XVII
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung in das kardiovaskuläre System.....	1
1.2 Regulation und Entwicklung der kardialen Hypertrophie	2
1.3 Tiermodelle kardialer Hypertrophie und Insuffizienz.....	4
1.4 Echokardiographie in der Diagnostik kardialer Dysfunktion.....	5
1.5 Differenzielle Analysen des zellulären Proteoms	7
1.6 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) als zelluläre Kontrollinstanz.....	8
1.7 Die Rolle induzierbarer Untereinheiten.....	9
1.8 Das UPS und kardiale Erkrankungen.....	11
1.9 Ziele dieser Arbeit.....	13
2 Material.....	15
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits	15
2.2 Verbrauchsmittel	16
2.3 Geräte und Werkzeuge	16
2.4 Präparationen für tierexperimentelle Arbeiten	17
2.5 Puffer und Lösungen für tierexperimentelle Arbeiten.....	18
2.6 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	18
2.7 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.....	19
2.8 Puffer und Lösungen für histologische Methoden.....	22
2.9 Mauslinie.....	22
2.10 Primer.....	22

2.11	Primärantikörper	23
2.12	Sekundärantikörper	24
2.13	Farbstoffe.....	24
3	Methoden	25
3.1	Tierexperimentelle Arbeiten	25
3.1.1	Lmp2-Gentransfer	25
3.1.2	Isoprenalin-induzierte Hypertrophie.....	25
3.1.3	Pumpenpräparation und Operation.....	26
3.1.4	Echokardiographie.....	26
3.1.5	Euthanasie und Organentnahme.....	29
3.1.6	Hypertrophe Kardiomyopathie.....	29
3.2	Molekularbiologische Analysen.....	29
3.2.1	DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien	29
3.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese	30
3.3	Proteinbiochemische Analysen.....	31
3.3.1	Extraktion und Fraktionierung von Proteinen aus Gewebe.....	31
3.3.2	Protein-Fällung	31
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
3.3.4	Proteasom-Aktivitätsassays.....	32
3.3.5	Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	32
3.3.6	Western Blot und Detektion	33
3.3.7	Zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese (DIGE)	33
3.3.8	Gel-Fixierung und Färbung.....	33
3.4	Histologische Analysen	34
3.4.1	Anfertigen kardialer Querschnitte.....	34
3.4.2	Mikroskopie	35
3.5	Statistik	35

4	Ergebnisse	37
4.1	Induktion von Lmp2 bei hypertropher Kardiomyopathie.....	37
4.2	Phänotypisierung von Lmp2 Knock-out-Mäusen.....	37
4.3	Analyse kardialer Funktion im Isoprenalinmodell	40
4.3.1	Systolische Funktion.....	40
4.3.2	Diastolische Funktion.....	40
4.4	Phänotypisierung nach kardiotroper Rekonstitution von Lmp2.....	45
4.5	Untersuchung der Herzfunktion im Isoprenalinmodell nach kardiotroper Rekonstitution von Lmp2.....	47
4.5.1	Systolische Funktion.....	47
4.5.2	Diastolische Funktion.....	48
4.6	Analyse kardialer Umbauprozesse in Abhängigkeit von Lmp2.....	50
4.6.1	Entwicklung kardialer Hypertrophie.....	50
4.6.2	Überprüfung einer differentiellen Regulation der Calcineurin-Abundanz	52
4.6.3	Untersuchung von interstitieller Kollagen-Einlagerung	55
4.7	Regulation sarkomerer Strukturen bei kardialer Hypertrophie.....	55
4.8	Untersuchung der UPS-Funktion in Abhängigkeit von Lmp2.....	58
4.9	DIGE-Analyse differentiell regulierter Proteine.....	63
5	Diskussion	67
5.1	Induktion von Lmp2 als genereller Mechanismus hypertropher Adaption ...	67
5.2	Lmp2 ist nicht essentiell für basale Herzentwicklung und initiale Antwort auf hypertrophe Stimulation.....	67
5.3	Kardiales Lmp2 ist notwendig zur Erhaltung der Kontraktilität	69
5.4	Verlust von Lmp2 verstärkt kardiales Remodelling.....	71
5.5	Die Abundanz von Lmp2 beeinflusst die Regulation der proteasomalen Aktivität in der Pathogenese kardialer Umbauprozesse	74
5.6	Das kardiale Proteom wird in Abhängigkeit von Lmp2 differentiell reguliert	75

Inhaltsverzeichnis

5.7	Welches ist die kritische Funktion von Lmp2 beim kardialen Remodelling?	77
5.8	Lmp2-spezifische Proteasom-Modulation als therapeutisches Ziel?.....	77
5.9	Limitationen und Ausblick.....	79
6	Literaturverzeichnis.....	81
7	Abbildungsverzeichnis.....	97
8	Tabellenverzeichnis.....	101
	Danksagung.....	103

Abkürzungsverzeichnis

2-D	Zweidimensional
A	in der Echokardiographie: Maximum der Einstromgeschwindigkeit in der aktiven diastolischen Phase
Asp	Asparaginsäure
AAV9	Adeno-assoziiertes Virus, Serotyp 9
AMC	7- <u>A</u> mino-4- <u>m</u> ethylcoumarin
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variances</i>)
APIC4	apikaler Vierkammerblick (<i>apical four-chamber view</i>)
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BDM	2,3- <u>B</u> utandion <u>m</u> onoxim
B-Modus	<i>Bright mode</i>
Boc-	<i>tert</i> - <u>B</u> utylo <u>x</u> ycarbonyl- (als N-ständige Schutzgruppe)
BSA	bovines Serum-Albumin
cAMP	3',5'-Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
Ca _v 1.2	spannungsabhängiger L-Typ Calcium-Kanal, Untereinheit α 1C
CHAPS	3-[(3- <u>C</u> holamidopropyl)dimethyl <u>a</u> mmonio]-1- <u>p</u> ropansulfonat-Hydrat
cMyBP	kardiales Myosin-bindendes Protein
d	Tag
DABCO	1,4- <u>D</u> iazabicyclo[2.2.2] <u>o</u> ctan
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidin-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndol
DIGE	<u>D</u> ifferenzielle <u>G</u> elelektrophorese
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	1,4- <u>D</u> ithiothreitol
E	in der Echokardiographie: Maximum der Einstromgeschwindigkeit in der passiven diastolischen Phase; als Aminosäure: Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EKG	Elektrokardiogramm
g	Gewichtskraft der Erdanziehung
GAPDH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3- <u>p</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase
h	Stunde

HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie (<i>hypertrophic cardiomyopathy</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horsereddish peroxidase</i>)
IBF	Interdisziplinäre Biomedizinische Forschungseinrichtung Heidelberg
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
IPS	Interner Standard bei DIGE (<i>internal pooled standard</i>)
I/R	Ischämie/Reperfusion
IKB α	<i>Inhibitor of nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, alpha</i>
kDa	Kilodalton
L	als Maßeinheit: Liter; als Aminosäure: Leucin
Lmp	<i>Low molecular mass peptide</i>
LVET	Linksventrikuläre Auswurfzeit (<i>left-ventricular ejection time</i>)
LVOT	Linksventrikulärer Ausflusstrakt (<i>left-ventricular outflow tract</i>)
Lys	Lysin
M	Molar ($\frac{\text{mol}}{\text{L}}$)
MCIP	Modulierendes, Calcineurin-interagierendes Protein
Mecl	<i>Multicatalytic endopeptidase complex subunit</i>
β -MHC	β -Myosin, schwere Kette (<i>β-myosin heavy chain</i>)
min	Minute
M-Modus	<i>Motion mode</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit bei statistischen Tests
PAGE	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
PBS	Phosphat-Natriumchlorid-Puffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus des dimensionslosen Betrages der Oxoniumionenaktivität in M (<i>potentia hydrogenii</i>)
pNFAT	<i>Phosphorylated nuclear factor of activated T-cells</i>
PSLAX	Parasternale lange Achse (<i>parasternal long axis</i>)

PW	Pulswelle (<i>pulsed wave</i>)
R	Arginin
S	als Maßeinheit: Svedberg (Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten); als Aminosäure: Serin
s	Sekunde
SAX	Kurze Achse (<i>short axis</i>)
SSLAX	Suprasternale lange Achse (<i>suprasternal long axis</i>)
Suc-	Succinyl- (als N-ständige Schutzgruppe)
T	Threonin
TAC	Transverse Aortenkonstriktion (<i>transverse aortic constriction</i>)
TBE	TRIS-Boran-EDTA
TBS	TRIS-Natriumchlorid-Puffer (<i>TRIS buffered saline</i>)
TBST	TBS mit Tween-20
Thr	Threonin
TnI	Troponin I
TRIS	<u>Tris</u> (hydroxymethyl)-aminomethan
Ub	Ubiquitinmolekül
UP1	„ubiquitinyliertes Protein 1“
V	als Maßeinheit: Volt; als Aminosäure: Valin
vg	Virusgenom
WB	Western Blot
WGA	Weizenkeim-Agglutinin (<i>wheat germ agglutinin</i>)
Y	Tyrosin
Z-	Benzyloxycarbonyl- (als N-ständige Schutzgruppe; benannt nach ihrem Entdecker Leonidas Zervas)

Zusammenfassung

Das Herzkreislaufsystem ist essentiell für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Organfunktionen wie z.B. die des Gehirns. Die Anpassung der Herzfunktion an eine veränderte transiente oder chronische hämodynamische Belastung initiiert adaptive oder maladaptive Anpassungsreaktionen. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist eine zentrale Kontrolleinheit zellulärer Proteine, dessen Manipulation abhängig von ihrem Ausmaß kardiale Umbauprozesse sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann. Die Funktion der fakultativen proteasomalen Untereinheit *low molecular mass peptide 2* (Lmp2) bei der Pathogenese kardialer Umbauprozesse ist unzureichend verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von kardialem Lmp2 auf kardiale Umbauprozesse in der Maus umfassend zu bestimmen.

Unter basalen Bedingungen entwickelten erwachsene Lmp2 Knock-out-Mäuse keinen offensichtlichen kardialen Phänotyp. Ihre chronotrope, inotrope und lusitrope Reaktion auf kontinuierliche β -adrenerge Stimulation über vier Tage war nicht von der bei Wildtyp-Geschwistertieren zu unterscheiden. Nach anhaltender Stimulation bis insgesamt sieben Tage allerdings waren Verkürzungsfraction und aktive diastolische Ventrikelfüllung gegenüber der Wildtyp-Gruppe deutlich verringert. Gleichzeitig konnte bei Lmp2 Knock-out-Mäusen eine wesentlich stärkere Zunahme beim Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht, bei der Kardiomyozytenquerschnittsfläche, der Hinterwanddicke sowie der interstitiellen Kollagen-Einlagerung beobachtet werden. Die Aktivität des 26S-Proteasoms war bei Lmp2 Knock-out-Tieren weniger stark erhöht. Kardialer Gentransfer von Lmp2 verhinderte den systolischen Funktionsverlust und begrenzte das Ausmaß der kardialen Hypertrophie auf das Niveau der Wildtypmäuse. In einem proteomischen Ansatz mittels zweidimensionaler differenzieller Gelelektrophorese wurden bei Lmp2 Knock-out-Tieren 36 durch Isoprenalin differenziell regulierte Proteine detektiert, von denen 27 im Vergleich zur parallel behandelten Wildtyp-Gruppe gegensätzlich reguliert waren.

Zusammengefasst scheint Lmp2 für die myokardiale Entwicklung und basale Herzfunktion nicht notwendig zu sein. Nach hypertropher Stimulation trägt Lmp2 jedoch zur Erhaltung der physiologischen Herzfunktion bei und begrenzt maladaptive Umbauprozesse im Herzen, sodass dieser induzierbaren Proteasomuntereinheit eine kardioprotektive Rolle zugeschrieben werden kann.

Summary

Effect of Endogenous Proteasome Regulation on Cardiac Function and Remodelling in a Murine Hypertrophy Model

The cardiovascular system is essential for maintaining proper organ function and viability. Modulation of cardiac function in response to a transient or chronic change in haemodynamic load initiates adaptive or maladaptive cardiac remodelling. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is a major regulator of cellular proteostasis. Depending on its extent, manipulation of UPS function can ameliorate or exacerbate cardiac remodelling processes. The impact of the facultative proteasome subunit *low molecular mass peptide 2* (Lmp2) on cardiac remodelling is so far poorly understood.

Therefore it was the aim of this study to comprehensively determine the impact of cardiac Lmp2 on cardiac remodelling in mice.

Unchallenged mice congenitally lacking Lmp2 did not develop an obvious cardiac phenotype. Additionally, their chronotropic, inotropic and lusitropic response to continuous β -adrenergic stimulation for four days was indistinguishable from that of wild type littermates. After a total of seven days stimulation with isoproterenol, though, left-ventricular fractional shortening and active diastolic filling were markedly impaired compared to that found in wild type animals. Decline of cardiac function was accompanied by an augmented gain in heart weight to body weight ratio, cardiomyocyte cross-sectional area and left-ventricular posterior wall thickness as well as by an increased interstitial collagen content and reduced induction of 26S proteasomal activities. Cardiotropic transfer of the Lmp2 gene prevented loss of systolic cardiac function and restricted hypertrophy to level observed in wild type mice. With a proteomic approach utilising two-dimensional differential gel electrophoresis, in Lmp2 knock-out mice 36 proteins differentially regulated by isoproterenol treatment were detected, 27 of which were regulated inversely compared to wild type animals treated in parallel.

In conclusion, Lmp2 seems to be non-essential for myocardial development and cardiac function at baseline. In contrast, following hypertrophic stimulation, Lmp2 contributes to maintaining physiological cardiac function and restricts maladaptive remodelling. Hence, a cardioprotective role can be assigned to this inducible subunit of the proteasome.

1 Einleitung

1.1 Einführung in das kardiovaskuläre System

Die Aufgabe des Herzkreislaufsystems besteht in der Versorgung des Organismus durch den Transport von Atemgasen, Nährstoffen, Neurotransmittern, Hormonen und Bestandteilen des Immunsystems sowie in der Regulation der Körpertemperatur und des Blut-pH-Wertes. Das Transportmedium Blut erreicht seine Zielstrukturen durch das Gefäßsystem des Körpers. Das Herz ist eine autonome, muskuläre Pumpe und fördert so den Blutfluss durch arterielle Gefäße in die Peripherie und zurück durch venöse Gefäße. Anatomisch betrachtet, handelt es sich beim Herzen um ein Hohlorgan, welches aus vier Kammern aufgebaut ist: linker Vorhof (Atrium) und linke Kammer (Ventrikel) sowie rechtes Atrium und rechter Ventrikel.^{1, 2} Die Anordnung der vier Kammern, zu- und ableitender Blutgefäße sowie der Blutfluss sind in Abbildung 1 dargestellt.

Vor der Systole kontrahiert die kardiale Muskulatur und erzeugt so intraventrikulären Druck ohne das ventrikuläre Füllvolumen zu verändern (isovolumetrische Kontraktion). Übersteigt der intraventrikuläre Druck den Druck in der Ausflussbahn distal der Aortenklappe (entsprechend dem totalen peripheren Widerstand), öffnet sich diese und die Auswurfphase beginnt. Sobald die ventrikuläre Kontraktion beendet ist und sich die Aortenklappe schließt, relaxiert die Ventrikelmuskulatur (isovolumetrische Relaxation). Da nun der atriale Druck den ventrikulären übersteigt, öffnet sich die Mitralklappe und Blut strömt aus dem linken Vorhof in den linken Ventrikel (passive Ventrikelfüllung). Sobald im Atrium und Ventrikel gleiche Drücke herrschen, bewirkt die aktive atriale Kontraktion den restlichen Bluteinstrom (ca. 30%) in den Ventrikel (aktive Ventrikelfüllung). Die Kontraktion der Herzmuskelzellen beruht auf einer elektromechanischen Aktivierung, wobei die autorhythmische Aktivierung von Schrittmacherzellen eine elektrische Potenzialänderung in den Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards in den Vorhöfen und in den Ventrikeln auslöst. Zu den Erregungszentren zählen in absteigender Hierarchie der Sinusknoten, der Atrioventrikular (AV)-Knoten und das His-Bündel.^{1, 2}

Das Herzkreislaufsystem ist dynamisch reguliert, um kurzzeitigen und langfristigen Anforderungen gerecht zu werden. So kann aufgrund sympathischer Innervierung durch β -adrenerge Stimulation die Herzfrequenz (Chronotropie), die Pumpkraft (Inotropie), die Erregungsweiterleitung (Dromotropie) und die Relaxationsgeschwindigkeit

(Lusitropie) gesteigert werden. Langfristig kann eine gesteigerte Herzarbeit wie Muskeltraining zu einer Adaption in Form von Muskelwachstum (Hypertrophie) führen. Auf der anderen Seite kann eine dauerhafte mechanische Überlastung, zum Beispiel durch Bluthochdruck oder Tachykardie, auch maladaptive hypertrophe Anpassungsreaktionen hervorrufen.^{1, 2}

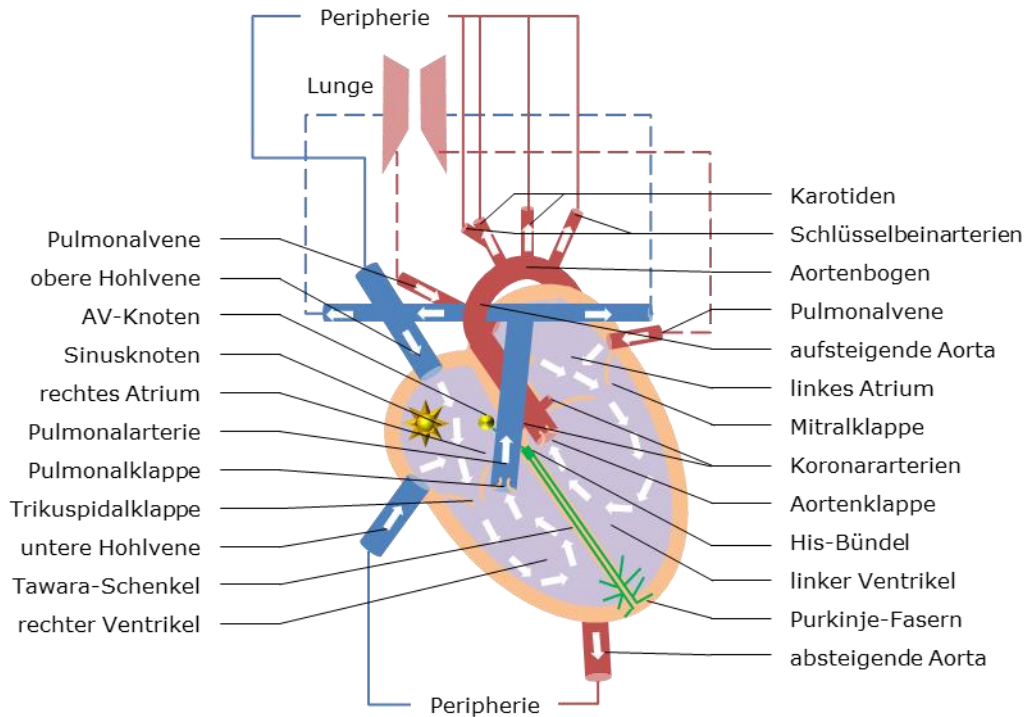


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Herzanatomie und Erregungszentren. Weiße Pfeile stellen die Richtung des Blutflusses dar. Rote Gefäße und Linien stellen sauerstoffreiches, blaue sauerstoffarmes Blut dar. Die Klappen verhindern durch ihre Segelstruktur einen Rückfluss des Blutes in vorangegangene Strukturen. Gestrichelte Linien skizzieren den „kleinen“, durchgezogene den „großen“ Kreislauf. Die Versorgung der Herzmuskulatur mit Blut erfolgt vorwiegend in der Diastole über die Koronararterien. Zusammengefasst nach *Schmidt & Lang: Physiologie des Menschen*¹ und *Bonow et al.: Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*.²

1.2 Regulation und Entwicklung der kardialen Hypertrophie

Maladaptives kardiales Remodelling ist mit der Entwicklung von Herzerkrankungen assoziiert. Kardiale Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. In Deutschland ist Herzinsuffizienz aktuell die häufigste Einzeldiagnose vollstationärer Patienten und die Erkrankungshäufigkeit (Morbiditätsziffer) hat sich in den letzten 20 Jahren verdoppelt.³ In den USA droht bis 2030 ein Anstieg der Prävalenz um mehr als 30%, wobei sich die Kosten für das Gesundheitswesen mehr als verdoppeln werden.⁴ Die Abgrenzung von Adaption und Maladaption des Herzens wird kontrovers diskutiert. Eine Abgrenzungsmöglichkeit beruht auf der Fähigkeit der inversen Remodellie-

rung, wie zum Beispiel das Athletenherz nach Beendigung der Ausdauersportkarriere oder das hypertrophe Herz nach Schwangerschaft wieder die ursprüngliche Größe annehmen kann,⁵ das pathologische vergrößerte Herz dazu aber nur begrenzt in der Lage ist.⁶ Diese Differenzierungsmöglichkeit ist allerdings limitiert, da z.B. bei Athleten durch Remodelling verstärkt Arrhythmien auftreten und den plötzlichen Herztod auslösen können.⁷

Wie auch der quergestreifte Skelettmuskel unterliegt der Herzmuskel Anpassungsreaktionen. Vermehrter Sauerstoffbedarf durch muskuläre Arbeit z.B. erfordert vermehrten Blutfluss, wofür β -adrenerg Chronotropie und Inotropie positiv reguliert werden.⁸ Chronisch erhöhte Inotropie stimuliert hypertrophes Muskelwachstum.⁸ Gleichmäßiges Wachstum der Kardiomyozyten in Länge und Querschnitt wird als physiologisch angesehen (z.B. Athletenherz oder Schwangerschaft).⁹ Stärkere Zunahme des Kardiomyozytenquerschnitts im Vergleich zur Länge bzw. der Wanddicke im Verhältnis zum Durchmesser wird als konzentrische Hypertrophie bezeichnet,^{9, 10} stärkere Zunahme der Länge bzw. des Durchmessers hingegen als exzentrische Hypertrophie;^{9, 10} beide Hypertrophieformen gelten als pathologisch (Abbildung 2).

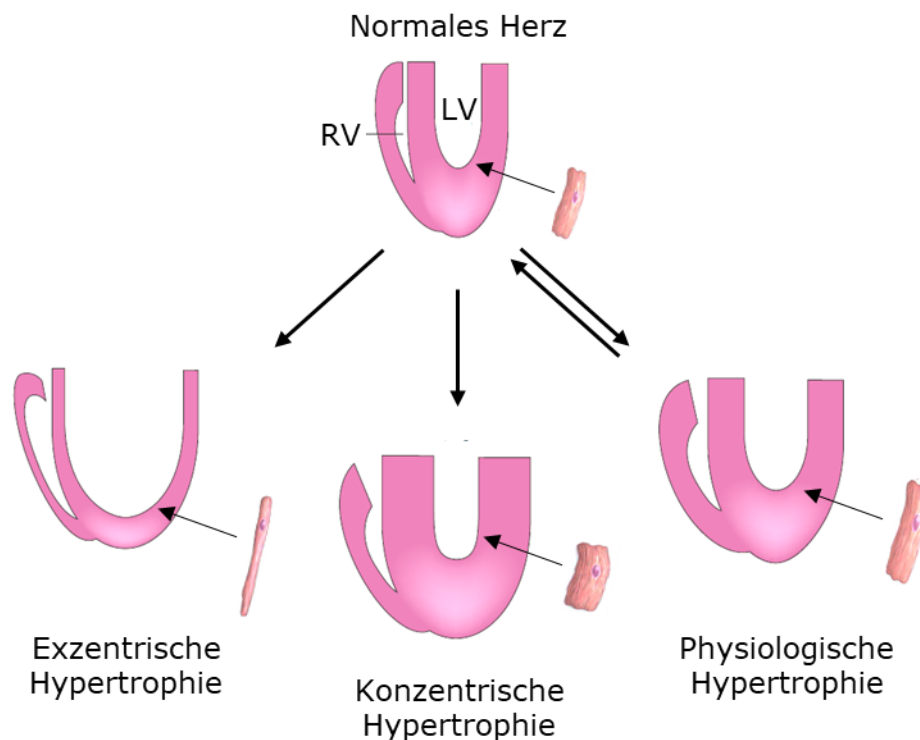


Abbildung 2: Schematische Darstellung kardialer Hypertrophie. Hypertrophie wird über Ventrikelwachstum und Kardiomyozytenwachstum definiert; LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel. Adaptiert nach Hunter & Chien⁹ und Heineke & Molkenin.¹¹

Kardiale Kontraktion wird u.a. durch kardiale β -Adrenorezeptoren gesteuert. Natürliche Agonisten an diesen Rezeptoren sind Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin, aber auch synthetische Moleküle wie Isoprenalin. Aktivierung von β_1 -Rezeptoren stimuliert über G_{α_s} -Proteine Adenylylcyclasen, welche über cAMP-Bildung Protein Kinase A aktivieren. Diese steuert Calcium-abhängige Kontraktion und Relaxation, sarkomere Aktivität und die Aktivierung von Schrittmacherzellen. Insgesamt werden dadurch Inotropie, Lusitropie, Dromotropie und Chronotropie gesteuert.^{9, 12, 13} Insbesondere erhöhter Calcium-Einstrom initiiert allerdings auch die Aktivierung von Proteinen, die mit prohypertropher Signalvermittlung assoziiert sind, wie z.B. die Phosphatase Calcineurin.^{11, 14, 15}

1.3 Tiermodelle kardialer Hypertrophie und Insuffizienz

Murine Modelle sind in der Erforschung der Pathomechanismen kardialer Erkrankungen weit verbreitet. Als hypertrophes Modell hat sich die kontinuierliche Applikation von Isoprenalin etabliert.^{16, 17} Nach initialer Steigerung von Chronotropie und Inotropie werden chronisch hypertrophe Umbauprozesse ausgelöst. Abhängig von der Dosis und Dauer kann hier Hypertrophie mit erhöhter systolischer Funktion oder Herzinsuffizienz, Fibrose und erhöhte Sterblichkeit ausgelöst werden.¹⁷⁻¹⁹ Weitere gut etablierte Modelle, die im Rahmen dieser Arbeit relevant sind, werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Ischämie/Reperfusion (I/R) wird verwendet, um eine infarktartige Verletzung durch kurzzeitige Unterbrechung der linksventrikulären Durchblutung/Sauerstoffversorgung (Ischämie) mittels einer Koronararterie, gefolgt von einer Wiederherstellung der Durchblutung (Reperfusion), zu erzeugen.²⁰ Präkonditionierung durch eine oder mehrere kurze Episoden von I/R kann in diesem Zusammenhang Kardioprotektion ermöglichen.²¹ Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine Sammelbezeichnung kardialer Muskeldefekte. Eine Form vererbter HCM wird durch homozygote Punktmutation (G→A) auf dem letzten Nukleotid des Exon 6 auf dem Gen, welches kardiales Myosin-bindendes Protein C3 kodiert (cMyBP-C3), erzeugt.²² Tiere mit defektem cMyBP entwickeln von Geburt an kardiale Hypertrophie und sind bereits nach drei Monaten herzinsuffizient.^{22, 23} Bei transverser Aortenkonstriktion (TAC) wird durch Verengung der Aorta am Aortenbogen eine Aortenstenose erzeugt,²⁴ welche erhöhte Nachlast und kardiale Umbauprozesse provoziert. Erhöhter Bluthochdruck kann pharmakologisch durch Applikation von Angiotensin II erzeugt werden.²⁵ Neben der peripheren Vasokonstrikti-

on wirkt Angiotensin u.a. durch kardiale AT₁-Rezeptoren an Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten auch direkt prohypertroph und profibrotisch.^{25, 26}

1.4 Echokardiographie in der Diagnostik kardialer Dysfunktion

Als Goldstandard zur Analyse kardialer Funktion in klinischer und tierexperimenteller Praxis, insbesondere in murinen Modellen, hat sich die Echokardiographie als nicht-invasive Methode etabliert.²⁷⁻²⁹ Als wichtigste Indikatoren systolischer Funktion werden die Verkürzungsfraction (prozentuale Verkürzung des Ventrikeldurchmessers von Enddiastole zu Endsystole) und Auswurffraction (Prozentsatz des endsystolisch ausgeworfenen Volumens zum enddiastolischen Volumen) angesehen.³⁰ Neben Schlagvolumen und Herzminutenvolumen dient auch die circumferentielle Faserverkürzungsgeschwindigkeit als weitere Messgröße systolischer Funktion.^{29, 31} Letztere ist weniger von der Vorlast (kurzzeitig stärkere enddiastolische Füllung, welche größeren ventrikulären Druck erzeugt) abhängig.³¹ Die systolische Funktion kann zweidimensional im B-Modus (*bright mode*) oder eindimensional im M-Modus (*motion mode*), welcher einen beliebigen Querschnitt im B-Modus zeitlich auflöst, analysiert werden.^{29, 30} Auch ventrikuläre Dimensionen wie Wanddicken und oder Durchmesser können so bestimmt werden.³⁰ Zwar sind kardiale Strukturen durch deren Bewegung in zweidimensionalen B-Modus-Aufnahmen besser qualitativ erkennbar, M-Modus-Aufnahmen erlauben aber durch die zeitliche Auflösung ein besseres Erfassen und reproduzierbareres Auswerten mehrerer Zyklen simultan. Die verlässlichsten Ergebnisse werden daher durch parallele Auswertung in B- und M-Modus erzielt, wobei der B-Modus hauptsächlich zur Identifikation von Strukturen und der internen Kontrolle dient.

Diastolische Funktion wird mit Doppler-Techniken gemessen. Hauptsächlich findet hierbei der *Pulsed Wave* (PW)-Doppler, mit welchem die Flussgeschwindigkeit des ventrikulären Einstroms gemessen wird, Verwendung.³⁰ Technische Weiterentwicklungen der letzten Dekade ermöglichen ergänzend durch die Verwendung des Gewebe-Dopplers, mit welchem die Bewegungsgeschwindigkeit in Relaxation und auch Kontraktion gemessen wird, ein umfassenderes Bild.³⁰⁻³² Letzterer ist neben seiner Neuheit aber insbesondere aufgrund der Schwierigkeit der Standardisierung und Reproduzierbarkeit in der Maus noch kaum etabliert.^{31, 33} Gemessene Parameter sind die maximalen ventrikulären Einstromgeschwindigkeiten des Blutflusses bzw. Geschwindigkeiten der Geweberelaxation am Mitralklappenannulus in der passiven Füllphase (E-Welle bzw. E'-Welle) sowie während der aktiven Füllphase (A-Welle bzw. A'-Welle).

Während die vorgestellten Parameter die gesamte Ventrikelfunktion wiedergeben, ist in der klinischen Praxis das Interesse an der Bestimmung der regionalen Ventrikelfunktion gewachsen. Durch die Messung der Verformung des Endokards (*strain*) kann hier die individuelle Funktion einzelner ventrikulärer Bereiche bestimmt werden, welches beispielsweise in der Infarkt-Diagnostik eine Rolle spielt. Allerdings ist so auch die Möglichkeit gegeben, globale systolische Funktion besser beurteilen zu können, da der Strain sich dreidimensional differenziell messen lässt (radial zentral nach innen zum Ventrikel hin, circumferentiell in der Kurzachse um den Ventrikel bzw. longitudinal in der Längsachse um den Ventrikel) und so der gegenläufigen Struktur der kardialen Muskelstränge gerecht wird.³⁴ Die Besonderheit der Strain-Analyse liegt darin, dass sie als *post processing*-Analyse nicht als eigene Aufnahme erstellt wird, sondern offline mithilfe der erfolgten Aufnahmen berechnet wird. Eine Möglichkeit dies zu erschließen bietet der Gewebedoppler, indem die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten distinkter Punkte einzeln gemessen und zusammengeführt werden.³⁵⁻³⁷ Technische Entwicklungen der letzten Jahre ermöglichen es, den Strain aus B-Modus-Aufnahmen zu analysieren, indem diese in *Speckle Tracking*-Aufnahmen transformiert werden.^{30, 38, 39} Hierbei wird die zu analysierende Muskelschicht (i.d.R. Endokard) in unabhängige Bildpunkte zerlegt und deren Bewegung gemessen. Als Bezugspunkt dient bei radialen Messungen das Epikard. Bei longitudinalen und circumferentiellen Strain-Analysen wird der Abstand zweier endokardialer Bildpunkte betrachtet, da sich dieser Strain in der entsprechenden Bewegungsrichtung verändert. Als Bezugspunkt wird der enddiastolische Abstand betrachtet; der Strain berechnet sich als Prozentsatz der Vergrößerung des Abstands bis zur Endsystole und ist daher radial positiv, longitudinal und circumferentiell hingegen negativ. Dies spiegelt die Verdickung des Endokards in radialer und die Verkürzung in longitudinaler und circumferentieller Richtung somit direkt wider.⁴⁰ Ergänzend zum Strain wird ebenfalls dessen Geschwindigkeit bzw. Ableitung nach der Zeit,⁴¹ Strain Rate, gemessen. Verkürzungs- und Auswurffraktion sind abhängig von Strain und Wandverdickung.^{42, 43} Strain-Analysen erlauben daher eine differenzielle Diagnostik, falls ein Rückgang systolischer Funktion durch gleichzeitig eintretende Wandverdickung scheinbar kompensiert wird. So konnte im Bluthochdruckmodell der Ratte durch Rückgang des longitudinalen Strains, welcher dort aufgrund der Herzgröße wesentlich stärker ausgeprägt ist als in der Maus,⁴⁴ Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurffraktion lange vor der Dekompensation detektiert werden.^{45, 46} Darüber hinaus korrelierte der longitudinale Strain signifikant mit der Entwicklung endokardia-

ler Fibrose und Versteifung des Ventrikels.⁴⁶ In murinen Modellen sind Strain-Analysen kaum verbreitet, bieten sich aufgrund der diagnostischen Möglichkeiten jedoch als Ergänzung zu Standard-Analysen an.

1.5 Differenzielle Analysen des zellulären Proteoms

Während sich der Western Blot als Standardmethode zum Nachweis einzelner Proteine und deren Regulation etabliert hat, ist es mit dieser Methode schwer möglich, Anhaltspunkte zur differenziellen Regulation mehrerer Proteine im zellulären Zusammenhang zu gewinnen. Als Werkzeug zur differenziellen Proteomanalyse bietet sich die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) an,⁴⁷ da diese zahlreiche Proteine auflöst, ohne dass danach eine spezifische Detektion nur einzelner Proteine z.B. per Antikörper erfolgen muss. Bei 2-DE werden denaturierte Proteine zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung, *IEF*) und im Anschluss nach Molekulargewicht mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt.

Eine Möglichkeit quantitative Vergleiche zu erzielen, bietet die differenzielle Gelelektrophorese (DIGE). Die Detektion der Proben erfolgt durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (CyDyesTM). Die Verwendung von drei verschiedenen Farbstoffen (Cy2, Cy3, Cy5) ermöglicht die Auftrennung von bis zu drei Proben pro IEF-Streifen/Gel. Eine spezielle Anwendung, die den statistischen Quervergleich mehrerer Gele ermöglicht, ist es, eine Mischung aller Proben des experimentellen Ansatzes als Referenz (*internal pooled standard*, IPS) einzusetzen und auf jedem Streifen/Gel mit zwei Proben laufen zu lassen.

Mittels 2-DE konnten schon frühzeitig kardiale Proteine identifiziert und kartiert werden.^{48, 49} Speziellere Analysen erfassten posttranskriptionale Modifikationen wie S-Nitrosylierung bei I/R oder Proteinphosphorylierung bei Bluthochdruck.^{50, 51} Per 2-D-DIGE und MALDI/TOF²-Massenpektrometrie wurden einige bei Myokardinfarkt und kardialer Hypertrophie differenziell regulierte Proteine identifiziert, speziell des Stoffwechsels (Glykolyse/Citratzyklus) und kontraktiler Strukturen (z.B. Myosin, leichte Kette, α -Aktin, Troponin T u.a.), welche Hinweise auf die unterschiedliche Maladaptation des Herzmuskels bei verschiedenen Stresstimuli liefern.⁵² In einer anderen Studie konnten bei verschiedenen Stadien TAC-induzierter Hypertrophie (Hypertrophie mit geringerem Funktionsverlust sowie schwerere Hypertrophie mit massivem Funktionsverlust und Lungenödem) differenziell regulierte Proteine identifiziert werden.⁵³ 2-D-DIGE ist somit ein vielversprechendes Werkzeug, um Hinweise auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede

von Pathomechanismen, die zu verschiedenen klinischen Bildern führen, im proteinbiochemischen Zusammenhang zu erhalten.

1.6 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) als zelluläre Kontrollinstanz

Das UPS trägt durch Verdau von Proteinen zu einem Gleichgewicht von Proteinaufbau und -abbau (Proteinhomöostase) bei und ist daher essentiell für zelluläre Struktur und Funktion.⁵⁴ Proteasomen sind Threoninproteasen.⁵⁵ Strukturell und funktionell lässt sich zwischen proteolytisch aktiven 20S- und 26S-Proteasomen unterscheiden (s.u.). 20S-Proteasomen konnten mit dem Abbau oxidierter und nicht mehr gefalteter Proteine in Verbindung gebracht werden.^{56, 57} Komplexere, gefaltete Proteine können nach Polyubiquitinylierung von 26S-Proteasomen abgebaut werden.^{54, 57} Polyubiquitinylierung durch Vernetzung von mindestens vier Ubiquitinmolekülen über das ϵ -Amin am Lys₄₈ in der Ubiquitinsequenz (Lys₄₈-Polyubiquitinylierung) ist ein zelluläres Signal für den Abbau über das 26S-Proteasom.^{54, 58, 59}

Ubiquitinylierung von Proteinen wird von spezifischen Enzymen vollzogen. E1-Enzyme aktivieren Ubiquitin durch ATP-abhängige Erzeugung eines Thioesters an der Carboxylgruppe des terminalen Gly, wonach dieses auf das aktive Zentrum (Cys) eines konjugierenden E2-Enzyms übertragen wird. E3-Ligasen katalysieren letztendlich die Bindung der aktivierten Carboxylgruppe an ein Lys- ϵ -Amin im Zielprotein.^{54, 55, 58}

26S-Proteasomen bestehen aus einem 20S-Proteasom mit proteolytischer Aktivität und einem 19S-Proteasom, welches spezifischen Zugang zum proteolytischen Zentrum gewährt (Abbildung 3). 19S-Proteasomen bestehen aus ATP- und nicht-ATP-abhängigen Untereinheiten. ATP-abhängige (z.B. Rpt4) entfalten und translozieren Proteine, nicht-ATP-abhängige (z.B. Rpn1) sind für die Struktur und den Zusammenbau des 26S-Proteasoms verantwortlich.^{60, 61} 20S-Proteasomen sind aus vier Ringen à sieben Untereinheiten aufgebaut. Die äußeren Ringe bestehen aus α -Untereinheiten, die inneren aus β -Untereinheiten, jeweils von 1 bis 7 bezeichnet.⁶² Während α -Untereinheiten den Zugang zu den β -Untereinheiten und Bindung des 19S-Partikels gewährleisten, stellen β -Untereinheiten das aktive Zentrum dar: β 1, β 2 und β 5 sind proteolytisch aktiv und mit den verschiedenen proteasomalen Aktivitäten assoziiert (β 1: Caspase-; β 2: Trypsin-; β 5: Chymotrypsin-artig).^{57, 62, 63} Jedes 20S- oder 26S-Proteasom hat sechs aktive Zentren. Die proteolytische Aktivität liegt im α -Amin des Thr₁ der Untereinhei-

ten,^{55, 62} welches (exemplarisch) bei $\beta 5$ mit Asp₁₇ und Lys₃₃ eine katalytische Triade bildet.⁶⁴

1.7 Die Rolle induzierbarer Untereinheiten

Die proteolytisch aktiven konstitutiven Untereinheiten können gegen ihre induzierbaren, sich jeweils primär-strukturell unterscheidenden Formen ausgetauscht werden ($\beta 1i$: Lmp2, $\beta 2i$: Mecl-1, $\beta 5i$: Lmp7).⁶⁵ Dies wird vor allem mit zellulären, z.B. Interferon (besonders IFN γ)-vermittelten Stimuli assoziiert.^{66, 67} In zellbasierten Untersuchungen ist bei der IFN γ -vermittelten Induktion von Lmp2 und Lmp7 eine Erhöhung Chymotrypsin- und Trypsin-artiger Aktivitäten beobachtet worden.⁶⁸ Lmp2-Transfektion von Zellen verringerte Caspase-artige Aktivitäten, erhöhte Chymotrypsin- und

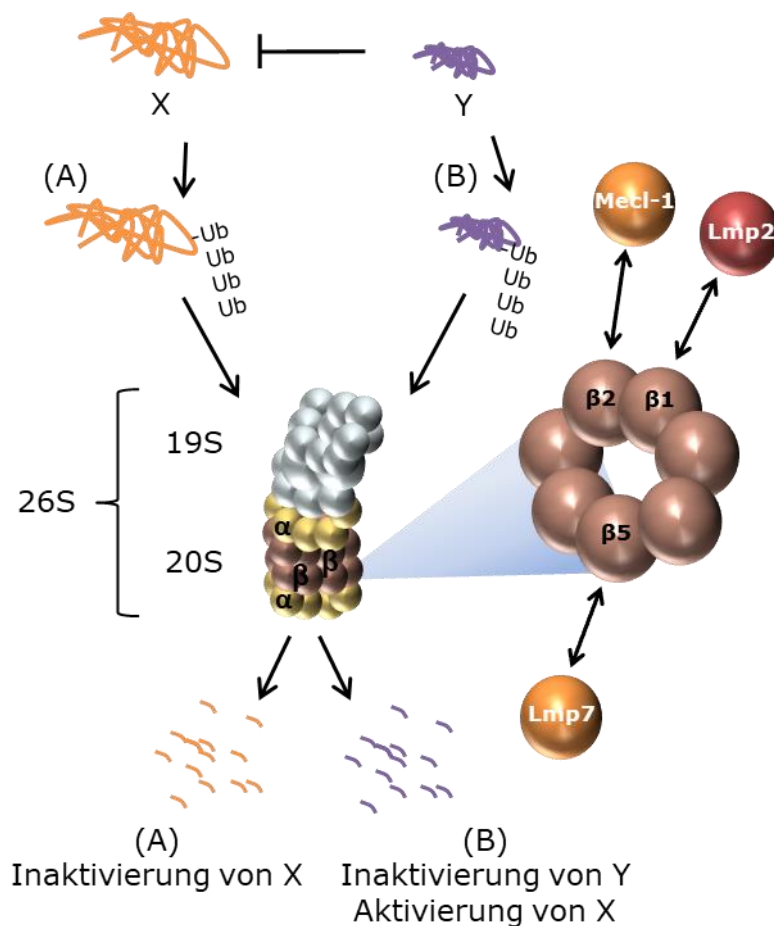


Abbildung 3: Schematische Darstellung von UPS-vermitteltem Proteinabbau und proteasomaler Heterogenität. X sei ein zelluläres Protein und Y dessen endogener Inhibitor. Ist X ein UPS-Substrat, führt Abbau zur vollständigen Inaktivierung von X (Weg A). Wird jedoch Y abgebaut, wird dadurch X proteasomal kontrolliert aktiviert (Weg B). Ein β -Ring des 20S-Proteasoms ist vergrößert projiziert und der Austausch der konstitutiven gegen induzierbare Untereinheiten dargestellt; Ub: Ubiquitinmolekül.

Trypsin-artige Aktivitäten⁶⁹ und änderte darüber hinaus die Lokalisation von Schnittstellen an gespaltenen Peptiden.^{67, 70} Lmp2 wird mit

Chymotrypsin-artiger Aktivität assoziiert,⁶⁵ da erhöhter Trypsin-artiger Umsatz in der Ko-Induktion von Mecl-1 und Lmp2 begründet liegt.⁷¹ Erste Untersuchungen in Lmp2 Knock-out-Mäusen zeigten in Milzlysaten verringerte Chymotrypsin- und Trypsin-artige Aktivitäten und erhöhte Caspase-artige Aktivitäten.⁷²

Die Induktion der induzierbaren Untereinheiten wurde daher als Teil der Immunantwort verstanden und mit der UPS-vermittelten Präsentation von Antigenen assoziiert.⁷³⁻⁷⁵ *In vivo* konnte eine von induzierbaren Untereinheiten abhängige Änderung von Peptid-Schnittstellen gezeigt werden.⁷⁶ Ob letztendlich die Modulation des proteasomalen Substratumsatzes oder der Präferenz der Peptidspaltung eine gesteigerte Antigen-Präsentation begünstigt, ist aber weiterhin kontrovers. In weiteren Untersuchungen konnte mittels Hepatitis-C-Virus-Infektion gezeigt werden, dass das Ausmaß der Induktion von Lmp2, Lmp7 und Mecl-1 vom applizierten Virustiter abhängt.⁷⁷ Mäuse mit einem Knock-out der induzierbaren Untereinheiten zeigten eine verringerte Immunreaktion nach viraler Infektion oder Impfung.^{78, 79} Auch im Herzen konnte eine Modulation der Entzündungsantwort nach Coxsackie-Virus-Infektion durch induzierbare Untereinheiten beobachtet werden.^{80, 81} Existenz und funktioneller Einbau induzierbarer Untereinheiten im Herzen unter basalen Bedingungen konnte 2007 nachgewiesen werden,⁸² was die Frage aufwirft, ob es auch nicht-inflammatorische Funktionen induzierbarer Untereinheiten gibt.

Jenseits von Modellen viraler Infektion konnte gezeigt werden, dass Lmp2 und Lmp7 neben $\text{IFN}\gamma$ auch von Stickstoffmonoxid (NO) induziert werden.⁸³ So wird der NO-abhängige Abbau einer Cytochrom P450-Familie (CYP2B) maßgeblich von Lmp2 beeinflusst.⁸⁴ Lmp2 und Lmp7 waren ebenfalls nach zellulärer Behandlung mit Wasserstoffperoxid in humanen Linsen-Epithelzellen oder Hitzeschock in Mausfibroblasten (SVB6) sowie murinen und humanen Kolon-Karzinomzellen (CT26, SW620) induziert.^{85, 86} H_2O_2 -Vorbehandlung induziert eine Protektion gegen eine spätere, stärkere H_2O_2 -Behandlung.⁸⁷ Knock-down von Lmp2 in murinen embryonalen Fibroblasten verhinderte diesen schützenden Effekt fast vollständig.⁸⁸ Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass induzierbare Untereinheiten auch zum vermehrten Abbau beschädigter Proteine bei IFN-induziertem oxidativen Stress beitragen.⁸⁹ Knock-out von Lmp2 trug darüber hinaus zu einer Akkumulation von oxidierten Proteinen bei Alterungsprozessen in Leber und Gehirn bei.⁹⁰ Zusammengefasst wurden für induzierbare Untereinheiten daher inflammatorische und zellprotektive Funktionen beobachtet.

Der Einbau induzierbarer Untereinheiten geschieht mechanistisch gesehen nicht als Austausch an sich, sondern induzierbare Untereinheiten werden bereits im Aufbau der Proteasomen anstatt der konstitutiven Form eingebaut.⁹¹ Hierbei entsteht zuerst ein α -Ring, bevor β -Untereinheiten an diesen gebunden werden, um „Halb-Proteasomen“ aus einem α - und einem β -Ring zu bilden.⁹¹ Die proteolytisch aktiven Untereinheiten sowie

$\beta 6$ und $\beta 7$ werden als Propeptide mit einem N-terminal gebundenen Peptid (im Falle von Lmp2 aus 18 Aminosäuren bestehend) eingebaut,⁹² welches notwendig ist um die Dimerisation zweier „Halb-Proteasomen“ zu ermöglichen.⁹¹ Während der Dimerisation werden N-terminale Teile der Propeptide jenseits von Thr₁ autolytisch und die Untereinheiten somit potenziell aktiviert.

1.8 Das UPS und kardiale Erkrankungen

Nachdem vor über 30 Jahren ein Zusammenhang zwischen kardialer Stimulation, Proteinsynthese und -degradation entdeckt worden war,⁹³ wurde die Rolle des UPS in der Entwicklung kardialer Erkrankungen in den letzten zwei Jahrzehnten näher untersucht (Zusammengefasst von Drews und Drews & Taegtmeier).^{94, 95} Dabei wurden zahlreiche Proteine, die mit der Entwicklung von Herzkrankheiten assoziiert sind, als UPS-Substrate identifiziert, darunter Enzyme (z.B. Calcineurin),⁹⁶ regulatorische Proteine (z.B. der NF- κ B-Inhibitor I κ B α ,⁹⁷⁻⁹⁹ modulierendes, Calcineurin-interagierendes Protein, *MCIP*,¹⁰⁰ und Troponin I)¹⁰¹ sowie Proteine des kontraktile Apparats (z.B. β -Myosin, schwere Kette).¹⁰²

Im TAC-Modell,¹⁰³ bei der genetisch bedingten HCM¹⁰⁴ sowie im Modell des Angiotensin II-¹⁰⁵ bzw. Isoprenalin-induziertem¹⁰⁶ kardialen Remodellings wurde eine Erhöhung proteasomaler 26S-Aktivitäten und ein veränderter Abbau ubiquitylierter Proteine beobachtet. In anderen Studien wurde der Einfluss von Aktivitäten-unspezifischer Proteasominhibierung auf die Entwicklung kardialer Umbauprozesse untersucht. Proteasominhibierung kann *in vivo* durch Gabe kleinmolekularer Wirkstoffe erzielt werden. Die einzelnen Untereinheiten und demzufolge Aktivitäten werden dabei unterschiedlich stark inhibiert,¹⁰⁷ welches zu einer konzentrationsabhängigen Selektivität der Inhibitoren führt. Präferenzielle Bindung von z.B. Lmp2 oder Lmp7 ist Gegenstand aktueller Forschungen.^{108, 109}

Bei fünftägiger TAC, sieben Tagen Isoprenalin- bzw. zwei Wochen Angiotensin II-Behandlung konnte durch gleichzeitige tägliche Gabe von Proteasominhibitoren kardiale Hypertrophie verringert oder sogar unterbunden und kardialer Funktionsverlust verhindert werden.^{103, 105, 110} Ebenfalls wurde im I/R-Modell durch Proteasominhibition 30 Minuten vor Ischämie-Eintritt und nach 30 Minuten Reperfusion die Infarktgröße und Verlust systolischer Funktion reduziert.¹¹¹ Bei verzögerter Gabe von Proteasominhibitoren konnte nach einer Woche Isoprenalin in der zweiten Woche durch Gabe des Inhibitors ein Fortschreiten der Pathogenese verhindert werden,¹¹⁰ in einer weiteren

Studie (3 Wochen TAC) konnte Applikation von Proteasominhibitoren ab der dritten Woche etablierte Hypertrophie sogar rückbilden.¹¹² Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnten bei einer anderen Studie im TAC-Modell bei gleichzeitiger Proteasominhibition massive Umbauprozesse bis hin zur Dilatation des Ventrikels und systolischem Funktionsverlust beobachtet werden.¹¹³ Interessanterweise führte Proteasominhibition alleine bei Sham-Behandlung bereits zu kardialem Remodelling.¹¹³ Auch in Schweinen wurden durch Proteasominhibition ohne weitere kardiale Stimulation kardi-ale Hypertrophie, diastolische Dysfunktion sowie eine tendenziell verringerte systolische Funktion und interstitielle Kollageneinlagerung beobachtet.¹¹⁴ In Mäusen, die eine proteolytisch inaktive $\beta 5$ -Variante überexprimieren, wurden verringerte kardiale Funktion nach I/R,¹¹⁵ keine Reduktion der Hypertrophie bei „moderater TAC“¹¹⁶, dafür geringere kardiale Funktion als in Kontrolltieren, und bei „schwerer TAC“¹¹⁶ verringerte Hypertrophie sowie kardiale Nekrose und erhöhte Sterblichkeit beobachtet.¹¹⁶ Der Einfluss proteasomaler Inhibition auf die Entwicklung kardialer Erkrankungen kann daher nicht verallgemeinert werden und ist abhängig von der applizierten Dosis und der spezifischen molekularen Wirkung des Inhibitors sowie der beeinflussten Untereinheiten und Aktivitäten.⁹⁴

Drews *et al.* zeigten, dass bei hypertrophem Remodelling mit erhöhter systolischer Funktion im Isoprenalinmodell konstitutive und induzierbare proteolytisch aktive Untereinheiten differenziell verstärkt exprimiert werden,¹⁰⁶ welches die distinkte Untersuchung einzelner Untereinheiten nahelegte. Lmp2 und Lmp7 waren bei Isoprenalinbehandlung vermehrt exprimiert und verstärkt in proteasomale Komplexe inkorporiert.¹⁰⁶ Lmp2 war bereits 30 Minuten nach Isoprenalinbehandlung verstärkt exprimiert.¹⁰⁶ Die Induktion von Lmp2 ist daher eine frühe Regulation bei kardialem Remodelling, welche im Verlauf aufrechterhalten wird.

Die Rolle von Lmp2 in weiteren Modellen kardialer Umbauprozesse ist kaum untersucht worden, jedoch scheint Lmp2 eine kritische Funktion nach der Induktion von kardialem Remodelling zu haben. Ob diese Funktion in Verbindung mit einer Immun- bzw. inflammatorischen Antwort oder einem zellprotektiven Effekt besteht, ist soweit unbekannt. Dies wurde bislang nur im akuten I/R-Modell mit ischämischer Präkonditionierung genauer untersucht. Der protektive Effekt ischämischer Präkonditionierung ist proteasomabhängig.¹¹⁷ In C57Bl/6J-Mäusen mit Knock-out von Lmp2⁷² konnte durch präkonditionierende I/R (10 min/5 min) vor I/R (30 min/120 min) im Gegensatz zu Wildtypmäusen kein kardioprotektiver Effekt erzielt werden.¹¹⁸ Um den Ein-

fluss von Lmp2 bei chronischem kardialen Remodelling zu untersuchen, behandelten wir Lmp2 Knock-out-Mäuse im Isoprenalinmodell. Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass (1) Verlust von Lmp2 in C57Bl/6J-Mäusen eine stärkere kardiale Hypertrophie nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung auslöst als in vorherigen Untersuchungen in Wildtypmäusen,¹¹⁹ dass (2) die systolische Funktion nach sieben Tagen geringer ausgeprägt ist als in Wildtypmäusen¹²⁰ und dass (3) kardiotope Rekonstitution von Lmp2 nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung zu einer verringerten Herzhypertrophie und verbesserter Herzfunktion als in Kontroll-Gentransfer-behandelten Tieren führt.¹²¹

1.9 Ziele dieser Arbeit

Bisher ist ein Quervergleich unserer Analysen bei kardialem Remodelling für eine umfassende Beurteilung des Einflusses von Lmp2-abhängiger proteasomaler Heterogenität auf kardiale Umbauprozesse nicht möglich. Daher war die erstmalige, vergleichende Parallelbehandlung von Lmp2 Knock-out-Tieren, Wildtyp-Wurfgeschwistern sowie Lmp2 Knock-out-Tieren mit Lmp2- und Kontroll-Gentransfer mit entsprechenden Sham-Kontrollgruppen ein Ziel dieser Arbeit. Die physiologische, proteinbiochemische und histologische Analyse sollte unsere bisherigen Ergebnisse absichern und erweitern. Bei den bisherigen echokardiographischen Untersuchungen wurde die basale Herzfunktion vor Hypertrophieinduktion sowie zum Versuchsende untersucht; daher ist soweit unklar, ob Verlust von Lmp2 unter Umständen einen untypischen Isoprenalin-induzierten Reiz erzeugt und ob die Herzfunktion überhaupt zumindest initial ansteigt. Bisherige Untersuchungen unserer Gruppe legten zudem in begrenztem Stichprobenumfang ein Auftreten leichter, interstitieller Fibrose bei Isoprenalinbehandlung und Verlust von Lmp2 nahe,¹²¹ welches noch nicht statistisch valide bestätigt wurde. Neben der Erweiterung dieser bisherigen Ergebnisse war es eine Zielsetzung, den Verlauf der Pathogenese in Abhängigkeit von Lmp2 proteinbiochemisch und histologisch zu charakterisieren.

Daher wurden folgende spezifischen Ziele in dieser Arbeit verfolgt:

1. Basale vergleichende kardiale Phänotypisierung von Lmp2 Knock-out-Mäusen ohne Gentransfer sowie mit Lmp2- bzw.- Luciferase-Kontrolltransfer und Wildtyp-Wurfgeschwistern.

2. Untersuchung des transienten (viertägigen) Einflusses von kontinuierlicher β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin in Abhängigkeit von Knock-out und kardiotroper Re-Expression von Lmp2 auf die Herzfunktion.
3. Vergleich von kardialem Remodelling nach sieben Tagen kontinuierlicher Isoprenalinbehandlung in Abhängigkeit von Knock-out und kardiotroper Re-Expression auf biometrischer, zellulärer und molekularer Ebene.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalien für Laborarbeiten und Pufferlösungen wurden generell zur Analyse oder reiner über das Chemikalienlager des Zentralbereichs im Neuenheimer Feld von Appli-Chem (Darmstadt), Biorad (Dreieich), Roth (Karlsruhe), Merck Millipore (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), oder Thermo Fisher (Dreieich, Langenselbold) oder direkt bei diesen Firmen bezogen. Chemikalien, welche sich nicht ohne Änderung der Methode austauschen lassen, sind im Folgenden aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Katalog-Nr.
2-D Clean-Up Kit	GE Healthcare, Freiburg	80-6484-51
5× Phusion™ HF-Puffer	Thermo Fisher	F-530L
Acrylamid-Lösung 40% w/v (29:1)	Serva, Heidelberg	10680
Acrylamid-Lösung 40% w/v (37,5:1)	Serva, Heidelberg	10681
Boc-LSTR-AMC	Bachem, Bubendorf, CH	I-1940
Bortezomib	LC Laboratories, Woburn, USA	B-1408
Complete® EDTA-frei	Roche, Mannheim	04 693 132 001
DC Protein Assay Kit	Biorad	500-0112
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
Epoxomicin	Boston Biochem, Cambridge, USA	I-110
GE Amersham ECL Prime	VWR, Bruchsal	RPN2236
Isofluran	Baxter, Unterschleiß- heim	HDG9623
Isoprenalin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	I5627
Mowiol 4-88	Merck Millipore	475904
Pharmalyte™ pH 3-10	GE Healthcare, Freiburg	17045601
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II	Sigma-Aldrich	P5726
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail III	Sigma-Aldrich	P0044
Phusion™ High-Fidelity Polymerase	Thermo Fisher	F-530L
Precision Plus STD Dual Color	Biorad	161-0374

Material

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Katalog-Nr.
Proteinase K	Sigma-Aldrich	P4850
Quick Start Bovine Serum Albumin Standard	Biorad	5000206
Richard-Allen-Scientific TM NEG TM -50	Thermo Fisher	6502AP
Suc-LLVY-AMC	Bachem, Bubendorf, CH	I-1395
Z-LLE-AMC	Calbiochem (Millipore), Schwalbach	53914
Z-Pro-Nle-Asp-H	Enzo, Lörrach	BML-ZW9490

2.2 Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Katalog-Nr.
BioTrace TM Nitrocellulose Transfermembranen	VWR, Bruchsal	732-3031
Immobiline DryStrip pH 3-10 L, 18 cm IEF-Gelstreifen	GE Healthcare, Freiburg	17-1234-01
Mikro-osmotische Pumpen	Durect Corporation, Cupertino/CA, USA	ALZET® Modell 1002
Plastikwaren für Laborarbeit	Sarstedt, Nürnbrecht	diverse
Polyamid 6 Prime OP-Fäden	Ethicon, Norderstedt	ET7800H
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Fisher	J1800AMNZ
Thermo Scientific Microfluor 2 Black Fluoreszenzplatten	Neolab Migge, Heidelberg	7805
Thermo Scientific Polycarbonat Ultrazentrifugenröhrchen	Beranek Laborgeräte, Weinheim	343778

2.3 Geräte und Werkzeuge

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Modell
Chemolumineszenz-Kamera	GE Healthcare, Freiburg	LAS Mini 4000
Echokardiographie-Schallkopf	VisualSonics, Toronto/ON, CAN	MicroScan TM MS-550D
Echokardiographie-System	VisualSonics, Toronto/ON, CAN	VEVO® 2100 Imaging System

Material

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Modell
Fluoreszenz-Scanner	GE Healthcare, Freiburg	Typhoon FLA 9500
Fluorometer	Thermo Fisher	FluoroSkan Ascent
Isofluranpumpe	Groppler, Deggendorf	UniVet Prota
Kleintier-Enthaarer	Braun, Kronberg	GT 420
Konfokal-Mikroskop	Olympus, Hamburg	IX-81
OP-Besteck	b.i.t. Chirurgiemechnik, Bammental	—
Sauerstoffkonzentrator OxyCare EverFlo	Philips Respironics, Murrysville/PA, USA	20- EVERFLO#02
Tenbroeck Glashomogenisierer	VWR, Bruchsal	432-1276
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld	TL-100
Ultrazentrifugenrotor	Beckmann Coulter, Krefeld	TLA-100.2

2.4 Präparationen für tierexperimentelle Arbeiten

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Katalog-Nr.
Aquagel	Parker Labs, Fairfield/NJ, USA	57-05
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen	PZN: 2182442
Bupivacain-HCl (Carbostesin®)	AstraZeneca, Wedel	PZN: 1177870
Iodsalbe (Braunovidon®)	Braun, Melsungen	PZN: 3188955
ROD18A Zuchtfutter (autoklaviert)	LASvendi, Soest	D.Rod18.A07
Skintact EKG-Gel	Leonhard Lang, Innsbruck, AUT	58322
SNÄ Epil Sensitive Enthaarungscrème	Axisis, Düsseldorf	PZN: 2186115
Trinkwasser (UV-bestrahlt)	IBF	—
Ultraschallgel	Dahlhausen	PZN: 8825881

2.5 Puffer und Lösungen für tierexperimentelle Arbeiten

10× PBS	1,37 M Natriumchlorid 27 mM Kaliumchlorid 81 mM Natriummonohydrogenphosphat 15 mM Kaliumdihydrogenphosphat
PBS pH 7,4	10% 10× PBS Keine pH-Einstellung
PBS pH 4	10% 10× PBS Salzsäure ad pH 4,0 Sterilfiltration durch 0,22 µm
Isoprenalin-Stammlösung (täglich frisch)	235 mg/mL Isoprenalin-Hydrochlorid (entspr. 200 mg/mL Isoprenalin) in PBS pH 4
BDM-Lösung	30 mM 2,3-Butandionmonoxim (BDM)

2.6 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

DNA-Lysepuffer ¹²²	67 mM TRIS-HCl pH 8,8 16,7 mM Ammoniumsulfat 6,7 mM Magnesiumchlorid 1% v/v β-Mercaptoethanol 0,5% v/v Triton X-100 1 µg/µL Proteinase K
5× DNA-Ladepuffer	45 mM TRIS 36,5 mM Borsäure 1,5 mM EDTA 18,75% v/v Glycerol 0,0025% w/v Xylen Cyanol 0,0025% w/v Bromphenolblau
10× TBE-Puffer	90 mM TRIS 73 mM Boräure 3 mM EDTA

Material

Agarosegel	1,5% w/v Agarose 30 ppm v/v Ethidiumbromid in TBE-Puffer
------------	--

2.7 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Homogenisierungspuffer ¹⁰⁶	20 mM HEPES-NaOH pH 7,5 1 mM Magnesiumchlorid 150 mM Natriumchlorid 0,5 mM EDTA
---------------------------------------	--

Homogenisierungspuffer stabilisiert (täglich frisch) ¹⁰⁶	1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) 1% v/v Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II 1% v/v Phosphatase Inhibitor-Cocktail III in Homogenisierungspuffer pH 7,5
---	--

50× Protease-Inhibitor	1 Tablette Complete® 50 µM Bortezomib in 1000 µL Homogenisierungspuffer
------------------------	---

Homogenisierungspuffer + Protease Inhibitor	1× Complete® 1 µM Bortezomib in Homogenisierungspuffer stabilisiert
--	---

26S-Assay-Puffer (täglich frisch) ¹⁰⁶	1 mM DTT 50 µM ATP 2% v/v DMSO in Homogenisierungspuffer pH 7,5
---	--

Sammelgel	125 mM TRIS-HCl pH 6,8 0,1% w/v Natriumdodecylsulfat 5% v/v Glycerol 4-6% v/v Acrylamid (29:1) 0,2% v/v Ammoniumperoxodisulfat 0,2% v/v TEMED
-----------	--

Material

Trenngel	375 mM TRIS-HCl pH 8,8 0,1% w/v Natriumdodecylsulfat 5% v/v Glycerol 8-12,5% v/v Acrylamid (29:1) 0,05% v/v Ammoniumperoxodisulfat 0,05% v/v TEMED
5× Ladepuffer	310 mM TRIS-HCl pH 6,8 5% w/v Natriumdodecylsulfat 50% v/v Glycerol 5% v/v β-Mercaptoethanol 0,0025% w/v Bromphenolblau
10× Laufpuffer	240 mM TRIS-NaOH pH 8,8 2 M Glycin 1% w/v Natriumdodecylsulfat
Transferpuffer ¹²³	25 mM TRIS 192 mM Glycin 20% v/v Methanol 0,1% Natriumdodecylsulfat
10× TBS	200 mM TRIS-HCl pH 7,4 9% w/v Natriumchlorid
TBST	0,1% w/v Tween-20 in 1× TBS
Milch	5% Blotting Grade Blocker in TBST
2-D-Lysepuffer ⁸²	9 M Harnstoff 4% w/v CHAPS
TRIS-Lysepuffer ⁸²	15 mM TRIS-HCl pH 8,8 in 2-D-Lysepuffer

Material

Lysepuffer für IEF ⁸²	1% w/v Pharmalyte 3-10 1 mM DTT 1% v/v Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II 1% v/v Phosphatase Inhibitor-Cocktail III 2% v/v 50× Complete® Lösung (ohne Bortezomib) in TRIS-Lysepuffer
Äquilibrierpuffer	50 mM TRIS-HCl pH 8,8 6 M Harnstoff 25% v/v Glycerol 2% w/v Natriumdodecylsulfat
DTT-Lösung	1% w/v DTT in Äquilibrierpuffer
Iodacetamid-Lösung	2,5% w/v Iodacetamid in Äquilibrierpuffer
2-D-Gel	375 mM TRIS-HCl pH 8,8 0,1% w/v Natriumdodecylsulfat 5% v/v Glycerol 12,0% v/v Acrylamid (37,5:1) 0,05% v/v Ammoniumperoxodisulfat 0,005% v/v TEMED
2-D-Agarose-Lösung	0,5% w/v Agarose 0,0025% w/v Bromphenolblau in 2× Laufpuffer
Fixierlösung	10% v/v Essigsäure 40% v/v Ethanol
<i>Coomassie Brilliant Blue</i> - Lösung	0,1% w/v <i>Coomassie Brilliant Blue</i> R-250 10% v/v Essigsäure 45% v/v Ethanol
Entfärbelösung 1	8% v/v Essigsäure 25% v/v Ethanol
Entfärbelösung 2	8% v/v Essigsäure
<i>Sensitizer</i> -Lösung	0,02% w/v Natriumthiosulfat

Material

Silber-Lösung	0,2% w/v Silbernitrat 0,02% v/v Formaldehyd (37%)
Developer-Lösung	3% w/v Natriumcarbonat 0,05% v/v Formaldehyd (37%) 0,0005% w/v Natriumthiosulfat
Stop-Reagenz	1,5% w/v Glycin
Imprägnierlösung	10% w/v Glycerol 20% v/v Ethanol

2.8 Puffer und Lösungen für histologische Methoden

Blockierlösung	2% Ziegenserum 0,1% v/v Triton X-100 in PBS pH 7,4
Antikörperlösung	Primär- oder Sekundärantikörper in 1% Ziegenserum 0,05% v/v Triton X-100 in PBS pH 7,4
Mowiol-Lösung	100 mM TRIS 10% w/v Mowiol 4-88 25% v/v Glycerol 2,5% v/v DABCO

2.9 Mauslinie

Bezeichnung	Genetische Veränderung	Referenz
Lmp2 Knock-out	Austausch eines Teils von Intron 2 und Exon 2 des Lmp2- kodierenden Gens gegen ein Neomycinresistenzgen	72

2.10 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
Lmp2-2 (forward)	5' -CCCGTGTCCCTCCGAGATAC-3'	72
Lmp2-3 (forward)	5' -AGGGTGTCTCAGCTCCCCTGGA-3'	72

Material

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
Lmp2-4 (reverse)	5' -GGGATCCAGGACCAGGAAAG-3'	72
NeoA (reverse)	5' -CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3'	72

2.11 Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung
Hase anti-Calcineurin	Abcam, Cambridge, UK	ab3673	WB: 1:2500
Hase anti-Ca _v 1.2	Alomone, Jerusalem, ISR	ACC-003	WB: 1:1000
Hase anti-Collagen I	Abcam, Cambridge, UK	ab34710	IHC: 1:150
Hase anti-Collagen III	Abcam, Cambridge, UK	ab7778	IHC: 1:300
Hase anti-Desmin	Dianova, Hamburg	DLN-13734	WB: 1:4000 IHC: 1:400
Hase anti-GAPDH	Cell Signaling, Cambridge, UK	2118	WB: 1:5000
Hase anti-Histon H3	Abcam, Cambridge, UK	ab1791	WB: 1:5000
Hase anti-Lys ₄₈ - polyubiquitinlierte Proteine	Merck Millipore	05-1307	WB: 1:2500 IHC: 1:500
Hase anti-MCIP1	Abcam, Cambridge, UK	ab140131	WB: 1:10000
Hase anti-pNFATc1 (Ser294)	Thermo Fisher	PA5-38301	WB: 1:2000
Hase anti- <i>Renilla</i> Luciferase	Abcam, Cambridge, UK	ab187338	WB: 1:1667
Hase anti-Rpn1	Abcam, Cambridge, UK	ab140675	WB: 1:2500
Maus anti-GAPDH	Merck Millipore	MAB374	WB: 1:2500
Maus anti-Lmp2	Enzo, Lörrach	PW8840	WB: 1:800
Maus anti-Rpt4	Enzo, Lörrach	PW8830	WB: 1:2500
Maus anti-Troponin I	Abcam, Cambridge, UK	ab19615	IHC: 1:400
Maus anti- α 7	Enzo, Lörrach	PW8110	WB: 1:2500
Maus anti- α -Actinin	Sigma-Aldrich	A7811	WB: 1:2000 IHC: 1:1500
Maus anti- β 1	Abcam, Cambridge, UK	ab58081	WB: 1:1667
Maus anti- β -MHC	Merck Millipore	MAB1628	WB: 1:5000

2.12 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung
Esel anti-Hase Cy5	Dianova, Hamburg	711-175-152	IHC: 1:500
Esel anti-Maus Cy3	Dianova, Hamburg	715-165-151	IHC: 1:1000
Ziege anti-Hase HRP	Abcam, Cambridge, UK	ab97051	WB: 1:20000
Ziege anti-Maus HRP	Abcam, Cambridge, UK	ab98717	WB: 1:10000

2.13 Farbstoffe

Farbstoffe wurden nach Anweisungen des Herstellers gelöst.

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung
Weizenkeim-Agglutinin (WGA), Alexa Fluor® 488-Konjugat	Thermo Fisher	W11261	IHC: 1:500 in PBS pH 7,4
Phalloidin, Alexa Fluor® 488- Konjugat	Thermo Fisher	A12379	IHC: 1:40 in PBS pH 7,4 + 1% Ziegenserum
CyDye™ Farbstoffe	GE Healthcare, Freiburg	25-8010-65	DIGE: 400 µM
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Life Technolo- gies, Darmstadt	D1306	IHC: 1:5000 in PBS pH 7,4

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Arbeiten

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden auf Grundlage der Genehmigung des Regierungspräsidiums Karlsruhe unter dem Aktenzeichen 35-9185.81 für die Projekte G-194/11, T-65/13, T-66/14 und T-70/15 durchgeführt.

3.1.1 Lmp2-Gentransfer

Um Veränderungen der Pathogenese in Lmp2 Knock-out-Mäusen myokardialem Lmp2 zuordnen zu können, wurde Lmp2 spezifisch im Myokard von Lmp2-Knock-out-Mäusen re-exprimiert. Für diesen Gentransfer wurden Adeno-assoziierte Viren des Serotyps 9 (AAV9) und ein Vektor mit Kardiomyozyten-spezifischem, rekombinantem Myosin-leichte-Ketten-Promoter verwendet. Als Kontrolle wurde ein Luciferase-Gen anstelle von Lmp2 transferiert. Die Tiere wurden randomisiert unter Verblindung des Experimentators und Planung durch Dr. Oliver Drews, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Medizinische Fakultät Heidelberg, in die Gentransfer-Gruppen eingeteilt. Das Lmp2-Insert wurde von Dr. Franziska Koser, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Medizinische Fakultät Heidelberg, generiert.¹²¹ Die Viren wurden von Dr. Andreas Jungmann und Prof. Dr. Oliver Müller, Abteilung Innere Medizin III, Universitätsklinik Heidelberg, zur Verfügung gestellt.¹²⁴⁻¹²⁶ Die Genfären wurden vier Wochen vor Hypertrophie-Induktion mit einem rechnerischen Titer von 10^{11} vg per Schwanzveneninjektion von Bianca Neu oder Ulrike Gärtner, IBF, appliziert.

3.1.2 Isoprenalin-induzierte Hypertrophie

Kardiale Hypertrophie wurde durch Isoprenalin induziert, welches für 7 Tage durch mikro-osmotische Pumpen mit einer Rate von 30 mg/kg/d subkutan freigesetzt wurde. In dieser Dosierung löst Isoprenalin kardiale Umbauprozesse mit erhöhter systolischer Funktion aus¹⁰⁶ und eignet sich daher, um durch etwaige Abnahme der systolischen Funktion schwereres Remodelling und vorzeitige Herzinsuffizienz zu diagnostizieren.¹²¹ Als Kontrolle dienten Sham-Tiere, deren Pumpe kein Isoprenalin, sondern nur Lösungsmittel (PBS pH 4) enthielt. 12-13 Wochen alte C57Bl/6J-Mäuse wurden randomisiert unter Verblindung und Planung durch O. Drews in die Behandlungsgruppen eingeteilt (Abbildung 4).

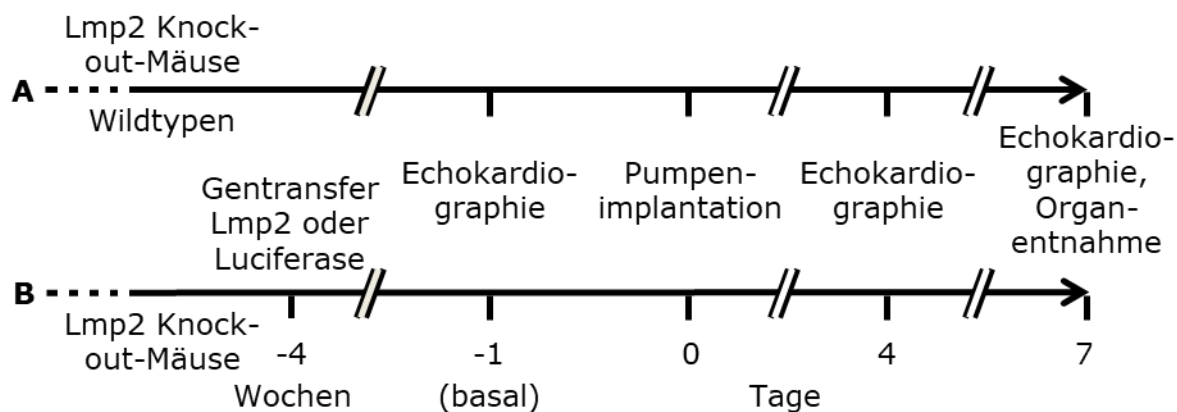


Abbildung 4: Schematische Darstellung der *in vivo*-Studie.

3.1.3 Pumpenpräparation und Operation

Die mikro-osmotischen Pumpen (ALZET® Modell 1002, Durect Corporation, Cupertino/CA, USA), wurden nach Instruktionen des Herstellers von O. Drews befüllt. Die Implantation erfolgte auf einer Wärmeplatte (37 °C) paravertebral subkutan unter Isoflurannarkose.

3.1.4 Echokardiographie

Einen Tag vor sowie am vierten und siebten Tag nach der Operation wurden kardiale Anatomie und Funktion transthorakal echokardiographisch unter Isoflurannarkose (1-3% bei 1 L/min Sauerstoff) mit Aufzeichnung von Herzfrequenz und Körpertemperatur untersucht (VEVO® 2100 System mit MicroScan™ MS-550D Schallkopf, VisualSonics, Toronto/ON, Kanada; Abbildung 5). Generell wurden drei aufeinanderfolgende Herzzyklen unter Aussparung der Atmung analysiert. Die verwendeten Aufnahmeeinstellungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zur Auswertung der Aufnahmen wurde die VEVO® 2100-Software verwendet. Tabelle 2 listet die im Rahmen der hier dargestellten Analysen angewandten Berechnungen.

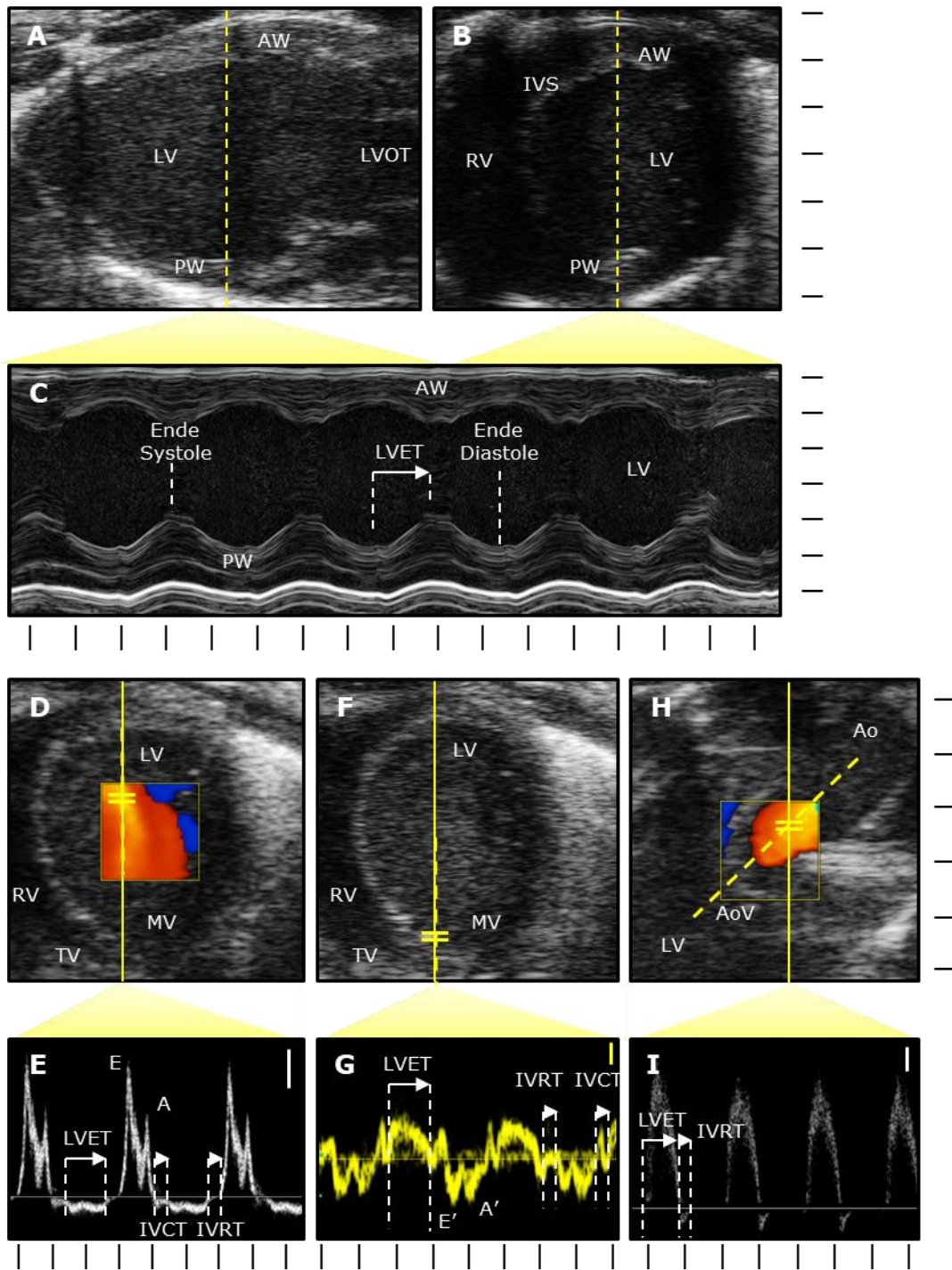


Abbildung 5: Repräsentative Aufnahmen echokardiographischer Analysen. Für die Analyse von Anatomie, Kontraktion und Strain wurden zuerst Aufnahmen im B-Modus in parasternal langer Achse (PSLAX) (A) und kurzer Achse (SAX) (B) generiert und anschließend die Herzmitte im Querschnitt im M-Modus zeitlich aufgelöst (C). Die diastolische Funktion wurde im apikalen Vierkammerblick (APIC4) analysiert. Für ventrikuläre Einstromgeschwindigkeiten wurde im Farb-Doppler der maximale Fluss geortet (D) und dieser mit *Pulsed Wave* (PW)-Doppler zeitlich aufgelöst (E). Die Geweberelaxationsgeschwindigkeit wurde am Mitralklappenannulus mit Gewebedoppler analysiert (F & G). Zuletzt wurde in der suprasternalen langen Achse (SSLAX) die Auswurfgeschwindigkeit an der Aortenklappe mit Farb- und PW Doppler aufgenommen (H & I). Die gelbe gestrichelte Linie stellt die Bildachse für zeitliche Auflösung dar. Skalen: vertikal: mm, horizontal: 50 ms, Geschwindigkeiten: weiß: 200 mm/s, gelb: 15 mm/s; Ao: Aorta, AoV: Aortenklappe, AW: Vorderwand, IVCT: isovolumetrische Kontraktionszeit, IVRT: isovolumetrische Relaxationszeit, IVS: interventrikuläres Septum, LV: linker Ventrikel, LVET: linksventrikuläre Auswurfzeit, LVOT: linksventrikulärer Ausflusstrakt, MV: Mitralklappe, RV: rechter Ventrikel, TV: Trikuspidalklappe.

Methoden

Tabelle 1: Aufnahmeeinstellungen für echokardiographische Analysen mit dem VEVO® 2100 System.

PSLAX, SSLAX	B-Modus	SAX	B-Modus
Frequenz	40 MHz	Frequenz	40 MHz
Gain	25 dB	Gain	25 dB
Bildtiefe	13,00 mm	Bildtiefe	11,00 mm
Bildbreite	12,08 mm	Bildbreite	9,08 mm
Dynamischer Bereich	60 dB	Dynamischer Bereich	60 dB
PSLAX, SAX	M-Modus	APIC4	PW-Doppler
Frequenz	40 MHz	Frequenz	32 MHz
Gain	25 dB	Doppler-Gain	29 dB
Winkel	0°	Winkel	0°
Dynamischer Bereich	60 dB	Dynamischer Bereich	35 dB
APIC4	Gewebe-Doppler	SSLAX	PW-Doppler
Frequenz	32 MHz	Frequenz	32 MHz
Doppler-Gain	25 dB	Doppler-Gain	29 dB
Winkel	0°	Winkel	30-45°
Dynamischer Bereich	30 dB	Dynamischer Bereich	35 dB

Tabelle 2: Übersicht der Berechnung funktioneller Parameter im Rahmen der durchgeführten echokardiographischen Analysen; LVID;s bzw. LVID;d: linksventrikulärer innerer Durchmesser, endsystolisch und enddiastolisch, L bzw. L₀: Distanz zweier Punkte auf dem Endokard in Systole und Diastole, IVRT: isovolumetrische Relaxationszeit, v_{AoV}: Geschwindigkeit von Aortenausfluss und -regurgitation.

Parameter	Berechnung
% Verkürzungsfraction	$100 \cdot \frac{\text{LVID;d} - \text{LVID;s}}{\text{LVID;d}}$
% Endokardialer Strain	$100 \cdot \frac{L - L_0}{L_0}$
Strain Rate	$\frac{d(\% \text{Strain})}{dt}$
Aortenregurgitation	$\left \int_{\text{Anfang IVRT}}^{\text{Ende IVRT}} v_{\text{AoV}} \cdot dt \right $

3.1.5 Euthanasie und Organentnahme

Operierte Tiere wurden nach der Echokardiographie zum primären Endpunkt der Studie unter Isoflurannarkose per zervikale Dislokation euthanasiert. Nicht operierte Kontrolltiere (z.B. für Basal-Untersuchungen) wurden ohne vorherige Untersuchung unter Isoflurannarkose per zervikale Dislokation euthanasiert. Herzen wurden entnommen, in PBS pH 7,4 gereinigt, in flüssigem Stickstoff eingefroren sowie bei -80 °C gelagert.

Ergänzend wurden Herzen randomisiert für histologische Analysen ausgewählt. Diese wurden im Querschnitt mittig geteilt. Die Herzspitze wurde daraufhin in BDM-Lösung inkubiert und anschließend mit der Schnittebene abwärts in NEGTM-50 mit Isopentan in flüssigem Stickstoff als Kühlmittel eingebettet und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Gewebe-Einbettung wurde von O. Drews oder Anita Kühner, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Medizinische Fakultät Heidelberg, durchgeführt.

3.1.6 Hypertrophe Kardiomyopathie

In Kollaboration wurden weitere Hypertrophie-Modelle analysiert. Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) wurde durch homozygote Punktmutation (G→A) auf dem letzten Nukleotid des Exon 6 auf dem Gen, welches kardiales Myosin-bindendes Protein C3 kodiert, erzeugt.²² Die Herzen dieser Tiere wurden von Dr. Saskia Schlossarek und Prof. Dr. Lucie Carrier, Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt.

3.2 Molekularbiologische Analysen

3.2.1 DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien

Schwanzbiopsien wurden im Alter von ca. drei Wochen von Mitarbeitern der IBF zur Verfügung gestellt. Die Biopsien wurden für 6-8 h in Lysepuffer inkubiert. Aus 50 µL Extrakt wurde die DNA über Nacht in 70% v/v Ethanol, 83,3 mM Natriumacetat bei -20 °C gefällt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Puffer-Zusammensetzung für DNA-Fällung.

Überstand nach Verdau	50 µL
100% Ethanol	125 µL
3 M Natriumacetat	5 µL

Das Präzipitat wurde nach 15 min Zentrifugation bei $20\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ sowie Waschen in 70% v/v Ethanol 20 min luftgetrocknet und in $50\ \mu\text{L}$ 10 mM TRIS-HCl pH 8,5 aufgenommen. Die DNA-Ausbeute wurde im Anschluss in Triplikaten UV-spektrometrisch bestimmt.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

Ca. 50-200 ng DNA wurden amplifiziert, um den Lmp2-Genotyp der Mäuse zu bestimmen. Dazu wurde folgender PCR-Mix angesetzt, um das Lmp2- bzw. das Neomycin-Resistenzgen zu detektieren:

Tabelle 4: PCR-Mix zur Feststellung des Lmp2-Genotyps.

	Volumen	Endkonzentration
Wasser	14,2 μL	—
5 \times Phusion TM HF-Puffer	4,0 μL	1,5 mM MgCl ₂
dNTP-Stammlösung 10 mM	0,2 μL	100 μM
Forward Primer 10 μM	0,2 μL	100 nM
Reverse Primer 10 μM	0,2 μL	100 nM
Phusion TM Polymerase 2 U/ μL	0,2 μL	0,02 U/ μL
DNA-Lösung	1,0 μL	~2,5-10,0 ng/ μL
Reaktionsvolumen	20,0 μL	

Die PCR wurde nach dem in Tabelle 5 aufgeführten Cycler-Protokoll durchgeführt. Das PCR-Produkt anschließend 90 min bei 80 V in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch UV-Detektion.

Tabelle 5: Cycler-Protokoll zur Lmp2-Genotypisierung.

Primer-Paar:	Lmp2-2 & Lmp2-4		Lmp2-3 & NeoA	
	Lmp2/Wildtyp		Neomycin/Lmp2 Knock-out	
Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1 min	94 $^\circ\text{C}$	1 min	94 $^\circ\text{C}$
35 Zyklen	Denaturierung	1 min	1 min	94 $^\circ\text{C}$
	Annealing	1 min	1 min	65 $^\circ\text{C}$
	Elongation	3 min	3 min	72 $^\circ\text{C}$
Abschließende Elongation	10 min	72 $^\circ\text{C}$	10 min	72 $^\circ\text{C}$

3.3 Proteinbiochemische Analysen

3.3.1 Extraktion und Fraktionierung von Proteinen aus Gewebe

Die gefrorenen Gewebeproben wurden in 1,5 mL stabilisiertem Homogenisierungspuffer durch 25 Umdrehungen im Glashomogenisierer auf Eis zermahlen. Die so gewonnene Fraktion diente als Rohextrakt. Der Überstand nach 60 min Ultrazentrifugation bei $100\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ diente als Zytosol (zur Validierung siehe Abbildung 6). Solubilisierung schlecht löslicher Proteine in länger gelagertem Rohextrakt wurde durch 1:2-Verdünnung des Rohextrakts mit Homogenisierungspuffer + Protease-Inhibitor und anschließender 1:2-Verdünnung mit 2-D-Lysepuffer erzielt. Unlösliche Bestandteile wurden 10 min bei $15\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ abzentrifugiert.

3.3.2 Protein-Fällung

Solubilierte Rohextrakte wurden mithilfe des 2-D Clean-Up Kits (GE Healthcare, Freiburg) nach Anweisung des Herstellers gefällt. 100 μL Ausgangsvolumen wurden gefällt und in 40 μL TRIS-Lysepuffer aufgenommen.

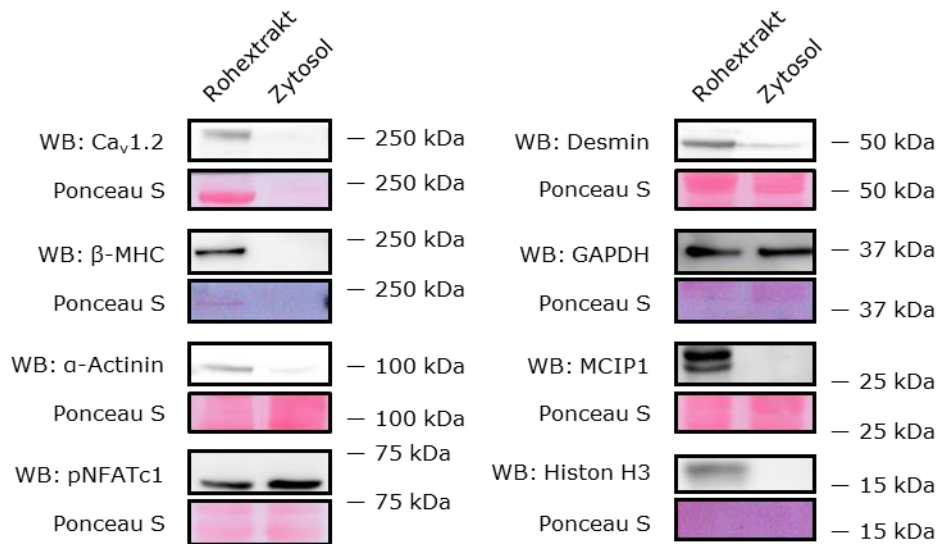


Abbildung 6: Repräsentative Detektion von Marker-Proteinen in Zytosol und frischem, nicht solubiliertem Rohextrakt unbehandelter Kontrolltiere. Nachgewiesen wurden β -Myosin, schwere Kette (β -MHC), α -Actinin und Desmin als Marker von Proteinen kontraktiler Strukturen, L-Typ Calcium-Kanal, Untereinheit α_1c (Cav1.2), als Marker membranöser Strukturen, GAPDH und Ser₂₉₄-phosphoryliertes NFATc1 (pNFATc1) als zytosolische Marker, MCIP1 als basal Kernmembran-assoziiertes Protein und Histon H3 als Marker nukleärer Proteine in 1-50 μg Extrakt (dabei jeweils gleiche Lademenge für Rohextrakt und Zytosol). Die Menge nicht-zytosolischer Proteine im Zytosol liegt im Bereich der verwendeten Nachweisgrenze. Die für das Zytosol charakteristischen Proteine pNFATc1 und GAPDH sind im Zytosol bei gleicher Lademenge angereichert gegenüber dem Rohextrakt.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Extrakten erfolgte anhand der Methode nach Bradford.¹²⁷ Die Messung erfolgte jeweils in Triplikaten gegen eine BSA-Standardgerade.

Tensid- und Harnstoff-haltige Extraktionen wurden mithilfe des Biorad DC Protein Assay verwendet, welcher auf einer Modifikation der Methode nach Lowry¹²⁸ beruht. Die Anwendung erfolgte nach Instruktionen des Herstellers im Mikrotiterplattenformat bei einer Anregung mit 750 nm in Duplikaten gegen eine BSA-Standardgerade.

3.3.4 Proteasom-Aktivitätsassays

Die proteolytischen Aktivitäten der Proteasomkomplexe wurden nach etablierten Protokollen bestimmt.^{82, 106} Nicht-proteasomale Aktivitäten wurden durch Einsatz von spezifischen Proteasominhibitoren gemessen. Die Netto-Aktivität als Differenz der gemessenen Aktivitäten mit und ohne Inhibitor wurde als spezifische proteasomale Aktivität betrachtet.

Die Probe (Zytosol; 25 µg) wurde mit oder ohne Inhibitor (Chymotrypsin-, Trypsin-artig: 10 bzw. 20 µM Epoxomicin; Caspase-artig: 30 µM Z-Pro-Nle-Asp-H) für 30 min bei Raumtemperatur abgedunkelt in 26S-Assay-Puffer inkubiert, um die spezifische Proteasominhibierung zu ermöglichen. Nach Äquilibrierung für 15 min auf Eis wurde das jeweilige Reporterpeptid (Endkonzentration: 100 µM) hinzugegeben und die proteasomalen Aktivitäten via die AMC-Akkumulation über 90 min bestimmt. Die Messung erfolgte alle 5 min (FluoroSkan Ascent, Thermo Fisher, Langenselbold) bei 390 nM Anregungs- und 460 nM Emissionswellenlänge in Triplikaten gegen eine AMC-Standardgerade. Anhand der linearen Phase der Enzymkinetik wurde die proteolytische Aktivität berechnet.

3.3.5 Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Rohextrakt oder Zytosol (1-50 µg) wurden mit 5× Ladepuffer für 5 min bei 95 °C und anschließendem Schockkühlen auf Eis denaturiert. Danach wurden die Proben mit 1× Laufpuffer bei 100 V (Minigele) bzw. je 10 mA (20 cm × 20 cm) elektrophoretisch über Polyacrylamid aufgetrennt (je nach Größe der Zielmoleküle 8-12,5% Acrylamid, 3,3% Crosslinker). Als Größenstandard wurden 2 µL Precision Plus Dual Color (Biorad, Dreieich) in 5× Ladepuffer und Homogenisierungspuffer ohne Erhitzen verwendet.

3.3.6 Western Blot und Detektion

Nach erfolgter PAGE wurde das Trenngel in Transferpuffer äquilibriert und die Proteine anschließend per *Wet blot*-Verfahren auf eine 0,2 µm Nitrozellulose-Membran transferiert.¹²³ Der Transfer erfolgte unter Kühlung und Rühren bei 80 V (Minigele) je nach Größe der zu detektierenden Proteine für 60-120 min bzw. bei 30 V (20 cm × 20 cm) für 8 h. Anschließend wurde die Membran kurz in Wasser gewaschen und getrocknet.

Für die Gesamtproteinfärbung zur Normalisierung wurde die Membran rehydriert, mit Ponceau S gefärbt, mit Wasser entfärbt und anschließend in Milch blockiert. Danach wurde mindestens 4 h mit Primärantikörper in Milch inkubiert, 3 × 10 min in TBST gewaschen, 1 h mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper in Milch inkubiert, 3 × 15 min in TBST gewaschen und entwickelt. Dafür wurde Amersham ECL Prime-Lösung nach Anweisung des Herstellers verwendet. Es wurde die Intensität der entstehenden Chemolumineszenz semi-quantitativ ermittelt und im Verhältnis zur Ponceau S-Intensität oder adäquater Markerproteine quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit der ImageQuantTL®-Software (GE Healthcare, Freiburg).

3.3.7 Zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese (DIGE)

Das DIGE-Experiment wurde im Wesentlichen von O. Drews nach publizierten Protokollen durchgeführt.^{82, 129} Die isoelektrische Fokussierung wurde auf linearen Immobilon® pH 3-10, 18 cm Gelstreifen durchgeführt. Die anschließende PAGE wurde in einem 12,0% Acrylamid-Gel (2,6% Crosslinker) durchgeführt

Die Detektion erfolgte mittels eines Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Freiburg). Die Auswertung wurde mit der DeCyder®-Software (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Relevante Spots wurden nach Coomassie- bzw. Silberfärbung für die weitere massenspektrometrische Analyse ausgestanzt.

3.3.8 Gel-Fixierung und Färbung

Die Gele wurden über Nacht in Fixierlösung inkubiert. Für Coomassie- bzw. Silberfärbung wurden folgende Protokolle angewendet:

Tabelle 6: Protokoll der Coomassie-Färbung von Gelen.

Schritt	Medium	Dauer
Waschen	Wasser	10 min
Färben	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> -Lösung	20 min
Waschen	Wasser	10 min
Entfärben	Entfärbelösung 1	20 min
Waschen	Wasser	10 min
Entfärben	Entfärbelösung 2	über Nacht

Tabelle 7: Protokoll der Silber-Färbung von Gelen nach Blum *et al.*¹³⁰

Schritt	Medium	Dauer
Waschen	Wasser	2× 20 min
Aktivieren	<i>Sensitizer</i> -Lösung	1 min
Waschen	Wasser	2× 20 s
Färben	Silber-Lösung	mindestens 20 min
Waschen	Wasser	2× 1 min
Entwickeln	<i>Developer</i> -Lösung	3-10 min (visuelle Kontrolle)
Waschen	Wasser	1 min
Deaktivieren	<i>Stop</i> -Reagenz	30 min

3.4 Histologische Analysen

3.4.1 Anfertigen kardialer Querschnitte

Die histologischen Experimente wurden unter der Anleitung von O. Drews und von Lidia Jost, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Medizinische Fakultät Heidelberg durchgeführt. Es wurden 14 µm dicke Schnitte im Microtom in technischen Duplikaten pro Herz von der Herzmitte nach apikal angefertigt. Diese wurden anschließend 15 min im Kühlschrank inkubiert und 5 min in PBS pH 7,4 gewaschen. Im Anschluss wurde 30 min in 4% Paraformaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert, 3× 5 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden dann anschließend 2 h blockiert. Als Nächstes wurde für 3× 5 min in PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 4 h mit Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 3× 5 min in PBS gewa-

schen, gefolgt von 2 h Inkubation mit Sekundärantikörper. Für Messung der Zellgröße wurde statt Antikörper 2 h mit WGA inkubiert. Dann wurde 3×10 min mit PBS gewaschen. Abschließend wurde nach Bedarf 20 min Phalloidin-Lösung inkubiert, 2×10 min in PBS gewaschen, 10 min mit DAPI-Lösung inkubiert, 10 min gewaschen und in Mowiol-Lösung eingedeckelt.

3.4.2 Mikroskopie

Die gefärbten Schnitte wurden konfokal mit 20-facher Vergrößerung unter Messung der Fluoreszenz mikroskopiert. Von jedem Duplikat wurden drei repräsentative Bereiche aufgenommen und der Anteil der immunhistochemisch gefärbten Bereiche (Fläche und Signalintensität) bestimmt. Je nach Auswertung wurde ggf. das Signalvolumen nach Flächen-% \times Grauwertintensität berechnet. Kollagen wurde aufgrund der interstitiellen Einlagerung auf 100 Kardiomyozyten normalisiert, da aufgrund der beobachteten Hypertrophie des Zellquerschnittes in gleich großen repräsentativen Ausschnitten verschiedener Gruppen weniger Kardiomyozyten und daher auch weniger Interstitium vorliegt. Die Ungleichmäßige Troponin I-Lokalisation wurde durch Zählen betroffener Kardiomyozyten im Verhältnis zur Gesamtzahl analysiert. Von jedem Schnitt wurden mindestens drei Aufnahmen verwendet. Kardiomyozytenquerschnitt und -länge wurden in 120 bzw. 72-79 Zellen pro Herz ausgemessen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der xcellenceRT®- und CellSense Dimension®-Software (Olympus, Hamburg).

3.5 Statistik

Wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, wurden die erhobenen Daten als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Der statistische Vergleich zweier Gruppen erfolgte mithilfe des zweiseitigen, heteroskedastischen Student'schen t-Tests (wenn anwendbar, gepaart). Hierbei wurde eine Überschreitungswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) als signifikant, eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von kleiner 1% ($p < 0,01$) als hoch signifikant angesehen. Mehr als zwei Gruppen (betrifft 2-D-DIGE) wurden mit zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) innerhalb der DeCyder 7.2-Software statistisch verglichen. Diese basiert auf einer Prüfung zweier Faktoren auf Abhängigkeit durch Analyse der Varianzen betreffender Gruppen. Es wurde die Nullhypothese getestet, dass Isoprenalin-Behandlung in Kombination mit Genotyp keinen anderen Einfluss hat als einer der Faktoren alleine. Eine Überschreitungswahrschein-

lichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) wurde als signifikant, eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von kleiner 1% ($p < 0,01$) als hoch signifikant angesehen (Abbildung 7).

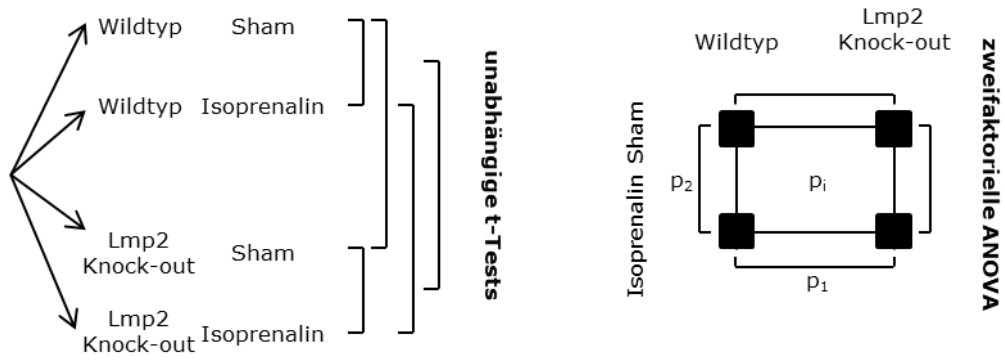


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verwendeten Signifikanztests. Mit t-Tests wurden jeweils zwei Gruppen unabhängig verglichen, während mit zweifaktorieller ANOVA zuerst die Faktoren (Genotyp und Behandlung) unabhängig sowie danach auf Abhängigkeit untersucht wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion von Lmp2 bei hypertropher Kardiomyopathie

Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) wurde durch kardiale Hypertrophie (linksventrikuläre Masse zu Körpergewicht ca. 89% Zunahme gegenüber Wildtypen, $p < 0,01$, $n=10$)[§] und Verlust systolischer Funktion (Verkürzungsfraction des Ventrikelquerschnitts ca. 64% Verlust gegenüber Wildtypen, $p < 0,01$, $n=10$)[§] charakterisiert. Es konnte eine signifikant erhöhte Abundanz von Lmp2 im Myokard gegenüber den Wildtypmäusen festgestellt werden (Abbildung 8).

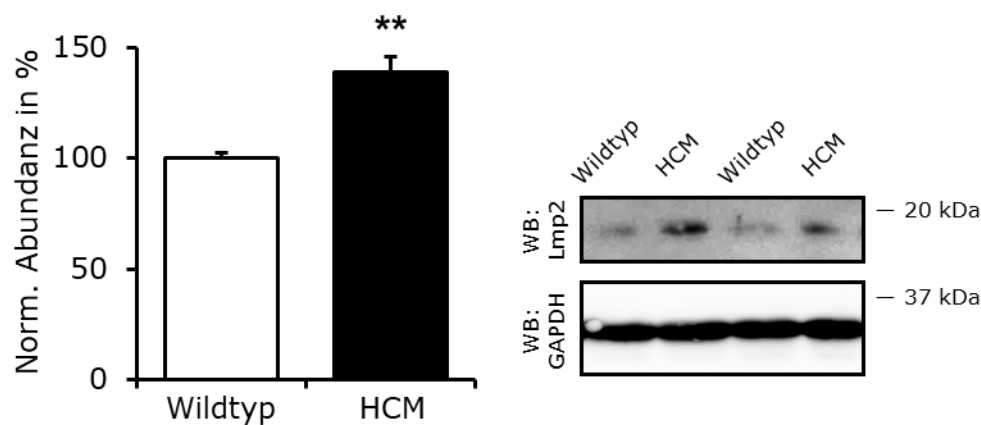


Abbildung 8: Untersuchung der Lmp2-Regulation bei HCM. Lmp2 wurde per Western Blot quantifiziert und auf GAPDH normalisiert (links). Rechts: repräsentative Western Blot-Aufnahme; ** $p < 0,01$ gegenüber Wildtyp-Kontrolle, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 4$.

4.2 Phänotypisierung von Lmp2 Knock-out-Mäusen

Der Lmp2-Genotyp wurde per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft, indem die Bande eines Lmp2-Genabschnitts oder eines Neomycin-Resistenzgenabschnitts qualitativ nachgewiesen wurde (Abbildung 9). Repräsentativ wurde die Lmp2-Expression im Wildtyp per Western Blot nachgewiesen. Im Weiteren wurde überprüft, ob durch kompletten Verlust von Lmp2 die myokardiale Abundanz von $\beta 1$ reguliert wird. Zum Vergleich wurde ebenfalls die Abundanz von $\alpha 7$ untersucht. Bei beiden konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Lmp2 Knock-out-Mäusen und Wildtypen festgestellt werden.

[§]Daten zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Lucie Carrier, Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

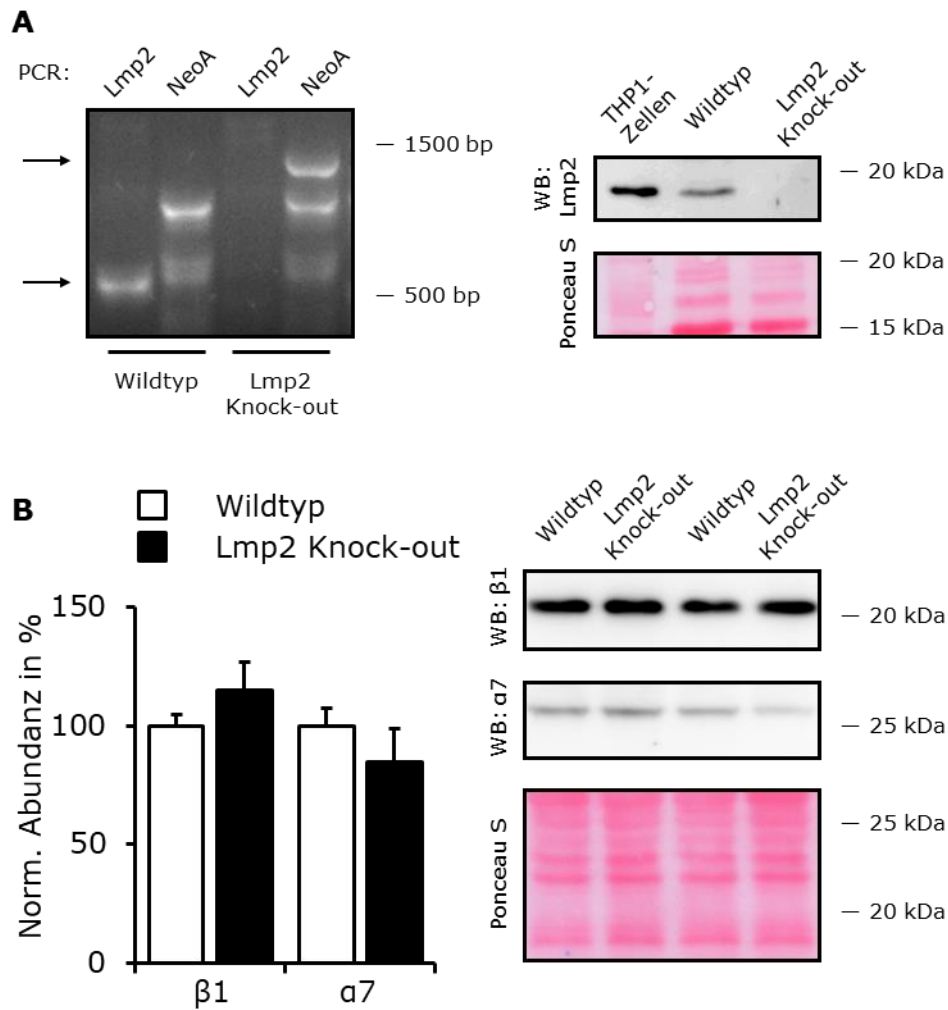


Abbildung 9: Basaluntersuchung proteasomaler Untereinheiten in Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäusen. **A:** Lmp2-Genotypisierung per PCR (links) und repräsentative Überprüfung der Lmp2-Abundanz im Western Blot (rechts). Der Knock-out wurde in der PCR durch Anwesenheit der Neomycin-Kassette (NeoA) nachgewiesen. Im Western Blot wurde eine Spur THP1-Zellysat als Positivkontrolle hinzugefügt. **B:** Untersuchung der Abundanz von $\beta 1$ und $\alpha 7$. Die Quantifizierung erfolgte per Western Blot und wurde auf Gesamtprotein (Ponceau S) normalisiert. Rechts: Repräsentative Aufnahmen; Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=4$.

Ob der Verlust von Lmp2 die kardiale Entwicklung verändert, wurde makroskopisch anhand des Körper- und Herzgewichts beurteilt (Abbildung 10). Hier wurde kein Unterschied festgestellt.

Bei der echokardiographischen Analyse der kardialen Anatomie sowie systolischer und diastolischer Funktion wurde ebenfalls kein Unterschied festgestellt (Abbildung 11).

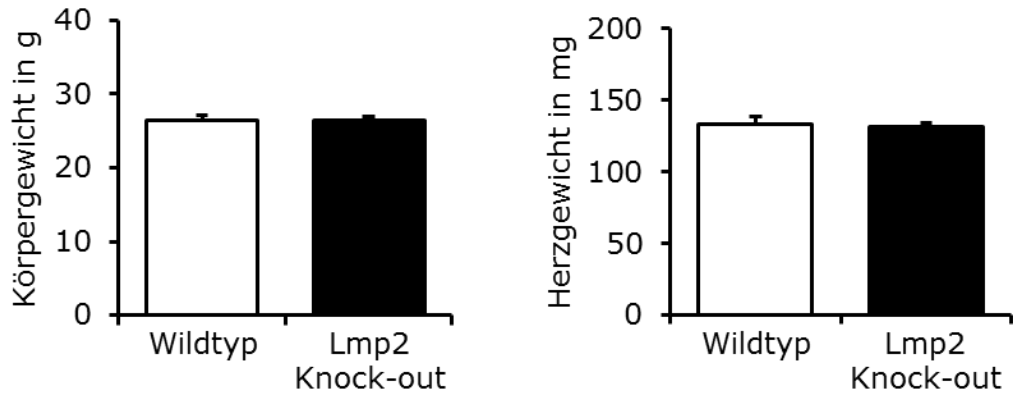


Abbildung 10: Vergleich von Körpergewicht und Herzgewicht unbehandelter Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäuse; Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 17$.

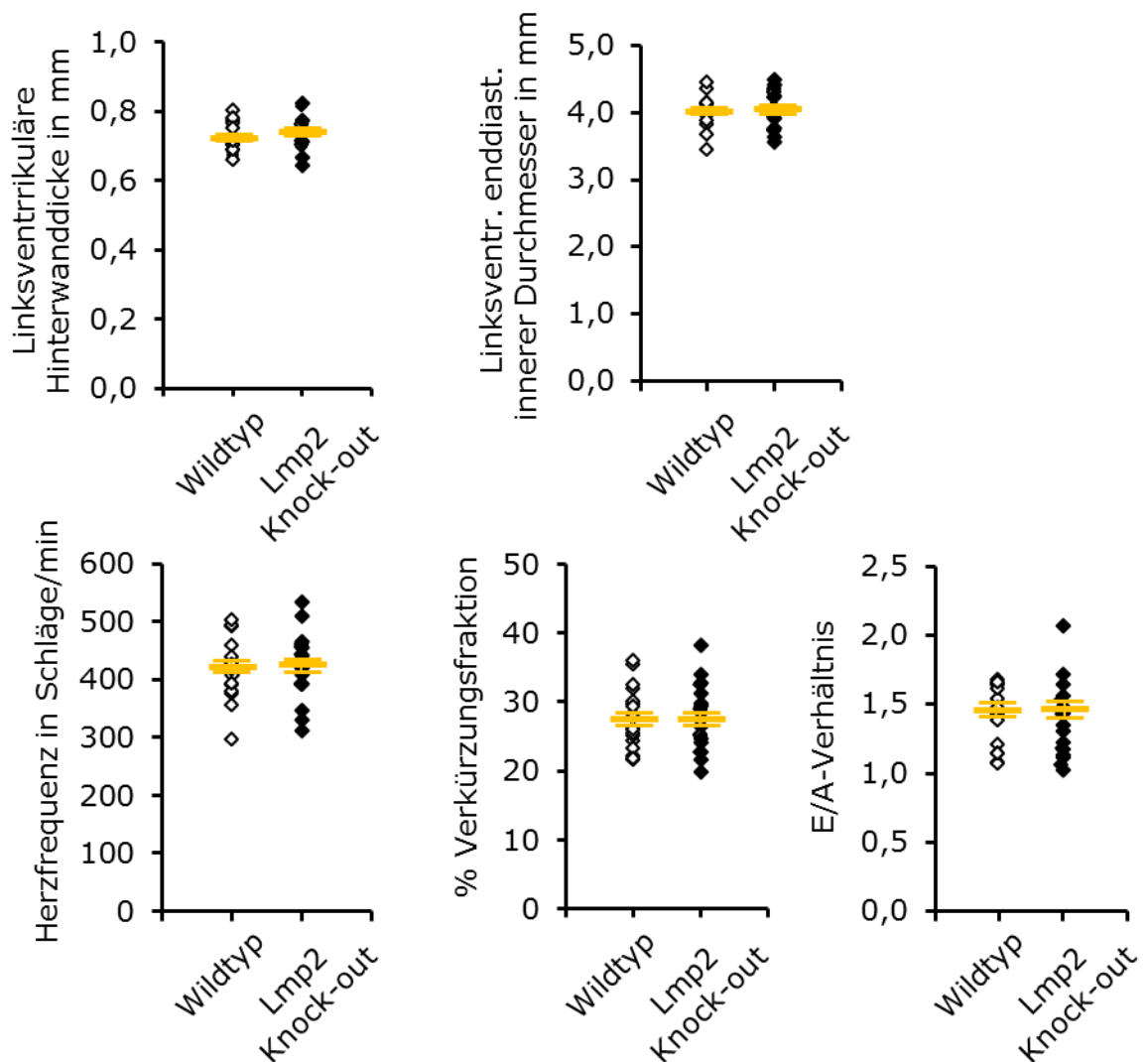


Abbildung 11: Echokardiographische Untersuchung der Basalfunktion von Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäusen; Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 18$.

4.3 Analyse kardialer Funktion im Isoprenalinmodell

4.3.1 Systolische Funktion

Der Einfluss des globalen Verlusts von Lmp2 auf die kardiale Funktion wurde daraufhin unter kontinuierlicher Isoprenalin-Stimulation für sieben Tage untersucht. Dabei wurde sowohl in Wildtyp- als auch Lmp2 Knock-out-Mäusen nach vier Tagen ein deutlicher Anstieg der Herzfrequenz beobachtet, der bis zum Versuchsende aufrechterhalten werden konnte (Abbildung 12). Ebenfalls reagierten beide Gruppen mit einer gleichmäßig erhöhten systolischen Funktion nach vier Tagen (ca. 35% erhöhte Verkürzungsfraktion gegenüber Versuchsbeginn). Allerdings konnten nur Wildtypmäuse die erhöhte Kontraktilität über sieben Tage aufrechterhalten, während diese in Lmp2 Knock-out-Tieren bis unter das Ausgangsniveau sank (ca. 13% Verlust gegenüber Versuchsbeginn und ca. 32% Verlust gegenüber behandelten Wildtypmäusen).

Der maximale circumferentielle Strain sowie dessen Geschwindigkeit (Strain Rate) waren wie die Verkürzungsfraktion in beiden Gruppen nach vier Tagen gleichmäßig erhöht, nach sieben Tagen allerdings wurde ein Abfall von Strain und Strain Rate in Lmp2 Knock-out Tieren beobachtet (Abbildung 13).

4.3.2 Diastolische Funktion

Neben der systolischen wurde auch die diastolische Funktion analysiert. Hier zeigten Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäuse nach vier Tagen einen gleichmäßigen Anstieg der passiven und aktiven Ventrikelfüllung gegenüber Versuchsbeginn (Abbildung 14). Nach sieben Tagen allerdings war das E/A-Verhältnis in Lmp2 Knock-out-Tieren deutlich erhöht (ca. 47% Zunahme gegenüber Wildtypmäusen). Diese Veränderung wurde maßgeblich von der späten, aktiven Ventrikelfüllung (A-Welle) verursacht, da die E-Welle in Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren auch nach sieben Tagen erhöht war, die A-Welle nach sieben Tagen allerdings in Lmp2 Knock-out-Tieren wieder reduziert war (ca. -32% gegenüber Wildtypmäusen, Abbildung 14 und Abbildung 15). In Ergänzung wurde untersucht, ob eine Aortenregurgitation während der diastolischen Ventrikelfüllung auftritt. Hier wurden das Volumen-Zeit-Integrals des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) in der Aorta nach der Systole (Tabelle 8, Abbildung 15) sowie dessen Durchmesser (Tabelle 8, Abbildung 16) untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen Isoprenalin-behandelten Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren festgestellt werden.

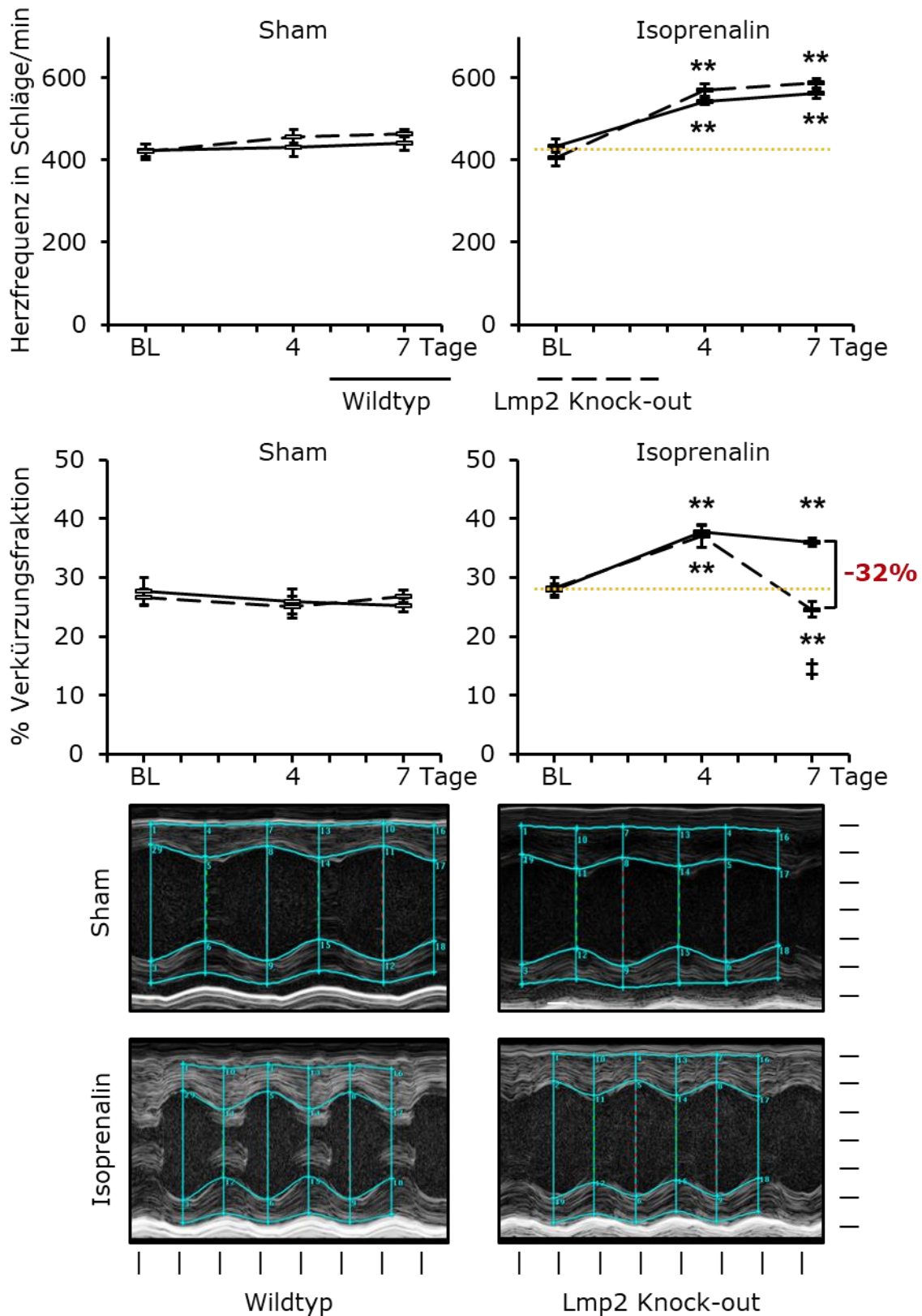


Abbildung 12: Untersuchung von Herzfrequenz und systolischer Funktion von Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäusen im Verlauf der Isoprenalinbehandlung. Die Tiere wurden echokardiographisch basal (BL) sowie vier und sieben Tage nach der Implantation der mikro-osmotischen Pumpen untersucht. Die Daten wurden im M-Modus der parasternalen langen Achse (PSLAX) ausgewertet. Die orange-gestrichelte Linie illustriert das Ausgangsniveau. Unten: Repräsentative PSLAX M-Modus Aufnahmen nach siebentägiger Behandlung; Skalen: vertikal: mm, horizontal: 50 ms; **p<0,01 gegenüber BL, †p<0,01 gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen, Mittelwert ± Fehler des Mittelwerts, n≥8.

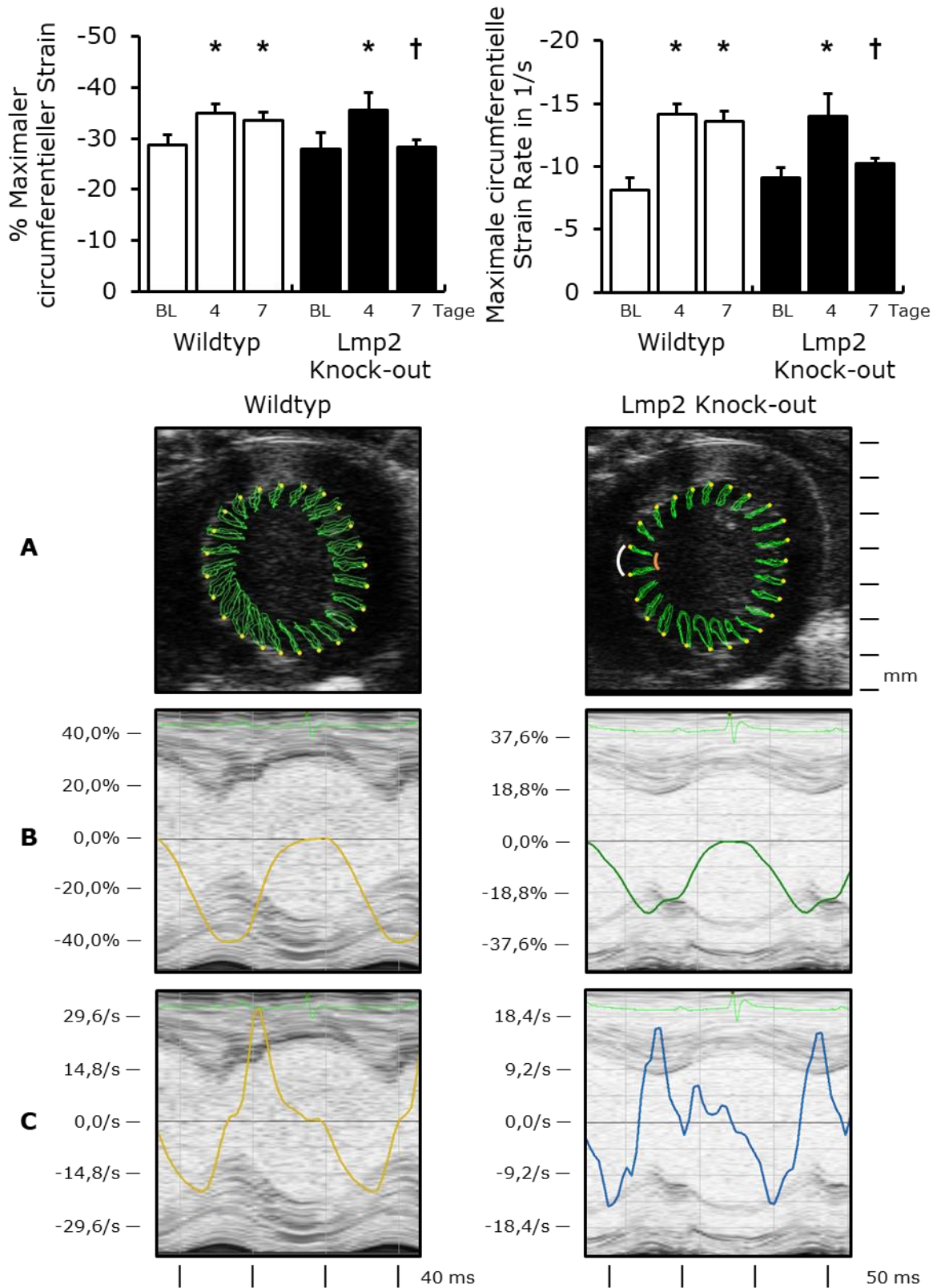


Abbildung 13: Analyse des circumferentiellen endokardialen Strains sowie repräsentative Aufnahmen in der circumferentiellen Achse nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung. Das Endokard (gelbe Punkte) verschiebt sich während des Herzzyklus auf den grün dargestellten Bahnen (A). Verglichen wurde der Abstand zweier Punkte während der Diastole (weißer Bogen) und Systole (oranger Bogen). Der Verlauf von circumferentiell Strain (B) und Strain Rate (C) im Herzzyklus ist vor dem Hintergrund der Verkürzung im M-Modus illustriert; daraus resultiert eine unterschiedliche Skalierung bei Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren; * $p < 0,05$ gegenüber BL, † $p < 0,05$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=5$.

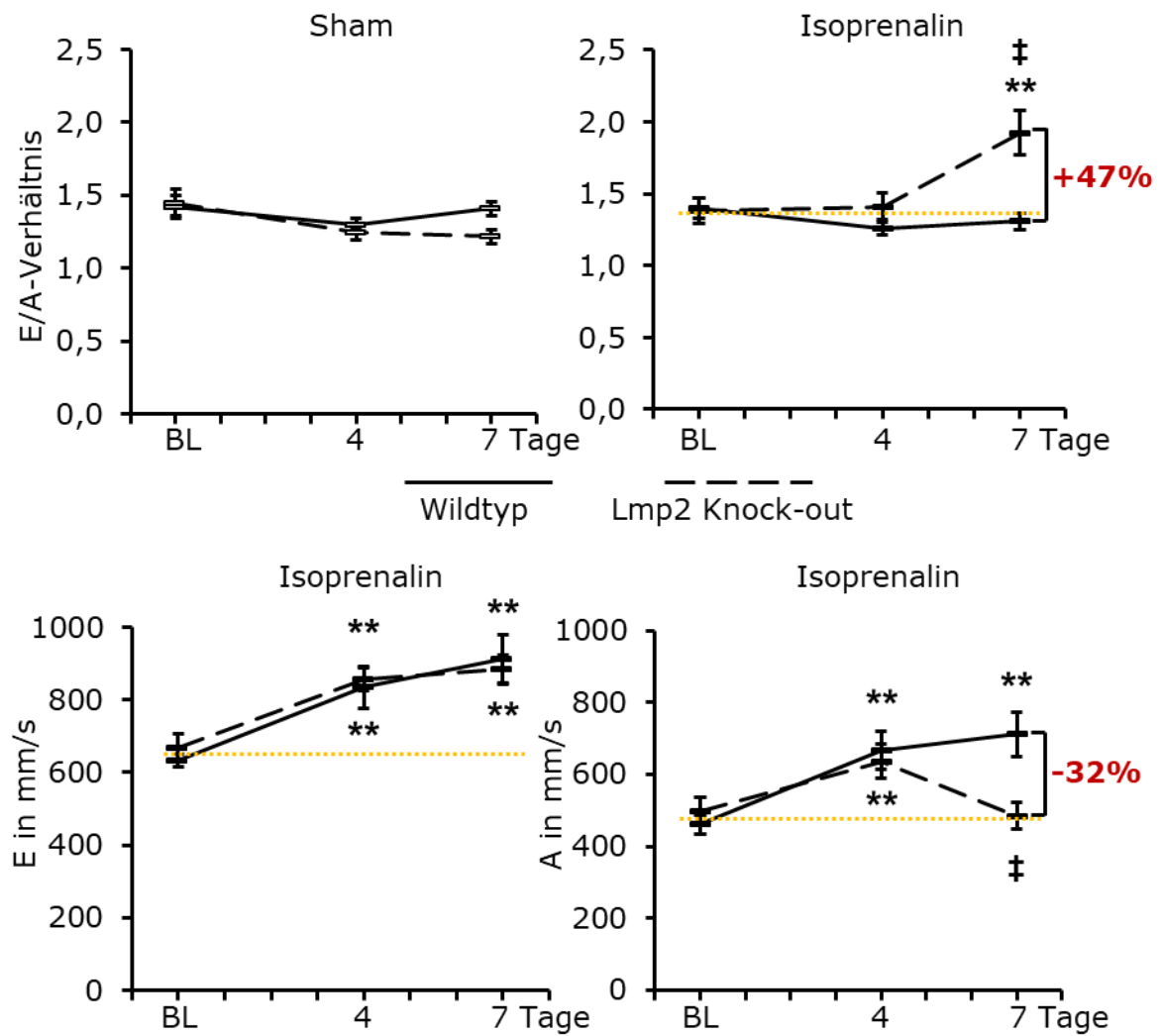


Abbildung 14: Untersuchung der diastolischen Funktion von Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäusen im Verlauf der Isoprenalinbehandlung. Das E/A-Verhältnis wurde basal (BL) sowie vier und sieben Tage nach der Implantation der mikro-osmotischen Pumpen bestimmt. Die orange-gestrichelte Linie illustriert das Ausgangsniveau; ** $p \leq 0,01$ gegenüber BL, ‡ $p < 0,01$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 8$.

Zuletzt wurde die maximale diastolische Strain Rate in circumferentieller Richtung bestimmt. Diese war nach vier Tagen gleichmäßig erhöht (wenn auch nicht signifikant in Lmp2 Knock-out-Tieren), nach sieben Tagen jedoch wieder reduziert in Lmp2 Knock-out-Tieren (Abbildung 17).

Ergebnisse

Tabelle 8: Analyse einer möglichen Aortenregurgitation durch Messungen am linksventrikulären Ausflusstrakt (LVOT); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gegenüber BL, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 4$.

	Wildtyp	Lmp2 Knock-out
LVOT (systolisch) (mm)	1,32 \pm 0,03	1,34 \pm 0,05
	1,42 \pm 0,03**	1,48 \pm 0,08*
	1,50 \pm 0,07**	1,56 \pm 0,06**
Aortenregurgitation (mm)	1,8 \pm 0,3	1,9 \pm 0,3
	1,6 \pm 0,4	2,0 \pm 0,3
	1,9 \pm 0,7	2,1 \pm 0,2

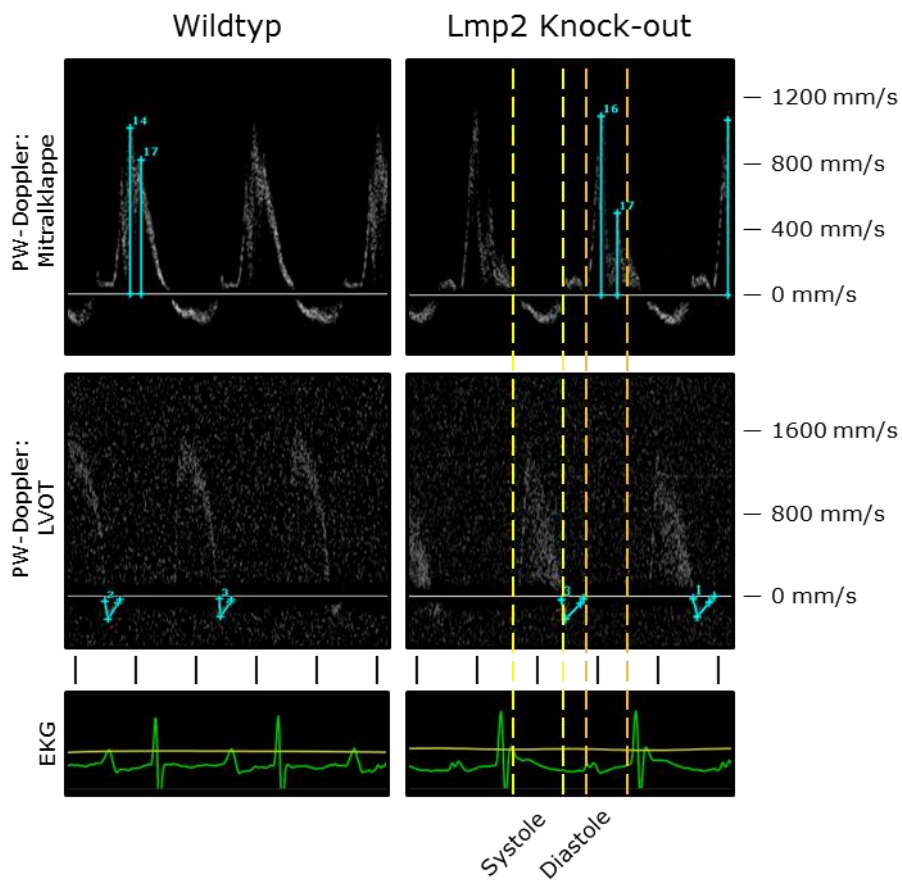


Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen der PW-Doppler-Messung nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung. Untersucht wurden linksventrikuläre Füllung im apikalen Vierkammerblick sowie eine mögliche Aortenregurgitation in der suprasternalen langen Achse; Skala: 50 ms.

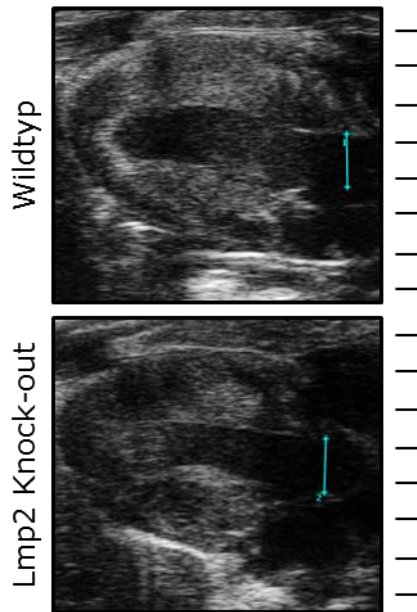


Abbildung 16: Repräsentative Aufnahmen der LVOT-Weite nach sieben Tagen Isoprenalin; Skala: mm.

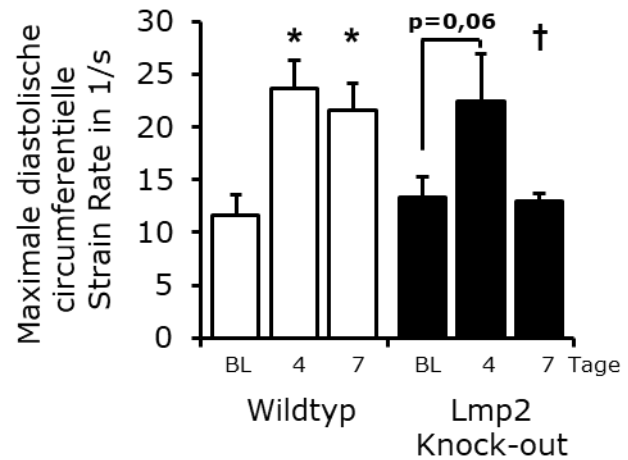


Abbildung 17: Analyse der diastolischen endokardialen Strain Rate in Isoprenalin-behandelten Tieren; * $p < 0,05$ gegenüber BL, [†] $p < 0,05$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=5$.

4.4 Phänotypisierung nach kardiotroper Rekonstitution von Lmp2

Um den beobachteten Phänotyp einer verschlechterten kardialen Funktion in der Folge von chronischer Isoprenalinstimulation bei globalem Verlust von Lmp2 spezifisch dem Fehlen von Lmp2 in den Herzmuskelzellen zuordnen zu können, wurde Lmp2 kardiotrop rekonstituiert. Hierfür wurde ein Kardiomyozyten-spezifischer Gentransfer (AAV9 mit rekombinantem Myosin-leichte-Ketten-Promotor) verwendet, mit dem entweder Lmp2 oder als Kontrolle Luciferase exprimiert wurden.

Um die basale Lmp2-Expression zu überprüfen, wurde Lmp2 per Western Blot detektiert. Hier wurde die Abundanz zweier Banden (Lmp2-Propeptid und prozessiertes Lmp2) nachgewiesen (Abbildung 18). Die Abundanz von prozessiertem Lmp2 bei Sham-behandelten Lmp2 Knock-out-Tieren nach Lmp2-Transfer entsprach trotz größerer Streuung in etwa dem Niveau Sham-behandelter Wildtypmäuse. Ergänzend wurde die Abwesenheit von Lmp2 bei Luciferase-Gentransfer anhand negativer Western Blot-Detektion bestätigt (vgl. Abbildung 9A).

Der erfolgreiche Gentransfer des Luciferase-Kontrollvehikels wurde mit dem Nachweis von *Renilla* Luciferase überprüft. Eine Regulation von Luciferase durch Isoprenalin konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 19).

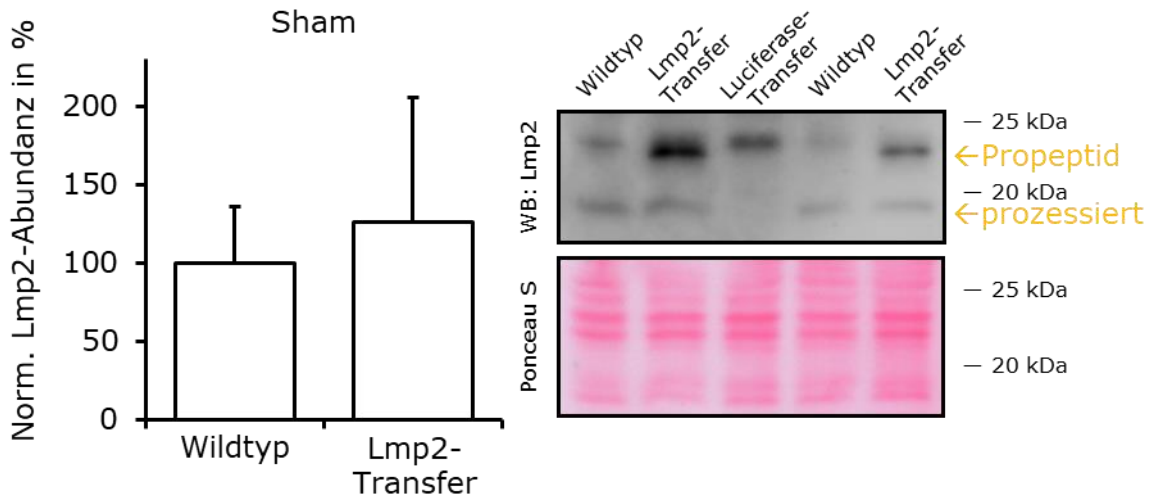


Abbildung 18: Expression von Lmp2 nach kardiotroper Rekonstitution. Untersucht wurde die Abundanz von Lmp2 Sham-Behandlung im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe, um auf die basale Expression nach Transfer schließen zu können. Nach Lmp2-Transfer konnten zwei Formen von Lmp2 nachgewiesen werden: Lmp2-Propeptid (obere Bande) sowie prozessiertes Lmp2 (untere Bande). Die Detektion des Propeptids wird durch eine unspezifische Bande knapp oberhalb erschwert, vgl. die Spuren der Wildtyp- und Luciferase-Kontrolltransfergruppen. Prozessiertes Lmp2 wurde auf Gesamtprotein (Ponceau S) normalisiert und quantifiziert; Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 3$

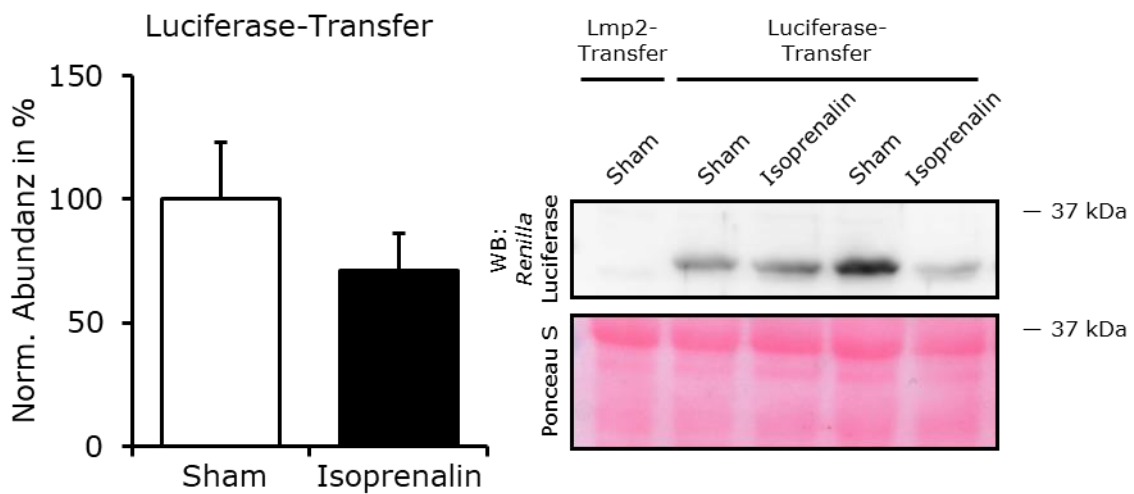


Abbildung 19: Untersuchung der Luciferase-Abundanz. *Renilla* Luciferase wurde auf Gesamtprotein (Ponceau S) normalisiert und quantifiziert; Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=5$.

Da beide Genföhren zu einer myokardialen Expression führten, wurde als nächstes echokardiographisch überprüft, ob sich die basale kardiale Funktion und Anatomie abhängig vom Gentransfer unterscheidet. Hierbei wurde kein Unterschied in der kardialen Anatomie sowie bei der systolischen bzw. diastolischen Funktion zwischen Lmp2- und Luciferase-Transfer festgestellt (Abbildung 20).

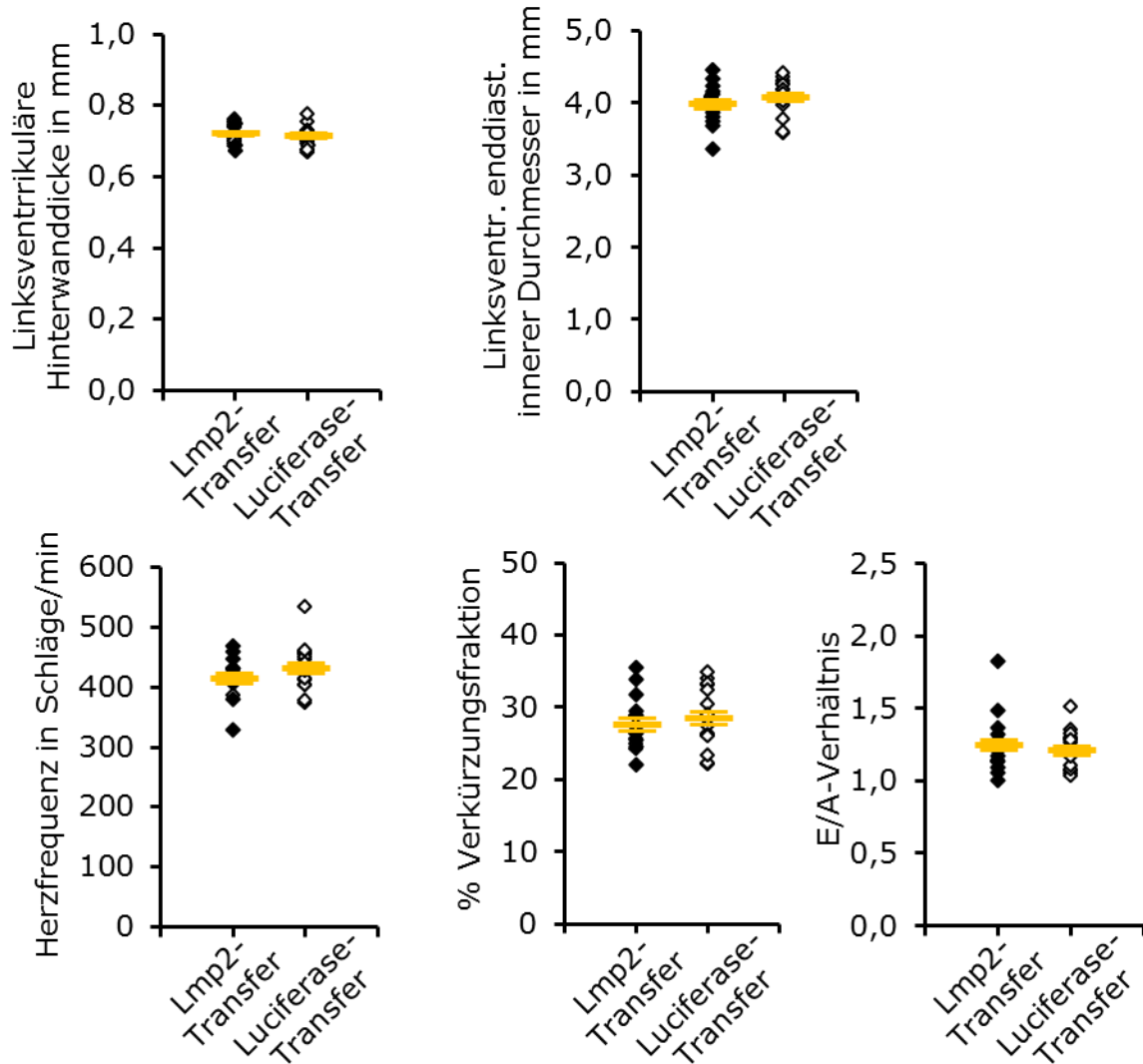


Abbildung 20: Echokardiographische Untersuchung der Basalfunktion von Lmp2 Knock-out-Tieren nach Lmp2- bzw. Luciferase-Gentransfer; Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, n=16.

4.5 Untersuchung der Herzfunktion im Isoprenalinmodell nach kardiotoxischer Rekonstitution von Lmp2

4.5.1 Systolische Funktion

Ob der Rescue von Lmp2 unter hypertropher Stimulation die systolische Funktion aufrechterhalten kann, wurde daraufhin echokardiographisch untersucht. Dabei wurde sowohl nach Lmp2- als auch Luciferase-Transfer und vier Tagen Isoprenalinexposition ein deutlicher Anstieg der Herzfrequenz beobachtet, der über sieben Tage aufrechterhalten werden konnte (Abbildung 21). Beide Gruppen zeigten außerdem eine um ca. 33% erhöhte Verkürzungsfraction nach vier Tagen, allerdings konnte diese nur durch

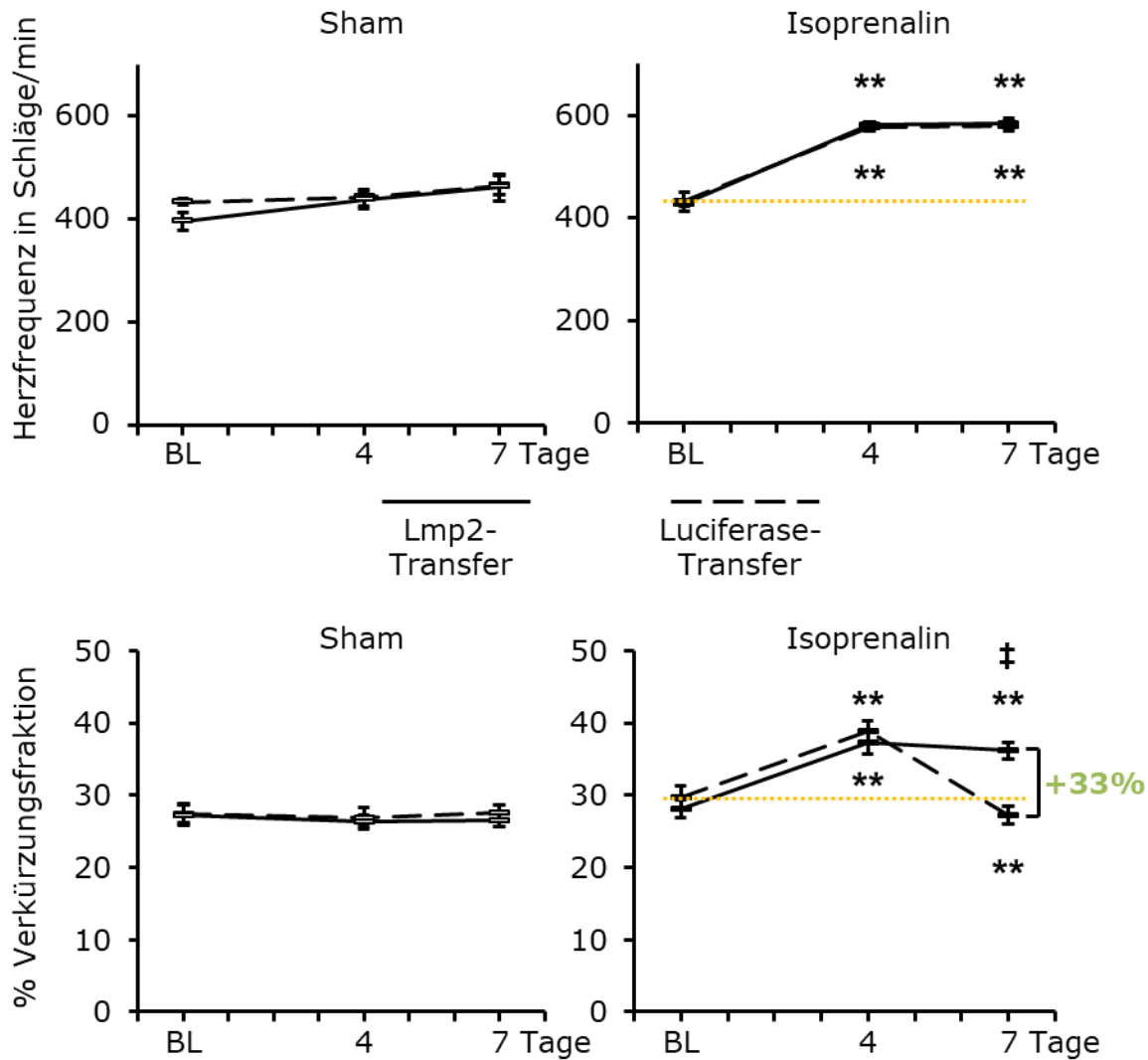


Abbildung 21: Untersuchung von Herzfrequenz und systolischer Funktion von Lmp2 Knock-out-Tieren nach Lmp2- bzw. Luciferase-Gentransfer im Verlauf der Isoprenalinbehandlung. Die Tiere wurden echokardiographisch basal (BL) sowie vier und sieben Tage nach der Implantation der mikro-osmotischen Pumpen untersucht. Die Daten wurden im PSLAX M-Modus ausgewertet. Die orange-gestrichelte Linie illustriert das Ausgangsniveau; **p<0,01 gegenüber BL, †p<0,01 gegenüber Isoprenalin-behandelten Luciferase-Kontrollen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, n \geq 6.

Lmp2-Rekonstitution bis zum Versuchsende aufrechterhalten werden (ca. 33% verbesserte systolische Funktion gegenüber Luciferase-Kontrolltransfer). Isoprenalin-behandelte Tiere, in denen Lmp2 kardiotrop rekonstituiert worden war, unterschieden sich in der systolischen Funktion somit nicht von identisch behandelten Wildtypmäusen, während der Luciferase-Gentransfer keinen Unterschied gegenüber Lmp2 Knock-out-Tieren ohne Gentransfer erbrachte (vgl. Abbildung 12).

4.5.2 Diastolische Funktion

Ebenfalls wurde überprüft, wie die Rekonstitution von Lmp2 den Verlauf der diastolischen Funktion im Isoprenalinmodell beeinflusst. Nachdem beide Gruppen nach vier

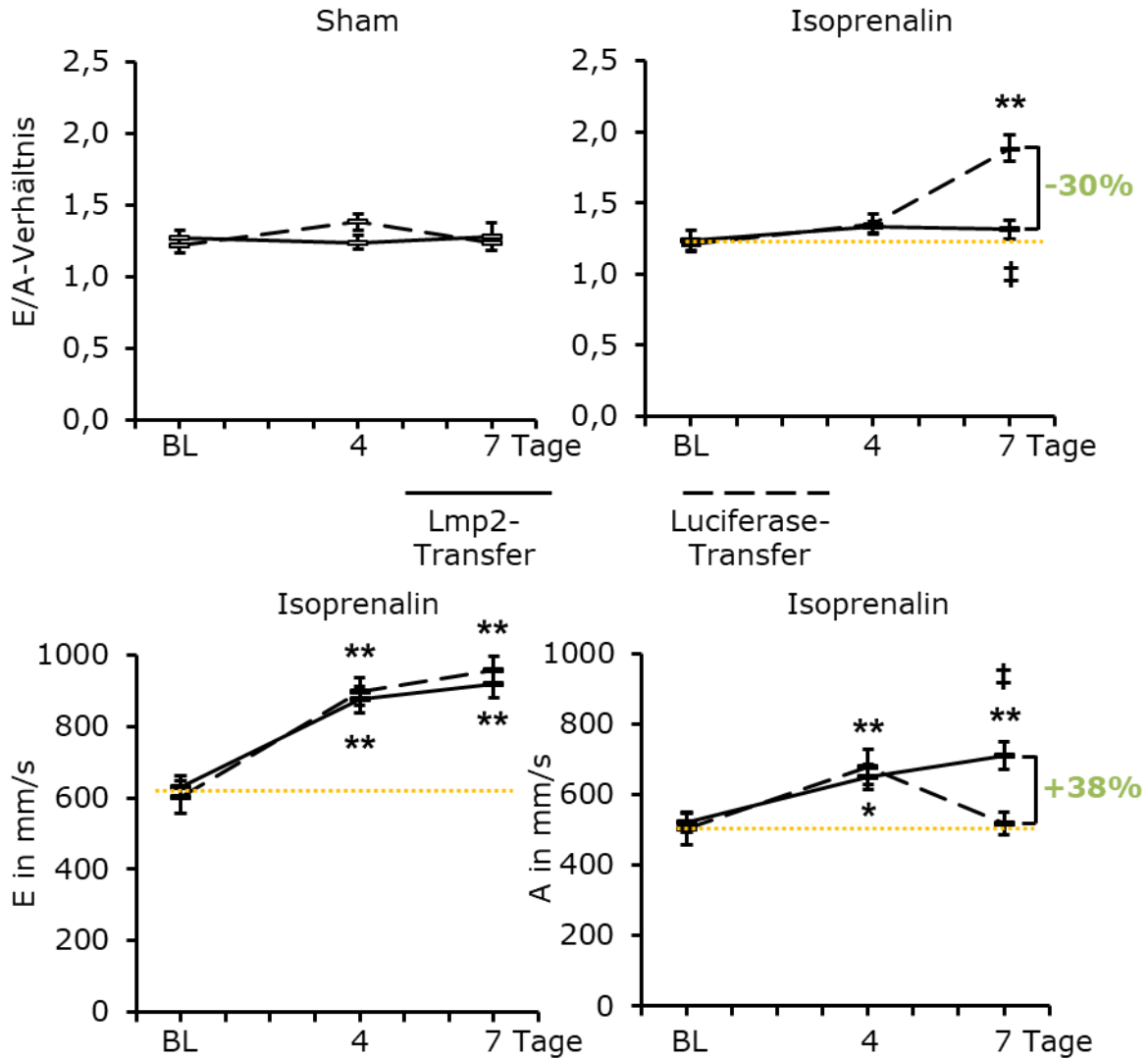


Abbildung 22: Untersuchung der diastolischen Funktion von Lmp2 Knock-out-Tieren nach Lmp2- bzw. Luciferase-Gentransfer im Verlauf der Isoprenalinbehandlung. Das E/A-Verhältnis wurde basal (BL) sowie vier und sieben Tage nach der Implantation der mikro-osmotischen Pumpen bestimmt. Die orange-gestrichelte Linie illustriert das Ausgangsniveau; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gegenüber BL, † $p < 0,01$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Luciferase-Kontrollen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 6$.

Tagen ein unverändertes E/A-Verhältnis aufwiesen, war dieses nach sieben Tagen und Luciferase-Gentransfer durch Abnahme der A-Welle signifikant erhöht, konnte durch Lmp2-Gentransfer aber auf Ausgangs- und somit Wildtypniveau gehalten werden (Abbildung 22, vgl. Abbildung 14)

4.6 Analyse kardialer Umbauprozesse in Abhängigkeit von Lmp2

4.6.1 Entwicklung kardialer Hypertrophie

Kardiale Hypertrophie wurde anhand des Herzgewichts im Verhältnis zum Körpergewicht beurteilt. Hier entwickelten Wildtypmäuse durch die Isoprenalinbehandlung eine signifikante Zunahme von ca. 20% gegenüber Sham-Behandlung (Abbildung 23). Die Zunahme bei Lmp2 Knock-out-Tieren lag bei ca. 32%, sodass der Zuwachs um ca. 65% gegenüber den Wildtyp-Kontrollen erhöht war. Nach Lmp2-Transfer wurde eine signifikante Zunahme von ca. 20% beobachtet (damit ca. 40% verringert gegenüber den Lmp2-Knock-out-Tieren), während das Verhältnis nach Luciferase-Gentransfer um ca. 33% zunahm (ca. 67% erhöht gegenüber dem Lmp2-Gentransfer).

Um die Änderungen des Gesamtherzgewichts auf anatomischer Ebene nachvollziehen zu können, wurden die linksventrikuläre Hinterwanddicke sowie der diastolische Ventrikeldurchmesser im Verlauf der Isoprenalinbehandlung echokardiographisch untersucht.

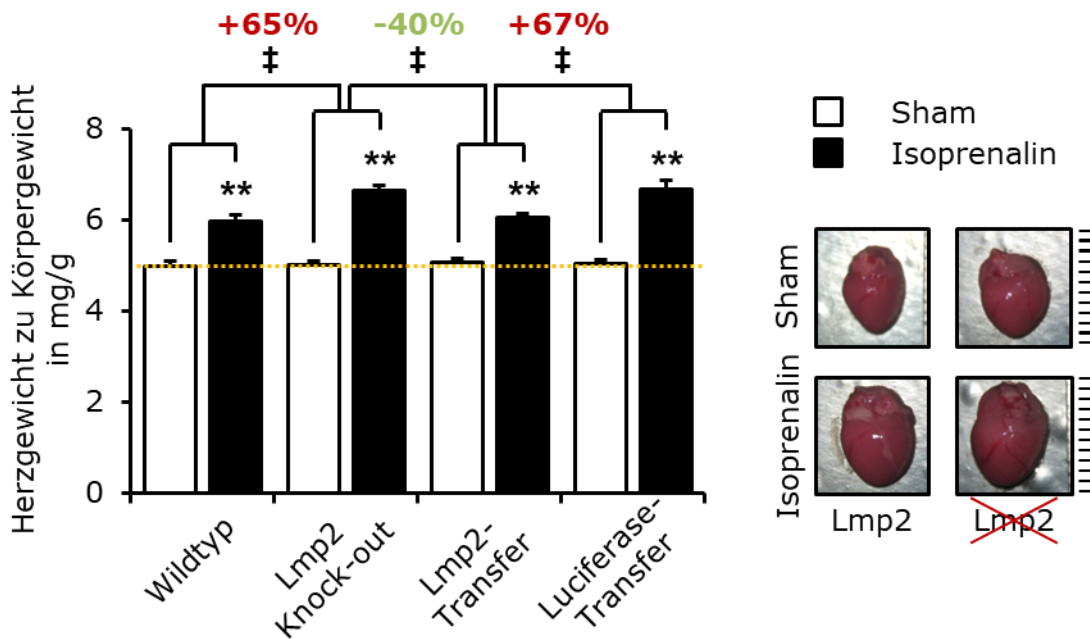
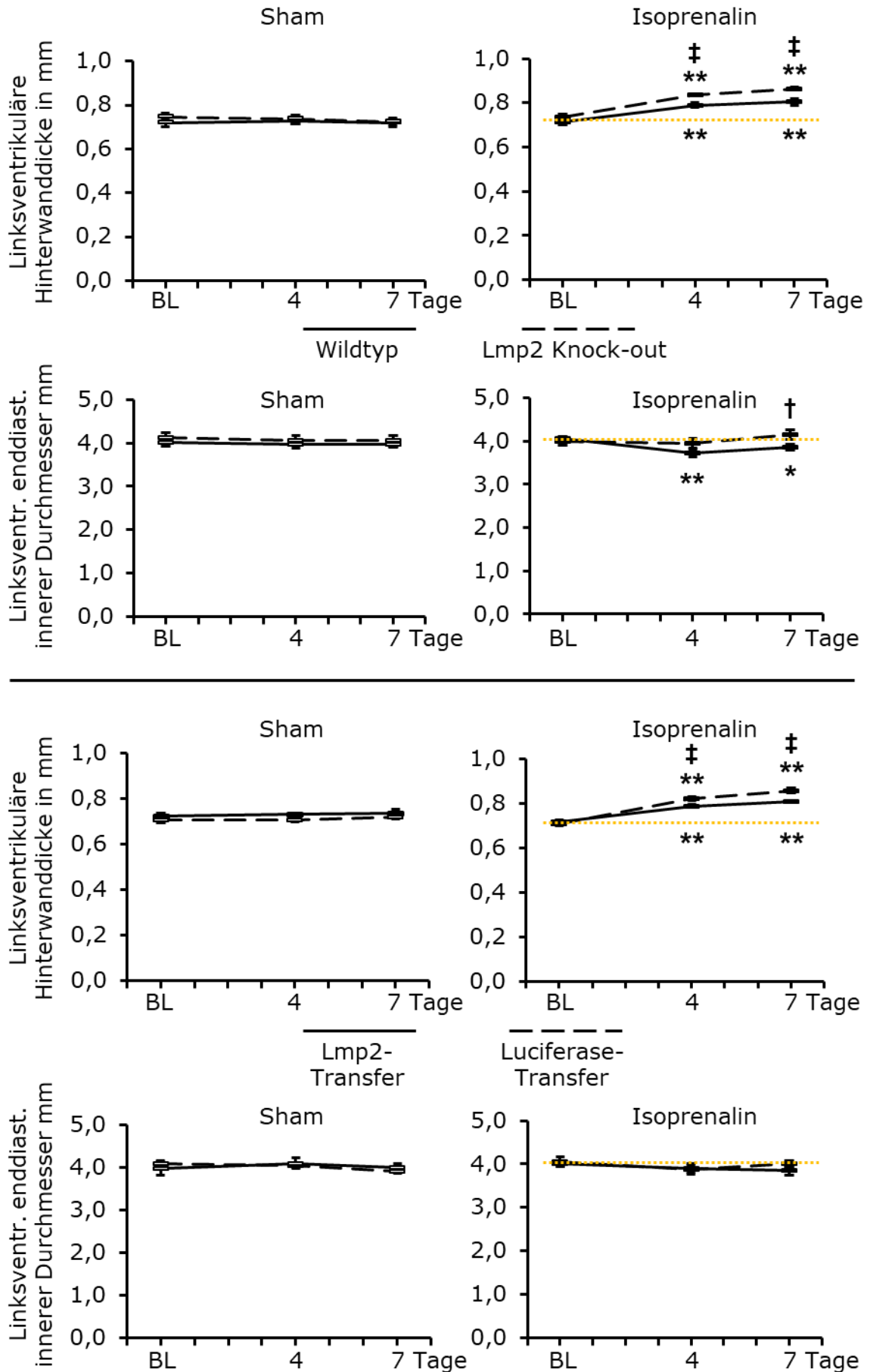


Abbildung 23: Herzgewicht zu Körpergewicht in An- und Abwesenheit von Lmp2 nach Isoprenalinbehandlung. Die orange-gestrichelten Linien approximieren das Sham-Niveau. Rechts: Repräsentative Aufnahmen der Herzen; Skala: mm; ** $p < 0,01$ gegenüber Sham, † $p \leq 0,01$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Vergleichsgruppen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 6$.

Abbildung 24: Linksventrikuläre Hinterwanddicke und innerer Durchmesser im Verlauf der Isoprenalinbehandlung. Die Auswertung erfolgte im PSLAX M-Modus. Die orange-gestrichelte Linie stellt das Ausgangsniveau dar; * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$ gegenüber BL, † $p < 0,05$, ‡ $p \leq 0,01$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Luciferase-Kontrollen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n \geq 6$.



Die Hinterwanddicke nahm unabhängig von Lmp2 in den ersten vier Tagen signifikant um 11-16% zu (Abbildung 24). Am Versuchsende konnte bei Lmp2 Knock-out-Tieren eine um ca. 7% vergrößerte Hinterwanddicke gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren festgestellt werden, während diese nach Lmp2-Transfer um ca. 6% gegenüber dem Luciferase-Gentransfer reduziert war. Der linksventrikuläre enddiastolische innere Durchmesser war in Lmp2 Knock-out-Tieren ohne Gentransfer zum Versuchsende signifikant erhöht (ca. +8% gegenüber Wildtypmäusen). Nach Luciferase-Gentransfer war der Innendurchmesser nicht signifikant reguliert, wodurch sich nach Lmp2-Transfer nur eine nicht signifikante Abnahme um ca. 4% ergab. Die Veränderungen im linksventrikulären enddiastolischen inneren Durchmesser fielen somit nur geringfügig aus. Eine Zusammenfassung der per Echokardiographie untersuchten Regulationen bietet Tabelle 9.

Um die Vergrößerung der Hinterwand auf zellulärer Ebene erklären zu können, wurde deren Länge und Querschnittsfläche in WGA-gefärbten Kryoschnitten ausgemessen. Bei letzterer konnte eine signifikante Zunahme in Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen gegenüber Sham-Behandlung um ca. 32% festgestellt werden, während sich die Kardiomyozytenlänge kaum änderte (Abbildung 25). Bei Lmp2 Knock-out-Tieren betrug der Zuwachs ca. 52%, ebenfalls bei unveränderter Kardiomyozytenlänge, woraus eine um ca. 65% erhöhte Zunahme bei Lmp2 Knock-out Tieren gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren resultierte.

4.6.2 Überprüfung einer differenziellen Regulation der Calcineurin-Abundanz

Als nächstes wurde überprüft, ob die beobachtete kardiale Hypertrophie mit Calcineurin im Zusammenhang steht. Da postuliert wurde, dass Lmp2-abhängiger proteasomaler Abbau die Calcineurin-Abundanz kontrolliert, wurde Calcineurin per Western Blot quantifiziert. Allerdings konnte hier kein signifikanter Unterschied nach Isoprenalinbehandlung sowohl gegenüber Sham als auch zwischen Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren festgestellt werden (Abbildung 26).

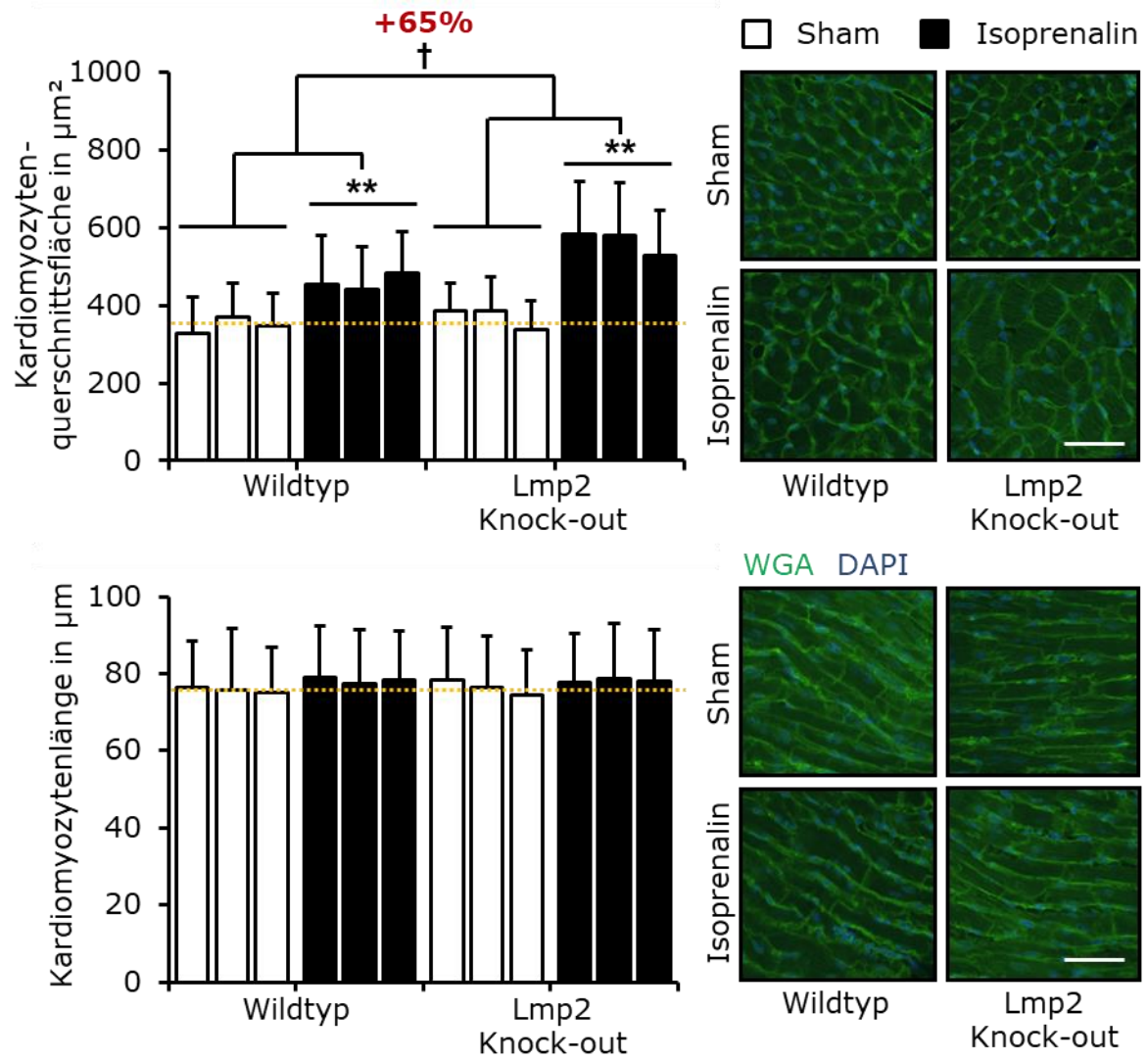


Abbildung 25: Kardiomyozytenquerschnitt und -länge nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung. Die Auswertung erfolgte nach Färbung mit WGA. Links: Quantifizierung. Die orange-gestrichelten Linien approximieren das Sham-Niveau. Rechts: Repräsentative Aufnahmen; Messbalken: 50 μm ; ** $p < 0,01$ gegenüber Sham, † $p < 0,05$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen, $n=3$; jeder Balken repräsentiert ein biologisches Replikat mit dem Mittelwert von 120 (Querschnitt) bzw. 72-79 (Länge) gemessenen Zellen \pm Standardabweichung.

Tabelle 9 Zusammenfassung der echokardiographischen Analysen im Verlauf der Isoprenalinbehandlung in Abhängigkeit von Lmp2. Signifikante Erhöhungen oder Reduktionen sind durch Pfeile relativ dargestellt. Veränderungen, auf stärkeres Remodelling bei Lmp2 Knock-out-Tieren gegenüber Wildtypen hinweisen, sind rot hervorgehoben. Veränderungen, die eine Aufrechterhaltung kardialer Funktion bzw. verringertes Remodelling bei Lmp2-Gentransfer im Vergleich zum Luciferase-Gentransfer andeuten, sind grün hervorgehoben; n.b.: nicht bestimmt.

	Parameter	Lmp2 Knock-out vs. Wildtyp		Lmp2- vs. Luciferase-Transfer	
		0-4	4-7	0-4	4-7
	Behandlungstage	0-4	4-7	0-4	4-7
	Herzfrequenz	↔	↔	↔	↔
ANATOMIE	Linksventrikuläre Hinterwanddicke	↔	↑	↔	↓
	Linksventr. diastolischer innerer Durchmesser	↔	↑	↔	↔
	Linksventrikulärer Ausflusstrakt (systolisch)	↔	↔	↔	↔
SYSTOLISCH	Verkürzungsfraktion	↔	↓	↔	↑
	Maximaler circumferentieller Strain	↔	↓	n.b.	
	Maximale systolische circumferentielle Strain Rate	↔	↓	n.b.	
DIASTOLISCH	E/A-Verhältnis	↔	↑	↔	↓
	E-Welle	↔	↔	↔	↔
	A-Welle	↔	↓	↔	↑
	Max. diastolische circumferentielle Strain Rate	↔	↓	n.b.	
	Aortenregurgitation	↔	↔	n.b.	

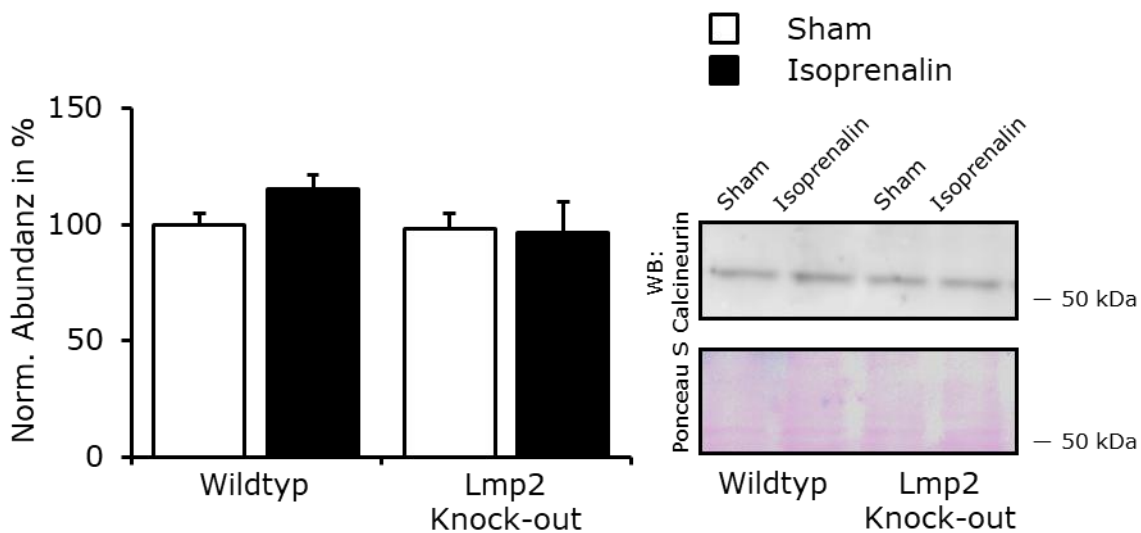


Abbildung 26: Untersuchung der Calcineurin-Abundanz. Calcineurin wurde auf Gesamtprotein (Ponceau S) normalisiert und quantifiziert; Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, n=5.

4.6.3 Untersuchung von interstitieller Kollagen-Einlagerung

Kollagen wurde nach Isoprenalinbehandlung bei Lmp2 Knock-out-Tieren interstitiell eingelagert (Abbildung 27). Um die unterschiedliche Größe des Interstitiums im Verhältnis zur Kardiomyozytenquerschnittsfläche zu berücksichtigen, wurde die gemessene Kollagen-Fläche auf jeweils 100 Kardiomyozyten normalisiert. Basierend auf der begrenzten Menge von drei biologischen Replikaten konnte so ein um ca. 40% signifikant höherer Gehalt an Kollagen I bezogen auf die Kardiomyozytenzahl in Lmp2 Knock-out-Tieren durch Isoprenalinbehandlung gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen festgestellt werden. Bei Kollagen III lag eine etwas schwächere, tendenziell erhöhte Einlagerung bei Lmp2 Knock-out-Mäusen vor.

4.7 Regulation sarkomerer Strukturen bei kardialer Hypertrophie

Ob die Zunahme an Herzgewicht, Hinterwanddicke und somit auch Muskelmasse direkt mit einer differenziellen Regulierung sarkomerer Strukturen in Verbindung gebracht werden kann, wurde in weiteren histologischen Untersuchungen überprüft. Desmin war in Z-Scheiben und interkalierenden Scheiben lokalisiert. Es konnten ebenfalls keine Agglomerate von Desmin detektiert werden (Abbildung 28). Außerdem wurden α -Actinin und F-Aktin analysiert. Hier wurde unabhängig von Behandlung und Genotyp eine gleichmäßige Struktur der Sarkomere festgestellt (Abbildung 29).

Per histologische Analyse konnte kein Unterschied in der Abundanz von Troponin I (TnI) festgestellt werden (Abbildung 30). Allerdings wurde eine vermehrte ungleichmäßige Lokalisation von TnI im Zellquerschnitt nach Isoprenalinbehandlung in Lmp2 Knock-out-Tieren erkannt, während in Sham-behandelten Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren sowie Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen die typische Struktur sarkomerer Elemente erkennbar war (vgl. Desmin-Struktur im Querschnitt, Abbildung 28).

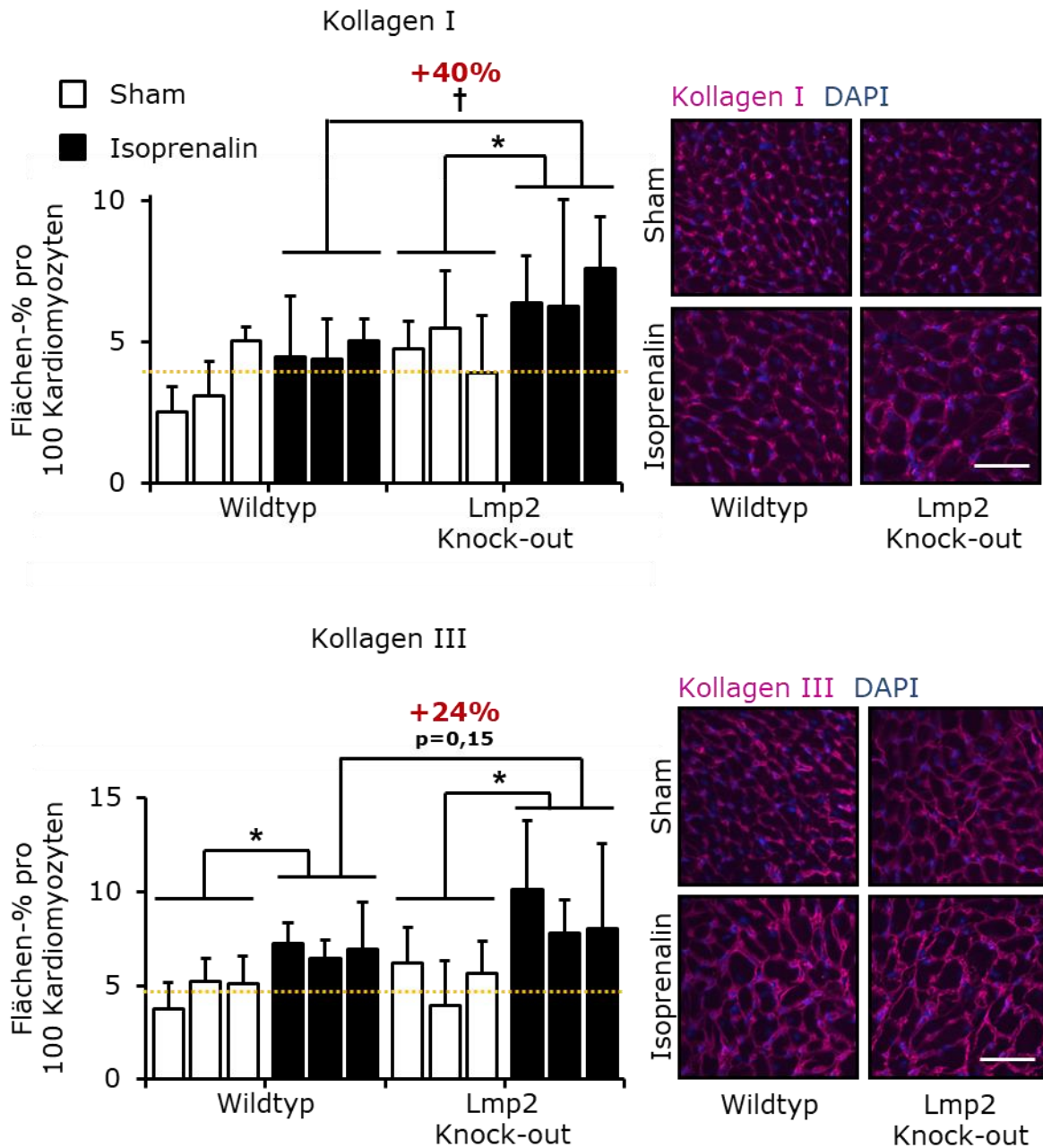


Abbildung 27: Histologische Analyse der interstitiellen Kollagen I- und III-Fläche nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung. Links: Absolute Quantifizierung und normalisiert auf jeweils 100 Kardiomyozyten. Die orange-gestrichelten Linien approximieren das Wildtyp-Sham-Niveau. Rechts: Repräsentative Aufnahmen; Messbalken: 50 μm ; * $p < 0,05$ gegenüber Sham, † $p < 0,05$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen, $n=3$; jeder Balken repräsentiert ein biologisches Replikat mit dem Mittelwert von 3-6 repräsentativen Ausschnitten \pm Standardabweichung.

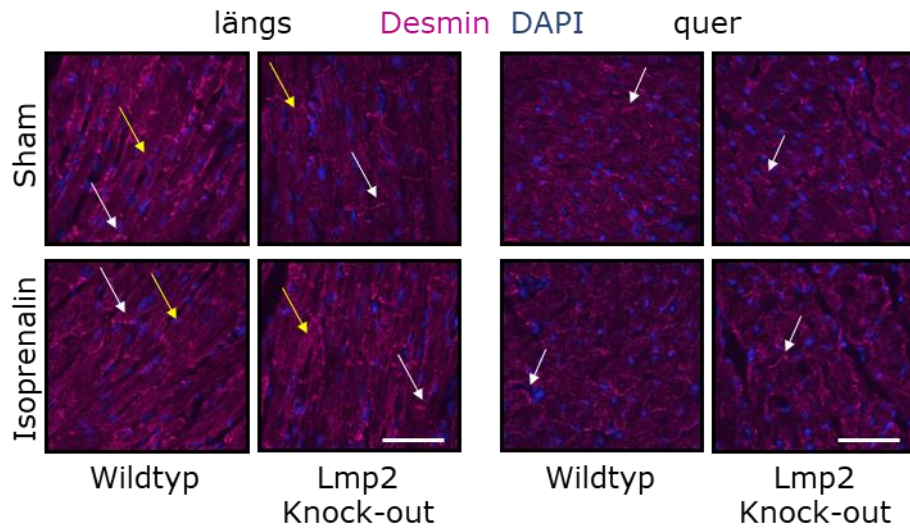


Abbildung 28: Repräsentative Aufnahmen der Desmin-Färbung in Kardiomyozytenlängs- und -querschnitt nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung. Weiße Pfeile deuten auf interkalierende, gelbe Pfeile auf Z-Scheiben. Messbalken: 50 μ m.

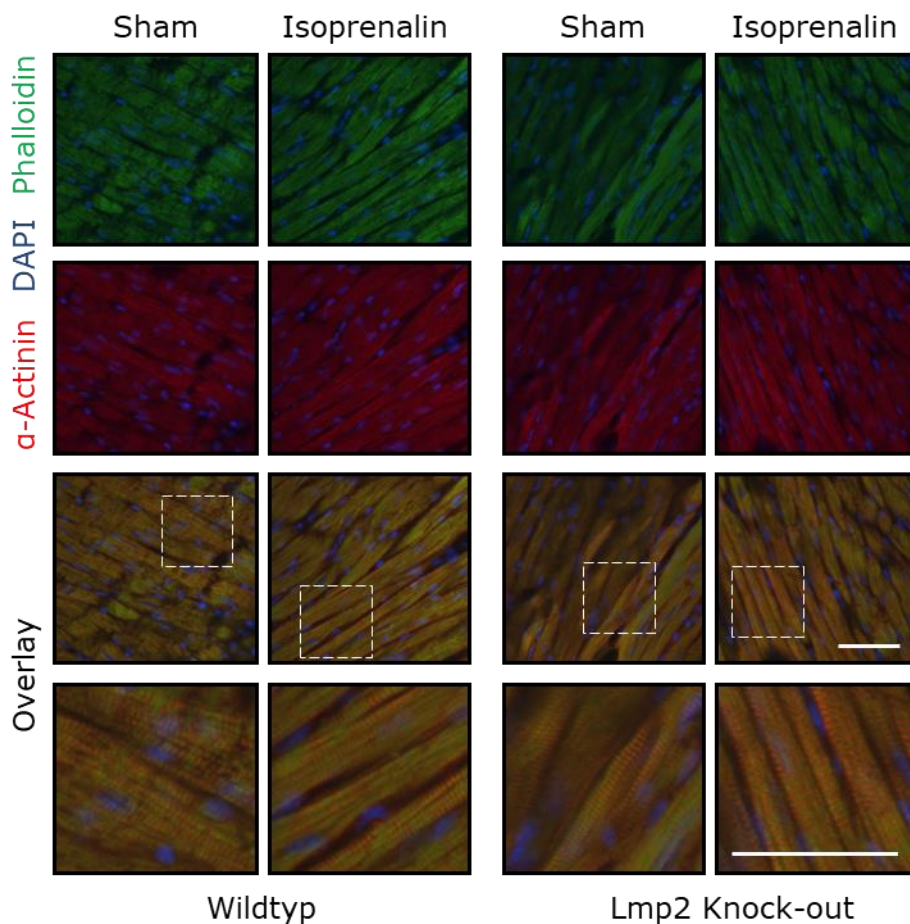


Abbildung 29: Repräsentative Aufnahmen der F-Aktin- und α -Actinin-Färbung im Kardiomyozytenlängsschnitt nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung. Die Auswertung erfolgte nach spezifischer Antikörperfärbung (α -Actinin) bzw. Phalloidinfärbung (F-Aktin). Ausgewählte Bereiche (gestrichelte Linien) wurden vergrößert dargestellt, um die abwechselnde Struktur von F-Aktin und α -Actinin qualitativ zu vergleichen. Messbalken: 50 μ m.

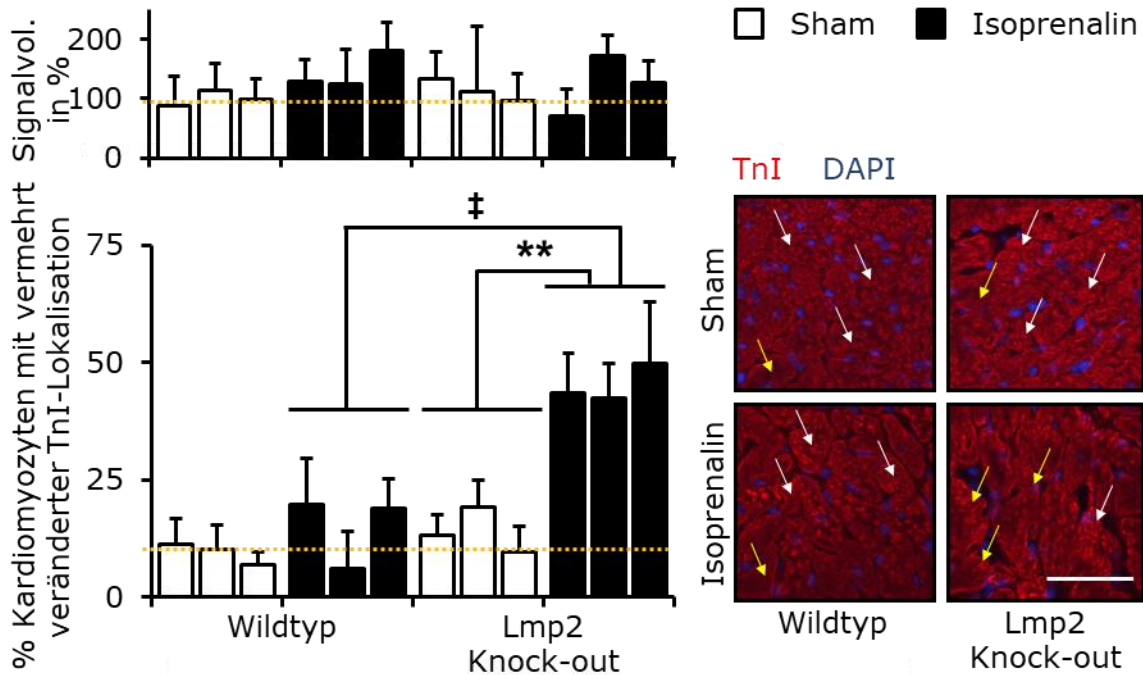


Abbildung 30: Histologische Analyse von Troponin I im Kardiomyozytenquerschnitt nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung. Links: Quantifizierung des TnI-Signalvolumens (oben) und der veränderten TnI-Lokalisation. Die orange-gestrichelten Linien approximieren das Wildtyp-Sham-Niveau. Rechts: Repräsentative Aufnahmen der TnI-Färbung. Quantifiziert wurden im Kardiomyozyten, in denen TnI verstärkt ungleichmäßig detektiert wurde (gelbe Pfeile) im Verhältnis zur jeweiligen Gesamt-Kardiomyozytenzahl. Die sarkomere TnI-Lokation ist mit weißen Pfeilen exemplarisch markiert. Messbalken: 50 μm ; ** $p < 0,01$ gegenüber Sham, $^{\ddagger}p < 0,01$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen, $n=3$; jeder Balken repräsentiert ein biologisches Replikat mit dem Mittelwert von 3-6 repräsentativen Ausschnitten \pm Standardabweichung.

4.8 Untersuchung der UPS-Funktion in Abhängigkeit von Lmp2

Inwieweit die veränderte Pathogenese im Isoprenalinmodell nach Verlust von kardialem Lmp2 mit veränderter Regulierung des UPS einhergeht, wurde durch die Messung proteasomaler Aktivitäten untersucht.

Basal wurde bei Lmp2 Knock-out-Mäusen tendenziell eine leichte Erhöhung proteolytischer 26S-Aktivitäten gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren festgestellt, die bei den Caspase-artigen Aktivitäten signifikant war (ca. +19%; Abbildung 31A). Dies konnte auch unter Sham-Behandlung nach AAV9-Injektion detektiert werden (Abbildung 31B). Hier wurden jedoch stärker erhöhte 26S Caspase-artige Aktivitäten ohne Lmp2-Gentransfer um ca. 41% gegenüber Lmp2-Gentransfer festgestellt. Nach Isoprenalinbehandlung konnte eine ca. 19% signifikante niedrigere 26S Trypsin-artige Aktivität nach Luciferase-Gentransfer gegenüber Lmp2-Gentransfer detektiert werden. Ferner lag eine nicht signifikant ca. 12% niedrigere 26S Chymotrypsin-artige Aktivität vor. Im Gegen-

satz dazu war die 26S Caspase-artige Aktivität ohne Lmp2-Gentransfer um ca. 14% erhöht.

Die beobachteten Regulationen der proteasomalen Aktivitäten wurden daraufhin im direkten Vergleich Isoprenalin- und Sham-behandelter Tiere genauer untersucht. Bei Wildtypen wurde nach Isoprenalinbehandlung ein signifikanter Anstieg der 26S-Aktivitäten gegenüber Sham um ca. 52-92% festgestellt (Abbildung 31C). Der Anstieg von 26S-Aktivitäten bei Lmp2 Knock-out-Tieren war weniger stark ausgeprägt (ca. 16-24% gegenüber Sham) und nur im Fall der Caspase-artigen Aktivität signifikant. Dies bedeutet, dass die zuvor beobachteten Unterschiede 26S-proteasomaler Aktivitäten nach Isoprenalinbehandlung durch eine geringere Erhöhung der Aktivitäten unter Berücksichtigung basaler Unterschiede in Abwesenheit von Lmp2 erklärt werden können.

Die Abundanz der regulatorischen 19S-Untereinheiten Rpn1 und Rpt4 wurde ebenfalls quantifiziert. Diese war nach Isoprenalinbehandlung nicht signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren reguliert (Abbildung 32). Beide Untereinheiten waren aber in Isoprenalin-behandelten Wildtypen stärker induziert als bei Lmp2 Knock-out-Tieren, wenn auch nicht signifikant.

Um zu überprüfen, wie die unterschiedliche Regulierung 26S-proteasomaler Aktivitäten den spezifischen Abbau von Proteinen beeinflusst, wurden Lys₄₈-polyubiquitinylierte Proteine per Immunfluoreszenz quantifiziert. Hier wurde eine geringere Abundanz nach Isoprenalinbehandlung um ca. 25-27% festgestellt, welche sich jedoch nicht zwischen Isoprenalin-behandelten Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren unterschied. Auch lokale Akkumulationen konnten nicht beobachtet werden (Abbildung 33). Die detektierte gleichmäßige Abundanz wurde daraufhin per Western Blot im Direktvergleich der Isoprenalin-behandelten Tiere bestätigt. Auffällig war eine Bande bei ca. 50 kDa (ubiquitinyliertes Protein 1, *UPI*), welches bei Lmp2 Knock-out-Mäusen signifikant geringer abundant war als bei Wildtyp-Kontrolltieren.

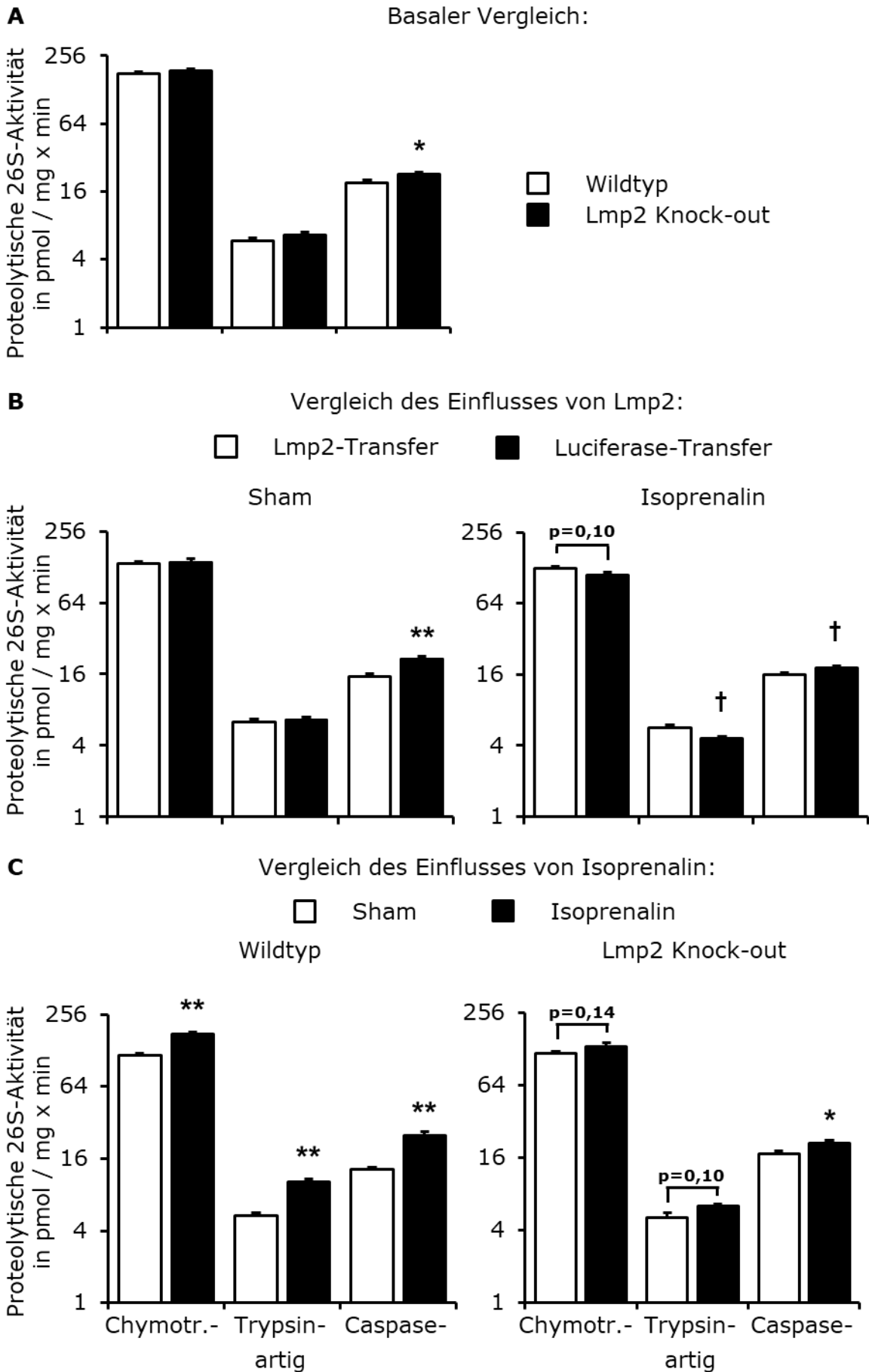


Abbildung 31: Aktivitätsassays zur Analyse 26S-proteasomaler Aktivitäten. **A:** Basaler Vergleich der Proteasomaktivität in Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren; * $p < 0,05$ gegenüber Wildtypmäusen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=5$; **B:** Vergleich des Einflusses von Lmp2 auf Proteasomaktivitäten (abhängig von Sham- bzw. Isoprenalinbehandlung; ** $p < 0,01$ gegenüber Sham-Behandlung und Lmp2-Gentransfer, $^{\dagger}p < 0,05$ gegenüber Isoprenalinbehandlung und Lmp2-Gentransfer, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=5$; **C:** Vergleich des Einflusses von sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung auf Proteasomaktivitäten (abhängig von Lmp2); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gegenüber Sham, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=5$.

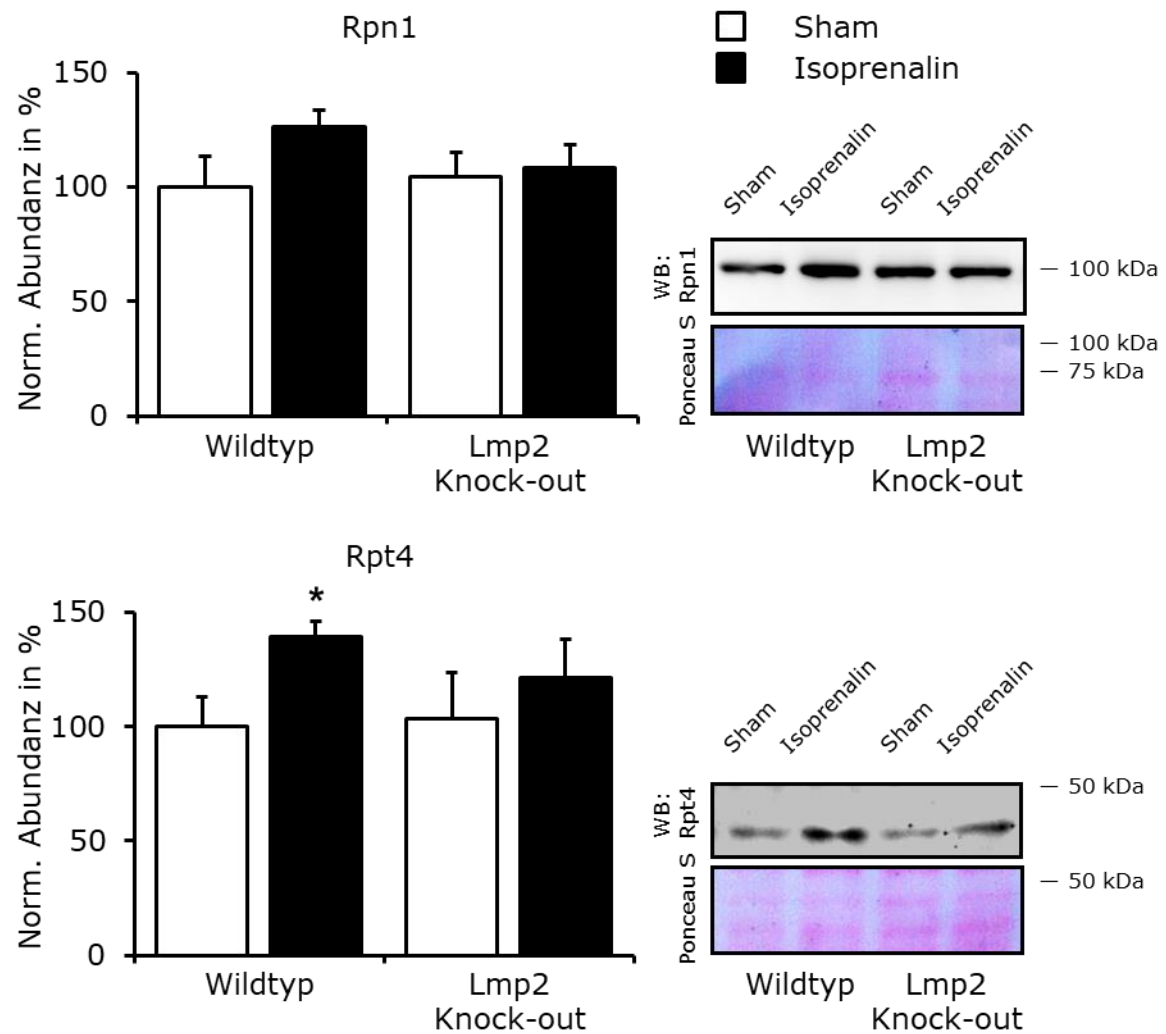
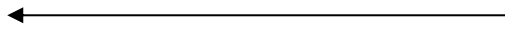


Abbildung 32: Quantifizierung regulatorischer 19S-Untereinheiten nach Isoprenalinbehandlung. Repräsentativ wurden Rpn1 und Rpt4 detektiert und quantifiziert (Abundanz normalisiert auf Gesamtprotein); * $p < 0,05$ gegenüber Sham; Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=5$.

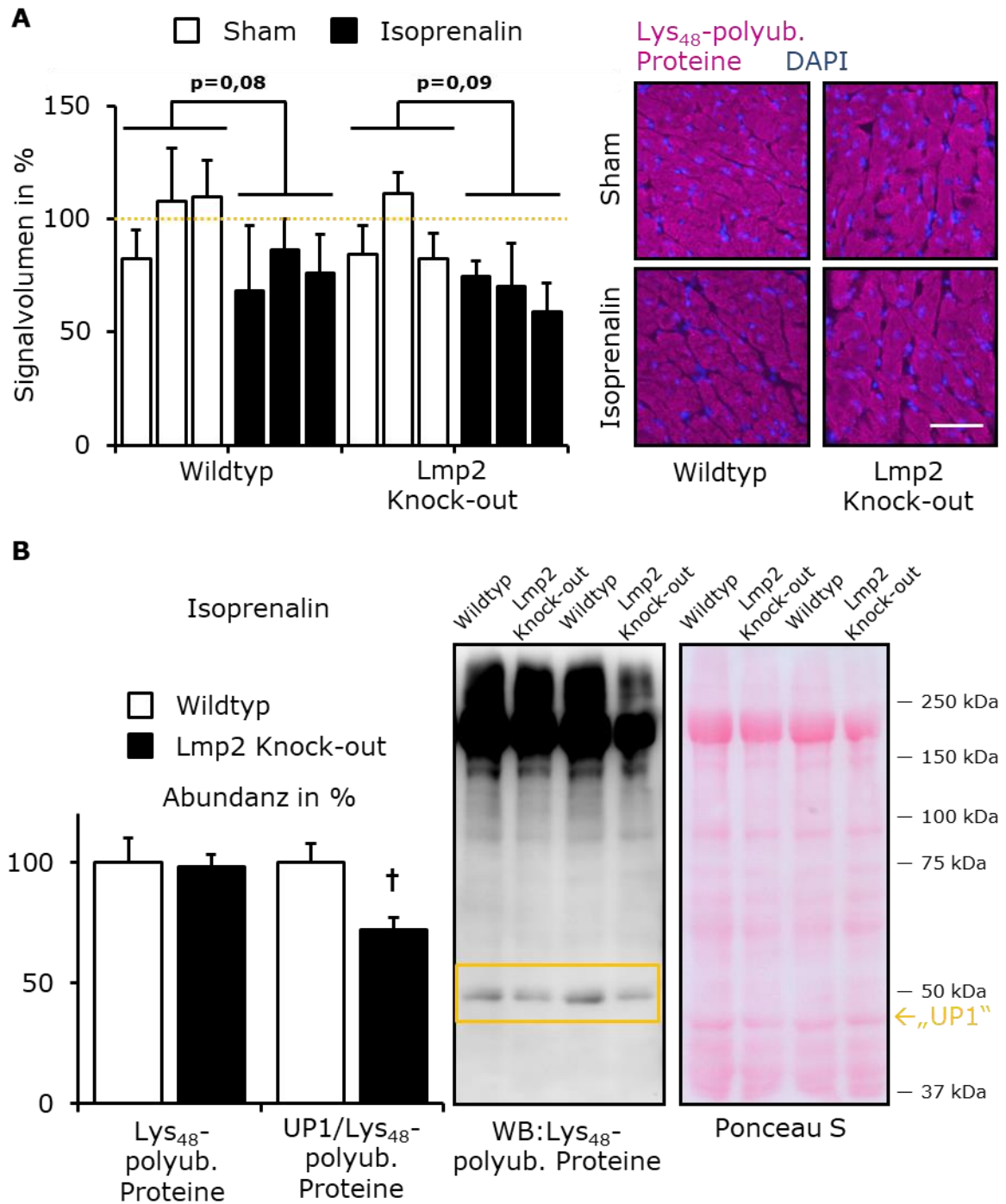


Abbildung 33: Untersuchung der Abundanz polyubiquitinylierter Proteine nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung. **A:** Histologische Analyse. Links: Quantifizierung des Signalvolumens. Die orange-gestrichelte Linie approximiert das Wildtyp-Sham-Niveau; rechts: repräsentative Aufnahmen der Färbung. Messbalken: 50 μ m; n=3; jeder Balken repräsentiert ein biologisches Replikat mit dem Mittelwert von 3-6 repräsentativen Ausschnitten \pm Standardabweichung. **B:** Proteinbiochemische Analyse Lys₄₈-polyubiquitinylierter Proteine. Links: Quantifizierung per Western Blot (Abundanz normalisiert auf Gesamtprotein); Rechts: Repräsentative Aufnahmen; $^{\dagger}p<0,05$ gegenüber Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, n=5.

4.9 DIGE-Analyse differenziell regulierter Proteine

Um den Einfluss des Verlusts von Lmp2 auf Proteomebene zu erfassen, erfolgte eine weiterführende Analyse per 2-D-DIGE. Auf zehn Gelen konnten nach Filtern irrelevanter Spots zwischen 2773 und 3165 Spots detektiert werden. Das Gel mit den meisten detektierten Spots wurde daraufhin als Master-Gel definiert. Darauf basierend konnten zwischen 1986 und 2163 Spots gematcht werden.

Danach wurde nach Proteinen gesucht, deren Regulation durch Isoprenalin abhängig vom Genotyp ist. Daher wurde die statistische Untersuchung mithilfe zweifaktorieller ANOVA durchgeführt (Abbildung 7). Es wurde nach Proteinen gefiltert, die in mindestens acht Gelen detektiert werden konnten. Dabei waren 139 reale Spots signifikant ($p < 0,05$) reguliert. Für weitere Analysen wurde nach regulierten Spots mit $p_i \leq 0,01$ gefiltert, welches auf 36 durch Isoprenalin und Lmp2 Knock-out differenziell regulierte Proteine zutraf (Abbildung 34, Tabelle 10).

Dabei wurden elf Proteine detektiert, deren Isoprenalin-induzierte veränderte Abundanz mindestens um den Faktor 1,5 bei Lmp2 Knock-out-Tieren verringert war, sowie zehn Proteine, deren Abundanzänderung mindestens 1,5-fach erhöht war. Bei elf weiteren Proteinen war die Isoprenalin-induzierte Abundanzänderung durch Lmp2 Knock-out mindestens um den Faktor 1,25 schwächer, während sie bei einem weiteren Protein mindestens um denselben Faktor erhöht war. Bei 27 von diesen 36 Proteinen wurde eine gegenläufige Regulation festgestellt, d.h. Isoprenalin-abhängige Erhöhung der Abundanz bei Wildtypmäusen und Verringerung bei den Lmp2 Knock-out-Tieren oder umgekehrt.

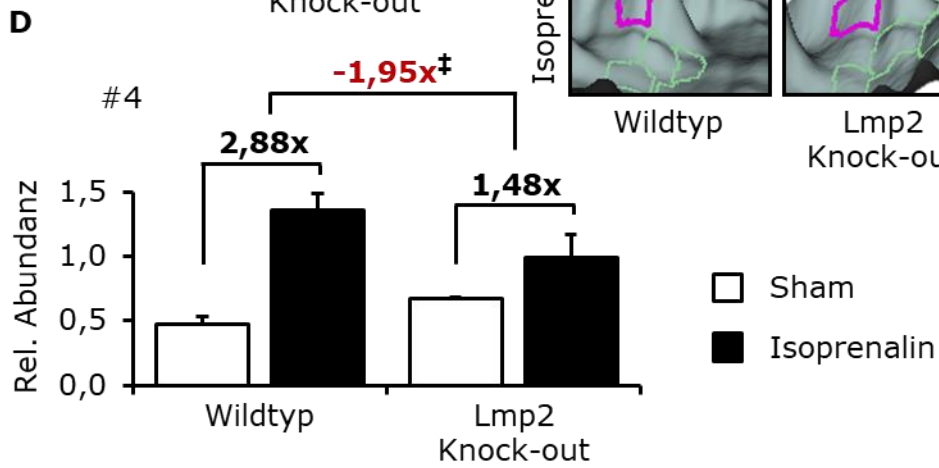
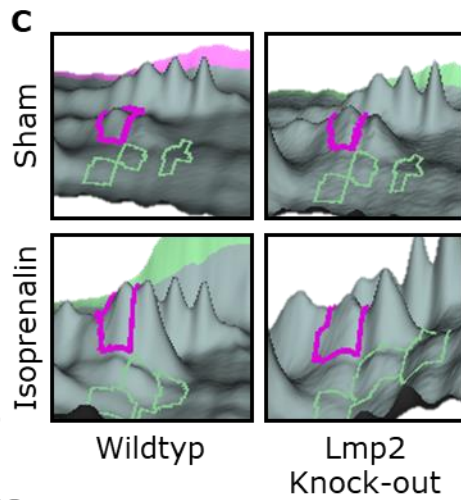
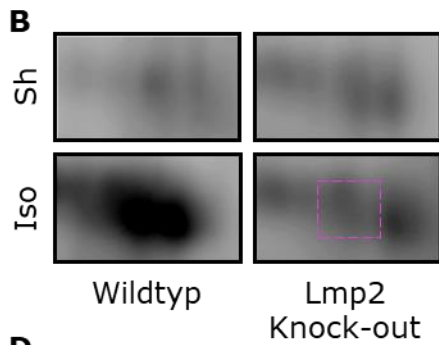
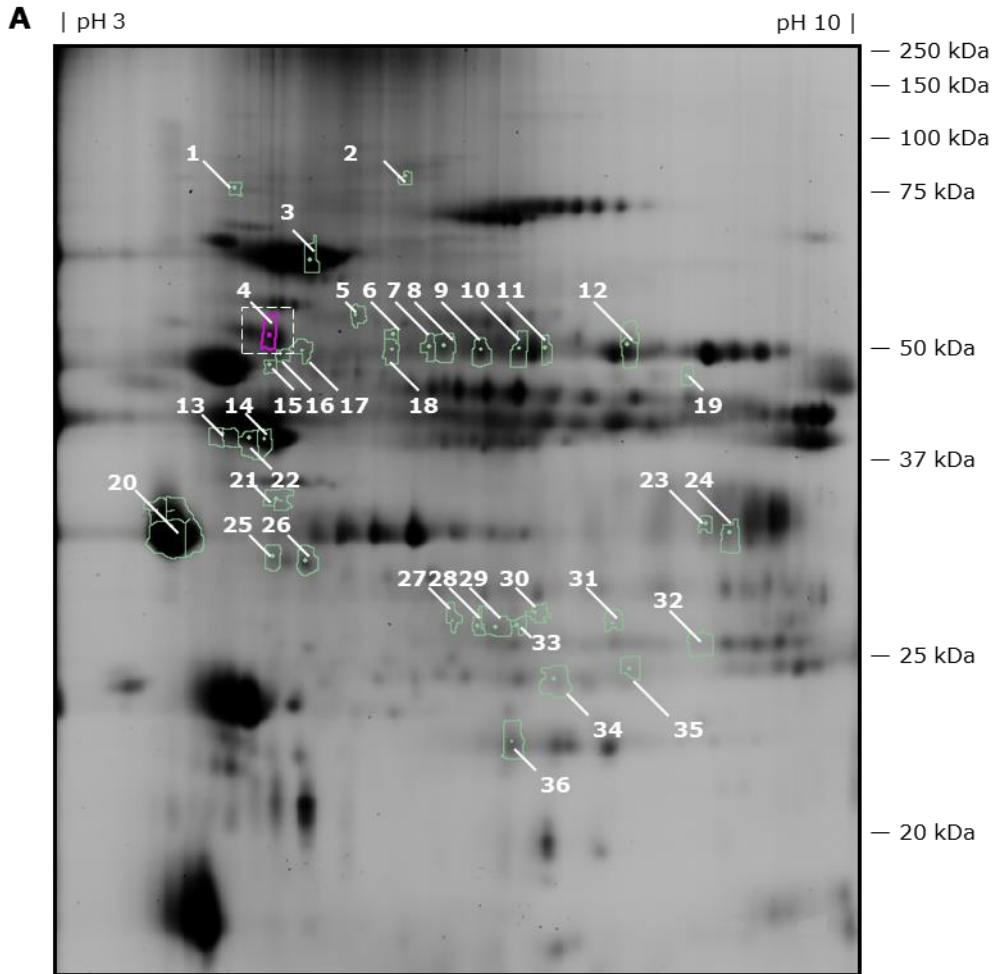


Abbildung 34: DIGE-Analyse differenziell regulierter Proteine mithilfe der DeCyder-Software. A: Repräsentatives 2-D-Gel. Dargestellt sind Proteine, welche durch die Interaktion zwischen Behandlung und Genotyp signifikant unterschiedlich reguliert sind ($p < 0,01$). Die Nummerierung der Spots bezieht sich auf Tabelle 10. B: Vergrößerung eines Protein-Spots (weiß-gestrichelter Ausschnitt in A). Sh: Sham-, Iso: Isoprenalinbehandlung; C: 3-D-Darstellung des relativen Spotvolumens in der DeCyder-Software. D: Quantifizierung des Spotvolumens (magenta-gestrichelter Ausschnitt in B) normalisiert auf den jeweiligen IPS (relative Abundanz); $^{\ddagger}p_i < 0,01$ nach zweifaktorieller ANOVA, Mittelwert \pm Fehler des Mittelwerts, $n=5$.

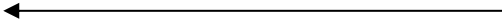


Tabelle 10: Übersicht differenziell regulierter Proteine mit $p \leq 0,01$ (1,00E-02). Die Nummerierung der Spots (#) bezieht sich auf Abbildung 34A. Master-ID kennzeichnet die eindeutige Spot-Nummer auf dem Master-Gel. Aufgelistet sind die relativen Abundanzänderungen einzelner Spots durch die Isoprenalinbehandlung bei beiden Genotypen sowie jeweils das Verhältnis der Abundanzänderungen beider Genotypen. x markiert Proteine, die gegenläufig zwischen den Genotypen reguliert sind.

#	Master-ID	Wildtyp Isoprenalin vs. Sham	Lmp2 Knock-out Isoprenalin vs. Sham	Regulation Lmp2 Knock-out vs. Wildtyp		p_i
1	778	1,53	1,00	-1,53		6,50E-03
2	755	-2,45	-1,03	2,38		8,40E-04
3	1045	1,14	2,07	1,82		5,20E-03
4	1333	2,88	1,48	-1,95		7,70E-03
5	1290	1,02	1,25	1,23		4,40E-03
6	1349	1,82	-1,15	-2,09	x	4,90E-03
7	1386	1,46	-1,18	-1,72	x	1,00E-02
8	1390	1,39	-1,18	-1,64	x	7,10E-03
9	1396	1,31	-1,13	-1,48	x	7,80E-03
10	1392	1,33	-1,12	-1,49	x	8,50E-03
11	1393	1,33	-1,05	-1,40	x	9,90E-03
12	1384	1,38	-1,06	-1,46	x	9,60E-03
13	3072	1,22	-1,20	-1,46	x	2,70E-03
14	1590	1,61	-1,24	-2,00	x	6,20E-03
15	1418	1,39	1,06	-1,31		5,80E-03
16	1376	3,07	1,46	-2,10		7,40E-03

Ergebnisse

Tabelle 10 (Fortsetzung): Übersicht differenziell regulierter Proteine mit $p \leq 0,01$ (1,00E-02).

#	Master-ID	Wildtyp Isoprenalin vs. Sham	Lmp2 Knock-out Isoprenalin vs. Sham	Regulation Lmp2 Knock-out vs. Wildtyp	p_i
17	1379	1,76	-1,02	-1,80 x	7,40E-03
18	1389	1,36	-1,12	-1,52 x	3,30E-04
19	1454	1,31	1,01	-1,30	3,70E-03
20	3153	1,05	-1,28	-1,34 x	4,40E-03
21	1788	-1,62	1,47	2,38 x	8,40E-03
22	1574	1,29	-1,31	-1,69 x	3,30E-03
23	1845	1,13	-1,12	-1,27 x	1,00E-02
24	1883	1,51	1,07	-1,41	6,00E-03
25	1915	1,27	-1,08	-1,37 x	4,80E-03
26	1925	1,19	-1,04	-1,24 x	1,90E-03
27	2114	-1,56	1,22	1,90 x	4,80E-04
28	2128	-2,15	1,10	2,37 x	5,80E-05
29	2133	-1,58	1,22	1,93 x	5,80E-04
30	2098	-1,43	1,14	1,63 x	2,10E-03
31	2104	-1,72	1,10	1,89 x	1,80E-03
32	2170	1,41	-1,10	-1,55 x	5,20E-03
33	2118	-1,23	1,22	1,50 x	5,90E-03
34	2273	-1,38	1,04	1,44 x	4,70E-03
35	2236	-1,45	1,04	1,51 x	4,30E-03
36	2426	1,06	-1,11	-1,18 x	6,60E-03

5 Diskussion

5.1 Induktion von Lmp2 als genereller Mechanismus hypertropher Adaption

Drews *et al.* zeigten 2010, dass in Antwort auf hypertrophe Stimulation mit Isoprenalin eine heterogene Induktion von konstitutiven wie induzierbaren proteasomalen Untereinheiten erfolgt.¹⁰⁶ Unter den signifikant erhöht exprimierten Untereinheiten war Lmp2 die einzige, welche zu allen untersuchten Zeitpunkten (30 Minuten, 24 Stunden, sieben Tage) induziert war.¹⁰⁶ Li *et al.* zeigten, dass auch bei Angiotensin II-induzierter Hypertrophie nach sieben Tagen mit unveränderter bzw. 14 Tagen mit verringerter Herzfunktion Lmp2 kardial induziert wird.¹⁰⁵ In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass auch bei einer hereditären Form der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) Lmp2 im chronischen Stadium induziert wird. Wie auch in den zuvor genannten Modellen kann auch bei HCM neben der Lmp2-Induktion eine Erhöhung 26S-proteasomaler Aktivitäten beobachtet werden.¹⁰⁴ Nicht abgeschlossene Untersuchungen deuten ebenfalls auf eine Induktion von Lmp2 im chronischen Verlauf des durch transverse Aortenkonstriktion (TAC)-bedingten Remodellings hin (Daten nicht aufgeführt). Besonders dabei ist, dass trotz verschiedener Ausmaße der Umbauprozesse mit Erhöhung bis hin zu massivem Verlust kardialer Funktion Lmp2-Induktion als gemeinsamer Mechanismus festgestellt werden konnte. Offen bleibt soweit, ob die Induktion von Lmp2 mit der Erhöhung der 26S-proteasomalen Aktivitäten im Zusammenhang steht und ob dies adaptiv oder maladaptiv in Bezug auf die Pathogenese des kardialen Remodellings ist.

5.2 Lmp2 ist nicht essentiell für basale Herzentwicklung und initiale Antwort auf hypertrophe Stimulation

Für die Untersuchung der spezifischen Funktion der Lmp2-Induktion in der Entwicklung der Herzhypertrophie wurden Lmp2 Knock-out Mäuse verwendet, welche unter basalen Bedingungen keinen offensichtlichen Phänotyp in punkto körperliche Entwicklung oder Verhalten besitzen.⁷² In einer erweiterten kardialen Phänotypisierung konnte gezeigt werden, dass Verlust von Lmp2 ebenfalls keine offensichtlichen Änderungen in der kardialen Entwicklung oder Funktion unter basalen Bedingungen hervorruft. Mit Analyse der proteasomalen Aktivitäten unter basalen Bedingungen und Sham-Bedingungen nach kardiotropem Lmp2-Gentransfer wurde gezeigt, dass proteasomale

Aktivitäten nach Verlust von Lmp2 erhöht waren, was sich am deutlichsten in der Caspase-artigen 26S-proteasomalen Aktivität zeigte. Stärkere Erhöhungen einzelner Aktivitäten nach Luciferase-Transfer, könnten damit im Zusammenhang stehen, dass Luciferase proteasomal degradiert wird¹³¹ und als nicht endogenes Protein potenziell Signalwege und proteasomale Aktivitäten stimuliert. Allerdings kann nicht schlussendlich erklärt werden, ob die größere Differenz durch geringere Caspase-artige Aktivitäten nach Lmp2-Gentransfer oder höhere Aktivitäten nach Luciferase-Gentransfer (oder eine Kombination von beidem) ausgelöst wird. Die kardiale Erhöhung Caspase-artiger Aktivitäten bei Abwesenheit von Lmp2 war bereits zuvor neben verringerten Chymotrypsin- und Trypsin-artigen Aktivitäten beobachtet worden.¹¹⁸ Diese Ergebnisse sind allerdings nur eingeschränkt vergleichbar, da proteasomale Aktivitäten unterschiedlich bestimmt wurden (Messung der linearen Phase der Kinetik bei 37 °C in dieser Studie gegenüber Endpunktmessung nach 24 h und Raumtemperatur bei Cai *et al.*).¹¹⁸ Ebenfalls waren keine offensichtlichen Unterschiede im Pool Lys₄₈-polyubiquitylierter zumindest histologisch unter Sham-Bedingungen erkennbar. Die Erhöhung Caspase-artiger Aktivität scheint daher unter basalen Bedingungen physiologisch kompensiert werden zu können.

Als hypertropher Reiz wurde Isoprenalin über sieben Tage konstant freigesetzt (30 mg/kg/d). Nach vier Tagen zeigten Lmp2 Knock-out-Tiere eine Steigerung der kardialen Funktion und Anzeichen einer kardialen Hypertrophie (Zunahme der Hinterwanddicke), welche so auch in Isoprenalin-behandelten Wildtypmäusen beobachtet werden konnte. Eine vergleichbare kardiale Stimulation hatte es in Lmp2 Knock-out-Tieren nicht gegeben. Bei Mäusen, die in Kardiomyozyten eine proteolytisch inaktive β 5-Variante überexprimieren,¹¹⁵ waren in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen (fünf Tage TAC) Dilatation und Nekrose ausgelöst worden.¹¹⁶ Bei TAC ist zwar die mechanische Beanspruchung durch die erhöhte Nachlast stärker als bei Isoprenalinbehandlung, allerdings ist die rapide Entstehung einer exzentrischen Hypertrophie bemerkenswert. Im vorliegenden Modell wurde nach vier Tagen kein derartig anderer Umbauprozess beobachtet.

Weder die hypertrophe (Mal)adaption noch die initiale β -adrenerge Signaltransduktionen scheinen daher von Lmp2 direkt abhängig zu sein, was vor allem vor dem Hintergrund der proteasomalen Kontrolle des β -adrenergen Signalings, z.B. via GRK2,¹³² bemerkenswert ist. Eine alternative Erklärung wäre, dass entsprechende Abhängigkeiten zumindest initial kompensiert werden können.

5.3 Kardiales Lmp2 ist notwendig zur Erhaltung der Kontraktilität

Der weitere Versuchsverlauf über vier Tage hinaus ging mit einem Rückgang der systolischen Funktion bis unter das Ausgangsniveau bei Lmp2 Knock-out-Tieren einher. Ein signifikanter Rückgang der Kontraktilität gegenüber dem Basalwert ist in der gewählten Dosierung von Isoprenalin bislang selbst bei einer Applikation über 14 Tage nicht beobachtet worden.¹⁸ Nur bei starker Erhöhung der Dosis (60 mg/kg/d) wurde ein derartiger Rückgang bis hin zum Pumpversagen beobachtet.¹⁸ Gängige und hier verwendete Parameter systolischer Funktion (Verkürzungsfraction,¹³³ Auswurffraction,¹⁰⁶ circumferentielle Verkürzungsgeschwindigkeit)¹⁸ basieren auf der Verkürzung des linksventrikulären inneren Durchmessers von der Enddiastole zur Endsystole.^{29, 31} Da dies nur indirekt die Kontraktion und Inotropie des Endokards wiedergibt und der interne Durchmesser nicht nur funktionell, sondern auch anatomisch von dem Umbauprozess beeinflusst wird, wurde die Auswertung um eine Analyse des endokardialen Strain erweitert, um eine Abhängigkeit von dem Remodelling *per se* zu minimieren.^{42, 43}

Im hier angewandten Modell wurde der circumferentielle Strain sowie dessen Geschwindigkeit (Strain Rate) in der kurzen Achse als Indikator ventrikulärer Kontraktion verwendet. Der longitudinale Strain ist aufgrund der geringen Größe des Mausherzens nicht stark genug ausgeprägt und daher nicht aussagekräftig anwendbar.⁴⁴ Besonderer Fokus wurde auf den maximal erreichten Strain bzw. die maximale Strain Rate gelegt.¹³⁴ Wie die konventionell gemessenen Parameter waren Strain und Strain Rate nach vier Tagen in Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren gleichmäßig erhöht, sanken aber danach in Abwesenheit von Lmp2 wieder ab. Die indirekt gemessene, verminderte Kontraktilität kann daher durch eine verringerte Kontraktionskraft und -geschwindigkeit erklärt werden.

Neben der systolischen wurde auch die diastolische Funktion untersucht. Hier konnte ein Anstieg des E/A-Verhältnisses zwischen vier und sieben Tagen in Lmp2 Knock-out-Mäusen beobachtet werden, welche maßgeblich durch einen Rückgang der A-Welle (aktive diastolische Funktion) vorangetrieben wurde. Die E-Welle, welche entsprechend die passive, auf Relaxation beruhende diastolische Füllphase repräsentiert, war nach vier und sieben Tagen in beiden Gruppen gleichmäßig erhöht. Analog wurde die maximale circumferentielle Strain Rate während der Diastole ermittelt. Diese verlief kongruent zur systolischen. Bei zunehmender diastolischer Dysfunktion durch verringerte Lusitropie war zuvor eine Verlangsamung der diastolischen im Vergleich zur systoli-

schen Strain Rate erkennbar gewesen.¹³⁵ Daher ist die Lusitropie Lmp2-unabhängig reguliert. Die Daten der Gewebe-Doppler-Messungen (nicht aufgeführt) ergaben keine zusätzlichen Interpretationsmöglichkeiten und werden daher nicht weiter diskutiert.

Eine verringerte aktive Ventrikelfüllung, wie sie die A-Welle wiedergibt, kann durch verringerte linksventrikuläre Compliance sowie eine reduzierte linksatriale Kontraktilität verursacht sein.¹³⁶ Daher wurde untersucht, ob die Compliance als Funktion des Ventrikelvolumens durch eine Aortenregurgitation beeinträchtigt wird.¹³⁷ Dabei wurde zuerst die Weite des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) bestimmt, da davon ausgegangen wurde, dass bei großer Weitung der Aorta die Aortenklappen in der kurzen Zeit (sieben Tage) nicht ausreichend wachsen würden, um einen vollständigen Klappenschluss zu gewährleisten und somit eine Regurgitation begünstigen.¹³⁸ Hier war Lmp2-abhängig kein Unterschied nach Isoprenalinbehandlung feststellbar. In Ergänzung wurde der Blutfluss ventrikelwärts an der Aortenklappe während der Diastole gemessen, da dessen Integral bei gleichem LVOT die diastolisch rückfließende Blutmenge widerspiegelt. Bei beiden Gruppen wurde ein geringer Rückfluss direkt an der Aortenklappe festgestellt. Dies ist die Blutmenge, die diastolisch gegen die Klappe drückt, aber nicht hindurchfließt. Eine signifikante Aortenregurgitation konnte daher bei Lmp2 Knock-out-Tieren nicht festgestellt werden. Die Compliance kann jedoch ebenfalls durch das systolische Restvolumen aufgrund einer verringerten Kontraktilität verursacht werden. Ob die beobachtete diastolische Dysfunktion daher hauptsächlich auf einer verringerten atrialen Kontraktilität oder einer verringerten ventrikulären Compliance beruht, ist nicht abschließend beurteilbar; vermutlich spielen aber beide Faktoren eine Rolle.

Lmp2 wurde in vorherigen Arbeiten unserer Gruppe bereits erfolgreich myokardial transferiert, wodurch geringere kardiale Hypertrophie und eine verbesserte Herzfunktion als in gleichbehandelten Tieren mit Kontroll-Gentransfer beobachtet wurde.¹²¹ Um den hier beobachteten Verlust der kardialen Funktion in Lmp2 Knock-out-Tieren ausschließlich kardialem Lmp2 zuweisen zu können, wurde Lmp2 auch in der vorliegenden Arbeit vor Hypertrophie-Induktion per Gentransfer bei Lmp2 Knock-out-Mäusen kardiotrop re-exprimiert. Die durchgeführte Studie ist allerdings die erste, in der Wildtyp-tiere, Lmp2 Knock-out-Mäuse ohne Gentransfer sowie mit Lmp2-Rekonstitution und Luciferase-Kontrolltransfer parallel behandelt wurden und somit ohne Einschränkung statistisch vergleichbar waren. Lmp2 und Luciferase wurden erfolgreich kardial exprimiert, ohne dass ein kardialer Phänotyp sichtbar wurde. Detektiert wurden das Lmp2-

Propeptid, welches im proteasomalen Zusammenbau in 20S-Proteasomen eingefügt und beim Zusammenbau zweier „Halb-Proteasomen“ zu funktionellem Lmp2 prozessiert wird,^{91, 92, 139} sowie prozessiertes Lmp2. Die Detektion von prozessiertem Lmp2 kann daher als Hinweis zur wiederhergestellten Lmp2-Inkorporation aufgefasst werden.¹²¹ Deswegen wurde prozessiertes Lmp2 im Vergleich zu Wildtypen unter Sham-Bedingungen quantifiziert, welches vergleichbare Expressionslevel anzeigte. So konnte bereits von Koser exemplarisch gezeigt werden, dass die Lmp2-Induktion nach Isoprenalinbehandlung ebenfalls wiederhergestellt wird.¹²¹ Außerdem wurde Lmp2 proteasomal inkorporiert.¹²¹ Auf Basis der echokardiographischen Beurteilung der Herzfunktion war der Krankheitsverlauf von Lmp2 Knock-out-Tieren mit Lmp2-Rekonstitution nicht unterscheidbar von dem in Wildtypmäusen sowie der mit Luciferase transduzierten Kontrolltieren nicht unterscheidbar von dem in Lmp2 Knock-out-Mäusen ohne Gentransfer. Die beobachtete Verschlechterung der Herzfunktion unter Isoprenalin-Behandlung bei den global Lmp2-defizienten Tieren konnte kurz zusammengefasst mithilfe der kardialen Rekonstitution von Lmp2 verhindert werden, obwohl die Tiere vollständig ohne Lmp2 aufgewachsen waren. Sie ist damit auf den Verlust von Lmp2 im Herzen ohne periphere Einflüsse zurückzuführen.

5.4 Verlust von Lmp2 verstärkt kardiales Remodelling

Die erhöhte Anforderung an die kardiale Muskulatur zur Aufrechterhaltung der unter Isoprenalin erhöhten Inotropie löst hypertrophe Adaption aus.¹⁶ Interessanterweise war diese nach vier Tagen nahezu gleich zwischen Wildtypmäusen und Lmp2 Knock-out-Tieren, nach sieben Tagen allerdings wesentlich stärker in Abwesenheit von Lmp2 ausgeprägt, welches durch eine um 65% größere Zunahme des Herzgewicht/Körpergewicht-Quotienten, eine um 7% dickere linksventrikuläre Hinterwand und eine ebenfalls um 65% stärkere Vergrößerung der Kardiomyozytenquerschnittsfläche angezeigt wurde. Während diese Betrachtung der Kardiomyozyten somit eine konzentrische Hypertrophie auf zellulärer Ebene,⁹ sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von Lmp2, suggeriert, ergab die Messung des Ventrikeldurchmessers in der Diastole die Tendenz eines *outward*-Remodellings in Abwesenheit von Lmp2, die auf unterschiedliche pro-hypertrophe Mechanismen in Abhängigkeit von Lmp2 hindeutet (s.u.).

Eine weitere strukturelle Adaption bei kardialer Überlastung ist die vermehrte Kollageneinlagerung, welche zur Fibrose führt. In der vorliegenden Arbeit wurden spezifisch die Kollagene I und III quantifiziert, da diese den Großteil der extrazellulären Matrix

im Herzen ausmachen.¹⁴⁰ Bei Isoprenalin konnte in der verwendeten Dosierung zuvor erst nach 14 und mehr Tagen, nicht aber nach sieben Tagen, interstitielle Fibrose beobachtet werden.^{17, 18, 141} In einer vorhergehenden Arbeit unserer Gruppe konnte erstmals gezeigt werden, dass Verlust von kardialem Lmp2 potenziell bereits nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung eine interstitielle Fibrose initiiert, welches durch Masson-Färbung nachgewiesen wurde.¹²¹ Mit dem spezifischem Kollagennachweis in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kollagen I signifikant höher in den Herzen von hypertrophen Lmp2 Knock-out-Herzen eingelagert wird als in die Herzen hypertropher Wildtypmäuse. Bei Kollagen III lag eine etwas schwächere Akkumulation vor. Beide Kollagene akkumulierten interstitiell. Histologisch deutlichere Phänotypen mit z.T. auch perivaskulären Ausprägungen wären bei Modellen wie TAC, Myokardinfarkt oder Angiotensin II aufgrund deren andersartigen Pathophysiologie zu erwarten.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Letztendlich würde eine massive Einlagerung von Kollagenen endokardiale Steifigkeit erzeugen und damit die diastolische Funktion (insbesondere in der passiven Phase) und den Strain beeinflussen.⁴⁶ Eine derart ausgeprägte diastolische Dysfunktion wurde aber nicht festgestellt (s.o.). Ebenfalls korreliert die Einlagerung von Kollagen III stärker mit der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion bei HCM-Patienten als Kollagen I.¹⁴⁵ Daher liegt bei den Lmp2-defizienten Mäusen eine frühe Phase der fibrotischen Entwicklung vor und diese ist noch nicht voll ausgeprägt. Das Auftreten einer milden interstitiellen Fibrose könnte eine Maladaptation in Zusammenhang mit einer verringerten systolischen Funktion sein¹⁴⁶ oder die Folge einer erhöhten Isoprenalin-induzierten Stimulation von kardialen Fibroblasten,¹⁴⁷ welche Lmp2-abhängig reguliert sein könnte. Beides ist noch hypothetisch und bedarf weiterer, z.B. proteomischer (s.u.), Analysen.

Isoprenalin-bedingte hypertrophe Adaption beinhaltet die Vergrößerung der Zahl an Sarkomeren.⁵ Die Homöostase zwischen Synthese und Degradation kontrakturer Strukturen ist gerade bei verstärkter Synthese essentiell, um Aggregate fehlgefalteter oder beschädigter sarkomerer Proteine zu verhindern. Im transgenen Mausmodell konnte Proteasomaktivierung Desmin-assoziierte Kardiomyopathie mindern.¹⁴⁸ In einer vorausgehenden Arbeit unserer Gruppe untersuchte Koser bereits die differenzielle Regulation sarkomerer Proteine in Lmp2 Knock-out-Mäusen nach Lmp2- bzw. Luciferase-Gentransfer und siebentägiger Isoprenalinbehandlung mittels proteinbiochemischer und histologischer Analyse.¹²¹ Auch in ihrer Arbeit konnte sie zeigen, dass Desmin nach Isoprenalinbehandlung Lmp2-unabhängig eine gleichmäßige Struktur ausbildet und in Z-Scheiben und interkalierenden Scheiben lokalisiert ist. Gleichzeitig war auch in dieser

Arbeit keine quantitative Regulation oder Agglomeration auffällig. Die α -Actinin/F-Aktin-Struktur war ebenfalls unauffällig. Z-Scheiben trennen einzelne Sarkomere, welche durch Myosin-Aktin-Verschiebung kontrahieren. Hierbei koordiniert α -Actinin die Bindung von Aktin an Z-Scheiben. Störungen in der Desmin- bzw. α -Actinin-Organisation wie Aufhebung der Querstreifung und sarkomere Dislokation waren zuvor in Patienten mit Herzinsuffizienz beobachtet worden.^{149, 150}

Im Querschnitt der Kardiomyozyten war in Abwesenheit von Lmp2 nach Isoprenalin-Behandlung eine subzelluläre ungleichmäßige Lokalisation von Troponin I zu erkennen. Dies könnte eine Dislokation aus Sarkomeren bedeuten. Zuvor war bereits eine deutliche Tendenz zur verringerten Troponin I-Abundanz nach Kontrollgentransfer und Isoprenalin-Behandlung gegenüber Lmp2-Gentransfer per Western Blot nachgewiesen worden.¹²¹ Phosphoryliertes Troponin I ist ein endogener Inhibitor der Myosin-Aktin-Bindung, dessen inhibitorische Wirkung nach Calcium-abhängiger Aktivierung von Troponin C durch dephosphorylierungsbedingte Konformationsänderung aufgehoben wird.^{151, 152} In einer Studie, in der in Mäusen kardiales Troponin I durch genetische Intervention unterdrückt worden war, wurde eine Verringerung der Calcium-Sensitivität für die Kontraktion beobachtet.¹⁵³ Nähere Untersuchungen zeigten, dass vor allem bei I/R, aber auch I/R-unabhängig bei erhöhter Vorlast, endogene Troponin I-Spaltung die kardiale Funktion verschlechtert.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Eine solche Änderung der Troponin I-Funktion kann Hypertrophie auslösen.¹⁵⁷ Eine sarkomere Dislokation wie in dieser Arbeit wurde zuvor offenbar noch nicht beobachtet. Eine intakte Funktion von Troponin I im Sarkomer ist aber essentiell für eine ökonomische kontraktile Funktion.¹⁵⁷ In der vorliegenden Studie könnte die erhaltene Troponin I-Lokalisation in Sarkomeren daher auf eine Aufrechterhaltung regulierter Kontraktilität trotz β -adrenerger Überstimulation hindeuten, während der schwerere Verlauf der Pathogenese in den Lmp2 Knock-out-Tieren u.a. durch eine sarkomere Dysfunktion von Troponin I gekennzeichnet ist. Daher ist eine ökonomische Herzarbeit bei diesen Tieren in der Situation einer permanenten β -adrenergen Stimulation trotz erhöhter Muskelmasse nicht gewährleistet.

Unbeantwortet bleibt in diesem Zusammenhang, ob die verringerte kardiale Funktion eine Konsequenz der stärkeren Hypertrophie mit ineffizient arbeitenden Sarkomeren ist oder die verstärkte Hypertrophie selbst den nicht erfolgreichen Versuch einer Kompensation der veränderten Sarkomerfunktion darstellt. Troponin I ist ein Substrat des UPS-modulierten Proteinabbaus.¹⁰¹ Sollte dessen Degradation mit Lmp2 assoziiert sein, wäre in Lmp2 Knock-out-Tieren bei kardialer Hypertrophie mit einer Akkumulation

dieses Proteins zu rechnen gewesen, welches jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Die sarkomere Dislokation von Troponin I scheint daher keine primäre Konsequenz des Lmp2-abhängigem Proteinabbaus zu sein, sondern mit der Entwicklung des kardialen Remodellings in Verbindung zu stehen.

5.5 Die Abundanz von Lmp2 beeinflusst die Regulation der proteasomalen Aktivität in der Pathogenese kardialer Umbauprozesse

Drews *et al.* zeigten, dass 26S-Proteasom-Aktivitäten nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung um bis zu 90% zunahmen.¹⁰⁶ Dies wurde auch in der vorliegenden Studie beobachtet. Im Gegensatz dazu war die Erhöhung der 26S-Aktivitäten bei Lmp2 Knock-out-Tieren durch Isoprenalin wesentlich geringer ausgeprägt. Ergänzend zur Messung der Aktivitäten wurde die Abundanz von proteasomalen Untereinheiten in Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren analysiert. 19S-Untereinheiten (exemplarisch Rpt4 und Rpn1) waren nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung zumindest tendenziell in Wildtypmäusen stärker exprimiert als in Lmp2 Knock-out-Tieren. Die Induktion von Rpt4 in den Wildtyp-Tieren um ca. 40% ist vergleichbar mit zuvor publizierten Ergebnissen.¹⁰⁶ Drews *et al.* zeigten außerdem, dass vermehrter Zusammenbau von 26S-Proteasomen ein regulatorischer Mechanismus ist, der bei siebentägiger Isoprenalinbehandlung zu erhöhten 26S-Aktivitäten führt.¹⁰⁶ Dies wurde hier nicht untersucht. Jedoch kann die verstärkte Expression der 19S-Untereinheiten ein Hinweis darauf sein, dass vermehrt 19S-Proteasomen synthetisiert werden und ein erhöhter Zusammenbau von 20S- und 19S- zu 26S-Proteasomen erfolgt. Dieser Regulationsmechanismus scheint in Lmp2 Knock-out-Tieren bei Isoprenalinbehandlung weniger stark ausgeprägt zu sein.

Im Isoprenalinmodell wurde zuvor bei erhöhten 26S-Aktivitäten eine Reduktion polyubiquitinylierter Proteine beobachtet.¹⁰⁶ Auch bei weiteren Modellen kardialen Remodellings standen erhöhte proteasomale Aktivität mit stärkerem Abbau polyubiquitinylierter Proteine im Zusammenhang.^{105, 116} Ebenfalls wurde beobachtet, dass eine Erhöhung proteasomaler Aktivitäten nicht ausreicht, um eine verstärkte Akkumulation polyubiquitinylierter Proteine zu verhindern.¹⁰⁴ Interessanterweise spiegelt sich die in dieser Arbeit beobachtete unterschiedliche Regulation proteasomaler 26S-Aktivitäten nicht offenkundig in der Analyse Lys₄₈-polyubiquitinylierter Proteine wider. Auffällig bei der Analyse der Lys₄₈-polyubiquitinylierten Proteine war eine Bande bei ca. 50 kDa

(ubiquitinyliertes Protein 1, *UP1*), welche im Verhältnis zur Gesamtmenge der Lys₄₈-polyubiquitinylierten Proteine bei Lmp2 Knock-out-Tieren nach Isoprenalinbehandlung im Vergleich zu Wildtypmäusen verringert war. Da spezifisch Lys₄₈-Ubiquitinylierungen detektiert wurden, müssen mindestens zwei Ubiquitin-Moleküle (8,5 kDa je Molekül) gebunden sein und es handelt sich unter Berücksichtigung der nicht ganz genauen Auflösung aufgrund möglicher Molekülmodifikation wie unvollständige Denaturierung oder Ladungsverstärkung durch z.B. Phosphorylierung um ein Protein mit maximal ca. 35-40 kDa im nicht modifizierten Zustand. Jedoch ist es bei Lmp2 Knock-out-Tieren weniger abundant, welche geringere 26S-Aktivitäten aufweisen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass UP1 ein durch im Rahmen der Pathogenese veränderte proteasomale Aktivitäten akkumulierendes Protein ist. Weiterhin denkbar wäre die Detektion freier Ub₆-Ketten, die nach der Degradation von UPS-Substraten frei werden. Allerdings müssten dann auch weitere Ketten wie Ub₄ detektiert werden, woraus man auf einen differenziellen proteasomalen Abbau schließen könnte. So bleibt die Identifikation von UP1 das Ziel anschließender Untersuchungen zur Analyse ubiquitinylierter Proteine.

Eine Möglichkeit ist, dass der beobachtete Unterschied globaler proteasomaler Aktivität nicht primär für die verstärkte Pathogenese in Abwesenheit von Lmp2 verantwortlich ist, sondern eine Folge dieser. In HCM-Patientenproben konnte UPS-Dysfunktion als Charakteristikum der fortgeschrittenen Erkrankung identifiziert werden.¹⁵⁸ Auch in der Maus wurde beobachtet, dass die UPS-Funktion bei TAC zwar initial zunimmt, im weiteren Verlauf jedoch bis unter das Sham-Niveau abfällt.¹¹⁶ Dies legt nahe, dass in den in dieser Arbeit untersuchten Lmp2 Knock-out-Tieren im Rahmen der schwereren Pathogenese ein Zeitpunkt im Bereich des Umschlags von initial verbesserter UPS-Funktion zu deren Rückgang beobachtet wurde, der sich noch nicht deutlich in einer veränderten globalen UPS-Funktion widerspiegelt und der Akkumulation nicht degradierter ubiquitinylierter Proteine vorausgeht. Der direkt durch die Lmp2-Induktion ausgelöste Beitrag zur gesamten 26S-proteasomalen Aktivität scheint eher gering und vor allem für den Abbau einzelner Proteine kritisch zu sein.

5.6 Das kardiale Proteom wird in Abhängigkeit von Lmp2 differenziell reguliert

Die Entstehung und Ausprägung muskulärer und kardialer Hypertrophie wird unter anderem über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade moduliert.^{11, 14, 15} Calcineurin ist

ein Zielmolekül von E3-Ligasen und ein proteasomales Substrat.⁹⁶ Die Ausgangshypothese lautete daher, dass Calcineurin als potenzielles Lmp2-Zielmolekül unter Basalbedingungen in Abwesenheit von Lmp2 durch andere proteolytisch aktive Proteasomuntereinheiten kompensiert abgebaut wird, jedoch unter hypertropher Stimulation akkumuliert und sich dadurch dessen Phosphatase 2B-Aktivität erhöht. Üblicherweise wird die Calcineurin-Aktivität experimentell über den Abbau eines artifiziellen Phosphats bestimmt,^{143, 159} da mit MCIP1 ein endogener Inhibitor identifiziert wurde¹⁶⁰⁻¹⁶² und die Abundanz von Calcineurin alleine daher nicht dessen Aktivität widerspiegelt. In der vorliegenden Arbeit jedoch wurde postuliert, dass die unterschiedliche Stärke des Remodellings durch differenziellen proteasomalen Calcineurin-Abbau begünstigt wird, weswegen hier die Abundanz untersucht wurde. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied nach Isoprenalinbehandlung zwischen Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren festgestellt werden. Stattdessen lag eher eine geringe, tendenzielle Erhöhung bei den Wildtypmäusen vor. Ebenfalls könnte die beobachtete Hypertrophie Calcineurin/NFAT-unabhängig z.B. via Mef2¹⁶³⁻¹⁶⁵ reguliert sein.

Um Hinweise auf Lmp2- abhängige Veränderungen des kardialen Proteoms im Verlauf der Isoprenalin-induzierten Hypertrophie zu erhalten, wurden differenziell regulierte Proteine per 2-D-DIGE analysiert. Die hohe Anzahl der differenziell regulierten Proteine und gerade die Tatsache, dass die meisten davon bei Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Tieren gegenläufig durch Isoprenalin reguliert werden, deuten eine komplexe Rolle von Lmp2 in der Entwicklung des kardialen Remodellings an. Dies ist insofern bemerkenswert, als zuvor bei verschiedenen TAC-Stadien hauptsächlich stärkere Regulationen der bereits bei leichter Pathogenese regulierten Proteine beobachtet wurden.⁵³ Der Verlust von Lmp2 begünstigt daher im Wesentlichen nicht einen schwereren Verlauf der Hypertrophie *per se*, sondern führt bereits auf Proteinebene zu einer andersartigen Pathogenese. Gerade basal unterschiedlich exprimierte Proteine könnten für das verstärkte Remodelling in Abwesenheit von Lmp2 prädisponieren, welches dann möglicherweise nur bei transienter Isoprenalinstimulation über ca. vier Tage weiter kompensiert werden kann. Da jedoch ungeklärt ist, wann genau jenseits von vier Tagen der Übergang von der Hypertrophie in die vorzeitige Herzinsuffizienz eintritt, liefert die Untersuchung des Proteoms nach sieben Tagen wertvolle Hinweise zu den dabei möglicherweise involvierten Proteinen.

5.7 Welches ist die kritische Funktion von Lmp2 beim kardialen Remodelling?

In den aktuellen Arbeiten unserer Gruppe wird die Rolle von Lmp2 erstmalig im Kontext von kardialer Hypertrophie untersucht. Lediglich im I/R-Modell konnte Lmp2 zuvor eine protektive Rolle zugeschrieben werden.¹¹⁸ Auch jenseits des Herzens ist die spezifische Rolle von Lmp2 wenig verstanden. Hauptsächlich wurden pro-inflammatorische Eigenschaften *in vitro*,⁷² aber auch bei Chorea Huntington¹⁶⁶ festgestellt, obwohl eine pro-inflammatorische Induktion im zentralen Nervensystem eher untypisch ist.¹⁶⁷ Besser untersucht wurde vor allem Lmp7, dessen Induktion pro-inflammatorisch,^{81, 168, 169} pro-carcinogen,¹⁷⁰ mit Autoimmunerkrankungen assoziiert¹⁷¹ und kognitiv einschränkend z.B. beim Morbus Alzheimer¹⁶⁹ verstanden wird. Interessanterweise konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass erhöhte Lmp7-Abundanz mit der Lebensdauer von Primaten positiv korreliert.¹⁷² Ebenfalls konnten protektive Funktionen induzierbarer Proteasomuntereinheiten bei oxidativem Stress beobachtet werden.^{85, 86, 88, 89} Bei der kardialen Hypertrophie scheint die Induktion von Lmp2 weniger mit inflammatorischen Prozessen in Verbindung zu stehen. Entzündung ist typischerweise durch einen Funktionsverlust des betroffenen Gewebes/Organs gekennzeichnet (*functio laesa*).¹⁷³ Der beobachtete Phänotyp der Lmp2 Knock-out-Tiere deutet dagegen eher daraufhin, dass Lmp2 einem solchen Funktionsverlust entgegenwirkt und daher im Herzen eher keine pro-inflammatorische Rolle spielt. Vielmehr repräsentiert die Hypertrophie-abhängige Induktion von Lmp2 eher einen kardioprotektiven Mechanismus (Abbildung 35), dessen genaue Funktionsweise jedoch weiterer Untersuchungen bedarf.

5.8 Lmp2-spezifische Proteasom-Modulation als therapeutisches Ziel?

In früheren Untersuchungen konnten durch Gabe von Proteasominhibitoren kardiale Umbauprozesse verhindert bzw. verringert werden,^{103, 105, 110-112} In anderen Studien bewirkte Proteasominhibierung allerdings verstärktes Remodelling bis hin zu einem kardialen Funktionsverlust.^{113, 114} Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die induzierbare proteasomale Untereinheit Lmp2 die kardiale Entwicklung und Funktion nicht maßgeblich beeinflusst, obwohl sie basal exprimiert und inkorporiert wird.⁸² Vorhergehende Arbeiten¹¹⁸ genauso wie diese Studie attestieren Lmp2 einen kardioprotek-

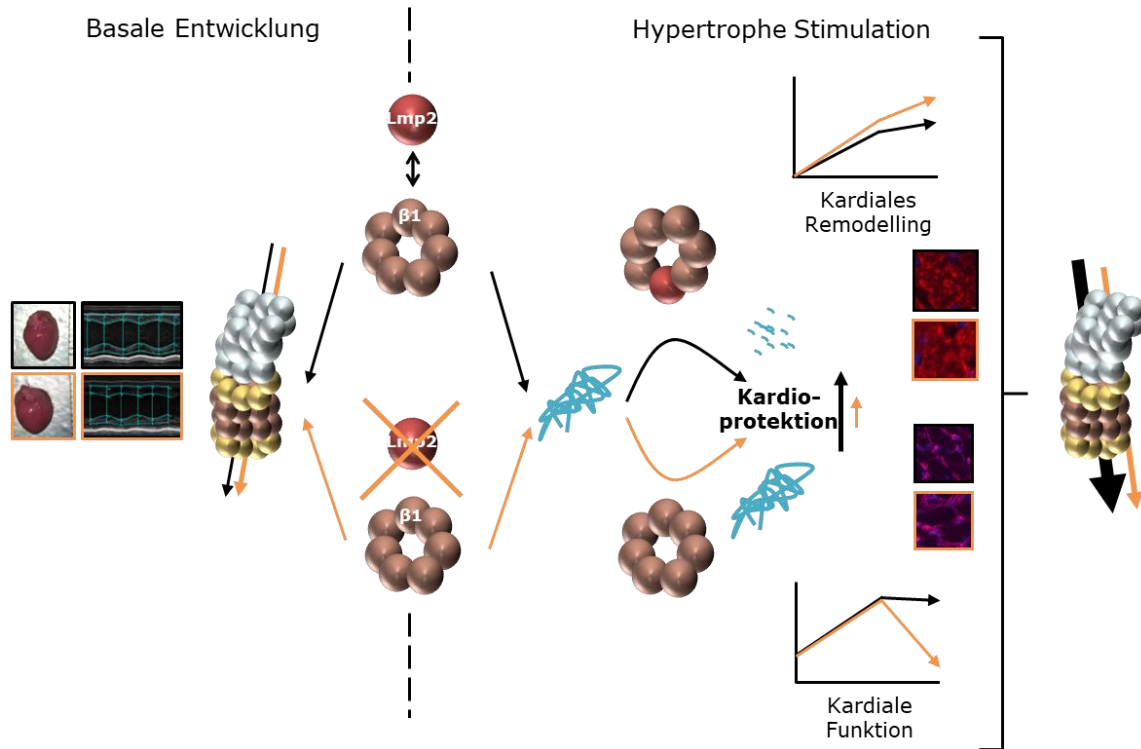


Abbildung 35: Schematische Darstellung der vermuteten Rolle von Lmp2. In der basalen Entwicklung kann fehlender Lmp2-abhängiger Proteinverdau endogen kompensiert werden, sodass zwar veränderte proteasomale Aktivität, aber kein funktioneller Phänotyp vorliegt. Unter hypertropher Stimulation nimmt Lmp2 eine kardioprotektive Rolle durch Abbau einzelner Proteine ein. Fehlender Lmp2-abhängiger Proteinverdau kann kaum mehr kompensiert werden, sodass die protektive Wirkung fehlt. Der deutliche Unterschied 26S-proteasomaler Aktivitäten ist ein Symptom der fortgeschrittenen Erkrankung, die mit verstärktem Remodelling und entstehender Fibrose, Rückgang kardialer Funktion und abnormer Troponin I-Lokalisation einhergeht.

tiven Effekt. Kompletter Verlust der Induktion von Lmp2, z.B. durch Knock-out, verhindert diesen Schutzmechanismus. Proteasomale Aktivitäten sind während des kardialen Remodellings dynamisch und heterogen reguliert.⁹⁵ Während der Einsatz von Proteasominhibitoren daher abhängig vom Fortschritt der Erkrankung die Pathogenese verbessern kann,⁹⁴ scheint die Hemmung der Lmp2-Induktion grundsätzlich negative Auswirkungen zu haben. Um Proteasominhibierung therapeutisch einsetzen zu können, ist zuerst ein detailliertes Verständnis der Heterogenität proteasomaler Induktion während der Pathogenese einer Erkrankung notwendig.⁹⁴ Nach derzeitigem Stand, durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert, erscheint spezifische Proteasominhibierung einzelner Untereinheiten vielversprechender als eine unspezifische Hemmung des Proteasoms insgesamt. Hier konnte im Kontext mit anderen Arbeiten^{105, 106} gezeigt werden, dass die Induktion von Lmp2 ein endogener Mechanismus ist, der mindestens drei murinen Herzhypertrophie-modellen gemeinsam ist. Diese Induktion scheint dabei potenziell kardioprotektiv zu sein. Um Proteasominhibierung therapeutisch bei kardialen Remodelling einzusetzen, erscheint es daher lohnenswert, eine spezifische Inhibition mit

keiner oder wenig Beeinflussung der Lmp2-vermittelten Aktivität zu erreichen. Auf der anderen Seite erscheint die Verstärkung der Lmp2-vermittelten proteasomalen Aktivität ein interessantes therapeutisches Ziel zu sein.

5.9 Limitationen und Ausblick

Durch die Wahl des Isoprenalinmodells können sekundäre vaskuläre Effekte weitestgehend ausgeschlossen werden, welches in diesem Fall den Effekt der Lmp2-Induktion eindeutig kardialen Remodellierungsprozessen wie den Anpassungen an erhöhte Inotropie und Chronotropie durch β -adrenerge Überstimulation zuordnen lässt. Diese maladaptiven Remodellierungsprozesse liegen auch beim Menschen im fortgeschrittenen Stadium kardialer Erkrankung vor¹⁷⁴ und treiben Herzinsuffizienz so maßgeblich voran.¹² Insbesondere konnte durch die Wahl von Isoprenalin bei Wildtyptieren eine nicht-herzinsuffiziente Kontrollgruppe geschaffen werden, die so eine Diagnose der vorzeitigen Herzinsuffizienz als solche überhaupt erst ermöglichte.

Untersuchungen der Abundanz polyubiquitinylierter Proteine konnten nur zum Teil auf proteinbiochemischer Ebene überprüft werden. Die hier gewählte Analyse der Immunfluoreszenz bietet zwar die Möglichkeit des quantitativen Vergleichs und der Detektion regionaler Unterschiede. Die Verifizierung erfolgte jedoch nur im Rohextrakt im direkten Vergleich Isoprenalin-behandelter Tiere.

Zweifelsfrei gibt das nicht vollständig aufgeklärte kardioprotektive Potenzial von Lmp2 Anlass zu der Frage, inwieweit derartige molekulare Veränderungen wie die Induktion einer spezifischen proteasomalen Untereinheit Erkrankungen wie die Herzhypertrophie auslösen, vorantreiben oder eine Konsequenz dieser Erkrankungen sind. Ob sich Kardioprotektion auch durch Überexpression von Lmp2 im Wildtyp erzielen lässt, ist eine spannende Frage, die einen nächsten Schritt zur Formulierung eines Therapieansatzes darstellt, den man später auf den Menschen übertragen könnte. Dies müsste in einem Herzinsuffizienz-Modell (z.B. 14 Tage Angiotensin II-Behandlung) durchgeführt werden, um die Vorteile dieses Ansatzes bei kardialer Hypertrophie mit Funktionsverlust im Wildtyp (bzw. Kontroll-Gentransfer) zu unterstreichen.

Ob und wie eine Gentherapie letztendlich auf den Menschen übertragen werden kann, wird derzeit untersucht. Mit Glybera® befindet sich bereits das erste AAV-basierte Medikament in klinischer Erprobung, für kardiale Erkrankung hat sich das Protein S100A1 als Zielmolekül herausgestellt, dessen medikamentöse Modulation per AAV

aktuell entwickelt wird.¹⁷⁵ Sollte sich die AAV-Applikation im Menschen als nicht ökonomisch oder praktikabel herausstellen, bietet sich die Verwendung von Liposomen als ein weiteres Organ-spezifisches Vehikel an,¹⁷⁶ jedoch bedarf es hier noch herzspezifischer Weiterentwicklungen. Für eine Lmp2-basierte Gentherapie im Menschen ist es zwar noch ein weiter Weg, jedoch kann mit jeder weiteren Studie dieser Weg ein Stück weiter besritten werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Piper HM, Daut J, Deussen A, Brandes R und Busse R. Herz und Kreislauf. In: R. F. Schmidt, F. Lang und M. Heckamnn, Hrsg. *Physiologie des Menschen Mit Pathophysiologie*. 31. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010: 517-626.
2. Opie LH, Hasenfuss G und Mann DL. Heart failure. In: R. O. Bonow, D. L. Mann, D. P. Zipes und P. Libby, Hrsg. *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 9. Aufl. Philadelphia/PA, USA: Elsevier Saunders; 2012: 459-504.
3. Klawki R, Schmidt K und Heinemann M. 28. Deutscher Herzbericht 2016. *Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland*. 2016.
4. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW und Turner MB; im Auftrag des American Heart Association Statistics Committee und Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the american heart association. *Circulation*. 2015;131:e29-e322.
5. Maillet M, van Berlo JH und Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14:38-48.
6. van Berlo JH, Maillet M und Molkentin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123:37-45.
7. Corrado D, Basso C und Judge DP. Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2017;121:784-802.
8. Lorell BH und Carabello BA. Left ventricular hypertrophy - pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102:470-479.
9. Hunter JJ und Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341:1276-83.
10. Kehat I und Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*. 2010;122:2727-35.
11. Heineke J und Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7:589-600.

12. Lohse MJ, Engelhardt S und Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res.* 2003;93:896-906.
13. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G und Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *Journal of the American College of Cardiology.* 2009;54:1747-62.
14. Wilkins BJ und Molkenin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications.* 2004;322:1178-91.
15. Molkenin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research.* 2004;63:467-75.
16. Osadchii OE. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev.* 2007;12:66-86.
17. Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Oka N, Ishikawa Y, Shannon RP, Bishop SP und Vatner SF. Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2735-2746.
18. Matkovich SJ, Diwan A, Klanke JL, Hammer DJ, Marreez Y, Odley AM, Brunskill EW, Koch WJ, Schwartz RJ und Dorn GW, 2nd. Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling. *Circ Res.* 2006;99:996-1003.
19. Galindo CL, Skinner MA, Errami M, Olson LD, Watson DA, Li J, McCormick JF, McIver LJ, Kumar NM, Pham TQ und Garner HR. Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure. *BMC Physiol.* 2009;9:23.
20. Rai V, Sharma P, Agrawal S und Agrawal DK. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Molecular and cellular biochemistry.* 2017;424:123-145.
21. Richard V, Kaeffer N und Thuillez C. Delayed protection of the ischemic heart-from pathophysiology to therapeutic applications. *Fundam Clin Pharmacol.* 1996;10:409-15.
22. Vignier N, Schlossarek S, Fraysse B, Mearini G, Kramer E, Pointu H, Mougnot N, Guiard J, Reimer R, Hohenberg H, Schwartz K, Vernet M, Eschenhagen T und Carrier L. Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system regulate cardiac myosin-binding protein C mutant levels in cardiomyopathic mice. *Circ Res.* 2009;105:239-48.
23. Carrier L, Knoll R, Vignier N, Keller DI, Bausero P, Prudhon B, Isnard R, Ambroisine ML, Fisman M, Ross J, Jr., Schwartz K und Chien KR. Asymmetric septal hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice. *Cardiovascular Research.* 2004;63:293-304.

24. Choy L, Yeo JM, Tse V, Chan SP und Tse G. Cardiac disease and arrhythmogenesis: Mechanistic insights from mouse models. *International journal of cardiology Heart & vasculature*. 2016;12:1-10.
25. Kim S und Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;52:11-34.
26. Sadoshima J und Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 1997;59.
27. Rottman JN, Ni G und Brown M. Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. *Echocardiography*. 2007;24:83-9.
28. Scherrer-Crosbie M und Thibault HB. Echocardiography in translational research: of mice and men. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2008;21:1083-92.
29. Gao S, Ho D, Vatner DE und Vatner SF. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2011;1:71-83.
30. Ram R, Mickelsen DM, Theodoropoulos C und Blaxall BC. New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301:H1765-H1780.
31. Stypmann J, Engelen MA, Troatz C, Rothenburger M, Eckardt L und Tiemann K. Echocardiographic assessment of global left ventricular function in mice. *Laboratory animals*. 2009;43:127-37.
32. Stypmann J. Doppler ultrasound in mice. *Echocardiography*. 2007;24:97-112.
33. Tsujita Y, Kato T und Sussman MA. Evaluation of left ventricular function in cardiomyopathic mice by tissue Doppler and color M-mode Doppler echocardiography. *Echocardiography*. 2005;22:245-253.
34. Sengupta PP, Korinek J, Belohlavek M, Narula J, Vannan MA, Jahangir A und Khandheria BK. Left ventricular structure and function: basic science for cardiac imaging. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48:1988-2001.
35. Dandel M, Lehmkuhl H, Knosalla C, Suramelashvili N und Hetzer R. Strain and strain rate imaging by echocardiography – basic concepts and clinical applicability. *Curr Cardiol Rev*. 2009;5:133-148.
36. Ferferieva V, Van den Bergh A, Claus P, Jasaityte R, Veulemans P, Pellens M, La Gerche A, Rademakers F, Herijgers P und D'hooge J. The relative value of strain and strain rate for defining intrinsic myocardial function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302:H188–H195.
37. Jasaityte R, Claus P, Teske AJ, Herbots L, Verheyden B, Jurcut R, Rademakers F und D'hooge J. The slope of the segmental stretch-strain relationship as a noninvasive index of LV inotropy. *JACC Cardiovascular imaging*. 2013;6:419-28.

38. Peng Y, Popovic ZB, Sopko N, Drinko J, Zhang Z, Thomas JD und Penn MS. Speckle tracking echocardiography in the assessment of mouse models of cardiac dysfunction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;297:H811-H820.
39. Geyer H, Caracciolo G, Abe H, Wilansky S, Carerj S, Gentile F, Nesser HJ, Khandheria B, Narula J und Sengupta PP. Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography: fundamentals and clinical applications. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2010;23:351-69; quiz 453-5.
40. Shah AM und Solomon SD. Myocardial deformation imaging: current status and future directions. *Circulation*. 2012;125:e244-8.
41. Fayssoil A. Tissue Doppler characterization of cardiac phenotype in mouse. *European journal of radiology*. 2009;72:82-4.
42. MacIver DH. The relative impact of circumferential and longitudinal shortening on left ventricular ejection fraction and stroke volume. *Exp Clin Cardiol*. 2012;17:5-11.
43. MacIver DH, Adeniran I und Zhang H. Left ventricular ejection fraction is determined by both global myocardial strain and wall thickness. *IJC Heart & Vasculature*. 2015;7:113-118.
44. Kusunose K, Penn MS, Zhang Y, Cheng Y, Thomas JD, Marwick TH und Popovic ZB. How similar are the mice to men? Between-species comparison of left ventricular mechanics using strain imaging. *PloS one*. 2012;7:e40061.
45. Koshizuka R, Ishizu T, Kameda Y, Kawamura R, Seo Y und Aonuma K. Longitudinal strain impairment as a marker of the progression of heart failure with preserved ejection fraction in a rat model. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2013;26:316-23.
46. Ishizu T, Seo Y, Kameda Y, Kawamura R, Kimura T, Shimojo N, Xu D, Murakoshi N und Aonuma K. Left ventricular strain and transmural distribution of structural remodeling in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2014.
47. Drews O. High-resolution separation of cardiovascular proteomes: two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2012;5:592.
48. Jungblut P, Thiede B, Zimny-Arndt U, Müller EC, Scheler C, Wittmann-Liebold B und Otto A. Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis*. 1996;17:839-47.
49. Raddatz K, Albrecht D, Hochgrafe F, Hecker M und Gotthardt M. A proteome map of murine heart and skeletal muscle. *Proteomics*. 2008;8:1885-97.
50. Menazza S, Sun J, Appachi S, Chambliss KL, Kim SH, Aponte A, Khan S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Shaul PW und Murphy E. Non-nuclear

estrogen receptor alpha activation in endothelium reduces cardiac ischemia-reperfusion injury in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;107:41-51.

51. Kotlo K, Johnson KR, Grillon JM, Geenen DL, deTombe P und Danziger RS. Phosphoprotein abundance changes in hypertensive cardiac remodeling. *J Proteomics.* 2012;77:1-13.

52. Mitra A, Basak T, Ahmad S, Datta K, Datta R, Sengupta S und Sarkar S. Comparative Proteome Profiling during Cardiac Hypertrophy and Myocardial Infarction Reveals Altered Glucose Oxidation by Differential Activation of Pyruvate Dehydrogenase E1 Component Subunit beta. *J Mol Biol.* 2015;427:2104-20.

53. Previlon M, Le Gall M, Chafey P, Federeci C, Pezet M, Clary G, Broussard C, Francois G, Mercadier JJ und Rouet-Benzineb P. Comparative differential proteomic profiles of nonfailing and failing hearts after in vivo thoracic aortic constriction in mice overexpressing FKBP12.6. *Physiol Rep.* 2013;1:e00039.

54. Willis MS, Townley-Tilson WH, Kang EY, Homeister JW und Patterson C. Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res.* 2010;106:463-78.

55. Finley D, Ulrich HD, Sommer T und Kaiser P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2012;192:319-60.

56. Grune T, Reinheckel T und Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1997;11:526-534.

57. Jung T und Grune T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I-structure of proteasomes. *Redox Biol.* 2013;1:178-182.

58. Willis MS, Bevilacqua A, Pulinilkunnil T, Kienesberger P, Tannu M und Patterson C. The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;71:43-53.

59. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M und Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal.* 2000;19:94-102.

60. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y und Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol.* 2017.

61. Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E und Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature.* 2012;482:186-91.

62. Heinemeyer W, Ramos PC und Dohmen RJ. The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2004;61:1562-78.

63. Sledz P, Forster F und Baumeister W. Allosteric effects in the regulation of 26S proteasome activities. *J Mol Biol.* 2013;425:1415-23.

64. Huber EM, Heinemeyer W, Li X, Arendt CS, Hochstrasser M und Groll M. A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome. *Nat Commun.* 2016;7:10900.
65. Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C und Huber R. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998;28:295-317.
66. Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K und Ichihara A. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem.* 1994;115:257-269.
67. Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH und Kloetzel PM. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med.* 1994;179:901-909.
68. Driscoll J, Brown MG, Finley D und Monaco JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature.* 1993;365:262-264.
69. Gaczynska M, Rock KL, Spies T und Goldberg AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:9213-9217.
70. Kuckelkorn U, Frentzel S, Kraft R, Kostka S, Groettrup M und Kloetzel PM. Incorporation of major histocompatibility complex-encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20s proteasome polypeptide processing products independent of interferon- γ . *European Journal of Immunology.* 1995;25:2605-2611.
71. Groettrup M, Standera S, Stohwasser R und Kloetzel PM. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:8970-8975.
72. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Eichelberger M, Gaczynska M, Nagashima K, Rock KL, Goldberg AL, Doherty PC und Tonegawa S. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity.* 1994;1:533-41.
73. Basler M, Youhnovski N, van den Broek M, Przybylski M und Groettrup M. Immunoproteasomes down-regulate presentation of a subdominant T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *The Journal of Immunology.* 2004;173:3925-3934.
74. Rock KL, Farfan-Arribas DJ und Shen L. Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *Journal of immunology.* 2010;184:9-15.
75. Rock KL, Farfan-Arribas DJ, Colbert JD und Goldberg AL. Re-examining class-I presentation and the DRiP hypothesis. *Trends in immunology.* 2014;35:144-52.
76. Strehl B, Textoris-Taube K, Jakel S, Voigt A, Henklein P, Steinhoff U, Kloetzel PM und Kuckelkorn U. Antitopes define preferential proteasomal cleavage site usage. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283:17891-7.

77. Oh IS, Textoris-Taube K, Sung PS, Kang W, Gorny X, Kahne T, Hong SH, Choi YJ, Cammann C, Naumann M, Kim JH, Park SH, Yoo OJ, Kloetzel PM, Seifert U und Shin EC. Immunoproteasome induction is suppressed in hepatitis C virus-infected cells in a protein kinase R-dependent manner. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48:e270.
78. Kincaid EZ, Che JW, York I, Escobar H, Reyes-Vargas E, Delgado JC, Welsh RM, Karow ML, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD und Rock KL. Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nature immunology*. 2012;13:129-35.
79. Chou B, Hisaeda H, Shen J, Duan X, Imai T, Tu L, Murata S, Tanaka K und Himeno K. Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. *Microbes Infect*. 2008;10:241-50.
80. Szalay G, Meiners S, Voigt A, Lauber J, Spieth C, Speer N, Sauter M, Kuckelkorn U, Zell A, Klingel K, Stangl K und Kandolf R. Ongoing coxsackievirus myocarditis is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes. *The American journal of pathology*. 2006;168:1542-52.
81. Opitz E, Koch A, Klingel K, Schmidt F, Prokop S, Rahnefeld A, Sauter M, Heppner FL, Volker U, Kandolf R, Kuckelkorn U, Stangl K, Kruger E, Kloetzel PM und Voigt A. Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. *PLoS pathogens*. 2011;7:e1002233.
82. Drews O, Wildgruber R, Zong C, Sukop U, Nissum M, Weber G, Gomes AV und Ping P. Mammalian proteasome subpopulations with distinct molecular compositions and proteolytic activities. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007;6:2021-2031.
83. Kotamraju S, Matalon S, Matsunaga T, Shang T, Hickman-Davis JM und Kalyanaraman B. Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1034-44.
84. Sun H, Lee CM, Tripathi S, Kim KB und Morgan ET. Nitric oxide-dependent CYP2B degradation is potentiated by a cytokine-regulated pathway and utilizes the immunoproteasome subunit LMP2. *The Biochemical journal*. 2012;445:377-82.
85. Petersen A und Zetterberg M. The immunoproteasome in human lens epithelial cells during oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:5038-45.
86. Callahan MK, Wohlfert EA, Menoret A und Srivastava PK. Heat Shock Up-Regulates lmp2 and lmp7 and Enhances Presentation of Immunoproteasome-Dependent Epitopes. *The Journal of Immunology*. 2006;177:8393-8399.
87. Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 1999;48:41-47.

88. Pickering AM, Koop AL, Teoh CY, Ermak G, Grune T und Davies KJ. The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28alphabeta proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *The Biochemical journal*. 2010;432:585-94.
89. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schroter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM und Kruger E. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell*. 2010;142:613-24.
90. Ding Q, Martin S, Dimayuga E, Bruce-Keller AJ und Keller NJ. LMP2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:130-135.
91. Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB und Monaco JJ. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *The EMBO journal*. 1997;16:5363-75.
92. Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Van Kaer L, Monaco JJ und Colbert RA. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med*. 1998;187:97-104.
93. Bonnin CM, Sparrow MP und Taylor RR. Increased protein synthesis and degradation in the dog heart during thyroxine administration. *J Mol Cell Cardiol*. 1983;15:245-50.
94. Drews O und Taegtmeyer H. Targeting the ubiquitin-proteasome system in heart disease: the basis for new therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21:2322-43.
95. Drews O. The left and right ventricles in the grip of protein degradation: Similarities and unique patterns in regulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2014.
96. Li HH, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang DZ und Patterson C. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114:1058-71.
97. Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A und Ben-Neriah Y. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:10599-603.
98. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D und Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*. 1995;9:1586-97.
99. Van Antwerp DJ und Verma IM. Signal-induced degradation of I(kappa)B(alpha): association with NF-kappaB and the PEST sequence in I(kappa)B(alpha) are not required. *Mol Cell Biol*. 1996;16:6037-45.

100. Kishi T, Ikeda A, Nagao R und Koyama N. The SCFCdc4 ubiquitin ligase regulates calcineurin signaling through degradation of phosphorylated Rcn1, an inhibitor of calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:17418-23.
101. Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA und Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:18135-40.
102. Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R und Olson EN. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:2486-95.
103. Depre C, Wang Q, Yan L, Hedhli N, Peter P, Chen L, Hong C, Hittinger L, Ghaleh B, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF und Madura K. Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2006;114:1821-8.
104. Schlossarek S, Englmann DR, Sultan KR, Sauer M, Eschenhagen T und Carrier L. Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic research in cardiology*. 2012;107:235.
105. Li N, Wang HX, Han QY, Li WJ, Zhang YL, Du J, Xia YL und Li HH. Activation of the cardiac proteasome promotes angiotension II-induced hypertrophy by down-regulation of ATRAP. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;79:303-14.
106. Drews O, Tsukamoto O, Liem D, Streicher J, Wang Y und Ping P. Differential regulation of proteasome function in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2010;107:1094-1101.
107. Kisselev AF, Callard A und Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:8582-90.
108. Ho YK, Bargagna-Mohan P, Wehenkel M, Mohan R und Kim KB. LMP2-specific inhibitors: chemical genetic tools for proteasome biology. *Chemistry & biology*. 2007;14:419-30.
109. Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, Lauer C, Sylvain C, Ring ER, Shields J, Jiang J, Shwonek P, Parlati F, Demo SD, Bennett MK, Kirk CJ und Groettrup M. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature medicine*. 2009;15:781-7.
110. Stansfield WE, Tang RH, Moss NC, Baldwin AS, Willis MS und Selzman CH. Proteasome inhibition promotes regression of left ventricular hypertrophy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294:H645-50.

111. Stansfield WE, Moss NC, Willis MS, Tang R und Selzman CH. Proteasome inhibition attenuates infarct size and preserves cardiac function in a murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *The Annals of thoracic surgery*. 2007;84:120-5.
112. Hedhli N, Lizano P, Hong C, Fritzky LF, Dhar SK, Liu H, Tian Y, Gao S, Madura K, Vatner SF und Depre C. Proteasome inhibition decreases cardiac remodeling after initiation of pressure overload. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;295:H1385-93.
113. Tang M, Li J, Huang W, Su H, Liang Q, Tian Z, Horak KM, Molkenin JD und Wang X. Proteasome functional insufficiency activates the calcineurin-NFAT pathway in cardiomyocytes and promotes maladaptive remodeling of stressed mouse hearts. *Cardiovascular Research*. 2010;88:424-33.
114. Herrmann J, Wohlert C, Saguner AM, Flores A, Nesbitt LL, Chade A, Lerman LO und Lerman A. Primary proteasome inhibition results in cardiac dysfunction. *European journal of heart failure*. 2013;15:614-23.
115. Tian Z, Zheng H, Li J, Li Y, Su H und Wang X. Genetically induced moderate inhibition of the proteasome in cardiomyocytes exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Circ Res*. 2012;111:532-542.
116. Ranek MJ, Zheng H, Huang W, Kumarapeli AR, Li J, Liu J und Wang X. Genetically induced moderate inhibition of 20S proteasomes in cardiomyocytes facilitates heart failure in mice during systolic overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;85:273-81.
117. Divald A, Kivity S, Wang P, Hochhauser E, Roberts B, Teichberg S, Gomes AV und Powell SR. Myocardial ischemic preconditioning preserves postischemic function of the 26S proteasome through diminished oxidative damage to 19S regulatory particle subunits. *Circ Res*. 2010;106:1829-38.
118. Cai ZP, Shen Z, Van Kaer L und Becker LC. Ischemic preconditioning-induced cardioprotection is lost in mice with immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide-2 deficiency. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22:4248-57.
119. Liem D, Koser F, Tsukamoto O, Wang Y, Hecker M, Ping P und Drews O. Reduced Proteasome Heterogeneity Augments Cardiac Remodeling. *Circulation*. 2012;126:A19351.
120. Gaal L, Liem D, Koser F, Tsukamoto O, Wang Y, Hecker M, Ping P und Drews O. Premature heart failure caused by lacking proteasome subpopulation during cardiac remodeling. *Clin Res Cardiol* 2014;103:V905.
121. Koser F. Role of the ubiquitin-proteasome system in the pathogenesis of cardiac hypertrophy and aging. *Faculty of Biosciences*. 2015.

122. Kogan SC, Doherty M und Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *N Engl J Med.* 1987;317:985-990.
123. Towbin H, Staehelin T und Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:4350-4354.
124. Muller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA und Trepel M. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nature biotechnology.* 2003;21:1040-6.
125. Muller OJ, Leuchs B, Pleger ST, Grimm D, Franz WM, Katus HA und Kleinschmidt JA. Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovascular Research.* 2006;70:70-8.
126. Schinkel S, Bauer R, Bekeredjian R, Stucka R, Rutschow D, Lochmuller H, Kleinschmidt JA, Katus HA und Muller OJ. Long-term preservation of cardiac structure and function after adeno-associated virus serotype 9-mediated microdystrophin gene transfer in mdx mice. *Human gene therapy.* 2012;23:566-75.
127. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 1976;72:248-254.
128. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry.* 1951;193:265-275.
129. Gorg A, Drews O und Weiss W. Separation of proteins using two-dimensional gel electrophoresis. In: R. J. Simpson, Hrsg. *Purifying proteins for proteomics: a laboratory manual* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004.
130. Blum H, Beier H und Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 1987;8:93-99.
131. Deroo BJ und Archer TK. Proteasome inhibitors reduce luciferase and beta-galactosidase activity in tissue culture cells. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277:20120-3.
132. Salcedo A, Mayor Fj und Penela P. Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *The EMBO journal.* 2006;25:4752-62.
133. Kreusser MM, Lehmann LH, Wolf N, Keranov S, Jungmann A, Grone HJ, Muller OJ, Katus HA und Backs J. Inducible cardiomyocyte-specific deletion of CaM kinase II protects from pressure overload-induced heart failure. *Basic research in cardiology.* 2016;111:65-73.
134. Mizuguchi Y, Oishi Y, Miyoshi H, Iuchi A, Nagase N und Oki T. Concentric left ventricular hypertrophy brings deterioration of systolic longitudinal,

circumferential, and radial myocardial deformation in hypertensive patients with preserved left ventricular pump function. *J Cardiol.* 2010;55:23-33.

135. Ersboll M, Andersen MJ, Valeur N, Mogensen UM, Fakhri Y, Thune JJ, Moller JE, Hassager C, Sogaard P und Kober L. Early diastolic strain rate in relation to systolic and diastolic function and prognosis in acute myocardial infarction: a two-dimensional speckle-tracking study. *European Heart Journal.* 2014;35:648-56.

136. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, Waggoner AD, Flachskampf FA, Pelikka PA und Evangelisa A. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *European Journal of Echocardiography.* 2009;10:165-93.

137. Gaasch WH, Levine HJ, Quinones MA und Alexander JK. Left ventricular compliance: mechanisms and clinical implications. *The American journal of cardiology.* 1976;38:645-53.

138. Maurer G. Aortic regurgitation. *Heart.* 2006;92:994-1000.

139. Murata S, Yashiroda H und Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2009;10:104-15.

140. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology.* 1989;13:1637-1652.

141. Saadane N, Alpert L und Chalifour LE. Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Brit J Pharmacol.* 1999;127:1165-1176.

142. Jiang DS, Wei X, Zhang XF, Liu Y, Zhang Y, Chen K, Gao L, Zhou H, Zhu XH, Liu PP, Bond Lau W, Ma X, Zou Y, Zhang XD, Fan GC und Li H. IRF8 suppresses pathological cardiac remodelling by inhibiting calcineurin signalling. *Nat Commun.* 2014;5:3303.

143. van Rooij E, Doevendans PA, Crijns HJ, Heeneman S, Lips DJ, van Bilsen M, Williams RS, Olson EN, Bassel-Duby R, Rothermel BA und De Windt LJ. MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004;94:e18-26.

144. Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y und Komuro I. Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation.* 1999;100:2093-9.

145. Kitamura M, Shimizu M, Ino H, Okeie K, Yamaguchi M, Fujino M, Mabuchi H und Nakanishi I. Collagen remodeling and cardiac dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the ignificance of type III and VI collagens. *Clin Cardiol.* 2001;24:325-329.

146. Krenning G, Zeisberg EM und Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol.* 2010;225:631-7.

147. Ethier MF, Medeiros M, Romano FD und Dobson JGj. Mechanism of enhanced cyclic AMP stimulation by isoproterenol in aged human fibroblasts. *Experimental gerontology*. 1992;27:287-300.
148. Li J, Horak KM, Su H, Sanbe A, Robbins J und Wang X. Enhancement of proteasomal function protects against cardiac proteinopathy and ischemia/reperfusion injury in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:3689-700.
149. Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, Bauer E, Klövekorn WP, Schlepper M, Schaper W und Schaper J. Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circ Res*. 2000;86:846-53.
150. Hein S, Block T, Zimmermann R, Kostin S, Scheffold T, Kubin T, Klövekorn WP und Schaper J. Deposition of nonsarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy or chronic pressure overload *Exp Clin Cardiol*. 2009;14:68-75.
151. Solaro RJ und Rarick HM. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res*. 1998;83:471-80.
152. Takimoto E, Soergel DG, Janssen PM, Stull LB, Kass DA und Murphy AM. Frequency- and afterload-dependent cardiac modulation in vivo by troponin I with constitutively active protein kinase A phosphorylation sites. *Circ Res*. 2004;94:496-504.
153. Huang X, Pi Y, Lee KJ, Henkel AS, Gregg RG, Powers PA und Walker JW. Cardiac troponin I gene knockout: a mouse model of myocardial troponin I deficiency. *Circ Res*. 1999;84:1-8.
154. McDonough JL, Arrell DK und Van Eyk JE. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 1999;84:9-20.
155. Tachampa K, Kobayashi T, Wang H, Martin AF, Biesiadecki BJ, Solaro RJ und de Tombe PP. Increased cross-bridge cycling kinetics after exchange of C-terminal truncated troponin I in skinned rat cardiac muscle. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:15114-21.
156. Feng J, Schaus BJ, Fallavollita JA, Lee TC und Canty JM-. Preload induces Troponin I degradation independently of myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103:2035-37.
157. Solaro RJ. Troponin I, stunning, hypertrophy, and failure of the heart. *Circ Res*. 1999;84:122-24.
158. Predmore JM, Wang P, Davis F, Bartolone S, Westfall MV, Dyke DB, Pagani F, Powell SR und Day SM. Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation*. 2010;121:997-1004.
159. Fruman DA, Burakoff SJ, Pai SY, Klee CB und Bierer BE. Measurement of calcineurin phosphatase activity in cell extracts. *Methods*. 1996;9:146-154.

160. Rothermel BA, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R und Williams RS. A protein encoded within the down syndrome critical region is enriched in striated muscles and Inhibits calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:8719-8725.
161. Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN und Williams RS. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:3328-33.
162. Rothermel BA, Vega RB und Williams RS. The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:15-21.
163. Kolodziejczyk SM, Wang L, Balazsi K, DeRepentigny Y, Kothary R und Megeney LA. MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Current Biology*. 1999;9:1203-1206.
164. Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR und Olson EN. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105:1395-406.
165. Tobin SW, Hashemi S, Dadson K, Turdi S, Ebrahimian K, Zhao J, Sweeney G, Grigull J und McDermott JC. Heart Failure and MEF2 Transcriptome Dynamics in Response to beta-Blockers. *Sci Rep*. 2017;7:4476.
166. Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Martin-Aparicio E, Gomez-Ramos P, Moran MA, Castano JG, Ferrer I, Avila J und Lucas JJ. Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2003;23:11653-61.
167. Kremer M, Henn A, Kolb C, Basler M, Moebius J, Guillaume B, Leist M, Van den Eynde BJ und Groettrup M. Reduced immunoproteasome formation and accumulation of immunoproteasomal precursors in the brains of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice. *Journal of immunology*. 2010;185:5549-60.
168. Paeschke A, Possehl A, Klingel K, Voss M, Voss K, Kespohl M, Sauter M, Overkleeft HS, Althof N, Garlanda C und Voigt A. The immunoproteasome controls the availability of the cardioprotective pattern recognition molecule Pentraxin3. *European Journal of Immunology*. 2016;46:619-33.
169. Wagner LK, Gilling KE, Schormann E, Kloetzel PM, Heppner FL, Kruger E und Prokop S. Immunoproteasome deficiency alters microglial cytokine response and improves cognitive deficits in Alzheimer's disease-like APPPS1 mice. *Acta neuropathologica communications*. 2017;5:52.
170. Koerner J, Brunner T und Groettrup M. Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice. *Oncotarget*. 2017;8:50873-88.

171. Castellano G, Cafiero C, Divella C, Sallustio F, Gigante M, Pontrelli P, De Palma G, Rossini M, Grandaliano G und Gesualdo L. Local synthesis of interferon-alpha in lupus nephritis is associated with type I interferons signature and LMP7 induction in renal tubular epithelial cells. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:72.
172. Pickering AM, Lehr M und Miller RA. Lifespan of mice and primates correlates with immunoproteasome expression. *The Journal of clinical investigation.* 2015;125:2059-68.
173. Rather LJ. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bull N Y Acad Med.* 1971;47:303-22.
174. Packer M. Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation.* 1988;77:721-730.
175. Thomas Jefferson University, Koch WJ, Pflieger ST, Most P und Rabinowitz JE. Tissue specific gene therapy treatment. 2008;WO2008054713.
176. Parmentier J, Thewes B, Gropp F und Fricker G. Oral peptide delivery by tetraether lipid liposomes. *Int J Pharm.* 2011;415:150-7.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Herzanatomie und Erregungszentren.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung kardialer Hypertrophie	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung von UPS-vermitteltem Proteinverdau und proteasomaler Heterogenität.....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> -Studie.....	26
Abbildung 5: Repräsentative Aufnahmen echokardiographischer Analysen im Mausmodell.....	27
Abbildung 6: Repräsentative Detektion von Marker-Proteinen in Zytosol und frischem, nicht solubiliertem Rohextrakt unbehandelter Kontrolltiere.....	31
Abbildung 7: Schematische Darstellung der verwendeten Signifikanztests.....	36
Abbildung 8: Untersuchung der Lmp2-Regulation bei HCM.....	37
Abbildung 9: Basaluntersuchung proteasomaler Untereinheiten in Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäusen.....	38
Abbildung 10: Vergleich von Körpergewicht und Herzgewicht unbehandelter Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäuse.	39
Abbildung 11: Echokardiographische Untersuchung der Basalfunktion von Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäusen	39
Abbildung 12: Untersuchung von Herzfrequenz und systolischer Funktion von Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäusen im Verlauf der Isoprenalinbehandlung	41
Abbildung 13: Analyse des circumferentiellen endokardialen Strains sowie repräsentative Aufnahmen in der circumferentiellen Achse nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung.....	42
Abbildung 14: Untersuchung der diastolischen Funktion von Wildtyp- und Lmp2 Knock-out-Mäusen im Verlauf der Isoprenalinbehandlung.....	43
Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen der PW-Doppler-Messung nach sieben Tagen Isoprenalinbehandlung.....	44
Abbildung 16: Repräsentative Aufnahmen der LVOT-Weite nach sieben Tagen Isoprenalin	45

Abbildung 17: Analyse der diastolischen endokardialen Strain Rate in Isoprenalin-behandelten Tieren.....	45
Abbildung 18: Expression von Lmp2 nach kardiotroper Rekonstitution.....	46
Abbildung 19: Untersuchung der Luciferase-Abundanz	46
Abbildung 20: Echokardiographische Untersuchung der Basalfunktion von Lmp2 Knock-out-Tieren nach Lmp2- bzw. Luciferase-Gentransfer	47
Abbildung 21: Untersuchung von Herzfrequenz und systolischer Funktion von Lmp2 Knock-out-Tieren nach Lmp2- bzw. Luciferase-Gentransfer im Verlauf der Isoprenalinbehandlung.....	48
Abbildung 22: Untersuchung der diastolischen Funktion von Lmp2 Knock-out-Tieren nach Lmp2- bzw. Luciferase-Gentransfer im Verlauf der Isoprenalinbehandlung	49
Abbildung 23: Herzgewicht zu Körpergewicht in An- und Abwesenheit von Lmp2 nach Isoprenalinbehandlung.....	50
Abbildung 24: Linksventrikuläre Hinterwanddicke und innerer Durchmesser im Verlauf der Isoprenalinbehandlung.....	50
Abbildung 25: Kardiomyozytenquerschnitt und -länge nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung.....	53
Abbildung 26: Untersuchung der Calcineurin-Abundanz.....	54
Abbildung 27: Histologische Analyse der interstitiellen Kollagen I- und III-Fläche nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung.....	56
Abbildung 28: Repräsentative Aufnahmen der Desmin-Färbung in Kardiomyozytenlängs- und -querschnitt nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung.....	57
Abbildung 29: Repräsentative Aufnahmen der F-Aktin- und α -Actinin-Färbung im Kardiomyozytenlängsschnitt nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung.....	57
Abbildung 30: Histologische Analyse von Troponin I im Kardiomyozytenquerschnitt nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung.....	58
Abbildung 31: Aktivitätsassays zur Analyse 26S-proteasomaler Aktivitäten.....	61
Abbildung 32: Quantifizierung regulatorischer 19S-Untereinheiten nach Isoprenalinbehandlung.....	61

Abbildung 33: Untersuchung der Abundanz polyubiquitinylierter Proteine nach sieben Tagen Isoprenalin- bzw. Sham-Behandlung..... 62

Abbildung 34: DIGE-Analyse differenziell regulierter Proteine mithilfe der DeCyder-Software..... 65

Abbildung 35: Schematische Darstellung der vermuteten Rolle von Lmp2..... 78

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufnahmeeinstellungen für echokardiographische Analysen mit dem VEVO® 2100 System.....	28
Tabelle 2: Übersicht der Berechnung funktioneller Parameter im Rahmen der durchgeführten echokardiographischen Analysen.	28
Tabelle 3: Puffer-Zusammensetzung für DNA-Fällung.....	29
Tabelle 4: PCR-Mix zur Feststellung des Lmp2-Genotyps.....	30
Tabelle 5: Cycler-Protokoll zur Lmp2-Genotypisierung.	30
Tabelle 6: Protokoll der Coomassie-Färbung von Gelen.....	34
Tabelle 7: Protokoll der Silber-Färbung von Gelen nach Blum <i>et al.</i> ¹³⁰	34
Tabelle 8: Analyse einer möglichen Aortenregurgitation durch Messungen am linksventrikulären Ausflusstrakt (LVOT).....	44
Tabelle 9 Zusammenfassung der echokardiographischen Analysen im Verlauf der Isoprenalinbehandlung in Abhängigkeit von Lmp2.	54
Tabelle 10: Übersicht differenziell regulierter Proteine mit $p \leq 0,01$ (1,00E-02).....	65

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Hecker dafür, dass er mir die Chance und Möglichkeit zur Promotion in der Herz- und Kreislaufphysiologie gegeben hat sowie für seine steten Ratschläge und fortwährende Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Oliver Drews für seine wissenschaftliche Betreuung und herausragende fachliche Anleitung bedanken sowie die Unterstützung bei der Einreichung von Abstracts und Förderanträgen.

Herrn Prof. Dr. Johannes Backs danke ich für zahlreiche anregende Gespräche, motivierenden Worte und seine Unterstützung, sei es in TAC-Meetings, auf Konferenzen oder stundenlangen Autofahrten dorthin sowie die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gert Fricker und Herrn Prof. Dr. Marc Freichel für die Bereitschaft als Prüfer zu fungieren. Insbesondere Gert Fricker danke ich für zahlreiche Empfehlungsschreiben zur Drittmittelinwerbung sowie seine Mitarbeit in meinem TAC. Marc Freichel und dem DZHK HD/MA danke ich darüber hinaus für zahlreiche anregende Gespräche und freundliche Unterstützung auf Konferenzen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der AG Drews für die kontinuierliche Unterstützung, sei es methodisch, inhaltlich oder einfach nur aufmunternde Worte beinhaltend: Franziska, Synje, Anita und Lidia J. Gerade dieser Lidia sei für ihre aufopferungsvolle Hilfe zur Fertigstellung zahlreicher Experimente trotz ihrer nahenden Prüfungstermine gedankt. Lidia G. und Julian wünsche ich darüber hinaus alles Gute für den erfolgreichen Abschluss ihrer Projekte und Arbeiten. Jener Lidia danke ich vor allem für ihre Einarbeitung in die Ultraschallmethodik, die mir die Gelegenheit gab, diese Methode in unserem Institut kontinuierlich anzuwenden und weiterzuentwickeln.

Ulrike Gärtner von der IBF danke ich für die sehr zuverlässige und harmonische Zusammenarbeit bei der Virusinjektion. Ebenso möchte ich allen weiteren Kooperationspartnern danken, hervorgehoben seien hier Dr. Saskia Schlossarek und Frau Prof. Dr. Lucie Carrier für biometrische Daten und Gewebe der HCM-Versuche sowie Dr. Andreas Jungmann und Herr Prof. Dr. Oliver J. Müller für die Herstellung der AAVs.

Weiter danken möchte ich den aktuellen und ehemaligen Labormitgliedern und Gruppenleitern der Herz- und Kreislaufphysiologie, besonders Eda, Franzi, Anja und Carla,

Dankagung

sowie apl.-Prof. Dr. Thomas Korff und PD Dr. Andreas Wagner für ihr wissenschaftliches Feedback, zahlreiche Diskussionen und gerne bereitgestellte Hilfe. Nicht fehlen dürfen hier vor allem Iva und Maren, deren nette Zusammenarbeit und aufmunternden Worte vieles erleichtert haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Barbara Richards, Michaela Neidig und Dr. Gerd König für ihre zuverlässige Arbeit „hinter den Kulissen“, ohne die der normale Laborbetrieb kaum möglich wäre.

Ein riesiger Dank gebührt außerdem Caro und Larissa, deren bemerkenswerte Kollegialität, Zuverlässigkeit und Freundschaft eine große Hilfe waren und ohne die vieles nicht möglich oder zumindest unglaublich langweilig gewesen wäre.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Trainingskolleginnen und -kollegen bedanken, deren Freundschaft über so manche Forschungskrise hinweg half oder dazu beitrug, mal einen Schritt zurückzutreten, besonders bei Alex, Anne, Flo, Julia, Manu, Marius, Markus, Miguel, Nico, Oli, Sergej, den Staudis, Tim und Tine.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei dem Team der Elisabeth Apotheke Eppelheim und Kraichgau Apotheke Östringen, besonders bei den Eheleuten Bschorer-Krause und Krause, für die Möglichkeit begleitend zur Promotion flexibel arbeiten zu können.

Zu guter Letzt möchte ich mich meiner Familie danken, besonders meinen Eltern. Vielen Dank für die bedingungslose Unterstützung, Aufmunterung und auch Ablenkung in den letzten Jahren. Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Freundin für all ihren Zuspruch und all ihre Geduld herzlich bedanken. Ohne dies alles wäre es mir nicht möglich gewesen, die letzten Jahre erfolgreich zu bewältigen.

Die Arbeit wurde mithilfe von Drittmitteln der Perspektivförderung “*DNA- und RNA-basierte Therapeutika für Herzmuskelerkrankungen*” des Ministeriums für Wissenschaft und Kunst, Baden Württemberg, der Dres. Majic/Majic-Schlez-Stiftung und einer Marie-Curie-Maßnahme der Europäischen Kommission (CIG294213 an O.D.) durchgeführt.