

INAUGURAL -DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

GESAMTFAKULTÄT

FÜR MATHEMATIK, INGENIEUR- UND

NATURWISSENSCHAFTEN

DER

RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT

HEIDELBERG

vorgelegt von
M.Sc. Anja Riedel
aus Dresden

Tag der mündlichen Prüfung: 09. November 2022

DER EINFLUSS
NUKLEÄRER CALCIUMPUFFER
AUF DIE
NEUROHUMORAL INDUZIERT
HYPERTROPHIE VON KARDIOMYOZYTEN

Gutachter:
Prof. Dr. Marc Freichel,
Prof. Dr. Patrick Most

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Kalziumhomöostase in ventrikulären Kardiomyozyten	1
1.1.1 Zyklische Kalziumtransienten in ventrikulären Kardiomyozyten .	1
1.1.2 Zytosolisches Kalzium ist essentiell für die Kontraktion von Kar- diomyozyten	4
1.2 Kardiale Hypertrophie	5
1.2.1 Abgrenzung und Klassifikation physiologischer und pathologischer Hypertrophie	5
1.2.2 Molekulare Mechanismen hinter der Entstehung kardialer Hyper- trophie	7
Gq-Signalweg	8
IP3 & IP3-Rezeptoren	9
Gs-Signalweg	10
Metabolische Veränderungen	10
Veränderungen der in der Regulation der Translation	11
1.3 Methoden zur <i>in vitro</i> Analyse von Hypertrophie	12
1.3.1 Zellmodelle für kardiale Hypertrophie	12
1.3.2 Isolation Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRVCMCs)	13
1.3.3 Parameter	13
1.4 Nukleäre Kalziumsignale	14
1.4.1 Regulation kardialer Hypertrophie durch nukleäre Kalziumsignale	15
1.4.2 Molekulare Werkzeuge zur Blockade nukleärer Kalziumsignalwege	16
Parvalbumin	16
CaMBP4	17
1.5 Einführen von Genen in Kardiomyozyten <i>In vitro</i> zur Untersuchung der Hypertrophieantwort	18
Toxizität & Effizienz	18
Schnelle Expression	18
Übertragbarkeit	18

1.6	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Materialien	21
2.2	Klonierung & Amplifikation	26
2.2.1	Material	26
2.2.2	Methoden	27
2.3	AAV6 Virusproduktion	34
2.3.1	Material	34
2.3.2	Arbeitsablauf	36
2.4	Isolation neonataler, ventrikulärer Rattenkardiomyozyten	41
2.4.1	Material	41
2.4.2	Arbeitsablauf	42
2.5	Zellflächenmessung zur Bestimmung der Hypertrophieantwort	44
2.5.1	Arbeitsablauf	44
2.6	Anreicherung transduzierter NRVCMs via FACS	47
2.6.1	Arbeitsablauf	47
2.7	Expressionsanalyse in neonatalen Rattenkardiomyozyten	47
2.7.1	Materialien	47
2.7.2	qPCR	47
2.7.3	RNA Sequenzierung transduzierter Rattenkardiomyozyten	48
2.8	Messung der Translationsaktivität via Puromycin	49
2.9	Analyse der Transkriptionsfaktoraktivitäten	50
2.10	Statistik	50
2.10.1	Zellflächenversuch Protokoll AR	50
2.10.2	Zellflächenversuch Protokoll PM	50
2.10.3	qPCR	51
2.10.4	Genexpressionsstudien	51
2.10.5	Puromycinassay	51
3	Ergebnisse	52
3.1	<i>In vitro</i> Hypertrophie in NRVCMs	52
3.1.1	Vergleichende Analyse publizierter Protokolle zur Induktion von Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten	52
3.1.2	Etablierung einer Methode zur Quantifizierung neurohumoral induzierter Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten	54
3.2	Virusproduktion AAV6	61
3.2.1	Untersuchung von HPLC aufgereinigten AAV6 hinsichtlich der Transduktionseffizienz	61
3.3	Transduktion von NRVCMs durch HPLC- aufgereinigten AAV6	61

3.4	Die Inhibition der nukleären CaM-Signale reduziert die PE- induzierte Hypertrophie in NRVCN	64
3.5	Anreicherung von mCherry ⁺ Kardiomyozyten via FACS zur Analyse der Genexpression	67
3.6	Genexpressionsanalyse	69
3.6.1	Analyse von Veränderungen der genomweiten Genexpression durch CaMBP4 Behandlung unter Hypertrophiebedingungen . .	77
3.7	Analyse der mRNA Translation in nlsCaMBP4 ⁺ NRVCN	80
4	Diskussion	82
4.1	Etablierung eines Systems zur Untersuchung der Hypertrophieantwort in AAV6-transduzierten NRVCN	82
4.2	Inhibition nukleären Calcium-Calmodulins inhibiert die Entwicklung kardialer Hypertrophie in NRVCN nach PE-Stimulation	83
4.3	NRVCNs können auf basis nukleärer Fluoreszenzsignale via FACS sortiert werden	85
4.4	Die Analyse der Genexpression deutet auf einen vom klassischen Hypertrophen Genprogramm unabhängigen Mechanismus in CaMBP4 ⁺ NRVCNs hin	85
4.5	Nukleäres Ca ²⁺ -Calmodulin reguliert die Expression von Regulatoren der stressabhängigen Translation	87
4.6	Schlussfolgerung	89
	Literaturverzeichnis	IX
	Danksagung	XXIX
	Appendix	XXX

Zusammenfassung

Während des kardialen Umbaus Veränderungen der zytosolischen und nukleären Kalziumhomöostase beschrieben worden. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob die Entwicklung kardialer Hypertrophie kausal durch nukleäres Kalzium bedingt ist und welche Signalwege in diesen Prozess charakterisieren. In der vorliegenden Doktorarbeit habe ich den Einfluss von Inhibitoren nukleären Kalziums (Parvalbumin), sowie Kalzium-Calmodulins (CaMBP4) auf die Entwicklung von Hypertrophie und die assoziierten transkriptionellen Veränderungen in neurohumoral stimulierten, neonatalen, ventrikulären Rattenkardiomyozyten (NRVCM) untersucht. Meine Ergebnisse zeigen, dass die Expression von nukleärem CaMBP4 den Anstieg der Zellfläche nach PE-Stimulation signifikant reduziert. Die Analyse des Transkriptoms zeigt keine Reduktion in der Expression der klassischen Hypertrophiemarkergene ANF und BNP, sowie von MEF2 regulierten Genen (Xirp1, Xirp2 und Srpk3), was auf einen CaMKII unabhängigen Mechanismus der Kalzium-Calmodulin medierten Hypertrophieantwort hindeutet. Via Auswertung der Transkriptionsfaktor(TF) -aktivitäten wurde ein Array potentiell kalziumsensitiver TFs identifiziert, darunter Etf3, E2f3, Runx1, E2f2, Klf2 und Klf4. Des Weiteren wurden Transkriptionsfaktoren gefunden deren Aktivität in NRVCM durch die Expression von CaMBP4-nls verstärkt wurde. Ich habe ein Cluster an Genen identifiziert (Eif2s1, Eif3d, Rnps1, Kpnb1), dass in die Regulation der Translation involviert ist und die in CaMBP4-nls-exprimierenden Zellen nach PE-Stimulation nicht signifikant verstärkt exprimiert werden. Über einen Puromycin-Assay konnte ich bestätigen dass die Proteintranslation in CaMBP4-nls-behandelten Kardiomyozyten nicht ansteigt. Dies legt nahe, dass nukleäre Kalzium-Calmodulin Signalwege in die transkriptionelle Regulation der Katecholamin-induzierten mRNA Translation involviert sind. Es bedarf weiterer Studien um die molekularen Akteure zu charakterisieren, die nukleäres Kalzium-Calmodulin und die transkriptionelle Regulatoren der Proteintranslation während der Ausbildung kardialer Hypertrophie verbinden.

Abstract

During cardiac remodeling, alterations in the cytosolic and nuclear Ca^{2+} homeostasis are described. Whether the development of cardiac hypertrophy is causally influenced by increases in nuclear calcium and which signaling pathways define this process is yet to be determined. In this thesis, I studied the impact of blockers of nuclear calcium (parvalbumin) and calcium-calmodulin signaling (CaMBP4) on the development of hypertrophy in neurohumorally stimulated neonatal rat ventricular cardiac myocytes (NRVCM) and the thereby associated calcium regulated transcriptional programs. I found that the expression of nuclear CaMBP4 led to a significant reduction in the PE-induced cell area growth compared to the control. Transcriptome analysis revealed the established hypertrophy marker genes ANF and BNP and known MEF2 target genes (Xirp1, Xirp2 and Srpk3) to be not reduced in nuclear CaMBP4-treated myocytes during PE stimulation, indicating a CaMKII independent mechanism of Ca^{2+} -calmodulin mediated hypertrophic signaling. Analysis of transcription factor (TF) activity identified potentially calcium-calmodulin sensitive TFs including Atf3, E2f3, Runx1, E2f2, Klf2 and Klf4, as well as transcription factors whose activity was increased in CaMBP4-nls treated NRVCM. I identified a cluster of genes which is involved in the regulation of translation (Eif2s1, Eif3d, Rnps1, Kpnb1), that was not upregulated by PE stimulation in CaMBP4-expressing myocytes. Via a puromycin assay, I confirmed that protein translation was not significantly increased in CaMBP4-nls-treated cardiac myocytes after PE stimulation. This suggests, that nuclear Ca^{2+} -calmodulin signaling is involved in the transcriptional regulation of catecholamine-evoked mRNA translation. Future studies are required to characterize the molecular machinery that connects Ca^{2+} -calmodulin and the transcriptional regulators of protein translation during the development of cardiac hypertrophy.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AC	Adenylyzyklase
Ang II	Angiotensin II
β -AR	β -Adrenorezeptor
CaM	Kalzium-Calmodulin
CaMBP4	Kalzium-Calmodulin Binding Protein 4
CaMK	Kalzium-Calmodulin-Kinase
CICR	Kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung
ECC	Elektromechanische Kopplung
Eif	eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET- 1	Endothelin 1
ISO	Isoproterenol
LTCC	L-Typ Kalziumkanal
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NRVCM	Neonataler ventrikulärer Rattenkardiomyozyt
PE	Phenylephrin
PI	Proteinaseinhibitor
PV	Parvalbumin
SERCA	SR Kalzium ATPase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
TnT Vektor	scAAV-TnnT-Bmt1 HindIII-scAAV

Abbildungsverzeichnis

1	Kalziumdynamik einer gesunden Kardiomyozyte	2
2	Kalziumdynamik einer hypertrophen Kardiomyozyte	7
3	Initiale Hypothese	17
4	Klonieren der Parvalbumin Konstrukte	29
5	Klonieren der mCherry Konstrukte	30
6	Klonieren der CaMBP4 Konstrukte	31
7	Finale Konstrukte	33
8	Protokolle zur Induktion von Hypertrophie in Rattenkardiomyozyten . . .	45
9	Variabilität in publizierten Protokollen zur Durchführung von Hypertrophie-Experimenten an NRVCMS	52
10	Unterschiede in der Art und Konzentration der Stimuli zur Durchführung von Hypertrophie-Experimenten an NRVCMS	53
11	Induktion von Hypertrophie über verschiedene Stimuli	55
12	Verwendung kombinierter Stimuli zur Induktion von Hypertrophie unter Protokoll AR	57
13	Einfluss von FBS als Zusatz im Mangelmedium auf die PE medierte Hypertrophieantwort	58
14	Vergleich verschiedener Stimulationsprotokolle für die Zellflächenmessung.	60
15	Produktion der Viruskonstrukte	62
16	Titration der HPLC aufgereinigten scAAV6 zeigt Transduzierbarkeit der Kardiomyozyten und Spezifität der Antikörperfärbung	63
17	Zellflächenfärbung und Nachweis der erfolgreichen Expression der AAV6-Konstrukte in NRVCMS mit und ohne PE Stimulation	64
18	Zellflächenmessung zur Quantifizierung der Hypertrophieantwort in NRVCMS	66
19	Kalibrierung an nicht transduzierten Kardiomyozyten	67
20	Sortierung transduzierter Kardiomyozyten	68
21	Hauptkomponentenanalyse nach RNAseq	69
22	Änderung der Genexpression in mCherry ⁺ NRVCM	71
23	Entkopplung von Phänotyp und Genexpressionsprofil	72
24	Effekt von CaMBP4 in Abwesenheit von PE	74
25	PE-induzierte Veränderungen der Genexpression in CaMBP4 ⁺ NRVCM.	76
26	Effekt von CaMBP4 unter PE-Stimulation	77
27	Analyse der Transkriptionsfaktoraktivitäten basierend auf den Daten der Genexpressionsanalyse	79
28	Regulation eines Clusters von translationsrelevanten Genen	80
29	Messung der Translation durch die Inkorporation von Puromycin	81

30	CaMBP4 greift über einen CaMKII unabhängigen Mechanismus in die Translation ein	91
----	---	----

Tabellenverzeichnis

1	Plasmide	21
5	Chemikalien	21
2	Primer	24
3	Verbrauchsmaterial	24
4	Kits	24
6	Enzyme & Puffer für die Klonierung	25
7	Antikörper	25
8	Software	26
9	1l LB Medium, pH 7,5	26
10	LB Agar, pH 7,5	27
11	PCR Ansatz für die Amplifizierung von PV.	28
12	PCR-Programm für die PV Amplifikation	28
13	Ansatz für die T4 Ligation.	32
14	PBS MK	34
15	PBS MKN	34
16	Benzonasepuffer	34
17	Iodixanollösungen für 23 Gradienten	34
18	Lysepuffer	35
19	PEI	35
20	Triton-Lysepuffer	35
21	SYBR Green Mastermix	35
22	qPCR Programm zur Virusquantifizierung	40
23	10x ADS	41
24	Kollagenlösung	41
25	Verdauungslösung	42
26	Percoll Stocklösung	42
27	Percollgradient, obere Schicht	42
28	Percollgradient, untere Schicht	42
29	PBST	44
30	Getestete Bedingungen im Zellflächenversuch	46
31	Primer für die Genexpressionsanalyse via qPCR	48
32	2x RIPA	49
33	Ausbeute nach Virusaufreinigung	61

34	Anzahl analysierter Zellen für die RNAseq	68
35	Appendix: Vergleich der Zusammensetzung von DMEM Glutamax und M199 Medium	XXX
36	Appendix: Durch CaMBP4 veränderte Transkriptionsfaktoraktivitäten in Abwesenheit von PE	XXXIII
37	Appendix: Durch CaMBP4 veränderte Transkriptionsfaktoraktivitäten unter PE Stimulation	XLI
38	Appendix: Gene, die sowohl in PE stimulierten NRVCM als auch in CFA stimulierten Neuronen durch Expression von CaMBP4 differentiell reguliert werden.	XLIX

1 Einleitung

Das Herz stellt die Verteilung von Stoffwechselfsubstraten und Sauerstoff innerhalb des Körpers über die Zirkulation des Blutes sicher. Ein menschliches Herz ist hierbei ein Hochleistungsmuskel, der etwa 3000 Millionen mal im Laufe eines Menschenlebens kontrahiert [Alberts et al., 2008; Gordan et al., 2015; Speckmann et al., 2019].

Das rechte und das linke Herz bilden hierbei jeweils eigene funktionale Untereinheiten, welche über eine Scheidewand getrennt sind. Eine Einheit besteht dabei aus dem Vorhof (Atrium), welche über der Kammer (Ventrikel) liegt. Zwischen Atrium und Ventrikel befinden sich die Herzklappen. Das Blut durchläuft aus den Hohl- (rechts) beziehungsweise den Lungenvenen (links) kommend zunächst die Atrien, wird in die Ventrikel geleitet und von dort in die Arterien ausgestoßen. Gesteuert wird die Kontraktion des Herzens durch, in Schrittmacherzellen des Sinusknotens produzierte, Aktionspotentiale, da gesunde adulte Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) von selbst keine Aktionspotentiale generieren und somit nicht spontan kontrahieren können. Dieses wird über den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) weitergeleitet und durchläuft von dort das His-Bündel und die Tawara-Schenkel. Innerhalb des Myokards wird das Aktionspotential über Purkinje-Fasern weitergegeben, da keine Verbindung zwischen Atrium und Ventrikel besteht. Diese geordnete Erregung stellt sicher, dass das Atrium vor dem Ventrikel kontrahiert und dieser somit vollständig mit Blut gefüllt ist [Mutschler et al., 2013; Speckmann et al., 2019].

Die zyklische Kontraktion der Kardiomyozyten bildet die Grundlage der Herzfunktion und verläuft in zwei Phasen: der Kontraktionsphase (Systole) und der Entspannungsphase (Diastole). Im Ruhezustand durchläuft ein menschliches Herz diese Phasen etwa 70-mal pro Minute, wobei im Schnitt 5 Liter Blut gepumpt werden. Unter Belastung können diese Werte jedoch durch sympathische Regulation erheblich erhöht werden [Mutschler et al., 2013]. Die kontrollierte Freisetzung, sowie Absenkung von Kalzium im Zytosol ist hierbei Voraussetzung für die koordinierte Kontraktion [Cairns und Borrani, 2015].

1.1 Kalziumhomöostase in ventrikulären Kardiomyozyten

1.1.1 Zyklische Kalziumtransienten in ventrikulären Kardiomyozyten

Während der Systole wird Kalzium über die L-Typ Kalziumkanäle (LTCCs) ins Zytosol eingeleitet [Hofmann et al., 2014; Sutanto et al., 2020]. Die Öffnung dieser Kanäle wird durch die Depolarisierung der Membran durch das ankommende Aktionspotential induziert. Dieser Einstrom ist jedoch nicht hauptsächlich für den Anstieg der zytosoli-

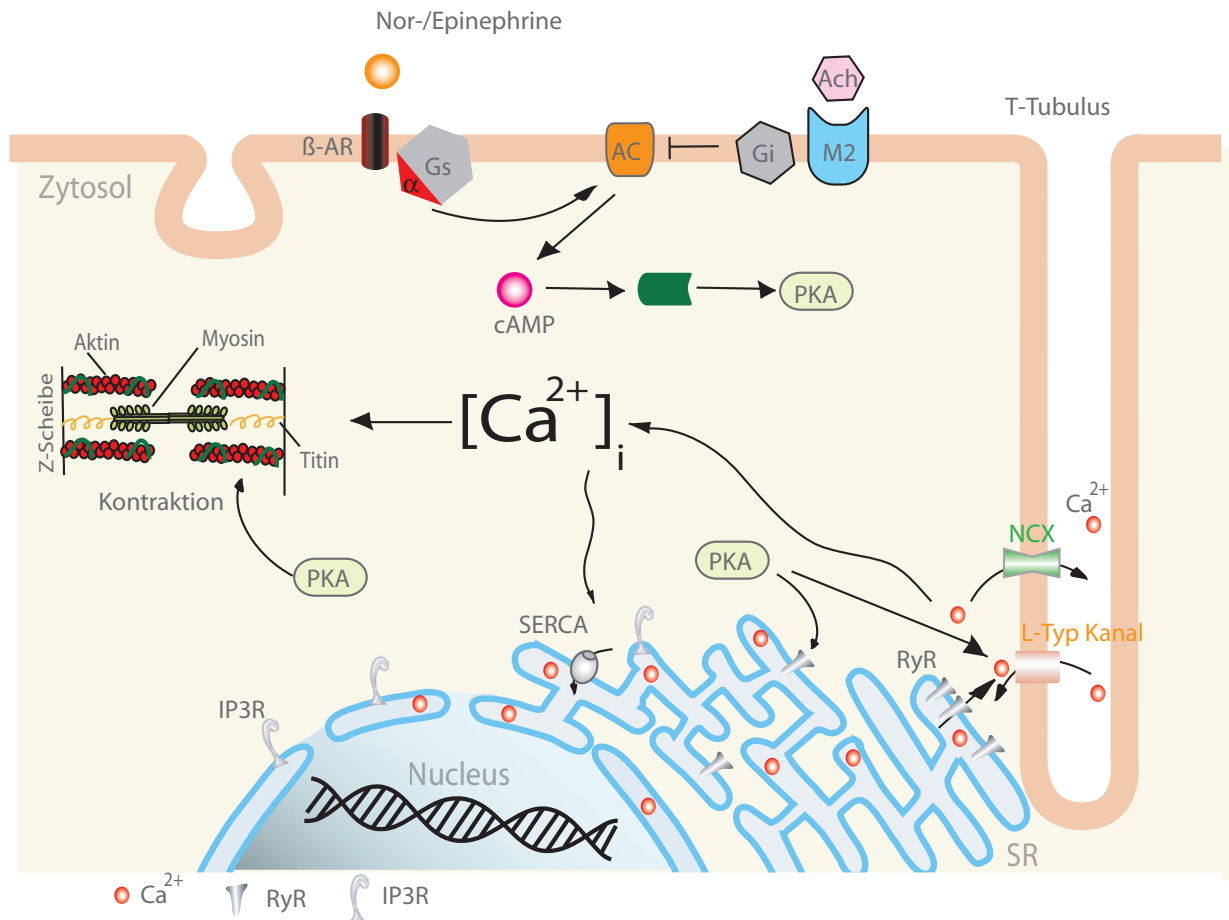


Abbildung 1: **Kalziumdynamik einer gesunden Kardiomyozyte.** Grafik von AG Freichel angepasst nach Alberts et al. [2008], Donald M. Bers [2002] und Gordan et al. [2015]. Kalzium (Ca^{2+}) wird über L-Typ Kanäle in die Zelle geleitet, was die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol (SR) über die Ryanodinrezeptoren (RyR) induziert. Freies Ca^{2+} ist Voraussetzung für die Kontraktion. Die Kontraktion wird über die Aktivierung des β Adrenorezeptors (β -AR) verstärkt. Die Aktivierung des β -AR führt zur Gs-vermittelten Aktivierung der Adenylylzyklase (AC), welche cAMP freisetzt, was zur Aktivierung der Phosphokinase A (PKA) führt. Diese moduliert sowohl die RyRs, als auch z.B. Troponin I.

schen Kalziumkonzentration verantwortlich, sondern wird benötigt um die Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Kalziumspeichern anzuregen [Eisner, 2014]. In ventrikulären Kardiomyozyten sind LTCCs hauptsächlich in den tiefen Einbuchtungen der Zellmembran, den T-Tubuli, präsent (siehe Abbildung 1). Auf der zytosolischen Seite befinden sie sich in räumlicher Nähe der in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) befindlichen Ryanodinrezeptoren (RyRs). LTCCs und RyRs bilden dabei so genannte Couplons aus, die im Zusammenspiel dazu dienen eine Signal-amplifikation über den Sekundärbotenstoff Kalzium zu erzeugen [Franzini-Armstrong et al., 1999; Hohendanner et al., 2014]. Das SR bildet ein zelluläres Kompartiment, das Kalzium speichert und mit der Kernmembran verbunden ist [Ljubojevic und Bers,

2015]. Der Bereich zwischen SR und LTCC wird in Modellen als eigenes zelluläres Kompartiment, als "Cleft", bezeichnet. Dieses Kompartiment ist mit dem Sarkolemma, dem SR und dem Extrazellularraum verbunden, wobei eine freie Diffusion zum Sarkolemma stattfindet, während der Ionenaustausch mit den anderen Kompartimenten nur über Kanäle und Transporter möglich ist. Dabei befinden sich etwa 90 % aller LTCCs im Cleft, was für die lokalen Ionenkonzentrationen und deren Diffusion durch das Zytoplasma entscheidend ist [Shannon et al., 2004]. In den T-Tubuli befinden sich außerdem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und spannungsabhängige Natriumkanäle. Diese sind nicht mit den Ryanodinrezeptoren kolokalisiert [Scriven et al., 2000].

Es sind 3 verschiedene Isoformen von RyR beschrieben (RyR1-3), diese werden jedoch gewebsspezifisch exprimiert. In Kardiomyozyten findet man hauptsächlich RyR2 in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums. Anders als LTCCs sind sie dabei jedoch nicht spezifisch am Cleft konzentriert, sondern finden sich überall am Übergang von SR zu Zytosol, Cleft und Sarkolemma. RyRs bilden Cluster von 30-250 RyRs. An C2C12 Zellen wurde zudem gezeigt, dass kein Kalziumausstrom durch RyRs an der Innenseite der Kernhülle stattfindet [Marius et al., 2006; Niggli et al., 2013]. Die Öffnungswahrscheinlichkeit von RyRs steigt stark mit der Kalziumkonzentration auf der Außenseite. Durch den systolischen Einstrom von Kalzium im Cleft kommt es zur kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung durch RyRs aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (engl. Calcium induced Calcium release; CICR). Dieses wiederum erhöht die lokale Kalziumkonzentration an den RyRs und induziert somit in einer Rückkopplung die Ausschüttung von Kalzium aus dem SR [Shannon et al., 2004].

Der kombinierte Kalziumeinstrom ins Zytosol aus dem Extrazellularraum und dem SR führt zu einem starken Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ auf $5 \mu\text{M}$ [Ibarra et al., 2014]. Nach der Systole folgt die Diastole, während der die Kalziumkonzentration wieder auf das basale Level abgesenkt wird. Während dieser Phase wird freies Kalzium rapide aus dem Zytosol zurück in das SR gepumpt, um den Urzustand wiederherzustellen und die nächste Systole auszulösen. Dies wird durch die SR Kalzium ATPase (SERCA) reguliert. In geringem Maße wird Kalzium durch den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) in den Extrazellularraum abgegeben oder durch aktiven Transport in die Mitochondrien geleitet [Ljubojevic und Bers, 2015; Frey et al., 2000; Sutanto et al., 2020; Eisner et al., 2020].

1.1.2 Zytoplasmatisches Kalzium ist essentiell für die Kontraktion von Kardiomyozyten

Das kontraktile Element der Muskelzellen ist das Sarkomer. Diese bestehen aus dicken und dünnen Filamenten. Die dünnen Filamente bestehen aus Aktinhelices, welche am (+)-Ende an Z-Scheiben befestigt sind. Diese Z-Scheiben bestehen aus α -Aktinin und CapZ und verhindern die Depolymerisation der Aktinstränge und dienen der Fixierung der Sarkomere. Entlang der Furche der Aktinhelix bindet Tropomyosin, welches durch die I-Untereinheit des Troponins an die Aktinhelix gebunden ist. Am (-)-Ende überlappen die dünnen mit den dicken Filamenten in der Mitte des Sarkomeres. Die dicken Filamente bestehen aus Myosinsträngen, die über Titin ebenfalls an den Z-Scheiben befestigt sind. Die Muskelkontraktion wird durch das Verschieben des Myosins in Richtung der (+)-Enden des Aktins erzeugt. Myosin verfügt über eine Aktinbindestelle, die im Ausgangszustand jedoch durch Troponin blockiert ist. Der Troponin I-T Komplex hält hierbei das Tropomyosin außerhalb der Furche der Aktinhelix und verhindert somit physisch die Bindung von Myosin [Alberts et al., 2008].

Zytoplasmatisches Kalzium ist in Kardiomyozyten essentiell für den Ablauf der Kontraktion [Dewenter et al., 2017]. Der Prozess in welchem durch diese Verschiebung unter Umsatz von ATP Kraft erzeugt wird, wird als Querbrückenzyklus bezeichnet. Bis zu 4 Ca^{2+} binden hierfür an Troponin-C, was durch eine Konformationsänderung die Bindung zwischen Troponin-I und Aktin auflöst. Infolge dessen ist die Ausbildung von Querbrücken zwischen Aktin und Myosin möglich und somit die Durchführung der Kontraktion. Die Menge an im Zytosol verfügbarem Kalzium ist dabei entscheidend für die Stärke der Kontraktion. Nachdem das Kalzium von Troponin dissoziiert, bindet dieses wieder an Myosin und kehrt somit in die Ausgangskonformation zurück [Alberts et al., 2008; Ljubojevic und Bers, 2015; Sutanto et al., 2020].

Die Leistung des Herzens muss konstant an die Nähr- und Sauerstoffbedarf des Körpers angepasst werden. Dabei werden Frequenz (Chronotropie), Kontraktilität (Inotropie) und Erregungsweiterleitung (Dromotropie) angepasst. Dies wird durch das autonome Nervensystem (ANS) gewährleistet. Das ANS wird in die antagonistischen Systeme Sympathikus und Parasympathikus unterteilt. Der Sympathikus reguliert die Bedingungen unter Belastung (Kampf, Flucht und Fortpflanzung, engl. "fight, flight or mate"), während der Parasympathikus die Ruhebedingungen (Ruhe und Verdau, engl. "rest and digest") kontrolliert. Norepinephrine ist der Neurotransmitter des Sympathikus, Acetylcholin der des Parasympathikus. Aus der obigen Beschreibung der ECC ergibt sich, dass die Kontraktion von Kardiomyozyten sowohl durch die Abstände (Frequenz) der eingehenden Aktionspotentiale, als auch durch die Präsenz von Kalzium

im Zytosol moduliert werden können. Die Herzfrequenz wird hauptsächlich über den Sinusknoten reguliert, wobei der Sympathikus die Frequenz positiv und der Parasympathikus negativ beeinflusst. Ebenfalls über das Nervensystem (AV Knoten) wird die Dromotropie abgesenkt (Parasympathikus) oder angehoben (Sympathikus). An dieser Stelle werden diese beiden Mechanismen daher nicht weiter beleuchtet. Stattdessen soll die Inotropie genauer betrachtet werden, die direkt an den Kardiomyozyten gesteuert wird. [Gordan et al., 2015].

In Kardiomyozyten erfolgt die Regulation der Inotropie hauptsächlich über β -Adrenorezeptoren (β -AR) und muskarinische Rezeptoren Typ 2 (M_2), wie in Abbildung 1 dargestellt. Durch Bindung von Nor-/Epinephrin an den β -AR Rezeptor wird die α -Untereinheit vom GTP-Bindeprotein (G_s) abgespalten und stimuliert die Adenylylzyklase (AC). Diese produziert cAMP, welches die Phosphorkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert zahlreiche Zielproteine innerhalb der Zelle, darunter die LTCCs, RyRs, Troponin I und Phospholamban. Dadurch wird die Wiederaufnahme von Ca^{2+} ins SR und die Dissoziation von Troponin beschleunigt, wodurch für die nächste Systole mehr Kalzium für die Ausschüttung zur Verfügung steht. Die parasymphatische negative Wirkung auf die Inotropie wird über die Inhibition der AC über den M_2 Rezeptor reguliert [Donald M. Bers, 2002].

1.2 Kardiale Hypertrophie

1.2.1 Abgrenzung und Klassifikation physiologischer und pathologischer Hypertrophie

Der Begriff kardiale Hypertrophie beschreibt die Größenzunahme des Herzens, basierend auf der Größenzunahme der Kardiomyozyten. Ausgelöst wird dieses Wachstum durch kardialen Stress. Dabei wird zwischen der physiologischen Hypertrophie, welche beispielsweise durch sportliche Belastung hervorgerufen und durch eine erhaltenen oder verbesserte Herzfunktion charakterisiert wird, und der pathologischen Hypertrophie, welche durch dauerhafte Belastungen wie z.B. anhaltendem Bluthochdruck oder Myokardinfarkt ausgelöst wird [Nakamura und Sadoshima, 2018; Frey et al., 2004].

In der westlichen Welt sind Herzerkrankungen für einen stetig steigenden Anteil der Todesfälle verantwortlich. In den USA allein werden inzwischen 25 % aller Todesfälle, das entspricht 655000 Todesfällen im Jahr, den Herzerkrankungen zugeordnet [Virani et al., 2020]. Dabei ist die pathologische kardiale Hypertrophie als ein Hauptmerkmal von Herzerkrankungen anerkannt [Cohn et al., 2000]. Das Herz erfährt hierbei funktionelle und morphologische Veränderungen, charakterisiert unter anderem durch die Größenzunahme (Hypertrophie), Fibrose und die Dysregulation der Kalzi-

umhomöostase [Azevedo et al., 2016]. Es wird geschätzt, dass sich bei etwa 4.9 % der über 60-jährigen Bevölkerung frühe Phasen kardialer Hypertrophie beobachten lassen [van Riet et al., 2016], die zunächst zu einer Abnahme des Volumens der Herzkammer und Zunahme der ventrikulären Wanddicke bei zunächst gleichbleibender Pumpleistung führt [Nakamura und Sadoshima, 2018]. Diese zunächst gleichbleibende Leistung geht auf die neurohumorale Gegenregulation zurück, bei der es durch das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem) zur Ausschüttung von Catecholaminen (z.B. Angiotensin) und Hormonen, wie Endothelin, die Kontraktilität des Herzens kurzfristig erhöht wird, bei dauerhafter Aktivierung jedoch die kardiale Hypertrophie auslöst [Schiattarella und Hill, 2015; Suzuki et al., 1991]. Es wurde gezeigt, dass diese Zunahme der Wanddicke auf Kosten des ventrikulären Volumens stark mit dem Auftreten des plötzlichen Herztodes korreliert (Herzversagen mit erhaltener Ejektionsfraktion, HFpEF) [Spirito et al., 2000]. Obwohl das kardiale Remodeling ein primär adaptiver Mechanismus ist [Dirkx et al., 2013], hat sich gezeigt, dass die Reduktion der Hypertrophie sich positiv auf die Prognose der betroffenen Patienten auswirkt. Die "Heart Outcomes Prevention Evaluation" (HOPE) Studie hat Patienten über 55 Jahren mit mehreren kardialen Risikofaktoren über 4-6 Jahre begleitet. Es wurde beobachtet, dass mit dem ACE-Inhibitor Ramipril behandelte Teilnehmer, die zu Studienbeginn keine linksventrikuläre Hypertrophie aufwiesen, ein signifikant geringeres kombiniertes Risiko für Hypertrophie und Tod hatten, als die Placebogruppe. Des Weiteren konnte unter Ramipril ein Rückgang bestehender Hypertrophie beobachtet werden [Mathew et al., 2001; Schiattarella und Hill, 2015].

Zudem kommt es zu vermehrter interstitieller Fibrose, sowie der Versteifung der Kardiomyozyten [Shimizu und Minamino, 2016; Pieske et al., 2019]. Etwa 50 % aller mit Herzversagen eingelieferten Patienten weisen diese Form der Erkrankung auf [Pieske et al., 2019]. In der Progression der Erkrankung kann es zum Absterben zahlreicher Zellen und zur Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie kommen, die durch einen extremen Zuwachs des ventrikulären Volumens, aber einer starken Abnahme der ventrikulären Wanddicke gekennzeichnet ist. In diesem Zustand ist das Herz nicht mehr fähig das gesteigerte Volumen auszustoßen (verringerte Ejektionsfraktion) und es kommt in der Folge zum Herzversagen (Herzversagen mit reduzierter Ejektionsfraktion, HFrEF) [Nakamura und Sadoshima, 2018].

Während des kardialen Umbaus kommt es auf zellulärer Ebene zu einer Zunahme der Zellflächen der Kardiomyozyten, einem Anstieg in der Proteinsynthese [Sadoshima und Izumo, 1993] und der Reaktivierung des fötalen Genprogramms. Infolge dessen wird die fötale (beta) Isoform der schweren Myosinkette (beta myosin heavy chain, β MHC) gegenüber der adulten α MHC hochreguliert. Des Weiteren wird die Expression

der natriuretischen Peptide ANF und BNP verstärkt [Frey und Olson, 2003; Molkenin et al., 1998]. Es ist jedoch zu beachten, dass ANF- und BNP-Level in Patienten von vielen Faktoren abhängig sind und somit starken individuellen Schwankungen unterliegen können [Pieske et al., 2019].

1.2.2 Molekulare Mechanismen hinter der Entstehung kardialer Hypertrophie

Zahlreiche Signalwege reagieren auf Stresssignale und ebnen den Weg für die Ausbildung von Hypertrophie in Kardiomyozyten. Die Vermittlung dieser Signale erfolgt sowohl mechanisch als neurohumoral [Carreno et al., 2006; Heineke und Molkenin, 2006]. Im Folgenden liegt der Fokus auf der neurohumoralen Vermittlung hypertropher Signalkaskaden

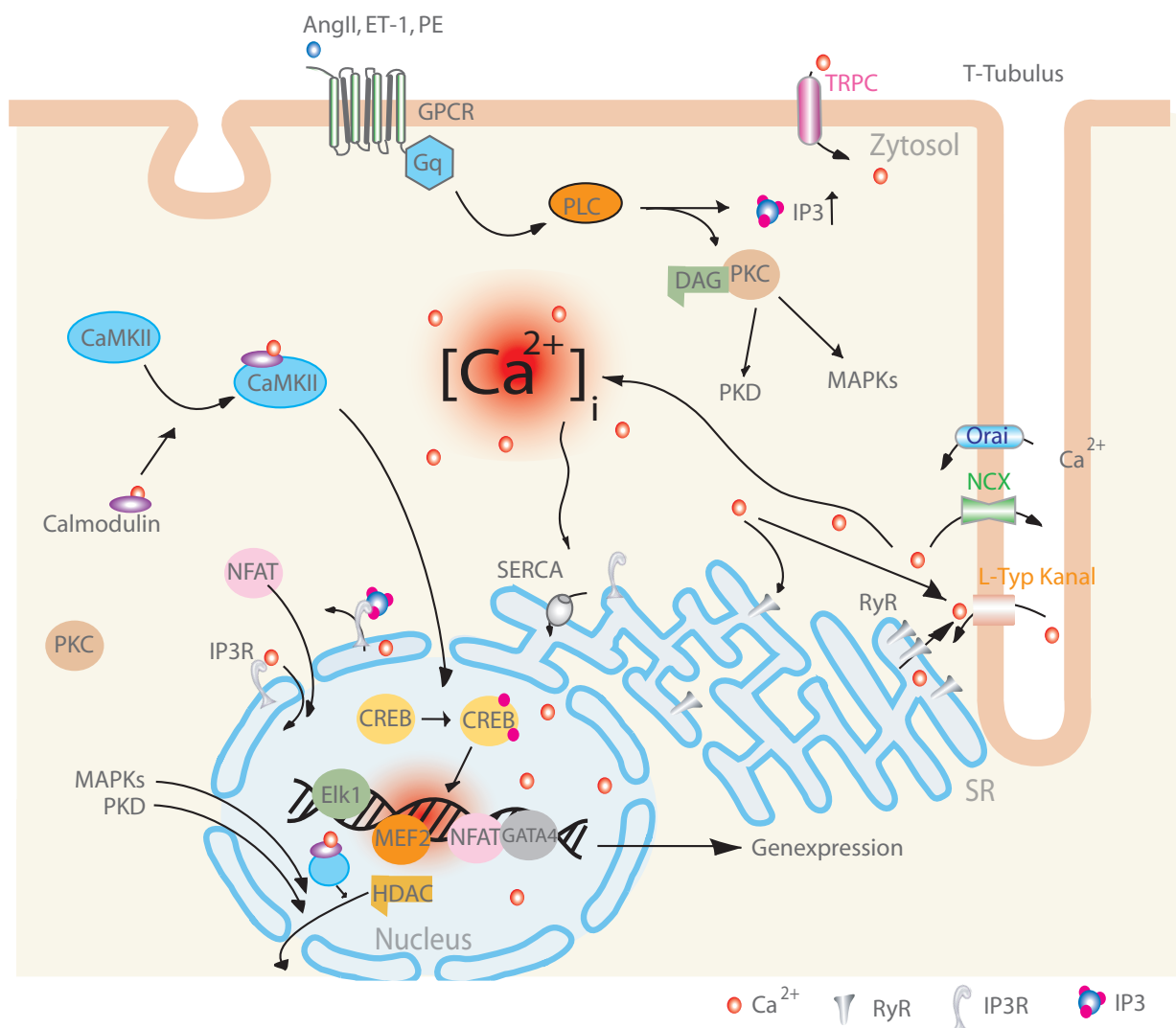


Abbildung 2: **Kalziumdynamik einer hypertrophen Kardiomyozyte.** Grafik von AG Freichel angepasst nach Mudd und Kass [2008], Bootman et al. [2009], Ljubojevic und Bers [2015] und Puhl et al. [2002]

Der Gq-Signalweg: Im Unterschied zur physiologischen Hypertrophie, welche hauptsächlich über Membranrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität vermittelt wird, sind in die pathologische Hypertrophie vor allem G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) involviert [Carreno et al., 2006], wie in Abbildung 2 dargestellt. Zu dieser Rezeptorklasse gehören der Angiotensin Rezeptor Typ 1 (AT₁, Ligand: Angiotensin II), der Endothelin Typ A Rezeptor (ET_A-Rezeptor, Ligand: Endothelin-1), sowie der α_1 -Adrenorezeptor (α_1 -AR), Ligand: Phenylephrin) [Melaku und Desalegn, 2019; Woodcock et al., 2007; Higazi et al., 2009].

In vivo produziert Angiotensin II (AngII) robuste Effekte, jedoch sind die AT-Rezeptoren nicht ausschließlich im Herzen exprimiert [Sechi et al., 1992], sodass der Effekt nicht ausschließlich auf den direkten Signalweg am Herzen zurückgeführt werden kann. *In vitro* ist dokumentiert, dass die Effekte von Angiotensin starken Schwankungen unterliegen [Lijnen und Petrov, 1999]. Es wurde postuliert, dass Kardiomyozyten durchaus funktionale Angiotensinrezeptoren exprimieren, der durch Angiotensin ausgelöste hypertrophe Effekt aber zusätzlich durch die Präsenz von Fibroblasten moduliert wird, welche auf AngII mit der Ausschüttung von IL-6 reagieren [Ibarra et al., 2014; Sano et al., 2000]. Durch Behandlung mit Losartan konnten die Effekte von Angiotensin in neonatalen Rattenkardiomyozyten reduziert werden [Sadoshima und Izumo, 1993], was wiederum für eine direkte Interaktion mit dem AT-Rezeptoren der NRVCMCs spricht. Sadoshima *et al.* zeigen in ihren Experimenten jedoch auch, einen starken Einfluss von AngII auf den Einbau von Phenylalanin in Nichtmyozyten.

Durch Bindung eines Liganden an einen Gq-GPCR in der Zellmembran, erfolgt auf zytosolischer Seite die Abspaltung der α -Untereinheit. Dies führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol- 4,5 -diphosphat zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert [Mutschler et al., 2013]. Sowohl IP3 als auch DAG sind hierbei wichtige Sekundärbotenstoffe, welche für die Hypertrophie relevante Signalwege vermitteln.

Diacylglycerol (DAG): DAG ist in der Zellmembran verankert und aktiviert eine Familie von Serin-Threonin Protein Kinasen (Protein Kinase C, PKC) [Carreno et al., 2006; Bootman et al., 2009; Sutanto et al., 2020]. Die PKC ist in zahlreiche Prozesse involviert. Es ist bekannt, dass die PKC in der Lage ist, Transiente Rezeptorpotentialkanäle (TRPCs) zu inhibieren [Eder und Molkentin, 2011]. Es wurde gezeigt, dass AngiotensinII vermittelte Hypertrophie auch über das Membranpotential reguliert wird. Hierfür wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit einer Überexpression von Transienten Rezeptorpotentialkanälen (TRPC3 & TRPC6) charakterisiert. Diese zeigten stärkere Veränderungen des Membranpotentials bei Behandlung mit AngII, als Wildtypzellen.

Des Weiteren zeigten Zellen, die mit TRPC3 oder TRPC6 siRNA behandelt wurden geringere Translokation von NFAT in den Nukleus, welche als Signalmechanismus für Hypertrophie bekannt ist [Onohara et al., 2006]. In einer TRPC- Knockout- Studie wurde jedoch gezeigt, dass TRPC3⁻/TRPC6⁻ Mäuse, anders als TRPC1⁻/TRPC4⁻ Mäusen, nicht vor maladapivem kardialen Remodeling nach Behandlung mit AngiotensinII geschützt sind [Camacho Londoño et al., 2015].

IP3 & IP3-Rezeptoren: IP3 bindet an IP3 Rezeptoren (IP3Rs) und führt somit zur Ausschüttung von Kalzium [Bootman et al., 2009; Mak und Foskett, 2015]. Die IP3R Familie umfasst 3 Subtypen, IP3R-1, IP3R-2 und IP3R-3. In adulten Kardiomyozyten wird hauptsächlich der IP3R-2 exprimiert, welcher die höchste Bindeaffinität unter den IP3Rs zu IP3 besitzt [Perez et al., 1997]. Es wurde gezeigt, dass der IP3R-2 in der äußeren Kernhülle und dem sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, wobei sich die Rolle des IP3R in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten zu unterscheiden scheint. In atrialen Kardiomyozyten sind verstärkte Cluster mit Ryanodinrezeptoren im peripheren SR zu beobachten, während in ventrikulären Kardiomyozyten der IP3R verstärkt in der Kernhülle lokalisiert ist [Wu et al., 2006; Dewenter et al., 2017]. Während die äußere Kernhülle mit dem SR verschmolzen ist, ist die innere Kernhülle strukturell separat vom SR [Gerasimenko et al., 1996]. Cárdenas *et al.* haben Antikörperfärbungen der drei IP3R Subtypen und LAMP2, einem Marker der inneren Kernhülle in Myozyten vorgenommen und konnten nur für IP3R-1 eine Kolo-kalisation feststellen. Allerdings wurde über SDS-Page gezeigt, dass der IP3R-2 in diesen Zellen zum größten Teil in der Peripherie lokalisiert ist [Cárdenas et al., 2005], sodass der Nachweis über eine Färbung womöglich nicht hinreichend möglich war. Eine andere Studie kam durch Messung der IP3-induzierten Kalziumfreisetzung in der Umgebung jedoch zu dem Schluss, dass die IP3R vornehmlich in der äußeren Kernhülle lokalisiert sein müssen [Zima et al., 2007]. Die durch IP3 in der Umgebung der Kerns ausgelösten Kalziumtransienten gelten als maßgeblich für die Vermittlung der Hypertrophieantwort [Dewenter et al., 2017]. Die nukleäre Expression eines IP3-Schwamms ist im Mausmodell ausreichend um die Hypertrophieantwort nach Gabe von AngiotensinII oder TAC zu unterdrücken.

Bisher wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen, über die IP3 kardiale Hypertrophie vermitteln könnte. In adulten ventrikulären Kaninchenkardiomyozyten wurde gezeigt, dass durch Stimulation mit ET-1 der Export der Histondeacetylase 5 (HDAC5) aus dem Nukleus, sowie die Aktivität des MEF2-Promoters mediiert wird. Durch Zugabe eines Kalzium-Calmodulinblockers konnte der Export von HDAC5 unterbunden werden. Die Inhibition der CaM-Kinase II (CaMKII) und von PKD resultierten jeweils in einer 50 %-igen Reduktion des HDAC5-Exports. Die Kombinierte Inhibition von CaMKII und PKD

konnte den Export von HDAC5 vollständig unterbinden [Wu et al., 2006; Kolodziejczyk et al., 1999]. *In Vivo* war jedoch der Knockout von CaMKII δ allein ausreichend, um die Hypertrophieantwort nach Aortenbanding (TAC) zu unterdrücken [Backs et al., 2009]. Ein weiterer Mechanismus für die Kopplung der Hypertrophieantwort an den IP₃-Signalweg beruht auf der Aktivierung von Calcineurin/NFAT. In primären neonatalen Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass sowohl die Inhibition von Calcineurin durch Cyclosporin A, als auch die Inhibition von NFAT die Expression von ANF, sowie die Translokation von NFAT in den Nukleus unterbinden [Higazi et al., 2009].

Der G_s-Signalweg: β -Adrenorezeptoren (β -ARs) gehören der Klasse der G_s gekoppelten Rezeptoren an [Wallukat, 2002]. In Kardiomyozyten wird hauptsächlich (80 %) der β_1 -Subtyp exprimiert, während die β_2 - und β_3 -Subtypen in nur etwa 20% bzw. 5% der kardialen Myozyten nachweisbar sind [de Lucia et al., 2018; Jean-Charles et al., 2017]. In Studien zur kardialen Hypertrophie wird Isoproterenol als Agonist der β -AR eingesetzt [Tse et al., 1979]. Aktivierung der β -AR führt zur Aktivierung der Adenylzyklase und zum Anstieg von cAMP und der im Folgenden erhöhten Aktivität der Phosphokinase A [Wallukat, 2002], wie auch in Abbildung 1 für gesunde Kardiomyozyten dargestellt. Während kurzfristige, moderate Stimulation der β_1 -Rezeptoren auf diesem Weg eine Steigerung der Inotropie und Lusitropie induziert, sind chronische und Überstimulation dieser Rezeptoren mit kardialem Remodeling und Herzversagen assoziiert [Jean-Charles et al., 2017]. Es wurde gezeigt, dass während des Herzversagens die Anzahl der β_1 -Rezeptoren im Herzen zurückgeht [Bristow et al., 1986].

In Vitro tritt ein positiv chronotroper Effekt durch Isoproterenol vor allem in BrdU-behandelten Kulturen, sowie in Kulturen, die mit Fibroblasten-konditioniertem Medium behandelt wurden, auf. Dies lässt darauf schließen, dass der Effekt von Isoproterenol zum Teil auf eine Interaktion mit Fibroblasten zurückzuführen ist [Simpson und Savion, 1982].

Metabolische Veränderungen: Die strukturellen Veränderungen in einem versagenen Herzen werden von metabolischen Veränderungen begleitet. In der frühen Phase des Herzversagens wird dabei der Metabolismus zunächst auf eine verstärkte Metabolisierung von Fettsäuren zu Glukose umgestellt, während der Fettsäurestoffwechsel reduziert wird. Mit Fortschreiten der Erkrankung wird jedoch sowohl der Fettsäurestoffwechsel als auch der Glukosestoffwechsel drastisch reduziert [Neubauer, 2007; Bertero und Maack, 2018]. Es ist allerdings umstritten, ob der daraus resultierende Mangel an ATP tatsächlich ursächlich für den Zusammenbruch der ECC sind [Bertero und Maack, 2018].

mTORC1 reguliert die metabolische Umstellung als Antwort auf Stresssignale. Dabei ist die Reaktion von mTORC1 abhängig von der Art des Stresssignals, da mTORC1 sowohl über den Akt- als auch über den AMPK (AMP-aktivierten Proteinkinase)-Signalweg reguliert wird. In Präsenz von Nährstoffen dominiert dabei der Akt-Signalweg, der mTORC1 durch die Phosphorylierung der Inhibitoren PRAS40 und TSC aktiviert. Unter Nährstoffmangel wird die Aktivität von mTORC1 über die Aktivierung von TSC, sowie die Inhibition von Raptor gehemmt [Sciarretta et al., 2018]. Experimente neonatalen Rattenkardiomyozyten haben gezeigt, dass der Glukosetransporter GLUT-4 nach Angiotensin II Stimulation vermehrt in die Zellmembran translokiert, was mit einer vermehrten Glukoseaufnahme einher geht. Des weiteren führt Stimulation mit Angiotensin II zu einer verminderten AMPK-Phosphorylierung. Präinkubation der Kardiomyozyten mit dem AMPK Aktivator AICAR führten sowohl in unstimulierten Rattenkardiomyozyten, als auch unter Angiotensin II zu einer reduzierten Präsenz von GLUT-4 in der Zellmembran, wobei die Aufnahme von Glucose vergleichbar mit der unstimulierten, unbehandelten Kardiomyozyten blieb. Parallel konnte der Angiotensin II-induzierte Anstieg der hypertrophen Marker ANF, BNP und β -MHC durch Behandlung mit AICAR unterbunden werden [Stuck et al., 2008]. In einer weiteren Studie an neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde gezeigt, dass die Aktivierung von AMPK die Ausbildung von Hypertrophie nach PE Stimulation unterdrückt [Gélinas et al., 2018]. Zudem ist Sestrin 2 (Sesn2) als Inhibitor von mTORC1 bekannt. Es wurde gezeigt, dass junge C57BL/6J Mäuse (4-6 Monate alt) höhere Sesn2 mRNA und Proteinlevel haben, als alte Tiere (24-26 Monate). Die Mortalität nach TAC Operation, sowie die Ausbildung von kardialer Hypertrophie ist in jungen Tieren reduziert im Vergleich zu alten Tieren. Alte Mäuse zeigten dabei sowohl hinsichtlich der Mortalität als auch der Ausprägung der Hypertrophie ein zu Sesn2-KO Tieren vergleichbares Verhalten [Quan et al., 2020]. Sowohl über die Expression von Sesn2 [Quan et al., 2020], als auch via Inhibition von mTORC1 via Rapamycin [Flynn et al., 2013] kann die Hypertrophieantwort in alten Tieren unterdrückt und die Herzfunktion verbessert werden.

Veränderungen der in der Regulation der Translation: Es ist bekannt, dass die Proteinsynthese als Antwort auf ein Energiedefizit in vielen Zellen reduziert wird, da sie häufig einen Großteil des zellulären ATP-Verbrauchs bedingt [Jia und Qian, 2021]. In Kardiomyozyten ist der ATP-Verbrauch jedoch hauptsächlich auf das ECC zurückzuführen [Bairwa et al., 2016]. Tatsächlich ist in Kardiomyozyten die verstärkte Expression von Proteinen als Zeichen sich ausbildender Hypertrophie anerkannt [Sadoshima und Izumo, 1993]. Entsprechend erscheint es logisch, dass Eif2s1, eine Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktorkomplex 2, der die globale Proteinsynthese durch den Transfer der Methionin t-RNA an die ribosomale 40S Untereinheit aufrecht erhält, in versagenden H9C2 Zellen verstärkt exprimiert wird [Kimball, 1999; Mathiesen et al.,

2019]. Es wurde zudem gezeigt, dass die Phosphorylierung von Eif2s1 die Proteinexpression allgemein reduziert, jedoch keinen Einfluss auf die Translation eines Clusters stressabhängig exprimierter RNAs hat [Harding et al., 2000]. In HEK293 Zellen wurde beobachtet, dass diese stressabhängige Genexpression durch den eukaryotischen Initiationsfaktorkomplex 3 (Eif3) reguliert wird, indem Eif3d die stressabhängige Genexpression durch gezieltes binden von cap-Strukturen der mRNAs [Lamper et al., 2020]. Diese Fähigkeit ist dabei spezifisch für metabolischen Stress, da sie abhängig von der Dephosphorylierung von Eif3d ist. Im Basalzustand wird Eif3d von der CK2 phosphoryliert und interagiert mit Eif4e, welches durch mTORC1 aktiviert wird und die Bindung von cap-Strukturen verbietet [Jia und Qian, 2021].

Es ist noch nicht bekannt, inwieweit die Translationskontrolle durch Eif3 auch im Rahmen der hypertrophen Stressantwort eine Rolle spielt. Verwandte Mechanismen wie die Eif4-Interaktion mit mTORC sind aber auch in Kardiomyozyten beschrieben [Nakamura und Sadoshima, 2018], sodass es wahrscheinlich scheint, dass die Translationsregulation auch während der Hypertrophie eine Rolle spielen könnte.

1.3 Methoden zur *in vitro* Analyse von Hypertrophie

1.3.1 Zellmodelle für kardiale Hypertrophie

Es existieren vier hauptsächlich eingesetzte, etablierte Zellmodelle, die auf hypertrophe Stimuli reagieren und sich daher für mechanistische Untersuchungen kardialer Hypertrophie eignen: adulte und neonatale Kardiomyozyten, H9C2 Zellen, sowie humane Stammzellen [Peter et al., 2016]. Auf funktionaler und struktureller Ebene, sind isolierte Kardiomyozyten hierbei das physiologischste Modell [Louch et al., 2011]. Da neonatale Kardiomyozyten deutlich länger kultivierbar sind, als Adulte [Peter et al., 2016], sowie einfacher zu isolieren sind [Vandergriff et al., 2015], bieten sie sich für länger angelegte Versuche an.

Als Modellorganismen sind für die Isolation neonataler Kardiomyozyten Ratten, Mäuse und Hühnerembryonen beschrieben worden [Ehler et al., 2013; Simpson et al., 1982]. Während Mauskardiomyozyten besonders durch Verfügbarkeit zahlreicher Linien attraktiv sind, werden für Wildtypstudien bevorzugt Rattenkardiomyozyten verwendet, da die Ausbeute und Qualität der Zellen nach Isolation als größer gilt [Ehler et al., 2013]. Aus diesem Grund verwende ich in der vorliegenden Arbeit neonatale Rattenkardiomyozyten, um die Ausbildung der Hypertrophieantwort *in vitro* über mehrere Tage beobachten zu könne.

1.3.2 Isolation Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRVCMCs)

Verschiedene Methoden wurden zur Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten beschrieben. Zahlreiche Studien verwendet Sprague-Dawley Ratten (z.B. [Watkins et al., 2012; Shimojima et al., 2017; Wodsedalek et al., 2018]), jedoch werden auch Wistar Ratten beschrieben (z.B. [Lu und Yang, 2009; Colella und Pozzan, 2008]).

Ebenfalls variabel wird der Zeitpunkt der Isolation beschrieben, wobei die Empfehlungen zwischen 0 und 3 Tagen nach der Geburt variieren (vgl. [Metz et al., 2012; Ruterling et al., 2015; Pattern, 2019; Cetinkaya et al., 2020]). Es wurde beschrieben, dass das Herz postnatal einen metabolischen Reifungsprozess durchläuft [Piquereau und Ventura-Clapier, 2018]. Es ist bisher jedoch nicht untersucht worden, ob und wie sich dies bezüglich des Isolationszeitpunktes in neonatalen Rattenkardiomyozyten in einem Modell kardialer Hypertrophie auswirkt. Bekannt ist jedoch, dass die Isolation aus 1-5 Tage alten Tieren bezüglich der Ausbeute günstiger ist, als spätere Zeitpunkte. Des Weiteren wird berichtet, dass mit steigendem Alter des Tieres die Viabilität der Zellen abnimmt und die gewonnenen Kardiomyozyten die Kontraktion früher einstellen [Chlopčíková et al., 2001]. Um eine möglichst reine Kardiomyozytenkultur zu erhalten, wird die Zellsuspension in den meisten Protokollen vorplattiert. Da die enthaltenen Nicht-Myozyten idR schneller an unbeschichteten Flächen adhärieren, als die Kardiomyozyten [Vandergriff et al., 2015], sind letztere lange im Überstand angereichert und können abgenommen werden. Gradienten werden ebenfalls zur Aufreinigung eingesetzt. Es wurde beschrieben, dass die Verwendung eines Percoll-Gradienten sehr reine Kulturen liefert [Ruterling et al., 2015].

Zur Beschichtung der Kulturgefäße werden Kollagen [Frank et al., 2008] und Gelatine [Watkins et al., 2012] bevorzugt, aber auch Laminin [Prasad et al., 2007] wurde beschrieben. Es wurde berichtet, dass die Kultivierung auf Fibronectin allein ausreicht, um hypertrophes Wachstum in neonatalen Rattenkardiomyozyten auszulösen. Kollagen und Laminin haben in dieser Studie keinen Einfluss auf die Zellgröße gezeigt [Ogawa et al., 2000].

1.3.3 Parameter

Auf zellulärer Ebene ist kardiale Hypertrophie als Zunahme der Zellgröße definiert, die mit verstärkter Proteinsynthese, höherer Sarkomerorganisation und der Aktivierung des fötalen Genprogrammes einhergeht [Frey et al., 2004; Dirx et al., 2013]. Entsprechend richten sich auch *in vitro* Experimente an diesen Kriterien aus. Als geradlinige Lösung bietet sich hier die Messung der Zellfläche an (z.B. Zhang et al. [2014]). Bereits früh haben sich hier automatisierte Messungen der Zelloberfläche etabliert [Toraason

et al., 1990], wobei die Analyse sowohl von Phasenkontrastbildern [Kim et al., 1995] als auch von angefärbten Kardiomyozyten (z.B. F-Aktin [Zhang et al., 2014] oder α -Aktinin [Voelkers et al., 2010]) beschrieben ist.

In zahlreichen Studien werden Sekundärparameter als Indikatoren für *in vitro* Hypertrophie quantifiziert; darunter die Quantifizierung der nukleären Translokation von NFAT (bsp. Guatimosim et al. [2008]), die Aktivierung des fötalen Genprogrammes anhand der klassischen Hypertrophiemarker wie ANF und BNP über qPCR (bsp. Giguère et al. [2018]) oder RNAseq (bsp. Wodsedalek et al. [2018]). Da eine Zunahme der Zellfläche auch eine generelle Steigerung der Proteinexpression und -menge benötigt, sind auch Messungen des Isoleucin-Einbaus [Lorenz et al., 2009] oder der DNA/Protein Ratio [Zhang et al., 2014] etabliert. Des Weiteren wurden auch der Anstieg der nukleären Fläche, sowie die Abnahme der nukleären Invaginationen nach neurohumoraler Stimulation genutzt um hypertrophes Verhalten zu beschreiben [Shimojima et al., 2017].

1.4 Nukleäre Kalziumsignale

Kalzium kann frei durch die Kernporen diffundieren [Clapham, 2007]. Anders als im Zytosol können Kalziumionen jedoch nicht durch Kalzium ATPasen in die Reservoirs rückgeführt werden und müssen daher auch durch Diffusion aus dem Zellkern gelangen. Es wurde gezeigt, dass nukleäre Kalziumtransienten durch Kalziumfreisetzung in der direkten Umgebung des Zellkerns entstehen und amplifiziert werden können, während periphere Kalziumfreisetzungen räumlich begrenzt sind [Lipp et al., 1997]. Die Kernhülle selbst bildet tiefe Invaginationen des Nukleus aus, wobei diese Invaginationen sowohl lediglich aus der inneren, als auch aus der äußeren und inneren Membran geformt sein können [Malhas et al., 2011]. Die äußere Kernhülle ist mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) verbunden und demnach fungiert der Raum zwischen innerer und äußerer Kernmembran ebenfalls als Kalziumreservoir. Freisetzungen von Kalzium in der Umgebung des Zellkerns erfolgen daher zumeist direkt an der Kernhülle selbst durch die in der Kernhülle lokalisierten IP_3 -Rezeptoren, was an Eizellen aus *Xenopus laevis* beobachtet werden konnte [Gerasimenko et al., 1996]. Die Invaginationen erlauben somit die Freisetzung von Kalzium tief im Inneren des Nukleus [Malhas et al., 2011].

In zahlreichen Zelltypen wurde gezeigt, dass nukleäres Kalzium Einfluss auf die Transkription nimmt, beispielsweise durch Modulation von der Aktivität kalziumsensitiver Transkriptionsfaktoren [Bootman et al., 2009; Bading, 2013]. In AtT20 Zellen wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch Phosphorylierung und CBP untersucht. Dabei wurde ein Anstieg des nukleären und cytosolischen Kalziums durch

Stimulation mit KCl-FPL induziert. In Zellen, deren nukleärer Kalziumanstieg durch Mikroinjektion des Kalziumpuffers BAPTA-D70 verhindert wurde, kam es zwar zur Phosphorylierung von CREB, jedoch nicht zur Transkription. Dieser Effekt konnte durch Blockade der nukleären CaM-Kinase IV (CaMKIV) reproduziert werden [Chawla et al., 1998]. In T Zellen konnte über die spezifisch nukleäre funktionelle Elimination des Kalzium-Calmodulin Komplexes durch CaMBP4, einem Bindepeptid, gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von CREB, aber nicht NFAT, nukleär von Kalzium-Calmodulin mediiert wird [Monaco et al., 2016; Wang et al., 1995]. Das Ausschalten von CaMKII in Neuronen führte zu ähnlichen Ergebnissen und unterstützt diese These somit [Ma et al., 2014]. In HepG2 Zellen wurde durch Expression und nukleäre Lokalisation des Kalziumpuffers Parvalbumin die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 durch EGF vollständig unterdrückt [Pusl et al., 2002].

Auch in Kardiomyozyten ist eine Einflussnahme von Ca^{2+} auf die Transkription beschrieben, hauptsächlich im Rahmen der kardialen Hypertrophie.

1.4.1 Regulation kardialer Hypertrophie durch nukleäre Kalziumsignale

Wu *et. al* haben in adulten Mauskardiomyozyten gezeigt, dass lokale IP_3 -induzierte Kalziumsignale im Nukleus, nicht aber zytosolische Kalziumsignale die Aktivierung der CaMKII und dem daraus resultierenden Export der Histondeacetylase 5 (HDAC5) regulieren [Wu et al., 2006]. HDAC5 ist ein Repressor des Transkriptionsfaktors MEF2C, der eine wichtige Rolle in kardialer Hypertrophie und Herzversagen spielt [Dewenter et al., 2017]. Die Abhängigkeit kardialer Hypertrophie von IP_3 -induzierten, nukleären Kalziumsignalwegen konnte für die Signalkaskaden zahlreicher hypertropher Stimuli bewiesen werden. Durch die Expression eines "IP3-Schwamms" in Mäusen konnte die AngiotensinII abhängige Hypertrophieantwort reduziert werden [Nakayama et al., 2010]. Auf gleiche Weise wurde die Abhängigkeit von perinukleären IP_3 Signalen bei Endothelin (ET-1) und Phenylephrin (PE) vermittelter Hypertrophie gezeigt [Dewenter et al., 2017; Ljubojevic und Bers, 2015]. In einer CaMKII δ -Knockout-Studie in TAC-operierten Mäusen konnte die Hypertrophieantwort vollständig unterdrückt werden [Backs et al., 2009]. In einer anderen Studie führte ein CaMKII-Knockout in Kardiomyozyten zu einer Reduktion der Apoptose, jedoch ohne Reduktion des hypertrophen Phänotyps oder der zugehörigen Hypertrophiemarker wie ANF, oder der Phosphorylierung von HDAC5 [Ling et al., 2009]. Dies illustriert, dass die Mechanismen hinter der Calmodulin-medierten Hypertrophie noch nicht vollständig aufgeklärt wurden.

Eine spätere Studie hat gezeigt, dass IP_3 -induzierte Kalziumsignale über den Calcineurin-NFAT Signalweg die Hypertrophieantwort steuert [Higazi et al., 2009].

Ljubojevic *et. al* haben beobachtet, dass Veränderungen im diastolischen nukleären Kalzium, sowie eine Verstärkte Aktivierung von CaMKII bereits vor der Ausbildung zytosolischer Veränderungen des nukleären Kalziums und der Ausbildung kardialer Hypertrophie zu beobachten sind [Ljubojevic et al., 2014].

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Studien schlussfolgern, dass nukleäre Kalziumsignale in den kardialen Umbau und Herzversagen involviert sind, wobei die Differenzierung zwischen der Bedeutung freien nukleären Kalziums und Kalzium- Calmodulins in der Ausbildung kardialer Hypertrophie jedoch unzureichend studiert ist.

1.4.2 Molekulare Werkzeuge zur Blockade nukleärer Kalziumsignalwege

In publizierten Studien werden verschiedene Werkzeuge zur Blockade nukleären Kalziumsignalwege eingesetzt. In Kardiomyozyten wird dabei insbesondere mit Knockout-Modellen (z.B. [Backs et al., 2009]), IP3-Schwämmen [Nakayama et al., 2010] oder nukleären Kalziumpuffern, wie Calbindin [Higazi et al., 2009] eingesetzt. In dieser Studie werde ich zwei im Kontext der kardialen Hypertrophie bisher nicht untersuchte Blocker nukleärer Kalziumsignalwege untersuchen.

Parvalbumin: Parvalbumin ist ein Protein mit zwei Kalziumbindestellen, welches in schnell kontrahierenden Muskeln exprimiert wird [Schwaller, 2010; Celio und Heizmann, 1982]. In zahlreichen Studien wurde Parvalbumin bereits in Herzmuskelzellen exprimiert, ohne dass dabei eine Toxizität des Konstruktes beschrieben wurde. Global exprimiertes Parvalbumin hat in einer *in vivo* Studie zu einer Beschleunigung der Relaxationsrate in gesunden Herzen geführt [Szatkowski et al., 2001]. *In vitro* konnte die Relaxationszeit in adulten Mauskardiomyozyten mit Kardiomyopathie assoziierten Mutationen in α -Tropomyosin verbessert werden [Coutu et al., 2004]. Darüber hinaus konnte die diastolische Funktion in 33-Monate alten Ratten durch Behandlung mit Parvalbumin optimiert werden [Michele et al., 2004]. Es wurde gezeigt, dass nukleäres Parvalbumin die nukleären Kalziumtransienten signifikant reduziert, ohne dabei die zytoplasmischen Transienten zu beeinflussen. Dabei hatte die Expression von Parvalbumin, weder zytosolisch noch nukleär, keinen Einfluss auf die basale Kalziumkonzentration [Nakao et al., 2015]. In keinem dieser Modelle wurde berichtet, dass die Expression von Parvalbumin toxisch auf Kardiomyozyten wirkt. Jedoch wurde bisher nicht untersucht, ob Parvalbumin auch die im Rahmen der kardialen Hypertrophie auftretenden gesteigerten Calciumkonzentrationen abfangen kann. Allerdings wurde gezeigt, dass Parvalbumin die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 in HEPG2 Zellen unterdrücken kann [Pusl et al., 2002], was das Potenzial von Parvalbumin zur

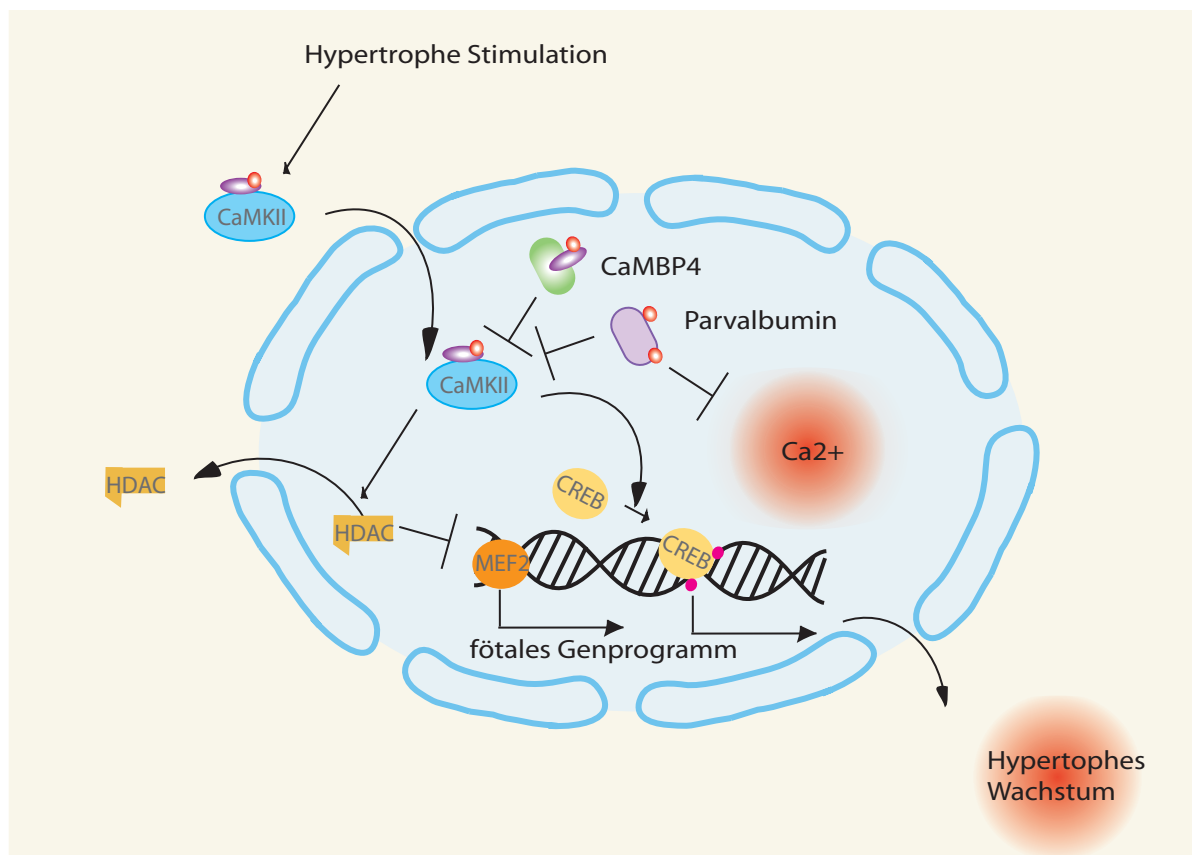


Abbildung 3: **Arbeitshypothese für den Wirkmechanismus von nukleärem CaMBP4 und Parvalbumin in neonatalen Rattenkardiomyozyten.**

Kontrolle der Genexpression nahelegt. Des Weiteren haben Schlumm *et. al* gezeigt, dass die Expression von Parvalbumin in unstimulierten hippocampalen Neuronen zu einer Akkumulation von HDAC 4 und HDAC 5 im Nukleus führt [Schlumm *et al.*, 2013]. Ich vermute daher, dass Parvalbumin über den in Abbildung 3 gezeigten Mechanismus den Export der HDACs aus dem Nukleus unterdrücken könnte. Wie oben erwähnt, ist der Export der Histondeacetylasen notwendig um die durch MEF2 vermittelte hypertrophe Genexpression zu initiieren [Passier *et al.*, 2000; Bacs *et al.*, 2009].

CaMBP4: CaMBP4 ist in der Lage, nukleäres Calcium-calmodulin funktional zu eliminieren [Wang *et al.*, 1995]. In Kardiomyozyten wurde CaMBP4 bisher nicht charakterisiert. Studien in Neuronen [Zhang *et al.*, 2009; Mauceri *et al.*, 2011; Simonetti *et al.*, 2013] und T-Zellen [Monaco *et al.*, 2016] haben jedoch CaMBP4 bereits zur Inhibition nukleären Kalzium-Calmodulins erfolgreich eingesetzt. In unstimulierten und Bicuculline-stimulierten hippocampalen Neuronen hat die Behandlung mit CaMBP4 eine Akkumulation von HDAC4 und HDAC5 im Nukleus ausgelöst [Schlumm *et al.*, 2013]. Entsprechend vermute ich, dass auch CaMBP4 über die Unterdrückung der MEF2 abhängigen Genexpression in die Entstehung der Hypertrophie eingreifen könnte (Abbildung 3).

1.5 Einführen von Genen in Kardiomyozyten *In vitro* zur Untersuchung der Hypertrophieantwort

Um den Einfluss von CaMBP4 und Parvalbumin auf die Ausbildung kardialer Hypertrophie *in vitro* untersuchen zu können, benötige ich eine effiziente Methode zum Gentransfer. Diese Methode muss charakterisiert sein durch:

1. Geringe Toxizität bei hoher Effizienz
2. Schnelle Expression
3. Übertragbarkeit auf andere Modelle

Toxizität & Effizienz: Djurovic *et al.* haben die Transfektionseffizienz von Elektroporation, Lipofection (FuGENE6 und L-2000), sowie Nukleofection verglichen. Alle Transfektionen wurden dabei 18h nach Isolation durchgeführt. Die Effizienz dieser Ansätze reichte von 3,3 % (FuGENE6)- 8,1 % (L-2000). Mit einer Überlebensrate von 88 % war L-2000 darüber hinaus der verträglichste Ansatz. Hohe Mortalität trat hingegen bei Nukleofection (37 % überlebende Zellen) und Elektroporation (20-70% überlebende Zellen) auf. Durch Transduktion mit einer Dosis von $6,67 \cdot 10^3$ AAV2/Zelle konnte in der gleichen Studie jedoch eine bedeutend höhere Effizienz von 88,1% nach 8 Tagen in Kultur erreicht werden [Djurovic et al., 2004]. Damit bietet sich ein viraler Gentransfer in Kardiomyozyten an. Eine frühere Studie hat gezeigt, dass adenoviraler Gentransfer bis zu 100 % effizient (1 pfu/Zelle *in vitro*, $6 \cdot 10^7$ pfu *in vivo*) sowohl in fetalen Kardiomyozyten(E20) *in vitro*, als auch in adulten Kardiomyozyten *in vivo* abläuft. Auch in dem hierbei verwendeten Protokoll vergehen zwischen Isolation und Transduktion 48h. Die Genexpression ist hier bereits 4h nach Infektion nachweisbar und 48h nach Infektion maximal [Kass-Eisler et al., 1993]. Es wurden jedoch auch Protokolle publiziert, in denen der adenovirale Gentransfer unmittelbar nach der Isolation erfolgte [Huq et al., 2004].

Schnelle Expression: Aufgrund der begrenzten Kulturdauer neonataler Rattenkardiomyozyten ist es essentiell, dass die ausgewählte Methode zum Gentransfer zu einer rapiden Genexpression führt. Es wurde gezeigt, dass selbst-komplementäre (sc) AAVs eine schnellere und stärkere Genexpression induzieren als einsträndige AAVs [McCarty et al., 2001]. Auch für Adenoviren ist ein früher Beginn der Genexpression beschrieben [Kass-Eisler et al., 1993].

Übertragbarkeit: Für den Gentransfer möchte ich ein System verwenden, das sich leicht auf andere Modelle kardialer Hypertrophie übertragen lässt, um eine hohe Ver-

gleichbarkeit mit zukünftigen Studien zu gewährleisten. Während Adenoviren hohe Effizienzen und frühe Genexpression in Kardiomyozyten erreichen, zeigt sich nach kardialen Gentransfer eine dosisabhängige Invasion von Immunzellen in das transduzierte Gewebe [Kass-Eisler et al., 1993]. Die verstärkte Immunantwort nach Behandlung mit adenoviralen Vektoren wurde seither in zahlreichen *in vivo* Studien beobachtet [Hajjar und Ishikawa, 2017], weswegen adeno-assoziierte Vektoren als vielversprechenderer Ansatz zum Gentransfer gelten. Adeno-assoziierte Viren lösen vergleichbar schwächere Immunantworten aus [Somia und Verma, 2000]. Neuere Erfahrungen aus der klinischen Forschung legen dabei nahe, dass die Immunantwort gegen AAVs mit dem Alter zunimmt und primär humoral stattfindet. Es wurde postuliert, dass bereits milde Immunantworten die Stabilität der Expression für virale Vektoren reduzieren können [Ronzitti et al., 2020]. Für eine Übersetzbarkeit in kardiale *in vivo*-Modelle eignen sich AAVs insofern besser, als dass bereits zahlreiche Studien kardialer Hypertrophie mit AAVs durchgeführt wurden [Pleger et al., 2007; Prasad et al., 2011; Yue et al., 2021]. *In vivo* wurde gezeigt, dass adeno-assoziierte Viren vom Serotyp 6 hohe Expressionslevel im Herzen erzeugen. Verglichen mit AAV9, welche ebenfalls hohe Expressionslevel im Herzen erreichen, ist dieser Effekt spezifischer, da AAV9 ebenfalls hohe Expressionslevel in anderen Organsystemen, wie Leber, Hirn und Hoden erzielt [Zincarelli et al., 2008]. AAV6 wurde bereits in *in vivo* Studien verwendet, um chronisches Herzversagen durch das Einbringen der S100A-RNA zu behandeln [Pleger et al., 2007]. In dieser Arbeit verwende ich daher einen adeno-assoziierten Virus, Serotyp 6, um den Gentransfer vorzunehmen.

Entsprechend dieser Aufstellung verwende ich scAAV6 zur Transduktion ventrikulärer Kardiomyozyten.

1.6 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit gehe ich der Frage nach, über welche Mechanismen nukleäre Kalziumsignale die Ausbildung kardialer Hypertrophie beeinflussen. Um dies zu untersuchen, gehe ich folgenden Fragen nach:

1. Welches Protokoll eignet sich um Hypertrophie in scAAV6 transduzierten neonatalen Rattenkardiomyozyten zu untersuchen?
2. Sind scAAV6 geeignet um die nukleäre Expression von Parvalbumin, CaMBP4 und mCherry zu induzieren?
3. Reduzieren CaMBP4 oder Parvalbumin die Hypertrophieantwort neurohumoral stimulierter neonataler Rattenkardiomyozyten?

4. Kann eine definierte Population von transduzierten neonatalen Rattenkardiomyozyten für eine RNA-Sequenzierungsanalyse sortiert werden?
5. Inwiefern wird die Expression klassischer Hypertrophie marker (z.B. ANF, BNP), beziehungsweise die CaMK-abhängige Genexpression durch Unterdrückung nukleärer Kalziumsignale beeinflusst?
6. Welche Signalwege sind in durch Unterdrückung der Hypertrophieantwort via Blockade nukleärer Signalwege beeinflusst?
7. Kann die Veränderung dieser Signalwege während der neurohumoralen Stimulation funktional gezeigt werden?

2 Material und Methoden

Adäquater Arbeitsschutz (Laborkittel, Handschuhe, Ethanol zur Reinigung und Desinfektion etc.) wird im Folgenden als selbstverständlich betrachtet und nicht gesondert aufgeführt.

2.1 Materialien

Genetisches Material

Tabelle 1: **Plasmide**

Plasmid	erhalten von	interne ID
CAG-CaMBP4-mCherry-WPRE	AG Bading	pMF_591
CAG-mCherry-WPRE	AG Bading	pMF_592
CAG-Parvalbumin-mCherry-WPRE	AG Bading	pMF_593
pDP6rs	Rebekka Medert	pMF_752
puC57 BmtI-CaMBP4-HindII	BioCat i.A. Anja Riedel	pMF_745
scAAV-TnnT-shRNA-bGHpA	Rebekka Medert	pMF_595
ssAAV-MLC260	Rebekka Medert	pMF_492
MLC260-mCherry-NLS	Anja Riedel	pMF_742
MLC260-CaMBP4-mCherry	Anja Riedel	pMF_743
MLC260-Parvalbumin-NLS	Anja Riedel	pMF_746
TnnT-mCherry-NLS	Anja Riedel	pMF755
TnnT-CaMBP4	Anja Riedel	pMF756
TnnT-Parvalbumin-NLS	Anja Riedel	pMF754

Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, Enzyme & Antikörper

Tabelle 5: **Chemikalien**

Chemikalie/ Kit	Hersteller	Artikelnummer
Agarose	Biozym	840004
Angiotensin II	Sigma-Aldrich	A9525-1MG
Aqua ad injectabilia	Braun	95324

Ampicillin	BioChemica	A0839,0100
Aqua bidest	NA	NA
Benzonase	Sigma-Aldrich	E1014-25KU
BSA	Sigma-Aldrich	A9418-10G
CaCl ₂	AppliChem	A4689
Collagenase Typ 2	Cell Systems Biotechno- logie Vertrieb	LS004177
Collagen Solution Type 1	Sigma-Aldrich	C8919
Glycerol	Sigma-Aldrich	15523-1L-R
DAPI	Sigma-Aldrich	D9542-10MG
DMEM-Glutamax	Gibco	31966021
DMSO	Uvasol	CAS 67-68-5
DPBS	Sigma-Aldrich	D8537-500ML
Endothelin-1	Sigma-Aldrich	E7764-50UG
Ethanol 99 %, vergällt	Berkel	52474
Ethidiumbromid 1%	Roth	2218
FBS	Gibco	10270
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fischer	SM1331
Glucose	Merck	1.08337.1000
Glycerin	Sigma-Aldrich	15523-1L-R
Glycin	Sigma-Aldrich	33226-1KG
HCl	Merck	1.00317
Hefeextrakt	BD Biosciences	212750
HEPES	Roth	9105.4
Isopropanol	Sigma Aldrich	33539-2.5L-M
Isoproterenol	Sigma-Aldrich	I5627-5G
KCl	Sigma-Aldrich	31248-1KG
KH ₂ PO ₄	AppliChem	A3620,1000
L-Glutamin	Gibco	25030081
MgCl ₂	AppliChem	A3618,0250
MgSO ₄	Sigma-Aldrich	M2643-1KG
Monarch DNA Gel Extrac- tion Kit	NEB	T1020S
M199	Sigma-Aldrich	7528
Na-Azid	Roth	4221.1
NaCl	AppliChem	A1149,9025
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	04272-1KG
NaOH	Sigma Aldrich	30620

Natriumdeoxycholat	NA	AG Völkers
OptiPrep Iodixanol 60 %	Progen	1114542
PBS	Elisabeth Janesch	NA
Pancreatin	Sigma-Aldrich	P3292
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140122
Pepton	BD Biosciences	211705
Percoll	GE Healthcare	17-0891-01
Phenol Red Solution	Sigma	P0290
Phenylephrin	Sigma-Aldrich	P6126
Polyethyleneimine	Polysciences	23966
Protease Inhibitor	Serva	39101.03
Puromycin Dihydrochlorid	Calbiochem	540411
TE buffer	Qiagen	1018499
Tris-Cl	Roth	4855.2
Triton	Merck	108603
Triton (reduced)	Sigma-Aldrich	X100RS-25G
Tween-20	Roth	9127.1
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich	T8154-100ML
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M6250
1x PBS	Elisabeth Janesch	NA
10x dNTPs	Hans-Peter Gensheimer	NA
2,5 % Trypsin (10x)	Gibco	15090046
4 % PFA	Manuela Ritzal	NA

Tabelle 2: **Primer**. Alle Primer wurden bei Sigma-Aldrich in Auftrag gegeben. Designer: AR= Anja Riedel, RM=Rebekka Medert

Primer	Sequenz 5'-3'	Designer
bghPolyA_rev	AGCATGCCTGCTATTGTC	AR
CMV_fwd	ACATCTACGTATTAGTCATCG	AR
PV_BmtI_fwd	ATCTAAGCTAGCATGTGCGATGACAG	AR
PV_BmtI_rev	ATCGATAAGCTTCTA GCCACCGCTGCCACCTGATC	AR
bghPA_fwd	TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT	RM
bghPA_rev	TGGGAGTGGCACCTTCCA	RM

Tabelle 3: **Verbrauchsmaterial**

Material	Hersteller	Artikelnummer
µClear Cell Culture plates, 96 well	Greiner	655087
LightCycler 480 Multiwell Plate 96 white	Roche	04729692001
LightCycler 480 SealingFoil	Roche	04729757001
Quick Seal	Beckmann	342413

Tabelle 4: **Kits**

Material	Hersteller	Artikelnummer
cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4387406
EndoFree Plasmid Giga Kit (5)	Qiagen	12391
EndoFree Plasmid Mega Kit (5)	Qiagen	12381
EndoFree Plasmid Maxi Kit (10)	Qiagen	12362
Ovation SoLo RNA-Seq System	NuGen	0500-0502,0516
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Quiagen	28704
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Quiagen	28104
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	Quiagen	27104
RNeasy MiniKit	Qiagen	74104
Turbo DNA-free Kit	Invitrogen	AM1907

Tabelle 6: **Enzyme & Puffer für die Klonierung**

Enzym/ Puffer	Hersteller	Artikelnummer
BmtI	NEB	R3658S
Clal	NEB	R0197S
Gel Loading Dye Purple (6x)	NEB	B7024S
HindIII	NEB	R3104S
iTaq Universal SYBR Green SuperMix	BioRad	172-5124
NcoI	NEB	R3193S
Phusion Hot Start Flex DNA Polymerase	NEB	M0535S
Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix	NEB	M0536S
T4 DNA Ligase	NEB	M0202S
Sall	NEB	R0138T
Scal	NEB	R3122S
XmaI	NEB	R0180S
1x TE	Elisabeth Janesch	-
10x T4 Ligase Reaction Buffer	NEB	B0202S
10x CutSmart Buffer	NEB	B7204S

Tabelle 7: **Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Artikelnummer
IgG (H+L) goat anti-mouse A1488	abcam	ab150117
IgG (H+L) goat anti-mouse A1594	molecular probes	A 11005
IgG (H+L) goat anti-Rabbit A1488	invitrogen	A-11008
Mouse IgG1 anti-alpha actinin	Sigma-Aldrich	A7811
Rabbit IgG anti-parvalbumin	invitrogen	PA1-933
Rabbit IgG anti-RFP	Rockland	600-401-379

Software

Tabelle 8: **Software für die Klonierung**

Software	Hersteller
Fiji	Wayne Rasband (NIH)
GraphPad Prism Version 5-8	GraphPad Software, Inc
IN Cell Investigator Developer Toolbox	GE Healthcare
LighCycler 96 Software Version 1.1.0.1320	Roche
Microsoft Office Excel Professional Plus 2010	Microsoft
NEBioCalculator	NEB
R Studio 1.0.153 and higher	RStudio PBC
SerialCloner 2.6.1	SerialBasics
SnapGene	GSL BIOTECH LLC

2.2 Klonierung & Amplifikation

2.2.1 Material

Bakterien

Alle Transformationen erfolgten in chemokompetenten *E.coli* dh65 α

Medien

Tabelle 9: **1l LB Medium, pH 7,5**

	Menge [g]
Hefeextrakt	5
Pepton	10
NaCl	10
ddH ₂ O	auf 1L (erst nach pH-Einstellung vollständig auffüllen)
HCl/NaOH	pH Wert einstellen

Tabelle 10: **LB Agar, pH 7,5**

	Menge
LB-Medium	
Agar	1,5%

2.2.2 Methoden

Ziel der Arbeit ist es, die Auswirkungen des Calciumpuffers Parvalbumin (PV) und des CaMKII-bindenden Proteins CaMBP4 zu vergleichen. Als Negativkontrolle wird der Fluorophor mCherry verwendet. Die unter CAG-Promoter exprimierten Konstrukte wurden von Sara Monaco (AG Prof. H. Bading) zur Verfügung gestellt. Da jedoch eine spezifisch kardiale Expression angestrebt wird, werden die Konstrukte in sc-AAV-Plasmide mit TnT bzw. MLC260 Promoter umklontiert.

Amplifikation in *E.coli dh65* α

Eine sterile Pipettenspitze wird in Glycerolstock/Kolonie getippt und in jeweils 5 ml autoklaviertes LB-Medium (Tabelle 9) eingebracht. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C und 800 rpm in einem Infors HT Minitron Inkubator inkubiert.

0,5 ml der Vorkultur werden mit 0,5 ml 40 % Glycerol gemischt und bei -80°C als Glycerolstock eingelagert, sofern bisher kein Stock vorhanden ist. Anschließend kann die DNA zur Sequenzierung mit einem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt werden.

Für Amplifikationen in größerem Maßstab werden je 1 ml der Kultur verwendet, um jeweils 250 ml-5l LB-Medium (Tabelle 9) für die Maxi- oder GigaPrep (EndoFree Plasmid Maxi/ Giga Kit) zu kultivieren. Diese Kultur wird ebenfalls über Nacht bei 37°C und 800 rpm inkubiert (Infors HT Minitron). Das Helferplasmid (pDP6rs; pMF_752) wurden im GigaPrep Maßstab, alle anderen Konstrukte im MaxiPrep Maßstab amplifiziert.

Amplifikation via PCR

Parvalbumin (PV) wurde aus dem CAG-Parvalbumin-mCherry-WPRE (pMF_593) via PCR amplifiziert (siehe Tabellen 11 & 12), um das mCherry Fusionsprotein zu entfernen und das Fragment mit den Schnittstellen für BmtI und HindIII zu flankieren. Es entsteht ein BmtI-PV-NLS-HindIII Fragment, das im Folgenden für die Klonierungen eingesetzt werden kann.

Da die Amplifikation von CaMBP4-FLAG via PCR wiederholt fehlschlug, wurde CaMBP4-

Tabelle 11: **PCR Ansatz für die Amplifizierung von PV.** Der komplette Ansatz wurde auf Eis pipettiert.

	Menge
CAG-PV-mCherry-WPRE	6,64 ng
10 µM PV_Bmtl_fwd	2,5 µl
10 µM PV_Bmtl_rev	2,5 µl
PhusionBuffer	10 µl
dNTPs	5 µl
Phusion	0,5 µl
ddH ₂ O	auf 50 µl

Tabelle 12: **PCR-Programm für die PV Amplifikation** in Biorad T100

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer
	98	30 s
34	98	10 s
	60	30 s
	72	30 s
	72	10 min
	12	∞

FLAG flankiert von Bmtl und HindIII Schnittstellen bei BioCat synthetisiert und in einem pUC57 Vektor ausgeliefert. pUC57-CaMBP4-FLAG (pMF_745) wurde in *E. coli* amplifiziert und mittels EndoFree Plasmid Maxi Kit (10) aufgereinigt.

Klonieren

Jeder Restriktionsverdau findet nach Herstellerangaben bei 1h bei 37°C statt (in Biorad T100 oder HLC BioTech Ditabis TH21). Eingesetzt werden dabei zwischen 1-5 µg DNA pro Reaktion. Alle Reaktionen werden in CutSmart Puffer durchgeführt. Die zu erwartenden Banden werden mit SerialCloner berechnet. Nach der Restriktion werden die Konstrukte über ein 0.8 % Agarose Gel in einer Embitec RunOne Gelkammer bei 120 V, 110 mA für 30 min aufgetrennt. Die erwarteten Banden werden mit einem Skalpell unter dem BioRad GelDoc XR+ ausgeschnitten und mit einem Monarch DNA Gel Extraction Kit oder QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Vektoren werden anstatt über Gelextraktion mittels QIAquick PCR Purificati-

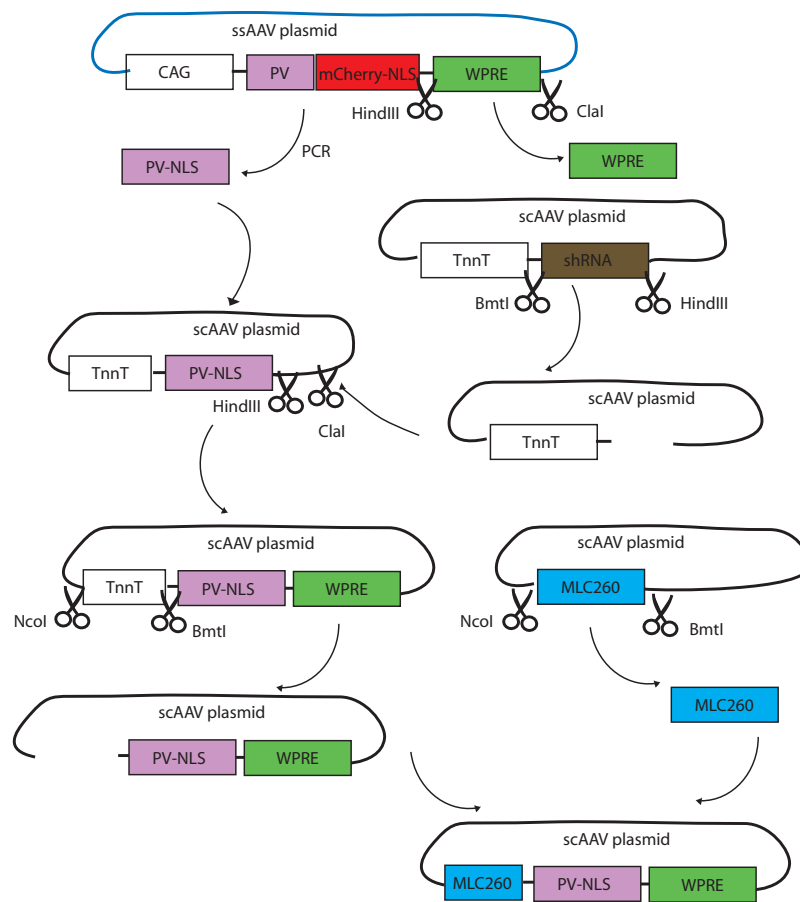


Abbildung 4: **Klonieren der Parvalbumin (PV) Konstrukte** Ausgangskonstrukte sind das von AG Bading zur Verfügung gestellte CAG-Parvalbumin-mCherry-NLS Konstrukt, sowie der TnnT-shRNA Vektor von Rebekka Medert. Via PCR (siehe Tabellen 11 und 12), wurde PV-NLS erzeugt und über BmtI und HindIII Schnittstellen in den scAAV TnnT Vektor eingefügt. Das WPRE wurde aus dem ssAAV über HindIII und ClaI in das TnnT-PV-NLS Plasmid eingeführt. Der TnnT Promoter wurde anschließend über die Schnittstellen NcoI und BmtI mit einem MLC260-Promoter aus einem scAAV-Plasmid mit der entsprechenden Sequenz ersetzt.

on Kit aufgereinigt, da ein entstehendes kleineres Fragment unter der angegebenen Mindestgröße des Herstellers lag. Anschließend werden die Fragmente bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Die Ligation der Fragmente wurde nach Tabelle 13 angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle Konstrukte wurden vor Verwendung in *E.coli dh65* α transformiert, sequenziert und in Glycerolstocks gelagert. Zunächst wurden MLC260-Parvalbumin (pMF_746, siehe Abbildung 4) erzeugt. Im Folgenden wurde Parvalbumin aus dem enthaltenen Konstrukt dann durch mCherry bzw. CaMBP4 ersetzt, wie in den Abbildungen 5 und 6 beschrieben.

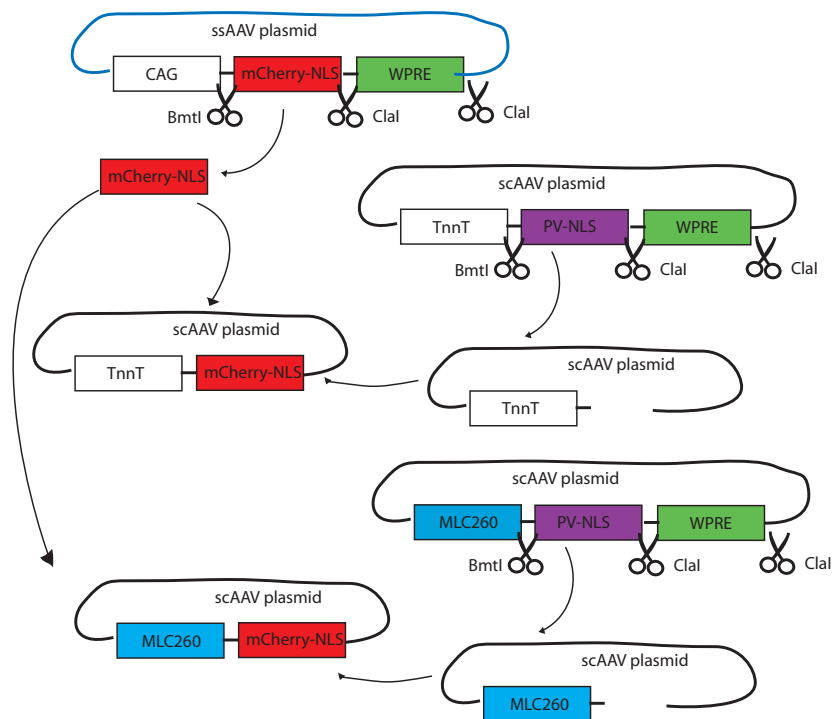


Abbildung 5: **Klonieren der mCherry Konstrukte** Ausgangskonstrukte sind das von AG Bading zur Verfügung gestellte CAG-mCherry-NLS Konstrukt, sowie das TnnT-PV-NLS-WPRE Konstrukte (siehe Abbildung 4). Über die BmtI und Clal Schnittstellen, wurde PV-NLS-WPRE durch mCherry ersetzt. Auf gleiche Weise wurde mCherry in den MLC260-PV-NLS-WPRE Vektor eingesetzt.

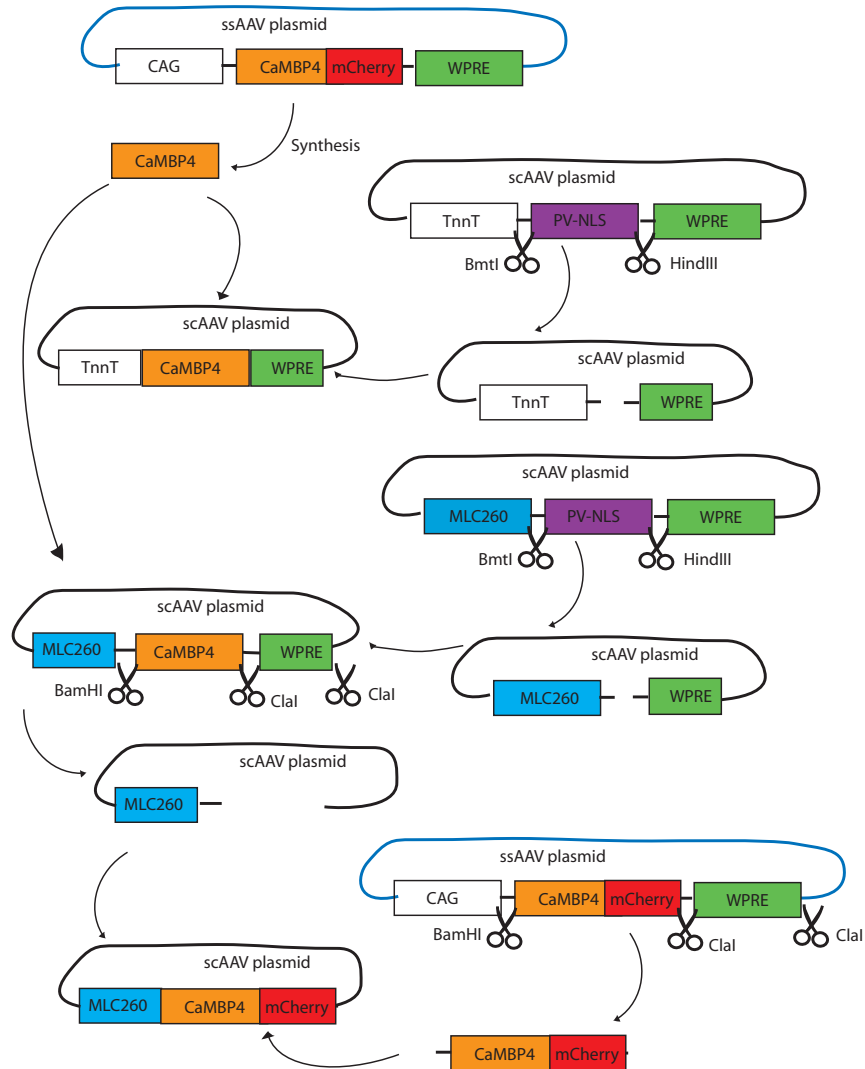


Abbildung 6: **Klonieren der CaMBP4 Konstrukte.** Ausgangskonstrukte sind das von AG Bading zur Verfügung gestellte CAG-CaMBP4-mCherry Konstrukt, sowie das TnnT-PV-NLS-WPRE Konstrukte (siehe Abbildung 4). Die CaMBP4 Sequenz wurde von BioCat synthetisiert und in einem puC57 Vektor geliefert. Über die BmtI und HindIII Schnittstellen, wurde PV-NLS durch CaMBP4 ersetzt. Auf gleiche Weise wurde mCherry in den MLC260-PV-NLS-WPRE Vektor eingesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass CaMBP4 einen FLAG-Tag enthält, der aber nicht mittels Antikörperfärbung nachgewiesen werden konnte, wurde über BamHI und ClaI CaMBP4-WPRE wieder entfernt und durch CaMBP4-mCherry aus dem Ausgangskonstrukt ersetzt.

Tabelle 13: **Ansatz für die T4 Ligation.** Der komplette Ansatz wurde auf Eis pipettiert. Das Vektor-Insert-Verhältnis betrug 1:2 oder 1:6, die dafür notwendige Menge DNA wurde mit dem NEBioCalculator berechnet.

	Menge
Vektor	Nach NEBioCalculator
Insert	Nach NEBioCalculator
10x T4 Ligase Reaction Buffer	2 µl
T4 Ligase	10 µl
dNTPs	1 µl
ddH ₂ O	auf 20 µl

Transformation chemokompetenter *E.coli dh65α*

200 µl chemokompetente *E.coli dh65 α* werden ca. 10 min auf Eis aufgetaut. 20 µl Ligationsansatz werden in die Bakterienlösung pipettiert und das Reaktionsgefäß wird leicht geflickt. Die Zellen werden anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgt im Wasserbad für 45 s bei 42°C (Lauda Alpha). Im Folgenden wird der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Nun wird der Ansatz mit LB-Medium (Tabelle 9) auf 1 ml aufgefüllt und für 1 h bei 37°C und 800 rpm (Infors HT Minitron) inkubiert. Während der Inkubationszeit werden pro Transformation 2 LB-Agar-Platten (Tabelle 10) bei 37°C im Platteninkubator (Binder B 28) getrocknet. 100 µl des Ansatzes werden auf die erste Platte ausplattiert. Die restlichen 900 µl werden für 3 min bei 0,3 g (ThermoFischer Heraeus Pico 17) abzentrifugiert und das Pellet wird in 100-200 µl LB Medium (Tabelle 9) resuspendiert. Von dem konzentrierten Ansatz werden 100 µl auf der zweiten Platte ausgestrichen. Beide Platten werden anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert (Infors HT Minitron).

Die Platten können bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden, oder die Kolonien können in einer Flüssigkultur (siehe oben) amplifiziert und sequenziert werden.

Sequenzierung

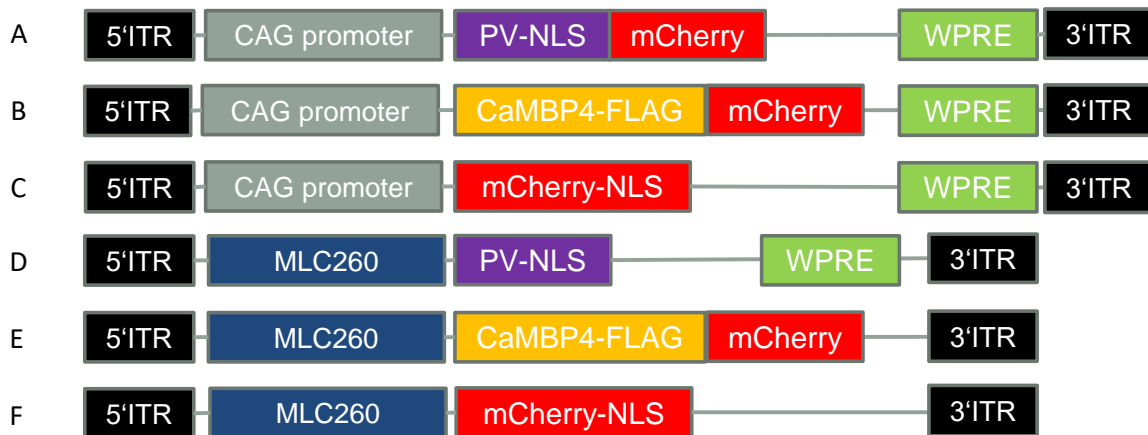


Abbildung 7: **Finale Konstrukte.** A-C Ausgangskonstrukte in ssAAV-Vektor mit CAG Promoter und WPRE. D-F Konstrukte in scAAV-Vektor unter dem MLC260-Promoter. Aus Kapazitätsgründen wurde bei den Konstrukten E & F auf das WPRE-Element verzichtet.

Die doppelsträngigen Sequenzierungen werden bei eurofins genomics durchgeführt. Dazu werden jeweils Ansätze von 15 μ l mit 50-100 ng/ μ l Plasmid-DNA verdünnt. Zu der DNA werden 2 μ l der Primer CMV_fwd oder bghPolyA_rev (10 μ M) zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 17 μ l ergibt. Die final erhaltenen Konstrukte sind in Abbildung 7 abgebildet, für die vorliegende Arbeit werden die Konstrukte D-F verwendet, da in einem Pilotversuch (N=1) an H9C2 Zellen MLC260-mCherry (pMF_742) aber nicht TnnT-mCherry 2 Tage nach Transduktion sichtbar exprimiert wurde.

2.3 AAV6 Virusproduktion

2.3.1 Material

Puffer und Lösungen

Tabelle 14: **PBS MK**

	Konzentration
PBS	1x
MgCl ₂	1 mM
KCl	2,5 mM
steril filtrieren	

Tabelle 15: **PBS MKN**

	Konzentration
PBS MK	1x
NaCl	1 M
steril filtrieren	

Tabelle 16: **Benzonasepuffer**

	Konzentration
Glycerin	50 %
MgCl ₂	2 mM
NaCl	20 mM
Tris-Cl	20 mM
ddH ₂ O	auf gewünschtes Volumen
NaOH/HCl	auf pH 8,0

Tabelle 17: **Iodixanollösungen für 23 Gradienten**

	Volumen [ml]	Iodixanol 60 %	PBS-MK	PBS-MKN	Phenol Red Solution
15 %	161	40,3 ml		120,7 ml	
25 %	115	47,9 ml	67,1 ml		240 µl
40 %	92	61,3 ml	30,7 ml		
60 %	92	92 ml			120 µl

Tabelle 18: **Lysepuffer**

	Konzentration
Tris-Cl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	150 mM
ddH ₂ O	auf gewünschtes Volumen
NaOH/HCl	auf pH 8,5

Tabelle 19: **1l PEI**

	Menge
PEI	0,323g
80°C ddH ₂ O	auf 1L (erst nach pH-Einstellung vollständig auffüllen)
NaOH/HCl	auf pH 7,0
	3 Frier-Tau-Zyklen -80°C/37°C
	Lagerung bei -80°C

Tabelle 20: **Triton-Lysepuffer**

	Konzentration
Triton X-100 reduced	1%
MgCl ₂	20 mM
TRIS	500 mM
ddH ₂ O	auf gewünschtes Volumen
NaOH/HCl	auf pH 7,4

Tabelle 21: **SYBR Green Mastermix**

	µl / Triplikate
ddH ₂ O	27
Primer bghPA_fwd	1,5
Primer bghPA_rev	1,5
SYBR Green Mix	30

2.3.2 Arbeitsablauf

Zellen

Die Virusproduktion findet in HEK293 Zellen (Passagenummer <20) statt. Die Zellen dürfen zuvor nicht konfluent gewesen sein. Wenn die Zellen vor der Transfektion mehr als 90 % konfluent sind, wird der Ansatz verworfen.

Herstellung von Kryostocks

Zellen werden in 175 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-one CellStar 661175) in DMEM Glutamax + 10 % FBS + 1%-PenStrep kultiviert (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂), bis sie ca. 70-80 % Konfluenz erreichen. Dabei wird das Medium alle 2-3 Tage ausgetauscht. Dafür werden zunächst 1x Trypsin in PBS, 1x PBS und das Kulturmedium auf 37°C im Wasserbad (Lauda AquaLine AL18) erwärmt. Das Medium wird aus den Zellkulturflaschen entfernt. Die Zellen werden mit 5-10 ml 1x PBS/ Flasche gewaschen. Nun wird je 3-5 ml 1x Trypsin in PBS zugegeben. Die Zellen werden für 3 min im Inkubator vom Flaschenboden gelöst (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂). Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium (auf 10 ml Volumen/ Flasche auffüllen) gestoppt. Die Zellen werden durch 10-maliges auf- und abpipettieren mit einer 10 ml serologischen Pipette vereinzelt und in 15 ml Falcon Reaktionsgefäße überführt. Anschließend werden die Zellen bei Raumtemperatur (RT) für 5 min bei 1200 g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 1,5 ml Kulturmedium pro eingesetzter Flasche resuspendiert und durch 10-maliges auf- und abpipettieren mit einer 10 ml serologischen Pipette vereinzelt.

In Kryoröhrchen werden 0,5 ml DMEM Glutamax + 10 % FBS + 20 % DMSO vorgelegt. Anschließend werden 0,5 ml der Zelllösung hinzugegeben. Der Ansatz wird sofort auf Trockeneis überführt, bis alle Röhrchen gefüllt sind. Anschließend werden die Kryostocks über Nacht bis maximal 72 h bei -80°C gelagert und dann in Flüssigstickstoff überführt.

Produktion von AAV6

Das Kulturmedium (DMEM-Glutamax + 10 % FBS + 1 % PenStrep) wird bei 37°C im Wasserbad erwärmt (Lauda AquaLine AL18). Für eine Kleinproduktion (AAV6) benötigt man 10⁶ HEK293 Zellen (\cong 1 ml Kryostock). Die Kryostocks werden bei 37°C im Wasserbad (Lauda AquaLine AL18) aufgetaut und in 175 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-one CellStar 661175) mit 19 ml Kulturmedium für 2-3 Tage kultiviert (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂). Jede Flasche wird dann auf 10 175 cm² Flaschen aufgeteilt. Die Zellen werden für maximal 48 h in 20 ml Kulturmedium auf ca. 70 % Konfluenz kultiviert

(Binder BD, 37°C, 5 % CO₂).

Die Zellen können nun in pro Kleinproduktion 15 143 cm² Zellkulturschalen (Greiner Petrischalen 150 mm 639160) ausgesetzt werden. Dafür werden zunächst 1x Trypsin in PBS, 1x PBS und das Kulturmedium auf 37°C im Wasserbad (Lauda AquaLine AL18) erwärmt. Nun wird das Medium aus den Flaschen entfernt. Die Zellen werden mit 5-10 ml 1x PBS/ Flasche gewaschen. Nun wird je 3-5 ml 1x Trypsin in PBS zugegeben. Die Zellen werden für 3 min im Inkubator vom Flaschenboden gelöst (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂). Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium (auf 10 ml Volumen/ Flasche auffüllen) gestoppt. Die Zellen werden durch 10-maliges auf- und abpipettieren mit einer 10 ml serologischen Pipette vereinzelt und in 15 ml Falcon Reaktionsgefäße überführt. Anschließend werden die Zellen bei Raumtemperatur (RT) für 5 min bei 1200 g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in einem angemessenen Volumen Kulturmedium resuspendiert und durch 10-maliges auf- und abpipettieren mit einer 10 ml serologischen Pipette vereinzelt. Anschließend werden die Zellen gepoolt und die Konzentration wird mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (1:10 verdünnt, Auszählung von mindestens 4 Großquadraten) bestimmt. In jeder Zellkulturplatte werden 4*10⁶ Zellen in einem Gesamtvolumen von 22 ml Kulturmedium ausgebracht ($\cong 1,8 \cdot 10^5$ / ml) und für maximal 48 h kultiviert (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂).

Pro Zellkulturschale werden 14,6 µg Vektorplasmid (MLC260-mCherry, -CaMBP4 - mCherry oder -Parvalbumin) und 29,2 µg Helferplasmid (pdP6rs) gemischt. Die DNA wird mit 1,178 ml sterilem ddH₂O verdünnt. Nun werden 1,53 ml steriles 0,3 M NaCl (in ddH₂O) zugegeben. Die Lösung wird gemischt. Abschließend werden 0,34 ml PEI zum Transfektionsansatz gegeben und die Lösung nach gründlichem Schütteln für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend sollte der Transfektionsansatz eine leichte Trübung aufweisen. Der Transfektionsansatz wird tropfenweise (5 ml serologische Pipette) auf die Zellen gegeben. Anschließend wird die Zellkulturschale vorsichtig geschwenkt, um den Ansatz zu verteilen. Die Zellen werden nun 48-72 h kultiviert (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂).

Aufreinigung der Viruspartikel

Mittels Iodixanolgradient

Da die Ernte der Viren aus den Zellen erfolgt, wird das Kulturmedium abgenommen und verworfen. Die Zellen werden mit 10 ml 1x PBS/ Schale von der Oberfläche pipettiert und in 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Die Zellen werden nun bei 2000 g und 4°C für 10 min pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wird verworfen und

die Zellen werden mit 7,5 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden in einem Falcon Röhrchen gepoolt und wie zuvor mit 7,5 ml PBS gewaschen. Anschließend wird der Überstand entfernt und die Zellen werden in 3 ml Lysepuffer + 1:100 Proteaseinhibitor durch vortexen resuspendiert. Die Zellen können bei -20°C gelagert werden.

Die geernteten Zellen durchlaufen 4 Frier-Tau-Zyklen (N₂/37°C), wobei die Lagerung bei -20°C als erster Zyklus angerechnet wird. Anschließend werden 50U Benzona-se/ ml Lysepuffer zugegeben und der Ansatz wird, nach gründlichem Vortexen, 30 min bei 37°C im Wasserbad (GFL 1083) inkubiert. Der Zellschrott wird anschließend bei 4000 g bei 4°C für 10 min abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der virenhaltige Überstand wird abgenommen und der Zentrifugationsschritt so oft wiederholt, bis sich kein Pellet mehr am Boden bildet. Dieser Überstand wird im Folgenden als CL1 bezeichnet. Die Pellets aus der Zentrifugation werden in Lysepuffer resuspendiert und gepoolt. Anschließend wird ein Frier-Tau Zyklus wie zuvor durchgeführt. Der Benzona-severdauer und die Zentrifugationen werden wie oben beschrieben durchgeführt und der resultierende Überstand wird als CL2 bezeichnet. CL1 & CL2 können bei -20°C gelagert werden.

Proteaseinhibitor wird 1:100 in Lysepuffer (Tabelle 18) verdünnt, pro Kleinproduktion werden etwa 40 ml Gesamtvolumen angesetzt. CL1 & CL2 werden jeweils in 50 ml Falcons überführt und auf 20 ml mit Lysepuffer + Proteaseinhibitor aufgefüllt. Die Proben werden über eine Glaspipette in je ein Ultrazentrifugenröhrchen (Quick Seal) gefüllt. Die Glaspipette wird ausgetauscht und der Virus der Reihe nach mit 7 ml 15 %, 5 ml 25 %, 4 ml 40 % und 4 ml 60 % Iodixanollösung (siehe Tabelle 17) unterschichtet. Anschließend werden die Röhrchen durch Zugabe von Lysepuffer + PI und Auswahl eines passenden Deckels (leichte Gewichtsschwankungen zwischen den Deckeln) auf ± 0,05 g austariert. Anschließend werden die Röhrchen verschweißt und für 2 h 15 min bei 4°C und 30.000 g zentrifugiert (Beckman Coulter L8-70M, Rotor Ti 60, Vakuum, decel/accel 9). Abschließend wird die virenhaltige 40 % Phase mit einer Spritze abgenommen und das Schätzvolumen wird notiert. Die Viren können bei -20°C gelagert werden.

Via HPLC

Die Aufreinigung kann sowohl aus dem Überstand sowie aus dem Überstand + Zellen durchgeführt werden. Erfolgt die Aufreinigung aus Überstand + Zellen, wird der Überstand abgenommen und die Zellen werden mechanisch oder mit 1x Trypsin abgelöst. Überstand und Zellen werden anschließend wieder gepoolt. Überstand, sowie Überstand + Zellen werden bei -20°C bis zur Aufreinigung gelagert. Enthält die Probe

Zellen, muss den Proben vor der HPLC-Aufreinigung 10x Triton-Lysepuffer (20) zugesetzt werden und die Probe wird für 30 min bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die Ausgangsmenge an Viruspartikeln sollte mindestens 10^{13} DNase-geschützte Virusgenome betragen. Die HPLC Aufreinigung erfolgte in Kooperation mit Dr. Martin Busch und Dr. Andreas Jungmann aus der Arbeitsgruppe von Professor Patrick Most (Klinik für Kardiologie, Angiologie, Pneumologie; Sektion Molekulare und Translationale Kardiologie).

Quantifizierung DNase-geschützer scAAV6 Partikel

Bestimmt wird der Anteil der DNase-geschützten Partikel, um nicht korrekt verpackte Partikel aus der Analyse auszuschließen. Zu diesem Zweck werden 90 µl Viruslösung nach Herstellerangaben (Turbo DNA-free Kit, Invitrogen) mit 10 µl DNase Puffer und 1 µl DNase (entspricht 2U) gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird anschließend mit 10 µl "Inactivation Reagent" 5 min auf RT abgestoppt. Das "Inactivation Reagent" wird dann durch zweiminütige Zentrifugation bei 10.000g pelletiert. Der virenhaltige Überstand wird abgenommen und für die weitere Analyse verwendet

10 µl Viruslösung oder ddH₂O (Negativkontrolle) 1:1 mit TE-Puffer verdünnt. Zu jeder Probe werden nun 20 µl 2 M NaOH zugegeben. Anschließend wird das Gemisch für 30 min bei 56°C inkubiert (Eppendorf Thermomixer compact). Nach der Inkubation werden je 960 µl 40 mM HCl zugegeben.

Als Standard wird das Konstrukt CAG-CaMBP4-mCherry verwendet. Ein Plasmidstock wird dazu auf ca. 50 ng verdünnt. Vor jedem Ansetzen einer Standardreihe wird die exakte Konzentration über mindestens 5 Messungen am Tecan NanoQuant Infinite M200 PRO bestimmt. Anschließend wird der Stock auf eine Konzentration von $3,5 \cdot 10^9$ Plasmide /µl eingestellt. Die Standardreihe entsteht aus 1:10 Verdünnungen dieser Konzentration. Für die Standardreihe werden üblicherweise die Konzentrationen $3,5 \cdot 10^7$ /µl - $3,5 \cdot 10^2$ /µl verwendet, wobei die qPCR wiederholt werden muss, wenn die Probe höher/niedriger konzentriert ist als der höchste/niedrigste Standard.

3,33 µl Probe werden mit 20 µl SYBR Mastermix (Tabelle 21) in einer Vertiefung einer LightCycler Plate gemischt. Standard und Proben werden in Triplikaten pipettiert. Anschließend wird die Platte versiegelt (Roche LightCycler 480 SealingFoil) und kurz abzentrifugiert (Thermo Fischer Scientific Heraeus Multifuge X3R, Pulse), um sicherzugehen, dass die Probe und der Mastermix vollständig am Boden der Vertiefung sind. Nun kann die qPCR in einem Roche Lightcycler96 nach dem Programm in Tabelle 22 durchgeführt werden. Die Daten werden mit der Light Cyler Software (Tabelle 8,

Tabelle 22: qPCR Programm zur Virusquantifizierung

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer	Option
1	95	1 min	
39	95	5 s	
	60	30 s	plate read
0,5°C Schritte	65 - 95	5 s	plate read

Evaluationsmethode "relative quantification") ausgewertet und die Cq-Werte jeder Vertiefung der Standardreihe werden notiert und in Microsoft Excel gegen den log10 der Konzentration der Plasmide im Reaktionsvolumen aufgetragen. Nun wird eine lineare Regression durchgeführt, sodass

$$y = a * x + b.$$

Die qPCR ist nur auswertbar, wenn der R²-Wert der Regression >0,98 ist. Die Effizienz der Reaktion berechnet sich aus

$$Effizienz[\%] = -1 + 10^{(\frac{-1}{a})} * 100$$

und muss zwischen 90 und 110 % betragen, damit das Ergebnis aussagekräftig ist. Für jedes Triplikat wird die Cq-Distanz nach

$$Cq_{Distanz} = MAX(cq_1, cq_2, cq_3) - MIN(cq_1, cq_2, cq_3)$$

bestimmt. Ist der Mittelwert der Cq-Distanzen der Standardreihe oder der Proben >0,4, ist der Ansatz nicht ausreichend präzise pipettiert um eine Aussage aus der qPCR zu treffen. Ist der Cq-Wert der Negativkontrolle >0,4, ist die Probe verunreinigt und das Ergebnis somit verfälscht. Sofern all die oben genannten Bedingungen erfüllt sind, kann die Konzentration in vg/ µl (virale Genome/ µl) der Probe für jede Vertiefung wie folgt bestimmt werden:

$$Cq_{PCR} = \frac{10^{\frac{cq-b}{a}}}{3,33} [10^9 vg/\mu l]$$

$$C_{stock} = \frac{Cq_{PCR}}{\frac{10}{10+990}} [10^9 vg/\mu l].$$

2.4 Isolation neonataler, ventrikulärer Rattenkardiomyozyten

2.4.1 Material

Tiere

Die Isolation erfolgt aus Wistar-Ratten P1-3 nach Tötungsanzeige T42/17. Die Ratten werden bei Janvier bestellt und verpaart. Die Lieferung der trächtigen Ratten in den klinisch-experimentellen Bereich am IBF erfolgt frühestens 10 Tage nach Verpaarung und spätestens 4 Tage vor dem errechneten Geburtstermin (Tag 17 der Schwangerschaft). Ein Replikat wird aus den gepoolten Zellen von 1-2 Würfen (3-24 Tiere) erhalten. Pro Tier können 0,5- 1,2* 10⁶ Zellen erhalten werden, wobei Isolationen aus wenigen (<6) Tieren zu niedrigeren Ausbeuten führen.

Puffer und Lösungen

Tabelle 23: **10x ADS**

	Konzentration [mM]
NaCl	1163,6
HEPES	197,2
NaH ₂ PO ₄	94,2
Glucose	55,5
KCl	53,5
MgSO ₄	8,3
Aqua ad injectabilia	auffüllen
NaOH/HCl	pH auf 7,4 einstellen steril filtrieren

Tabelle 24: **Kollagenlösung**. Kann nach der Beschichtung abgenommen, bei 4°C gelagert und weitere 2-3 mal verwendet werden.

	Menge [ml]
1x ADS (in Aqua ad injectabilia)	27
Collagen Solution Type 1	3

Tabelle 25: **Verdauungslösung**

	Konzentration
Pankreatin	0,6 mg/ml
Collagenase Typ 2	0,5 mg/ml
1x ADS in in Aqua ad injectabilia	auffüllen
>20 min bei RT rühren	
steril filtrieren	

Tabelle 26: **Percoll Stocklösung**. Für 4 Gradienten/(1-3) Würfe

	Menge
Percoll	27 ml
10x ADS	3 ml

Tabelle 27: **Percollgradient, obere Schicht**. Für 4 Gradienten/(1-3) Würfe

	Menge
Percoll Stocklösung	9 ml
1x ADS in Aqua ad injectabilia	11 ml
Phenol Red	120 µl

Tabelle 28: **Percollgradient, untere Schicht**. Für 4 Gradienten/(1-3) Würfe

	Menge
Percoll Stocklösung	13 ml
1x ADS in Aqua ad injectabilia	7 ml

2.4.2 Arbeitsablauf

Geeignete Zellkulturgefäße werden mit Kollagen beschichtet, indem der Boden mit Kollagenlösung (Tabelle 24) bedeckt wird und das Gefäß für mindestens 2 bis maximal 12 h bei 37°C inkubiert wird (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂). Die Kollagenlösung wird erst kurz vor dem Ausbringen der Zellen abgenommen.

Hals und Bauch der neugeborenen Ratten werden kurz mit einem mit 70 % Ethanol (in H₂O) getränkten Taschentuch abgewischt. Die Ratten werden nun mithilfe einer Schere dekapitiert und der Brustkorb wird links des Sternums geöffnet. Das Herz wird mit

Hilfe von Schere und Pinzette entnommen und in eiskaltem 1x ADS platziert. Sobald alle Herzen entnommen wurden, wird der 1x ADS-Puffer ausgetauscht. Die nachfolgenden Schritte finden unter einer Sterilbank statt. Der 1x ADS-Puffer wird erneut ausgetauscht, um überschüssiges Blut zu entfernen. Mit Schere und Pinzette werden die Atrien, Gefäße und sonstiges mit entnommenes Gewebe von den Ventrikeln entfernt. Die Ventrikel werden in frischem 1x ADS-Puffer platziert. Mit der Schere werden die Ventrikel nun zerkleinert. Pro Wurf werden die Gewebestücke nun in einer Laborglasflasche mit ca. 10 ml Verdauungslösung (Tabelle 25) gegeben und für 20 min bei 37°C sanft im Wasserbad gerührt (Lauda Alpha auf Heidolph MR 3001 K). Die Herzen werden nun mit einer 25 ml serologischen Pipette 3-mal auf und ab pipettiert. Anschließend dürfen sich die Gewebestücke auf dem Boden sammeln und der Überstand wird abgenommen und verworfen. Neue Verdauungslösung wird zugegeben und der Verdauungsschritt wird wiederholt.

Der Überstand wird wie zuvor abgenommen und dann durch ein Zellsieb (Corning CellStrainer 100 µm Nylon, vwr 734-2762) in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben. Das Sieb wird mit 3-4 ml 37°C FBS gespült. Anschließend wird der Überstand mit dem FBS bei RT für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wird abgenommen und die Zellen mit 5-7 ml FBS resuspendiert. Die Suspension wird mit leicht geöffnetem Deckel im Inkubator aufbewahrt (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂).

Der Verdau der Gewebestücke und das Sammeln des Überstandes wird wiederholt, bis sich das Gewebe komplett aufgelöst hat. Die Überstände können dabei nach der Zentrifugation gepoolt werden. Anschließend werden die gepoolten Überstände erneut bei RT für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4°C 1x ADS-Puffer resuspendiert (2 ml/Gradient). 4 Percollgradienten werden angesetzt indem 4 ml der oberen Schicht (Tabelle 27) je in einem 15 ml Falconröhrchen mit 3 ml der unteren Schicht (Tabelle 28) über eine Glaspipette unterschichtet werden. 2 ml der Zellsuspension werden sehr vorsichtig auf jeden Gradienten gegeben. Die Gradienten werden nun für 30 min bei 4°C und 2400 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R), die Bremse wird hierfür deaktiviert. Die Kardiomyozyten sammeln sich zwischen der oberen und der unteren Percollschicht. Die Zellen werden mit einer Pipette entnommen. Dabei dürfen die zwischen der oberen Percollschicht und dem 1x ADS befindlichen Fibroblasten möglichst nicht mit den Kardiomyozyten abgenommen werden. Die ventrikulären Kardiomyozyten werden nun auf 2 50 ml Falconröhrchen verteilt. Diese werden anschließend mit kaltem 1x ADS auf 50 ml aufgefüllt und 5 min bei 1000 rpm auf RT (Heraeus Megafuge 1.0 R) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets werden gepoolt, erneut mit kaltem 1x ADS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert.

Nun werden die Zellen in einem angemessenen Volumen Kulturmedium (i.d.R. 10-15 ml, DMEM-Glutamax + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und die Konzentration der lebenden Zellen in einer Neubauerkammer gezählt (1:1 mit Trypan Blue Solution gefärbt, Auszählung von mindestens 4 Großquadraten).

Für jede Isolation werden die Anzahl der Jungtiere, die Anzahl der erhaltenen Zellen und der Prozentsatz lebender Zellen, sowie Unregelmäßigkeiten während der Isolation protokolliert.

2.5 Zellflächenmessung zur Bestimmung der Hypertrophieantwort

Medien und Lösungen

Tabelle 29: **PBST**

	Menge
Tween 20	1 ml/l
Glycin	0,3 M
PBS	auf Endvolumen
HCl/NaOH	auf pH 7,4

2.5.1 Arbeitsablauf

Etablierung des Versuches

Alle Bedingungen werden in Duplikaten gemessen. Dafür werden die entsprechenden Vertiefungen von 4 identischen 96er Reaktionsplatten mit Kollagenlösung vorbereitet und neonatale, ventrikuläre Rattenkardiomyozyten (NRVCMCs) werden isoliert wie oben beschrieben. Jede Platte wird für einen Zeitpunkt verwendet, da die fixierten Zellen nicht im Inkubator gelagert werden können. Pro Vertiefung werden 10.000 Zellen in 100 µl Kulturmedium mit FBS (DMEM + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin) ausgesetzt. Die Zellen werden je nach Protokoll (siehe Abbildung 8) 24-72 h in diesem Medium inkubiert (Binder BD, 37°C, 5 % CO₂).

Zu jedem definierten Zeitpunkt (siehe Abbildung 8 und Tabelle 30) jeweils eine Platte fixiert. Dazu wird das Medium abgenommen und die Vertiefungen werden mit 4°C PBS gespült. Anschließend werden die Zellen für 10 min bei 4°C mit 4 % PFA fixiert. Nun

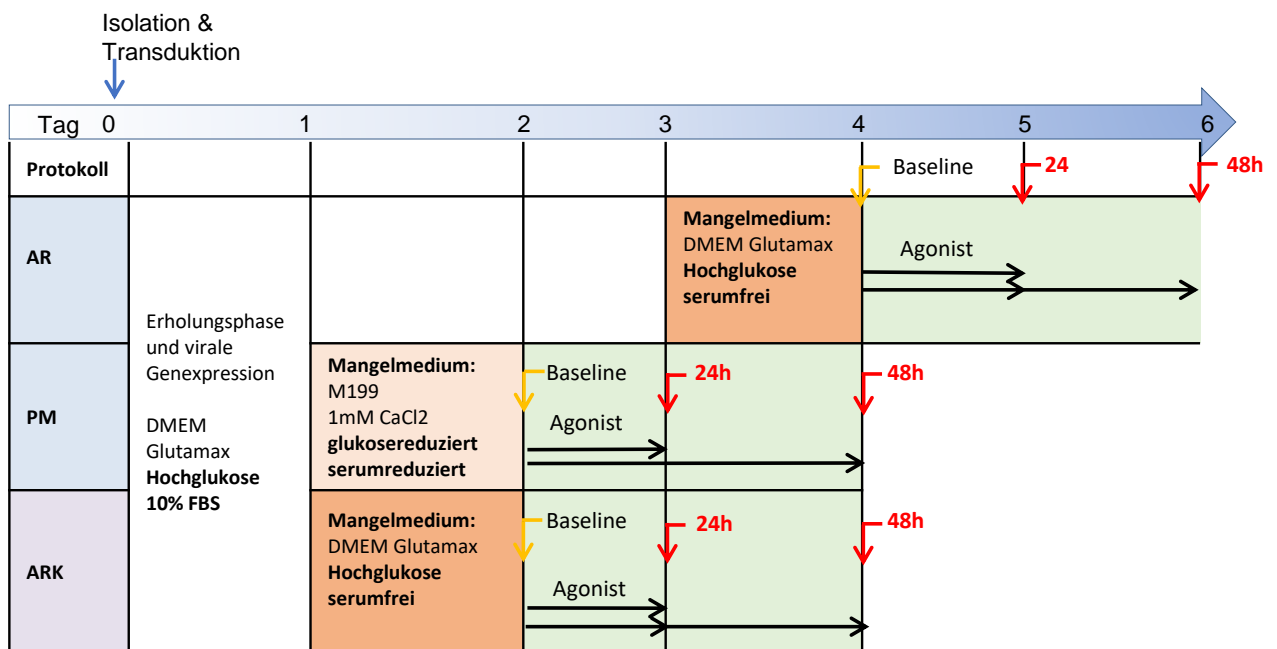


Abbildung 8: Protokolle zur Induktion von Hypertrophie in Rattenkardiomyozyten

Es werden 3 verschiedene Protokolle getestet. Die Zellen werden nach der Isolation jeweils in DMEM Medium ausgesetzt (Hochglukose, 10% FBS) inkubiert. Für Protokoll AR wird dieses Medium 72h beibehalten, wobei das Medium alle 24h erneuert wird. Anschließend wird als Mangelmedium DMEM Medium ohne FBS zugegeben und die Zellen werden weitere 24 h kultiviert, bevor die Stimuli in Mangelmedium zugegeben werden. Das Stimulationsmedium wird alle 24h erneuert. Für Protokoll PM werden die Zellen 24h nach Isolation in ein M199 Mangelmedium mit 2% FBS überführt und nach weiteren 24 h werde die Stimuli in Mangelmedium zugegeben. Protokoll ARK folgt dem Zeitplan des Protokolls PM, verwendet aber die Medien, die für Protokoll AR beschrieben wurden. Auch für Protokoll ARK wird das Medium alle 24 h gewechselt. Die Stimuli werden jeweils nach Tabelle 30 angesetzt. Als Negativkontrolle dienen unstimulierte Zellen vom gleichen Zeitpunkt und ein Basiswert (BL) vor Stimulation verwendet.

werden die Vertiefungen 2-mal für jeweils 5 min mit PBS + 2g/l Na-Azid bei 4°C gewaschen. 100 µl PBS + 2g/l Na-Azid werden in jede Vertiefung gegeben und die Platten werden mit Parafilm verschlossen und bis zur Färbung bei 4°C gelagert.

Färbung und Zellflächenmessung

Wenn alle Zellen fixiert sind, kann die Färbung fortgesetzt werden. Dafür werden die Zellen 2-mal für jeweils 5 min mit PBS bei 4°C gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt für 20 min bei RT in 0,1 % Triton (in PBS). Anschließend werden die NRVMCs 3 mal für jeweils 5 min mit PBS bei 4°C gewaschen. Nun werden die Zellen für 1 h bei RT mit 100 µl/ Vertiefung 3 % BSA in PBST (Tabelle 29) behandelt. Im Folgenden werden 45-70 µl/ Vertiefung anti-alpha-actinin Antikörper (1:500 in 3 % BSA in

Tabelle 30: **Getestete Bedingungen** Folgende Bedingungen wurden je Protokoll getestet.

Protokoll	Stimulation mit	Konzentration	Stimulationsdauer
Most	PE	100 μ M	BL, 24 h, 48 h
AR	AngII	100 nM, 300 nM, 1 μ M	2 h, 10 h, 24 h, 48 h
	ET-1	100 nM, 300 nM, 1 μ M	2 h, 10 h, 24 h, 48 h
	ISO	100 nM, 300 nM, 1 μ M	2 h, 10 h, 24 h, 48 h
	PE	10 μ M, 30 μ M, 100 μ M	BL, 2 h, 10 h, 24 h, 48 h
	FBS	5%, 10%	2 h, 10 h, 24 h, 48 h
AR kurz	PE	100 μ M	BL, 24 h, 48 h

PBS) zugegeben. Die Platten werden mit Parafilm versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die NRVCs werden 3-mal für jeweils 5 min mit PBS bei 4°C gewaschen. In jede Vertiefung werden jetzt 45-70 μ l Sekundärantikörper (1:200 IgG anti-mouse + A1488 oder IgG anti-mouse + A1594 in 3 % BSA in PBS) zugegeben und für 1 h bei RT lichtgeschützt inkubiert. Nun werden die NRVCs 3-mal für jeweils 5 min mit PBS bei 4°C gewaschen. Die Zellkerne werden jetzt mit 70-100 μ l 1,5 μ g/ μ l DAPI in PBS für 5 min bei RT lichtgeschützt angefärbt. Überschüssiges DAPI wird mit PBS abgewaschen. Anschließend werden pro Vertiefung 100 μ l PBS zugegeben. Die Zellen werden bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt und noch am gleichen Tag am InCell Analyzer der AG Backs gemessen.

Um die Daten im Säulendiagramm darzustellen, wird jede Probe auf ihre Negativkontrolle oder Baseline normalisiert und die normalisierten Daten werden anschließend gemittelt. Die statistische Auswertung erfolgt auf Basis der nicht normalisierten Zellflächen. Es wird dazu ein ANOVA mit Post-hoc Sidak Test angewendet.

Bestimmung einer geeigneten MOI zur Transduktion von NRVCs

Die Bestimmung einer geeigneten Dosis für die in vitro Transduktion von NRVCs erfolgte unter dem Protokoll PM. Dazu wurden die Zellen direkt nach dem Aussetzen in einer Verdünnungsreihe jeweils mit einer Dosis von 300 - 10⁵ vg/Zelle pro Konstrukt transduziert. Die Expression und Lokalisation für die Konstrukte CaMBP4-mCherry und mCherry-NLS wurde täglich an einem Fluoreszenzmikroskop überprüft (Zeiss, Z1). 72 h nach Zugabe des Mangelmediums wurden die Zellen wie oben beschrie-

ben fixiert, gefärbt und am InCell Analyzer ausgewertet. Die Anzahl detektierter transduzierter Kardiomyozyten, sowie die Gesamtzahl aller Kardiomyozyten wurde protokolliert und in einer Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Basierend auf dieser wurde für jedes Konstrukt eine geeignete Dosis für Zellflächen- und Genexpressionsanalyse ausgewählt. Durch die hohe Reinheit der Kultur und die Spezifität des MLC260-Promoters ist eine Verfälschung des Ergebnisses durch falsch positive Nuclei zu vernachlässigen.

2.6 Anreicherung transduzierter NRVCMS via FACS

2.6.1 Arbeitsablauf

Um sicherzustellen, dass die Analyse der Genexpression nicht durch die RNA nicht transduzierter Kardiomyozyten verunreinigt wird, wurde getestet inwieweit die Kernfluoreszenz für MLC260-mCherry und MLC260-CaMBP4-mCherry ausreicht um transduzierte Zellen via FACS anzureichern.

Dazu werden die Kardiomyozyten wie oben beschrieben isoliert. Es werden für jede Bedingung 5 Vertiefungen zu je 10.000 Zellen ausgesetzt und die Zellen werden mit 3.000 vg/Zelle transduziert. Zusätzlich wird in einer 12er Reaktionsplatte eine nicht transduzierte Kontrolle aus 500.000 Zellen angesetzt, damit bei jedem FACS Durchgang kalibriert werden kann. Die Zellen werden nach dem Most Protokoll behandelt. Für jedes Konstrukt werden 5 Vertiefungen nicht stimuliert und 5 Vertiefungen werden mit 100 μ PE stimuliert. Die Zellen werden 48h nach Stimulation mit PBS gewaschen und 5 min mit 30 μ l/Vertiefung 1x Trypsin bei 37°C abgelöst. Die Zellen werden nun in 0,5 % FBS in PBS aufgenommen, wobei gründlich über den Boden der Vertiefung pipettiert wird und die 5 technischen Replikate werden in ein FACS Röhrchen überführt, auf ein Volumen von 400-500 μ l aufgefüllt und auf Eis gestellt. In einem weiteren FACS Röhrchen werden 350 μ l RLT Puffer aus dem RNeasy Qiagen Kit nach Herstelleranweisungen vorgelegt. Aus diesen Proben werden anschließend an der ZMBH Core Facility bis zu 3000 Zellen direkt in den Lysepuffer sortiert und anschließend bei -80°C bis zur Aufreinigung gelagert.

2.7 Expressionsanalyse in neonatalen Rattenkardiomyozyten

2.7.1 Materialien

2.7.2 qPCR

Neonatale Rattenkardiomyozyten werden isoliert und konfluent (0.5 Mio/Vertiefung in einer 12er Reaktionsplatte) ausgesetzt. Die NRVCMSs werden entsprechend dem AR Protokoll für 2 h, 10 h, 24 h oder 48 h stimuliert, wie oben beschrieben. Anschließend

Tabelle 31: **Primer für die Genexpressionsanalyse via qPCR**

Name	Sequenz	Roche Sonde Nr	designed von
ANF fwd	tgatggattcaagaacctgct	25	Christin Richter
ANF rev	cctcatcttctaccggcatc	25	Christin Richter
BNP fwd	gggctgtaacgcactgaag	71	Christin Richter
BNP rev	cccaggcagagtcagaaact	71	Christin Richter
α MHC fwd	agaggagagggcgacat	95	Anja Riedel
α MHC rev	catcgtgcattttctgcttg	95	Anja Riedel
β MHC fwd	caggcgtgtaccttatagca	20	Anja Riedel
β MHC rev	cattgagggggtccttggt	20	Anja Riedel
18S fwd	ggtgcatggccgttctta	22	Anja Riedel
18S rev	aactagttagcatgccgagagtc	22	Anja Riedel

werden die Zellen mit 1xDPBS gewaschen und die RNA wird über ein RNeasy Mini Kit extrahiert und in 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA wird bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Bis zu 1 μ g RNA wird nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR für ANF, BNP und 18S quantifiziert. Das Umschreiben und die qPCRs werden von Christine Richter durchgeführt.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Roche LightCycler Software (siehe Tabelle 8)

2.7.3 RNA Sequenzierung transduzierter Rattenkardiomyozyten

Neonatale Rattenkardiomyozyten werden isoliert wie oben beschrieben und in einer Dichte von 128,2 Zellen/ cm^2 ausgesetzt. Die Kardiomyozyten werden mit mCherry-NLS oder CaMBP4-mCherry-NLS transduziert und die Hälfte der Proben wird mit 100 μ M PE nach Protokoll PM behandelt, während die andere Hälfte in unbehandeltem Mangelmedium kultiviert wird. Anschließend werden die Zellen mit 1xDPBS gewaschen und mit 1x Trypsin für 6 min von der Platte gelöst. Die Zellen werden in 1x DPBS + 0,5 % FBS (Volumen 200-400 μ l) überführt und auf Eis zur FACS Core facility transportiert, wo bis zu 3000 mCherry-fluoreszente Zellen direkt in 350 μ l RLT Puffer sortiert werden. Die RNA wird bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die RNA wird entsprechend dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Bibliotheken wurden nach dem Ovation SoLo RNA-seq System (user guide M01406 v5) von

Christine Richter oder Xenia Tolksdorf vorbereitet. 25 ng DNA werden anschließend für die RNAseq eingesetzt (durchgeführt von Vladimir Benes. EMBL Core facility, Illumina NextSeq 500 , 75bp single end reads). Die Verarbeitung der Sequenzierdaten erfolgte durch Vladimir Kuryshev. Die Qualitätskontrolle erfolgte via FastQC (0.11.8) [Andrew, 2010]. Reads, welche die Qualitätskontrolle bestanden haben, wurden auf das Rattenreferenzgenom (rn6, genome-build RGSC Rnor_6.0) über den Star RNA-seq aligner (2.6.1d) [Dobin et al., 2013] gemäß der Standardeinstellungen mappiert. Die resultierenden 34- 81 % einzigartig auf dem Referenzgenom lokalisierbaren reads (Alignments) wurden für die weitere Analyse verwendet. Über featureCounts (2.0.1) [Liao et al., 2014] wurden alle Alignments auf +-Strang Exons gezählt. Die differenzielle Genexpression wurde mittels des DESeq2 R-Pakets (1.28.1) [Love et al., 2014] analysiert, wobei Gene mit weniger als 10 Alignments über alle Proben aus der Analyse entfernt wurden. Ein Gen wurde als differenziell exprimiert gewertet, wenn der angepasste p-Wert $<0,05$ und der $\log_{2}FC > |0,58|$, also die Expression eines Gens mehr als 1,5-fach verändert war. Gene mit p-Wert $<0,05$ wurden unter Einbeziehung des WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkits [Liao et al., 2019] im Rahmen einer KEGG-Signalweganalyse analysiert und relevante Gene wurden anschließend mit GraphPad prism grafisch dargestellt.

2.8 Messung der Translationsaktivität via Puromycin

Tabelle 32: **2x RIPA**

	Menge
Tris pH 7,5	25 mM
NaCl	150 mM
Triton	1%
SDS	0,1%

Neonatale Rattenkardiomyozyten werden wie zuvor beschrieben isoliert in 12er Reaktionsplatten ausgesetzt (250000 Zellen/Vertiefung), mit mCherry bzw CaMBP4-mCherry transduziert und nach dem Protokoll PM mit 100 μ PE behandelt. 24h nach Stimulation wird dem Medium Puromycin zugesetzt, sodass eine Konzentration von 0,5 μ g/ml pro Vertiefung vorliegt. Nach 30 min werden die Vertiefungen zweimal mit PBS gespült und in 1x RIPA Puffer (siehe Tabelle 32; + 0,5 % Natriumdeoxycholat, +1x Proteaseinhibitor) zur späteren Analyse bei -20°C gelagert. Die Erstellung und Auswertung der WesternBlots mit Hilfe von anti-Puromycin erfolgte durch die AG Völkens.

2.9 Analyse der Transkriptionsfaktoraktivitäten

Zur Abschätzung veränderter Transkriptionsfaktor (TF)-aktivität durch die Expression von CaMBP4, wurden die oben beschriebenen RNAseq Datensätze verwendet. Die Durchführung der Analyse erfolgte durch Enio Gjerga aus der AG Dieterich. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren erfolgte anhand der Viper Anreicherungsverfahren [Alvarez et al., 2016] auf Grundlage der vier verlässlichsten Interaktionslevel (A-D) der DoRothEA Datenbank für die Interaktion von TFs mit Zielgenen [Garcia-Alonso et al., 2019] für den Organismus *mus musculus*. Zur Abschätzung des Signifikanzniveaus der Aktivitätsscores der einzelnen TFs wurde ein vergleichender Permutationstest auf Grundlage (Nullverteilung) einer randomisiert generierten bi-partiten TF-zu-Zielgen-Interaktion von DoRothEA 1000 mal mit Hilfe des R-Pakets BiRewire [Iorio et al., 2016] durchgeführt. Zur Bestimmung des p-Wertes wurde aus der Menge der generierten Nullverteilungen ausgewertet, in wie vielen Fällen der Betrag des zufälligen Aktivitätsscores höher lag als der experimentell Bestimmte. Transkriptionsfaktoren mit einem p-Wert $\leq 0,1$ wurden als signifikant definiert.

2.10 Statistik

Eine Isolation, bestehend aus 1-2 Würfen neugeborener Wistar-Ratten (4-24 Tiere), wird als ein Replikat gewertet, sofern nicht anders beschrieben.

2.10.1 Zellflächenversuch Protokoll AR

Die Zellfläche wird mittels eines Boxplots (Box and Whiskers; Min to Max, show all points) in GraphPad Prism dargestellt. Für die Berechnung der Signifikanz des Quotienten aus stimulierter Probe und Kontrolle wurde ein einseitiger Wilcoxon Signed Rank Test gegen 1 durchgeführt.

2.10.2 Zellflächenversuch Protokoll PM

Die Zellfläche wird mittels eines Boxplots (Box and Whiskers; Min to Max, show all points) in GraphPad Prism dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte Anhand der nicht normalisierten Zellflächen. Dabei wird für jeden Zeitpunkt ein separater ANOVA und post-hoc Sidak-Test in GraphPad Prism durchgeführt. Zum Zeitpunkt Baseline wird die unstimulierte Kontrolle gegen die mCherry, CaMBP4 und Parvalbumin Gruppen verglichen. Diese Analyse wird für die Zeitpunkte 24h und 48h wiederholt.

Des Weiteren werden zum Zeitpunkt 24h und 48h jeweils folgende Gruppen verglichen:

- Untransduzierte Kontrolle unstimuliert vs PE

- Untransduzierte Kontrolle unstimuliert vs ET-1
- mCherry⁺ NRVCN unstimuliert vs PE
- mCherry⁺ NRVCN unstimuliert vs ET-1
- Parvalbumin⁺ NRVCN unstimuliert vs PE
- Parvalbumin⁺ NRVCN unstimuliert vs ET-1
- CaMBP4⁺ NRVCN unstimuliert vs PE
- CaMBP4⁺ NRVCN unstimuliert vs ET-1
- mCherry⁺ NRVCN vs Parvalbumin⁺ NRVCN unter PE Stimulation
- mCherry⁺ NRVCN vs CaMBP4⁺ NRVCN unter PE Stimulation

Die Zellfläche wird mittels eines Boxplots (Box and Whiskers; Min to Max, show all points) in GraphPad Prism dargestellt. Die Signifikanz wurde in den Abbildungen mit *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ dargestellt.

2.10.3 qPCR

Die Genexpressionsveränderungen (Log_2FC $\text{cq-Wert}_{\text{stimuliert}} / \text{cq-Wert}_{\text{nicht stimuliert}}$) werden als Boxplot (Box and Whiskers; Min to Max, show all points) in GraphPad Prism dargestellt und die Signifikanz wird mittels eines 1-Sample-t-Tests (gegen 1) in GraphPad Prism ermittelt. Signifikanz wurde in den Abbildungen mit *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ dargestellt.

2.10.4 Genexpressionsstudien

Die Signifikanz der in dieser Arbeit ermittelten Genexpressionsveränderungen wird über das Deseq2-Paket in R ermittelt, indem ein Wald-Test mit Benjamini-Hochberg Korrektur durchgeführt wird. Die Signifikanz wurde in den Abbildungen mit *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ dargestellt.

2.10.5 Puromycinassay

Ein Replikat wird als eine gemessene Vertiefung in der Reaktionsplatte gewertet. Die Signifikanz wurde über einen one-way-ANOVA (gegen 1) mit post-hoc Bonferroni-Korrektur ermittelt. Die Signifikanz wurde in der Abbildung mit *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Hypertrophie in NRVCMCs

3.1.1 Vergleichende Analyse publizierter Protokolle zur Induktion von Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten

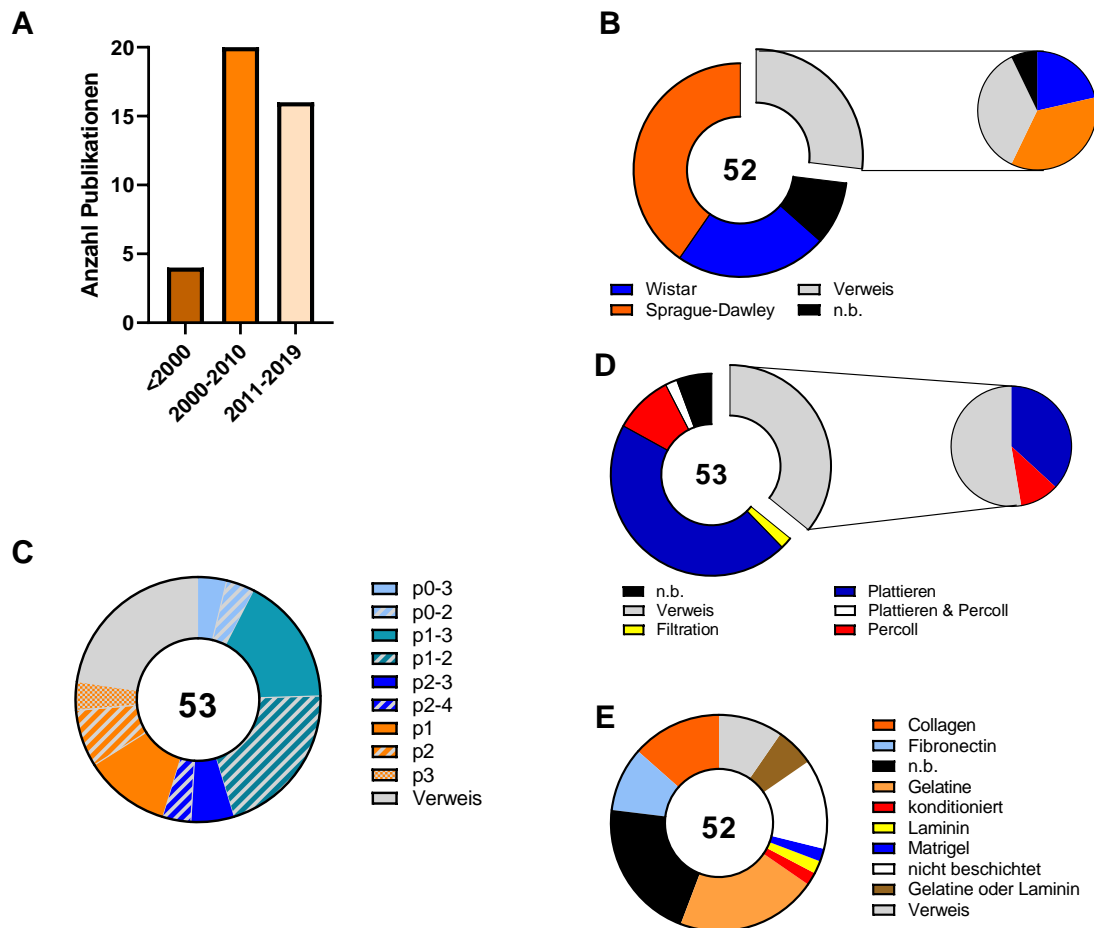


Abbildung 9: **Variabilität in publizierten Protokollen zur Durchführung von Hypertrophie- Experimenten an NRVCMs.** Die Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten unterscheidet sich in den untersuchten Protokollen (Publikationszeitraum in A) sowohl hinsichtlich der verwendeten Tiere (B), als auch bezogen auf den Zeitpunkt der Isolation (C), die Aufreinigung der Kardiomyozyten (D) und die Beschichtung der Platten (E).

Aufbauend auf den in der Einleitung beschriebenen Beobachtungen zur Isolation und Kultur neonataler Rattenkardiomyoten, habe ich mehr als 50 publizierte Protokolle hauptsächlich aus den letzten 20 Jahren (Abbildung 9 A) hinsichtlich der verwendeten Isolation und Stimulationsmethoden untersucht. Es hat sich gezeigt, dass mit Wistar und Sprague-Dawley Ratten im Regelfall Auszuchtlinien verwendet werden (Abbildung 9 B). Des Weiteren wird mehrheitlich ein Isolationszeitpunkt bis zu 2 Tagen

nach der Geburt ($p \leq 2$) beschrieben (Abbildung 9 C). Um eine Kardiomyozytenkultur zu erhalten, die möglichst frei von Fibroblasten ist, plattieren die meisten Gruppen die Zellsuspension vor (Abbildung 9 D). Zur Kultur der Kardiomyozyten sind zahlreiche Beschichtungen beschrieben, die meisten Protokolle verwenden Collagen oder Gelatine (Abbildung 9 E).

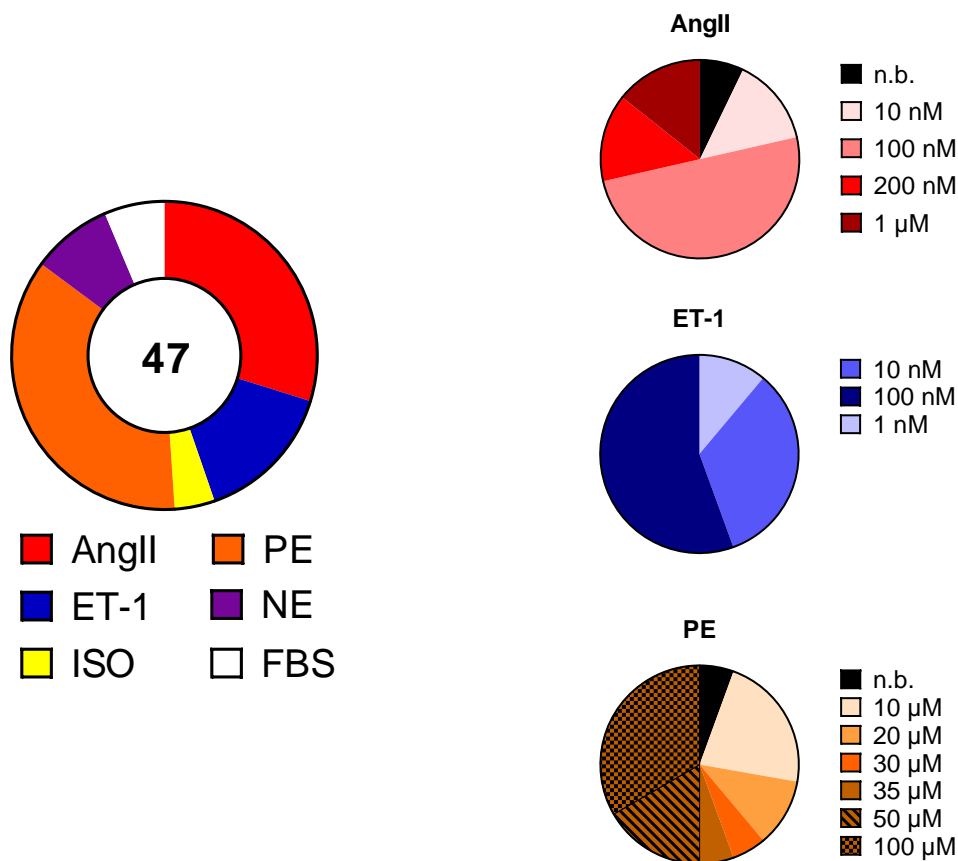


Abbildung 10: **Unterschiede in der Art und Konzentration der Stimuli zur Durchführung von Hypertrophie-Experimenten an NRVCMs.** Die Stimulation neonataler Rattenkardiomyozyten unterscheidet sich sowohl hinsichtlich der verwendeten Stimuli, als auch bezogen auf die verwendeten Konzentrationen jedes Stimulus. Die eingesetzte Konzentration variiert hierbei um den Faktor 10.

Auch bei der Induktion von Hypertrophie weichen die Protokolle stark voneinander ab. Ich habe festgestellt, dass die Stimulationsprotokolle nicht einheitlich hinsichtlich der Stimulationsdauer (20-48h), sowie Art und Konzentration der Stimuli (Abbildung 10) sind (z.B. Simpson et al. [1982]; Liu et al. [1998]; Sundgren et al. [2003]; Colella und Pozzan [2008]; Higazi et al. [2009]; Lu und Yang [2009]; Watkins et al. [2011]).

3.1.2 Etablierung einer Methode zur Quantifizierung neurohumoral induzierter Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Ein 6-tägiges Protokoll mit serumfreien Medium (AR) liefert geringe Effektstärken

Basierend auf den publizierten Stimulationsprotokollen (siehe Kapitel 1.3.2), habe ich mich entschieden Wistar-Ratten für den Versuch zu verwenden. Des Weiteren kultiviere ich die Zellen drei Tage in DMEM Medium mit 10 % FBS, um für die späteren Versuche ausreichend Zeit zur Expression unserer Konstrukte zu lassen. 24h vor Stimulation werden die Zellen in serumfreies Medium überführt (siehe Protokoll AR, Abbildung 8). Es wird eine Versuchsreihe mit 5 verschiedenen Stimuli (Angiotensin II, Endothelin-1, Isoproterenol, Phenylephrin und FBS) in 3 Konzentrationen getestet. Nach 2h, 10h, 24h und 48h Stimulation werden die Zellfläche mittels Antikörperfärbung oder die gängigen Hypertrophiemarker ANF, BNP und β -MHC/ α -MHC anhand der höchsten getesteten Konzentration für jeden Stimulus via qPCR bestimmt, ein geeignetes Protokoll zur Stimulation neonataler Rattenkardiomyozyten zu determinieren.

Stimulation mit Angiotensin II (AngII): Ich habe festgestellt, dass unter dem gegebenen AR Protokoll nach 48h Stimulation mit 300 nM AngII eine signifikante Vergrößerung der Zellfläche um 46,3 % im Vergleich zur Negativkontrolle (ctrl) messbar ist (Abbildung 11 A). Allerdings ist zu keinem Zeitpunkt ein Anstieg der Expression der hypertrophen Marker messbar (Abbildung 11 B).

Stimulation mit Endothelin-1 (ET-1): Unter Stimulation mit ET-1 konnte in allen getesteten Konzentrationen nach 24h oder 48h ein signifikanter Anstieg der Zellfläche relativ zur Negativkontrolle bestimmt werden (Abbildung 11 C). Mit 100 nM konnte nach 24h (60,8 %) und 48h (96,7 %) Stimulation eine signifikante Vergrößerung gezeigt werden. Bei einer Erhöhung der Dosis auf 300 nM steigt die mittlere relative Zellfläche nach 24h Stimulation um 61,2 % an. Mit der maximalen Dosis von 1 μ M steigt die Zellfläche über die Zeit hinweg an. Nach 48h hat sich die Zellfläche signifikant um 81,6 % vergrößert. Die Expression von BNP war bereits nach 2h signifikant um Faktor 2,5 erhöht, anschließend konnte keine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden (Abbildung 11 D).

Stimulation mit Isoproterenol (ISO): Durch Stimulation mit ISO konnte ich unter dem von mir verwendeten Protokoll keine signifikanten Veränderungen der Zellfläche (Abbildung 11 E) oder der hypertrophen Marker (Abbildung 11 F) nachweisen.

Stimulation mit Phenylephrin (PE): Die Stimulation von Kardiomyozyten mit 10 μ M

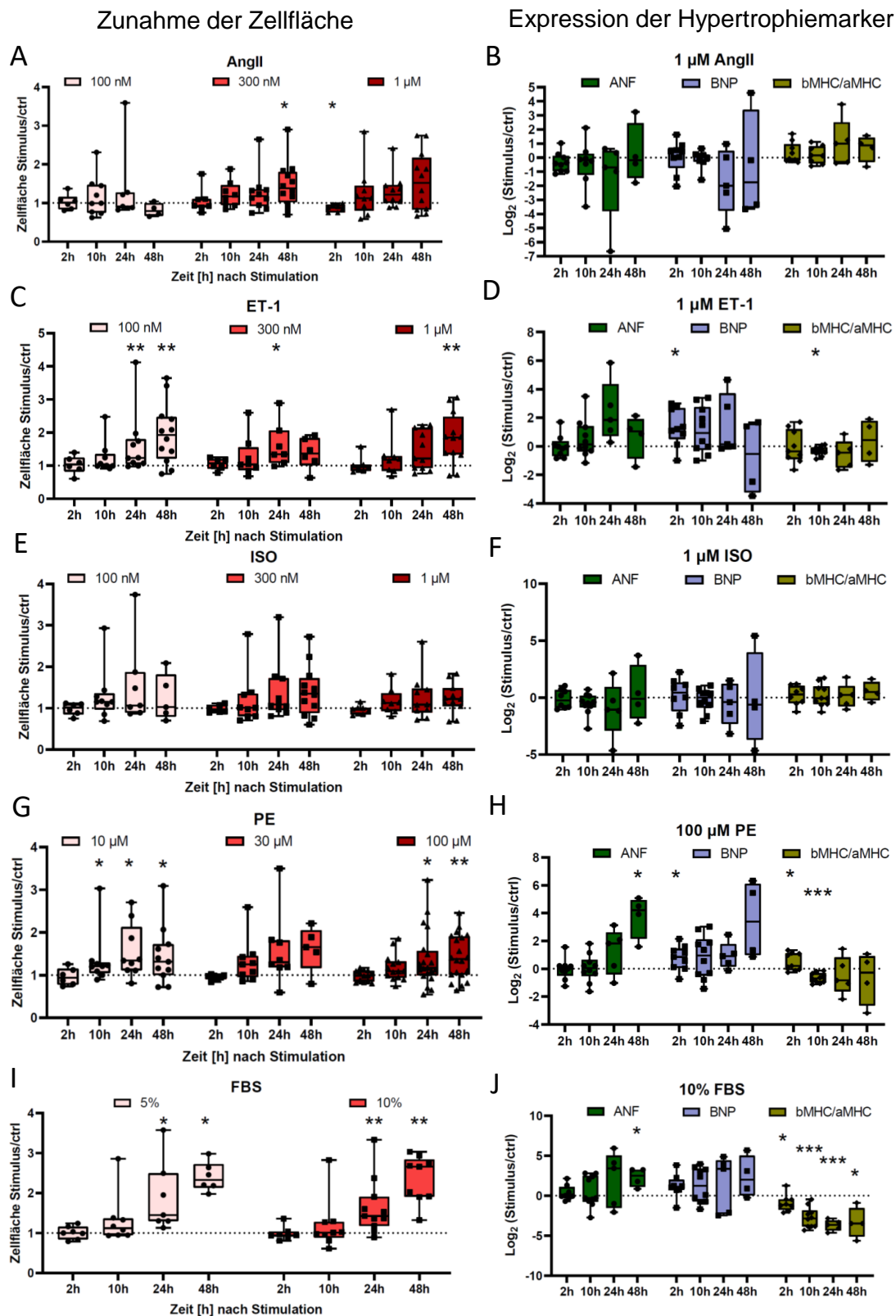


Abbildung 11: **Induktion von Hypertrophie über verschiedene Stimuli.** Gemessen wurde die Zellfläche in Relation zur unstimulierten Kontrolle (A, C, E, G, H, I), sowie die Expression der Hypertrophie-Markergene ANF & BNP, sowie der Quotient aus β -MHC/ α -MHC (B,D,F,H,I) für Angiotensin (A,B), Endothelin (C,D), Isoproterenol (E,F), Phenylephrin (G,H) und Kälberserum (I,J). N=4-22 unabhängige Biologische Replikate. Statistik mit Wilcoxon Signed Rank Test (Zellfläche), beziehungsweise T-Test (Expression der Hypertrophie-Markergene). *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$

PE führte zu einer signifikanten Zunahme der Zellfläche um 21,2% nach 10h Stimulation, um 34,2% nach 24h Stimulation und um 31,6% nach 48h Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Stimulation mit einer Konzentration von 100 μ M PE führte zu einer signifikanten Größenzunahme um 16,7% nach 24h und 37,7% nach 48h im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 11 G). Nach Stimulation mit 100 μ M PE war ebenfalls eine verstärkte Expression der hypertrophen Marker nachweisbar (Abbildung 11 I). Die Expression von ANF war nach 48h um den Faktor 13,7 erhöht. Nach 2h Stimulation konnte eine verstärkte Expression von BNP (Faktor 1,7) und β -MHC/ α -MHC (Faktor 1,4) nachgewiesen werden. Das Verhältnis von β -MHC/ α -MHC fiel nach 10h um 37 % im Vergleich zur Negativkontrolle ab.

Stimulation mit Kälberserum (FBS): Bei Zugabe von 5 oder 10 % FBS zum Mangelmedium nahm die relative Zellfläche über den Beobachtungszeitraum hinweg zu (Abbildung 11 I). Bei Zugabe von 5 % FBS konnte ein mittlerer Anstieg um den Faktor 1,45 nachgewiesen werden. Nach 48h Stimulation waren die Kardiomyozyten um Faktor 2,33 vergrößert. Bei Zugabe von 10 % FBS konnte nach 24h ein Anstieg um Faktor 1,43 gezeigt werden. Nach 48h waren die Zellen um Faktor 2,66 größer als unbehandelte Zellen zum gleichen Zeitpunkt. Unter Zugabe von FBS konnte nach 48h eine signifikante Zunahme der Expression von ANF um Faktor 4,85 gemessen werden. Ein Anstieg von BNP war nicht nachweisbar (Abbildung 11 J). Ich habe gezeigt, dass unter diesem Protokoll der Quotient β -MHC/ α -MHC über den Beobachtungszeitraum um bis zu 92,3 % gegenüber der Negativkontrolle abnimmt.

Zusammenfassung: Unter dem AR Protokoll hat keiner der verwendeten Stimuli eine robuste Induktion kardialer Hypertrophie im Bezug auf Zellfläche und Markerexpression gezeigt. Wegen der großen Standardabweichung in diesem Versuch (Abbildung 11), müssten für eine 95%ige Trennschärfe nach 48h PE Stimulation 24 Replikate durchgeführt werden. Daher wäre eine erhebliche Menge an Replikaten erforderlich um eine Reduktion der PE-induzierten Hypertrophie durch die Blockade der nuklären Kalziumsignalwege via Parvalbumin oder CaMBP4 zu zeigen. Aus diesem Grund muss das Protokoll zur Induktion kardialer Hypertrophie weiter verbessert werden.

Kombination verschiedener Stimuli: Ich habe untersucht, ob die Kombination mehrerer Stimuli eine Verbesserung der Effektstärke verglichen mit den Einzelstimuli ermöglicht (Abbildung 12). Es hat sich gezeigt, dass keine der getesteten Kombinationen Hypertrophie in NRVCMs auslösen konnte. Insbesondere die Kombination aus Phenylephrin und Isoproterenol, sowie die Kombination aller Stimuli haben sich dabei bereits nach 24h (Abbildung 12 A) als toxisch herausgestellt.

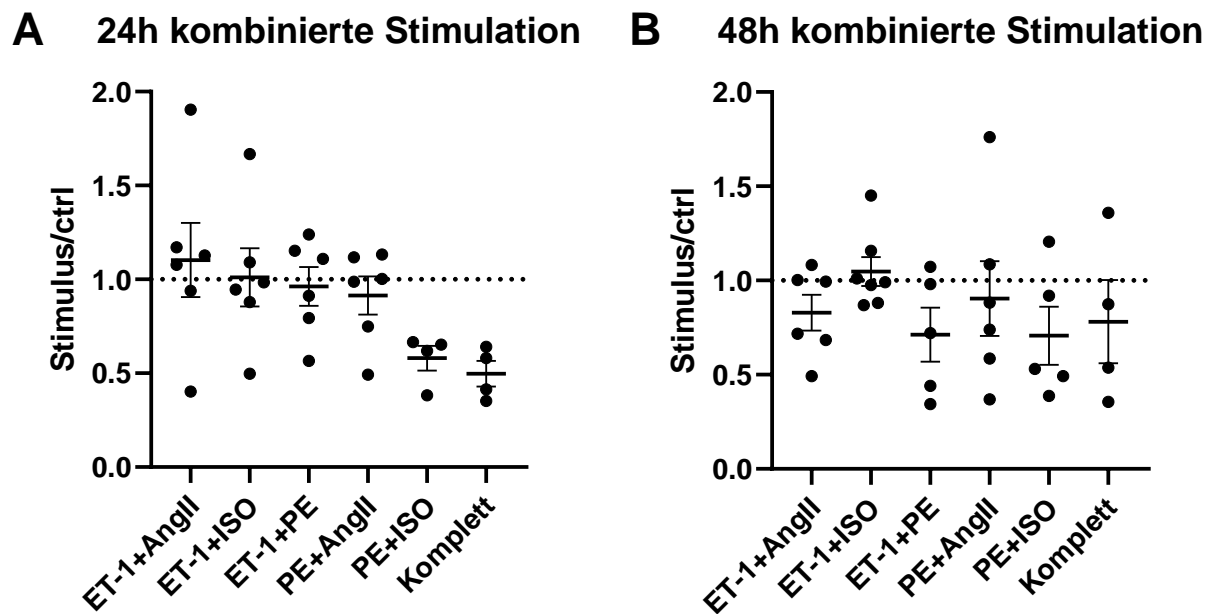


Abbildung 12: **Verwendung kombinierter Stimuli zur Induktion von Hypertrophie unter Protokoll AR.** Zur Stimulation wurden 300 nM AngII, 100 nM ET-1, 300 nM ISO und 10 μ M PE wie kombiniert. Neonatale, ventrikuläre Rattenkardiomyozyten wurden für A) 24h oder B) 48h stimuliert. Die gemessene Zellfläche wurde in Relation zur unstimulierten Kontrolle aufgetragen. N=4-6 unabhängige biologische Replikate. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung (SD), kein Signifikanztest.

Zusatz von FBS zum Mangelmedium: Ich habe evaluiert, ob eine Zugabe einer geringen Menge FBS zum Mangelmedium die Hypertrophieantwort im Bezug auf die hohe Standardabweichung stabilisieren könnte. Zu diesem Zweck habe ich die Hypertrophieantwort nach Stimulation mit 100 μ M PE nach 2-48h unter verschiedenen Mangelmedien aufgenommen (Abbildung 13). Es ist erkennbar, dass bereits die Zugabe von 0,3 % FBS in das Mangelmedium unter Protokoll AR die Hypertrophieantwort vollständig maskiert.

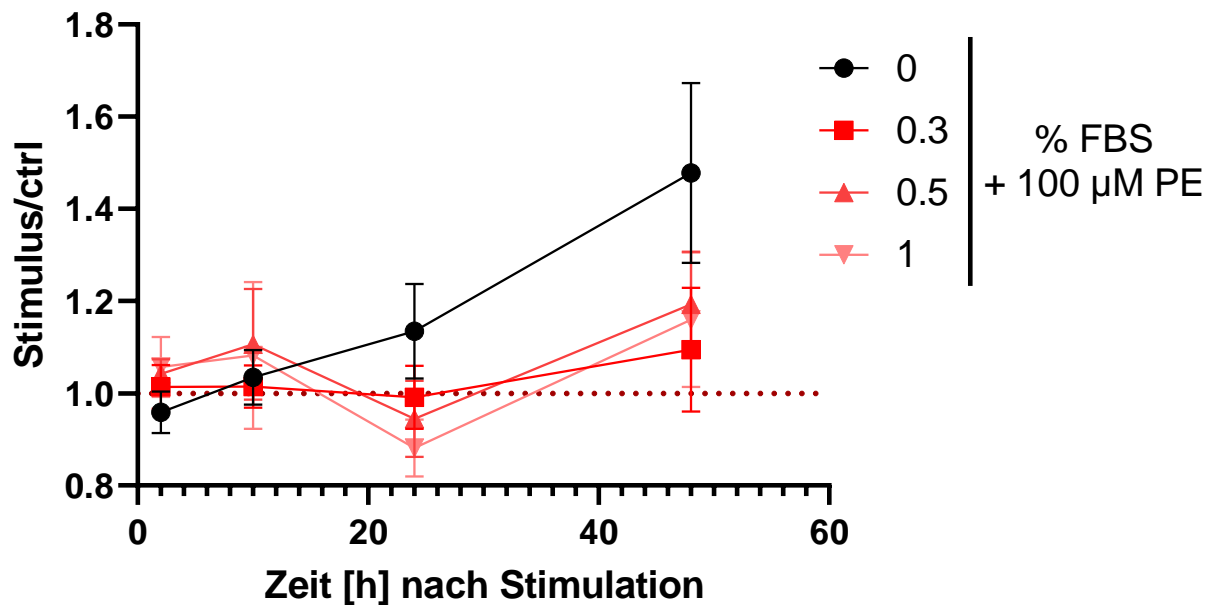


Abbildung 13: **Einfluss von FBS als Zusatz im Mangelmedium auf die PE mediierte Hypertrophieantwort.** Verwendet wurden 0-1 % FBS im Mangelmedium. Nach 2-48h wurde die Zellfläche im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle aufgenommen. N=7-9 unabhängige biologische Replikate. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, kein Signifikanztest.

Zusammenfassung der Induktion von Hypertrophie in NRVCMs unter dem AR Protokoll: Es hat sich gezeigt, dass unter dem AR Protokoll keine stabile Induktion der Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten stattfindet. Eine Zugabe von FBS zum Mangelmedium führt nicht zu einer Reduktion der Standardabweichung und die Kombination mehrerer Stimuli erhöht nicht die Zunahme der Zellfläche. Aus diesem Grund muss ein weiteres Stimulationsprotokoll getestet werden.

Durch Verkürzung der Zeit in Kultur, sowie eine Anpassung der Medienzusammensetzung können stärkere hypertrophe Effekte in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Stimulation mit PE und ET-1 erreicht werden

Es wurde ein weiteres (PM) Protokoll getestet, welches in der AG Prof. P. Most entwickelt wurde (Abbildung 8). Da dieses sich sowohl in Zeitrahmen als auch in Medienzusammensetzung vom AR Protokoll unterscheidet, habe ich ein Protokoll (ARK) eingeführt, das den Ablauf des PM Protokolls verwendet, jedoch die Medien des AR Protokolls. Ich habe diese Protokolle anhand der höchsten und niedrigsten Konzentration der besten Stimuli (ET-1, PE) aus dem vorherigen Versuch verglichen. Wie in Abbildung 14 A und D zu erkennen, sind bereits 24h nach Stimulation mit PE oder ET-1

Unterschiede zwischen den Protokollen erkennbar. Über das PM-Protokoll können signifikante Änderungen der Zellfläche bereits mit einer relativ kleinen Zahl biologischer Replikate (N=6) unter PE nachgewiesen werden. Unter dem AR-Protokoll ist dies nicht der Fall. Das ARK-Protokoll konnte eine signifikante Änderung nach Stimulation mit 1 μ M ET-1 induzieren. Nach 48 h Stimulation (14 B und E) können unter dem PM-Protokoll sowohl mit PE als auch mit ET-1 signifikante Vergrößerungen der Zellfläche erreicht werden. Weder das ARK noch das AR Protokoll erreichen signifikante Vergrößerungen, allerdings sind unter dem ARK Protokoll Tendenzen in diese Richtung erkennbar.

Während der Analyse hat sich gezeigt, dass sich die Anzahl der analysierbaren Zellen abhängig vom Protokoll unterscheidet (Abbildung 14 C und F). Während die Zellzahl unter dem PM Protokoll konstant bleibt, kommt es unter dem AR Protokoll zu einer Abnahme der Zellzahl über die Zeit, außer während der Stimulation mit FBS. Obwohl sich die Protokolle ARK und AR nur hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs unterscheiden, fällt die Zellzahl unter dem ARK-Protokoll systematisch stärker als unter dem AR-Protokoll. Dies hatte den Ausschluss mehrerer Replikate des ARK Protokolls zur Folge, da die zuvor definierte Mindestanzahl von 30 Zellen/well unterschritten wurde. Unter dem PM Protokoll ist kein Schwund der Zellzahl zu beobachten.

Somit habe ich gezeigt, dass das PM Protokoll eine robuste Hypertrophie in Rattenkardiomyozyten induziert. Entsprechend finden im Folgenden alle Versuche unter dem PM Protokoll statt.

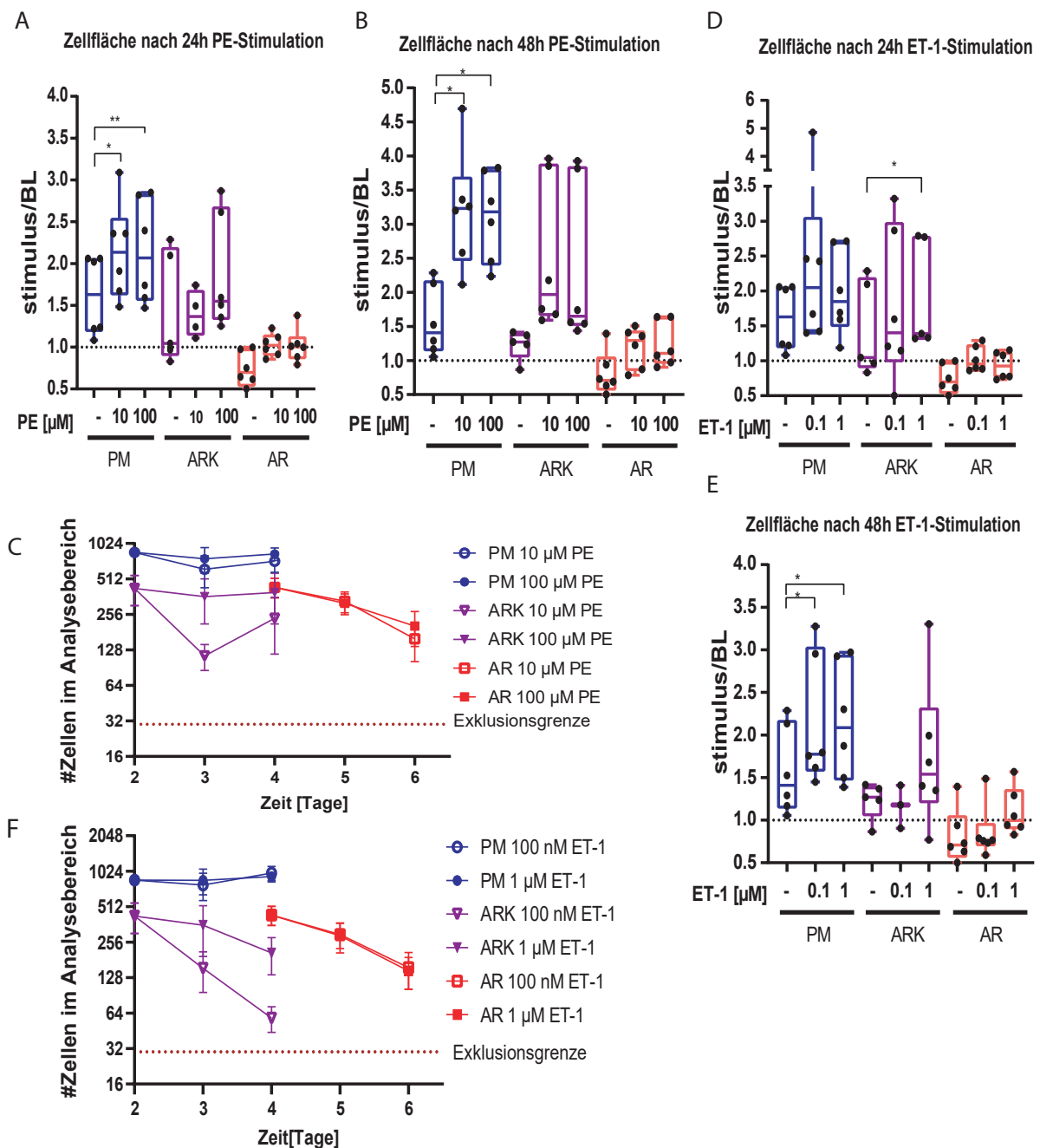


Abbildung 14: **Vergleich verschiedener Stimulationsprotokolle für die Zellflächenmessung.** Gemessen wurde die Veränderung der Zellfläche nach Stimulation mit PE (A,B) und ET-1 (D,E) unter den in Abbildung 8 beschriebenen Protokollen AR, PM und ARK, sowie die Anzahl der identifizierten Kardiomyozyten im Analysebereich 24h nach Stimulation unter PE (C) und ET-1 (F), abgebildet sind Mittelwert und SEM. N=4-6 biologische Replikate. Signifikanz via ANOVA + post-hoc Sidak Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$

3.2 Virusproduktion AAV6

3.2.1 Untersuchung von HPLC aufgereinigten AAV6 hinsichtlich der Transduktionseffizienz

Für die Transduktion benötigten wir große Mengen an Virus, um ausreichend Zellen für die Genexpressionsstudien zur Verfügung zu haben. Eine hohe Konzentration war dabei ebenfalls entscheidend, da der Zellflächenversuch in Volumina von 100 µl ausgesetzt wurde. Geringe Konzentrationen bedeuten somit immer, dass ein großes Volumen Viruspuffer (Iodixanol oder Elutionspuffer) auf die Zellen gegeben werden müsste, was wiederum die Nährstoffkonzentration im Medium negativ beeinflussen könnte.

Wie in Tabelle 33 dargestellt, konnten via Aufreinigung über Iodixanolgradienten nur geringe Mengen Virus aus dem HEK-Zellpellet isoliert werden. Daher habe ich in einem weiteren Ansatz in Kooperation mit der AG Prof. P. Most Viruspartikel via HPLC aufgereinigt. Die Viruspartikel wurden hierfür aus den zellfreien Überständen isoliert um die Präzipitationen in der Viruslösung zu vermeiden. Zudem habe ich, die Ausgangsmenge auf $1 \cdot 10^{13}$ vg (DNase geschützte Virusgenome) normiert, anstatt auf das Volumen des Überstandes. Dies gewährleistet eine optimierte Auslastung der Säule für die HPLC.

Tabelle 33: **Ausbeute nach Virusaufreinigung:** Verglichen wurde die Ausbeute in vg (DNase geschützte Virusgenome) nach Aufreinigung mittels Iodixanolgradient (aus HEK-Zellpellet) mit der Aufreinigung via HPLC (aus Überstand) 48-72 h nach Transfektion

Konstrukt	Methode	Ausgangsmaterial	Konzentration * 10^{11} vg/ml	Ausbeute * 10^{11} vg
MLC260-mCherry-NLS	Iodixanol	15	0,028	0,085
MLC260-Parvalbumin-NLS	Iodixanol	90	0,499	0,998
MLC260-mCherry-NLS	HPLC	45	4,0	6,0
MLC260-mCherry-NLS	HPLC	60	3,5	36,3
MLC260-Parvalbumin-NLS	HPLC	$1 \cdot 10^{13}$ vg	1,0	5,0
MLC260-CaMBP4-mCherry	HPLC	$1 \cdot 10^{13}$ vg	1,9	3,8

3.3 Transduktion von NRVCMCs durch HPLC- aufgereinigten AAV6

Als nächsten Schritt haben wir die Transduktionseffizienz der Vektoren für jedes der Konstrukte unter dem MLC-Promoter mCherry, CaMBP4 und Parvalbumin (Abbildung

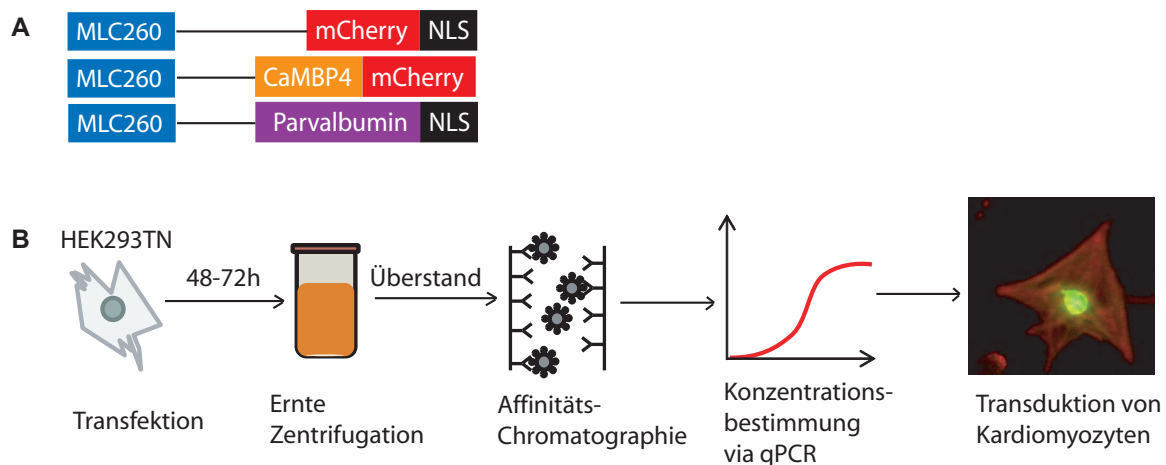


Abbildung 15: **Produktion der Viruskonstrukte.** A) scAAV6 Konstrukte unter dem MLC260 Promoter. B) Produktion der Viruskonstrukte in HEK293TN Zellen und anschließende Affinitätschromatografie. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung via qPCR und die Transduktion in neonatale Rattenkardiomyozyten. C) Expression und Färbung der Konstrukte in neonatalen Rattenkardiomyozyten. D) Titration von AAV6 MLC260-mCerry E) Titration von AAV6 MLC260-Parvalbumin F) Titration von AAV6 MLC260-CaMBP4-mCerry.

15 A) einzeln bestimmt. Alle Konstrukte wurden via HPLC aufgereinigt (Abbildung 15 B). Wie in Abbildung 16 A dargestellt, werden die Konstrukte in neonatalen Rattenkardiomyozyten exprimiert und lokalisieren in den Zellkern. Des Weiteren wurde zu jedem Konstrukt eine untransduzierte Kontrolle mitgeführt, die ebenfalls auf mCherry bzw Parvalbumin gefärbt wurde. Getestet wurde ein Konzentrationsbereich von 10^0 - 10^5 vg/Zelle. Am Tag 4 nach Isolation wurde die Transduktionseffizienz bestimmt (Abbildung 16 B-D). Die maximale durchschnittliche Transduktionseffizienz lag dabei für mCherry bei 77 % bei einer Dosis von $5 \cdot 10^4$ vg/Zelle (Abbildung 16 B). Das Parvalbumin-Konstrukt erzielte eine maximale Effizienz von 60,4 % bei $3 \cdot 10^4$ vg/Zelle (Abbildung 16 C). Mit CaMBP4 wurden im Schnitt maximal 62,2 % aller Zellen bei einem Einsatz von $3 \cdot 10^4$ vg/Zelle (Abbildung 16 D) transduziert. In der untransduzierten Negativkontrolle wurde jeweils nur ein geringer Teil der Zellen fälschlicher Weise als transduziert identifiziert (mCherry: 2,8 %, Parvalbumin: 4,6 %, CaMBP4: 0,7 %, Abbildung 16 B-D).

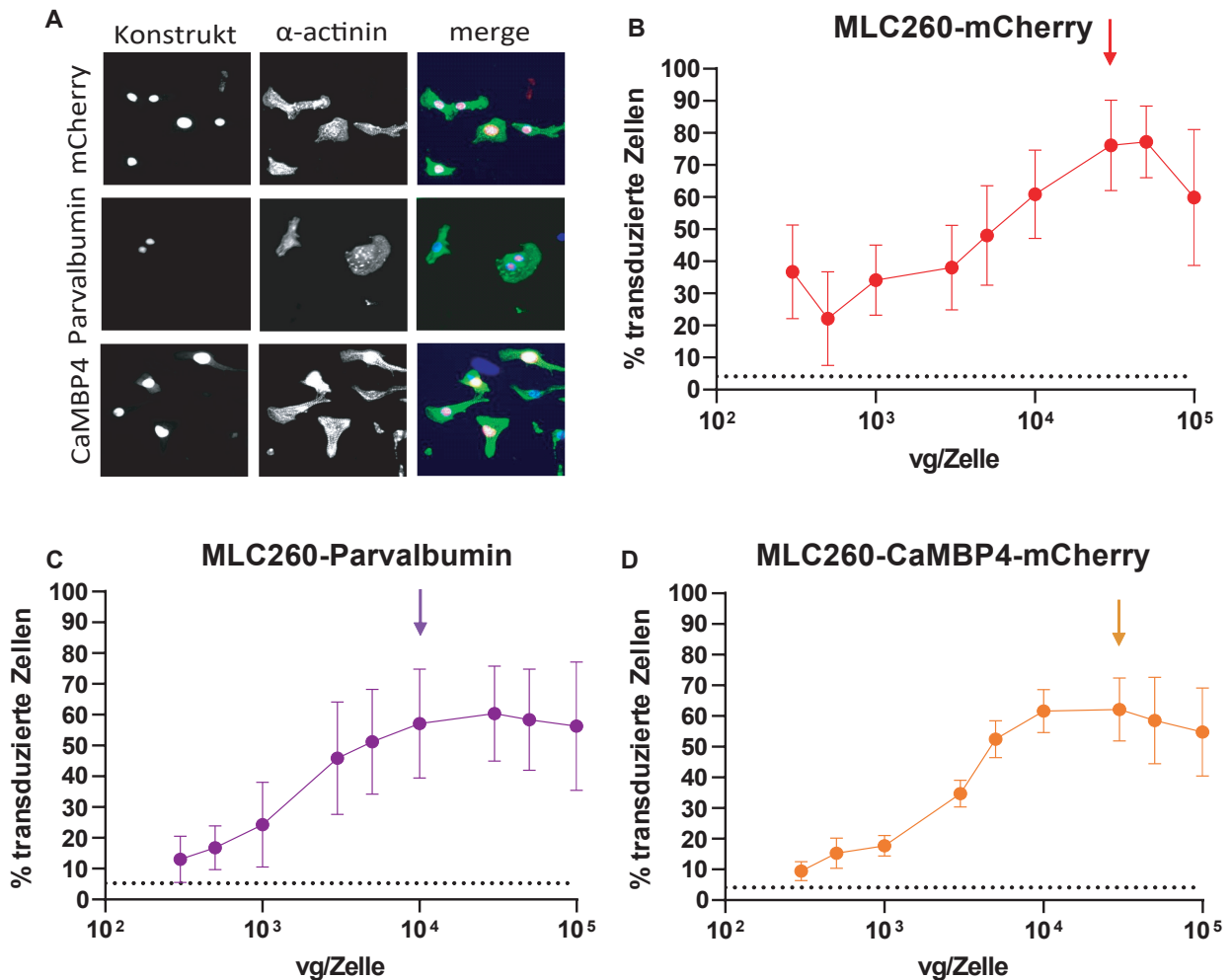


Abbildung 16: **Titration der HPLC aufgereinigten scAAV6 zeigt Transduzierbarkeit der Kardiomyozyten und Spezifität der Antikörperfärbung.** A) Expression und Färbung der Konstrukte in neonatalen Rattenkardiomyozyten an Zellen zum Zeitpunkt BL (48h nach Isolation). Gemessen wird jeweils das anti-RFP (für CaMBPr-mCherry und mCherry) oder das anti-Parvalbumin Fluoreszenzsignal. Titration von B) AAV6 MLC260-mCherry (N=2-5) C) AAV6 MLC260-Parvalbumin (N=3-4) und D) AAV6 MLC260-CaMBP4-mCherry (N=4). Dargestellt sind jeweils Mittelwert und SEM. Der Anteil der antikörpergefärbten, untransduzierten Zellen über dem Threshold des Fluoreszenzsignals werden im jeweiligen Graphen durch die gestrichelte Linie repräsentiert. Die ausgewählte MOI für die Durchführung des Zellflächenversuches mit Pfeil markiert.

3.4 Die Inhibition der nukleären CaM-Signale reduziert die PE- induzierte Hypertrophie in NRVCM

Ich habe untersucht ob die Interferenz mit den nukleären Ca²⁺-CaM Signalen die PE oder ET-1 induzierte Hypertrophieantwort in CaMBP4-mCherry und Parvalbumin.nls transduzierten in neonatalen Kardiomyozyten moduliert. Die Färbung zur Messung der Zellfläche erfolgte über anti- α Actin und die transduzierten Zellen wurden jeweils über anti-RFP (mCherry und CaMBP4-mCherry) beziehungsweise anti-Parvalbumin (Parvalbumin) identifiziert (siehe Abbildung 17).

Ich habe zunächst geprüft, ob die Konstrukte (mCherry, CaMBP4-mCherry, Parval-

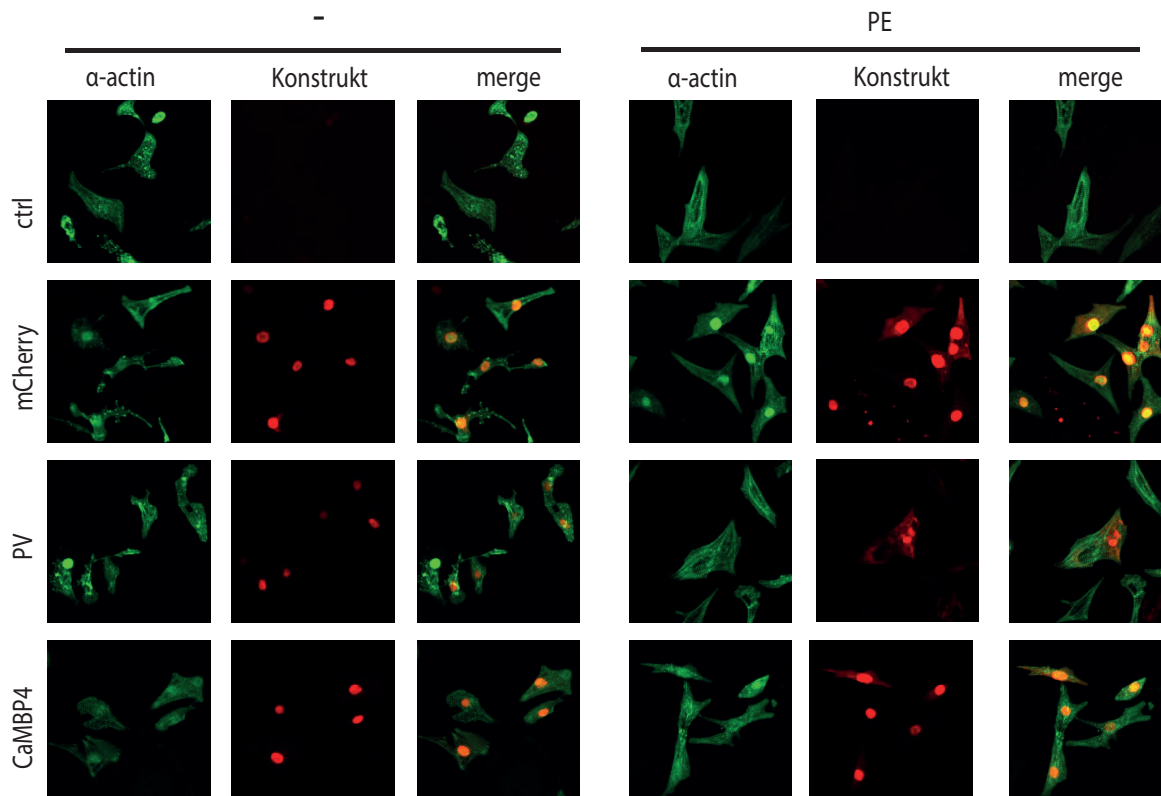


Abbildung 17: **Zellflächenfärbung und Nachweis der erfolgreichen Expression der AAV6-Konstrukte in NRVCMs mit und ohne PE Stimulation.** NRVCM wurden nach Protokoll PM behandelt und transduziert. Die Zellfläche wurde über einen anti- α -Actin Antikörper und Anti-Maus A1594 angefärbt. Die Färbung der Konstrukte erfolgte über einen anti-RFP Antikörper (mCherry & CaMBP4), bzw. über einen anti-Parvalbumin Antikörper. jeweils mit anti-rabbit-A1488.

bumin) in Abwesenheit der hypertrophen Stimuli bereits die Zellfläche beeinflussen. Dazu habe ich die Zellflächen zum Zeitpunkt der Baseline (vor Stimulation im PM Protokoll) (Abbildung 18 A), sowie weitere 48 h später aufgenommen (Abbildung 18 B). Transduzierte Zellen unterscheiden sich in beiden Versuchen nicht signifikant von der

nicht transduzierten Kontrolle.

Stimulation transduzierter NRVCM mit Phenylephrin: Die Stimulation von nicht-transduzierten Zellen mit 100 μ M PE führte zu einer Zunahme der Zellfläche von $134,9 \pm 63,2\%$ (Abbildung 18 C) gegenüber der Baseline. Dieser Effekt unterscheidet sich nicht signifikant mit der Hypertrophieantwort in mCherry⁺ Kardiomyozyten ($151,7 \pm 93,5\%$, Abbildung 18 B). Somit habe ich gezeigt, dass die Transduktion mit AAV6 und die nukleäre Präsenz von mCherry selbst die Hypertrophieantwort nicht signifikant beeinflussen.

Verglichen mit der mCherry-Kontrolle führte die Expression von Parvalbumin-NLS nicht zu einer signifikanten Reduktion der Hypertrophieantwort ($-24,24 \pm 23,2\%$, Abbildung 18 C). Bemerkenswert ist, dass die Expression von CaMBP4-mCherry unter PE-Stimulation mit einem deutlichen Rückgang der Hypertrophieantwort um $-43,4 \pm 13,5\%$ assoziiert ist (Abbildung 18 C).

Stimulation transduzierter NRVCM mit Endothelin-1: Die Stimulation untransduzierter Zellen mit ET-1 führte zu einer signifikanten Zunahme der Zellfläche um $70,0 \pm 32,2\%$ (Abbildung 18 D). In mCherry exprimierenden Kardiomyozyten war dieser Effekt ($+66,4 \pm 66,6\%$) jedoch nicht statistisch signifikant. Mit nukleärem CaMBP4-behandelte Kardiomyozyten reagierten mit einer geringeren Größenzunahme ($14,5 \pm 18,1\%$) verglichen mit der mCherry-Kontrolle, der Effekt war jedoch gering. Die Reduktion der Hypertrophieantwort in Parvalbumin-exprimierenden Zellen war noch geringer ausgeprägt ($-3,7 \pm 16,3\%$) als unter CaMBP4 (Abbildung 18 D).

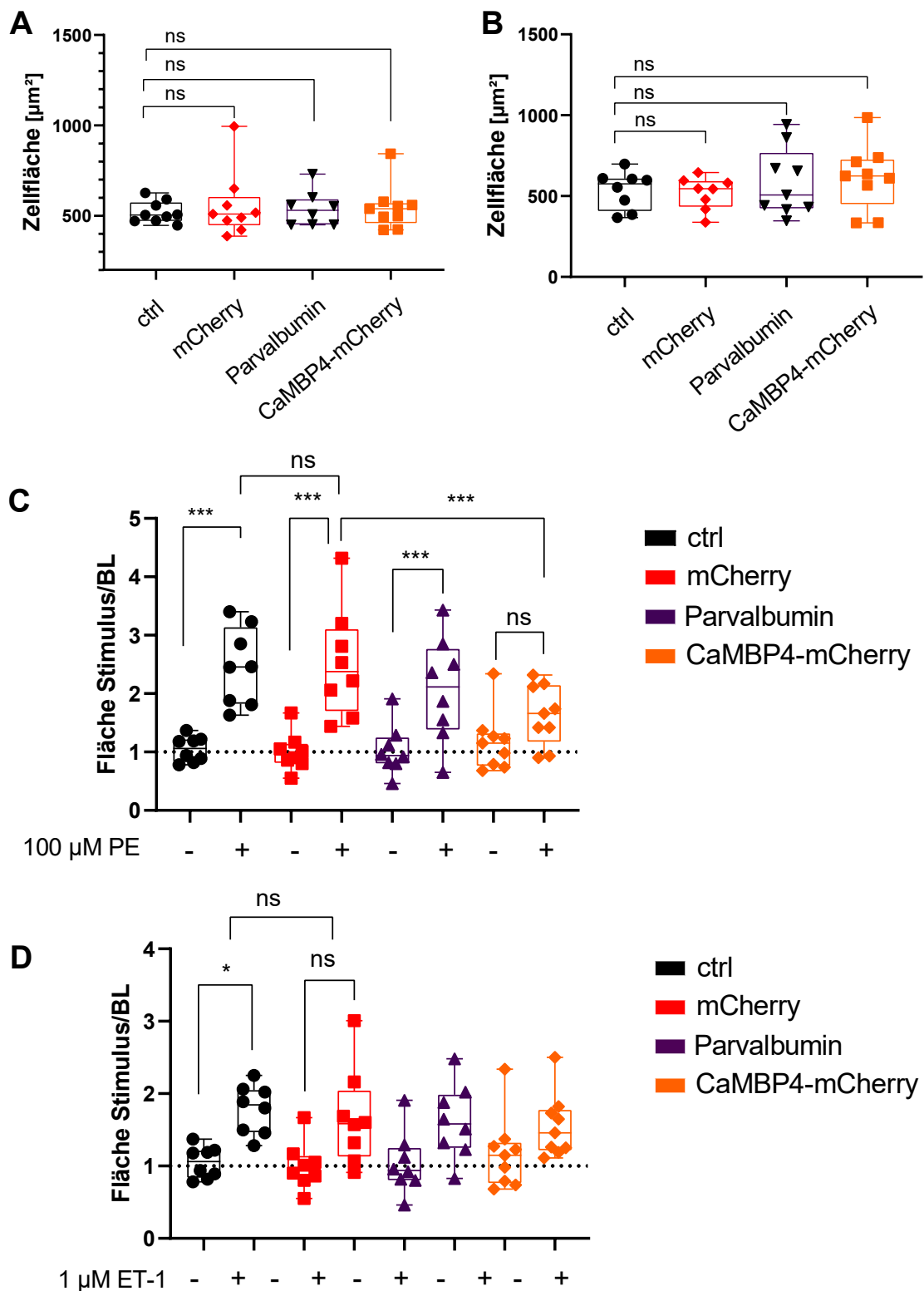


Abbildung 18: **Zellflächenmessung zur Quantifizierung der Hypertrophieantwort in NRVCMs.** Messung der Zellfläche in μm^2 A) Am Tag 2 nach Isolation (Baseline) und B) in Abwesenheit hypertropher Stimulation am Tag 4 nach Isolation (48h nach Baseline). C) Zellfläche relativ zum Zeitpunkt vor Stimulation (Baseline =1) nach 48h Stimulation mit 100 μM PE. D) Zellfläche relativ zum Zeitpunkt vor Stimulation (Baseline =1) nach 48h Stimulation mit 1 μM ET-1. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils mit ANOVA und post-hoc Sidak Test. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

3.5 Anreicherung von mCherry⁺ Kardiomyozyten via FACS zur Analyse der Genexpression

Nachdem ich gezeigt habe, dass die funktionelle Eliminierung von Ca²⁺-calmodulin im Zellkern geeignet ist, um die Hypertrophieantwort nach PE-Stimulation zu unterdrücken (Abbildung 18 C), habe ich die mit diesem Effekt assoziierten Veränderungen in der Genexpression untersucht. Da die Transduktion der Kardiomyozyten mit den AAV6 Konstrukten keine 100 % Effizienz erzielt hat (Abbildung 16 D-F), habe ich getestet, inwieweit die nukleäre Fluoreszenz von mCherry bzw CaMBP4-mCherry ausreichend ist, um die transduzierten NRVCs mittels fluoreszenzassistierter Zellsortierung (FACS) aus der Kultur aufzureinigen.

Zunächst habe ich mit nicht transduzierten Kardiomyozyten das Gating kalibriert (Ab-

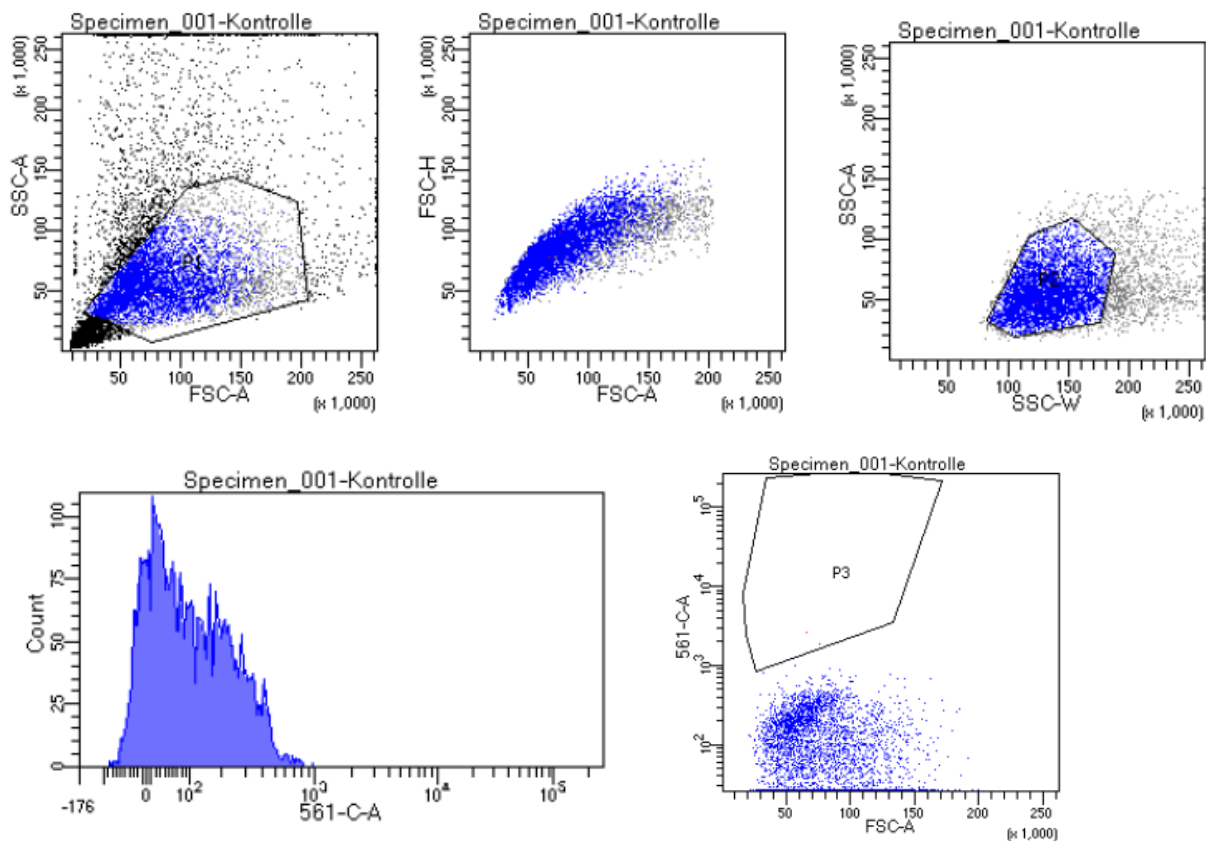


Abbildung 19: **Kalibrierung an nicht transduzierten Kardiomyozyten.** Lebendige Kardiomyozyten werden in Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) ausgewählt. Bei einer Anregungswellenlänge von 561 nm sind keine mCherry-fluoreszenten Zellen detektierbar. Das Fenster wird entsprechend der Negativkontrolle angepasst. Abgebildet sind Scatterplots aus einer repräsentativen Isolation.

bildung 19). Dabei hat sich gezeigt, dass die NRVCs am FACS-Setup ohne Verklumpungen analysiert werden können. Des Weiteren konnten ich zeigen, dass die

Autofluoreszenz der Zellen im mCherry (561-CA) Kanal gering ist. Im nächsten Schritt haben wurden mCherry-transduzierte Zellen sortiert (Abbildung 20). Es zeigt sich eine klar abgegrenzte mCherry-fluoreszente Zellpopulation. Somit war die Anreicherung von mCherry-nls⁺ Kardiomyozyten für die Genexpressionsanalyse möglich. Entsprechend habe ich aus 7 unabhängigen Präparationen von neonatelen Rattenkardiomyozyten aus 7 Würfen zu je 4-10 Tieren (siehe Abbildung 18) Zellen für die Genexpressionsanalyse sortiert (siehe Tabelle 34). Die aus diesen Proben isolierte RNA wurde anschließend in DNA umgeschrieben und in Kooperation mit Dr. V. Benes am EMBL mittels Illumina-Sequenzierung analysiert.

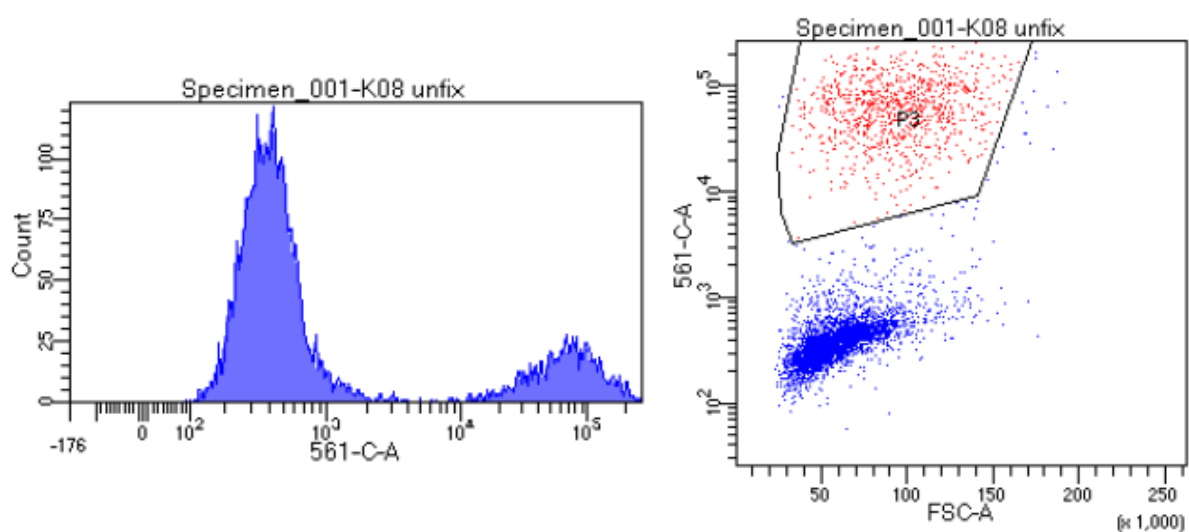


Abbildung 20: **Sortierung transduzierter Kardiomyozyten.** Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) werden analog zur Negativkontrolle gesetzt. Aus der fluoreszenten Population (P3) werden bis zu 3000 Zellen in Lysepuffer sortiert. Abgebildet sind Scatterplots aus einer repräsentativen Isolation.

Tabelle 34: **Anzahl analysierter Zellen für die RNAseq.** Die Zellen wurden direkt in Qiagen RLT Puffer sortiert und bis zur Aufreinigung bei -80 °C gelagert. Die Illumina-Sequenzierung erfolgte in 3 Ansätzen (M02, M06 und M07).

Konstrukt	Behandlung	Anzahl sequenzierter Zellen								
		M02			M06				M07	
Analyse Batch Nr		1	2	3	4	5	6	7	4	7
mCherry	ctrl	>2000	2600	3000		6000	6000	3570	3000	
	PE	>2000	1200	2060	3000	6000	3500	2860		
CaMBP4-mCherry	ctrl	>2000	-	1800	3000	6000	4300			2050
	PE	>2000	500	2900	2750	6000	2400	3600		

3.6 Genexpressionsanalyse

Effekte von Batch und Behandlung auf das Genexpressionsprofil: Ich habe untersucht, inwiefern die hypertrophie-assoziierten Genprogramme durch die Reduktion der katecholamin-induziertem Hypertrophie durch die CaMBP4-medierte Interferenz mit den nukleären Ca^{2+} -Calmodulin Signalwegen beeinflusst werden. Dazu habe ich die Transkriptompe PE-stimulierter und nicht-stimulierter Kardiomyozyten nach Transduktion mit CaMBP4 oder dem mCherry-Kontrollkonstrukt verglichen. Um qualitativ zu untersuchen, inwiefern die Stimulation von NRVCMs mit Phenylephrin zu einer Verschiebung des Genexpressionsprofils führt, haben wir eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) auf die gepoolten Batches durchgeführt (Abbildung 21). In 3 Dimensionen werden dabei 72 % der Varianz dargestellt. Dabei fällt auf, dass die Behandlung mit 100 μM PE eine klare Verschiebung des Genexpressionsprofils von mCherry⁺ Zellen entlang der ersten Hauptkomponente (38 % Varianz) induziert. Interessanter Weise zeigen CaMBP4⁺ Kardiomyozyten, die wie zuvor beschrieben vor PE-induzierter Größenzunahme geschützt sind, eine zur mCherry-Kontrolle vergleichbare Verschiebung ihres Genexpressionsprofils.

Wie in Tabelle 34 beschrieben, wurden die Proben in 3 Ansätzen (Batches) sequen-

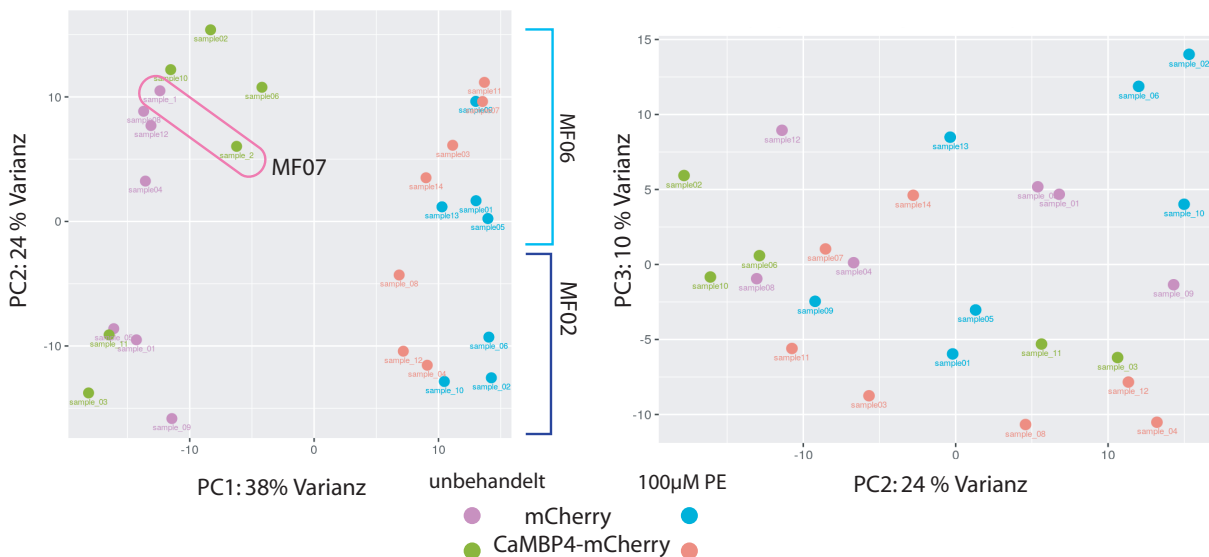


Abbildung 21: Hauptkomponentenanalyse nach RNAseq. Die RNAseq Daten aus den drei Batches (MF02, MF06 & MF07) wurden gepoolt und mittels Hauptkomponentenanalyse in drei Dimensionen visuell zugänglich gemacht. Die Gruppen mCherry und CaMBP4-mCherry, jeweils unbehandelt sowie nach Stimulation mit 100 μM PE wurden farblich markiert. N=6-7 unabhängige biologische Replikate

ziert. Es zeigt sich ein Batch-Effekt entlang der 2. Hauptkomponente (24% Varianz), da MF02 und MF06 wie in (Abbildung 21) markiert entlang der PC2 clustern. Zwischen MF06 und MF02 ist kein starker Batch Effekt erkennbar. Innerhalb der Batches bilden

mCherry- und CaMBP4- exprimierende NRCMs ebenfalls Cluster (siehe Farbkodierung in Abbildung 21) entsprechend ihrer Behandlung. Da die Proben aus den gleichen Isolationen stammen, anhand derer wir auch den hypertrophen Phänotyp (Abbildung 18) untersucht haben, gehe ich davon aus, dass die Phänotyp treibenden Gene in allen Batches differentiell exprimiert sein müssen. Daher habe ich mich entschieden, für die nachfolgenden Analysen keine Batchkorrektur vorzunehmen.

PE-induzierte Verschiebung der transkriptionellen Aktivität in mCherry⁺ NRVCN:

Ich habe untersucht inwieweit sich die Genexpression durch 48h PE-Stimulation in mCherry- transduzierten NRVCN unter hypertropher Stimulation verändert. Ich habe 1986 differentiell exprimierte Gene in der mCherry Kontrolle identifiziert (Abbildung 22 A), die auf PE Stimulation reagieren. Die am stärksten regulierten Gene sind in Abbildung 22 B dargestellt. Des Weiteren habe ich eine KEGG Signalweganalyse (Abbildung 22 C) durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass Gene die in den Fettsäureabbau involviert sind, unter PE-Stimulation vermindert exprimiert werden, während Gene die das Aktin-Zytoskelett und die fokale Adhäsion kontrollieren verstärkt exprimiert werden.

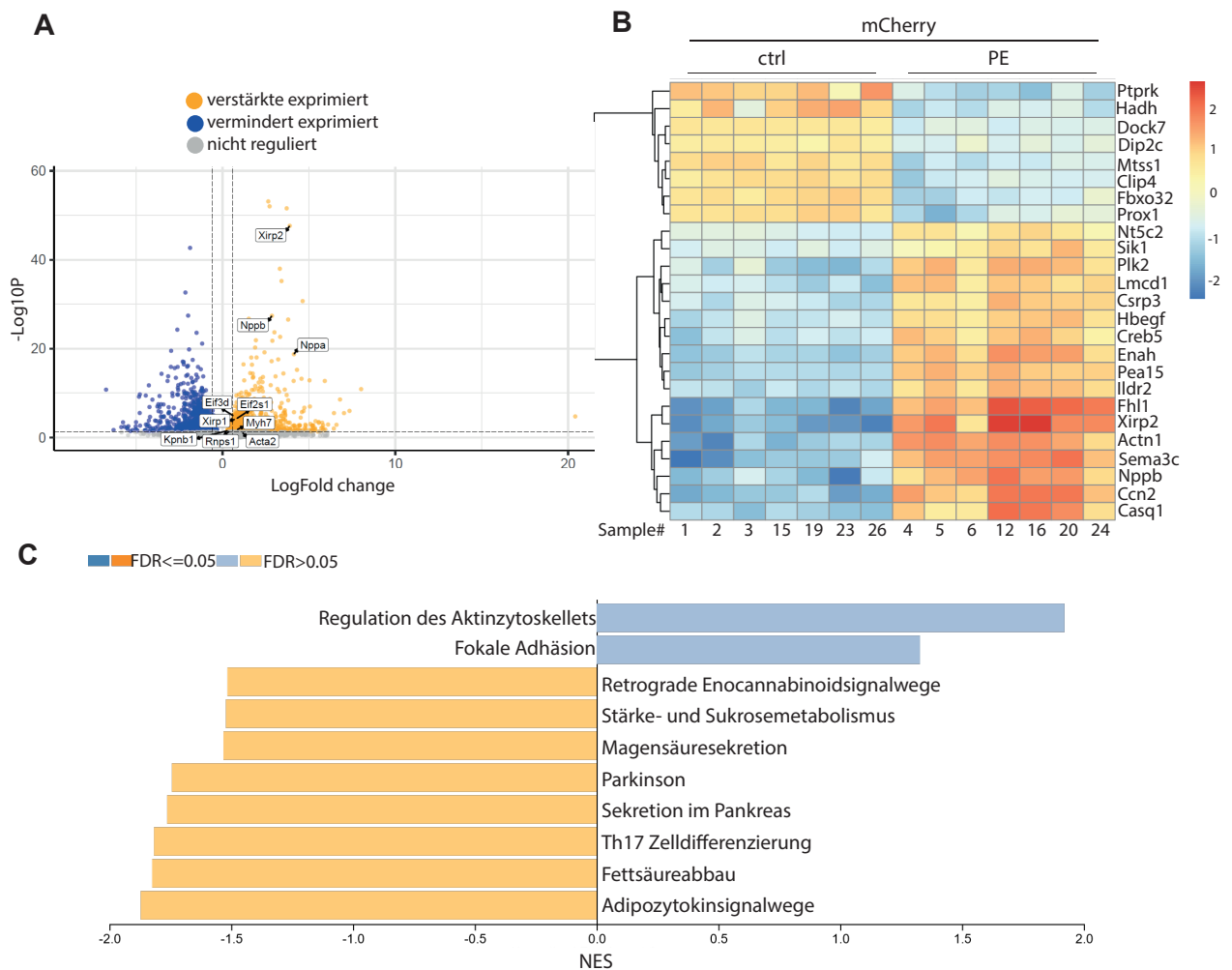


Abbildung 22: **Änderung der Genexpression in mCherry⁺ NRVCM.** A) Signifikant verstärkt (orange), vermindert (blau) exprimierte und nicht regulierte Gene (grau) in mCherry-exprimierenden Zellen. Statistik mit Wald-Test und Benjamini-Hochberg Korrektur. B) Hierarchisches Clustering von 25 stark exprimierenden Genen in unstimulierten (ctrl) gegenüber PE stimulierten mCherry⁺ NRVCM. C) KEGG Signalweganalyse von unter PE-Stimulation signifikant ($p_{adj} < 0,05$) regulierten mCherry-transduzierten Kardiomyozyten. N=7 unabhängige biologische Replikate.

Untersuchung etablierter Hypertrophiemarker in CaMBP4-behandelten NRVCMs:

Ich habe untersucht, wie sich die nukleäre Expression von CaMBP4 auf die PE-medierte Expression eines Hypertrophiemarkerpanels aus ANF (Nppa)[Kolodziejczyk et al., 1999], BNP (Nppb), β -MHC (Myh7) [Nakamura und Sadoshima, 2018] und α -Aktin (Acta2)[Sadoshima und Izumo, 1993], sowie bekannter MEF2 Zielgene wie Srpk3 [Nakagawa et al., 2005], Xirp1 und Xirp2 auswirkt.

Wie erwartet reagieren mCherry-transduzierte NRVCMs mit einer signifikant verstärkten Expression von ANF ($+1657,9 \pm 795,5\%$), BNP ($+628,0 \pm 126,4\%$) und β -MHC ($+77,7 \pm 15,8\%$) auf die PE-Stimulation (Abbildung 23 A-C). Überraschend zeigte sich, dass

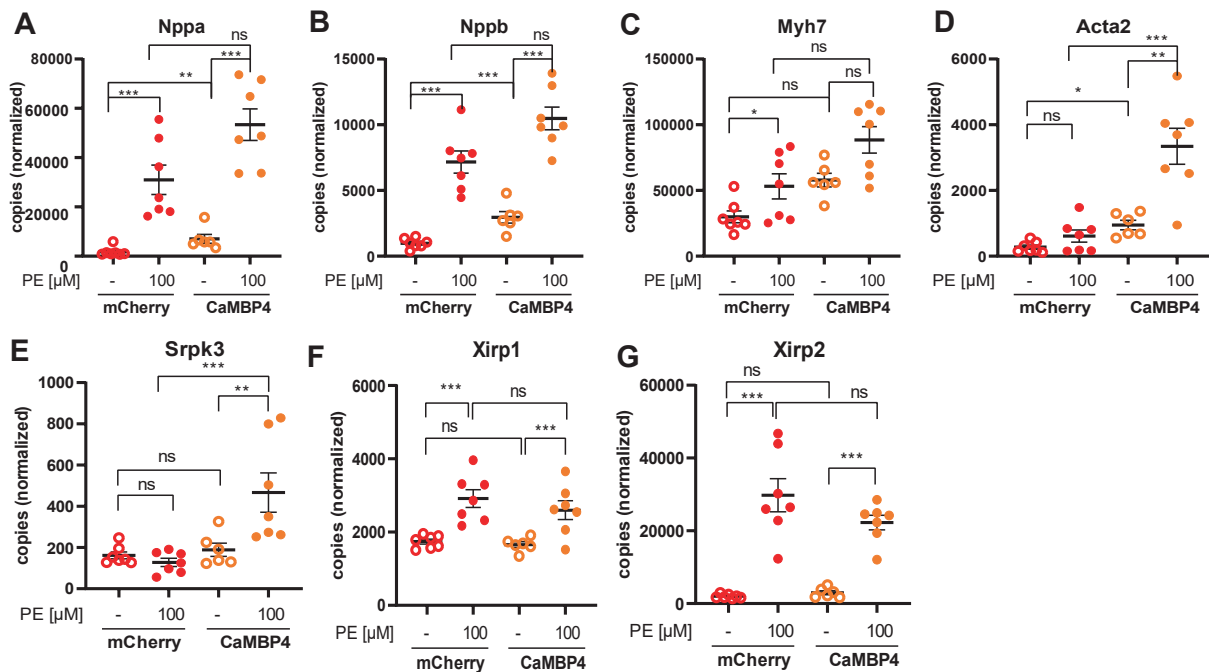


Abbildung 23: **Entkopplung von Phänotyp und Genexpressionsprofil im CaMBP4-behandelten NRVC unter PE Stimulation.** A-D Getestet wurde die Expression der Hypertrophiemarker ANF (Nppa, A), BNP (Nppb, B), Myh7 (C) und Acta2 (D) in mCherry und CaMBP4 exprimierenden Zellen unbehandelt oder nach 48h Behandlung mit PE. E-F Analyse der MEF2 abhängigen Gene Srpk3(E), Xirp1 (F) und Xirp2 (G). N=6-7 unabhängige biologische Replikate. Statistik mit Wald-Test und Benjamini-Hochberg Korrektur. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$

dieser PE-induzierte Anstieg in der Expression der Hypertrophiemarker nicht durch die Expression von CaMBP4 unterdrückt wurde (Abbildung 23 A-D), obwohl die Expression von CaMBP4 mit einer Reduktion des hypertrophen Phänotyps auf Ebene der Zellfläche assoziiert ist. Die Expressionslevel von Myh7 und Acta2 (Abbildung 23 C,D) sind zudem bereits in Abwesenheit von PE signifikant in CaMBP4⁺ Zellen gegenüber der mCherry-Kontrolle erhöht. Für Acta2 wurde dieser Effekt durch PE zudem verstärkt (+444,3±235,8 % gegenüber der PE-stimulierten mCherry-Kontrolle).

Untersuchung von MEF2-Zielgenen in CaMBP4-behandelten NRVCs: Der Transkriptionsfaktor MEF2 ist in die Induktion hypertropher Genprogramme involviert und wird durch den CaMKII-medierte Export der HDACs aktiviert [Dewenter et al., 2017]. Da in Neuronen gezeigt wurde, dass nukleäres CaMBP4 eine nukleäre Akkumulation von HDACs induziert [Schlumm et al., 2013], habe ich erwartet, dass die MEF2-abhängige Genexpression durch die Expression von CaMBP4 reduziert wird. Aus diesem Grund habe ich die Expression der MEF2-Zielgene Srpk3 [Nakagawa et al., 2005] (Abbildung 23 E), Xirp1 (Abbildung 23 F) und Xirp2 [McCalmon et al., 2010] (Abbildung 23 G) in CaMBP4- und mCherry-transduzierten Zellen unter PE Stimulation verglichen.

Srpk3 ist, ähnlich zu Acta2, in PE stimulierten CaMBP4⁺ Zellen verstärkt exprimiert im Vergleich zur mCherry-Kontrolle (+265,7 %). Der PE-induzierte Anstieg von Xirp1 war in CaMBP4 behandelten Zellen ($56,6 \pm 41,2$ %) gegenüber der mCherry-Kontrolle ($67,6 \pm 37,0$ %) unverändert. Xirp2 verhielt sich diesbezüglich ähnlich, mit einem Anstieg von $1385,8 \pm 599,3\%$ in der mCherry- Kontrolle, beziehungsweise von $646,4 \pm 177,0\%$ in CaMBP4-behandelten NRVCN. Dies deutet darauf hin, dass CaMBP4 die Expression von MEF2-Zielgenen unter hypertropher Stimulation nicht beeinflusst.

Analyse von Veränderungen der genomweiten Genexpression durch CaMBP4 Behandlung ohne Hypertrophieinduktion: Nachdem sich gezeigt hat, dass CaMBP4 die Hypertrophieantwort nicht über den Mef2 Signalweg reduziert, habe ich eine unvoreingenommene Analyse der Genexpressionsdaten durchgeführt. Zunächst habe ich evaluiert, inwiefern CaMBP4 in unstimulierten Kardiomyozyten die Genexpression verändert. Es hat sich gezeigt, dass nur wenige Gene signifikant differentiell exprimiert werden. Es hat sich gezeigt, dass die meisten dieser differentiell exprimierten Gene verstärkt exprimiert werden (Abbildung 24 A). Die 25 am stärksten vermindert (Abbildung 24 B) beziehungsweise verstärkt (Abbildung 24 C) exprimierten Gene habe ich jeweils in einer Heatmap dargestellt. Zu den Top25 verstärkt exprimierten Genen zählen hierbei die zuvor beobachteten Hypertrophiemarker ANF, BNP und Acta2. Eine KEGG-Signalweganalyse hat dabei gezeigt, dass differentiell exprimierte Gene im Bereich der Glycandegradation, dem Metabolismus, dem PI3K-Akt Signalweg sowie der positiven Regulation des Aktinzytoskeletts clustern (Abbildung 24 D.)

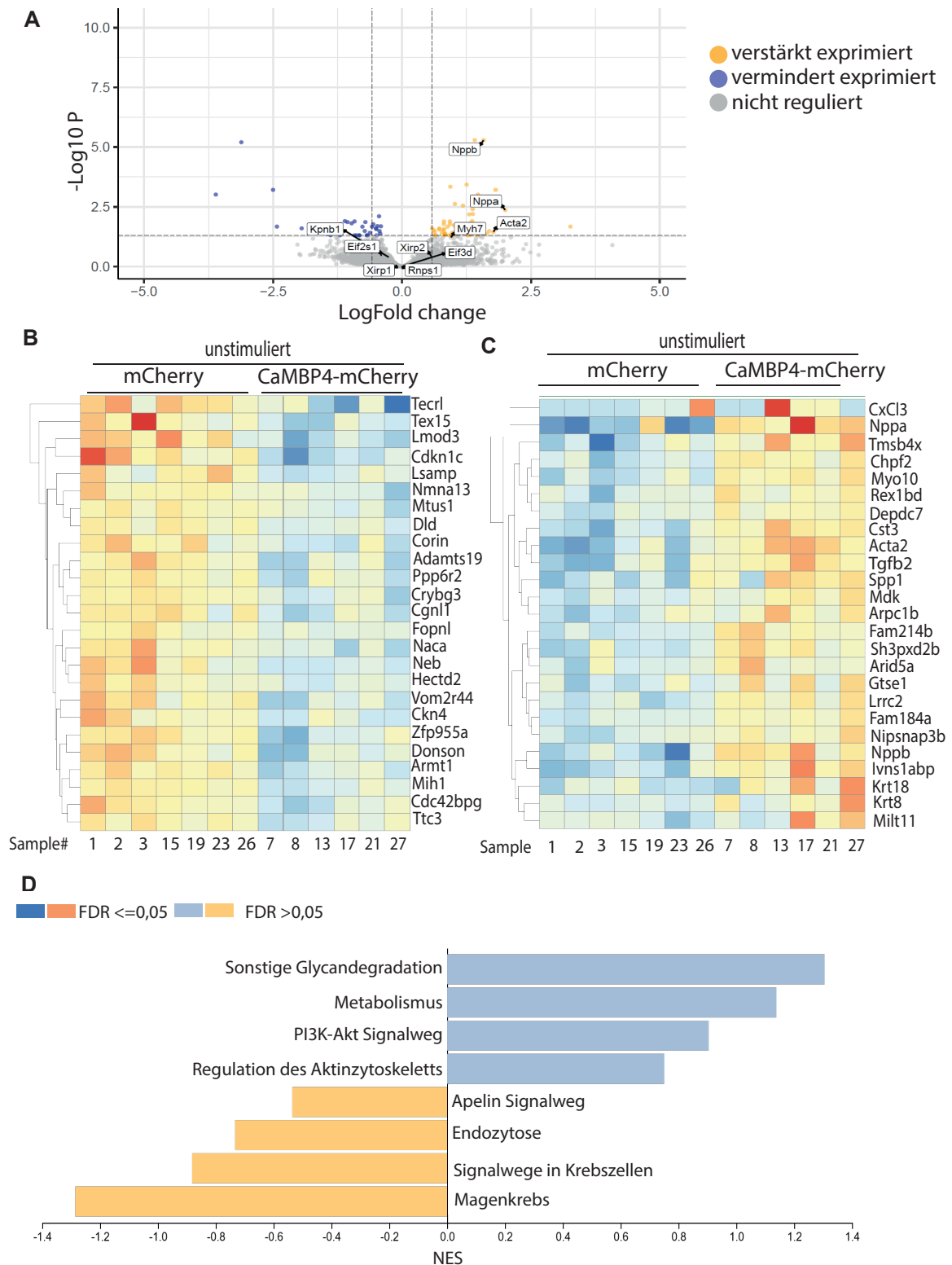


Abbildung 24: **Effekt von CaMBP4 in Abwesenheit von PE.** A) Signifikant verstärkt (orange), vermindert (blau) exprimierte und nicht regulierte Gene (grau) in CaMBP4⁺ Zellen verglichen mit der unstimulierten mCherry-Kontrolle. Statistik mit Wald-Test und Benjamini-Hochberg Korrektur. Hierarchisches Clustering der Top 25 vermindert (B) bzw. verstärkt (C) exprimierten Gene in CaMBP4-behandelten NRVCN in Abwesenheit von PE D) KEGG Signalweganalyse von signifikant ($p_{adj} < 0,05$) regulierten Genen in unbehandelten CaMBP4 exprimierenden Zellen verglichen mit der mCherry-Kontrolle. N=6-7 unabhängige biologische Replikate. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$

Analyse der PE-induzierten Verschiebung des Transkriptoms in CaMBP4-

exprimierenden NRVCMs: Zunächst habe ich untersucht, welche PE- induzierten Veränderungen der Genexpression in CaMBP4 exprimierenden NRVCM auftreten. Ich habe 1047 Gene gefunden, die differentiell in PE stimulierten Zellen reguliert werden (Abbildung 25 A). Ich habe jeweils die im Vergleich zu unstimulierten CaMBP4-exprimierenden Zellen 25 verstärkt (Abbildung 25 B) und vermindert (Abbildung 25 C) exprimierten Gene hierarchisch geclustert. Eine KEGG-Signalweganalyse hat dabei gezeigt, dass die Katecholaminstimulation in CaMBP4 hauptsächlich zu einer Reduktion von Genen induziert die in den Fettsäureabbau involviert sind (Abbildung 25 D).

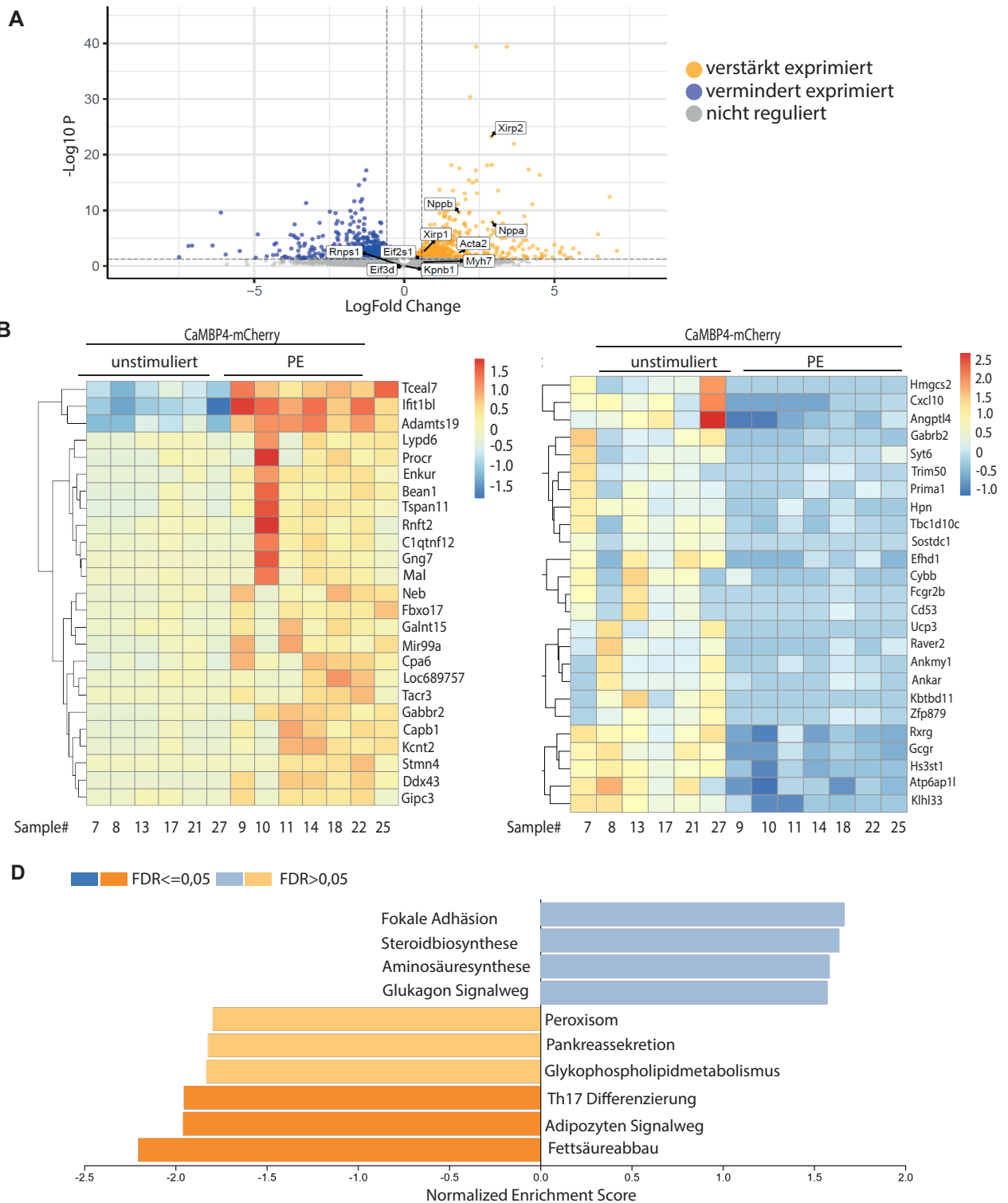


Abbildung 25: **PE-induzierte Veränderungen der Genexpression in CaMBP4⁺ NRVCs.** A) Signifikant verstärkt (orange), vermindert (blau) exprimierte und nicht regulierte Gene (grau) in CaMBP4 exprimierenden Kardiomyozyten nach PE Stimulation. Statistik mit Wald-Test und Benjamini-Hochberg Korrektur. B & C) Hierarchisches Clustering der Top25 verstärkt (B) bzw. vermindert (C) exprimierten Gene in PE stimulierten CaMBP4-exprimierenden NRVCs. D) KEGG Signalweganalyse von signifikant ($p_{adj} < 0,05$) regulierten Genen in PE stimulierten CaMBP4-exprimierenden Zellen verglichen mit unbehandelten CaMBP4⁺ Zellen. N=6-7 unabhängige biologische Replikate.

3.6.1 Analyse von Veränderungen der genomweiten Genexpression durch CaMBP4 Behandlung unter Hypertrophiebedingungen

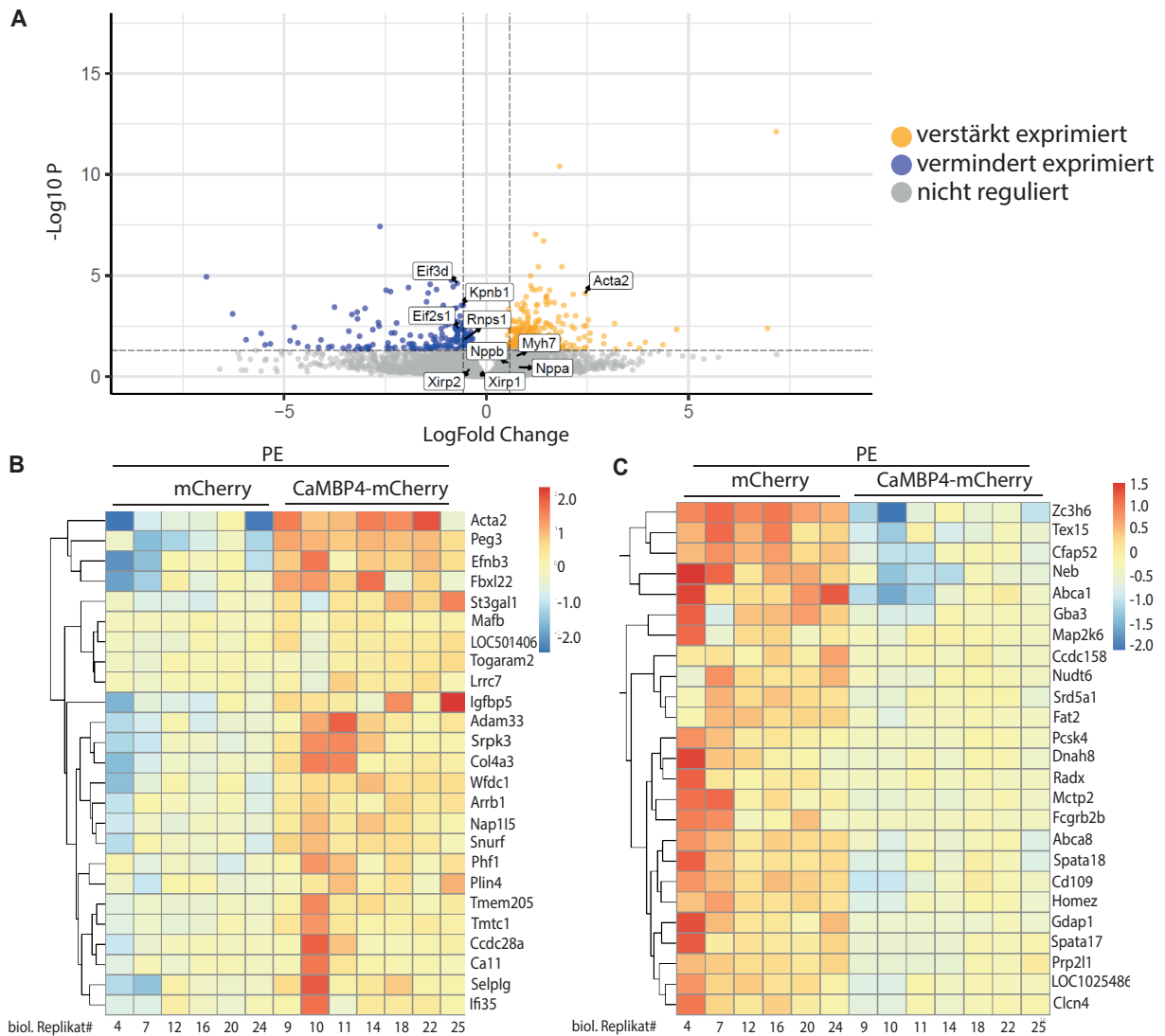


Abbildung 26: Effekt von CaMBP4 unter PE-Stimulation. A) Signifikant verstärkt (orange), vermindert (blau) exprimierte und nicht regulierte Gene (grau) in PE-stimulierten CaMBP4⁺ NRVCN verglichen mit der mCherry Kontrolle. Statistik mit Wald-Test und Benjamini-Hochberg Korrektur. Hierarchisches Clustering der B) Top25 in CaMBP4 verstärkt exprimierte Gene C) Top25 in CaMBP4 vermindert exprimierte Gene. N=6-7 unabhängige biologische Replikate.

Ich habe die 492 in CaMBP4⁺ NRVCN unter Katecholaminstimulation differentiell exprimierte Gene betrachtet (Abbildung 26 A). Die Top25 verstärkt (Abbildung 26 B) beziehungsweise vermindert (Abbildung 26 C) exprimierte Gene habe ich in einer Heatmap dargestellt. Es fällt auf, dass unter den verstärkt exprimierten Genen (Abbildung 26 A) die bereits betrachteten hypertrophieassoziierten Gene Acta2 und Srpk3 auftreten. Peg3, das mit kardialer Hypertrophie assoziiert ist [Cui et al., 2020], ist ebenfalls stark in CaMBP4⁺ NRVCN exprimiert. Das Zinkfingerprotein Zc3h6 [Stelzer et al.,

2016] ist ein besonders stark reprimiertes Transkript PE-stimulierten in CaMBP4⁺ NRVC-M (Abbildung 26 C).

Analyse der Transkriptionsfaktoraktivitäten: Um zu Analysieren welche Transkriptionsfaktoren durch die Blockade der nukleären Ca²⁺ Signalwege in ihrer Aktivität beeinflusst werden, habe ich die Aktivitäten der Transkriptionsfaktoren in CaMBP4-exprimierenden Kardiomyozyten verglichen mit der mCherry-Kontrolle in Abwesenheit (Tabelle 36) und nach 48 h PE Stimulation (Tabelle 37) untersucht, indem die Daten aus der Genexpressionsanalyse auf die DoRothEA-Ressource für Transkriptionsfaktor-Zielgeninteraktion angewendet wurden. Ich habe beobachtet, dass nukleäres CaMBP4 die Aktivität klassischer hypertropher Transkriptionsfaktoren wie Mef2c, Elk-1, Mef2a und GATA4 unter PE Stimulation nicht reduziert sondern verstärkt (Abbildung 27 A). Zudem scheint CaMBP4 die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie Atf3 [Zhou et al., 2011], Klf2 [Li et al., 2021] und Klf4 [Liao et al., 2010] zu reduzieren, die mit einer Protektion vor Hypertrophie assoziiert sind (Abbildung 27 A). Ich habe untersucht, ob sich diese modulierten Transkriptionfaktoraktivitäten mit einer veränderten Expression dieser Transkriptionsfaktoren erklären lassen. In unstimulierten CaMBP4-exprimierenden Zellen ist die Expression von Mef2a leicht reduziert (Tabelle 36), nicht aber unter PE Stimulation (Tabelle 37). Des Weiteren induziert PE einen leichten Anstieg in der Expression von Gata4 in CaMBP4-exprimierenden Zellen, dies unterscheidet sich jedoch nicht signifikant verglichen mit der mCherry-Kontrolle. Die Expression von Atf3 wird ebenfalls in CaMBP4- und mCherry-exprimierenden Zellen unter PE-Stimulation gleichermaßen erhöht. Interessanter Weise ist die Expression von Atf4, ein transkriptioneller Regulator der Stressantwort [Freundt et al., 2018; Harding et al., 2000] in CaMBP4-exprimierenden Zellen verglichen mCherry⁺ Kardiomyozyten erhöht, was die Aktivität von Atf4 in dieser Analyse jedoch nicht beeinflusst. Für einige Transkriptionsfaktoren (Esr2, Pgr, Foxa1, ctcf1, Tfap2a, Nir4a1, Duxbl1-3, Nanog, Zfp750, Prdn14), die in dieser Analyse als CaMBP4-sensitiv vorgeschlagen wurden, lagen die Expressionslevel unterhalb der Nachweisgrenze.

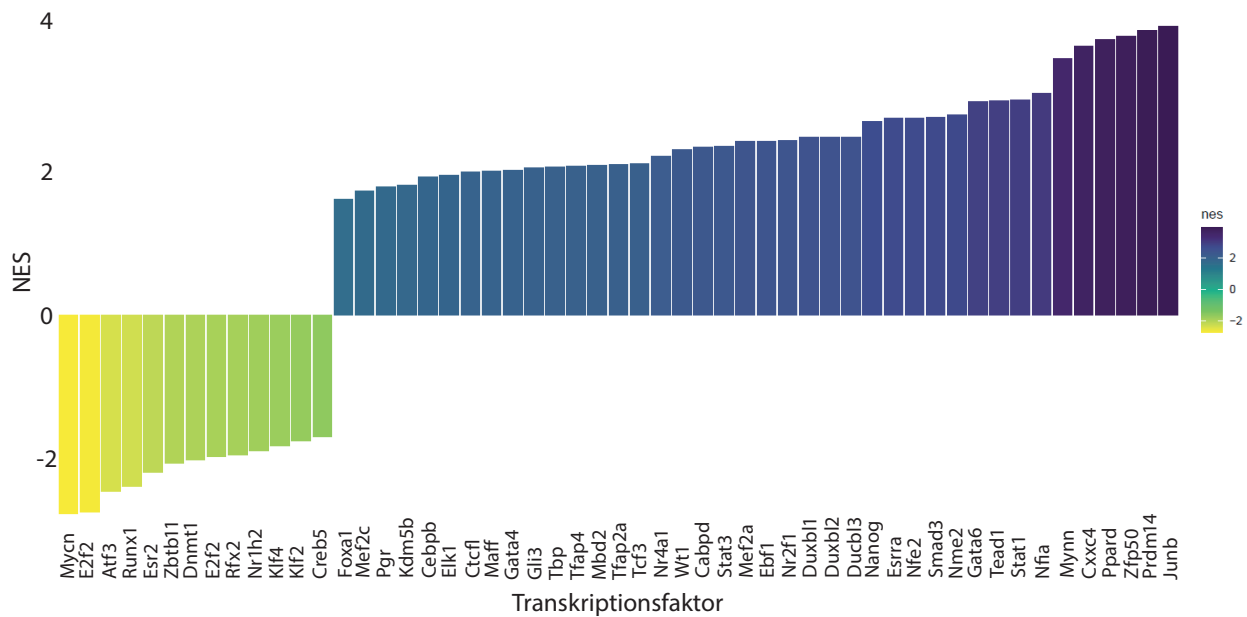


Abbildung 27: **Analyse der Transkriptionsfaktoraktivitäten basierend auf den Daten der Genexpressionsanalyse A)** Ein NES (Normalized Enrichment Score) von <0 zeigt vermindert aktive, ein NES von >2 verstärkt aktive Transkriptionsfaktoren. $N=6-7$ unabhängige biologische Replikate.

Signalwegsanalyse von CaMBP4 behandelten NRVCs führt zur Identifikation von Genen, welche in die Translationsregulation involviert sind : In einem nächsten Schritt habe ich die unter PE-Stimulation in CaMBP4⁺ NRVCm differenziell exprimierten Genen über eine KEGG-Signalweganalyse untersucht (Abbildung 28 A).

Ich habe dabei vier Gene gefunden, die im KEGG Signalweg rno03013 involviert sind, welcher in den Transport von mRNAs aus dem Nukleus sowie die Translation abdeckt. Dabei schützt nukleäres CaMBP4 vor der PE-induzierten Hochregulation der Untereinheiten der eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren Eif3d ($-39,7 \pm 12,5\%$, Abbildung 28 B) und Eif2s1 ($-38,5 \pm 14,0\%$, Abbildung 28 C). Ebenfalls war die Expression von Kpnb1 (Karyopherin β 1, Abbildung 28 D) signifikant reduziert in PE-stimulierten CaMBP4⁺ NRVCm ($-32,6 \pm 8,3\%$) verglichen zur mCherry-Kontrolle. Kpnb1 ist in den nukleären Import von Transkriptionsfaktoren wie ASK1 [Sturchler et al., 2013] und NFAT [Van Der Watt et al., 2016], sowie von ribosomalen Proteinen [Jakel, 1998] involviert. Des Weiteren katalysiert Kpnb1 die Phosphorylierung von Ran-GDP zu Ran-GTP, welches für den nukleären Export via Exportine benötigt wird [Lonhienne et al., 2009; Clarke und Zhang, 2008]. Rnps1 (engl. RNA-binding protein with serine-rich domain 1), kodiert einen Regulator des RNA-splicings [Michelle et al., 2012; Boehm et al., 2018]. Die Expression von Rnps1 war in der mCherry-Kontrolle unter PE Stimulation leicht erhöht ($+33,4 \pm 14,1\%$). Diese Erhöhung wurde in CaMBP4 exprimierten Zellen vollständig supprimiert (Abbildung 28 E).

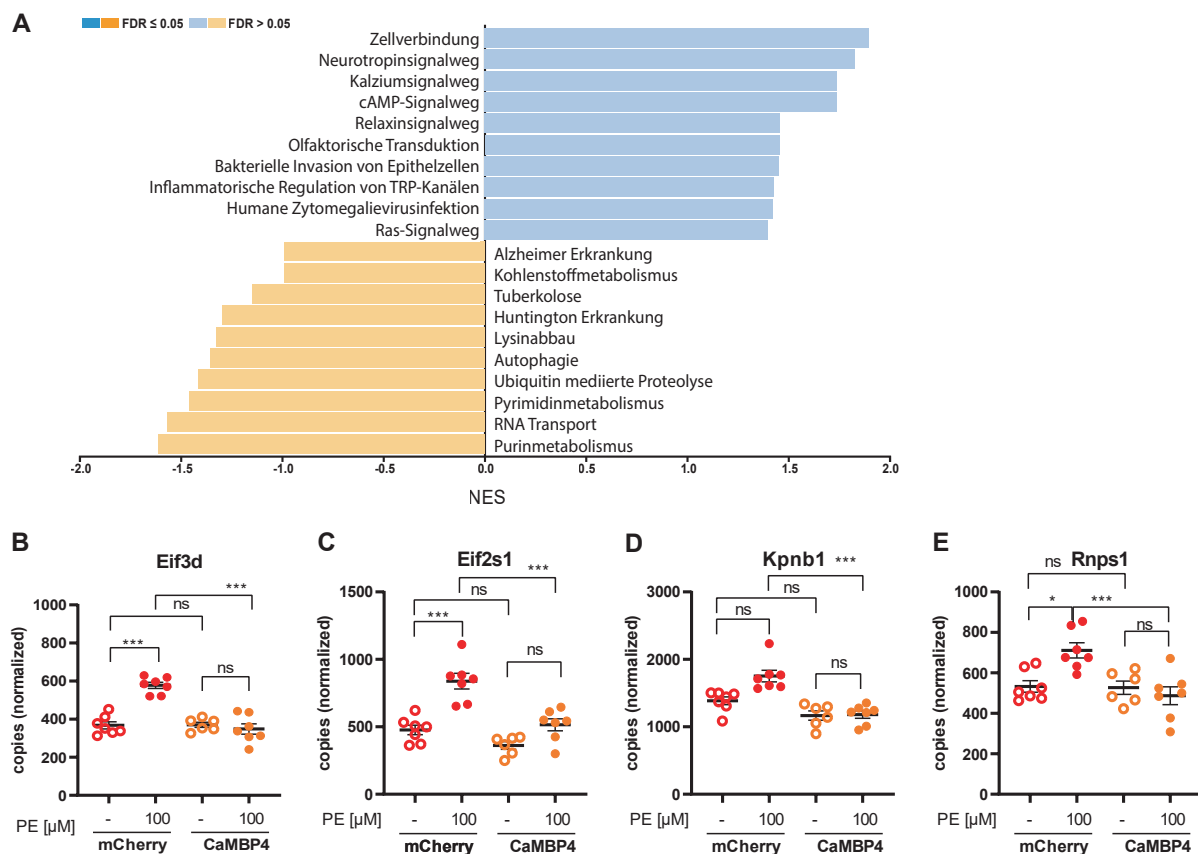


Abbildung 28: **Regulation eines Clusters von translationsrelevanten Genen.** A) Analyse der potentiell durch CaMBP4 unter PE Stimulation modulierten Signalwege via GSEA KEGG. B-E) Expression der in (A) gezeigten Gene im RNA-Transportsignalweg B) Eif3d, C) Eif2s1 D) Kpnb1 und E) Rnps1. N=6-7 unabhängige biologische Replikate. Statistik mit Wald-Test und Benjamini Hochberg-Korrektur. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$

Keines der beschriebenen Gene (Eif3d, Eif2s1, Kpnb1, Rnps1) wird hierbei durch CaMBP4 in Abwesenheit eines hypertrophen Stimulus reguliert.

3.7 Analyse der mRNA Translation in nlsCaMBP4⁺ NRVCM

Da die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nahelegen, dass die PE-induzierte, verstärkte Expression der Translationsinitiationsfaktoren Eif2s1 und Eif3d durch CaMBP4-mCherry unterdrückt wird, habe ich untersucht ob die Translation von mRNA in CaMBP4-exprimierenden Kardiomyozyten messbar beeinflusst ist. Zu diesem Zweck habe ich den Einbau von Puromycin via WesternBlot in vier unabhängigen biologischen Replikaten nach 24h PE Stimulation und in Abwesenheit eines hypertrophen Stimulus evaluiert (repräsentativer WesternBlot in Abbildung 29 A). Es hat sich gezeigt, dass nlsCaMBP4-behandelte Kardiomyozyten vor dem PE-induzierten Anstieg der Transla-

tion geschützt sind, der in der mCherry-Kontrolle beobachtet werden kann (Abbildung 29 B). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die Zellen für diese Analyse nicht sortiert werden konnten und entsprechend auch untransduzierte NRVCM mit in die Analyse eingegangen sind.

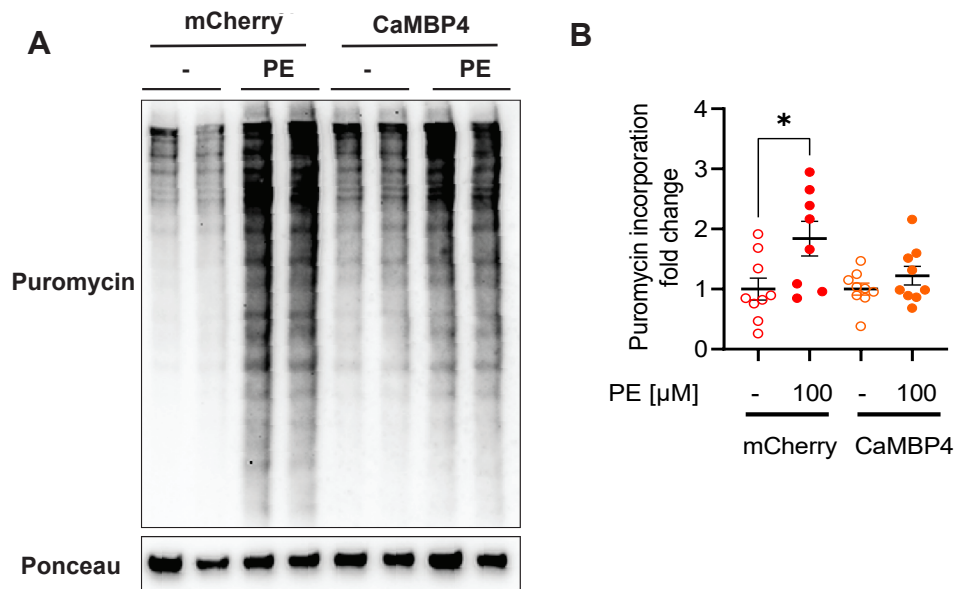


Abbildung 29: **Messung der Translation durch die Inkorporation von Puromycin nach 24h PE Stimulation.** A) Repräsentativer WesternBlot mit Ponceau-Kontrolle. B) Auswertung von n=7-10 Vertiefungen aus N=4 Isolationen. Gezeigt sind Mittelwert und SEM. Statistik mit one-way ANOVA und Bonferroni Korrektur. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$

4 Diskussion

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass die Expression eines nukleären Ca^{2+} -CaM Inhibitors, CaMBP4, die catecholamin-induzierte Hypertrophieantwort in neonatalen Rattenkardiomyozyten unterdrückt. Zu diesem Zweck habe ich ein *in vitro* System zur Transduktion mit scAAV6 und Messung der Hypertrophieantwort in diesen Zellen optimiert. Die Untersuchung ergab, dass CaMBP4 die Vergrößerung der Zellfläche von neonatalen Rattenkardiomyozyten nach PE-Stimulation verhindert, nicht jedoch die verstärkte Expression klassischer Hypertrophiemarker (ANF, BNP, β -MHC, Acta2) und anderer MEF2 Zielgene. Allerdings verhindert die Expression von CaMBP4 die PE-induzierte verstärkte Expression von translationalen Mediatoren. Ich habe gezeigt, dass sich dieser Effekt auch in der verminderten Translationalen Aktivität von CaMBP4-behandelten, PE stimulierten NRVCN manifestiert.

4.1 Etablierung eines Systems zur Untersuchung der Hypertrophieantwort in AAV6-transduzierten NRVCN

Ich habe ein *in vitro* Protokoll zur Transduktion und Messung der Hypertrophieantwort in Kardiomyozyten optimiert. Zu diesem Zweck habe ich drei verschiedene Protokolle verglichen (Abbildung 14) und ein optimales Protokoll (PM) gefunden, welches eine robuste und reproduzierbare Hypertrophieantwort bei gleichzeitig hoher Zellviabilität induziert. In der Literatur wird empfohlen Kardiomyozyten nicht länger als eine Woche zu kultivieren [Louch et al., 2011]. Ich habe gezeigt, dass eine Reduktion der Kulturdauer von 6 auf 4 Tage allein ausreicht um die Effektstärke sowohl unter ET-1 als auch unter PE deutlich zu erhöhen (Abbildung 14 A,B,D,E). Es ist bekannt, dass FBS allein das Wachstum von Kardiomyozyten induzieren kann [Simpson et al., 1982]. Aus diesem Grund verwenden beschriebene Protokolle in der Regel serumfreies Mangelmedium [Babu et al., 2000; Putinski et al., 2013; Molkentin et al., 1998], während Medien mit reduziertem Serumanteil selten beschrieben wurden [Voelkers et al., 2010]. In dieser Arbeit habe ich zwei verschiedene Mangelmedien getestet und es hat sich gezeigt, dass ein (M199) Mangelmedium mit geringem Glukose und FBS-Anteil die Effektstärke unter hypertropher Stimulation erhöht (Abbildung 14 A,B,D,E) und mit einer verbesserten Viabilität assoziiert ist (Abbildung 14 C,F), verglichen mit einem hoch glukosehaltigen, serumfreien Medium (DMEM). Sowohl M199 [Simpson et al., 1982] als auch DMEM Medium [Guatimosim et al., 2008] wurden in früheren Studien als Mangelmedium eingesetzt. Da diese Medien sich jedoch in vielen Komponenten unterscheiden (siehe Tabelle 35), kann ich die verbesserte Effektstärke und Viabilität unter M199 nicht abschließend auf ausschließlich FBS und Glukose zurückführen. Des Weiteren habe ich gezeigt, dass die Hypertrophieantwort bezogen auf die Zellfläche nach

48 h PE-Stimulation größer ist als unter ET-1, was mit früheren Studien konsistent ist [Shimojima et al., 2017].

Vergleich verschiedener Strategien zum Gentransfer in neonatalen Kardiomyozyten. Frühere Studien verwenden adenovirale Vektoren für den Gentransfer in Kardiomyozyten [Fisch et al., 2007; Putinski et al., 2013; Kirschmer et al., 2016] und haben die Effizienz dieses Vorgehens bewiesen [Kass-Eisler et al., 1993]. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die Transfektion von Kardiomyozyten weniger effizient als die Transduktion ist [Shimojima et al., 2017; Duran et al., 2017] und mit höherem Zellsterben verbunden ist [Gao et al., 2014]. Mein Ziel war jedoch die Verwendung eines Systems das leicht auf zukünftige *in vivo* Experimente übertragbar ist. Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind ein vielversprechendes Vehikel für das Einbringen von Genen *in vivo* [Ellis et al., 2013; Zincarelli et al., 2008]. Es wurde gezeigt, dass selbstkomplementäre (sc)AAVs verglichen mit einsträngigen (ss)AAVs zu einem früheren Einsetzen der Genexpression und einer höheren Transduktionseffizienz führt [McCarty et al., 2001] und somit einige der Nachteile des AAV-medierten Gentransfers adressiert. Des Weiteren wurde in neonatalen Kardiomyozyten gezeigt, dass AAV6 effizienter als AAV1 und 9 ist [Ambrosi et al., 2019]. *In vivo* wurde in Mäusen für AAV6 ein hoher Tropismus für das Herz gemessen [Zincarelli et al., 2008] und gezeigt dass AAV6 sich sowohl *in vitro* [Ellis et al., 2013]- als auch für *in vivo* [Pleger et al., 2007]-Studien eignet. In einer weiteren Studie wurden NRVCМ hocheffizient (88%) mit AAV2 transduziert [Djurovic et al., 2004]. Unter Verwendung von scAAV6 habe ich in dieser Arbeit eine maximale Transduktionseffizienz von (60,4-77%) erreicht. Allerdings beeinflussen zahlreiche Parameter, wie beispielsweise der Anteil leerer Kapside [Gao et al., 2014], die Transduktionseffizienz. Aus diesem Grund werden weitere Studien benötigt um den AAV-medierten Gentransfer in Kardiomyozyten *in vitro* zu optimieren. Die Aufreinigung von AAV6 via Affinitätschromatografie verbessert dabei die Ausbeute, Reinheit und die Transduktionseffizienz verglichen mit der Aufreinigung via Idoxianol (Unveröffentlichte Studie der AG Prof. P. Most).

4.2 Inhibition nukleären Calcium-Calmodulins inhibiert die Entwicklung kardialer Hypertrophie in NRVCМ nach PE-Stimulation

Durch die Transduktion von NRVCМ mit scAAV6 Vektoren und der Expression unter dem MLC260-Promoter konnte ich zeigen, dass die Expression von nlsCaMBP4, nicht jedoch Parvalbumin, die PE-induzierte Hypertrophie in NRVCМ reduziert (Abbildung 18 C). In Neuronen wurde gezeigt, dass die Expression von Parvalbumin die Phosphorylierung von CREB nur direkt nach (5 min) Bicucullin-Stimulation verhindert. 60 min nach Stimulation war dieser Effekt nicht länger nachweisbar. Möglicherweise deutet

dies darauf hin, dass die Ca^{2+} -Pufferkapazität von Parvalbumin nicht für eine längere Stimulationsdauer ausreicht [Mauceri et al., 2015]. In Kardiomyozyten erhöht sich die nukleäre, diastolische Ca^{2+} Konzentration nach hypertropher Stimulation kontinuierlich [Ljubojevic et al., 2014], was insbesondere unter Katecholaminstimulation die die Pufferkapazität von Parvalbumin übersteigen könnte. Dies würde erklären, warum Parvalbumin nach 48 h Stimulationsdauer die Hypertrophie nicht signifikant reduziert. In dem von mir verwendeten Zellflächenversuch ist die Zunahme der Zellgröße erst ab 24 h PE-Stimulation nachweisbar. Frühe Effekte von Parvalbumin auf die Hypertrophieantwort können in diesem Modell daher statistisch nicht gezeigt werden.

Des Weiteren konnte ich zeigen, dass nlsCaMBP4 die katecholamininduzierte Hypertrophie effektiv reduziert. Wang *et al.* haben gezeigt, dass CaMBP4 den nukleären Kalzium-Calmodulin-Komplex funktional eliminiert [Wang et al., 1995]. Ich habe somit gezeigt, dass die Inhibition von nukleärem Ca^{2+} -Calmodulin (CaM) ausreicht um die Hypertrophieantwort in neonatalen Kardiomyozyten zu unterdrücken. In Neuronen wurde gezeigt, dass CaM über die CaM-Kinase CaMKII in den Nukleus transferiert werden kann [Ma et al., 2014]. Eine neuere Studie zeigt, dass die Translokation von CaM hauptsächlich über RyR2 gesteuert wird [Oda et al., 2018]. CaM aktiviert sowohl GRK5 [Oda et al., 2018] als auch CaMKII [Duran et al., 2017]. Im Mausmodell und in neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde gezeigt, dass die Aktivierung der CaMKI und IV ausreicht um Hypertrophie via MEF2 zu induzieren. In der gleichen Studie wurde der hypertrophe Effekt durch Aktivierung der CaMK durch die zusätzliche Aktivierung von NFAT3 verstärkt [Passier et al., 2000]. Passier *et al.* argumentieren daher, dass Calcium-Calmodulin die Hypertrophieantwort parallel zum Calcineurin-NFAT Signalweg reguliert, wobei die Aktivierung eines Signalwegs ausreichend ist um die Hypertrophieantwort zu induzieren. Frey *et al.* schlagen vor, dass zahlreiche Hypertrophiesignalwege an einem Punkt konvergieren, um die ähnliche Ausprägung des hypertrophen Phänotyps nach Aktivierung verschiedener Signalwege zu erklären. Als möglicher Konvergenzpunkt der Signalwege wurde der Transkriptionsfaktor MEF2 vorgeschlagen [Frey et al., 2004]. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Aktivierung von GRK5 [Zhang et al., 2011], als auch CaMKII [Ling et al., 2009; Backs et al., 2009] und PKD [Vega et al., 2004] die Phosphorylierung und damit den Export von HDAC5 medieren. Der Export von HDAC5 erlaubt die MEF2-anhängige Genexpression [Frey et al., 2004]. Ich habe daher erwartet, dass die Expression von CaMBP4 die MEF2 abhängige Genexpression unterdrückt.

4.3 NRVCMs können auf basis nukleärer Fluoreszenzsignale via FACS sortiert werden

Ich habe gezeigt, dass die Expression von mCherry-NLS bzw. CaMBP4-mCherry ausreichend ist, um mCherry⁺ Zellen anhand der nukleären Fluoreszenz zu sortieren (Abbildung 20). In früheren Studien wurde gezeigt, dass nukleäre GFP-Fluoreszenz sich zum FACS-Sortieren von Zellen aus transgenen Mäusen eignet [Samadder et al., 2016]. Dabei haben Smadder *et al.* Zellen aus Pancreas, Muskel Lunge, Leber und Hirn, jedoch keine Kardiomyozyten untersucht. Dies überrascht nicht, da adulte Kardiomyozyten mit herkömmlichen FACS-Methoden aufgrund ihrer Größe und Rigidität nicht sortierbar sind, sondern ein spezialisiertes Setup erfordern [Kannan et al., 2019]. Neonatale Kardiomyozyten wurden in früheren Studien via FACS sortiert [Walsh et al., 2010; Gusterson et al., 2003; Liu et al., 2010]. In diesen Studien wurde jedoch mit antikörpergefärbten Zellen gearbeitet, während ich lebende Kardiomyozyten sortiert habe.

4.4 Die Analyse der Genexpression deutet auf einen vom klassischen Hypertrophen Genprogramm unabhängigen Mechanismus in CaMBP4⁺ NRVCMs hin

Bei der Auswertung der Genexpressionsdaten zeigt sich ein Batcheffekt entlang der zweiten Hauptkomponente (Abbildung 21). Batch-Effekte sind in der Literatur beschrieben und üblicherweise technischer Natur [Kiselev et al., 2019]. Eine mögliche Ursache für die Abweichung könnte die Präparation der Proben selbst sein, da Batch MF02 und MF06 & MF07 von verschiedenen Personen präpariert wurden.

Wie erwartet führt die Zugabe von PE in mCherry-exprimierenden Zellen zu einer starken Verschiebung der Genexpression, was für die Hypertrophieantwort Voraussetzung ist [Stanton et al., 2000]. Entgegen meiner initialen Hypothese wird diese Verschiebung in nlsCaMBP4-exprimierenden NRVCm nicht unterdrückt. Stattdessen clustern CaMBP4⁺ Kardiomyozyten unter PE Stimulation näher an der PE-stimulierten mCherry-Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibierung von Ca²⁺-Calmodulin unter PE-Stimulation einen eigenen regulatorischen Mechanismus in Gang setzt.

ANF, BNP, β MHC und α -Aktin sind akzeptierte Marker kardialer Hypertrophie [Watkins et al., 2011; Sadoshima et al., 1992; Stuck et al., 2008]. Ich habe gezeigt, dass die hypertrophe (PE) Stimulation die Expression von ANF, BNP und β MHC in mCherry⁺ NRVCm erhöht. Allerdings konnte ich keine Reduktion dieses PE-mediierten Anstiegs durch CaMBP4 zeigen, trotz der klaren Reduktion des hypertrophen Phänotyps auf

Ebene der Zellfläche in den gleichen Präparationen. Für Acta2 zeigte sich sogar ein signifikanter Anstieg der Expression in CaMBP4-behandelten Zellen.

In Neuronen wurde gezeigt, dass nlsCaMBP4 den Export von HDAC4 und 5 unterbindet [Schlumm et al., 2013]. Aus diesem Grund habe ich erwartet, dass CaMBP4 in Kardiomyozyten die MEF2-abhängige Genexpression unterdrückt. In diesem Fall müssten in CaMBP4⁺ NRVCM bekannte MEF2-Zielgene wie Srpk3, Xirp1 und Xirp2 vor dem PE-induzierten Anstieg der mRNA-Expression geschützt sein. Das MEF2-Zielgen Srpk3 [Nakagawa et al., 2005] ist jedoch eines der 25 am stärksten durch PE-Stimulation hochregulierten Genen in nlsCaMBP4⁺ NRVCMs (Abbildung 26 A). Des Weiteren wurde der PE-medierte Anstieg der mRNA-Level von Xirp1 und Xirp2 (Abbildung 23 F & G) durch die Expression von CaMBP4 nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nukleäres Ca²⁺-Calmodulin die CaMKII-MEF2 abhängige Genexpression nicht beeinflusst.

Diese Ergebnisse werden durch die Analyse der Transkriptionsfaktoraktivitäten unterstützt (Abbildung 27). Es hat sich gezeigt dass die Aktivität pro-hypertropher Transkriptionsfaktoren, wie MEF2c nach PE Stimulation in nlsCaMBP4⁺ NRVCM nicht reduziert ist. Interessant ist zudem, dass die Aktivität antihypertropher Transkriptionsfaktoren, wie Atf3 und Klf4, unter PE Stimulation in CaMBP4-behandelten Kardiomyozyten verglichen mit der mCherry-Kontrolle reduziert ist. In Atf3-KO Mäusen wurde eine verstärkte Hypertrophieantwort nach Aortenbanding verglichen mit dem Wildtyp beobachtet [Zhou et al., 2011]. In dieser Arbeit habe ich beobachtet, dass die Aktivität von Atf3 unter PE-Stimulation in CaMBP4-exprimierenden Kardiomyozyten reduziert erscheint. Eine weitere Studie hat beobachtet, dass durch die Überexpression von Klf4 die PE-induzierte Hypertrophieantwort in NRVCM unterdrückt werden kann [Liao et al., 2010]. In dieser Arbeit habe ich beobachtet, dass die Aktivität von Klf4 in CaMBP4-exprimierenden NRVCM während der PE-Stimulation reduziert ist. Meine Daten zeigen zudem, dass die veränderten Transkriptionsfaktoraktivitäten nicht auf einer veränderten Expression dieser Transkriptionsfaktoren basieren.

Ich habe meine Ergebnisse mit einer Studie verglichen, in der nls-CaMBp4 exprimierende Neuronen unter CFA-Stimulation untersucht wurden [Simonetti et al., 2013] und 102 Gene gefunden die in beiden Modellen unter CaBMP4 differentiell exprimiert werden (Tabelle 38), wobei 68 gleichsinnig und 35 gegensätzlich reguliert werden. In einer anderen Studie, in der der Einfluss von CaM auf die Aktivierung von T-Zellen via qPCR untersucht wurde, wurde keines der in meinem Modell differentiell exprimierten Gene untersucht [Monaco et al., 2016]. Daher muss in zukünftigen Studien erforscht werden, ob die von mir beobachteten Effekte spezifisch für Kardiomyozyten sind.

4.5 Nukleäres Ca²⁺-Calmodulin reguliert die Expression von Regulatoren der stressabhängigen Translation

Die KEGG-Signalweganalyse hat gezeigt, dass ein Cluster von Genen, welche in die Kontrolle der Translation involviert sind, in CaMBP4-behandelten Zellen differentiell reguliert wird.

Rnps1: Zu den identifizierten Genen, die in die Translationskontrolle involviert sind zählt Rnps1, einen Aktivator des pre-mRNA splicings [Mayeda et al., 1999]. Es wurde gezeigt, dass Rnps1 in Mäusen nach ischämischer Hirnschädigung verstärkt exprimiert wird [Zhang et al., 2020], die Rolle von Rnps1 im Kontext der kardialen Hypertrophie ist jedoch bisher nicht untersucht worden. Ich habe in NRVCN beobachtet, dass Rnps1 durch PE-Stimulation verstärkt exprimiert wird und dieser Effekt durch CaMBP4 vollständig unterdrückt wird. Da gezeigt wurde, dass Rnps1 ein Regulator des splicens ist und somit zur Expression intakter mRNAs ohne Verlust von Exons beiträgt [Boehm et al., 2018], sollten zukünftige Studien den Einfluss nukleären Kalziums auf das Splicing behandeln.

Kpnb1: In dieser Arbeit konnte ich den Anstieg der Expression von Kpnb1 (Karyopherin β 1) durch Behandlung mit nlsCaMBP4 reduzieren. Es wurde gezeigt, dass Kpnb1 den nukleären Import der apoptosesignalregulierenden Kinase 1 (ASK1) in HEK293 Zellen [Sturchler et al., 2013] und von NFAT in HeLa Zellen [Van Der Watt et al., 2016] mediiert. Ebenfalls in HeLa Zellen wurde die Bedeutung von Kpnb1 für den nukleären Import ribosomaler Proteine zur Assemblierung belegt [Jakel, 1998]. Zudem katalysiert Kpnb1 die Phosphorylierung von Ran-GDP zu Ran-GTP, welches für den Exportin-medierten nukleären Export benötigt wird [Lonhienne et al., 2009; Clarke und Zhang, 2008]. Es wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition von Kpnb1 über Importazol sich anti-hypertroph in einem Hypertrophiemodell von humanen pluripotenten Stammzellen auswirkt [Nagai et al., 2017]. Welche dieser Prozesse dem anti-hypertrophen Effekt von CaMBP4 zugrunde liegen, muss Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Regulatorische Untereinheiten von eukaryotischen Initiationsfaktoren (Eifs): Die verstärkte Proteintranslation im Rahmen kardialer Hypertrophie ist in der Literatur belegt [Sadoshima und Izumo, 1993; Putinski et al., 2013]. Neuere Studien haben die Wichtigkeit der Translationskontrolle für die Ausbildung kardialer Hypertrophie anhand von Eif4, mTORC1, PABPC1, oder lokalen Regulatoren hervorgehoben [Zeitzy und Smyth, 2020]. Beispielsweise wurde die Verbindung zytosolischer Kalziumregulatoren mit der mTORC1 abhängigen Proteinsynthese gezeigt [Sanliyalp et al., 2020]. Die regulatorische Bedeutung nukleärer Kalziumsignale für die Translation wurde jedoch

bisher nicht untersucht. Die eukaryotischen Initiationsfaktoren (Eifs) sind die primären Modulatoren der mRNA Translation, in dem sie die Translationsinitiation steuern [Hao et al., 2020]. Ich habe gezeigt, dass Eif3d, eine Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktor 3, in der PE-behandelten mCherry-Kontrolle verstärkt exprimiert, dies in CaMBP4⁺ NRVCN verhindert wird. Es wurde in HEK293 Zellen gezeigt, dass die stressabhängige Genexpression durch den Eif-Komplex reguliert wird, wobei Eif3d die stress-abhängige Genexpression durch die Modulation der Erkennung von 5^{*}-cap-mRNAs forciert [Lamper et al., 2020]. Eine Untereinheit des Eif2-Komplexes (Eif2s1) wird ebenfalls verstärkt in der PE-stimulierten mCherry-Kontrolle exprimiert, während das basale Expressionslevel in CaMBP4-exprimierenden Kardiomyozyten beibehalten wird. Es wurde gezeigt, dass der Eif2 komplex die globale Proteinsynthese aufrecht erhält, indem er den Transfer der Methionin-tRNA auf die ribosomale 40S Untereinheit steuert [Kimball, 1999]. Die Phosphorylierung von Eif2s1 führte in einer früheren Studie zu einer allgemeinen Reduktion der Proteinsynthese, hatte aber keinen Einfluss auf die Translation stress-abhängiger mRNAs [Harding et al., 2000]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Inhibition von Eif2s1 via Salubrinal nach Ligation des linken vorderen, absteigenden Astes der Koronararterie die Infarktgröße, sowie die Apoptose reduziert [Li et al., 2015]. Andererseits wurde vorgeschlagen, dass die Apoptoserate auch durch die dauerhafte Aktivierung von Eif2s1 via Knockout von GCN2 erreicht werden kann, wobei die Hypertrophieantwort nicht beeinflusst wird [Lu et al., 2014]. In dieser Arbeit habe ich beobachtet, dass es in Kardiomyozyten, die durch die Blockade nukleärer CaM-Signalwege vor der Ausbildung von Hypertrophie geschützt sind, nicht zu einer verstärkten Expression der regulatorischen Eif Untereinheiten Eif3d und Eif2s1 kommt. Das legt nahe, dass nukleäre Ca²⁺-Calmodulin-Signale eine entscheidende Rolle in der Regulation der Translation spielen könnten und so in die CaMBP4-vermittelte Reduktion der Hypertrophieantwort eingebunden sein könnten.

Auswirkung auf die Translation: In neonatalen Rattenkardiomyozyten ist beschrieben, dass der Einbau von Puromycin nach PE Stimulation ansteigt [Wang et al., 2017]. Darüber hinaus wurde *in vivo* gezeigt, dass die Inhibition der Proteintranslation zu einer Reduktion der Hypertrophie nach TAC führte und von einem geringeren Einbau von Puromycin verglichen zu unbehandelten Tieren begleitet wurde [Grund et al., 2019]. In dieser Studie habe ich über einen Puromycinassay nachgewiesen, dass die Expression von CaMBP4 in Kardiomyozyten mit einem Rückgang der PE-induzierten mRNA Translation assoziiert ist. Somit habe ich gezeigt, dass der CaMBP4-vermittelte Schutz vor einem PE-induzierten Anstieg von Eif2s1 und Eif3d mit einer reduzierten Translation unter PE-Stimulation assoziiert ist. Es ist jedoch möglich, dass weitere Mechanismen zu der CaMBP4-vermittelten Reduktion der Hypertrophieantwort beitragen. Um dies zu untersuchen, sollte getestet werden inwiefern der durch CaMBP4 vermittel-

te Effekt unter PE durch Knockout oder Inhibition von Eif2s1 und Eif3d reproduzierbar ist. Es ist zu befürchten, dass ein vollständiger Knockout von Eif2s1 und Eif3d möglicherweise tödlich für die Kardiomyozyten wäre, weswegen sich eine Inhibition vermutlich besser für diese Studie eignen wird. Bisher wurden keine direkten und spezifischen Inhibitoren für Eif2s1 und Eif3d publiziert. Eine frühere Studie hat gezeigt, dass Salubrinal die Apoptoserate und Infarktgröße in einem Infarktmodell *in vivo* via Inhibition der Aktivierung von Eif2s1 reduziert [Li et al., 2015]. Es wurde beschrieben, dass Salubrinal die Phosphorylierung von Eif2s1 via Inhibition von GADD34 erreicht [Choy et al., 2015]. Neuere Studien schlagen allerdings auch weitere Substrate für GADD34 vor [Dedigama-Arachchige et al., 2018], sodass der Effekt von Salubrinal nicht ausschließlich auf Eif2s1 beschränkt werden kann. Des Weiteren wird die Aktivität Eif3d über die Casein Kinase 2 gesteuert [Lamper et al., 2020], die zahlreiche Ziele phosphoryliert [Homma et al., 2005], sodass sie sich nicht als Ziel für die funktionelle Untersuchung von Eif3d eignet. Folglich bietet sich für die Interferenz mit Eif2s1 und Eif3d ein siRNA-Ansatz an. In neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden Transfektionsansätze genutzt um die Expression von Lrp6 [Wu et al., 2021], sowie Ryr und NCX [Vazquez-hidalgo et al., 2021] zu reduzieren. Alternativ wäre eine virale Transduktion denkbar, um eine größere Anzahl NRVCs zu erreichen. Über diesen Ansatz kann dann gezeigt werden, dass die spezifische Reduktion von jeweils Eif2s1 und Eif3d die Translation reduziert. Um zu untersuchen, ob die anti-hypertrophe Wirkung von CaMBP4 auf die Reduktion der mRNA-Level von Eif2s1, Eif3d oder die Kombination beider zurückzuführen ist, könnte dann eine Überexpression der Eifs in CaMBP4⁺ Kardiomyozyten induziert werden, was die Hypertrophieantwort unter PE Stimulation wiederherstellen sollte.

4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend habe ich in dieser Studie gezeigt dass die katecholamin-vermittelte Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten durch die Expression eines Inhibitors der nukleären Ca²⁺-Calmodulin-Signale (CaMBP4) reduziert wird. Dabei sind bekannte CaMKII-regulierte Gene wie Xirp1 und Xirp2 nicht durch die Expression von CaMBP4 reguliert. Eine breitere Analyse der katecholamin-induzierten, transkriptionellen Genprogramme hat gezeigt, dass CaMBP4 die Expression von Eif2s1, Eif3d und anderen Genen, die in die Regulation der Translation involviert sind, beeinflusst. Ich konnte auch zeigen, dass CaMBP4-exprimierende Kardiomyozyten vor dem PE-induzierten Anstieg der Translation geschützt sind. Die differentielle Expression der von mir beschriebenen Translationsmodulatoren, sowie des Hypertrophiemarkerpanels, wurde durch Professor Christoph Dieterich unter Verwendung eines weiteren Algorithmus mit Batchkorrektur bestätigt (Veröffentlichung in Arbeit). Welche molekularen Elementen

te die Expression dieser Regulatoren in abhängigen von nukleärem CaM vermitteln ist nicht bekannt. Man kann sie anhand ihrer Funktion jedoch als Ca²⁺ /Calmodulin-responsives, nukleäres Element“(CaRNE) zusammenfassen (Abbildung 30). Darüber hinaus habe ich zahlreiche CaM-responsive Transkriptionsfaktoren in PE-stimulierten NRVCN identifiziert. Von diesen Transkriptionsfaktoren ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit gezeigt worden, dass er die Expression der zuvor beschriebenen Regulatoren der Translation (Eif3d, Eif2s1, Kpnb1 oder Rnps1) reguliert. Folglich muss es Ziel weiterführender Studien sein, die molekularen Elemente zu identifizieren, die die Ca²⁺-abhängige Regulation der Transkription, Proteintranslation und die Ausbildung kardialer Hypertrophie verbinden.

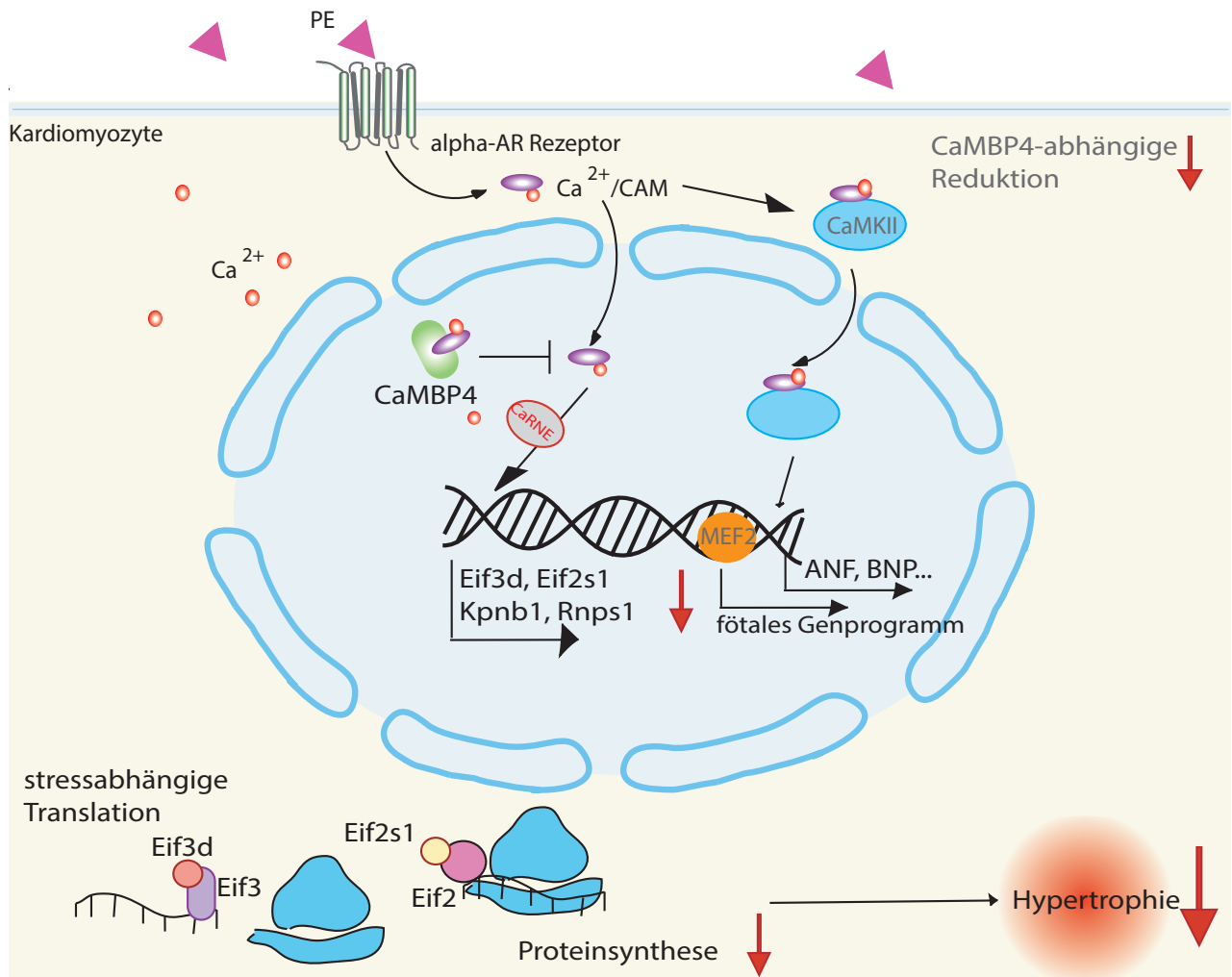


Abbildung 30: **CaMBP4 greift über einen CaMKII unabhängigen Mechanismus in die Translation ein.** CaMBP4 inhibiert ein Calcium responsives, nukleäres Element (CaRNE), welches auf Transkriptionsebene die Expression von Zc3h6, Eif2s1, Eif3d und Kpnb1 reduziert. Dies hat sowohl eine verringerte Umsetzung der CaMKII medierten Genexpression zur Folge, als auch die Beibehaltung des basalen Translationslevels. Des Weiteren wird die Assemblierung weiterer Ribosome, so wie der Export aus dem Nukleus gebremst. Diese Effekte führen in der Summe zu einer Unterdrückung des Hypertrophen Wachstums.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 5th. Auflage.
- Alvarez, M. J., Shen, Y., Giorgi, F. M., Lachmann, A., Ding, B. B., Ye, B. H., und Califano, A. (2016). Functional characterization of somatic mutations in cancer using network-based inference of protein activity. *Nature Genetics*, 48(8):838–847.
- Ambrosi, C. M., Sadananda, G., Han, J. L., und Entcheva, E. (2019). Adeno-Associated Virus Mediated Gene Delivery: Implications for Scalable in vitro and in vivo Cardiac Optogenetic Models. *Frontiers in Physiology*, 10(MAR):1–13.
- Andrew, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. R., und Zornoff, L. A. M. (2016). Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 106(1):62–69.
- Babu, G. J., Lalli, J. M., Sussman, M. A., Ichi Sadoshima, J., und Periasamy, M. (2000). Phosphorylation of Elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(8):1447–1457.
- Backs, J., Backs, T., Neef, S., Kreusser, M. M., Lehmann, L. H., Patrick, D. M., Grueter, C. E., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J. A., Katus, H. A., Bassel-Duby, R., Maier, L. S., und Olson, E. N. (2009). The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7):2342–2347.
- Bading, H. (2013). Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9):593–608.
- Bairwa, S. C., Parajuli, N., und Dyck, J. R. (2016). The role of AMPK in cardiomyocyte health and survival. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(12):2199–2210.
- Bertero, E. und Maack, C. (2018). Metabolic remodelling in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 15(8):457–470.
- Boehm, V., Britto-Borges, T., Steckelberg, A.-L., Singh, K. K., Gerbracht, J. V., Gueney, E., Blazquez, L., Altmüller, J., Dieterich, C., und Gehring, N. H. (2018). Exon Junction

- Complexes Suppress Spurious Splice Sites to Safeguard Transcriptome Integrity. *Molecular Cell*, 72(3):482–495.e7.
- Bootman, M. D., Fearnley, C., Smyrniak, I., MacDonald, F., und Roderick, H. L. (2009). An update on nuclear calcium signalling. *Journal of Cell Science*, 122(14):2337–2350.
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P. I. R., Jamieson, S., und Stinson, E. B. (1986). beta1 and beta2-Adrenergic-Receptor Subpopulations in Nonfailing and Failing Human Ventricular Myocardium: Coupling of Both Receptor Subtypes to Muscle Contraction and Selective beta1-Receptor Down-Regulation in Heart Failure. *Circulation research*, 59(3):297–309.
- Cairns, S. P. und Borrani, F. (2015). β -Adrenergic modulation of skeletal muscle contraction: key role of excitation-contraction coupling. *The Journal of Physiology*, 593(21):4713–4727.
- Camacho Londoño, J. E., Tian, Q., Hammer, K., Schröder, L., Camacho Londoño, J., Reil, J. C., He, T., Oberhofer, M., Mannebach, S., Mathar, I., Philipp, S. E., Tabellion, W., Schweda, F., Dietrich, A., Kaestner, L., Laufs, U., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Freichel, M., und Lipp, P. (2015). A background Ca^{2+} entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *European Heart Journal*, 36(33):2257–2266.
- Cárdenas, C., Liberona, J. L., Molgó, J., Colasante, C., Mignery, G. A., und Jaimovich, E. (2005). Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca^{2+} transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *Journal of Cell Science*, 118(14):3131–3140.
- Carreno, J. E., Apablaza, F., Ocaranza, M. P., und Jalil, J. E. (2006). Cardiac hypertrophy molecular and cellular events. *Rev. Esp. Cardiol.*, 59(5):473–486.
- Celio, M. und Heizmann, C. W. (1982). Calcium binding protein parvalbumin is associated with fast contracting muscle fibers. *Nature*, 297:504–506.
- Cetinkaya, A., Berge, B., Sen-Hild, B., Troidl, K., Gajawada, P., Kubin, N., Valeske, K., Schranz, D., Akintürk, H., Schönburg, M., Kubin, T., Choi, Y.-h., und Richter, M. (2020). Radixin Relocalization and Nonmuscle α -Actinin Expression Are Features of Remodeling Cardiomyocytes in Adult Patients with Dilated Cardiomyopathy. *Disease Markers*, 2020(Id):1–14.

- Chawla, S., Hardingham, G. E., Quinn, D. R., und Bading, H. (1998). CBP: A signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science*, 281(5382):1505–1509.
- Chlopčíková, Š., Psotová, J., und Miketová, P. (2001). NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES – A MODEL FOR THE STUDY OF MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE HEART. *Biomed. Papers*, 145(2):49–55.
- Choy, M. S., Yusoff, P., Lee, I. C., Newton, J. C., Goh, C. W., Page, R., Shenolikar, S., und Peti, W. (2015). Structural and Functional Analysis of the GADD34: PP1 eIF2 α Phosphatase. *Cell Reports*, 11(12):1885–1891.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131(6):1047–1058.
- Clarke, P. R. und Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(6):464–477.
- Cohn, J. N., Ferrari, R., und Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3):569–582.
- Colella, M. und Pozzan, T. (2008). Cardiac Cell Hypertrophy In Vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1123(1):64–68.
- Coutu, P., Bennett, C. N., Favre, E. G., Day, S. M., und Metzger, J. M. (2004). Parvalbumin corrects slowed relaxation in adult cardiac myocytes expressing hypertrophic cardiomyopathy-linked α -tropomyosin mutations. *Circulation Research*, 94(9):1235–1241.
- Cui, L., Zhang, Y., Ge, X., Liu, J., Zhang, X., Li, H., und Li, Z. (2020). Downregulated PEG3 ameliorates cardiac fibrosis and myocardial injury in mice with ischemia/reperfusion through the NF- κ B signaling pathway. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 52(3):143–154.
- de Lucia, C., Eguchi, A., und Koch, W. J. (2018). New Insights in Cardiac β -Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging. *Frontiers in Pharmacology*, 9(AUG):1–14.
- Dedigama-Arachchige, P. M., Acharige, N. P. N., und Pflum, M. K. H. (2018). Identification of PP1–Gadd34 substrates involved in the unfolded protein response using K-BIPS, a method for phosphatase substrate identification. *Molecular Omics*, 14(2):121–133.

- Dewenter, M., Von Der Lieth, A., Katus, H. A., und Backs, J. (2017). Calcium signaling and transcriptional regulation in cardiomyocytes. *Circulation Research*, 121(8):1000–1020.
- Dirkx, E., da Costa Martins, P. A., und De Windt, L. J. (2013). Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(12):2414–2424.
- Djurovic, S., Iversen, N., Jeansson, S., Hoover, F., und Christensen, G. (2004). Comparison of Nonviral Transfection and Adeno-Associated Viral Transduction on Cardiomyocytes. *Molecular Biotechnology*, 28(1):21–32.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., und Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1):15–21.
- Donald M. Bers (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415(January):198–205.
- Duran, J., Lagos, D., Pavez, M., Troncoso, M. F., Ramos, S., Barrientos, G., Ibarra, C., Lavandero, S., und Estrada, M. (2017). Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Androgen Signaling Pathways Modulate MEF2 Activity in Testosterone-Induced Cardiac Myocyte Hypertrophy. *Frontiers in Pharmacology*, 8(604):1–15.
- Eder, P. und Molkenin, J. D. (2011). TRPC Channels As Effectors of Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*, 108(2):265–272.
- Ehler, E., Moore-Morris, T., und Lange, S. (2013). Isolation and Culture of Neonatal Mouse Cardiomyocytes. *J. Vis. Exp.*, 79(e50154):1–10.
- Eisner, D. (2014). Calcium in the heart: From physiology to disease. *Experimental Physiology*, 99(10):1273–1282.
- Eisner, D. A., Caldwell, J. L., Trafford, A. W., und Hutchings, D. C. (2020). The Control of Diastolic Calcium in the Heart: Basic Mechanisms and Functional Implications. *Circulation Research*, Seiten 395–412.
- Ellis, B. L., Hirsch, M. L., Barker, J. C., Connelly, J. P., Steininger, R. J., und Porteus, M. H. (2013). A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology journal*, 10(1):74.
- Fisch, S., Gray, S., Heymans, S., Haldar, S. M., Wang, B., Pfister, O., Cui, L., Kumar, A., Lin, Z., Sen-Banerjee, S., Das, H., Petersen, C. A., Mende, U., Burleigh, B. A.,

- Zhu, Y., Pinto, Y., Liao, R., und Jain, M. K. (2007). Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17):7074–7079.
- Flynn, J. M., O’Leary, M. N., Zambataro, C. A., Academia, E. C., Presley, M. P., Garrett, B. J., Zykovich, A., Mooney, S. D., Strong, R., Rosen, C. J., Kapahi, P., Nelson, M. D., Kennedy, B. K., und Melov, S. (2013). Late-life rapamycin treatment reverses age-related heart dysfunction. *Aging Cell*, 12(5):851–862.
- Frank, D., Kuhn, C., Brors, B., Hanselmann, C., Lüdde, M., Katus, H. A., und Frey, N. (2008). Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: Evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension*, 51(2):309–318.
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., und Ramesh, V. (1999). Shape, Size, and Distribution of Ca²⁺ Release Units and Couplons in Skeletal and Cardiac Muscles. *Biophysical Journal*, 77(3):1528–1539.
- Freundt, J. K., Frommeyer, G., Wötzel, F., Hüge, A., Hoffmeier, A., Martens, S., Eckardt, L., und Lange, P. S. (2018). The Transcription Factor ATF4 Promotes Expression of Cell Stress Genes and Cardiomyocyte Death in a Cellular Model of Atrial Fibrillation. *BioMed Research International*, 2018.
- Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N., und Hill, J. A. (2004). Hypertrophy of the Heart. *Circulation*, 109(13):1580–1589.
- Frey, N., McKinsey, T. A., und Olson, E. N. (2000). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nature Medicine*, 6(11):1221–1227.
- Frey, N. und Olson, E. (2003). Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annual Review of Physiology*, 65(1):45–79.
- Gao, K., Li, M., Zhong, L., Su, Q., Li, J., Li, S., He, R., Zhang, Y., Hendricks, G., Wang, J., und Gao, G. (2014). Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side effects. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 1(October 2013):9.
- Garcia-Alonso, L., Holland, C. H., Ibrahim, M. M., Turei, D., und Saez-Rodriguez, J. (2019). Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities. *Genome Research*, 29(8):1363–1375.
- Gélinas, R., Mailleux, F., Dontaine, J., Bultot, L., Demeulder, B., Ginion, A., Daskalopoulos, E. P., Esfahani, H., Dubois-Deruy, E., Lauzier, B., Gauthier, C., Olson, A. K., Bouchard, B., Des Rosiers, C., Viollet, B., Sakamoto, K., Balligand, J. L., Vanoverschelde, J. L., Beauloye, C., Horman, S., und Bertrand, L. (2018). AMPK activation

- counteracts cardiac hypertrophy by reducing O-GlcNAcylation. *Nature Communications*, 9(1).
- Gerasimenko, O. V., Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., und Petersen, O. H. (1996). Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 432(1):1–6.
- Giguère, H., Dumont, A.-A., Berthiaume, J., Oliveira, V., Laberge, G., und Auger-Messier, M. (2018). ADAP1 limits neonatal cardiomyocyte hypertrophy by reducing integrin cell surface expression. *Scientific Reports*, 8(13605):13.
- Gordan, R., Gwathmey, J. K., und Xie, L.-H. (2015). Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World Journal of Cardiology*, 7(4):204.
- Grund, A., Szaroszyk, M., Korf-Klingebiel, M., Malek Mohammadi, M., Trogisch, F. A., Schrameck, U., Gigina, A., Tiedje, C., Gaestel, M., Kraft, T., Hegermann, J., Batkai, S., Thum, T., Perrot, A., dos Remedios, C., Riechert, E., Völkers, M., Doroudgar, S., Jungmann, A., Bauer, R., Yin, X., Mayr, M., Wollert, K. C., Pich, A., Xiao, H., Katus, H. A., Bauersachs, J., Müller, O. J., und Heineke, J. (2019). TIP 30 counteracts cardiac hypertrophy and failure by inhibiting translational elongation. *EMBO Molecular Medicine*, 11(10):1–20.
- Guatimosim, S., Amaya, M. J., Guerra, M. T., Aguiar, C. J., Goes, A. M., Gómez-Viquez, N. L., Rodrigues, M. A., Gomes, D. A., Martins-Cruz, J., Lederer, W., und Leite, M. F. (2008). Nuclear Ca²⁺ regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium*, 44(2):230–242.
- Gusterson, R. J., Jazrawi, E., Adcock, I. M., und Latchman, D. S. (2003). The Transcriptional Co-activators CREB-binding Protein (CBP) and p300 Play a Critical Role in Cardiac Hypertrophy That Is Dependent on Their Histone Acetyltransferase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9):6838–6847.
- Hajjar, R. J. und Ishikawa, K. (2017). Introducing Genes to the Heart. *Circulation Research*, 120(1):33–35.
- Hao, P., Yu, J., Ward, R., Liu, Y., Hao, Q., An, S., und Xu, T. (2020). Eukaryotic translation initiation factors as promising targets in cancer therapy. *Cell Communication and Signaling*, 18(1):175.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., und Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6(5):1099–1108.

- Heineke, J. und Molkenstin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8):589–600.
- Higazi, D. R., Fearnley, C. J., Drawnel, F. M., Talasila, A., Corps, E. M., Ritter, O., McDonald, F., Mikoshiba, K., Bootman, M. D., und Roderick, H. L. (2009). Endothelin-1-Stimulated InsP3-Induced Ca²⁺ Release Is a Nexus for Hypertrophic Signaling in Cardiac Myocytes. *Molecular Cell*, 33(4):472–482.
- Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., und Wegener, J. W. (2014). L-type CaV1.2 calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. *Physiological Reviews*, 94(1):303–326.
- Hohendanner, F., McCulloch, A. D., Blatter, L. A., und Michailova, A. P. (2014). Calcium and IP3 dynamics in cardiac myocytes: experimental and computational perspectives and approaches. *Frontiers in Pharmacology*, 5(35):1–10.
- Homma, M. K., Wada, I., Suzuki, T., Yamaki, J., Krebs, E. G., und Homma, Y. (2005). CK2 phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 5 potentiates cell cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43):15688–15693.
- Huq, F., Lebeche, D., Iyer, V., Liao, R., und Hajjar, R. J. (2004). Gene transfer of parvalbumin improves diastolic dysfunction in senescent myocytes. *Circulation*, 109(22):2780–2785.
- Ibarra, C., Vicencio, J. M., Varas-Godoy, M., Jaimovich, E., Rothermel, B. A., Uhlir, P., Hill, J. A., und Lavandero, S. (2014). An integrated mechanism of cardiomyocyte nuclear Ca²⁺ signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 75:40–48.
- Iorio, F., Bernardo-Faura, M., Gobbi, A., Cokelaer, T., Jurman, G., und Saez-Rodriguez, J. (2016). Efficient randomization of biological networks while preserving functional characterization of individual nodes. *BMC Bioinformatics*, 17(1):542.
- Jakel, S. (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *The EMBO Journal*, 17(15):4491–4502.
- Jean-Charles, P. Y., Yu, S. M. W., Abraham, D., Kommaddi, R. P., Mao, L., Strachan, R. T., Zhang, Z. S., Bowles, D. E., Brian, L., Stiber, J. A., Jones, S. N., Koch, W. J., Rockman, H. A., und Shenoy, S. K. (2017). Mdm2 regulates cardiac contractility by inhibiting GRK2-mediated desensitization of β -adrenergic receptor signaling. *JCI insight*, 2(17).

- Jia, L. und Qian, S.-B. (2021). A Versatile eIF3d in Translational Control of Stress Adaptation. *Molecular Cell*, 81(1):10–12.
- Kannan, S., Miyamoto, M., Lin, B. L., Zhu, R., Murphy, S., Kass, D. A., Andersen, P., und Kwon, C. (2019). Large Particle Fluorescence-Activated Cell Sorting Enables High-Quality Single-Cell RNA Sequencing and Functional Analysis of Adult Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 125(5):567–569.
- Kass-Eisler, A., Falck-Pedersen, E., Alvira, M., Rivera, J., Buttrick, P. M., Wittenberg, B. A., Cipriani, L., und Leinwand, L. A. (1993). Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24):11498–11502.
- Kim, N. N., Villarreal, F. J., Printz, M. P., Lee, A. A., und Dillmann, W. H. (1995). Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 269(3 32-3).
- Kimball, S. R. (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(1):25–29.
- Kirschmer, N., Bandleon, S., von Ehrlich-Treuenstätt, V., Hartmann, S., Schaaf, A., Lamprecht, A.-K., Miranda-Laferte, E., Langsenlehner, T., Ritter, O., und Eder, P. (2016). TRPC4 α and TRPC4 β Similarly Affect Neonatal Cardiomyocyte Survival during Chronic GPCR Stimulation. *PLOS ONE*, 11(12):e0168446.
- Kiselev, V. Y., Andrews, T. S., und Hemberg, M. (2019). Challenges in unsupervised clustering of single-cell RNA-seq data. *Nature Reviews Genetics*, 20(5):273–282.
- Kolodziejczyk, S. M., Wang, L., Balazsi, K., DeRepentigny, Y., Kothary, R., und Megey, L. A. (1999). MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Current Biology*, 9(20):1203–1206.
- Lamper, A. M., Fleming, R. H., Ladd, K. M., und Lee, A. S. Y. (2020). A phosphorylation-regulated eIF3d translation switch mediates cellular adaptation to metabolic stress. *Science*, 370(6518):853–856.
- Li, H., Wang, Y., Liu, J., Chen, X., Duan, Y., Wang, X., Shen, Y., Kuang, Y., Zhuang, T., Tomlinson, B., Chan, P., Yu, Z., Cheng, Y., Zhang, L., Liu, Z., Zhang, Y., Zhao, Z., Zhang, Q., und Liu, J. (2021). Endothelial Klf2-Foxp1-TGF β signal mediates the inhibitory effects of simvastatin on maladaptive cardiac remodeling. *Theranostics*, 11(4):1609–1625.

- LI, R.-J., HE, K.-L., LI, X., WANG, L.-L., LIU, C.-L., und HE, Y.-Y. (2015). Salubrinal protects cardiomyocytes against apoptosis in a rat myocardial infarction model via suppressing the dephosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α . *Molecular Medicine Reports*, 12(1):1043–1049.
- Liao, X., Haldar, S. M., Lu, Y., Jeyaraj, D., Paruchuri, K., Nahori, M., Cui, Y., Kaestner, K. H., und Jain, M. K. (2010). Krüppel-like factor 4 regulates pressure-induced cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(2):334–338.
- Liao, Y., Smyth, G. K., und Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7):923–930.
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E. J., Shi, Z., und Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*, 47(W1):W199–W205.
- Lijnen, P. und Petrov, V. (1999). Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31(5):949–970.
- Ling, H., Zhang, T., Pereira, L., Kable Means, C., Cheng, H., Gu, Y., Dalton, N. D., Peterson, K. L., Chen, J., Bers, D., und Heller Brown, J. (2009). Requirement for the Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5):1230–1240.
- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M. J., und Bootman, M. D. (1997). Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *The EMBO Journal*, 16(23):7166–7173.
- Liu, Y., Leri, A., Li, B., Wang, X., Cheng, W., Kajstura, J., und Anversa, P. (1998). Angiotensin II Stimulation In Vitro Induces Hypertrophy of Normal and Postinfarcted Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, 82:1145–1159.
- Liu, Z., Yue, S., Chen, X., Kubin, T., und Braun, T. (2010). Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by cyclinG1. *Circulation Research*, 106(9):1498–1506.
- Ljubojevic, S. und Bers, D. M. (2015). Nuclear Calcium in Cardiac Myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(3):211–217.
- Ljubojevic, S., Radulovic, S., Leitinger, G., Sedej, S., Sacherer, M., Holzer, M., Winkler, C., Pritz, E., Mittler, T., Schmidt, A., Sereinigg, M., Wakula, P., Zissimopoulos, S.,

- Bisping, E., Post, H., Marsche, G., Bossuyt, J., Bers, D. M., Kockskämper, J., und Pieske, B. (2014). Early remodeling of perinuclear Ca²⁺ stores and nucleoplasmic Ca²⁺ signaling during the development of hypertrophy and heart failure. *Circulation*, 130(3):244–255.
- Lonhienne, T. G., Forwood, J. K., Marfori, M., Robin, G., Kobe, B., und Carroll, B. J. (2009). Importin- β Is a GDP-to-GTP Exchange Factor of Ran. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34):22549–22558.
- Lorenz, K., Schmitt, J. P., Schmitteckert, E. M., und Lohse, M. J. (2009). A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature Medicine*, 15(1):75–83.
- Louch, W. E., Sheehan, K. A., und Wolska, B. M. (2011). Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer.
- Love, M. I., Huber, W., und Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12):1–21.
- Lu, Y. und Yang, S. (2009). Angiotensin II Induces Cardiomyocyte Hypertrophy Probably through Histone Deacetylases. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 219(1):17–23.
- Lu, Z., Xu, X., Fassett, J., Kwak, D., Liu, X., Hu, X., Wang, H., Guo, H., Xu, D., Yan, S., Mcfalls, E. O., Lu, F., Bache, R. J., und Chen, Y. (2014). Loss of the Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase General Control Nonderepressible 2 Protects Mice From Pressure Overload – Induced Congestive Heart Failure Without Affecting Ventricular Hypertrophy. *Hypertension*, 1:128–135.
- Ma, H., Groth, R. D., Cohen, S. M., Emery, J. F., Li, B., Hoedt, E., Zhang, G., Neubert, T. A., und Tsien, R. W. (2014). γ CaMKII shuttles Ca²⁺/CaM to the nucleus to trigger CREB phosphorylation and gene expression. *Cell*, 159(2):281–294.
- Mak, D.-O. D. und Foskett, J. K. (2015). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium*, 58(1):67–78.
- Malhas, A., Goulbourne, C., und Vaux, D. J. (2011). The nucleoplasmic reticulum: Form and function. *Trends in Cell Biology*, 21(6):362–373.
- Marius, P., Guerra, M. T., Nathanson, M. H., Ehrlich, B. E., und Leite, M. F. (2006). Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 39:65–73.

- Mathew, J., Sleight, P., Lonn, E., Johnstone, D., Pogue, J., Yi, Q., Bosch, J., Sussex, B., Probstfield, J., und Yusuf, S. (2001). Reduction of Cardiovascular Risk by Regression of Electrocardiographic Markers of Left Ventricular Hypertrophy by the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Ramipril. *Circulation*, 104:1615–1621.
- Mathiesen, S. B., Lunde, M., Aronsen, J. M., Romaine, A., Kaupang, A., Martinsen, M., De Souza, G. A., Nyman, T. A., Sjaastad, I., Christensen, G., und Carlson, C. R. (2019). The cardiac syndecan-4 interactome reveals a role for syndecan-4 in nuclear translocation of muscle LIM protein (MLP). *Journal of Biological Chemistry*, 294(22):8717–8731.
- Mauceri, D., Freitag, H. E., Oliveira, A. M., Bengtson, C. P., und Bading, H. (2011). Nuclear Calcium-VEGFD Signaling Controls Maintenance of Dendrite Arborization Necessary for Memory Formation. *Neuron*, 71(1):117–130.
- Mauceri, D., Hagenston, A. M., Schramm, K., Weiss, U., und Bading, H. (2015). Nuclear calcium buffering capacity shapes neuronal architecture. *Journal of Biological Chemistry*, 290(38):23039–23049.
- Mayeda, A., Badolato, J., Kobayashi, R., Zhang, M. Q., Gardiner, E. M., und Krainer, A. R. (1999). Purification and characterization of human RNPS1: A general activator of pre-mRNA splicing. *EMBO Journal*, 18(16):4560–4570.
- McCalmon, S. A., Desjardins, D. M., Ahmad, S., Davidoff, K. S., Snyder, C. M., Sato, K., Ohashi, K., Kielbasa, O. M., Mathew, M., Ewen, E. P., Walsh, K., Gavras, H., und Naya, F. J. (2010). Modulation of Angiotensin II-Mediated Cardiac Remodeling by the MEF2A Target Gene Xirp2. *Circulation Research*, 106(5):952–960.
- McCarty, D., Monahan, P., und Samulski, R. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Therapy*, 8(16):1248–1254.
- Melaku, L. und Desalegn, T. (2019). Molecular mediators, characterization of signaling pathways with descriptions of cellular distinctions in pathophysiology of cardiac hypertrophy and molecular changes underlying a transition to heart failure. *International Journal of Health and Allied Sciences*, 8(1):1.
- Metz, R. P., Patterson, J. L., und Wilson, E. (2012). Isolation of Cardiac Myocytes and Fibroblasts from Neonatal Rat Pups. In Peng, X. und Antonyak, M., Herausgeber, *Cardiovascular Development: Methods and Protocols*, Band 843 in *Methods in Molecular Biology*, Kapitel 20, Seiten 169–176. Humana Press, Totowa, NJ.

- Michele, D. E., Szatkowski, M. L., Albayya, F. P., und Metzger, J. M. (2004). Parvalbumin gene delivery improves diastolic function in the aged myocardium in vivo. *Molecular Therapy*, 10(2):399–403.
- Michelle, L., Cloutier, A., Toutant, J., Shkreta, L., Thibault, P., Durand, M., Garneau, D., Gendron, D., Lapointe, E., Couture, S., Le Hir, H., Klinck, R., Elela, S. A., Prinos, P., und Chabot, B. (2012). Proteins Associated with the Exon Junction Complex Also Control the Alternative Splicing of Apoptotic Regulators. *Molecular and Cellular Biology*, 32(5):954–967.
- Molkentin, J. D., Lu, J.-R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., und Olson, E. N. (1998). A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell*, 93(2):215–228.
- Monaco, S., Jahraus, B., Samstag, Y., und Bading, H. (2016). Nuclear calcium is required for human T cell activation. *Journal of Cell Biology*, 215(2):231–243.
- Mudd, J. O. und Kass, D. A. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, 451(7181):919–928.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Menzel, S., und Ruth, P. (2013). *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, 10. Auflage.
- Nagai, H., Satomi, T., Abiru, A., Miyamoto, K., Nagasawa, K., Maruyama, M., Yamamoto, S., Kikuchi, K., Fuse, H., Noda, M., und Tsujihata, Y. (2017). Antihypertrophic Effects of Small Molecules that Maintain Mitochondrial ATP Levels Under Hypoxia. *EBioMedicine*, 24:147–158.
- Nakagawa, O., Arnold, M., Nakagawa, M., Hamada, H., Shelton, J. M., Kusano, H., Harris, T. M., Childs, G., Campbell, K. P., Richardson, J. A., Nishino, I., und Olson, E. N. (2005). Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes and Development*, 19(17):2066–2077.
- Nakamura, M. und Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology*, 15(7):387–407.
- Nakao, S., Wakabayashi, S., und Nakamura, T. Y. (2015). Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca²⁺ signaling in cardiomyocytes: A role of neuronal calcium sensor-1. *PLoS ONE*, 10(4):1–16.
- Nakayama, H., Bodi, I., Maillet, M., Desantiago, J., Domeier, T. L., Mikoshiba, K., Lorenz, J. N., Blatter, L. A., Bers, D. M., und Molkentin, J. D. (2010). The IP3 receptor

- regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circulation Research*, 107(5):659–666.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart—an engine out of fuel. *The New England journal of medicine*, 356(11):1140–51.
- Niggli, E., Ullrich, N. D., Gutierrez, D., Kyrychenko, S., Poláková, E., und Shirokova, N. (2013). Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca²⁺ signaling and EC-coupling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(4):866–875.
- Oda, T., Yamamoto, T., Kato, T., Uchinoumi, H., Fukui, G., Hamada, Y., Nanno, T., Ishiguchi, H., Nakamura, Y., Okamoto, Y., Kono, M., Okuda, S., Kobayashi, S., Bers, D. M., und Yano, M. (2018). Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 125:87–97.
- Ogawa, E., Saito, Y., Harada, M., Kamitani, S., Kuwahara, K., Miyamoto, Y., Ishikawa, M., Hamanaka, I., Kajiyama, N., Takahashi, N., Nakagawa, O., Masuda, I., Kishimoto, I., und Nakao, K. (2000). Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(5):765–776.
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., und Kurose, H. (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *The EMBO Journal*, 25(22):5305–5316.
- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., Overbeek, P., Richardson, J. A., Grant, S. R., und Olson, E. N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 105(10):1395–1406.
- Pattern, R. (2019). Neonatal rat cardiomyocyte harvest protocol.
- Perez, P. J., Ramos-Franco, J., Fill, M., und Mignery, G. A. (1997). Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38):23961–23969.
- Peter, A. K., Bjerke, M. A., und Leinwand, L. A. (2016). Biology of the cardiac myocyte in heart disease. *Molecular Biology of the Cell*, 27(14):2149–2160.
- Pieske, B., Tschöpe, C., De Boer, R. A., Fraser, A. G., Anker, S. D., Donal, E., Edelman, F., Fu, M., Guazzi, M., Lam, C. S., Lancellotti, P., Melenovsky, V., Morris, D. A., Nagel, E., Pieske-Kraigher, E., Ponikowski, P., Solomon, S. D., Vasan, R. S., Rutten,

- F. H., Voors, A. A., Ruschitzka, F., Paulus, W. J., Seferovic, P., und Filippatos, G. (2019). How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: The HFA-PEFF diagnostic algorithm: A consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 40(40):3297–3317.
- Piquereau, J. und Ventura-Clapier, R. (2018). Maturation of cardiac energy metabolism during perinatal development. *Frontiers in Physiology*, 9(959):1–10.
- Pleger, S. T., Most, P., Boucher, M., Soltys, S., Chuprun, J. K., Pleger, W., Gao, E., Dasgupta, A., Rengo, G., Remppis, A., Katus, H. A., Eckhart, A. D., Rabinowitz, J. E., und Koch, W. J. (2007). Stable Myocardial-Specific AAV6-S100A1 Gene Therapy Results in Chronic Functional Heart Failure Rescue. *Circulation*, 115(19):2506–2515.
- Prasad, A. M., Ma, H., Sumbilla, C., Lee, D. I., Klein, M. G., und Inesi, G. (2007). Phenylephrine hypertrophy, Ca²⁺-ATPase (SERCA2), and Ca²⁺ signaling in neonatal rat cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(6):C2269–C2275.
- Prasad, K.-M. R., Smith, R. S., Xu, Y., und French, B. A. (2011). A single direct injection into the left ventricular wall of an adeno-associated virus 9 (AAV9) vector expressing extracellular superoxide dismutase from the cardiac troponin-T promoter protects mice against myocardial infarction. *The Journal of Gene Medicine*, 13(6):333–341.
- Pusl, T., Wu, J. J., Zimmerman, T. L., Zhang, L., Ehrlich, B. E., Berchtold, M. W., Hoek, J. B., Karpen, S. J., Nathanson, M. H., und Bennett, A. M. (2002). Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30):27517–27527.
- Putinski, C., Abdul-Ghani, M., Stiles, R., Brunette, S., Dick, S. A., Fernando, P., und Megeney, L. A. (2013). Intrinsic-mediated caspase activation is essential for cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43):E4079–E4087.
- Quan, N., Li, X., Zhang, J., Han, Y., Sun, W., Ren, D., Tong, Q., und Li, J. (2020). Substrate metabolism regulated by Sestrin2–mTORC1 alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy in aged heart. *Redox Biology*, 36(June).
- Ronzitti, G., Gross, D.-A., und Mingozi, F. (2020). Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Frontiers in Immunology*, 11(April):1–13.
- Rutering, J., Ilmer, M., Recio, A., Coleman, M., Vykoukal, J., Alt, E., und Orleans, N. (2015). Improved Method for Isolation of Neonatal Rat Cardiomyocytes with Incre-

- ased Yield of C-Kit⁺ Cardiac Progenitor Cells. *Journal of Stem Cell Research and Therapy*, 05(09):1–8.
- Sadoshima, J. I. und Izumo, S. (1993). Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts critical role of the AT1 receptor subtype. *Circulation Research*, 73(3):413–423.
- Sadoshima, J. I., Jahn, L., Takahashi, T., Kulik, T. J., und Izumo, S. (1992). Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 267(15):10551–10560.
- Samadder, P., Weng, N., Doetschman, T., Heimark, R. L., und Galbraith, D. W. (2016). Flow cytometry and single nucleus sorting for Cre-based analysis of changes in transcriptional states. *Cytometry Part A*, 89(5):430–442.
- Sanliyalp, A., Schumacher, D., Kiper, L., Varma, E., Riechert, E., Ho, T. C., Hofmann, C., Kmietczyk, V., Zimmermann, F., Dlugosz, S., Wirth, A., Gorska, A. A., Burghaus, J., Camacho Londoño, J. E., Katus, H. A., Doroudgar, S., Freichel, M., und Völkens, M. (2020). Saraf-dependent activation of mTORC1 regulates cardiac growth. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 141(March):30–42.
- Sano, M., Fukuda, K., Kodama, H., Pan, J., Saito, M., Matsuzaki, J., Takahashi, T., Makino, S., Kato, T., und Ogawa, S. (2000). Interleukin-6 Family of Cytokines Mediate Angiotensin II-induced Cardiac Hypertrophy in Rodent Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38):29717–29723.
- Schiattarella, G. G. und Hill, J. A. (2015). Inhibition of Hypertrophy Is a Good Therapeutic Strategy in Ventricular Pressure Overload. *Circulation*, 131(16):1435–1447.
- Schlumm, F., Mauceri, D., Freitag, H. E., und Bading, H. (2013). Nuclear calcium signaling regulates nuclear export of a subset of class iia histone deacetylases following synaptic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12):8074–8084.
- Schwaller, B. (2010). Cytosolic Ca²⁺ Buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2:1–20.
- Sciarretta, S., Forte, M., Frati, G., und Sadoshima, J. (2018). New Insights Into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 122(3):489–505.
- Scriven, D. R., Dan, P., und Moore, E. D. (2000). Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes. *Biophysical Journal*, 79(5):2682–2691.

- Sechi, L. A., Griffin, C. A., Grady, E. F., Kalinyak, J. E., und Schambelan, M. (1992). Characterization of Angiotensin II Receptor Subtypes in Rat Heart. *Circulation Research*, 71(6):1482–1489.
- Shannon, T. R., Wang, F., Puglisi, J., Weber, C., und Bers, D. M. (2004). A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte. *Biophysical Journal*, 87(5):3351–3371.
- Shimizu, I. und Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 97:245–262.
- Shimojima, M., Yuasa, S., Motoda, C., Yozu, G., Nagai, T., Ito, S., Lachmann, M., Kashimura, S., Takei, M., Kusumoto, D., Kunitomi, A., Hayashiji, N., Seki, T., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Egashira, T., Hayashi, K., Nakanishi, C., Sakata, K., Yamagishi, M., und Fukuda, K. (2017). Emerin plays a crucial role in nuclear invagination and in the nuclear calcium transient. *Nature Scientific Reports*, 7(44312):1–16.
- Simonetti, M., Hagenston, A. M., Vardeh, D., Freitag, H. E., Mauceri, D., Lu, J., Satagopam, V. P., Schneider, R., Costigan, M., Bading, H., und Kuner, R. (2013). Nuclear Calcium Signaling in Spinal Neurons Drives a Genomic Program Required for Persistent Inflammatory Pain. *Neuron*, 77(1):43–57.
- Simpson, P., McGrath, A., und Savion, S. (1982). Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circulation Research*, 51(6):787–801.
- Simpson, P. und Savion, S. (1982). Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circulation Research*, 50(1):101–116.
- Somia, N. und Verma, I. M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Reviews*, 1(November):91–99.
- Speckmann, E.-J., Hescheler, J., und Köhling, R. (2019). *Physiologie*. Elsevier GmbH, 7. Auflage.
- Spirito, P., Bellone, P., Harris, K. M., Bernabo, P., Bruzzi, P., und Maron, B. J. (2000). Magnitude Of Left Ventricular Hypertrophy And Risk Of Sudden Death In Hypertrophic Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 342(24):1778–1785.
- Stanton, L. W., Garrard, L. J., Damm, D., Garrick, B. L., Lam, A., Kapoun, A. M., Zheng, Q., Protter, A. A., Schreiner, G. F., und White, R. T. (2000). Altered Patterns of Gene Expression in Response to Myocardial Infarction. *Circulation Research*, 86:939–945.

- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., und Lancet, D. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1):1.30.1–1.30.33.
- Stuck, B. J., Lenski, M., Böhm, M., und Laufs, U. (2008). Metabolic Switch and Hypertrophy of Cardiomyocytes following Treatment with Angiotensin II Are Prevented by AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47):32562–32569.
- Sturchler, E., Feurstein, D., Chen, W., McDonald, P., und Duckett, D. (2013). Stress-induced nuclear import of apoptosis signal-regulating kinase 1 is mediated by karyopherin $\alpha 2/\beta 1$ heterodimer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(3):583–592.
- Sundgren, N. C., Giraud, G. D., Stork, P. J., Maylie, J. G., und Thornburg, K. L. (2003). Angiotensin II stimulates hyperplasia but not hypertrophy in immature ovine cardiomyocytes. *Journal of Physiology*, 548(3):881–891.
- Sutanto, H., Lyon, A., Lumens, J., Schotten, U., Dobrev, D., und Heijman, J. (2020). Cardiomyocyte calcium handling in health and disease: Insights from in vitro and in silico studies. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 00(00):1–22.
- Suzuki, T., Hoshi, H., Sasaki, H., und Mitsui, Y. (1991). Endothelin-1 Stimulates Hypertrophy and Contractility of Neonatal Rat Cardiac Myocytes in a Serum-Free Medium. II. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 17(1):S182–186.
- Szatkowski, M. L., Westfall, M. V., Gomez, C. A., Wahr, P. A., Michele, D. E., DelloRusso, C., Turner, I. I., Hong, K. E., Albayya, F. P., und Metzger, J. M. (2001). In vivo acceleration of heart relaxation performance by parvalbumin gene delivery. *Journal of Clinical Investigation*, 107(2):191–197.
- Toraason, M., Krueger, J. A., Busch, K. A., und Shaw, P. B. (1990). Automated surface area measurement of cultured cardiac myocytes. *Cytotechnology*, 4(2):155–161.
- Tse, J., Powell, J. R., Baste, C. A., Priest, R. E., und Kuo, J. F. (1979). Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy : Modifications in Characteristics of Beta-Adrenergic Receptor, Adenylate Cyclase, and Ventricular Contraction. *Endocrinology*, 105(1):246–255.
- Van Der Watt, P. J., Chi, A., Stelma, T., Stowell, C., Strydom, E., Carden, S., Angus, L., Hadley, K., Lang, D., Wei, W., Birrer, M. J., Trent, J. O., und Leaner, V. D. (2016).

- Targeting the nuclear import receptor Kpn β 1 as an anticancer therapeutic. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(4):560–573.
- van Riet, E. E., Hoes, A. W., Wagenaar, K. P., Limburg, A., Landman, M. A., und Rutten, F. H. (2016). Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *European Journal of Heart Failure*, 18(3):242–252.
- Vandergriff, A. C., Hensley, M. T., und Cheng, K. (2015). Isolation and Cryopreservation of Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Journal of Visualized Experiments*, 98(e52726):1–7.
- Vazquez-hidalgo, E., Barba, T., Zhang, X., Paolini, P., und Katira, P. (2021). Downregulation of RyR and NCX in the neonatal rat ventricular myocyte modulates cytosolic [Ca²⁺]. *BioRxiv*, 2021.10.20:1–14.
- Vega, R. B., Harrison, B. C., Meadows, E., Roberts, C. R., Papst, P. J., Olson, E. N., und McKinsey, T. A. (2004). Protein Kinases C and D Mediate Agonist-Dependent Cardiac Hypertrophy through Nuclear Export of Histone Deacetylase 5. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19):8374–8385.
- Virani, S. S., Alonso, A., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Delling, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S., Ferguson, J. F., Fornage, M., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Kwan, T. W., Lackland, D. T., Lewis, T. T., Lichtman, J. H., Longenecker, C. T., Loop, M. S., Lutsey, P. L., Martin, S. S., Matsushita, K., Moran, A. E., Mussolino, M. E., Perak, A. M., Rosamond, W. D., Roth, G. A., Sampson, U. K., Satou, G. M., Schroeder, E. B., Shah, S. H., Shay, C. M., Spartano, N. L., Stokes, A., Tirschwell, D. L., VanWagner, L. B., und Tsao, C. W. (2020). Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 141(9):E139–E596.
- Voelkers, M., Salz, M., Herzog, N., Frank, D., Dolatabadi, N., Frey, N., Gude, N., Friedrich, O., Koch, W. J., Katus, H. A., Sussman, M. A., und Most, P. (2010). Orai1 and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(6):1329–1334.
- Wallukat, G. (2002). The β -Adrenergic Receptors. *Herz*, 27(7):683–690.
- Walsh, S., Pontén, A., Fleischmann, B. K., und Jovinge, S. (2010). Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo—An analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovascular Research*, 86(3):365–373.

- Wang, J., Campos, B., Jamieson, G. A., Kaetzel, M. A., und Dedman, J. R. (1995). Functional Elimination of Calmodulin within the Nucleus by Targeted Expression of an Inhibitor Peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51):30245–30248.
- Wang, Y., Zhang, Y., Ding, G., May, H. I., Xu, J., Gillette, T. G., Wang, H., und Wang, Z. V. (2017). Temporal dynamics of cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 313(6):H1119–H1129.
- Watkins, S. J., Borthwick, G. M., und Arthur, H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 47(2):125–131.
- Watkins, S. J., Borthwick, G. M., Oakenfull, R., Robson, A., und Arthur, H. M. (2012). Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro is TAK1-dependent and Smad2/3-independent. *Hypertension Research*, 35(4):393–398.
- Wodsedalek, D. J., Paddock, S. J., Wan, T. C., Auchampach, J. A., Kenarsary, A., Tsaih, S.-W., Flister, M. J., und O'Meara, C. C. (2018). IL-13 promotes in vivo neonatal cardiomyocyte cell cycle activity and heart regeneration. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 316(1):H24–H34.
- Woodcock, E. A., Du, X.-J., Reichelt, M. E., und Graham, R. M. (2007). Cardiac 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovascular Research*, 77(3):452–462.
- Wu, X., Zhang, T., Bossuyt, J., Li, X., McKinsey, T. A., Dedman, J. R., Olson, E. N., Chen, J., Brown, J. H., und Bers, D. M. (2006). Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *Journal of Clinical Investigation*, 116(3):675–682.
- Wu, Y., Zhou, L., Liu, H., Duan, R., Zhou, H., Zhang, F., He, X., Lu, D., Xiong, K., Xiong, M., Zhuang, J., Liu, Y., Li, L., Liang, D., und Chen, Y. H. (2021). LRP6 downregulation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Cell Research*, 31(4):450–462.
- Yue, P., Xia, S., Wu, G., Liu, L., Zhou, K., Liao, H., Li, J., Zheng, X., Guo, Y., Hua, Y., Zhang, D., und Li, Y. (2021). Attenuation of Cardiomyocyte Hypertrophy via Depletion Myh7 using CASAIV. *Cardiovascular Toxicology*, 21(3):255–264.
- Zeitz, M. J. und Smyth, J. W. (2020). Translating Translation to Mechanisms of Cardiac Hypertrophy. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 7(1):9.

- Zhang, C., Shan, X. L., Liao, Y. L., Zhao, P., Guo, W., Wei, H. C., und Lu, R. (2014). Effects of stachydrine on norepinephrine-induced neonatal rat cardiac myocytes hypertrophy and intracellular calcium transients. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1):1–9.
- Zhang, S. J., Zou, M., Lu, L., Lau, D., Ditzel, D. A. W., Delucinge-Vivier, C., Aso, Y., Descombes, P., und Bading, H. (2009). Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: Identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genetics*, 5(8).
- Zhang, Y., Matkovich, S. J., Duan, X., Gold, J. I., Koch, W. J., und Dorn, G. W. (2011). Nuclear Effects of G-Protein Receptor Kinase 5 on Histone Deacetylase 5–Regulated Gene Transcription in Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*, 4(5):659–668.
- Zhang, Z., Guo, M., Liu, Y., Liu, P., Cao, X., Xu, Y., und Zhu, X. (2020). RNPS1 inhibition aggravates ischemic brain injury and promotes neuronal death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 523(1):39–45.
- Zhou, H., Shen, D. F., Bian, Z. Y., Zong, J., Deng, W., Zhang, Y., Guo, Y. Y., Li, H., und Tang, Q. Z. (2011). Activating transcription factor 3 deficiency promotes cardiac hypertrophy, dysfunction, and fibrosis induced by pressure overload. *PLoS ONE*, 6(10):2–10.
- Zima, A. V., Bare, D. J., Mignery, G. A., und Blatter, L. A. (2007). IP3-dependent nuclear Ca²⁺ signalling in the mammalian heart. *Journal of Physiology*, 584(2):601–611.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., und Rabinowitz, J. E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(6):1073–1080.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Marc Freichel, der diese Arbeit persönlich durch all ihre Höhen und Tiefen betreut hat und diese Arbeit, sowie meine persönliche Entwicklung über konstruktive Diskussionen, Feedback und Anregungen gefördert und mir auch den Raum gegeben hat, meine eigene Schlussfolgerungen und Hypothesen zu entwickeln.

Des Weiteren möchte ich meinen Betreuern Prof. Patrick Most und Prof. Hilmar Bading danken, die mit ihrem konstruktiven Feedback maßgeblich den Fortschritt dieser Arbeit vorangetrieben haben. Insbesondere möchte ich den Beitrag von Prof. Patrick Most betonen, der darüber hinaus die Ressourcen und das Wissen seiner Arbeitsgruppe zur Unterstützung dieses Projektes eingesetzt hat.

Dr. Rebekka Medert, Dr. Jenny Bröker-Lai, Dr. Angela Wirth, Christin Richter, Xenia Tolksdorf, Dr. Juan Camacho Londoño, Dr. Michael Berlin und Dr. Vladimir Kuryshev danke ich für Ihre Geduld und Unterstützung mit der sie mir zahlreiche Methoden beigebracht und teilweise Beiträge zu einigen der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen geleistet haben. Insbesondere möchte ich Dr. Rebekka Medert danken, die in meine fachliche und persönliche Entwicklung neben ihrer eigenen Promotion nach Kräften unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich Hans-Peter Gensheimer, Manuela Ritzal, Elisabeth Janesch, Beate Hilbert, Irina Kupin und Xenia Tolksdorf für ihre exzellente technische Assistenz danken.

Neben den bisher genannten aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Freichel, danke ich Dr. Axel Kraft, Yoko Oguchi, Dr. Robin Sachdeva, Roger Ottenheim, Dr. Alexander Schürger, Dr. Dagmar Schumacher, Linlin Yang, Dr. Volodymyr Tsvilovskyy, Marianne Hartmann, Anastasia Zukhovets, Linda Dotterweich, Winder Brinceno und insbesondere Melanie Bender und Lilia Falkenstern für ihre Motivation, ihren Teamgeist und viele koffeingestützte, konstruktive Diskussionen in allen Lebenslagen.

Mein Dank geht an dieser Stelle auch an die vielen externen Kollaboratoren Prof. Johannes Backs, Prof. Mirko Völkers, Prof. Christoph Dieterich, Dr. Vladimir Benes, Enio Gjerga, Dr. Monika Langlotz, Meike Schrader, Dr. Martin Busch und Dr. Andreas Jungmann, die diese Arbeit mit ihrem Fachwissen, ihren Laborgeräten und ihrer Unterstützung überhaupt möglich gemacht haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich unermüdlich auf dieser Reise begleitet, unterstützt und angefeuert haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Appendix

Tabelle 35: Vergleich der Zusammensetzung von DMEM GlutaMAX und M199 Medium

Komponente	DMEM GlutaMAX g/l	M199 g/l
Anorganische Salze		
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2	0,2
Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O	1*10 ⁻⁴	7,2*10 ⁻⁴
MgSO ₄	0,09767	0,09767
KCl	0,4	0,4
KH ₂ PO ₄		0
Na*Acetat	0	0,05
NaHCO ₃	3,7	2,2
NaCl	6,4	6,0
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	0,125	0
NaH ₂ PO ₄	0	0,122
Aminosäuren		
L-Alanin	0	0,025
L-Alanyl-Glutamin	0,862	0
L-Arginin*HCl	0,084	0,07
L-Asparaginsäure	0	0,03
L-Cystein*2H ₂ O	0	1,1*10 ⁻⁵
L-Cystein*HCl*H ₂ O	0	0,026
L-Cystein*2HCl	0,063	0
L-Glutaminsäure	0	0,0668
L-Glutamin	0	0
Glycin	0,03	0,05
L-Histidin*HCl*H ₂ O	0,042	0,02188
Hydroxy-L-Prolin	0	0,01
L-Isoleucin	0,105	0,02
L-Leucin	0,105	0,06
L-Lysin*HCl	0,146	0,07
L-Methionin	0,03	0,15
L-Phenylalanin	0,066	0,025
L-Prolin	0	0,04
L-Serin	0,042	0,025
L-Threonin	0,095	0,03
L-Tryptophan	0,016	0,01

L-Tyrosin*2Na*2H ₂ O	0,104	0,05766
L-Valin	0,094	0,025
Vitamine		
Ascorbinsäure*Na	0	5,66*10 ⁻⁵
D-Biotin	0	1*10 ⁻⁵
Calciferol	0	1*10 ⁻⁴
Cholinchlorid	4*10 ⁻³	5*10 ⁻⁴
D-Calcium Panthotenat	4*10 ⁻³	0
Folsäure	4*10 ⁻³	1*10 ⁻⁵
Menadion (Natrium Bisulfit)	0	1,6*10 ⁻⁵
myo-Inositol	0	5*10 ⁻⁵
Niazinamid	4*10 ⁻³	2,5*10 ⁻⁵
Nikotinsäure	0	2,5*10 ⁻⁵
p-Amino-Benzoesäure	0	5*10 ⁻⁵
D-Pantothensäure*0,5 Ca	0	1*10 ⁻⁵
Pyridoxal*HCl	0	2,5*10 ⁻⁵
Pyridoxin*HCl	4*10 ⁻³	2,5*10 ⁻⁵
Retinolacetat	0	1,4*10 ⁻⁴
Riboflavin	4*10 ⁻⁴	1*10 ⁻⁵
DL- α -	0	1*10 ⁻⁵
Tocopherolphosphat*2Na		
Thiamin*HCl	0	1*10 ⁻⁵
i-Inositol	7.2*10 ⁻³	0
Sonstiges		
Adeninsulfat	0	0,01
Adenosintriphosphat*2Na	0	0,001
Adenosinmonophosphat*Na	0	2,385*10 ⁻⁴
Cholesterol	0	2*10 ⁻³
Deoxyribose	0	5*10 ⁻³
Glucose	4,5	1
Glutathion (reduziert)	0	5*10 ⁻⁵
Guanin*HCl	0	3*10 ⁻⁴
HEPES	0	5,958
Hypoxanthin	0	3*10 ⁻⁴
Phenolrot*Na	0,015	0,0213
TWEEN 80	0	0,02
Ribose	0	5*10 ⁻⁴
Thymin	0	3*10 ⁻⁴
Uracil	0	3*10 ⁻⁴

Xanthin*Na	0	$3,44 \cdot 10^{-4}$
Natriumpyruvat	0,11	0

Tabelle 36: Durch CaMBP4 veränderte Transkriptionsfaktoraktivitäten in Abwesenheit von PE.

id	nes	pval
Glyr1	-5,80602872	0
Esr1	4,87572876	0
Zfp750	4,53010721	0,002
Hif1a	4,45192274	0,001
Trp53	4,39623731	0,001
Etv4	3,90250788	0
Mbd3	3,89026501	0,006
Smad4	3,58108567	0
Smad3	3,46960669	0,002
Jun	3,4338302	0,005
Sp1	3,37151714	0,022
Tfap2a	3,35728336	0,003
Nfil3	3,35405981	0,001001001
Runx2	3,27091793	0,005
Sp3	3,19866208	0,002
Pou5f1	3,1633988	0,006
Rfx5	-3,0656809	0
Spi1	3,04177347	0,005
Stat1	3,0304375	0,044
Hoxa10	3,00890784	0,004
Spib	2,95544022	0,014
Egr1	2,93500337	0,026
Fosl2	2,93135142	0,009
Nr2f1	2,89432232	0,012
Cebpa	2,73908677	0,029
Hmga1	2,68742127	0,011
Hmga1b	2,68742127	0,015
Lef1	2,67578553	0,012
Gata4	2,66839252	0,01002004
Cebpd	2,66061717	0,006
Ppard	2,65448821	0,019
Rxrb	2,64992123	0,009
Sox10	-2,61398617	0,013
Stat3	2,61137751	0,027
Tead1	2,56047401	0,078
Tead4	2,55518584	0,05

Nfia	2,51934618	0,019
Tbx21	2,49410867	0,041
Cebpb	2,49020688	0,019
Sox13	2,42996127	0,035
Klf6	2,42859573	0,025
Atf4	2,40670187	0,025
Nfkb1	2,34928661	0,062
Smad1	2,34881572	0,021
Tfdp1	-2,32505017	0,034
Ppara	2,30803229	0,023
Hic1	-2,25174953	0,027
Ahr	2,21657326	0,024
Twist2	2,20174277	0,039
Srebf1	-2,18339623	0,043
Gata6	2,17127231	0,063
Dr1	2,16520681	0,02421308
Nfic	2,15733597	0,035
Ar	2,15481252	0,132
Nr2f2	-2,12908122	0,03885481
Ets2	2,11634932	0,053
Tcf4	2,09361992	0,079
Creb3	2,08726684	0,035
Junb	2,0777697	0,117
Zbtb33	-2,0399252	0,057
E2f3	-2,02748719	0,045
Zfy1	2,0233822	0,23
Zfy2	2,0233822	0,214
Pax6	2,01874047	0,03985507
Cxhc4	2,01412817	0,48
Mynn	1,99610941	0,527
Zfp217	1,99451375	0,046
Usf2	1,98176357	0,076
Pax5	1,97846242	0,091
Kdm5b	1,96508043	0,072
E2f5	1,96043019	0,05
E2f1	-1,953245	0,166
Tbp	1,94819122	0,111
Srf	1,94665008	0,07
Egr2	1,94111919	0,064

Epas1	1,89812255	0,062
Elk1	1,85781388	0,103
Mecp2	-1,80944611	0,089
Zbtb11	-1,80750618	0,094
Zfp207	1,80748484	0,577
Xbp1	1,78212984	0,099
Foxj2	-1,78060738	0,107
Six2	1,77851683	0,126
Ets1	1,77771638	0,145
Stat6	1,77614239	0,0840081
Rela	1,77456756	0,201
Nr1h4	1,7707758	0,083
Ascl1	1,73255224	0,138
Klf5	1,71644939	0,095
Atf3	-1,70436971	0,08409321
Nr2c2	-1,67319032	0,252
Rarb	1,67171953	0,146
Erg	1,66518909	0,104
Tcf7l2	1,65209342	0,108
Arnt	1,64451735	0,097
Foxo3	1,63921521	0,164
Pcgf2	1,63817611	0,352
Duxbl1	1,63274101	0,126
Duxbl2	1,63274101	0,139
Duxbl3	1,63274101	0,123
Rara	1,59888442	0,127
Adnp	1,59741719	0,542
Gabpa	-1,5851381	0,212
Trp73	1,55296243	0,205
Clock	1,54023921	0,248
Pou2f1	1,53999066	0,154
Prdm14	1,5055991	0,408
Rarg	1,48425696	0,201
Setdb1	-1,46014417	0,623
Nfe2l2	1,44900803	0,17
Satb1	-1,4424647	0,15430862
Nrf1	-1,41850377	0,309
Tfcp2	1,41591823	0,158
Pparg	1,37557106	0,206

Grhl2	1,35729837	0,296
Cebpe	1,3487603	0,17629179
Rbpj	1,3357325	0,323
Stat5b	1,32831772	0,209
Pax8	1,32734595	0,187
E2f2	-1,31587256	0,198
Pou2f2	1,31216804	0,335
Zzz3	1,30231535	0,415
Ctcf	1,27269575	0,33
Otx2	1,27085106	0,23
Creb3l1	1,26679723	0,257
Onecut1	1,25956681	0,332
Zbtb16	1,25236705	0,21
Terf2	1,25228737	0,734
Esrra	1,2484191	0,37
Stat4	1,24473139	0,22645291
Kmt2b	-1,23739311	0,435
Thap1	1,22911735	0,337
Neurod1	1,21841577	0,282
Hnf1a	1,20563305	0,24124124
Klf1	1,20079522	0,348
Tfap2c	1,16891603	0,27054108
Nfya	-1,16237356	0,268
Klf3	1,13351109	0,296
Gli2	-1,11530357	0,253
Tcf12	1,11382446	0,462
Rfx1	-1,08064347	0,337
Foxk2	-1,07324086	0,399
Atf2	1,0708334	0,316
Gata3	1,06567701	0,416
Srebf2	-1,06363332	0,288
Mef2c	1,0511979	0,269
Max	1,04639716	0,276
Pknox1	-1,04296294	0,366
Elk4	1,04264466	0,334
Tead2	1,04073244	0,386
Pin1	-1,03157375	0,315
Pin1rt1	-1,03157375	0,331
Nfkb2	1,01776513	0,314459

Klf9	1,01408375	0,46
Crem	-1,00469998	0,416
Maff	0,99883717	0,376
Irf2	0,98422562	0,462
Nr4a1	0,97793866	0,409
Nr5a2	0,96475363	0,395
Etv6	-0,96382497	0,3353353
Lyl1	0,95324582	0,476
Fli1	0,94447447	0,337
Pdx1	0,94370125	0,447
Gata2	-0,93910638	0,368
Nfatc1	0,93802177	0,417
Sox11	0,93149422	0,387
Pax3	0,90714762	0,357
Zfp384	-0,90660135	0,53
Maz	0,90126943	0,524
Ikzf1	0,89789247	0,415
Foxa1	0,89582005	0,392
Nme2	0,89391121	0,792
Atf6	0,89200244	0,374
E2f7	-0,88447351	0,443
Wt1	0,86847653	0,401
Mbd4	0,85531123	0,391
Ncoa3	-0,85022406	0,45
Gata1	0,84118663	0,42
Elf3	0,82795573	0,518
Zkscan1	0,81097848	0,528
Gli3	0,80532095	0,443
Smad5	-0,80424627	0,449
Mafg	0,79830015	0,511
Zfp592	0,79279197	0,476
Jund	0,78199217	0,446
Eomes	0,77192363	0,449
Irf9	-0,76970613	0,455
Pou3f2	0,75648959	0,4674675
Nfe2	0,74269674	0,576
Gtf2b	-0,73582683	0,926
Nanog	0,73510354	0,575
Stat5a	0,71225664	0,486

Batf	0,71012398	0,548
Irf3	-0,69990124	0,4994882
Nr1h2	0,69448741	0,532
Creb5	-0,69227671	0,509
Terf1	-0,68971684	0,925
Mycn	0,68782613	0,536
Elf5	-0,67037726	0,52
Gli1	0,66019709	0,597
Arntl	-0,65599661	0,511
Ncoa2	-0,65430241	0,577
Bach1	0,64840028	0,564
Meis2	-0,64429783	0,641
Sox2	0,6257492	0,5433231
E2f4	-0,60849037	0,814
Esr2	0,60027387	0,58
Stat2	-0,58682463	0,561
Hmgn3	0,57227281	0,946
Ehf	0,57122303	0,576
Mef2b	-0,56764848	0,579
Cebpz	-0,54121277	0,903
Foxp3	-0,52148604	0,59
Cbx2	0,50622058	0,872
Sp4	-0,50022742	0,714
Nfyb	0,45890718	0,76
Foxo1	-0,44805728	0,684
Tfap4	0,44175626	0,732
Hoxa1	-0,42890345	0,693
Ebf1	0,42765203	0,759
Zfx	-0,42494611	0,756
Hoxa9	0,42055631	0,656
Myc	0,41965636	0,931
Irf1	-0,41756025	0,698
Foxl2	0,41357712	0,685
Mef2a	0,40338628	0,807
Rfx2	-0,40113945	0,693
Cdx2	0,39607226	0,703
Ctcf1	0,38639583	0,761
Runx3	0,37825177	0,7141176
Zfp143	0,37476908	0,798

Zfp318	0,37286756	0,948
Rel	0,37267713	0,721
Atf1	0,3696887	0,708
Ncoa1	-0,366383	0,759
Gfi1b	0,36138527	0,729
Tcf7	0,35514541	0,789
Creb1	0,3458556	0,776
Usf1	0,34206241	0,769
Myod1	0,33616621	0,794
Klf4	-0,33446261	0,758
Cdx1	0,32197061	0,76
Tcf3	0,310191	0,747
Yy1	-0,30967628	0,799
Dnmt1	-0,30448686	0,773
Pgr	-0,3012143	0,752
Meis1	-0,28453016	0,775
Nr1i2	-0,27519596	0,892
Arid2	-0,27443979	0,76
Vdr	0,27272348	0,798
Pbx2	-0,26395416	0,83
Irf4	0,26065756	0,83
Bcl11a	-0,2605536	0,811
Trp63	-0,26042391	0,8
Etv1	0,25767461	0,824
Runx1	-0,2522106	0,806
Zfp740	-0,25065797	0,829
Sox6	0,24728247	0,823
Gtf2i	0,23651964	0,8288934
Ski	0,234376	0,8198307
Pbx3	-0,20794965	0,879
Fosl1	0,20024134	0,839
Cebpg	0,19322036	0,889
Mitf	-0,19209671	0,868
Elf1	0,19104173	0,898
Hinfp	0,18767075	0,867
Hsf1	-0,17993808	0,868
Mafk	-0,1766147	0,862
Pou4f2	0,1755505	0,856
Snapc4	0,17232463	0,876

Sp2	-0,16784	0,862
Prox1	-0,16670436	0,863
Hoxb13	-0,16076181	0,896
Irf8	-0,16023696	0,881
Rxra	0,15871932	0,8714859
Maf	-0,14996972	0,906
Foxo4	-0,14745366	0,87
Hoxb7	-0,14625823	0,91
Tal1	0,14404739	0,892
Mbd2	-0,12802519	0,898
Foxk1	0,1248127	0,934
Lhx2	0,12415523	0,896
Mybl2	0,11882311	0,915
Klf2	-0,10368107	0,9124088
Deaf1	-0,10266143	0,934
Nr1h3	-0,09661279	0,909
Prdm1	0,08756399	0,942
Bach2	-0,08535616	0,937
Ddit3	0,08145073	0,94
Cux1	0,07580081	0,951
Hnf4a	0,07387454	0,945
Myb	0,0727953	0,948
Nfyc	0,0612536	0,947
Foxp2	0,06062898	0,94
Fos	0,05834942	0,961
Brf2	0,05386685	0,988
Six5	0,04990669	0,967
Zfp644	0,04742523	0,994
Hnf1b	0,04582042	0,956
Twist1	0,04421984	0,959
Atf7	0,03665132	0,973
Nfe2l1	0,03316099	0,972
Mafb	-0,02669607	0,974
Foxm1	-0,01374169	0,992

Tabelle 37: **Durch CaMBP4 veränderte Transkriptionsfaktoraktivitäten unter PE Stimulation**

id	nes	pval
Junb	3,945525076	0
Prdm14	3,893924188	0,001
Zfp750	3,812311039	0,003
Ppard	3,766420865	0
Cxxc4	3,679720994	0,013
Mynn	3,500604265	0,021
Nfia	3,033305096	0,003003003
Stat1	2,944217937	0,035
Tead1	2,932541755	0,021
Gata6	2,915290353	0,009
Hmgn3	2,744922875	0,125
Nme2	2,737394093	0,079
Smad3	2,709271221	0,011
Mycn	-2,705842658	0,007
Nfe2	2,69253312	0,022
Esrra	2,690375673	0,015
E2f3	-2,683823755	0,008
Nanog	2,64817441	0,016
Glyr1	-2,635284722	0,139
Duxbl1	2,434296491	0,017
Duxbl2	2,434296491	0,03
Duxbl3	2,434296491	0,018
Atf3	-2,397950549	0,019387755
Nr2f1	2,393001138	0,028
Ebf1	2,380418793	0,046
Mef2a	2,377425649	0,061
Runx1	-2,334893857	0,025
E2f4	-2,315323161	0,103
Stat3	2,311899627	0,038
Cebpd	2,294347329	0,021
Brf2	-2,268209323	0,174
Wt1	2,260129864	0,028
Nr4a1	2,169956596	0,046
Esr2	-2,143955815	0,035
Tcf3	2,069535895	0,035
Tfap2a	2,056406724	0,081

Mbd2	2,043798249	0,048
Tfap4	2,042168087	0,073
Ar	2,039482927	0,115
Tbp	2,027277227	0,069
Gli3	2,018463023	0,04
Zbtb11	-2,01502122	0,054
Gata4	1,978699377	0,04723618
Dnmt1	-1,974104518	0,072
Esr1	1,96797181	0,136
Maff	1,965177575	0,068
Ctcf1	1,960991863	0,085
E2f2	-1,921299034	0,057
Elk1	1,911529347	0,082
Rfx2	-1,899188212	0,069
Cebpb	1,885329347	0,083
Nr1h2	-1,846439945	0,077
Zkscan1	1,835303349	0,106
Mbd3	1,817478411	0,337
Nfatc1	1,780211425	0,104
Klf4	-1,777515345	0,075
Kdm5b	1,772706376	0,091
Nr1i2	1,770059489	0,225
Egr1	1,768793674	0,198
Foxk2	1,7590478	0,107
Pgr	1,755081808	0,08
Zfp384	1,734904666	0,145
Klf2	-1,714286668	0,09798995
Mef2c	1,702441907	0,05
Batf	1,699828971	0,113
Mef2b	1,681510156	0,114
Creb1	1,677857709	0,13
Creb5	-1,65648414	0,1
Sp1	1,650812317	0,311
Irf9	-1,644179994	0,111
Adnp	1,629766136	0,409
Stat4	1,629084798	0,1031031
Erg	1,628456991	0,101
Arid2	1,615618538	0,108
Tfap2c	1,594618028	0,103

Stat2	-1,593256911	0,12136409
Foxa1	1,590526811	0,086
Hnf4a	1,578803624	0,172
Srebf2	1,574088463	0,129
Nfic	1,568010839	0,136
Trp73	-1,559138712	0,171
Smad4	1,552788481	0,153
Hoxa1	1,545557586	0,126
Sox13	1,545090953	0,189
Tead4	1,538860569	0,23
Nfkb2	-1,538404716	0,13975155
Klf1	1,537775391	0,193
Rxra	-1,53512423	0,13313313
Lef1	1,533896678	0,145
Pcgf2	1,532247369	0,313
Jund	1,51828526	0,133
Srf	1,507041921	0,125
E2f1	-1,49498657	0,269
Ehf	1,476219197	0,156
Sp2	1,464330924	0,18
Zfp644	1,460008193	0,482
Tbx21	-1,45123752	0,21
Mbd4	1,449818408	0,165
Zbtb33	-1,412234986	0,184
Six5	1,40863683	0,202
Klf9	1,397263992	0,273
Pbx3	1,386587715	0,266
Fos	-1,385832034	0,215
Rfx5	-1,375510551	0,18852459
Ascl1	1,345697755	0,228
Tcf12	1,335651837	0,331
Myod1	1,323742758	0,248
Eomes	-1,31993043	0,225
Nr1h3	-1,318640905	0,225
Lhx2	1,308494772	0,179
Max	1,302417189	0,159
Hoxb7	1,284872068	0,32
Otx2	-1,27967314	0,23
Six2	1,259245804	0,269

Cebpg	1,2561375	0,278
Nr2f2	1,251161547	0,22517912
Klf5	1,242306078	0,226
Creb3	1,23632431	0,22
Ahr	1,219878677	0,24
Creb3l1	1,217642685	0,234
Spib	1,206518728	0,305
Hif1a	1,191035834	0,453
Clock	1,176074393	0,315
Maf	1,174863226	0,293
Satb1	1,169631565	0,2447342
Gli1	-1,161504318	0,328
Xbp1	1,132003012	0,275
Jun	1,131559356	0,403
Smad1	1,12517191	0,312
Irf1	-1,115494417	0,28
Srebf1	1,107333005	0,304
Rarg	1,104315898	0,341
Thap1	1,088435613	0,355
Pou5f1	1,081589861	0,359
Stat5b	1,071351561	0,297
Fosl1	1,038180148	0,29
Terf1	1,024870425	0,748
E2f7	-1,020518132	0,401
Hoxa10	1,019095634	0,295
Pou3f2	1,013276144	0,3386774
Runx2	1,012233463	0,415
Twist2	1,00509553	0,323
Ets1	0,99651438	0,431
Gtf2b	0,993647679	0,753
Atf6	0,988077456	0,349
Twist1	-0,963296392	0,379
Atf1	0,949521686	0,344
Terf2	0,931420285	0,764
Zzz3	0,912689204	0,585
Klf3	0,912454667	0,371
Zfy1	0,912288701	0,582
Zfy2	0,912288701	0,582
Neurod1	0,905410951	0,426

Hnf1b	-0,90062106	0,346
Elf1	0,899046014	0,456
Zfp217	0,896238504	0,403
Ncoa3	0,892689638	0,43
Epas1	0,891114638	0,375
Elk4	0,889730301	0,398
Lyl1	0,884584494	0,494
Cdx2	-0,88221864	0,381
Sox10	-0,871752995	0,394
Gli2	0,868123429	0,42
Hic1	-0,854748017	0,405
Pax5	0,831819545	0,476
Foxj2	0,830961803	0,457
Foxk1	0,82666956	0,533
Pparg	0,820344252	0,428
Pdx1	0,805746866	0,5
Fli1	0,80384191	0,436
Cebpz	0,800755234	0,782
Nfkb1	0,79540465	0,561
Etv4	0,794604658	0,424
Rarb	0,790553459	0,478
Stat6	0,779522373	0,4676923
Rfx1	0,77888201	0,475
Etv1	-0,772266247	0,477
Stat5a	0,769164856	0,485
Snopc4	-0,768658697	0,506
Sox11	0,766735163	0,501
Nfe2l2	0,766705485	0,461
Irf4	-0,76594251	0,517
Gtf2i	-0,763628308	0,4535124
Rbpj	-0,762918974	0,519
Trp53	0,762878728	0,671
Hoxa9	0,759594364	0,479
Gata1	0,744702548	0,451
Zfp207	0,735942815	0,847
Maz	0,71391736	0,611
Pbx2	0,708587192	0,55
Irf2	0,705596399	0,581
Rela	0,689590984	0,609

Klf6	0,678869164	0,527
Tfdp1	-0,656961572	0,541
Gata3	0,656575723	0,557
E2f5	0,653395159	0,551
Spi1	0,646289228	0,592
Bcl11a	-0,635650071	0,576
Tead2	-0,629457385	0,558
Bach2	-0,606743552	0,571
Hmga1	0,604963752	0,544
Hmga1b	0,604963752	0,544
Mafk	0,601693437	0,547
Gata2	-0,598138579	0,545
Pax8	-0,598074928	0,5595596
Sp4	0,589316332	0,651
Sox6	-0,576228743	0,607
Mafg	0,572672425	0,617
Ppara	0,570236127	0,566
Tal1	-0,568794969	0,605
Foxo1	-0,568295551	0,576
Nfyc	0,565421599	0,598
Hsf1	-0,550938961	0,604
Hoxb13	0,543510965	0,628
Runx3	-0,531519079	0,6223862
Crem	-0,530688805	0,68
Ncoa2	0,526494004	0,625
Tcf7l2	0,525128575	0,592
Cebpa	-0,522106368	0,665
Mecp2	-0,522044739	0,603
Dr1	0,52050688	0,5904059
Nr5a2	0,516765229	0,646
Zfp592	0,514465194	0,626
Nfyb	-0,51207539	0,689
Bach1	-0,500869221	0,643
Cux1	0,496472955	0,656
Prox1	0,494587255	0,67
Elf5	-0,49074365	0,637
Nrf1	0,488152993	0,733
Egr2	-0,471194171	0,675
Tcf7	0,470601438	0,692

Sp3	0,462466043	0,685
Tfcp2	0,458643702	0,6576577
Elf3	-0,451737059	0,706
Ncoa1	0,451648434	0,675
Nr2c2	-0,443776729	0,749
Nr1h4	0,430232132	0,673
Setdb1	-0,425981973	0,881
Pou2f2	0,422268259	0,759
Fosl2	0,421111486	0,688
Ikzf1	-0,419105207	0,703
Foxo3	-0,412232365	0,711
Gabpa	-0,404838398	0,778
Mitf	-0,390050213	0,713
Pou2f1	-0,389720439	0,715
Foxp3	-0,383007335	0,702
Meis1	0,378015714	0,68
Atf2	0,373152394	0,744
Usf1	0,359640386	0,744
Foxp2	-0,358857773	0,717
Pax3	0,349067705	0,728
Arnt	0,339303962	0,749
Nfya	-0,330637393	0,757
Smad5	0,325563046	0,736
Etv6	-0,325342781	0,7419679
Usf2	-0,309689329	0,784
Ctcf	0,308178522	0,815
Pin1	0,306957497	0,781
Pin1rt1	0,306957497	0,757
Zfp143	-0,276162233	0,825
Ddit3	0,258036596	0,813
Pknox1	0,251039797	0,824
Zfp318	0,248597824	0,947
Myb	0,247240011	0,835
Pou4f2	0,240773938	0,81
Arntl	-0,23077027	0,814
Trp63	-0,2174822	0,851
Hinfp	-0,212478917	0,838
Foxo4	0,209107968	0,827
Deaf1	0,20398759	0,898

Nfil3	-0,194529426	0,8605817
Tcf4	0,16636117	0,903
Irf8	0,164749987	0,878
Rara	-0,162522647	0,885
Kmt2b	-0,157170654	0,904
Rxb1	0,151030875	0,89
Cdx1	0,146512028	0,888
Vdr	-0,14433709	0,897
Ets2	-0,132203509	0,897
Ski	-0,124142232	0,9067797
Foxl2	0,109914673	0,925
Foxm1	0,1085252	0,928
Zfx	0,107305239	0,932
Zbtb16	-0,098102179	0,916
Atf7	-0,09012142	0,932
Rel	-0,08869782	0,945
Cebpe	-0,080903509	0,9306122
Prdm1	0,070957861	0,947
Mybl2	0,069463633	0,953
Onecut1	-0,068974933	0,949
Atf4	-0,051627494	0,957
Mafk	0,047017185	0,965
Myc	-0,044543026	0,986
Meis2	-0,043155264	0,975
Hnf1a	0,043100985	0,956957
Pax6	-0,034277876	0,9807923
Yy1	0,032797665	0,982
Grhl2	-0,023918433	0,991
Cbx2	0,020000995	0,991
Nfe2l1	0,019373391	0,988
Zfp740	-0,01929643	0,989
Gfi1b	-0,008772972	0,998

Tabelle 38: Gene, die sowohl in PE stimulierten NRVCN als auch in CFA stimulierten Neuronen durch Expression von CaMBP4 differentiell reguliert werden. Identifizierte Gene sind alphabetisch nach dem Gensymbol geordnet. Dargestellt sind außerdem der ENSEMBL-Identifikator, der Basismittelwert (BaseMean), logFC und korrigierter p-Wert (padj) in NRVCNs

SYMBOL	ENSEMBL	baseMean	logFC	padj
Abcf2	ENSRNOG00000010609	293,79	-0,72	0,009
Acta2	ENSRNOG00000058039	1308,62	2,44	0,000
Actr10	ENSRNOG00000007504	387,02	-0,47	0,046
Ankrd13a	ENSRNOG00000001204	452,37	-0,88	0,033
Armc8	ENSRNOG00000014521	378,84	-0,64	0,036
Arrb1	ENSRNOG00000030404	48,04	1,79	0,017
As3mt	ENSRNOG00000020081	127,21	1,59	0,003
Bcl2l11	ENSRNOG00000016551	415,22	-1,44	0,000
Cald1	ENSRNOG00000010233	1008,76	1,43	0,043
Calm2	ENSRNOG00000030871	369,24	0,86	0,006
Calm3	ENSRNOG00000016770	391,66	0,75	0,025
Cap1	ENSRNOG00000013492	359,26	0,70	0,032
Carhsp1	ENSRNOG00000002610	714,25	0,79	0,030
Ccl27	ENSRNOG00000039530	24,32	2,41	0,039
Cd109	ENSRNOG00000025332	34,93	-3,32	0,001
Cd276	ENSRNOG00000033608	218,68	0,82	0,022
Cdkn1c	ENSRNOG00000059500	167,35	-1,88	0,009
Cds2	ENSRNOG00000021265	296,22	0,71	0,050
Cirbp	ENSRNOG00000015999	300,14	0,82	0,035
Cobl	ENSRNOG00000004281	115,58	1,17	0,011
Crip2	ENSRNOG00000005041	1633,43	0,92	0,040
Cryab	ENSRNOG00000010524	8245,78	0,65	0,027
Cst3	ENSRNOG00000005195	909,28	1,02	0,001
Cul3	ENSRNOG00000015633	1602,83	-0,39	0,006
Dgkz	ENSRNOG00000017737	323,58	0,98	0,036
Eef1a2	ENSRNOG00000012477	1727,24	0,85	0,005
Eif5	ENSRNOG00000010218	1063,08	-0,58	0,035
Fancc	ENSRNOG00000016889	12,44	-2,90	0,036
Fbxo32	ENSRNOG00000006738	957,98	0,59	0,025
Fcgr2b	ENSRNOG00000046452	9,07	-5,94	0,015
Fgf1	ENSRNOG00000013867	1116,05	0,88	0,024
Figl1	ENSRNOG00000004440	378,83	1,67	0,004
Flna	ENSRNOG00000054890	2371,75	0,94	0,026

Frmd6	ENSRNOG00000007329	299,05	-0,71	0,002
Gja1	ENSRNOG00000000805	6541,10	1,00	0,006
Gpm6a	ENSRNOG00000010731	152,99	0,99	0,022
Gpx1	ENSRNOG00000048812	473,29	0,76	0,037
Hdgf	ENSRNOG00000042261	248,59	1,22	0,000
Hectd2	ENSRNOG00000056753	555,67	-0,76	0,005
Hmgn3	ENSRNOG00000031032	266,12	0,88	0,004
Ifi35	ENSRNOG00000020678	33,20	2,91	0,010
Igfbp5	ENSRNOG00000017206	465,27	2,47	0,003
Iqgap1	ENSRNOG00000012002	861,01	0,67	0,036
Ivns1abp	ENSRNOG00000002618	1624,38	1,00	0,044
Kif13a	ENSRNOG00000001455	1356,83	0,56	0,027
Klhl26	ENSRNOG00000020088	100,70	-0,85	0,046
Lrrk2	ENSRNOG00000004048	551,87	1,21	0,000
Man2b1	ENSRNOG00000023910	385,25	0,61	0,005
Mipep	ENSRNOG00000013876	177,98	-0,92	0,003
N6amt1	ENSRNOG00000001603	48,73	-1,69	0,001
Ndufb3	ENSRNOG00000011825	389,20	-0,54	0,022
Nol3	ENSRNOG00000015588	244,22	1,23	0,001
Nrbp2	ENSRNOG00000029535	321,87	1,33	0,014
Nsfl1c	ENSRNOG00000008604	282,41	1,02	0,006
Nt5c2	ENSRNOG00000020179	748,49	-0,49	0,013
P2ry6	ENSRNOG00000019270	8,96	-2,98	0,036
Pcdh7	ENSRNOG00000012367	1325,69	1,29	0,000
Pde3a	ENSRNOG00000025042	513,42	1,05	0,022
Peg3	ENSRNOG00000014791	1498,76	1,81	0,000
Phf5a	ENSRNOG00000024170	170,15	-0,57	0,041
Phlda1	ENSRNOG00000004019	399,33	0,82	0,048
Pik3r1	ENSRNOG00000018903	668,48	1,01	0,026
Pkd1	ENSRNOG00000010771	690,65	0,73	0,005
Pmm2	ENSRNOG00000002615	202,66	0,67	0,035
Pou2af1	ENSRNOG00000011500	11,42	-3,54	0,040
Ppp3cb	ENSRNOG00000054782	598,04	-0,56	0,005
Preb	ENSRNOG00000007141	176,32	0,81	0,007
Prkg2	ENSRNOG00000002361	11,86	3,79	0,039
Prpf8	ENSRNOG00000003495	2167,06	-0,34	0,013
Psma2	ENSRNOG00000049920	568,81	0,67	0,024
Ptpro	ENSRNOG00000006231	18,94	-3,17	0,033
Ptprs	ENSRNOG00000047247	524,86	1,01	0,012

Rasa2	ENSRNOG00000011909	307,75	1,09	0,036
Rgs9	ENSRNOG00000003800	4,33	-5,47	0,027
Rnf181	ENSRNOG00000012035	214,61	0,87	0,009
S100a1	ENSRNOG00000012410	85,40	-1,30	0,037
Sae1	ENSRNOG00000015128	365,62	-0,71	0,009
Sdf4	ENSRNOG00000019981	302,79	0,63	0,036
Selplg	ENSRNOG00000000699	78,75	2,42	0,003
Sf3b3	ENSRNOG00000017724	498,57	-0,68	0,005
Slc25a23	ENSRNOG00000047781	126,62	1,48	0,000
Slc44a2	ENSRNOG000000031824	712,49	1,29	0,002
Slc9a6	ENSRNOG00000000879	236,23	-0,68	0,041
Snurf	ENSRNOG000000054391	38,81	1,97	0,022
Sorbs1	ENSRNOG00000015658	2344,88	0,86	0,000
Spata7	ENSRNOG00000003955	58,06	-1,42	0,034
Stam	ENSRNOG000000060817	710,30	-0,62	0,004
Tbc1d10c	ENSRNOG000000021510	20,23	-3,40	0,006
Tbx20	ENSRNOG00000016181	1473,77	0,89	0,026
Tfrc	ENSRNOG00000001766	2657,77	-0,59	0,037
Tmem205	ENSRNOG00000011747	77,21	1,79	0,001
Tmem63b	ENSRNOG00000019743	504,20	-0,74	0,019
Tmsb10	ENSRNOG000000042499	342,75	1,12	0,029
Tmtc1	ENSRNOG00000001854	66,18	2,20	0,001
Tnni3k	ENSRNOG000000028225	1029,16	0,86	0,049
Tpm2	ENSRNOG00000016731	1219,34	0,98	0,036
Ube2o	ENSRNOG00000011007	261,38	0,81	0,038
Uchl5	ENSRNOG00000003545	159,85	-0,86	0,021
Uck2	ENSRNOG00000003917	227,66	0,77	0,022
Usp11	ENSRNOG000000009049	201,93	1,03	0,001
Vat1	ENSRNOG000000020684	418,00	0,94	0,015
Vegfa	ENSRNOG00000019598	3003,30	0,81	0,047
Zfp612	ENSRNOG00000016971	245,18	1,11	0,028