

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
des Universitätsklinikums Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Ertl

# **Die Bedeutung des Eya4-Signalwegs für die Entstehung und Entwicklung von Herzkrankheiten**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Moritz Jens Hundertmark  
aus Würzburg

Würzburg, 18. Dezember 2013



**Referent:** Prof. Dr. med. Oliver Ritter

**Korreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 21.08.2014

**Der Promovend ist Arzt**

**„Ich hatte immer Angst, wie mein Vater zu werden. Nun bin ich's, und es ist gar nicht so schlimm.“**

**(Manfred Krug)**

**Für meinen verstorbenen Vater und meine Familie**

## I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis .....	I
II. Abbildungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Herzinsuffizienz .....	1
1.2 Kardiomyopathien .....	5
1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	23
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	24
2 Material.....	27
2.1 Geräte .....	27
2.2 Verbrauchsmaterial .....	29
2.2.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial.....	29
2.2.2 Chemikalien .....	29
2.3 Antikörper .....	30
2.3.1 Primärantikörper .....	30
2.3.2 Sekundärantikörper .....	31
2.4 Kommerzielle Kits .....	32
2.5 Primer .....	32
2.6 Plasmide .....	33
2.7 siRNA .....	34
2.8 Zellen .....	34
2.9 Puffer, Lösungen und Medien.....	34
2.9.1 Puffer, Lösungen und Medien für die Isolierung von nukleären und zytosolischen Proteinen.....	34

2.9.2 Zellkultur.....	35
2.9.3 Western Blot .....	37
2.9.4 Immunhistochemie.....	41
2.9.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	43
2.9.6 Picrosirius-Rot-Färbung.....	43
2.9.7 Polymerase-Kettenreaktion.....	44
2.9.8 Chemisch kompetente E. coli .....	45
2.9.9 Anzucht von Bakterienkulturen .....	46
2.10 Software.....	46
3 Methoden .....	48
3.2 Etablierung eines Mausmodells.....	49
3.3 Proteinanalytische Methoden .....	49
3.3.1 Proteinextraktion aus Zellen .....	49
3.3.2 Proteinextraktion aus Geweben .....	50
3.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	50
3.3.4 Western Blot zur Bestimmung der Proteinexpression.....	51
3.4 Färbungen.....	52
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	54
3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	54
3.5.2 [ <sup>3</sup> H]-Leucin Einbau in Kardiomyozyten .....	57
3.5.3 Gateway®-Klonierung.....	59
3.5.4 Transfektion .....	65
3.5.5 Adenovirale Expressionskonstrukte.....	66
3.5.6 Knockdown mittels siRNA.....	66
3.5.7 Anzucht von Bakterienklonen.....	66
3.6 Magnetresonanztomographie transgener Tiere .....	67

3.7	Statistische Auswertung .....	68
4.	Ergebnisse .....	69
4.1	Zelluläre Lokalisation von Eya4- und E193-Proteinen in Abhängigkeit von Six1 .....	69
4.2	Die p27 <sup>kip1</sup> -Expression in Abhängigkeit von Eya4 .....	72
4.3	Die p27 <sup>kip1</sup> -Promoteraktivität in Abhängigkeit der Expression von Eya4 .....	76
4.4	Generierung von HA-E193- und HA-Eya4-überexprimierenden Mäusen.....	79
4.5	Kardio-MRI-Untersuchungen transgener Tiere .....	84
4.6	Histomorphologie myokardialer Gewebeschnitte .....	86
5.	Diskussion.....	89
6.	Zusammenfassung und Ausblick .....	96
7.	Literaturverzeichnis .....	100
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	1

Danksagung

Lebenslauf

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Ursachen der Herzinsuffizienz .....	3
Abbildung 2:	Internationale Klassifikation einer Herzinsuffizienz.....	4
Abbildung 3:	Überblick der Klassifizierung von Kardiomyopathien.....	6
Abbildung 4:	Schematische Übersicht vielfältiger Mechanismen, die zu familiär- genetischer Kardiomyopathie führen.....	14
Abbildung 5:	Stammbaum der Indexfamilie für das Syndrom aus SNHL und DCM	17
Abbildung 6:	Strukturelle Unterschiede bekannter EYA-Mutationen im Vergleich .	18
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Wildtyp Eya4 (links abgebildet) und der Mutante E193 (rechts abgebildet) welche zu SNHL und DCM führt ..	19
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Hierarchie im RD-Netzwerk.....	21
Abbildung 9:	Zeitabhängige Translokation von Eya4 (grün) in den Nucleus im Infarktmodell. ....	24
Abbildung 10:	Hypothese der Funktion des Eya4/Six1-Signalweges in der Entstehung myokardialer Hypertrophie.....	26
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des als Entryvektor verwendeten pENTR <sup>TM</sup> 1A-Vektors .....	60
Abbildung 12:	Schematische Darstellung des pAd/CMV/V5-DEST-Expressions- vektors mit Kanamycin-Resistenz in der MCS, nach Invitrogen .....	64
Abbildung 13:	Kolokalisierungsstudien von DsRed-markiertem Eya4 und E193 (rot) mit GFP-markiertem Six1 (grün) in NRCMs.....	70
Abbildung 14:	Western Blot-Analyse von nukleären und zytoplasmatischen Proteinlysaten transfizierter NRCM bei isolierter Transfektion mit E193/Eya4 sowie Kotransfektion mit Six1 .....	71
Abbildung 15:	Western Blot von Homogenisat transfizierter NRCMs.....	73
Abbildung 16:	Densitometrische Analyse der angefertigten Western Blots .....	74
Abbildung 17:	[ <sup>3</sup> H]-Leucin-Inkorporation als Korrelat der Proteinsynthese während Hypertrophie.....	75
Abbildung 18:	Schematische Zeichnung des p27 <sup>kip1</sup> -Promoters .....	76

Abbildung 19: Promoterstudien mit dem p27-Plasmid .....	77
Abbildung 20: Darstellung des wildtypischen p27PF-Promoters und der mutierten Plasmide p27PF_muta-1794 und p27PF_muta-2604 .....	78
Abbildung 21: Schemazeichnung des Vektors der verwendet wurde um eine myokardspezifische Überexpression von HA-markiertem Eya4 bzw. E193 zu gewährleisten.....	80
Abbildung 22: Western Blot Analyse aus Herzlysaten transgener Tiere .....	81
Abbildung 23: Immunfluoreszenz der zellulären Verteilung von HA-Eya4 und HA-E193.....	82
Abbildung 24: Western Blot und densitometrische Analyse der <i>in vivo</i> Expression von p27 <sup>kip1</sup> in Abhängigkeit von Eya4 bzw. E193, Wildtyp-Proben zum Vergleich und GAPDH als Ladekontrolle.....	83
Abbildung 25: MRI-Untersuchung transgener (HA-E193/HA-Eya4) Mäuse im Vergleich zum Wildtyp .....	85
Abbildung 26: HE-gefärbte Myokardschnitte unterschiedlicher Tiere .....	86
Abbildung 27: CCSA-Färbungen von Wildtyp, HA-E193 und HA-Eya4-Mäusen .....	87
Abbildung 28: PSR-Färbung von Myokard unterschiedlicher Tiere.....	88
Abbildung 29: Zusammenfassung und Auswertung der Durchschnittsmessungen, MRI-Ergebnisse und kardialer Histomorphologie .....	88



## 1. Einleitung

### 1.1 Herzinsuffizienz

Eine Herzinsuffizienz stellt die häufigste pathophysiologische Entität kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD) dar und ist eine intensive gesundheitsökonomische Last für jedes Gesundheitssystem. Laut Statistik der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind CVD als global häufigste Todesursache identifiziert worden. Geschätzt verstarben im Jahr 2008 weltweit 17,3 Millionen Menschen an einer CVD. Diese Zahl repräsentiert 30 % aller globalen Todesfälle und wird sich gemäß Voraussagen der WHO bis zum Jahr 2030 sogar auf 23,6 Millionen erhöhen und somit global die häufigste Todesursache bleiben <sup>1</sup>. Eine Schätzung betroffener Individuen auf dem europäischen Kontinent hat die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) angestrengt. In den 51 durch die ESC vertretenen Ländern sind derzeit ca. 15 Millionen Menschen an Herzinsuffizienz erkrankt, woraus sich eine Prävalenz von ca. 4 % errechnet. Betrachtet man die Altersverteilung der Herzinsuffizienz, so liegt die Prävalenz in der Gruppe der 70- bis 80-jährigen bei 10 bis 20 % <sup>2</sup>. In jüngeren Jahren existiert eine deutliche geschlechtsspezifische Krankheitsprävalenz auf Seiten männlicher Patienten, in späteren Dekaden ist das Geschlechterverhältnis ausgeglichen <sup>2</sup>. Die Gesamtprävalenz der Herzinsuffizienz wird sich zukünftig weiter erhöhen. Dies ist vor allem auf den zunehmenden demographischen Wandel bezüglich der Altersstruktur, die Verbesserung der Überlebensrate nach einem kardialen Insult und Fortschritte in der Sekundärprävention einer Herzinsuffizienz zurückzuführen <sup>2, 3</sup>. Zukünftig wird die Bedeutung der Herzinsuffizienz in der medizinischen Versorgung somit weiter an Relevanz gewinnen.

Die chronische Herzinsuffizienz kann nicht als uniformes Krankheitsbild mit gleichbleibender Symptomatik beschrieben werden und bisher existiert ebenfalls noch keine ubiquitär akzeptierte Definition dieser Erkrankung. Vielmehr ist die Herzinsuffizienz als komplexes Syndrom, verknüpft mit dem Auftreten typischer klinischer Symptomenkonstellationen und wegweisender apparativer Befunde, zu sehen <sup>3</sup>. Bei einer symptomatischen Herzinsuffizienz finden sich bei erkrankten Patienten belastungsabhängige Dyspnoe, bei fortgeschrittener Erkrankung auch Ruhedyspnoe, vermehrte Müdigkeit,

sogenanntes „fatigue“, sowie eine zunehmende Ansammlung von Ödemen in verschiedenen Körperbereichen und Organen. Diese können zu nächtlichen Atemnotepisoden mit schaumigem Auswurf, dem Asthma cardiale, führen. Insgesamt führt die Progredienz der Erkrankung zu einer deutlichen Verschlechterung der Lebensqualität betroffener Individuen. Die apparativen Untersuchungen umfassen neben der Echokardiographie, dem Elektrokardiogramm und einer Röntgenuntersuchung des Thorax auch die laborchemische Analyse einer Blutprobe und sollen objektivierbare Befunde struktureller und/oder funktioneller kardialer Veränderungen erbringen. Etablierte laborchemische Biomarker zur Erst- und Verlaufsdagnostik einer Herzinsuffizienz sind das atriale natriuretische Peptid (ANP), das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) und das wegen der höheren Halbwertszeit zur Erst- und Verlaufsdagnostik vermehrt eingesetzte N-Terminale pro-BNP (NTpro-BNP) <sup>4-8</sup>.

Für eine Herzinsuffizienz existieren multiple Ursachen (siehe Abbildung 1). Der wichtigste Grund bei kardialer Genese der Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit (KHK). Sie ist bei über 50 % der betroffenen Patienten kausal für eine spätere Herzinsuffizienz verantwortlich <sup>9</sup>. Für die KHK wiederum stellt vor allem die langjährige Hypertonie einen prädispositionellen Zustand dar, welcher somit indirekter als auch direkter Risikofaktor der Herzinsuffizienz ist. Neben der KHK und Hypertonie sind weitere wichtige Risikofaktoren, sogenannte „major risk factors“, für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz identifiziert worden <sup>10</sup>. Hierzu zählen Klappenvitien, Diabetes mellitus, Übergewicht, Myokarditiden und Arrhythmien. Neben den bisher beschriebenen kausalen Ursachen einer Herzinsuffizienz gibt es ebenfalls (noch) nicht klassifizierbare sogenannte idiopathische Formen dieser Erkrankung.

Ursachen der Herzinsuffizienz	
Kardial bedingt	Systemisch bedingt
<b>Myokardiale Schäden</b> Myokardinfarkt, Myokarditis, Kardiomyopathie, Chemotherapeutika	<b>Erhöhter CO-Bedarf</b> Hyperthyreoidismus, Morbus Paget
<b>Klappenvitien</b> Aortenstenose, Mitralklappeninsuffizienz	<b>Erhöhung der Nachlast</b> Aortenstenose, Hypertonie, Phäochromozytom
<b>Arrhythmien</b> Bradyarrhythmien, Tachyarrhythmien	<b>Metabolisch</b> Selenmangel, Thiaminmangel, Carnitinmangel
<b>Fehler der Erregungsleitung</b> AV-Knoten-Block, Linksschenkelblock	<b>Infiltrative Erkrankungen</b> Amyloidose, Hämochromatose, Chronische Fibrose
<b>Insuffiziente Versorgung</b> Ischämie	

Abbildung 1: Ursachen der Herzinsuffizienz

Nach <sup>11</sup>

Klinisch wird versucht, die Betroffenen deskriptiv bestimmten Gruppen zuzuordnen. Daher wird die akute von einer chronischen Herzinsuffizienz unterschieden. Akut sollte hierbei nicht im Sinne eines zeitlichen Terminus, sondern vielmehr zur Beschreibung der Schwere der Erkrankung herangezogen werden. Die betroffene Struktur im Herzen begründet eine Unterscheidung zwischen linksventrikulärer und rechtsventrikulärer Herzinsuffizienz. Während die linksventrikuläre Herzinsuffizienz viele unterschiedliche Ätiologien haben kann, ist die rechtsventrikuläre Herzinsuffizienz oftmals Folge einer vorbestehenden linksventrikulären Herzinsuffizienz <sup>11</sup>. Als letzte Konsequenz kann hieraus auch eine biventrikuläre, also das gesamte Myokard betreffende, globale Herzinsuffizienz entstehen. Generell wird zudem die systolische (HFrEF) von der diastolischen Herzinsuffizienz (HFpEF) unterschieden <sup>12, 13</sup>. Hierzu ist anzumerken, dass eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Formen keine Darstellung zweier voneinander unabhängiger Entitäten zufolge haben sollte <sup>14</sup>.

Zur Einteilung des Schweregrades einer Herzinsuffizienz bedient man sich klinisch oftmals der international anerkannten Klassifikation der New York Heart Association (NYHA). Diese stellt allerdings eine rein subjektive Klassifizierung der Erkrankung anhand von Symptomen etwaiger Patienten dar und ist daher stetiger Kritik ausgesetzt. Um die Einteilung des Schweregrades an objektivierbare Befunde zu knüpfen, entwickelte die American Heart Association (AHA) zusammen mit dem American

College of Cardiology (ACC) eine Klassifikation, die sich an strukturellen Befunden des Herzmuskels orientiert <sup>3</sup> (siehe Abbildung 2). Mittlerweile werden beide Klassifikationen oftmals zusammen genannt und ergänzen sich gegenseitig. Darüber hinaus existieren noch weitere, detailliertere Klassifikationen zur Einschätzung des Schweregrades einer Herzinsuffizienz, wie beispielsweise die Forrester-Klassifikation <sup>15</sup>, welche sich an hämodynamischen Parametern orientiert und vor allem bei akut gefährdeten, intensivmedizinisch zu versorgenden Patienten eine vorteilhaftere, standardisierte Behandlung ermöglichen soll. Eine weitere Methode, um die Schwere einer Herzinsuffizienz anhand objektivierbarer Befunde zu ermitteln, bietet die Feststellung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF). Die LVEF ist der Anteil des vom linken Ventrikel in die systemische Zirkulation ausgeworfenen Blutvolumens am gesamten Schlagvolumen während einer Herzaktion. Normalwerte für die Ejektionsfraktion liegen in der Regel zwischen 55-70 %, bei Werten zwischen 40-55 % spricht man von einer reduzierten Ejektionsfraktion, Werte unter 40 % können einen Anhaltspunkt für das Vorliegen einer Herzinsuffizienz bieten <sup>16</sup>.

<b>Gebäuchliche Klassifikationen zur Einteilung der Herzinsuffizienz</b>	
<b>Funktionell nach NYHA</b>	<b>Strukturell nach ACC/AHA</b>
Einteilung in Klassen anhand von Symptomen und körperlicher Aktivität	Einteilung in Stufen anhand struktureller Defizite
<b>Klasse I</b> Keine Einschränkung der Leistungsfähigkeit bei normaler körperlicher Belastung. Keine Ruhesymptomatik	<b>Stufe A</b> Hohes Risiko für Herzinsuffizienz aber keine nachweisbaren Myokardschäden
<b>Klasse II</b> Leichte Einschränkung bei körperlicher Belastung. Normale körperliche Belastung führt zu Dyspnoe, Fatigue und Palpitationen. Keine Ruhesymptomatik	<b>Stufe B</b> Beginnende strukturelle Myokardschäden die hochwahrscheinlich mit einer Herzinsuffizienz assoziiert sind aber ohne nachweisbare Symptome
<b>Klasse III</b> Mittlere Einschränkung bei körperlicher Belastung. Bereits leichte körperliche Aktivität führt zu Dyspnoe, Fatigue und Palpitationen. Keine Ruhesymptomatik.	<b>Stufe C</b> Symptomatische Herzinsuffizienz mit nachweisbaren strukturellen Myokardschäden.
<b>Klasse IV</b> Keine körperliche Aktivität ohne starke Symptomatik. Beschwerden auch in Ruhe.	<b>Stufe D</b> Fortgeschrittene strukturelle Myokardschäden und nachweisbare Beschwerden in Ruhe trotz medikamentöser Therapie.

**Abbildung 2: Internationale Klassifikation einer Herzinsuffizienz**

Nach <sup>2</sup>

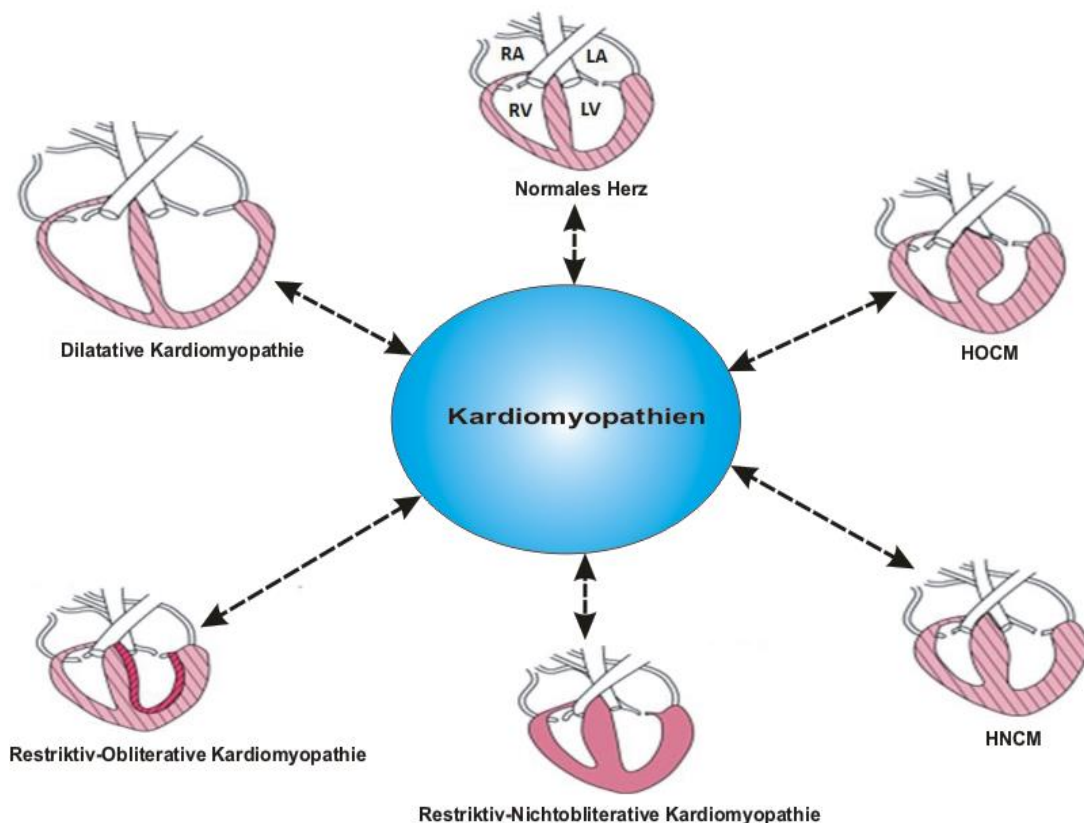
In Deutschland ist die Herzinsuffizienz seit dem Jahr 2006 wechselnd an Platz 1 und 2 unter den Ursachen für eine Hospitalisierung<sup>17</sup>. Gleichermäßen stellt sie in der Altersgruppe der über 85-jährigen die am häufigsten diagnostizierte Erkrankung dar. Die Gesamtausgaben des deutschen Gesundheitssystems im Zusammenhang mit der Diagnose Herzinsuffizienz lagen im Jahr 2006 bei 2,9 Milliarden Euro<sup>18</sup>. Jedoch wird zukünftig aufgrund der progredient alternden Bevölkerung und weiterer, oben genannter, Gründe mit einem Anstieg der Kosten zu rechnen sein. Die Mortalität der Herzinsuffizienz in Deutschland hat sich in den letzten Jahren verbessert. Allerdings ist die krankheitsbezogene Sterblichkeit, die sogenannte Letalität, immer noch mit einer schlechten Prognose verbunden. Nach 540 Tagen sterben, trotz leitliniengerechter Therapie, ca. 36 % der Patienten<sup>18</sup>. Durchschnittlich versterben ca. 50 % der männlichen und 46 % der weiblichen Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung<sup>19-21</sup>. Damit liegt die 5-Jahres-Mortalitätsrate über der vieler maligner Neubildungen.

### **1.2 Kardiomyopathien**

Bei ca. einem Drittel aller herzinsuffizienten Patienten lässt sich eine Kardiomyopathie als Ursache der Erkrankung belegen. Der Begriff der Kardiomyopathie unterliegt in seiner Bedeutung und der ihm zugeordneten Befunde einem stetigen Wandel. Im Jahr 1957 prägte W. Bridgen in einem Bericht über ungewöhnliche, nicht-koronare Erkrankungen des Myokards erstmals den Begriff der Kardiomyopathien<sup>22</sup>. Zunächst definierte man diese als akute, subakute oder chronische Dysfunktionen des Herzens, häufig mit endo- oder perikardialer Beteiligung aber ohne arteriosklerotischen Ursprung<sup>23-25</sup>. Die erste globale Klassifikation der Kardiomyopathien erfolgte dann im Jahr 1980 durch die WHO-Task Force und unterteilte die Erkrankung in primäre (idiopathische, angeborene) und sekundäre (spezifische, identifizierbare Pathologie) Formen<sup>26</sup>. Eine Kardiomyopathie wurde fortan lediglich als Erkrankung des Herzmuskels unklarer Genese definiert. Weiter wurden die primären Kardiomyopathien in dilatative, restriktive, hypertrophische und nicht klassifizierbare Formen unterteilt. Erst 15 Jahre später wurde diese Klassifikation revidiert und enthielt nun eine weitere Subklasse, die der arrhythmogenen Kardiomyopathien. Die bis heute gültige Klassifikation definiert den Begriff der Kardiomyopathie als Erkrankung des Myokards, welche mit einer durch Befunde

objektivierbaren kardialen Dysfunktion vergesellschaftet ist <sup>27</sup>. Im Jahr 2006 veröffentlichte die AHA zusammen mit dem ACC eine Empfehlung zur möglichen Aktualisierung der aktuell gültigen Klassifikation von Kardiomyopathien <sup>28</sup>. In dieser Veröffentlichung wird empfohlen, die Unterteilung in primär und sekundär neu zu definieren. Primär solle für eine auf den Herzmuskel beschränkte Kardiomyopathieform verwendet werden und enthält 3 vorgeschlagene Subgruppen (genetisch, erworben und Mischformen). Die sekundären Kardiomyopathien sind als jene im Kontext vorherrschender organischer Erkrankungen mit sekundärer Myokardbeteiligung zu verstehen.

Die aktuell gültige Einteilung beschreibt die verschiedenen Kardiomyopathieformen aufgrund der für sie spezifischen Pathophysiologie und, insoweit möglich, ihrer Ätiopathogenese:



**Abbildung 3: Überblick der Klassifizierung von Kardiomyopathien**

RA = Rechtes Atrium, LA = Linkes Atrium, RV = Rechter Ventrikel, LV = Linker Ventrikel.

Nach <sup>11</sup>

## 1. Unklassifizierbare Kardiomyopathien (UCM)

In dieser Subgruppe finden sich alle Formen von Kardiomyopathien, welche den anderen Gruppen nicht eindeutig zuordenbar sind. Beispiele hierfür sind neben der isolierten ventrikulären Non-Compaction Kardiomyopathie (INVM) die Takotsubo-Kardiomyopathie, die systolische Dysfunktion mit minimaler Dilatation, die mitochondriale Kardiomyopathie und die endokardiale Fibroelastose.

## 2. Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Typisch für die HCM ist eine vermehrte Hypertrophie des interventrikulären Septums im Vergleich zur freien Wand des linken Ventrikels. In der klinischen Diagnosefindung gelten normalerweise Werte von über 15mm Dicke des interventrikulären Septums als pathologische Hypertrophie<sup>29</sup>. Aufgrund dessen kommt es, abhängig vom Schweregrad der Erkrankung, zu einer Verengung des Ausflusstraktes mit konsekutiv vermehrter Druckbelastung des linken Ventrikels. Man unterteilt die HCM daher in eine obstruktive (HOCM) und eine nicht-obstruktive Form (HNCM) (siehe Abbildung 3). Auch eine durch die Krankheit ausgelöste rechtsventrikuläre Hypertrophie wurde von Maskatia *et al.* beschrieben<sup>30</sup>. Das linksventrikuläre Volumen ist meist normal bis reduziert und üblicherweise lässt sich in der 2-dimensionalen Echokardiographie, welche das diagnostische Mittel der Wahl darstellt, eine diastolische Dysfunktion nachweisen. Hierbei liegt eine abnorme Relaxations- und Füllungsphase des linken Ventrikels einhergehend mit erhöhten Füllungsdrücken vor. Sekundär, beziehungsweise zur weiteren Diagnostik bei fehlendem Befund in der Herzechokardiographie, kann auch ein Magnet-Resonanz-Imaging (MRI) des Myokards erfolgen. Diese kann irreguläre Morphologie sowie Narben im Myokard nachweisen, die oftmals ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien und somit den plötzlichen Herztod aufweisen. Insofern könnte die MRI-Untersuchung in Zukunft einen höheren Stellenwert in der HCM-Diagnostik gewinnen<sup>31</sup>. Ätiologisch liegen bei ungefähr 60-70 % der Betroffenen verschiedene autosomal-dominante Mutationen in Genen von Sarkomerproteinen vor. Hierbei betreffen die häufigsten Mutationen das Gen der schweren Kette des  $\beta$ -Myosins ( $\beta$ -MHC) und das des kardialen Myosinbindungsproteins-C<sup>32</sup>. Die therapeutischen Maßnahmen zur Behandlung der HCM sind bislang nur symptomorientiert und stellen keine kausale Kuration dar. Neben

konservativen Maßnahmen, die unter anderem eine medikamentöse Therapie zur Reduktion der kardialen Last mittels Betablocker oder Calciumantagonisten und Vermeidung körperlicher Spitzenbelastungen beinhalten, kommen auch interventionelle Anwendungen zum Einsatz. Diese umfassen neben der transkoronaren Ablation der Septumhypertrophie (TASH) und der endokardialen Radiofrequenzablation der Septumhypertrophie (ERASH) unter anderem auch die Implantation eines Schrittmachers und/oder eines implantierbaren Kardiovertierer-Defibrillators (ICD). Bei Therapieversagen kann schließlich noch eine transaortale subvalvuläre Myektomie (TSM) versucht werden, welche wegen der Maximalinvasivität des Eingriffes immer seltener durchgeführt wird.

### **3. Restriktive Kardiomyopathie (RCM)**

Eine eher seltene Form der Kardiomyopathie stellt die RCM dar. Bei betroffenen Individuen bestehen eine Restriktion des Füllungsvolumens sowie des enddiastolischen Volumens, mono- oder auch biventrikulär<sup>27, 33</sup>. Im Gegensatz zu anderen Kardiomyopathieformen ist hierbei jedoch in der Regel die systolische Funktion annähernd normal und es besteht keine Hypertrophie der myokardialen Wand<sup>27</sup> (siehe Abbildung 3). Dennoch kann die Wanddicke, im Rahmen interstitieller oder infiltrativer Erkrankungen, zunehmen (siehe unten). Ursächlich kann sie idiopathisch, familiär-genetisch oder sekundär im Rahmen von infiltrativen Erkrankungen wie Amyloidose und Sarkoidose auftreten. Die familiär-genetische Form wird in der Regel autosomal-dominant vererbt und wird häufiger bei weiblichen Patienten beobachtet<sup>34</sup>. Weiterhin sind Speichererkrankungen wie Morbus Fabry und Hämochromatose, endomyokardiale Erkrankungen wie endomyokardiale Fibrose und hypereosinophiles Syndrom und Sklerodermie als auch Radiatio und medikamentöse Therapie mit Chemotherapeutika (vor allem Anthrazykline) mögliche Ursachen der Erkrankung<sup>35-38</sup>. Der Diagnosestellung einer RCM geht im Allgemeinen eine Kombination von Untersuchungen, bestehend aus körperlicher-, echokardiographischer- und diagnostischer Rechtsherzkatheteruntersuchung, voraus. Da Krankheitsverlauf und klinische Präsentation der Erkrankung variabel sind, nutzt man je nach Schweregrad unterschiedliche Therapieregime. Hierzu zählen die Anwendung von Diuretika zur Vorlastsenkung, eine Frequenzkontrolle mittels Digitalis, Calciumantagonisten oder Betablockern zur Verlängerung und Optimierung der



Füllungsphase des Herzens während der Diastole und Gabe von Antikoagulantien bei Auftreten von Vorhofflimmern. Als weitere Option kommen 2-Kammer Schrittmacher in Betracht, um Defizite der Erregungsbildung und -leitung zu kompensieren. Ultima ratio ist die Herztransplantation bei Patienten welche eine progressive, therapierefraktäre Form der Erkrankung aufweisen.

#### **4. Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)**

Die ARVC stellt mit einer Inzidenz von 1:1.000 bis 1:5.000 auch eine der weniger verbreiteten Kardiomyopathien dar<sup>39-41</sup>. In mehr als 50 % der Fälle liegt eine familiäre Form der Erkrankung vor, die in der Regel autosomal-dominant vererbt und mit variabler Penetranz weitergegeben wird<sup>42</sup>. Hierbei sind männliche Individuen häufiger betroffen als weibliche. Pathogenetisch kommt es zu einer vermehrten Apoptose in Kardiomyozyten. Die apoptotischen Zellen werden durch eine Mischung aus Binde- und Fettgewebe ersetzt, welches mit der Leitung elektrischer Impulse interferiert. Daher erklären sich auch die im EKG (Elektrokardiographie) zu beobachtenden Phänomene wie die Epsilonwelle, Rechtsschenkelblöcke und sogenannte Re-Entry-Arrhythmien. Obwohl die Erkrankung entsprechend ihrer Bezeichnung rechtsventrikulär gehäuft auftritt, sind bei bis zu 50 % der Fälle auch linksventrikuläre Beteiligungen nachgewiesen worden<sup>43-45</sup>. Die klinische Manifestation der Erkrankung findet meist erst im Adoleszentenalter statt, wobei die Patienten in der Regel nicht älter als 60 Jahre sind<sup>46</sup>. Routinediagnostik bei verdächtigen Patienten umfasst neben ausführlicher körperlicher Untersuchung, 12-Kanal-EKG, Röntgen-Thorax, 24-Stunden-EKG und 2-dimensionaler Echokardiographie auch eine ausführliche Familienanamnese mit Stammbaumuntersuchung. Gerade in Frühstadien der Erkrankung können die Untersuchungen allerdings auch unspezifisch ausfallen. Da die Erkrankung eine mögliche Ursache für den plötzlichen Herztod unter jungen Erwachsenen und Profisportlern repräsentiert, ist die erste Therapiemaxime die Verhinderung des plötzlichen Herztodes. Sportliche Aktivität sollte minimiert werden, da sie aufgrund der erhöhten kardialen Belastung zu einer mehrfachen Risikoerhöhung führen kann<sup>47</sup>. Symptomatische Patienten die Arrhythmien aufweisen, können mit Betablockern oder einem Klasse-III-Antiarrhythmikum wie Amiodaron oder Sotalol behandelt werden, da diese sich aufgrund ihrer niedrigen proarrhythmischen Potenz besonders eignen<sup>48, 49</sup>. Bei therapierefraktären Arrhythmien

bietet sich die Implantation eines ICD zur Verhinderung des plötzlichen Herztodes an. Eine weitere Möglichkeit zur Risikoreduktion bietet die Katheterablation von Arrhythmieherden. Diese Maßnahme bietet schnell sichtbaren, akuten Erfolg, jedoch sind Rezidivraten von bis zu 90 % innerhalb eines 3-Jahresintervalls beschrieben<sup>50</sup>.

### **5. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)**

Die DCM beschreibt einen Zustand des Herzens, bei dem der linke und/oder der rechte Ventrikel dilatiert sind (siehe Abbildung 3) und folglich eine verminderte Kontraktilität des Herzens präsent ist, wodurch sich auch die Ejektionsfraktion (EF) reduziert<sup>27, 51</sup>. Die Inzidenz der Erkrankung steigt mit zunehmendem Lebensalter und ist bei männlichen und afroamerikanischen Individuen erhöht<sup>52, 53</sup>. Der Krankheitsverlauf, dessen genaue Ursache bislang nicht geklärt werden konnte, ist gekennzeichnet durch den zunehmenden Verlust von Kardiomyozyten. Charakteristischerweise kommt es bei den Betroffenen zu einer histologisch nachweisbaren, progredienten interstitiellen Fibrose des Myokards, sowie zu einer Reduktion der Autokontraktilität der Kardiomyozyten im Krankheitsverlauf<sup>54</sup>. Klinisch leiden die Patienten oftmals unter typischen Symptomen einer Herzinsuffizienz (s.o.) und das Auftreten von Arrhythmien, Thrombembolien sowie des plötzlichen Herztodes ist in jeder Phase der Erkrankung möglich<sup>27, 55</sup>. Generell weisen Betroffene ein erhöhtes Herzgewicht auf, jedoch findet sich keine signifikante Hypertrophie, da die Erhöhung auf die zunehmende Dilatation der Herzhöhlen zurückzuführen ist. Die Reduktion der EF ist der etablierteste prognostische Marker zur Einschätzung der Schwere einer DCM.

Therapeutisch kommen, abhängig von Schweregrad und Ursache der Erkrankung, unterschiedliche Möglichkeiten in Betracht. Supportive Maßnahmen umfassen neben der Reduktion etwaiger Risikofaktoren (Nikotinabusus, Adipositas, Alkohol- und Salzrestriktion) auch Flüssigkeitsbilanzierung und moderate körperliche Aktivität. Der Verzicht beziehungsweise die Behandlung auslösender Noxen ist bei identifizierbarer Ursache der Erkrankung eine der ersten Maßnahmen. Medikamentös kommen Vasodilatoren (ACE-Inhibitoren, Hydralazin und Isosorbiddinitrat), Diuretika (Furosemid, Hydrochlorothiazid), Aldosteronantagonisten (Spironolacton, Eplerenon), Betablocker und

Antikoagulantien zum Einsatz<sup>56-64</sup>. Ultima Ratio ist, wie bei anderen Kardiomyopathieformen, auch hier die Herztransplantation<sup>65, 66</sup>.

Die DCM ist als das Ergebnis der Einwirkung verschiedenartigster pathogenetischer Prozesse auf das Myokard anzusehen<sup>67</sup>. Insofern sind potentielle Ursachen dieser Erkrankung mannigfaltig und zum Teil noch nicht komplett geklärt. Eine grundsätzliche Differenzierung erfolgt dementsprechend zwischen spezifischen Formen mit bekannter Ursache und idiopathischen Formen bei denen die Ursache (noch) nicht abschließend geklärt werden konnte. Die Diagnose einer idiopathischen DCM stellt in aller Regel eine Ausschlussdiagnose dar.

In etwa der Hälfte aller Fälle kann die DCM einer spezifischen Ursache zugeschrieben werden<sup>68</sup>. Hierbei sind vor allem familiär-genetische, toxische, (auto-) immunologische und infektiöse Gründe zu nennen. Manche dieser spezifischen DCM-Formen gelten als potenziell reversibel<sup>69</sup>.

Inzidenz (5-8/100.000 pro Jahr) und Prävalenz (36,5/100.000) der DCM in den westlichen Industriestaaten zeigen die Erkrankung ebenfalls als nicht vernachlässigbares ökonomisches Problem<sup>70-73</sup>. Betrachtet man die fehlenden kurativen Therapieoptionen, das potenziell junge Erstmanifestationsalter und den oftmals finalen Verlauf, so ist die DCM eine der schwerwiegendsten Herzerkrankungen und ist darüber hinaus häufigste Ursache für die Indikation zur Herztransplantation<sup>67, 74-76</sup>.

### **5.1 Toxische Formen**

Die toxisch-induzierten Kardiomyopathieformen sind im Vergleich zu infektiösen Formen, vor allem den viral-induzierten Myokarditis-assoziierten Formen, als seltener einzustufen<sup>68</sup>. Bei den schädigenden Substanzen spielen vor allem Alkohol, der Alkoholmetabolit Acetaldehyd und Kokain neben vielen anderen toxischen Agentien eine wichtige Rolle. Der Alkohol und seine Metabolite führen hierbei zu einer direkten Schädigung der Mitochondrien und des sarkoplasmatischen Retikulums. Infolge dessen kommt es zu einer verminderten Proteinbiosynthese im Myokard<sup>77, 78</sup>. Die Anwendung von Medikamenten, insbesondere Chemotherapeutika, können ebenfalls zu einer immensen myokardialen Schädigung führen. Hierbei sind neben den für ihre kardiotoxische

Wirkung bekannten Anthracyclinen (Adriamycin, Doxo- und Daunorubicin) auch Fluorouracil, Barbiturate, Chloroquin und Amphetamine zu nennen. Weiterhin existiert auch in der immer häufiger verwendeten Gruppe der sogenannten monoklonalen Antikörper (wie z.B. Infliximab) ein ausgeprägtes kardiotoxisches Nebenwirkungsprofil. Da diese Medikamente vermehrt eingesetzt werden, könnte auch die Anzahl hierdurch induzierter Nebenwirkungen zunehmen <sup>79-81</sup>.

### 5.2 Immunologische Formen

Immunologische Ursachen als Auslöser einer DCM sind in jüngster Zeit vermehrt Gegenstand von Untersuchungen geworden. Gerade nach einer überstandenen infektiösen Myokarditis, welche mehrheitlich den Erstkontakt eines Erregers mit dem Körper darstellt, bleiben oftmals Gedächtniszellen gegen das spezifische Antigen zurück, welche sich im Verlauf auch gegen körpereigene Epitope richten können. Diese sogenannten Autoimmunerkrankungen können durch eine genetische Prädisposition und/oder gewisse Umwelt- und Lifestylefaktoren induziert werden <sup>82</sup>. Eine besondere Bedeutung erlangt die Theorie der Autoimmunerkrankungen im Zusammenhang mit der Pathogenese einer DCM vor allem hinsichtlich der Nachweisbarkeit autoantigener Immunglobuline und weiterer Autoantikörper im Myokard betroffener Patienten <sup>83-85</sup>.

### 5.3 Infektiöse Formen

Die infektiöse Myokarditis kann ebenfalls einen fulminanten Verlauf nehmen und zu kardialer Dysfunktion führen. Die infektiös bedingte Kardiomyopathie zählt daher, neben anderen, zu den Hauptursachen einer DCM <sup>68, 71</sup>. Eine Myokarditis kann durch eine Vielzahl verschiedener Erreger ausgelöst werden. Hierbei sind neben Viren (Coxsackievirus), Bakterien (*Corynebakterium diphtheriae*) und Pilzen (*Aspergillus* und *Candida sp.*) auch Parasiten zu erwähnen <sup>86-90</sup>. In lateinamerikanischen Ländern von Bedeutung ist diesbezüglich vor allem *Trypanosoma cruzi* <sup>91, 92</sup>. Aber auch in Ländern in die Immigration aus Endemiegebieten stattfindet, steigt die Relevanz solcher Infektionen <sup>93</sup>. Als Reaktion auf eine Zunahme von Infektionen mit diesem Parasiten werden in den USA, Spanien und Frankreich nahezu alle Blutprodukte zur Übertragung am Menschen auf *T.cruzi* gescreent <sup>94, 95</sup>.

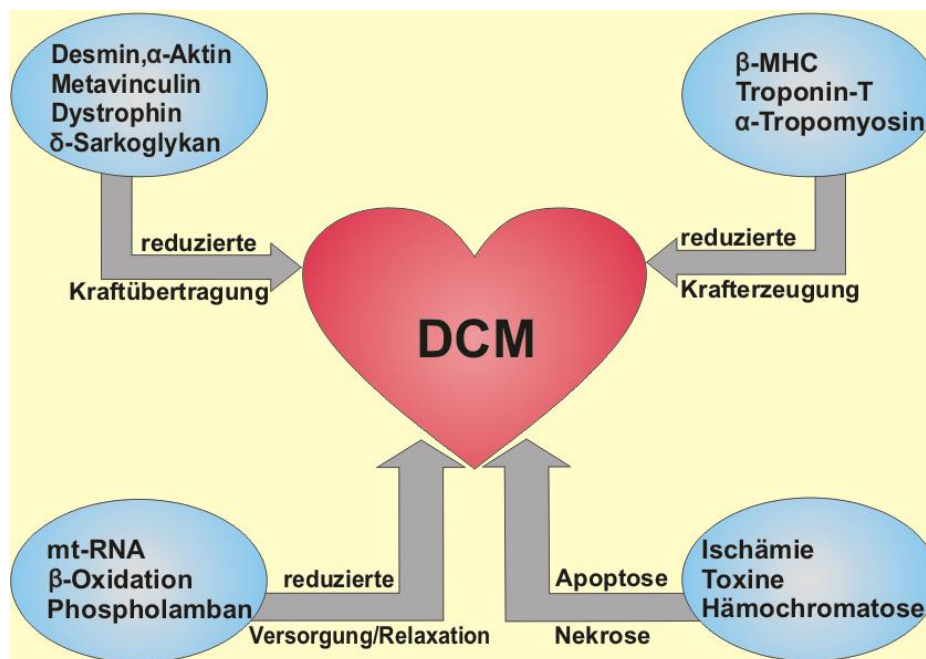
In Europa und Nordamerika wird die Mehrzahl infektiös bedingter Kardiomyopathien jedoch weiterhin durch kardiotope Viren verursacht<sup>96, 97</sup>. In diesen Fällen kommt es meist zu einer akuten Entzündungsreaktion innerhalb des Myokards, welche eigentlich der Viruselimination dienen soll, oftmals allerdings mit exzessiver Myokardschädigung einhergeht. Die entzündlichen Vorgänge bei dieser Kardiomyopathie führen zu Fibrosierung des Myokards, Hypertrophie von Kardiomyozyten und in letzter Konsequenz zu einer Dilatation der betroffenen Herzhöhlen<sup>98, 99</sup>.

### 5.4 Familiär-genetische Formen

In den letzten 2 Dekaden konnten viele der vormals als idiopathisch klassifizierten Kardiomyopathien näher untersucht und dem familiären Formenkreis zugeordnet werden. Die Häufigkeit familiär bedingter Formen der Erkrankung fluktuiert, je nach Autor, zwischen 20-50 %<sup>100-104</sup>. Die hohe Variabilität in Angaben zur Häufigkeit resultiert vermutlich aus dem Ausschluss symptomloser aber dennoch genotypisch positiver Personen. Die zugrundeliegenden genetischen Mutationen, die bei Betroffenen zur phänotypischen Ausprägung führen, sind sehr vielschichtig. Hierbei sind autosomal-dominante Vererbungsmodi in der deutlichen Mehrzahl und mit ungefähr 90 % aller Fälle am häufigsten verantwortlich für eine Erkrankung<sup>105</sup>. Die ebenso existierenden autosomal-rezessiven, X-chromosomalen sowie mitochondrialen Vererbungswege treten im Verhältnis selten auf<sup>100, 106, 107</sup>.

In unterschiedlichen Proteinen konnten bisher Mutationen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4). Darunter befinden sich vor allem solche aus dem Struktur- und Zytoskelettapparat der Kardiomyozyten. Die erste Proteinmutation, die als ursächlich für eine früh einsetzende DCM identifiziert werden konnte, war die in kardialen  $\alpha$ -Aktin<sup>108</sup>. Kardiales  $\alpha$ -Aktin stellt einen Hauptbestandteil der im Sarkomer lokalisierten dünnen Filamente in Kardiomyozyten dar. Weil das Sarkomer in allen Muskelzellen des Körpers die funktionale Einheit zur Krafterzeugung und -übertragung während der Muskelkontraktion ist, wirken sich Mutationen in diesem Protein folglich fatal auf die Funktion von kontraktilen Zellen aus. Die bisher entdeckten Mutationen in kardialen  $\alpha$ -Aktin betreffen überwiegend die Interaktion zwischen Aktin und dem Zytoskelett und nicht die Aktin-Myosin-Interaktion. Insofern sind Mutationen hierin als Defekte der

Kraftübertragung zu bezeichnen <sup>109</sup>. Weitere, in der Regel autosomal-dominante, Mutationen mit Wirkung auf die Kraftübertragung der Muskelzelle betreffen Desmin, Metavinculin, Dystrophin (x-chromosomal rezessive Transmission) und die  $\delta$ -Sarkoglykan-Untereinheit des Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplexes <sup>110</sup>. Alle diese Proteine sorgen physiologischerweise für eine effiziente Kraftübertragung des Sarkomers an das Sarkolemm. Sind sie mutiert, führen verminderte Kraftübertragung und/oder verminderte Resonanz auf erhöhte mechanische Belastung zur Ausprägung einer kardialen Dysfunktion und längerfristig gegebenenfalls zu einer DCM. Veränderungen im Dystrophin sind bisher vor allem im Zusammenhang mit dem Auftreten der Duchenne'schen Muskeldystrophie bekannt, bei der es vornehmlich zu Veränderungen in der quergestreiften Skelettmuskulatur kommt <sup>111-114</sup>. Ebenfalls möglich, wenn auch deutlich seltener, sind Dystrophinveränderungen, die isoliert die Herzmuskulatur betreffen und als Grund einer DCM in Frage kommen <sup>115-117</sup>.



**Abbildung 4: Schematische Übersicht vielfältiger Mechanismen, die zu familiär-genetischer Kardiomyopathie führen**

DCM = Dilatative Kardiomyopathie

$\beta$ -MHC = schwere Kette des beta-Myosin

mt-RNA = mitochondriale t-RNA

Modifiziert nach <sup>109</sup>

Auch an der Krafterzeugung in Kardiomyozyten beteiligte Proteine können autosomal-dominante Mutationen aufweisen, die zu einer DCM führen können<sup>118</sup>. Hierbei sind vor allem  $\beta$ -MHC, das kardiale Troponin-T und das  $\alpha$ -Tropomyosin betroffen<sup>109, 110, 119</sup> (siehe Abbildung 4).

Neben den bisher beschriebenen Mutationen können auch Signalwege oder die Regulation der Kalziumhomöostase von möglichen Veränderungen betroffen sein und sind aufgrund dessen mit der Entstehung einer DCM in Zusammenhang zu bringen (siehe Abbildung 4).

Die Energiebereitstellung in den Mitochondrien mittels  $\beta$ -Oxidation freier Fettsäuren kann durch Veränderungen in Genen für Proteine, die in diesen Prozess involviert sind, entweder direkt als beteiligte Enzyme oder als Transportproteine empfindlich gestört werden<sup>120</sup>. Das Myokard kann in diesen Fällen entweder durch die verminderte Energiebereitstellung oder auch direkt durch toxische Zwischenprodukte des betroffenen Stoffwechselweges geschädigt werden.

Genauso kann eine verminderte und/oder fehlerhafte Proteinsynthese in den Mitochondrien zur Krankheitsentwicklung beitragen<sup>107, 109, 121-123</sup>.

Eine gleichbleibende intrazelluläre Kalziumkonzentration ist Voraussetzung einer physiologischen Muskelkontraktion. Das Protein Phospholamban ist unter anderem in die Regulation des Kalziumspiegels involviert und sorgt als Inhibitor der im Sarkoplasma lokalisierten Kalzium-ATPase SERCA2a (Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) für die Steuerung der Aufnahme von Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum<sup>124</sup>. Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation wird SERCA2a phosphoryliert und in seiner Funktion gehemmt, wodurch die Aufnahme von Kalzium ins sarkoplasmatische Retikulum beschleunigt und so eine schnellere Relaxation möglich wird. Kommt es nun zu einer Veränderung im Phospholamban, welches eine retardierte Kalziumwiederaufnahme induziert, so verlangsamt sich die Relaxation und dies kann auf Dauer zur Ausbildung einer DCM führen<sup>125</sup>.

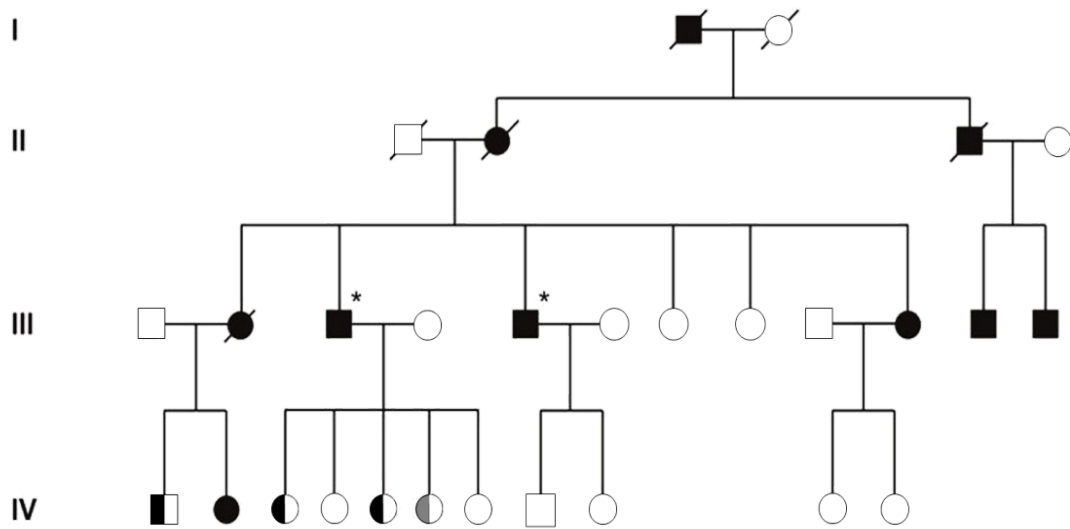
### **Der Transkriptionskofaktor EYA4**

Der Anteil familiär-genetisch bedingter DCM wurde bereits im Abschnitt 5.4 in der vorliegenden Arbeit erwähnt. Auch die verschiedenen möglichen pathophysiologischen Mechanismen die zur Manifestation einer DCM führen können, wurden in diesem Zusammenhang behandelt. Die genauere Aufarbeitung vermuteter genetischer Veränderungen gestaltet sich in der Regel schwierig, da die Identifizierung möglicher Gene, welche an der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnten, aus dem kompletten Genpool erfolgt und jedes hiervon exakt untersucht werden muss. Zusätzlich werden viele Syndrome erst im späteren Lebensalter symptomatisch und bedingen ab diesem Zeitpunkt eine hohe 5-Jahres-Mortalitätsrate von über 50 %<sup>126</sup>, sodass weitere Untersuchungen möglicherweise nicht zeitgerecht stattfinden können<sup>127</sup>.

Bisher wurden mehr als 40 Gene identifiziert in denen Mutationen zu einer DCM führen können<sup>68, 128-133</sup>. Da diese Gene häufig für unterschiedliche Proteine kodieren, kann bei der familiären DCM von einer starken genetischen Heterogenität gesprochen werden<sup>134</sup>. Es verwundert daher nicht, dass gewisse Mutationen nicht nur phänotypische Auswirkungen im Herz von Betroffenen, sondern auch in anderen Organen nach sich ziehen. Es existieren mehrere genetisch bedingte Syndrome, bei denen neben kardialer Dysfunktion auch eine auditorische Beeinträchtigung vorliegt<sup>135</sup>. Oftmals sind in diesen Fällen jedoch zusätzliche Organdysfunktionen wie beispielsweise Enzephalomyelopathien, nicht-insulin-abhängiger Diabetes oder Ataxie nachweisbar<sup>123, 136-138</sup>. Die Kombination rein kardialer und auditorischer Beeinträchtigungen ist selten.

Insofern war es ein Novum, als Schönberger *et al.* im Jahr 2000 ein bisher unbekanntes, autosomal-dominant vererbtes, Syndrom beschrieben<sup>127</sup>. 2 betroffene Brüder wiesen hierbei einen seit über 20 Jahren bestehenden sensorineuralen Hörverlust (SNHL) auf und präsentierten sich mit einer sich im Verlauf aggravierenden DCM, welche eine Herztransplantation notwendig machte<sup>127</sup>. Nachforschungen innerhalb der Familie der Betroffenen ergaben 6 weitere adoleszente Betroffene mit linksventrikulären Abnormalitäten und Hörverlust sowie 3 Betroffene mit SNHL ohne kardiale Auffälligkeiten (siehe Abbildung 5).





**Abbildung 5: Stammbaum der Indexfamilie für das Syndrom aus SNHL und DCM**

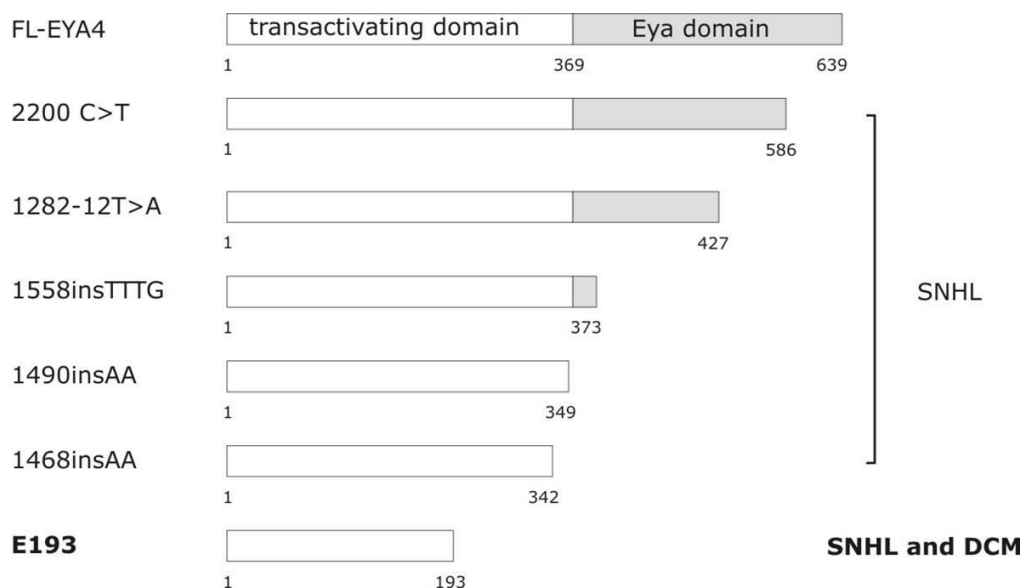
Gefüllte Symbole zeigen Betroffene von SNHL und DCM, freie Symbole zeigen unbetroffene Individuen. Halb links gefüllte Symbole zeigen nur von SNHL-Betroffene Individuen. Durchgestrichene Symbole bezeichnen verstorbene Individuen. Markierung mit Stern zeigt Indexpatienten.

Nach <sup>127</sup>

Erweiterte genetische Analysen zeigten, dass sich das beteiligte Gen auf dem Chromosom 6q23-24 befand. Weitere Untersuchungen von dort lokalisierten Genen, welche neben kardialer auch für kochleäre Transkripte kodieren, engten die ursächlichen Gene auf 3 voneinander verschiedene ein. Hierunter befanden sich das Gen für den Transkriptionsfaktor Epikardin (TCF21), das für die Glukokortikoid-induzierbare Kinase SGK-1 und jenes für den Transkriptionsfaktor EYA4. In letzterem konnte schließlich eine 4846-Basenpaare lange Deletion nachgewiesen werden, welche in allen betroffenen Familienmitgliedern präsent, in den anderen getesteten Vergleichsgenomen jedoch abwesend war. Diese Mutation führt zu einem Transkript, welches nach dem Aminosäurerest 193 einen Frameshift aufweist, sodass nach 29 neuen Aminosäureresten schlussendlich ein Stoppkodon abgelesen wird. Dieser Umstand führte zur Namensgebung dieser Mutante: E193 <sup>139</sup>. Um ferner zu beweisen, dass Eya4 eine Bedeutung in Funktion und Entwicklung kardialer Gewebe hat, wurden weitere Versuche im Zebrafischmodell durchgeführt. Die Injektion von antisense morpholino Oligonukleotiden führte zu anomal gespliceter RNA in Versuchszellen, was sich klinisch in Perikardergüssen und

Hämoperikardia äußerte. Zusätzlich präsentierten sich die Ventrikel der injizierten Tiere deutlich kleiner als die der Vergleichstiere <sup>139</sup>.

Das Besondere an der Identifizierung der EYA4-Mutation als Ursache der Entstehung einer DCM ist, dass es die erste nachgewiesene Mutation in einem Transkriptionskofaktor darstellt die zu einer solchen Erkrankung führt <sup>127, 139</sup>. Bisherige Mutationen betrafen vor allem Gene für Struktur- und Sarkomerproteine (s.o.) aber kein Gen eines Transkriptionskofaktors. Alle bisher beschriebenen Mutationen in humanem EYA4 resultieren in isoliertem SNHL und führen zu keiner Ausprägung eines kardialen Phänotyps (siehe Abbildung 6) <sup>140-142</sup>.

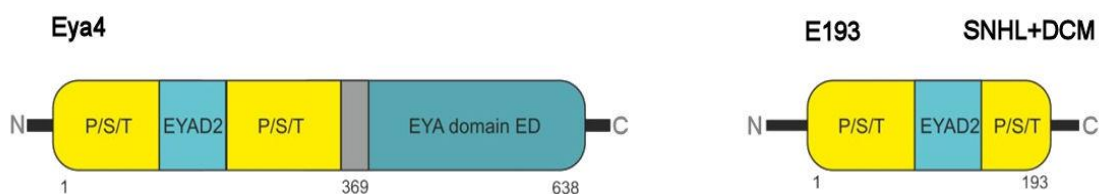


**Abbildung 6: Strukturelle Unterschiede bekannter EYA-Mutationen im Vergleich**

Modifiziert nach <sup>139</sup>

Eya-Proteine bestehen aus einer C-terminalen und einer N-terminalen Domäne, welche sich in Größe und Funktion unterscheiden <sup>142-144</sup>. Charakteristisch für Eya-Proteine ist eine hochkonservierte, ca. 271 bis 275 Aminosäuren lange, sogenannte Eya-Domäne (ED), welche sich am C-Terminus des Proteins befindet und unter anderem für die direkte Interaktion mit anderen Proteinen zuständig ist. Zudem besitzen sie eine intrinsische und extrinsische Phosphataseaktivität in Form einer Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) (siehe Abbildung 7) <sup>144-147</sup>. Die ED beinhaltet das charakteristische Sequenzmotiv für eine Subgruppe der PTP, die der Haloazid-Dehalogenasen (HAD) <sup>148, 149</sup>. Diese

speziellen Enzyme finden sich über viele Speziesgrenzen hinweg auch in Bakterien sowie in Menschen. Ihre detaillierte Funktion ist bis heute, vor allem in Eukaryoten, nicht definitiv geklärt. Bisher konnte nur ein Substrat dieser PTP nachgewiesen werden, das Histoneprotein H2AX<sup>150, 151</sup>. Da sie allerdings den posttranslationalen Zustand der Eya-Proteine verändern können und dies die Proteinstabilität, -konformation, subzelluläre Lokalisation, Interaktionsfähigkeit als Kofaktor sowie die Transaktivierungsfunktion beeinträchtigen kann, erscheint durch diese Funktion eine Anpassung an bestimmte Signale in Form einer schnellen Adaptation möglich<sup>144, 152-154</sup>.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Wildtyp Eya4 (links abgebildet) und der Mutante E193 (rechts abgebildet) welche zu SNHL und DCM führt**

Modifiziert nach<sup>155</sup>

Eya-Proteine definieren eine neue Klasse von PTP, da Ihnen ein essentielles Merkmal dieser Gruppe, der Cysteinrest welcher für die Katalysefunktion nötig ist, fehlt<sup>156, 157</sup>. Diese Phosphataseaktivität fehlt in einzelnen Mutationen von Eya4, so beispielsweise in E342 (1468insAA, siehe Abbildung 6) und E193.

Die ED ist zwischen Vertebraten und Invertebraten, aber auch zwischen unterschiedlichen Eukaryoten, in großen Teilen identisch. So ist beispielsweise das Eya-Protein der Pflanze *Arabidopsis thaliana* zu 39 % Sequenzhomolog zum humanen und das murine Eya-Protein ist mit dem des Menschen zu 98,7 % identisch<sup>158</sup>. Eine N-Terminale Domäne ist bei in Pflanzen exprimierten Eya-Proteinen hingegen nicht nachweisbar<sup>155</sup>.

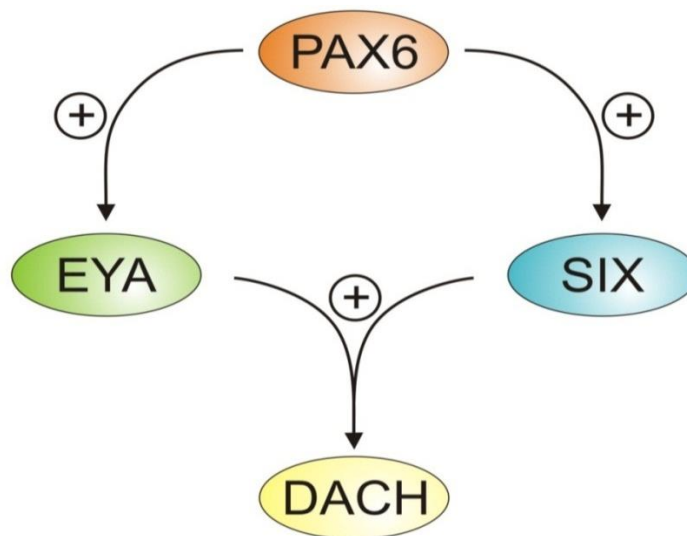
Die Austauschbarkeit der einzelnen Eya-Proteine zwischen verschiedenen Spezies unterstreichen Experimente in denen es möglich war, einen sogenannten „eyeless“ Phänotyp von *Drosophila*, bei dem das *Eya*-Gen mutiert und die Fliegen wegen defekter Eya-Proteine phänotypisch augenlos waren, durch Expression von humanem EYA1, -2 oder -3 Augen zu verleihen und den „eyeless“-Phänotyp zu reversibilisieren<sup>159, 160</sup>.

Die N-Terminale Domäne, die bei Menschen zwischen 200 und 300 Aminosäuren lang ist, ist im Vergleich hierzu variabler und andere Forschungsarbeiten konnten nachweisen, dass sie eine gewisse Transaktivierungsfunktion besitzt (siehe Abbildung 7) <sup>161, 162</sup>. Die Domäne wird beidseits von Prolin-, Serin- und Threonin-reichen Sequenzen flankiert (siehe Abbildung 7) und kürzlich konnte für sie eine Threonin-Phosphataseaktivität nachgewiesen werden <sup>163, 164</sup>. Über eine klar definierte Funktion dieser Aktivität oder ein spezifisches Substrat wurde bisher zwar noch nicht berichtet, es konnte hierzu aber gezeigt werden, dass die Threonin-Phosphatase eine bedeutende Rolle in der Aktivierung der angeborenen Immunität im Zytoplasma der Zelle hat <sup>163</sup>. Zusammengefasst sind Eya-Proteine nicht mehr nur simple Transkriptionskofaktoren, die in einer isolierten linearen Kaskade der Signaltransduktion mitwirken, sondern vielmehr in einem komplexen System verschiedenster Wechselwirkungen stehende und vor allem hierin stetig den finalen Effekt dieser Kaskade beeinflussende Moleküle <sup>157</sup>.

Wildtypisches Eya4 ist eines von 4 Homologen (Eya1-4) des Gens „*eyes absent*“ (*eya*), welches bei *Drosophila melanogaster* vor allem an der Entwicklung retinaler Strukturen beteiligt ist <sup>165, 166</sup>. Diverse Studien zeigten hierbei den direkten Zusammenhang zwischen der korrekten Genfunktion von *Eya* und der phänotypischen Augenentwicklung. Kommt es zu einem Funktionsverlust des *Eya*-Gens, fehlt betroffenen *Drosophila melanogaster* jegliche Augenentwicklung <sup>167, 168</sup>. Durch direkte Expression dieses Gens in Zellen an beliebigen Körperstellen hingegen ist eine Formation ektopter Augen jederzeit möglich <sup>159, 169, 170</sup>.

Neben „*eyes absent*“ gehören noch „*twin of eyeless (Toy)*, *eyeless (Eye)*, *sine oculis (So)* und *dachshund (Dac)*“ zu diesem Netzwerk retinaler Entwicklung (RD, engl. für Retinal Determination). Bei Säugetieren sind die entsprechenden homologen Gene „*Pax6* (für *Toy* und *Eye*), *Eya*, *Six* (für *So*) und *Dach* (für *Dac*)“ <sup>171</sup>. Dieses Netzwerk wird, analog zu *Drosophila*, oft als *Pax-Six-Eya-Dach*-Netzwerk (PSEDN) bezeichnet <sup>155</sup>. Die Mitglieder dieses Netzwerkes sind als Regulatoren embryonaler Entwicklungsvorgänge in unterschiedlichen Geweben wie z.B. Auge, Ohr, Muskel, Hypophyse und Nieren sowie in diversen weiteren essentiellen Entwicklungsvorgängen bei allen Metazoen involviert <sup>165, 172-174</sup>. Neuere Forschungsergebnisse zeigen ebenfalls eine Beteiligung von Eya-Proteinen in Angiogenese, Reparatur von DNA-Schäden sowie in der

Metastasierung maligner Tumoren <sup>155</sup>. Im RD von Vertebraten wie auch Invertebraten besteht unter den einzelnen Proteinen eine gewisse Hierarchie. Hierbei ist *Pax6* in der Hierarchie ganz oben angeordnet und sorgt für die Aktivierung der Expression von *Eya* und *Six*. Diese beiden bewirken in synergistischer Weise die Induktion der Expression von *Dach* (siehe Abbildung 8) <sup>161</sup>. Diese Regulation ist jedoch nicht als lineare Hierarchie anzusehen, sondern ein komplexes Zusammenwirken mehrerer Vorgänge, die sich untereinander beeinflussen <sup>170, 175</sup>.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hierarchie im RD-Netzwerk**

*Pax6* aktiviert die Transkription von *Eya* und *Six* welche synergistisch zusammen wirken und *DACH* induzieren.

Modifiziert nach <sup>161</sup>

Als Transkriptionskofaktoren wird Eya-Proteinen bisher keine eigene DNA-Bindedomäne zugeschrieben, weiterhin konnte bis dato auch keine eindeutige nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) für Eya-Proteine von Vertebraten gezeigt werden. Hinzu kommt, dass sie, um ihre regulatorische Funktionen im Nukleus der Zelle wahrnehmen zu können, an echte Transkriptionsfaktoren binden müssen <sup>143, 159, 176</sup>. Es wurde hierzu gezeigt, dass Eya-Proteine nach Kotransfektion mit dem Transkriptionsfaktor Six1 mit diesem komplexieren und in den Kern importiert werden <sup>142</sup>. Six-Proteine hingegen können, aufgrund zweier eigener NLS, auch ohne diese Komplexierung in den Kern translozieren und dort als Aktivator und/oder Repressor ihre Zielgene regulieren. Die

letztendliche Wirkung wird hierbei durch eventuelle Kofaktoren, wie beispielsweise Eya4, beeinflusst.

Der Zusammenhang, aufgrund dessen alle anderen bisher bekannten humanen EYA4-Mutationen isolierten SNHL ohne kardiale Beteiligung verursachen und E193 einen kardialen Phänotyp präsentiert, kann eventuell durch die fehlende Möglichkeit der Dimerisierung mit wildtypischem Eya4 und der Komplexierung mit Six1 erklärt werden. In der Literatur wird beschrieben, dass E193 nicht mehr die Fähigkeit zur Dimerisierung mit wildtypischem Eya4 und Komplexierung mit Six1 besitzt<sup>139</sup>. Zusätzlich wird mutierten Eya-Proteinen ebenfalls eine beschleunigte Biodegradierung zugeschrieben, welche einen weiteren Grund für verminderte Funktionalität darstellen kann<sup>142</sup>.

Da sogenannte Transkriptionskofaktoren für einen Import in den Nukleus der Zelle an echte Transkriptionsfaktoren binden müssen, dürfte dieser Hypothese folgend kein E193 im Nukleus der Zelle nachgewiesen werden können.

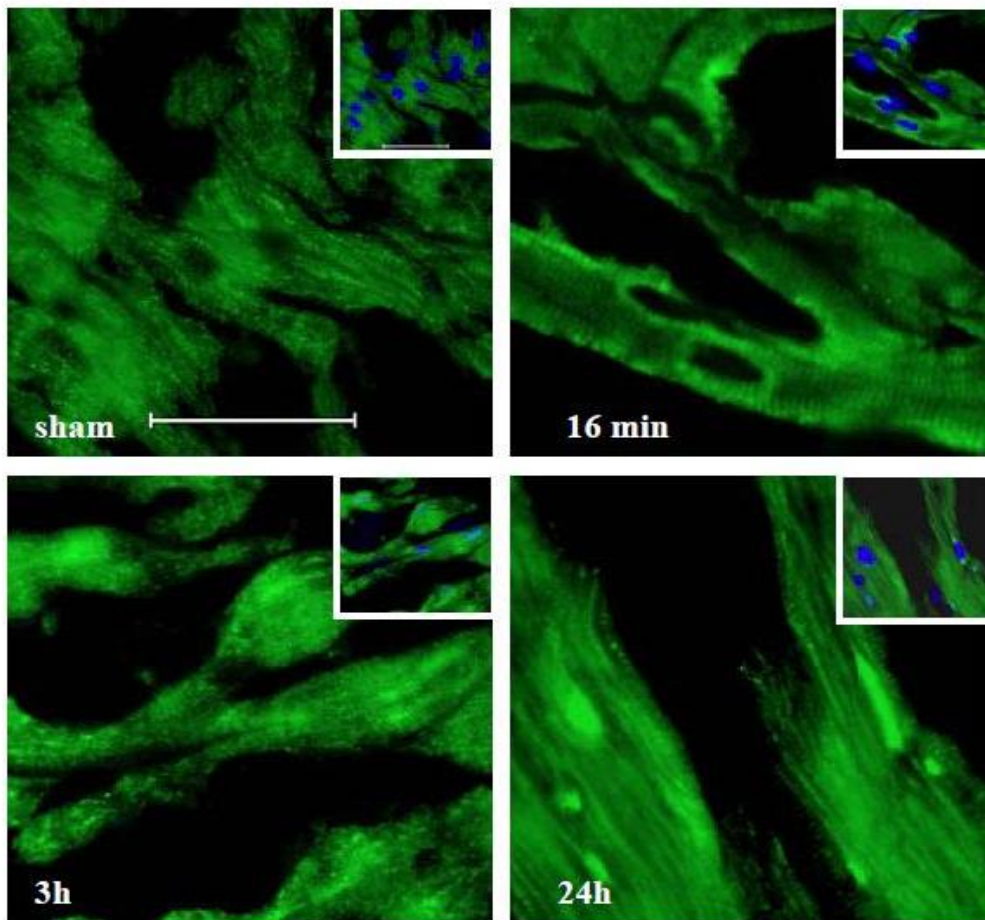
Über die spezifische Funktion von Eya4 im myokardialen Gewebe von Säugetieren ist bislang wenig bekannt. Ein Target, welches myokardial exprimiert wird und eine wichtige Funktion in der kardialen Homöostaseerhaltung und Herzentwicklung hat, ist die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase<sup>177</sup>. Diese sorgt für einen Ionenaustausch über die Zellmembran entgegen des vorherrschenden Gradienten, indem sie 3 Natriumionen nach extrazellulär und 2 Kaliumionen nach intrazellulär unter ATP-Verbrauch aktiv transportiert. Hierdurch ist sie am Erhalt der elektrischen Leitfähigkeit und Impulsbildung in Kardiomyozyten durch Konstruktion eines elektro-chemischen Gradienten beteiligt. Im Zusammenspiel mit dem Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher wird so über die Reduktion des Kalziumtransports nach extrazellulär die Kontraktilität des Myokards erhöht<sup>178, 179</sup>. Doch auch an der physiologischen Herzentwicklung ist die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase beteiligt. So konnte im Zebrafischmodell gezeigt werden, dass eine mutierte Isoform der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zu verkleinerten und malformierten Herzen führte, deren Funktion stark eingeschränkt war<sup>180, 181</sup>.

Neben Eya4 konnte für Eya2 eine wichtige Funktion in der Regulation von myokardialer Hypertrophie von Lee *et al.* nachgewiesen werden<sup>182</sup>. Durch Ligation des Aortenbogens wurde in dieser Arbeit eine Anpassung des Myokards an die erhöhte Druckbelastung erzwungen. Es konnte gezeigt werden, dass Eya2-überexprimierende

Mäuse signifikant weniger pathologisches Remodeling aufweisen als Wildtypmäuse. Zusätzlich wurde spekuliert, dass Eya2 das pathologische Remodeling stoppen und einen Signalweg für die physiologische Hypertrophie ohne kardialen Funktionsverlust induzieren könnte<sup>182, 183</sup>. Da neben Eya4 auch Eya2 eine wichtige Rolle in der kardialen Homöostase inne zu haben scheint, wäre eine kardioprotektive Rolle von Eya-Proteinen denkbar.

### **1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe**

Um neben der bisher bekannten kausalen Bedeutung von Eya4 im Falle einer mutierten Isoform auch eine Beteiligung des Eya4-Signalweges bei erworbenen kardialen Erkrankungen nachzuweisen, wurde an histologischen Schnitten von murinem und humanem Myokard ein polyklonaler Eya4-Antikörper verwendet. Zunächst konnte hierdurch die homogene zytoplasmatische Lokalisation des Proteins in humanem und murinem Myokard nachgewiesen werden. Kommt es zu einer pathophysiologischen Schädigung des myokardialen Gewebes, wird Eya4 in den Kern transloziert. Im murinen Infarktmodell konnte ferner nachgewiesen werden, dass die Translokation von Eya4 bereits wenige Minuten nach dem Insult eintritt (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Zeitabhängige Translokation von Eya4 (grün) in den Nukleus im Infarktmodell.**

Im gesunden Myokard ist Eya4 zytosolisch lokalisiert. Bereits wenige Minuten post-Infarkt wird Eya4 in den Kern transloziert. Blau: DAPI

Zum Nachweis der Lokalisierung von Eya4 sowie E193 innerhalb der Zelle, auch in Abhängigkeit der Expression von Six1, wurden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Eya4- (DsRed-Eya4), E193- (DsRed-E193) sowie Six1- (GFP-Six1) Expressionsvektoren kloniert. Um die Funktion von Eya4 und E193 in primären Kardiomyozyten untersuchen zu können, wurden des Weiteren Eya4- und E193-Vektoren auf adenoviraler Basis kloniert.

#### **1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Dass die Mutante E193 des Transkriptionskofaktors Eya4 zur Manifestation von früh einsetzendem SNHL und später einsetzender DCM (siehe oben) führt, wurde bereits

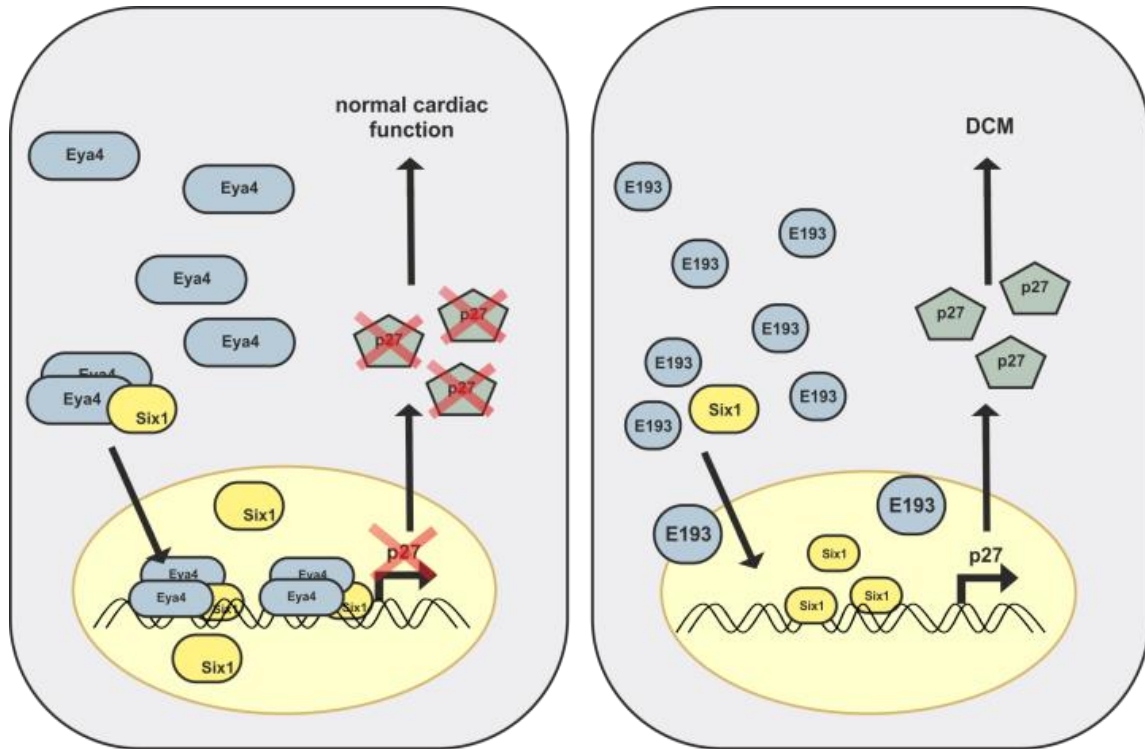


dargelegt<sup>139</sup>. Da der Finalzustand einer progressiv verlaufenden DCM stets eine sich im Laufe der Zeit aggravierende Herzinsuffizienz zur Folge hat, war die Untersuchung des Einflusses des Eya4-Signalweges auf Entstehung und Verlauf einer Herzinsuffizienz eine logische Schlussfolgerung aus den bisher publizierten Arbeiten.

Im Jahr 2013 bezogen sich 164.422 wissenschaftliche Publikationen auf das Thema Herzinsuffizienz (Pubmed, Stand 06.08.2013). Im Vergleich hierzu sind die erfassten Publikationen zum spezielleren Thema DCM mit 4.084 im Jahr 2013 deutlich geringer. Das Thema Herzinsuffizienz wird vermutlich zukünftig, gerade aufgrund des demografischen Wandels in Deutschland<sup>184</sup>, weiterhin große Bedeutung haben und wahrscheinlich eine noch größere Geltung in den globalen Gesundheitssystemen erlangen<sup>1</sup>. Insofern ist die Thematik molekularer Mechanismen und Signalwege, die eine Herzinsuffizienz beeinflussen oder in ihre Entstehung involviert sind, stark vorangetrieben worden und gegenwärtig immer noch weltweit Gegenstand intensiver Forschung. Dennoch sind potentielle Mechanismen und Targets in der Entstehung kardialer Hypertrophie und sich daraus ergebender Herzinsuffizienz nach wie vor mehrheitlich unbekannt<sup>185</sup>.

Die Überlegung, den Eya4/Six1-Signalweg auf Zusammenhänge mit der Entstehung einer erworbenen Herzinsuffizienz und nicht nur im kausalen Falle einer Eya4-Mutante zu untersuchen, ergab sich, nachdem von Li *et al.* gezeigt wurde, dass der Transkriptionsfaktor Six6 zusammen mit Dach eine direkte reprimierende Wirkung auf den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor p27<sup>kip1</sup> ausübt<sup>186</sup>. Des Weiteren konnten Hauck *et al.* nachweisen, dass p27<sup>kip1</sup> nicht nur während einer Zellzyklusregulation sondern auch in postmitotischen Kardiomyozyten aktiv ist und über sein Substrat CK2- $\alpha'$  (Casein Kinase 2) inhibiert wird, was eine Hypertrophie in adulten Kardiomyozyten erst ermöglicht<sup>187</sup>. Als in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe daraufhin nachgewiesen werden konnte, dass eine Six1-Bindungsstelle im Promotor des p27-Gens existiert (unpublished data), war es das erklärte Ziel, zu untersuchen, ob eine Regulation von p27<sup>kip1</sup> durch Eya4 stattfindet. Ferner sollte die Relevanz der physiologischen Funktionalität des Eya4/Six1-Komplexes in der Aufrechterhaltung der kardialen Homöostase untersucht werden. Hierbei war es die Zielsetzung, die Hypothese zu belegen, dass der Eya4/Six1-Komplex Targets, die für die normale kardiale Funktion eminent sind, via p27<sup>kip1</sup>

reguliert und somit eine wichtige Rolle in der Erhaltung einer normalen kardialen Funktion innehat (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Hypothese der Funktion des Eya4/Six1-Signalweges in der Entstehung myokardialer Hypertrophie**

**Linkes Abbild:** Unter Normalbedingungen befinden sich Eya4 und Six1 zum größten Teil im Zytoplasma, die p27-Level sind ausreichend, um eine Hypertrophie zu unterbinden. Kommt es zu einem Hypertrophiestimulus, komplexieren Eya4 und Six1 und translozieren in den Kern, die Konzentration im Kern steigt und sinkt im Zytoplasma. Intranukleär hemmen sie die Expression von p27. Somit wird eine physiologische Hypertrophie möglich. **Rechtes Abbild:** Ein Defekt der Eya4-Signalkaskade, z.B. durch die Mutante E193, könnte über eine Verhinderung der Inhibition zu permanent erhöhten p27-Leveln führen und, mangels Adaptation an sich täglich ändernde myokardiale Lasten, zu spät einsetzender Herzinsuffizienz führen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Firma	Gerätebezeichnung
Autoklav	Systec	V150
Eismaschine	Scotsman	AF200
ELISA-Reader	Tecan	Tecan Spectra
ELISA-Reader	Dynex	Dynex MRX tc
Entwicklermaschine	Protec medical systems	Ecomax
Feinwaage	Sartorius	BP61
Fluoreszenzmikroskop	Keyence	Biozera BZ-8000K
Folienschweißgerät	Clatronic	FS 3261
Folienschweißgerät	Severin	Folio
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr	Economy, öko super
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch	Economic
Gefrierschrank (-80 °C)	National Lab	Profi Star
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus	Hera freeze
Gefrierschrank (-80 °C)	Forma Scientific	-86C Freezer
Heizblock	Eppendorf	ThermoStat plus
Homogenisator	IKA	EUROSTAR digital
Inkubator	Heraeus	Function line
Inkubator	Forma Scientific	Steri-Cult 200

## Material

Kühlschrank (4 °C)	Siemens	KT14R31, KT14R30
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr	glass line, Premium, comfort
Lichtmikroskop	Leitz	Labovert
Lichttisch	Universität Würzburg	
Luminometer	Berthold Industries	Lumat LB9501
Magnetrührer	IKA Labortechnik	RH basic2, Ikamag RET, Ikamag RCT
Magnetrührer	Hartenstein	Hotplate Stirrer L-71, Hot- plate Stirrer L-81
Magnetresonanztomograph	Bruker Biospin Germany	Bruker Biospec 70/20
Photometer	Eppendorf	Bio-Photometer
Power Supply	Biometra	P25, PP4000
Power Supply	Hoefer	SX250
Scanner	Epson	Expression 1600
Schüttler	Hartenstein	L-40,Mini Rocker MR-1
Schüttler	Braun Biotech	Certomat R
Schüttler	Heidolph	Duomax 1030
Sonikator	Julabo	USR 05
Sterilbank	Steril S.p.A.	Antares 72
Vakuumpumpe	KNF	LAB Laboport
Vortexer	LMS	VTX-3000L
Vortexer	Lab 4 you	Bio Vortex V1
Vortexer	Heidolph	Reax 1 D R

Waage	Kern&Sohn	EW2200-2NM
Wasserbad	Haake	Thermo C10
Wasserbad	Inlabo	SW20C
Zentrifuge	Sigma	2K15, Sigma 2-15
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge pico
Zentrifuge	Beckman	GPKR Centrifuge

## 2.2 Verbrauchsmaterial

### 2.2.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial

Generell wurden die allgemeinen Verbrauchsmaterialien, wie zum Beispiel Plastikröhrchen, Zellkulturschalen oder Pipettenspitzen, über die Universitätsklinik Würzburg (Medizinische Fakultät, Zentrallager), die Firma A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, Deutschland) oder die Firma Weckert Labor-, Röntgen- und Medizintechnik (Kitzingen, Deutschland) bezogen.

### 2.2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, über die Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg oder über die Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (München, Deutschland) und A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, Deutschland) bezogen.

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primärantikörper

Primär-Antikörper	Firma	Katalog Nr.	Verdünnung
Rabbit monoclonal anti-HA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	H6908	1:1.000 WB
Rabbit monoclonal anti-p27 <sup>kip1</sup>	Abcam, Cambridge, UK	ab 32034	1:300 WB 1:50 ICH
Rabbit monoclonal anti-p27 <sup>kip1</sup> (phospho T157)	Abcam, Cambridge, UK	ab 60019	1:200 WB 1:50 ICH
Goat polyclonal anti-p27 (Thr187)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-16324	1:300 WB 1:50 ICH
Rabbit polyclonal anti-p27 <sup>kip1</sup>	Abcam, Cambridge, UK	ab 7961	1:150 WB 1:50 ICH
Mouse monoclonal anti-GAPDH	Millipore, Temecula, Kalifornien	MAB374	1:3.000 WB
Goat polyclonal anti-Eya4-N-Terminal	Abcam, Cambridge, UK	ab 47990	1:300 WB
Rabbit polyclonal anti-Six 1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-9127	1:200 WB
Mouse monoclonal anti-Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase $\beta$ 2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-135997	1:200 WB

## Material

Rabbit polyclonal anti-ANP	Chemicon International, Temecula, Kalifornien	AB5490	1:250 WB
Rabbit monoclonal anti-p27 <sup>kip1</sup> (Ser-10)-R	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-12939	1:50 ICH
Rabbit polyclonal anti-p27 <sup>kip1</sup> (Phospho T198)	Abcam, Cambridge, UK	ab 64949	1:50 ICH
Rabbit polyclonal anti-Histone H1 (FL-219)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-10806	1:250 WB

### 2.3.2 Sekundärantikörper

Sekundär-Antikörper	Firma	Katalog Nr.	Verdünnung
Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG (H+L)	Invitrogen <sup>™</sup> , Darmstadt, Deutschland	A11058	1:200
Cy3 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen <sup>™</sup> , Darmstadt, Deutschland	A10520	1:200
ECL anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)	GE Healthcare, München, Deutschland	NA931V	1:5.000
ECL anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked F(ab') <sub>2</sub> (from donkey)	GE Healthcare, München, Deutschland	NA9340V	1:5.000
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-2020	1:3.000

## 2.4 Kommerzielle Kits

Kits	Firma	Katalog Nr.
Qiagen® Plasmid Purification Kit	Qiagen® GmbH, Hilden, Deutschland	12162
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München, Deutschland	RPN2106
DharmaFECT® 2 Transfection Protocol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	T-2005-01
Lipofectamine™ PLUS™ System	Life Technologies™, Darmstadt, Deutschland	15338030
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland	200518
Quant-iT™ dsDNA Assay Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	Q-33130
Qiagen® DNeasy Tissue Kit	Qiagen® GmbH, Hilden, Deutschland	Q-69582
ViraPower™ Adenoviral Expression System	Invitrogen™, Darmstadt, Deutschland	K4930-00 K4940-00

## 2.5 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Firma
Forward-Primer Genotypisierungs PCR	5'-TGG GAG AGC CAT AGG CT-3'	Eurofins MWG Operon
Reverse-Primer Genotypisierungs PCR	3'- GCG GCG AAG CTT TTA GTA AGT GGG-5'	Eurofins MWG Operon



## Material

Forward-Primer Gateway <sup>®</sup> Klonierung Eya4	5'-TAC GGT ACC ATG GAA GAC TCC C-3'	Eurofins MWG Operon
Reverse-Primer Gateway <sup>®</sup> Klo- nierung Eya4	5'-TAC CTC GAG TTA CAA ATA CTC TAA-3'	Eurofins MWG Operon
Reverse-Primer Gateway <sup>®</sup> Klo- nierung E193	5'-TAC CTC GAG TTA GTA AGT GGG C-3'	Eurofins MWG Operon
Forward-Primer Mutagenese Position -2604	5'-ACA GAA AAT GAA CCA AGA GTG TTA GGA GAC T-3'	Eurofins MWG Operon
Foward-Primer Mutagenese Po- sition -1794	5'-GCT TGG GAA GGA AGA TGG GCC AGG GGT GTA C-3'	Eurofins MWG Operon
Reverse-Primer Mutagenese Position -2604	5'-AGT CTC CTA ACA CTC TTG GTT CAT TTT CTG T- 3'	Eurofins MWG Operon
Reverse-Primer Mutagenese Position -1794	5'-GTA CAC CCC TGG CCC ATC TTC CTT CCC AAG C- 3'	Eurofins MWG Operon

## 2.6 Plasmide

Bezeichnung	Firma
pAd-CMV-Dest-DsRed-Eya4	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
pAd-CMV-Dest-DsRed-E193	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
pAd-CMV-Dest-GFP-Six1	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

## 2.7 siRNA

Bezeichnung	Firma
Dharmacon siRNA	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

## 2.8 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im Haus aus den Herzen von neonatalen weiblichen und männlichen Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Deutschland) isoliert.

## 2.9 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.9.1 Puffer, Lösungen und Medien für die Isolierung von nukleären und zytosolischen Proteinen

#### 1x PBS pH 7,4

#### Puffer A

Inhaltsstoffe	Volumen / 10 ml	Endkonzentration
Hepes (pH 7,9)	1,0 ml	10 mM
KCl	0,2 ml	10 mM
EDTA	0,01 ml	0,1 mM
EGTA	0,02 ml	0,1 mM
DTT	0,025 ml	1 mM
PMSF	0,05 ml	0,5 mM

## Material

---

### Puffer C

Inhaltsstoffe	Volumen/ 10 ml	Endkonzentration
Hepes (pH 7,9)	2,0 ml	20 mM
NaCl	4,0 ml	0,4 M
EDTA	0,02 ml	1 mM
EGTA	0,2 ml	1 mM
DTT	0,02 ml	1 mM
PMSF	0,1 ml	1 mM

- dH<sub>2</sub>O zum Auffüllen der Pufferlösungen auf 10 ml/Ansatz

### 2.9.2 Zellkultur

#### 1x PBS pH 7,4 zum Waschen der Zellen

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 5 l	Endkonzentration
NaCl [58,44]	40,0 g	137 mM
KCl [74,56]	1,0 g	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O [177,99]	7,2 g	8,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [136,09]	1,02 g	1,5 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 5,0 l	

#### DMEM/10 (Dulbecco's Modified Eagles's Medium mit 10 % FCS)

Inhaltsstoffe	Volumen	Endkonzentration
DMEM (Invitrogen™)	500,0 ml	

## Material

#D6046)		
Penicillin G	5,0 ml	100,0 U/ml
Streptomycin	5,0 ml	0,1 mg/ml
FCS	50,0 ml	10 %

## Nährmedium für NRCM

- MEM HBS mit NEAA (AMIMED<sup>®</sup> Bioconcept)

Inhaltsstoffe	Volumen/ 1000 ml	Endkonzentration
MEM HBS mit NEAA	12,5 g	
L-Glutamin (Sigma-Aldrich #G8540-25G)	292 mg	2,0 mM
Natrium-Bicarbonat (Sigma-Aldrich #S-5761)	350 mg	4,2 mM
Vitamin B12	1 ml	2,0 µg/ml
Penicillin G	1 ml	50 U/ml
Streptomycin	1 ml	50 µg/ml
Bromdesoxyuridin	5 ml	0,1 mM
FCS	50 ml	5 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

## Isoliermedium für NRCM

- Calcium und Bikarbonat-freies Hanks mit Hepes (CBFHH)

## Material

Komponente (MW [g/mol])	Stocklösung [g/l]	ml Stock/ l CBFHH	Endkonzentration [mM]
NaCl (58,44)	200	40	137
KCl (74,55)	40	10	5,36
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	20	10	0,81
Dextrose	100	10	5,55
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (136,09)	6	10	0,44
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (141,96)	9	10	0,34
Hepes, pH 7,4	47,66	100	20,06

- T- und D-Lösung: Zugabe von 150 mg Trypsin (1,5 mg/ml) (Difco Trypsin 250 #215240) pro 100 ml CBFHH und 1ml DNase (2 mg/ml) pro 100 ml CBFHH

### 2.9.3 Western Blot

#### RIPA-Puffer

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Stock-Lsg.	Volumen bzw. Gewicht/100 ml	Endkonzentration
NaCl [58,44]	1,0 M	15,0 ml	150,0 mM
Tris [121,14]	1,0 M	5,0 ml	50,0 mM
PMSF [174,19]	100,0 mM	1,0 ml	1,0 mM
IGEPAL CA-630		1,0 ml	1,0 %
DOC [416,6]	10 %	5,0 ml	0,50 %
SDS [288,38]	10 %	1,0 ml	0,10 %
dH <sub>2</sub> O		ad 100,0 ml	

#### 4x Laemmli-Puffer

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 10 ml	Endkonzentration
1 M Tris pH 6,8	2,4 ml	0,24 M
SDS [288,38]	0,8 g	0,08 %
Glycerol [92,1]	4,0 ml	0,4 %
$\beta$ -Mercaptoethanol [78,13]	1,0 ml	0,1 %
Bromphenolblau [669,96]	0,1 ml	0,01 %
dH <sub>2</sub> O	2,8 ml	

#### 1,5 M Tris pH 8,8

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
Tris [121,14]	18,15 g	1,5 M
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

#### 1,0 M Tris pH 6,8

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
Tris [121,14]	12,0 g	1,0 M
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

## Material

---

### 10 % SDS pH 8,0

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
SDS [288,38]	10,0 g	10,0 %
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

### SDS-Gele

#### 1. Trenngel

Inhaltsstoffe	5 %	7,5 %	10 %	12 %	15 %
dH <sub>2</sub> O	11,39 ml	9,69 ml	8,02 ml	6,69 ml	4,69 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Acrylamid/Bis (30 % Stock)	3,3 ml	5,0 ml	6,67 ml	8,0 ml	100,0 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

#### 2. Sammelgel

Inhaltsstoffe	Volumen 10 ml für 2 Gele
dH <sub>2</sub> O	5,65 ml
1,0 M Tris pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
Acrylamid/Bis (30 % Stock)	1,7 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,01 ml

**5x PBS pH 7,4**

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 5 l	Endkonzentration (5x)	Endkonzentration (1x)
NaCl [58,44]	20,0 g	342,0 mM	68,4 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O [137,99]	11,73 g	85,0 mM	17,0 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [141,96]	41,17 g	290,0 mM	58,0 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 5,0 l		

**5x Elektrophorese-Puffer pH 8,3**

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 5 l	Endkonzentration (5x)	Endkonzentration (1x)
Tris [121,14]	75,0 g	0,62 M	124,0 mM
Glycin [75,07]	360,0 g	4,8 M	960,0 mM
SDS	25,0 g	0,50 %	0,10 %
dH <sub>2</sub> O	ad 5,0 l		

**Transfer-Puffer pH 8,3**

Inhaltsstoffe	Stock-Lsg.	Volumen/ 1 l	Endkonzentration
5x Elektrophorese Puffer pH 8,3	5x	200,0 ml	1x
MeOH	100 %	200,0 ml	20,0 %
dH <sub>2</sub> O		ad 1,0 l	



### Waschlösung

Inhaltsstoffe	Stock-Lsg.	Volumen/ 1 l	Endkonzentration
5x PBS pH 7,4	5x	200,0 ml	1x
Tween20	100 %	0,5 ml	0,05 %
dH <sub>2</sub> O		ad 1,0 l	

### Blocklösung

Inhaltsstoffe	Stock-Lsg.	Volumen/ 100 ml	Endkonzentration
5x PBS pH 7,4	5x	20,0 ml	1x
Magermilchpulver		5,0 g	5,0 %
dH <sub>2</sub> O		ad 100,0 ml	

## 2.9.4 Immunhistochemie

### Fixierlösung

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
PFA [30,03 als Monomer]	4,0 g	4,0 %
1x PBS pH 7,4	ad 100,0 ml	

**Permeabilisierungslösung**

Inhaltsstoffe	Volumen/ 50 ml	Endkonzentration
Triton X-100	0,1 ml	0,2 %
1x PBS pH 7,4	ad 50,0 ml	

**Blockierlösung**

Inhaltsstoffe	Volumen/ 5 ml	Endkonzentration
Donkeyserum	0,5 ml	10,0 %
BSA	0,05 mL	1 %
TWEEN	0,005 mL	0,1 %
1x PBS pH 7,4	ad 5,0 ml	

**4',6-Diamidin-2-phenylindol-Lösung**

Inhaltsstoffe	Volumen/ 50 ml	Endkonzentration
DAPI [10 mg/ml]	0,1 ml	0,2 %
1x PBS pH 7,4	ad 50,0 ml	

### 2.9.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

#### An Kryoschnitten

Inhaltsstoffe
Hämatoxylin
Eosin
H <sub>2</sub> O/dH <sub>2</sub> O
96% Ethanol
Roti-Histol a und b
Xylol/Ethanol 1:1
Entelan

### 2.9.6 Picrosirius-Rot-Färbung

#### An Kryoschnitten

Inhaltsstoffe
Sirius red F3BA
50 % Ethanol, 75 % Ethanol, 96 % Ethanol
Roti-Histol a und b
Xylol/Ethanol 1:1
Entelan
dH <sub>2</sub> O

### Cardiomyocyte-Cross-Sectional-Area-Färbung

Inhaltsstoffe
1x PBS pH 7,4
Blue Alexa Fluor 350 conjugate Wheat Agglutinin 1µg/µl (Invitrogen™)
Sytox Green Nucleic Staining 5mM in DMSO (Invitrogen™)
DAPI (10mg/ml)
Red Alexa Fluor 594 conjugate Wheat Agglutinin 1µg/µl (Invitrogen™)

### 2.9.7 Polymerase-Kettenreaktion

#### 50x TAE-Puffer

Inhaltsstoffe	Volumen/Gewicht
Tris (pH 8,3)	42g
CH <sub>3</sub> COOH	55,1 ml
Na <sub>2</sub> EDTA (0,5 M)	100 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

#### 1x TAE-Puffer

Inhaltsstoffe	Volumen
50x TAE-Puffer	20 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

## Material

---

### 10x Ladepuffer

Inhaltsstoffe	Volumen	Endkonzentration
Saccharose		50 %
Bromphenolblau		0,1 %
Na <sub>2</sub> EDTA	0,2 M	

### Nukleotid Stammlösung (100mM)

Inhaltsstoffe	Volumen/Gewicht
dATP (100 mM)	12,5 µl
dCTP (100 mM)	12,5 µl
dGTP (100 mM)	12,5 µl
dTTP (100 mM)	12,5 µl
dH <sub>2</sub> O	950 µl

### 2.9.8 Chemisch kompetente E. coli

#### CAP-Puffer

Inhaltsstoffe	Volumen/Gewicht
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O (60 mM)	2,2 g
15 % Glycerol	37,5 ml
PIPES (10 mM)	0,75 g
dH <sub>2</sub> O	ad 250 ml

## 2.9.9 Anzucht von Bakterienkulturen

### LB-Medium

Inhaltsstoffe	Volumen/Gewicht
Bacto-Trypton (Pepton)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
NaOH	ad pH 7,0-7,5
dH <sub>2</sub> O	ad 1,0 l

### Agarplattenmedium

Inhaltsstoffe	Volumen/Gewicht
Bacto-Trypton (Pepton)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
NaOH	ad pH 7,0-7,5
dH <sub>2</sub> O	ad 1,0 l

## 2.10 Software

- Microsoft Office 2010
- Correl Draw
- SigmaStat 2.03
- MRXe Revelation
- Keyence BZ 8000, BZ image analysis application

- Keyence BZ 8000, BZ observation application
- ScanPacK 3.0
- Epson Scan Expression 1600
- easyWIN basic
- Image J

## **3 Methoden**

### **3.1 Isolierung und Kultivierung von neonatalen Kardiomyozyten**

Die Isolation von Kardiomyozyten aus Herzen von weiblichen und männlichen Wistar-Ratten erfolgte jeweils an 1-3 Tage alten Jungtieren. Nach durchgeführter Desinfektion erfolgte die Dekapitation und die zügige Exzidierung des Herzens. Alle nachfolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank und bei sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Herzen wurden in ein Gefäß mit 10 ml CBFHH und 2,5 ml Heparin überführt. Anschließend erfolgte die Überführung in ein Gefäß mit 1,5 ml CBFHH und 1,5 ml Heparin. In einer leeren Petrischale wurden die Herzen zunächst mit einer Schere und im weiteren Verlauf mit einem Skalpell zerkleinert. Nach weiterer mechanischer Zerkleinerung der Schnitte wurden diese schließlich in einer T- und D-Lösung (bestehend aus CBFHH mit Trypsin und DNase) für 2x 20 min bei geringster Geschwindigkeit auf einem Magnetrührer verdaut. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellüberstand in FCS überführt und die verbleibenden Gewebestücke je für 10 min einem Trypsin-DNase-Verdau unterzogen. Die Zellen wurden im Anschluss bei 1.600 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Um eventuell vorhandene Fibroblasten aus der Suspension zu entfernen erfolgte das Preplating. Hierzu wurde das nach der Zentrifugation vorhandene Pellet in MEM/5 resuspendiert und die entstandene Zellsuspension auf eine 10 cm Petrischale gegeben, welche dann für 1 h bei 37 °C und 1% CO<sub>2</sub> inkubiert wurde. Nach dem Preplating wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und hieraus anschließend auf einer 6-Well Platte ausplattiert. Die Inkubation der adhärenenten, primären Zelllinie erfolgte bei 37 °C in einer 1 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und frisches Medium dazugegeben. Darauf folgende Medienwechsel erfolgten im 2-Tagesrhythmus.

Die Reinheit der Zellkultur wurde zum einen lichtmikroskopisch anhand der für Kardiomyozyten typischen autoelektrischen Erregung des Zellverbandes verifiziert, zum anderen durch immunhistologische Fluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen kardiospezifisches Troponin-T bestätigt.



## **3.2 Etablierung eines Mausmodells**

HA-getaggte E193- und Eya4-cDNA wurde mittels PCR amplifiziert, restriktionsverdaut um passende Schnittstellen zu erhalten und unabhängig voneinander in einen korrekten Säugetierexpressionsvektor (alpha-MyHC clone 26) kloniert. Um eine kardiospezifische Expression zu validieren, wurde das gesamte Konstrukt unter Kontrolle des mausspezifischen  $\alpha$ -MHC-Promotors kloniert. Ob die Klonierung erfolgreich war, konnte im Anschluss mittels einer Sequenzierung des entstandenen Plasmids verifiziert werden. Nach dem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente, bestehend aus dem  $\alpha$ -MHC-Promoter sowie dem HA-Eya4 bzw. HA-E193, mit dem Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette Kit (Pierce Technologies) entsprechend der Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente noch auf die finale Konzentration mittels Zugabe von Mikroinjektionspuffer eingestellt. Darauffolgend wurde die DNA per Mikroinjektion in den Pronukleus männlicher befruchteter Oozyten von Friend Leukemia Virus B-Mäusen (FVB) eingebracht. Diese wurden danach in den Fortpflanzungstrakt scheinchwangerer weiblicher Mäuse implantiert. Durch DNA-Isolierung aus Ohr- oder Schwanzspitzen der Versuchstiere mittels PCR-Analyse wurden sogenannte „Founder“ sowie deren Nachkommen genotypisiert und so die Tiere, welche das Transgen exprimieren, determiniert. Zur DNA-Extraktion wurde das DNeasy Tissue Kit (Qiagen<sup>®</sup>) gemäß Herstellerangaben korrekt verwendet.

## **3.3 Proteinanalytische Methoden**

### **3.3.1 Proteinextraktion aus Zellen**

Die nukleäre und zytoplasmatische Proteinextraktion aus Zellen wurde stets vor sämtlichen proteinanalytischen und biochemischen Methoden durchgeführt. Hierbei wurde zuerst das Behandlungsmedium von den Zellen abgenommen und diese mehrmals mit raumtemperierten 1x PBS gewaschen. Ein definiertes Volumen Puffer A (siehe jeweiliger Abschnitt) wurde auf die Zellen pipettiert, diese mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst und die Zellsuspension anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die intrazellulär lokalisierten Proteine wurden durch einen Zellaufschluss in Lösung gebracht. Die Zellsuspension wurde hierzu 8-10 mal mit einer

Insulinspritze aspiriert und mit Druck zurück durch die dünne Öffnung der Nadel gepresst. Die Suspension wurde durch Zentrifugation (5.000 rpm, 5 min, 4 °C) in Membranbestandteile und Zellüberstand separiert. Die zytoplasmatischen Bestandteile und die RNA blieben im Überstand, der in ein separates Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung konserviert wurde. Das am Boden des Gefäßes verbleibende Pellet, bestehend aus nukleären Proteinen, wurde in Puffer C resuspendiert, für 20 min auf Eis gelagert und alle 5 min geschüttelt. Nach Ablauf der Zeit erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt und der sich hieraus ergebende Überstand aus Kernextrakten und nukleären Proteinen wurde bei -80 °C konserviert.

### **3.3.2 Proteinextraktion aus Geweben**

Bevor analytische Methoden angewandt werden konnten, musste zunächst die Proteinextraktion aus dem Gewebe betreffender Versuchstiere (z.B. Myokard von genotypisch veränderten Mäusen) isoliert werden. Hierzu wurde 200 µl RIPA-Puffer mit 1:25 Proteaseinhibitor (Roche® „cOmplete, EDTA-free“) zu dem jeweiligen Gewebestück hinzugefügt und unter Verwendung des Homogenisators mit passendem Spatel homogenisiert. Nachdem makroskopisch keine Gewebestücke mehr sichtbar waren, erfolgte eine Proteinbestimmung die Probe mittels Bradford-Methode (siehe unten). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Lösung 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer und Mercapto-Ethanol (950 µl Laemmli-Puffer und 50 µl Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Danach konnte entweder die Gesamte Probe bei -80 °C konserviert oder beispielsweise im Rahmen eines Western Blots direkt verwendet werden.

### **3.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Um die Zelllysate für weitere Analysen verwenden zu können, musste ihre Proteinkonzentration bestimmt werden. Dafür wurde ein 1976 von Bradford etabliertes Verfahren durchgeführt<sup>188</sup>. Von den zu messenden Proben wurde 1 µl zu 799 µl dH<sub>2</sub>O zugegeben und mit 200 µl Bradford-Lösung (Bio-Rad, München, Deutschland) vermischt. Die Lösungen wurden in Küvetten überführt und in einem geeichten Photometer, das vorher mit einer Referenz (800 µl Wasser + 200 µl Bradford-Reagenz + 1 µl Extraktionspuffer)

genullt wurde, bei 595 nm gemessen. Mittels des geeichten Photometers konnte die Extinktion bei 595 nm abgelesen und hierdurch der Proteingehalt der Probe ermittelt werden.

### **3.3.4 Western Blot zur Bestimmung der Proteinexpression**

Die differentielle Expression spezifischer Proteine und Enzyme in Proteinlysaten aus zytoplasmatischen oder nukleären Extrakten transfizierter Zellen sowie Gewebe aus dem linken Myokard wurden mittels Western Blot Analysen und entsprechender Antikörper bestimmt.

Zunächst wurden die Proteine extrahiert, indem die Zellen in 200 µl RIPA-Puffer, versetzt mit einem Protease Inhibitor Cocktail (1:25 Roche Diagnostics GmbH, Germany), aufgeschlossen wurden.

Nach Bestimmung und Einstellung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode wurden die Proteinextrakte mit 4x Laemmli-Puffer (v/v 1:4) versetzt und bei 95 °C für 10 min denaturiert. 20-40 µg Gesamtprotein jeder Probe wurden anschließend mittels 15 % SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine durch einen elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde nachfolgend für mindestens 2 h in Blocklösung (5 % Magermilchpulver in PBST) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnung in Blocklösung), der spezifisch an das zu analysierende Protein bindet, erfolgte standardmäßig ÜN im Kühlraum bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit 1x PBS/Tween gründlich gewaschen (mind. 3x für je 10 min) und mit einem speziesspezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 2 h bei RT inkubiert.

Nach weiteren Waschschritten (1x PBS/Tween, >3x je 10 min) erfolgte schließlich die Visualisierung des detektierten Proteins durch die ECL-Methode (GE Healthcare) nach Anleitung des Herstellers.

Um sicher zu stellen, dass unterschiedlich starke Proteinbanden tatsächlich aus einer differentiellen Proteinexpression resultieren, wurde bei jeder Membran stets eine Ladekontrolle der Proteinmenge bzgl. eines ubiquitär exprimierten Kontrollproteins

durchgeführt. Im Falle von Zytoplasma- und Gesamtzellysate diente hierzu GAPDH (Chemicon), während bei nukleären Lysaten das Histon H1 (Santa Cruz) verwendet wurde. Die densitometrische Analyse der Proteinbanden im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH bzw. Histon H1 erfolgte mit der ImageQuant Software (Biometra).

### **3.4 Färbungen**

#### **3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung von Geweben und Zellen**

Für die intrazelluläre Detektion und Lokalisierung spezifischer Proteine in Kardiomyozyten, wurden immunfluoreszente Färbungen mit spezifischen Antikörpern für das jeweils zu untersuchende Protein durchgeführt.

Hierbei wurden aus den entnommenen Herzen Kryoschnitte mit einer Dicke von 10 µm mittels eines Kryotoms angefertigt und direkt zur adäquaten Konservierung in „Tissue Tek® O.C.T™“ fixiert. Die Schnitte wurden zunächst bei RT aufgetaut und anschließend wurde das auf dem Glasträger befindliche Material mit dem „Dako®-Pen“ umrandet. Danach erfolgten 3 Waschschritte der Glasträger mit 1x PBS für jeweils 5 min. Weitergehend wurden eine Fixierung mit 4 % PFA in PBS (17 min bei 10 µm-Schnitten, RT) und erneutes 3-maliges Waschen mit 1x PBS für jeweils 5 min durchgeführt. Im Anschluss daran wurde ein Permeabilisierungsschritt mit 0,2 % igem Triton X-100 vorgenommen (20 min bei 10 µm-Schnitten, RT), wonach erneutes Waschen der Schnitte mit 1x PBS nötig war. Vor der Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte eine Blockierung eventueller unspezifischer Antikörperbindungen (Blockierlösung. >1 h, RT). Die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-HA, Sigma 1:1.000) erfolgte standardmäßig ÜN bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Primärantikörperlösung gründlich abgewaschen (3x mit 1x PBS für mind. je 10 min) und das Gewebe mit einem speziesspezifisch gekoppelten Sekundärantikörper (entsprechende Verdünnung in Blockierlösung) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper gründlich abgewaschen (3x mit 1x PBS für mind. je 10 min) und die Zellkerne mit DAPI angefärbt (15 min, RT, im Dunkeln). Nach den abschließenden Waschschritten (3x mit 1x PBS für mind. je 10 min) und dem Eindeckeln der Gewebe mit „VectaShield® Mounting Medium“ (Vector Labs) wurde

die zelluläre Lokalisierung bzw. die Histomorphologie der Gewebe am Fluoreszenzmikroskop (Keyence Biozera BZ-8000K) analysiert.

### **3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die HE-Färbung dient der unterschiedlichen Anfärbung basophiler bzw. azidophiler Strukturen, welche sich nach der Färbung blau bzw. rot darstellen. Somit werden bei Gewebeschnitten insbesondere die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA sowie das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum durch das Hämatoxylin blau gefärbt, während das Eosin vor allem die Zellplasmaproteine rot anfärbt. Für die Hämatoxylin-Eosin Färbung wurden 10 µm dicke Kryoschnitte von Herzgewebe zuerst für genau 10 min in Mayer's Hämatoxylin inkubiert. Daraufhin erscheinen die Zellkerne aufgrund des niedrigen pH-Gehaltes der Färbelösung zunächst rötlich-braun. Die typische blau-violette Färbung der Zellkerne wurde durch Erhöhen des pH-Wertes mittels 10 min Spülen mit Leitungswasser erreicht. Ein Vorgang der auch als „Bläuen“ bezeichnet wird. Anschließend erfolgte 2-maliges Waschen mit destilliertem Wasser. Danach wurden die Schnitte für 5 min in Eosin inkubiert. Als nächster Schritt erfolgte eine Dehydrierung der Schnitte mit 96 % Ethanol, vor der Klärung der Schnitte in Xylol/Ethanol 1:1 sowie reinem Xylol. Zuletzt wurden die Entwachsung mit Roti-Histol (a und b) sowie die schlussendliche Fixierung in Entelan vorgenommen.

### **3.4.3 Picrosirius-Rot-Färbung**

Mit der Picrosirius-Rot-Färbung wird Kollagen rot angefärbt, während sich andersartiges Gewebe gelblich darstellt. Da es bei einer Herzinsuffizienz im Rahmen des sogenannten kardialen Remodelling zu einer deutlichen interstitiellen Bindegewebsvermehrung kommt, ist diese Methode gut dazu geeignet, eben jene Vermehrung zu detektieren. Hierzu wurden 10 µm dicke Kryoschnitte von Herzgewebe für genau 20 min in eine 1 %ige Lösung aus Sirius Rot F3BA und gesättigter Pikrinsäure gelegt. Nach dem anschließenden Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser, je 2-3 mal pro Schnitt, wurden sie der Reihenfolge nach in 50 %-, 75 %- und 96 %igem Ethanol jeweils für 1 min dehydriert und mittels Xylol/Ethanol 1:1 sowie Xylol für jeweils 5 min

geklärt. Nach der Entwachsung der Schnitte mit Roti-Histol (a und b) für ebenfalls jeweils 5 min erfolgte als letzter Schritt die Fixierung in Entelan.

### **3.4.4 Cardiomyocyte Cross Sectional Area-Färbung**

Die Cardiomyocyte Cross Sectional Area-Färbung wird zur Auswertung von mit Hypertrophiestimuli behandelten Zellen im Vergleich mit basalen Zellen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden stets Kardiomyozyten aus dem linksventrikulären Gewebe an möglichst gleicher Lokalisation genutzt.

Hierzu wurden die Schnitte zunächst bei RT aufgetaut, bevor mit einem „Dako<sup>®</sup>-Pen“ die Umrandung des sich auf dem Glasträger befindlichen Gewebes erfolgte. Als nächstes wurden die Schnitte in 4 %igem PFA mit PBS für 17 min fixiert, wonach sie 3 mal für jeweils 1 min in 1x PBS gewaschen wurden. Darauffolgend wurde die Färbung der Schnitte durch Bedecken mit Blue Wheat Agglutinin und Sytox Green für 30 min durchgeführt. Das sich in der Färbung befindliche Blue Wheat Agglutinin lagert sich spezifisch in die Zellmembranen von Kardiomyozyten ein und färbt diese blau, während das verwendete Sytox Green den Zellkern grün färbt. Nach abschließendem Waschvorgang für insgesamt 10 min in 1x PBS und der Fixierung der gefärbten Schnitte in „Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium“ (Vector labs) lassen sich somit die blau gefärbte Zellmembran und das grün gefärbte Zytoplasma mittels Mikroskop (Keyence Biozera BZ 8000K) untersuchen und hiervon Aufnahmen erstellen (200x Vergrößerung). Mittels einer Analysesoftware (Image J) konnten diese ausgewertet werden. Das Programm ermöglichte es, die Fläche der Kardiomyozyten zu bestimmen und somit stimulierte mit unstimulierten Zellen anhand der Fläche des Zytoplasmas zu vergleichen. Dieser Umstand erlaubte die Feststellung einer Hypertrophie.

## **3.5 Molekularbiologische Methoden**

### **3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Technik, die es gestattet, ausgewählte DNA-Bereiche gezielt zu amplifizieren. Voraussetzung für diese zyklische Nukleinsäureamplifikation ist, dass DNA-Sequenzen, die das zu amplifizierende Stück

flankieren, bekannt sind. Der Reaktionsablauf einer PCR gliedert sich in die 3 Einzelschritte Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation, welche zwischen 25 und 35 mal wiederholt werden, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung ( $2^n$ ) des ausgewählten DNA-Bereichs kommt.

Ein Standardansatz für eine in dieser Arbeit durchgeführte PCR setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 µl 10x-PCR-Puffer
- 1 µl F (forward)-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl R (reverse)-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl DNA bzw. 2 µl Zellkultur (für Klon-PCR)
- 0,25 µl Taq-Polymerase bzw. Taq/Pfu-Polymerase
- 2 µl dNTPs (10 mM)
- ad 50 µl dH<sub>2</sub>O

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pfu-Ultra II-Polymerase verwendet. Die Pfu-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* und besitzt zusätzlich zur hohen Thermostabilität noch einen Korrekturlesemechanismus, welcher den Falscheinbau von Basen minimiert.

Im Thermocycler durchlief das Reaktionsgemisch folgende Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sec, 30 Zyklen
Primer-Annealing T <sub>m</sub> (Primer)	Primer T <sub>m</sub> -5°C	30 sec, 30 Zyklen
Elongation	72 °C	1 min/kB, 30 Zyklen
Finale Elongation	72 °C	4 min

### Auswahl der Primer

Mittels der Computersoftware „Generunner®“ lassen sich Oligonukleotid-Primer in ihrer Sequenz konstruieren. Hierbei ist zu beachten, dass die Primer spezifisch nur an einen DNA-Bereich binden, möglichst nicht mit sich selbst hybridisieren und einen

GC-Gehalt zwischen 40 % und 60 % aufweisen. Die Annealing-Temperatur des Primers sollte 2-5 °C unterhalb seiner Schmelztemperatur liegen.

Mit Hilfe der genannten Software ließen sich verschiedene Sequenzierprimer entwerfen (siehe 3.7). Außerdem wurden verschiedene PCR-Primer konstruiert, die 3'- und 5'-wärts der cDNA an die jeweilige Vektor-DNA binden.

Auch alle verwendeten Mutagenese-Primer wurden auf diese Art entworfen. Bei der Konstruktion dieser Oligonukleotide war darauf zu achten, dass sie 3'- und 5'-wärts der Mutagenesestelle zwischen 15 und 18 bp besitzen, die eine hochspezifische Bindung der Primer an die DNA zulassen.

### **Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese**

In dieser Arbeit wurden 0,8-2 %ige Agarosegele verwendet um PCR-Produkte, Plasmide und enzymatisch gespaltene Vektoren ihrer Größe nach aufzutrennen. Für die Herstellung eines Agarosegels wurde die jeweilige Menge Agarose (2 g bei einem 2 %igen Gel) in 100 ml 1 x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht bis eine klare Lösung entstand. Das Gemisch wurde anschließend unter Rühren auf ca. 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid-Lösung wurde das noch flüssige Gemisch luftblasenfrei in eine Gelkammer mit eingesetzten Kämmen gegossen. Nach der Auspolymerisierung des Agarosegels wurde es in einer Gelelektrophoresekammer mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Kämmen wurden vorsichtig entfernt. Je 5 µl DNA (z.B. PCR-Produkt, Plasmid) wurden mit 3 µl Laufpuffer gemischt und nachfolgend in die Geltaschen pipettiert. Für die Größen- bzw. Konzentrationsbestimmung der DNA-Fragmente wurde neben die Proben eine 100 bp DNA Ladder bzw. eine Low Mass DNA Ladder aufgetragen. Das Agarosegel wurde daraufhin für ca. 30 min an eine Spannung von 120 V angeschlossen.

Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und fluoresziert unter UV-Licht. Aus diesem Grund lassen sich die aufgetrennten DNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese unter einem UV-Transilluminator sichtbar machen und ihre Größe bzw. Konzentration bestimmen.



## Mutagenese

Mit der Methode der *in vitro*-Mutagenese ist es möglich, eine bekannte DNA-Sequenz gezielt zu verändern. Die Mutagenesereaktion entspricht im Wesentlichen einer PCR-Reaktion (siehe 4.2.1). Die doppelsträngige Vektor-DNA mit cDNA-Insert wird bei 95 °C denaturiert. Anschließend bindet der Mutageneseprimer bei 60 °C spezifisch an die Zielsequenz mit Ausnahme der Base(n), welche verändert werden soll(en). Durch die Pfu-Polymerase wird der Primer bei 68 °C komplementär zum Matrizenstrang in 5'→3'-Richtung verlängert. Es entsteht ein doppelsträngiges DNA-Molekül, das an der Mutationsstelle ungepaart vorliegt. Bereits ab dem 2. Zyklus der Reaktion bindet der Mutationsprimer vollständig an die Zielsequenz und die Mutation kann sich manifestieren. Nach der Mutagenese-PCR erfolgt mittels einer enzymatischen Reaktion mit dem Enzym *Dpn* I der Abbau der methylierten Template DNA, die keine Mutationen enthält. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der *in vitro*-Mutagenese verwendet, um gezielt eine Triplet-Deletion in die vorliegende Six1-Bindungsstelle im Promoterbereich des  $p27^{\text{kip1}}$ -Gens einzubauen. Durch diese Mutationen veränderte sich die Sequenz der Bindungsstelle in der Form, dass der Eya4/Six1-Komplex nicht mehr binden konnte. So konnten eine funktionelle Analyse des veränderten Gens durchgeführt und die Auswirkungen dieser Mutationen genauer betrachtet werden.

Das Pipettierschema für eine Mutagenese-PCR sah wie folgt aus:

- 5 µl 10x Pfu-Puffer
- 0,5 µl template-DNA
- 0,5 µl F (forward)-Primer (10 pmol/µl)
- 0,5 µl R (reverse)-Primer (10 pmol/µl)
- 0,5 µl Pfu-Polymerase
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- ad 50 µl dH<sub>2</sub>O

### 3.5.2 [<sup>3</sup>H]-Leucin Einbau in Kardiomyozyten

Eine Möglichkeit um das Wachstumsverhalten von Zellen beobachten zu können ist es, die Proteinsyntheserate dieser zu quantifizieren. Da hypertrophierende Zellen eine

erhöhte de-novo Proteinsynthese aufweisen, kann man durch Bestimmung dieser nachweisen, ob Zellen auf einen bestimmten Stimulus mit Hypertrophie reagieren. Hierzu wurde in dieser Arbeit die Methode des Tritium-Leucin ( $[^3\text{H}]$ -Leucin) Einbaus in myokardiale Zellen verwendet. Als Tracer wurde Tritium-markiertes Leucin verwendet, welches die Kardiomyozyten in ihre Proteine einbauen. Die Strahlung der Radioaktivität wurde anschließend mittels eines Detektors erfasst und mit dem DNA-Gehalt der Zelle normalisiert. Anhand der Menge detektierter Elektronen erfolgte die Quantifizierung der Hypertrophie.

Nachdem die Kardiomyozyten isoliert und für 24 h in MEM mit 5 % FCS kultiviert wurden (siehe oben), erfolgte nach weiteren 24 h die Transfektion der Zellen mit Plasmiden, welche entweder für Eya4 oder für E193 kodierten. Anschließend wurden die Zellen für 4 h in einer Suspension aus MEM-T/I und einem prohypertrophischen Stimulans inkubiert. Das Stimulans war bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen stets Angiotensin-II. Weitergehend beginnt die Inkubation mit  $[^3\text{H}]$ -Leucin (Amersham Biosciences), welches hierzu in einer Konzentration von 37.000 bq/ml hinzugegeben wurde. Auf eine Einwirkzeit von 4 h folgend, wurden die Zellen 2-malig mit 1x PBS gewaschen und für 10 min mit 1 %igem SDS lysiert. Die DNA-Konzentration der Zellen wurde mit dem „Quant iT® dsDNA Assay Kit“ (Invitrogen™) gemäß dem vorliegenden Protokoll des Herstellers bestimmt. Dieser Schritt war nötig, um eine Referenz der Zellmenge als Vergleichsbasis zu haben. Damit die verbleibenden Proteine präzipitiert werden konnten, wurden 500  $\mu\text{l}$  niedrigtemperierte 10 %ige Trichloroessigsäure zur Suspension hinzugefügt. Daraufhin ruhte das entstandene Gemisch für 30 min. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Suspension bei 13.000 rpm für 10 min. Das hieraus entstandene Pellet resuspendierte man nun in 500  $\mu\text{l}$  1 %igem SDS und ließ das ganze erneut für 30 min bei Raumtemperatur (RT) reagieren. Zuletzt wurde das LySAT in neue Gefäße überführt und 5 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben. Die Menge an inkorporiertem  $[^3\text{H}]$ -Leucin wurde mittels eines sogenannten  $\beta$ -Counters ermittelt und in counts/ml/min (CPM) angegeben. Die Änderung des Verhältnisses von CPM zu DNA-Konzentration wurde als Korrelat der de-novo Proteinsynthese verwendet, wobei das Verhältnis unstimulierter Vergleichszellen als 100 % definiert wurde.

### 3.5.3 Gateway®-Klonierung

Für die funktionale Analyse eines Gens bzw. eines Proteins wird die Methode der Klonierung genutzt. Hierbei wird das gewünschte Gen des „proteins of interest“ in Form des entsprechenden DNA-Fragmentes in einen entsprechenden Vektor integriert. In dieser Promotionsarbeit wurden die Klonierungsarbeiten gemäß der „Gateway®-Klonierung“ (Invitrogen™) gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Diese Technik lässt sich in separate Schritte aufgliedern, welche nachfolgend charakterisiert werden.

#### **Anfügen von Restriktionsschnittstellen an das Zielgen**

Zunächst musste das Zielgen in einen passenden Entry Clone eingefügt werden. Dazu wurde die kodierende Sequenz mittels Mutagenese-PCR mit den passenden Schnittstellen versehen. Diese waren für das spätere Einfügen des Zielgens in einen Vektor eminent wichtig, da diese 8-10 bp langen Sequenzen von den Rekombinationsenzymen erkannt wurden. Dies wurde erreicht, indem man eine PCR mit spezifischen Primern ansetzte und das Zielgen als Template hinzugab. Mutagenese-Primer (siehe Materialteil), die aus der Schnittstelle, einer kurzen Spacer-Sequenz und dem Anfang bzw. dem Ende der Zielsequenz bestanden, banden sich während der Reaktion komplementär an die cDNA. Als Produkt des in der PCR-Maschine ablaufenden Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation ergab sich nun die cDNA mit den angefügten Schnittstellen. Da die Enzyme des späteren Ligationsschrittes sogenannte „sticky ends“, also Überhänge einzelner Nukleotide in der DNA, benötigten, führte man mit dem PCR-Produkt einen Restriktionsverdau durch. Dafür brauchte es je eine bestimmte Menge des PCR-Produktes, des 10x Fast Digest Puffer® und der für die Schnittstellen spezifischen Restriktionsenzyme (Kpn I und Xho I). Anschließend wurde destilliertes H<sub>2</sub>O addiert um das Endvolumen zu erreichen.

Ein Standardansatz für den Restriktionsverdau setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 µl des PCR-Produktes,
- 1 µl 10x Fast Digest Puffer®,
- je 1,5 µl des für die Schnittstelle spezifischen Restriktionsenzym
- dH<sub>2</sub>O ad 30 µl/Ansatz

Das Gemisch reagierte für 1 h bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch eine enzymespezifische Hitzeinaktivierung unterschiedlicher Dauer und Temperatur beendet. Nach Ende des Verdau wurde die Suspension auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels horizontaler Gelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt. Dies diente der Isolierung des gesuchten Zielgens mit passenden Schnittstellen und der Befreiung von Verunreinigung durch entstandene Nebenprodukte. Die entsprechende Gelbande wurde aus dem Gel exzidiert und entsprechend der Angaben des Herstellers mit dem „PCR-Purification Kit“ (Quiagen Industries) aufgereinigt. Um das Zielgen in den Entryvektor (pENTR™1A, siehe Abbildung 11) einfügen zu können, musste dieser mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und aus der Multiple Cloning Site (MCS) das *ccdB*-Gen entfernt werden. Hierzu wurde, nach obigem Schema, erneut ein Restriktionsverdau mit dem Entryvektor durchgeführt. Das *ccdB*-Gen enthält die Information für ein die Gyrase des Bakteriums hemmendes Protein, das letztlich zytotoxisch auf das Bakterium wirkt. Bei einer nicht erfolgreichen Klonierung dürften die Bakterien dementsprechend nicht überlebensfähig sein.

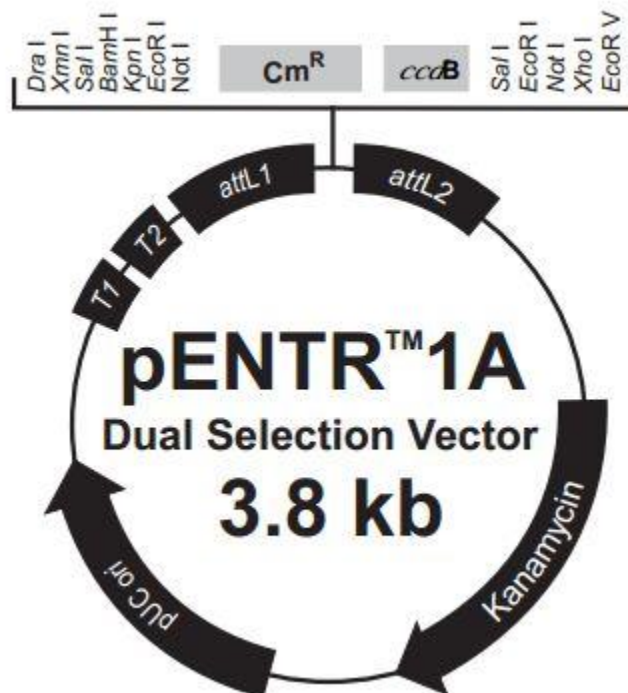


Abbildung 11: Schematische Darstellung des als Entryvektor verwendeten pENTR™1A-Vektors

Nach <sup>189</sup>

### **Ligation von Zielgen und Donorvektor**

Nach erfolgreichem Restriktionsverdau der Vektor- und Insert-DNA mit den ausgewählten Restriktionsenzymen und der Aufreinigung der DNA aus der Gelelektrophorese begann der nächste Schritt. Dieser implizierte die Ligation von cDNA und dem pENTR™1A-Vektor um das Zielgen rekombinationsfähig zu machen und die Vorteile des Gateway®-Systems nutzen zu können. Ohne diesen Schritt wäre eine spätere Rekombination zwischen Entryvektor und vielen anderen Expressionsvektoren im Rahmen des Gateway®-Systems nicht vereinfacht möglich gewesen. Die Ligation wurde erreicht indem, durch Verwendung des Enzyms T4-DNA-Ligase, die Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:5 (Vektor:Insert) an ihren komplementären überhängenden Enden („sticky ends“) miteinander verknüpft wurden.

Hierzu wurde das PCR-Produkt mit pENTR™1A (1 µg/µl) und dem entsprechenden Enzym-Puffer in einer Suspension zusammengefügt. Anschließend ließ man das Gemisch bei 22 °C für 1,5 h reagieren. Um die Reaktion zu beenden, wurde der Ansatz nach Ablauf der vorgeschriebenen Zeit für 10 min auf 65 °C erhitzt.

Ein Standardansatz für diesen Schritt setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 16 µl des PCR-Produktes
- 1 µl pENTR™1A (1 µg/µl)
- 2 µl des T4-Ligase Puffers (10-fach, Invitrogen™)

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

Damit die Bakterien die Plasmid-DNA aufnehmen können, und somit eine Erfolgskontrolle der Klonierung durchgeführt werden kann, mussten die Zellwand sowie die Plasmamembran der Bakterienzelle zunächst permeabilisiert werden. Dies wurde über ein sogenanntes „kompetent machen“ der Bakterien realisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte dies chemisch, also durch Zugabe bestimmter Stoffe, erreicht werden. Es wurde zunächst eine über Nacht-Kultur (ÜNK) des betreffenden Bakteriums (E. coli, Stamm DH5α) angesetzt (für Details siehe Kapitel 3.5.5) und die ÜNK auf 4x10 ml

Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 min mit 6.000 rpm bei 4 °C. Hatte sich am Ende der Zentrifugation am Boden des Falcon-Röhrchens ein Pellet gebildet, wurde der Flüssigkeitsüberstand oberhalb des Pellets vorsichtig verworfen. Danach wurde das Pellet in je 10 ml eiskaltem CAP-Puffer resuspendiert und es erfolgte die Inkubation der Lösung auf Eis für 30 min, wonach erneut für 10 min bei 6.000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Hatte sich erneut ein Pellet gebildet, wurde der Überstand vorsichtig verworfen. Nun konnte das Pellet erneut mit 2 ml eiskaltem CAP-Puffer resuspendiert und die Lösung zu jeweils 50 µl aliquotiert werden. Die Aliquots konnten nun bei -80 °C konserviert oder direkt verwendet werden.

### **Transformation von Fremd-DNA in chemisch kompetente Bakterien**

Um eine Erfolgskontrolle der bisher vollzogenen Maßnahmen nachweisen zu können, wurde im nun folgenden Schritt eine Transformation mit dem hergestellten Entryvektor durchgeführt. 50 µl chemisch-kompetente *E. coli* vom Stamm DH5α-Zellen wurden auf Eis liegend aufgetaut und vorsichtig resuspendiert. Anschließend gab man 1 µl (ca. 1 ng) Plasmid-DNA (pENTR<sup>TM</sup>1A+Eya4, Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin, siehe Abbildung 11) zu den Zellen und beließ diese für eine Inkubationszeit von 30 min auf Eis. Im folgenden Schritt wurden die chemisch-kompetenten Zellen für genau 30 sec auf 42 °C erhitzt und anschließend erneut für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 150 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C geschüttelt und schließlich 50 µl der Zellen auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (hier Kanamycin und Chloramphenicol) ausplattiert. Die ausplattierten Zellen wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### **Effizienzkontrolle**

Nach dem Bebrüten der Zellen auf der Agarplatte wurden gut gewachsene Kolonien selektiert, indem man diese in eine 96-Well-Platte, in die pro Well 10 µl dH<sub>2</sub>O vorgelegt wurden, pipettierte und resuspendierte. Um nun spezifisch nachweisen zu können, dass die Insertion der cDNA in den pENTR<sup>TM</sup>1A-Entryvektor erfolgreich war, wurde eine PCR mit dem Inhalt der Well-Platten als Template durchgeführt. Die PCR erfolgte nach einem standardisierten Vorgehen (siehe Abschnitt PCR), wobei die Primer, welche

spezifisch an das erwünschte Zielgen binden, passend zum gesuchten Template ausgewählt werden mussten. Hierzu wurden Polymerase-Puffer, dNTPs, die spezifischen Primer (Forward und Reverse), das Template und eine passende hitzestabile Polymerase zu einem Ansatz von 50 µl mit dH<sub>2</sub>O zusammengefügt. War der Ansatz gemäß dem gewählten Programm in der PCR-Maschine genügend amplifiziert, wurde er auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente nach Molekulargewicht mittels horizontaler Gelelektrophorese. Anhand des berechneten Molekulargewichts des Konstrukts ließ sich nun visuell eruieren, ob die Ligation erfolgreich war.

Einen Standardansatz für diese PCR wählte man wie folgt:

- 5 µl 10x Pfu-Puffer,
- 5 µl dNTPs (10 mM each)
- Je 1 µl spezifische Primer (Forward und Reverse)
- 1 µl Template
- 0,5 µl Pfu-Polymerase
- 37,5 µl destilliertes H<sub>2</sub>O

### **Plasmidisoliation**

Damit das gewünschte Plasmid in entsprechend großen Mengen erhältlich ist, kann man nach dem Ausplattieren der Zellen erneut selektieren und anschließend gut gewachsene Klone „picken“. Die Vervielfältigung und Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur war in dieser Arbeit immer dann nötig, wenn die Plasmid-DNA in größeren Mengen benötigt wurde. Hierzu wurden die Bakterienklone mit einer Pipettenspitze in LB-Medium (siehe Materialteil) überführt und über Nacht, unter Selektionsdruck mit dem entsprechenden Antibiotikum, bei 37 °C in einem Schüttler angezogen. Am folgenden Morgen wurden die Ansätze in einer Mini- oder Midi-Präp mit dem „Qiagen<sup>®</sup> Plasmid-Purification Kit“ (Qiagen<sup>®</sup>) entsprechend der Angaben des Herstellers aufgereinigt und es ergab sich die aufgereinigte Plasmid-DNA, welche zur Konservierung bei -80 °C eingefroren werden konnte. Wurde auch dieser Schritt erfolgreich durchgeführt, empfahl es sich, das Produkt zur Sequenzierung einzusenden.

### Rekombination mit anderen Vektoren

Der große Vorteil der Gateway<sup>®</sup>-Klonierungsmethode liegt in der hohen Zahl an Rekombinationsmöglichkeiten einzelner Plasmide, sobald das gewünschte Gen einmal in einen Entryvektor eingebracht wurde. Sollte nun das Zielgen in einen anderen Expressionsvektor überführt werden, ließ sich dies sehr einfach und schnell durchführen. Im speziellen Fall war der Entryvektor wie bereits erwähnt pENTR<sup>™</sup>1A+Eya4/E193 und man rekombinierte diesen mit dem Expressionsvektor pAd/CMV/V5-DEST<sup>™</sup> (siehe Abbildung 12).

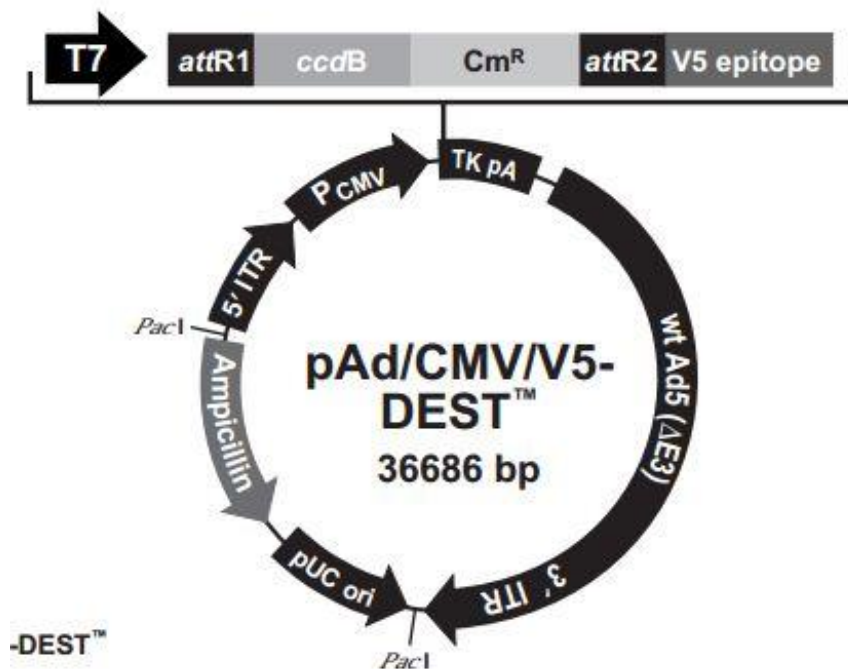


Abbildung 12: Schematische Darstellung des pAd/CMV/V5-DEST-Expressionsvektors mit Chloramphenicol-Resistenz in der MCS, nach Invitrogen<sup>™</sup>

Nach <sup>189</sup>

Hierzu wurden 2 µl des Insert-tragenden Entryvektors (pENTR<sup>™</sup>1A+Eya4/E193, 150 ng/µL) sowie 1 µl des Zielvektors (pAd/CMV/V5-DEST, 150 ng/µl) zusammengegeben. Währenddessen taute der Enzymmix LR-Clonase II (Invitrogen<sup>™</sup>) für 2 min auf Eis langsam auf. Anschließend vortexte man diesen 2 mal gründlich und fügte 2 µl der LR-Clonase zum Rekombinationsansatz hinzu und vortexte diesen ebenfalls bevor er kurz zentrifugiert wurde. Daraufhin wurde der gesamte Ansatz für 1 h bei 25 °C inkubiert



und dann 1 µl Proteinase K pro Ansatz hinzugefügt. Anschließend wurde erneut gewor-  
text und nochmals für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Erfolgskontrolle wurde im Wei-  
teren simultan zu der Insertion des Zielgens in den Entryvektor durchgeführt. Sie erfolg-  
te anhand von Transformation, Ausplattieren, Selektieren der Klone, PCR sowie Ampli-  
fikation und Aufreinigung der Plasmid-DNA (s.o.).

### 3.5.4 Transfektion

Das Verfahren der Transfektion beschreibt generell das Einbringen genetischen  
Fremdmaterials in eine eukaryotische Zelle. Dieses lässt sich beispielsweise für  
Plasmide, Antisense-Oligos oder siRNA nutzen. Die Anforderungen, die an eine Trans-  
fektionsmethode gestellt werden, beziehen sich auf eine möglichst hohe Effizienz, die  
Zellkernspezifität des eingebrachten Materials und eine niedrige Absterberate der  
behandelten Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Transfektionsmethode war  
die der Lipofektion und wurde mit dem „Lipofectamin<sup>®</sup>-System“ des Herstellers Invi-  
trogen<sup>™</sup> gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Hierbei handelt es sich um einen Vorgang bei dem eine bestimmte Formulierung aus  
kationischen und neutralen Lipiden eingesetzt wird. Diese Moleküle bilden in wässriger  
Lösung spontan sogenannte Liposomen, vesikuläre Ansammlungen von Fettmolekülen  
die eine Lipiddoppelschicht ausbilden und hierdurch einen hydrophoben Hohlraum im  
Inneren bilden können. Durch elektrostatische Wechselwirkung der negativ geladenen  
Phosphatgruppen des genetischen Materials mit der hydrophilen Kopfgruppe der katio-  
nischen Lipide bilden sich Komplexe aus, welche als Lipoplexe bezeichnet werden. Die  
Komplexierung des einzubringenden Materials mit kationischen Verbindungen vermit-  
telt eine Schutzfunktion vor extrazellulärem Abbau, gleichzeitig wird die Anheftung an  
die negativ geladene Zelloberfläche sowie die endozytotische Aufnahme ins Zytoplas-  
ma begünstigt. Über Lipid-Lipid-Interaktionen wird im Zellinneren die endosomale  
Membran destabilisiert, so dass die DNA/RNA aus dem Endosom freigesetzt wird, be-  
vor der lysosomale Abbau einsetzt. Für eine erfolgreiche Transfektion muss das geneti-  
sche Material dann noch in den Nukleus der Zelle gelangen. Auf passivem Wege ist  
dies nur nach Auflösung der Kernmembran während der mitotischen Zellteilung mög-  
lich und setzt eine geringe Molekülgröße mit weniger als 1.000 bp voraus.

Als Transfektionsreagenz wurde „Lipofectamine<sup>®</sup>2000“ (Invitrogen<sup>™</sup>, USA) verwendet. Um den DNA-Lipofectamin-Komplex herzustellen, verdünnte man sowohl das „Lipofectamine<sup>®</sup>2000“ als auch die DNA/RNA in serumfreiem Minimalmedium (OPTI-MEM), mischte beide Verdünnungen und inkubierte für 20 min bei RT. Den entstandenen DNA/RNA-Lipofectamin-Komplex gab man zu den etwa 90 %ig konfluenten Zellen, die am Tag zuvor ausgesät wurden und bei denen das Medium kurz vor Zugabe durch OPTI-MEM ersetzt wurde. Nach 4 bis 6 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 bis 48 h konnte selektiert werden.

### **3.5.5 Adenovirale Expressionskonstrukte**

Für die Herstellung der adenoviralen Expressionkonstrukte wurden definierte Plasmide über die Firma Life Technologies bezogen (siehe Abschnitt Material). Hieraus wurden virale Partikel unter Verwendung des „Vira Power<sup>™</sup> Adenoviral Expression System“ (Invitrogen<sup>™</sup>) gemäß Anleitung des Herstellers gewonnen.

### **3.5.6 Knockdown mittels siRNA**

Für die funktionelle Deaktivierung eines Gens von Interesse, kann man die Zelle in der das Gen aktiv ist mit siRNA transfizieren. Hierzu wurde in dieser Arbeit die „Dharmacon siRNA“ (Thermo Scientific) mittels des „DharmaFECT 2“ (Thermo Scientific) gemäß Vorgaben des Herstellers in die verwendeten Zellen eingebracht.

### **3.5.7 Anzucht von Bakterienklonen**

Für die Anzucht von Bakterienklonen auf Agarplatten wurden ca. 50 µl transformierte Bakterienzellen auf die Agarplatten pipettiert und gleichmäßig mit einem abgeflamten Drigalski-Spatel verteilt. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. War dem Agarmedium ein Antibiotikum zugesetzt, so erfolgte neben der Vermehrung der Bakterien auch eine Selektion. In diesem Fall konnten nur die Bakterien wachsen, welche durch die Transformation ein Plasmid mit einem entsprechenden Resistenzgen aufgenommen haben. Für die Vermehrung eines Bakterienklons in Flüssigmedium wurde je nach Bedarf eine bestimmte Menge LB-Medium (5 ml, 50 ml, 100 ml) verwendet und die jeweils entsprechende Menge Antibiotikum hinzu pipettiert. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde etwas Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur entnommen oder

ein Bakterienklon von einer Agarplatte gepickt und in das Medium überführt. Die Kultur wurde anschließend bei 37 °C unter Schütteln über Nacht oder bis zu einer vorgegebenen Bakteriendichte kultiviert.

Um immer mit demselben Bakterienklon arbeiten zu können, wurde aus einer Übernachtskultur eine Glycerinkultur angesetzt, die bei -80 °C gelagert werden kann. Hierfür wurden zu 850 µl der Übernachtskultur 150 µl 87 % Glycerin gemischt und der Klon eingefroren.

### **3.6 Magnetresonanztomographie transgener Tiere**

Die morphologischen Veränderungen des kardialen Phänotyps transgener Mäuse mit einer Überexpression von jeweils HA-E193 bzw. HA-Eya4 wurde *in vivo* mittels MRI ermittelt und vergleichend Wildtypmäusen gegenübergestellt. Hierzu wurden jeweils 6 männliche und weibliche Mäuse jeder Gruppe im Alter von 6 Monaten untersucht. Alle Untersuchungen an den Tieren wurden unter Einhaltung aller Vorgaben für die Behandlung von Versuchstieren sowie stets mit dem gleichen MRT durchgeführt (siehe Abschnitt Material). Das Gerät hatte hierbei eine angegebene Feldstärke von 7,05 Tesla. Die Tiere wurden unter Allgemeinanästhesie in Inhalationstechnik untersucht. Hierzu wurde eine endotracheale Intubation der Tiere vorgenommen und mittels Inhalation von Raumluft mit 0,5 %igen O<sub>2</sub>-Anteil sowie 1,5 %igem Isoflurananteil die Anästhesie aufrechterhalten. Für die Darstellung der Herzen der Tiere wurde eine EKG-getriggerte „multi-slice cine-FLASH“-Sequenz (fast low angle-shot) mit einer Auflösung von 0,117x0,117 mm bei einer Schichtdicke der einzelnen Schnitte von 1 mm verwendet. Die zeitliche Auflösung wurde mit 20 Bildern pro Herzzyklus gewählt und die Mittelung lag bei 2-4 pro Bild um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Unter Verwendung eines Analyseprogramms erfolgt die Auswertung der myokardialen Wanddicke, der Gesamtmasse des Herzens, der links- und rechtsventrikulären endsystolisch sowie enddiastolischen Volumina sowie des ventrikulären Durchmessers. Alle Messungen wurden hierbei von einem in der Methode erfahrenen Spezialisten, verblindet, in Relation zum Wildtyp ausgewertet.

### **3.7 Statistische Auswertung**

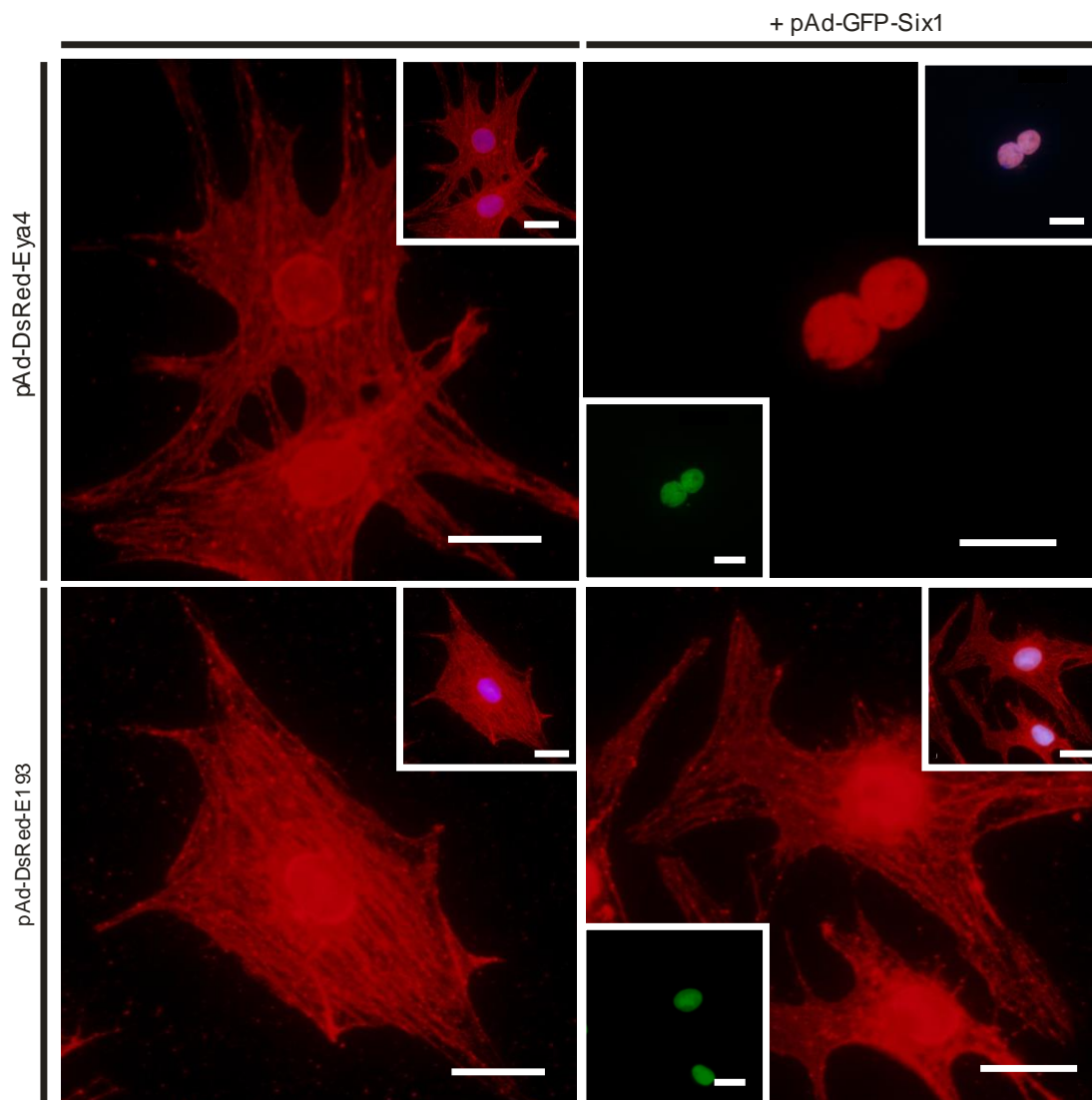
Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM, engl. standard error of the mean) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte durch eine einfaktorische Varianzanalyse (One Way ANOVA). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $*p < 0,05$  und  $**p < 0,001$  wurde als signifikant erachtet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Zelluläre Lokalisation von Eya4- und E193-Proteinen in Abhängigkeit von Six1**

Eya-Proteine sind per Definitionem Transkriptionskofaktoren, da zumindest für Vertebraten-Eya bisher noch keine NLS identifiziert werden konnte. Weil sie die regulatorische Funktion auf Ihre Zielgene im Nukleus der Zelle ausüben, sind sie von echten Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Six-Proteinen abhängig, welche Ihnen die Translokation in den Zellkern ermöglichen. Eya-Proteine lagern sich im Zytoplasma der Zelle zu Dimeren zusammen und binden als solches an Six1. Anschließend erfolgt die nukleäre Translokation des gesamten Komplexes<sup>190</sup>.

Um Lokalisierungsstudien von Eya4 und der mutierten Isoform E193 durchführen zu können, wurden primäre neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) mit DsRed-markiertem Eya4, E193 und GFP-markiertem Six1 transfiziert. Die Verteilung der fluoreszierenden Proteine im Zellkulturmodell wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (siehe Abbildung 13).



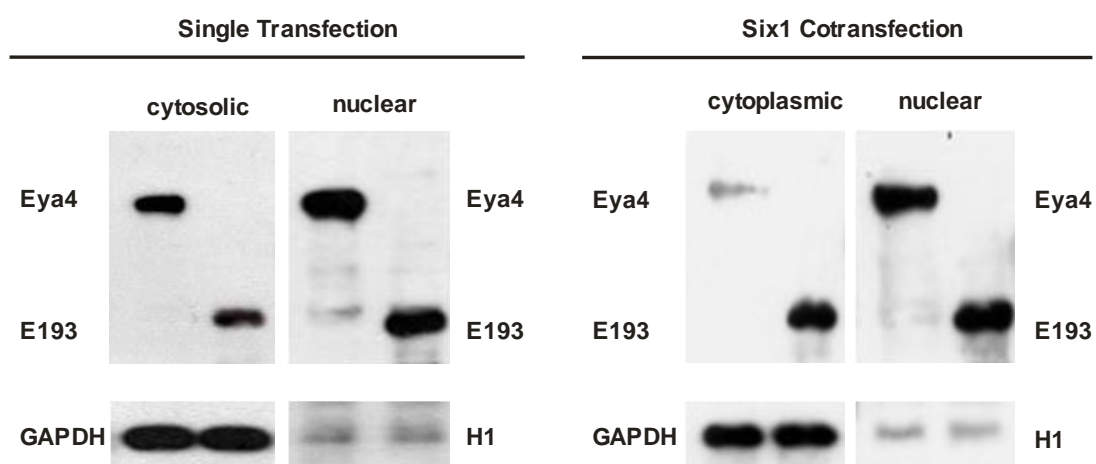
**Abbildung 13: Kolokalisierungsstudien von DsRed-markiertem Eya4 und E193 (rot) mit GFP-markiertem Six1 (grün) in NRCMs.**

Subzelluläre Lokalisierung und Translokation von DsRed-markiertem wildtypischem Eya4 und der trunzierenden E193-Mutante in primären Rattenkardiomyozyten. Oben links: Isolierte Infektion mit adenoviralem DsRed-Eya4 zeigt zytoplasmatische sowie (in geringerem Umfang) nukleäre Lokalisierung des Proteins (rot; lila aus übereinander gelegtem DAPI-gefärbtem Nukleus). Oben rechts: Koinfektion von DsRed-Eya4 und GFP-Six1 ergibt die nukleäre Translokation von DsRed-Eya4 (Eya4 rot; Six1 grün). Die kleine Box oben rechts zeigt die Überlagerung aus DsRed-Eya4 und GFP-Six1 zusammen mit DAPI. Unten links: Einzelinfektion mit adenoviralem DsRed-E193 zeigt die größtenteils zytoplasmatische Lokalisierung des Proteins bei ebenfalls nukleärer Nachweisbarkeit. Rechts unten: Die zelluläre Verteilung von DsRed-E193 (rot) verändert sich nach Koinfektion mit GFP-Six1 (grün) nicht. Alle Bilder bei gleicher Vergrößerung. Ein weißer Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Übereinstimmend mit vorherigen Publikationen<sup>142, 190</sup> konnte im Zellkulturmodell gezeigt werden, dass (DsRed-markiertes) Eya4 48 h nach Transfektion größtenteils im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach der Kotransfektion mit GFP-markiertem Six1 findet eine nukleäre Translokation des Komplexes statt und beide Proteine sind im Zellkern vermehrt und im Zytoplasma nur noch vermindert nachweisbar (siehe Abbildung 13). Die alleinige Transfektion mit GFP-markiertem Six1 führte, konkordant zu Beobachtungen anderer Forschungsgruppen<sup>176, 190, 191</sup>, ebenfalls zur Nachweisbarkeit des Proteins im Zellkern.

Die Auswertung der Koloalisierungsstudien mit DsRed-markiertem E193 bestätigte, entgegen der bisherigen Annahme, dass das mutierte Protein auch im Zellkern nachweisbar war. Jedoch fanden sich auch Residuen im Zytoplasma und dies trotz Kotransfektion mit GFP-markiertem Six1 (siehe Abbildung 13). Obwohl die Nachweisbarkeit von E193 im Zellkern geringer war als bei Eya4, war sie durchweg in mehreren Transfektionsreihen mit unterschiedlichen Klonen vorhanden. Ebenfalls waren die Ergebnisse in Transfektionsstudien mit unterschiedlichen Zelltypen reproduzierbar.

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie weiter zu validieren und zu quantifizieren, wurden die transfizierten NRCM aufgearbeitet und so präpariert, dass man die Extrakte aus Zellkernen und Zytoplasma für eine Western Blot-Analyse nutzen konnte (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Western Blot-Analyse von nukleären und zytoplasmatischen Proteinlysaten transfizierter NRCM bei isolierter Transfektion mit E193/Eya4 sowie Kotransfektion mit Six1**

Nach Kotransfektion mit Six1 kann nur wenig Eya4 zytosolisch nachgewiesen werden, während es nukleär akkumuliert. E193 konnte, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie, ebenfalls im Zellkern nachgewiesen werden. GAPDH und Histon H1 (H1) wurden als Ladekontrolle verwendet.

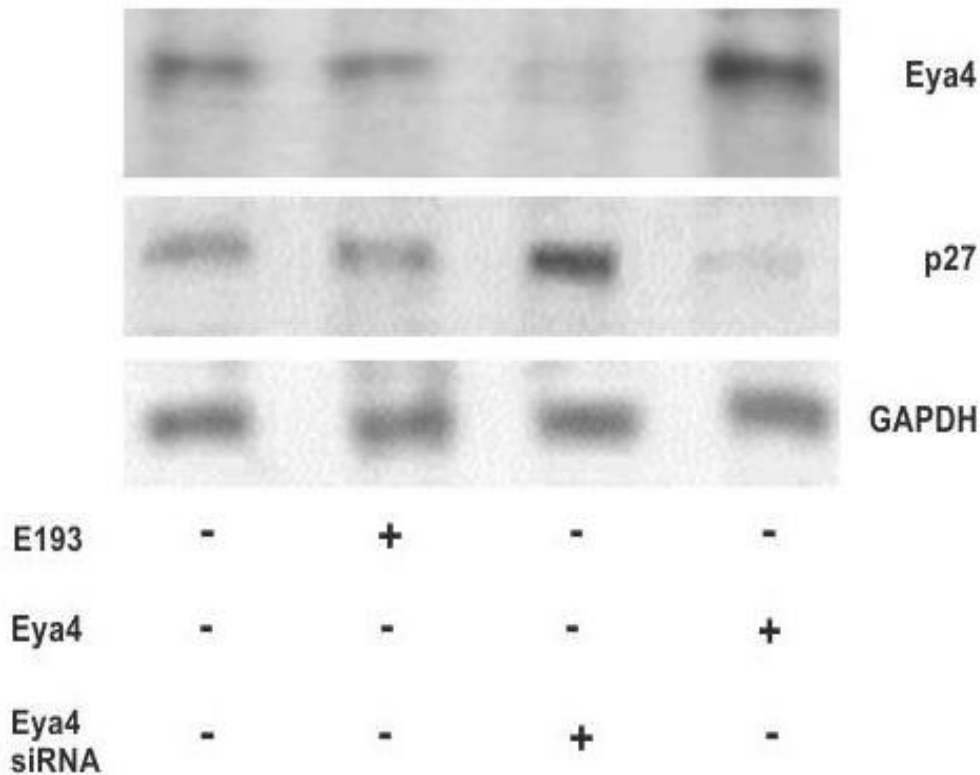
Um die Proteine E193 und Eya4 nachweisen zu können, wurde ein  $\alpha$ -DsRed-Antikörper verwendet. Nach Koexpression von Six1 war E193 deutlich im Zytoplasma nachweisbar, wohingegen Eya4 kaum mehr nachgewiesen werden konnte. In den Zellkernextrakten ließ sich ferner eine signifikante Akkumulation von wildtypischem Eya4 nachweisen. Die trunkierende Mutation E193 war ebenfalls in nukleären Extrakten zu detektieren, wenn auch mit geringerer Intensität.

### 4.2 Die $p27^{kip1}$ -Expression in Abhängigkeit von Eya4

Der Tumorsuppressor  $p27^{kip1}$  ist hauptsächlich durch seine Funktion der Zellzyklusregulation und der Zellteilung bekannt, wo er als Inhibitor dieser Vorgänge eine Überwachungsfunktion inne hat<sup>192</sup>. So führte die Deletion des  $p27^{kip1}$ -Gens in Tierversuchen mit Mäusen zu einer Organhyperplasie in multiplen Loci und zusätzlichem Tumorstadium<sup>193-195</sup>. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass eine direkte Regulation des  $p27^{kip1}$ -Gens durch Proteine der Six-Familie stattfindet<sup>186</sup>. Da ein Großteil der Kardiomyozyten nach der Perinatalperiode im Zellzyklusarrest bleiben, ist es umso interessanter, dass eine antihypertrophische Regulation von postmitotischen, adulten Kardiomyozyten durch  $p27^{kip1}$  nachgewiesen werden konnte<sup>187</sup>.

Eya4 reguliert im Komplex mit Six1 seine Zielgene<sup>190, 196-198</sup>. Um einen möglichen Einfluss von Eya4 auf die Expression von  $p27^{kip1}$  zeigen zu können, wurden NRCM mit jeweils dem wildtypischen Eya4-Protein, der trunkierenden Mutation E193 oder Eya4-siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte eine proteinanalytische Auswertung mittels Western Blot und nachfolgender Densitometrie (siehe Abbildung 15).





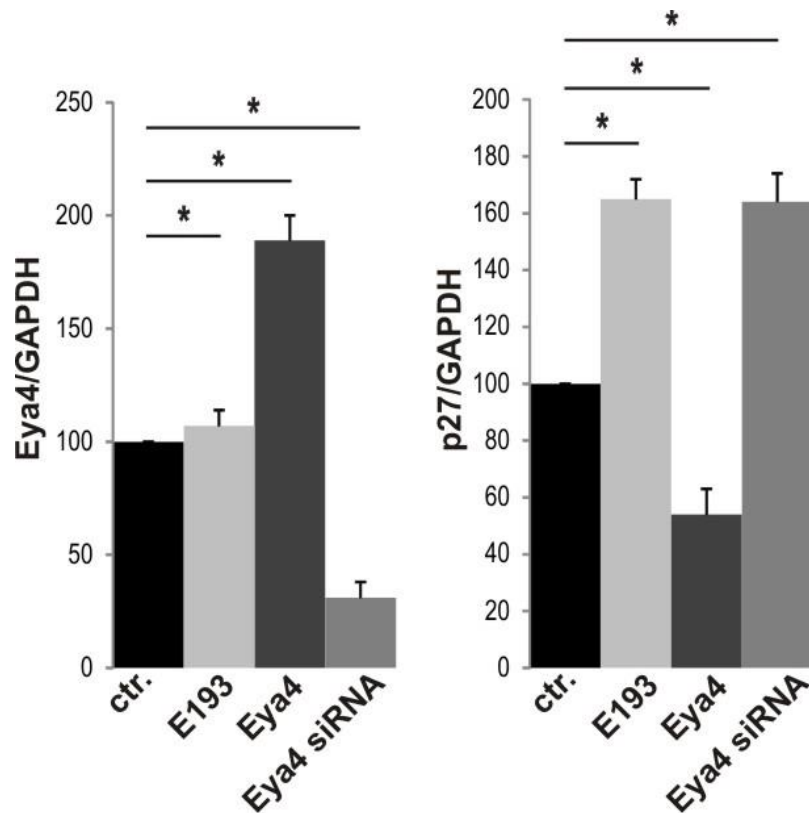
**Abbildung 15: Western Blot von Homogenisat transfizierter NRCMs**

Die Überexpression von Eya4 zeigt einen Anstieg der Eya4-Level ebenso wie einen Abfall der p27<sup>kip1</sup>-Level innerhalb der Zelle. Im Fall einer E193-Überexpression ist die p27<sup>kip1</sup>-Expression erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Ein Knockdown von Eya4 mittels spezifischer siRNA sorgt für ein umgekehrtes Resultat: Die Eya4-Spiegel sind niedrig und parallel dazu sind die p27<sup>kip1</sup>-Spiegel erhöht.

In der Analyse mittels Western Blot wurde ein Eya4-spezifischer Antikörper, welcher sich gegen den N-Terminus des Proteins richtete, verwendet. Die Überlegung, dass durch eine „Lack of function“-Mutation von Eya4, in Form von E193, kein Einfluss auf die endogene Eya4-Expression mehr stattfindet, korrelierte mit den optischen Befunden ( $107 \pm 7$  %;  $n=6$ ; *ns*). Um die optischen Eindrücke zu validieren und eine möglichst genaue Quantifizierung der Ergebnisse zu erhalten, wurden im Anschluss densitometrische Analysen der Western Blots erstellt (siehe Abbildung 16).

Hierbei zeigte sich, dass eine Eya4-Überexpression für einen Anstieg der Eya4-Proteinlevel sorgte ( $189 \pm 11$  %;  $n=6$ ;  $p < 0.05$ ), während die Transfektion mit Eya4-siRNA zu einem deutlichen Abfall der Eya4-Expression führte ( $31 \pm 7$  %;  $n=6$ ;  $p < 0.05$ ). Ebenso zeichnete sich ein Einfluss der Eya4-Proteinlevel auf die Expression von p27<sup>kip1</sup>

ab. Als Referenzwerte wurden stets die Eya4-Proteinlevel der unbehandelten Zellen verwendet, wobei diese als 100 % galten.



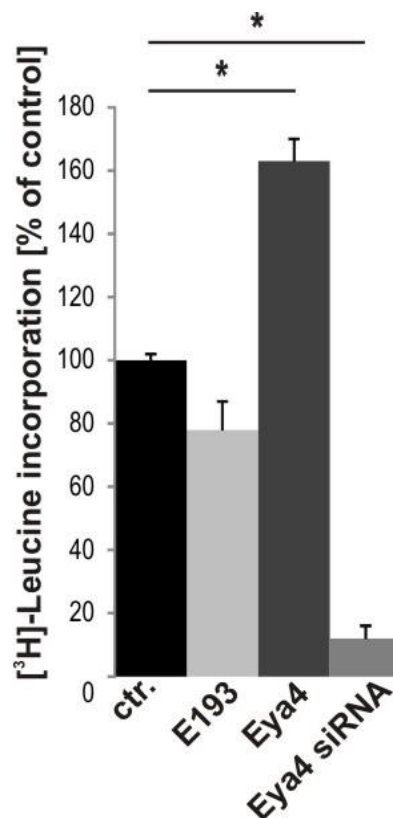
**Abbildung 16: Densitometrische Analyse der angefertigten Western Blots**

Eya4 reprimiert signifikant die  $p27^{kip1}$ -Expression ( $54 \pm 9$  %;  $n=6$ ;  $p<0.05$ ), während ein Eya4-Knockdown mittels siRNA diesen Effekt umkehrte ( $164 \pm 10$  %;  $n=6$ ;  $p<0.05$ ). E193 hat einen aktivierenden Einfluss auf die Expression von  $p27^{kip1}$ . GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Hinsichtlich der Regulation der  $p27^{kip1}$ -Expression durch Eya4 konnte durch die densitometrische Analyse (siehe Abbildung 16) quantifiziert werden, dass eine Transfektion mit E193 eine Steigerung  $p27^{kip1}$ -Expression zur Folge hatte ( $163 \pm 9$  %,  $n=6$ ;  $p<0.05$ ). Die Transfektion mit wildtypischem Eya4 hingegen sorgte in betroffenen Zellen für eine signifikante Erniedrigung von  $p27^{kip1}$ -Leveln ( $54 \pm 9$  %;  $n=6$ ;  $p<0.05$ ). Im Gegensatz zu dieser Beobachtung sorgte ein Eya4-spezifischer Knockdown mittels Transfektion von Zellen mit siRNA für eine signifikante Zunahme der  $p27^{kip1}$ -Proteinlevel in der Zelle ( $164 \pm 10$  %;  $n=6$ ;  $p<0.05$ ). Auch hierbei dienten die  $p27^{kip1}$ -Proteinlevel in unbehandelten Zellen als 100 % Referenzwert. Die beobachteten Ergebnisse sind konkordant mit der Hypothese einer Beeinflussbarkeit der  $p27^{kip1}$ -Expression durch Eya4.

Da, wie bereits erwähnt, in der Literatur gezeigt werden konnte, dass p27<sup>kip1</sup> in adulten, postmitotischen Kardiomyozyten an der Hypertrophieregulation beteiligt ist<sup>187</sup>, musste als nächster Schritt eine kausale Auswirkung der Eya4-Proteinlevel auf die Entstehung einer Hypertrophie belegt werden. Hypertrophierende Zellen weisen einen erhöhten Proteinmetabolismus auf und dieser wird durch die De-Novo-Proteinsynthese der betreffenden Zelle repräsentiert. Die Quantifizierung der [<sup>3</sup>H]-Leucin-Inkorporation in die Proteine der Zelle ist hierbei ein Surrogatmarker für eine Hypertrophie<sup>199</sup>.

Hierzu wurden primäre Kardiomyozyten von Ratten verwendet, welche entweder mit wildtypischem Eya4, der mutierten Isoform E193 oder Eya4-siRNA transfiziert wurden (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17: [<sup>3</sup>H]-Leucin-Inkorporation als Korrelat der Proteinsynthese während Hypertrophie**

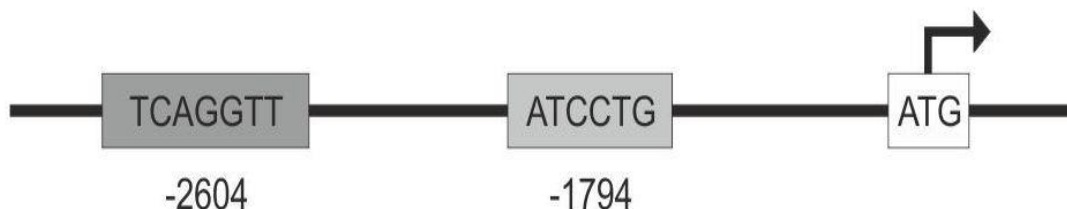
Transfektion mit Eya4 hat einen aktivierenden Effekt. Durch einen Eya4-Knockdown kommt es zur Umkehr dieses Effektes. E193 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinsynthese.

Die [<sup>3</sup>H]-Leucin-Inkorporation der primären Kardiomyozyten stieg durch eine Transfektion mit Eya4 signifikant an (163±7 %; n=8; *p*<0.05). Wurde die Herzmuskelzelle mit

Eya4-spezifischer siRNA transfiziert, welche die Translation des Proteins hemmt, ließ sich dieser Effekt signifikant mindern und es trat eine Reduktion der De-Novo-Proteinsynthese ein ( $12\pm 4\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0.05$ ). Dieses Ergebnis spricht für eine mögliche Induktion der zellulären Hypertrophie durch eine Überexpression von Eya4 und unterstützt die hier formulierte Hypothese der Regulation von  $p27^{\text{kip1}}$  durch Eya4. Eine ebenfalls durchgeführte Transfektion des Kardiomyozyten mit der trunkierenden Mutante E193 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den  $[^3\text{H}]$ -Leucin Einbau der Zelle, was die Vorstellung einer Loss-of-Function-Mutation dieses Proteins validieren könnte.

### 4.3 Die $p27^{\text{kip1}}$ -Promoteraktivität in Abhängigkeit der Expression von Eya4

Um zu determinieren auf welcher Ebene eine Regulation der  $p27^{\text{kip1}}$ -Expression durch den Transkriptionskofaktor Eya4 stattfindet und um zu verifizieren, dass eine Regulation durch Eya4 im Komplex mit einem Koaktivator, wie zum Beispiel einem Mitglied der Six-Familie, erfolgt, wurde die Wirkung von Eya4 auf  $p27^{\text{kip1}}$  *in vitro* untersucht. Hierzu wurden NRCM mit einem (p27PF) Expressionsplasmid transfiziert, welches das Luciferase-Reportergen unter Kontrolle des  $p27^{\text{kip1}}$ -Promoters exprimiert. Dieser Vektor wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Sakai Kyoto, Japan konstruiert und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Anschließend erfolgte die Kotransfektion mit jeweils einem für Eya4- oder E193-kodierenden Plasmid. Im Promoterbereich des  $p27^{\text{kip1}}$ -Gens befinden sich 2 putative Six1-Bindungsstellen, die sich beide upstream des eigentlichen Startcodons für die Translation des  $p27^{\text{kip1}}$ -Gens befinden (TCAGGTT bei Position -2604; ATCCTG bei Position -1794, siehe Abbildung 18).

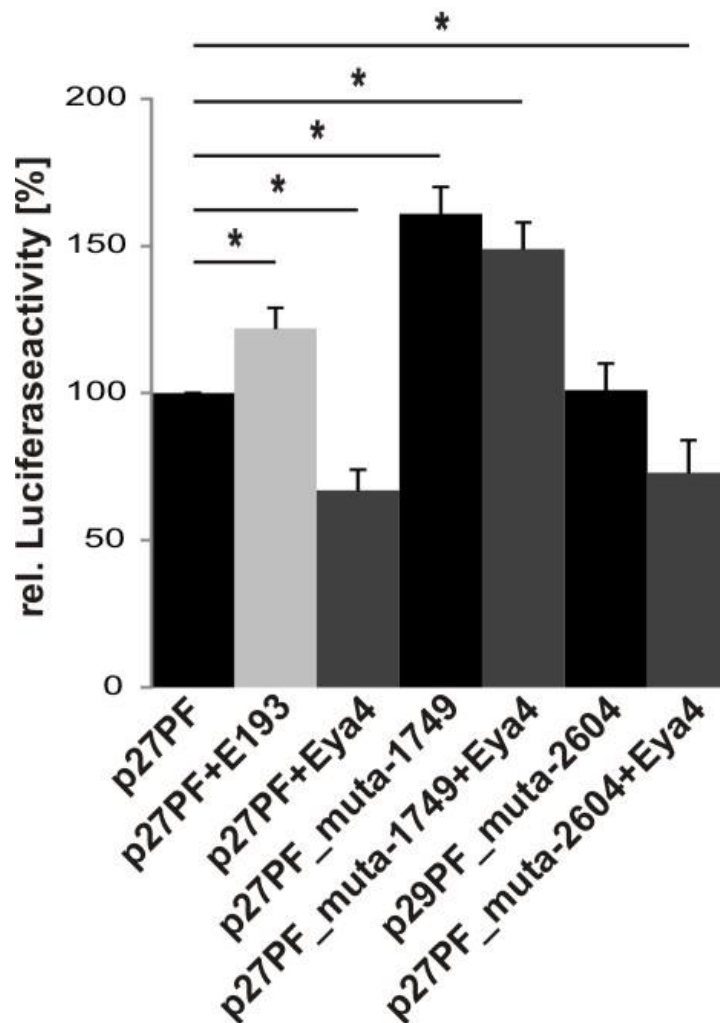


**Abbildung 18: Schematische Zeichnung des  $p27^{\text{kip1}}$ -Promoters**

Es befinden sich 2 Six1-Konsensussequenzen im Promoterbereich: Bei Position -2604 und Position -1794. Beide befinden sich upstream des ATG-Startcodons.

Da für vertebraten-Eya4 bisher keine eigene DNA-Bindedomäne oder eine NLS nachgewiesen wurde, benötigt es für die Translokation in den Zellkern und vor allem für das Binden an seine Zielgene die Interaktion mit echten Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Six1<sup>142, 155</sup>.

Es erfolgte die Kotretransfektion von p27PF mit entweder wildtypischem Eya4 oder E193 (siehe Abbildung 18). Die p27<sup>kip1</sup>-Promoteraktivität in alleinig mit p27PF-transfizierten Zellen wurde als 100 % (n=6) definiert.

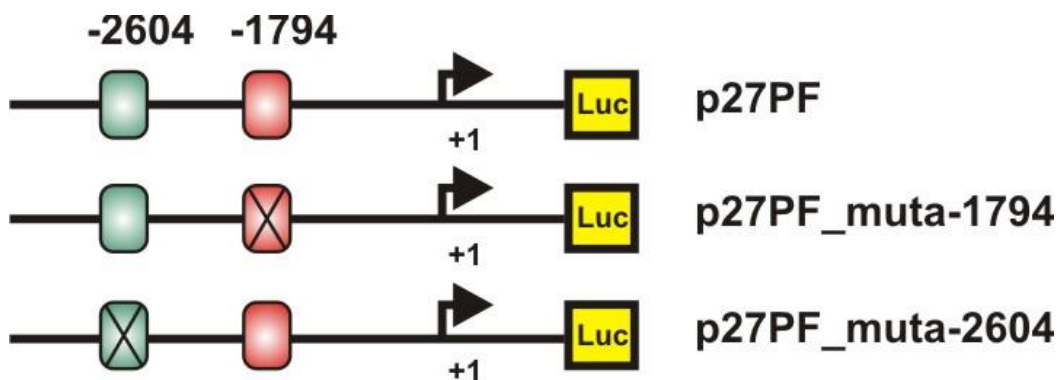


**Abbildung 19: Promoterstudien mit dem p27-Plasmid**

Die Auswertung beweist die Reduktion der p27<sup>kip1</sup>-Promoteraktivität in Abhängigkeit der Expression von Eya4 (67±7 %; n=6;  $p < 0.05$ ). Dieser Effekt war durch die Inaktivierung der Six1-Bindungsstelle an Position -1794 revidierbar. E193 führte zu einer signifikanten Steigerung der transkriptionellen Aktivität (120±7 %; n=6;  $p < 0.05$ ).

Die Kotransfektion mit dem Eya4-Plasmid führte in den behandelten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der  $p27^{kip1}$ -Promoteraktivität ( $67\pm 7\%$ ;  $n=6$ ;  $p<0.05$ ). Im Gegensatz dazu führte die Koinfektion mit E193 zu einer signifikanten Zunahme der transkriptionellen Aktivität des  $p27^{kip1}$ -Promoters ( $120\pm 7\%$ ;  $n=6$ ;  $p<0.05$ ). Dieses Ergebnis weist auf eine Abhängigkeit der Wirkung von Eya4 auf das  $p27^{kip1}$ -Gen in Form einer funktionierenden Six1-Konsensussequenz hin, da die Mutante E193 durch den Frameshift und den Einbau eines Stoppkodons nach Aminosäurerest 193 keine Six1-Bindungsstelle mehr besitzt<sup>139</sup>.

Um eine direkte Abhängigkeit der Wirkung von Eya auf das  $p27^{kip1}$ -Gen von der Interaktion mit Six1 zu bestätigen, wurde jeweils eine der beiden Six1-Bindungsstellen im Promoterbereich des  $p27^{kip1}$ -Gens durch Mutagenese derart verändert, dass eine Bindung an diese Sequenzen nicht mehr möglich sein sollte. Im Detail wurde entweder das AGG-Basentriplett der Konsensussequenz an Position -2604 oder das CCT-Basentriplett an Position -1794 deletiert (siehe Abbildung 20). Die hieraus resultierenden mutierten p27PF-Plasmide (p27PF\_muta-2604 und p27PF\_muta-1794) wurden per Transfektion erneut in NRCM eingebracht, entweder allein oder in Kotransfektion mit dem Eya4-Konstrukt.



**Abbildung 20: Darstellung des wildtypischen p27PF-Promoters und der mutierten Plasmide p27PF\_muta-1794 und p27PF\_muta-2604**

Die konstitutive Suppression der  $p27^{kip1}$ -Promoteraktivität war weniger stark ausgeprägt, nachdem die Bindungsstelle an Position -1794 manipuliert wurde ( $161\pm 9\%$ ;  $n=6$ ;  $p<0.05$ , Abbildung 19). Auch eine Kotransfektion von p27PF\_muta-1794 mit dem Eya4-Konstrukt konnte keine vermehrte Suppression des  $p27^{kip1}$ -Promoters induzieren ( $149\pm 9\%$ ;  $n=6$ ;  $p<0.05$ , Abbildung 19). Konträr zu diesem Ergebnis führte eine Mani-

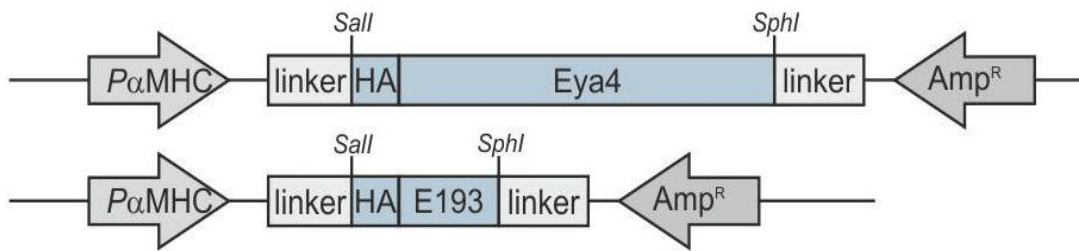
pulation der Bindungsstelle an Position -2604 zu keiner signifikanten Suppression der Aktivität des  $p27^{kip1}$ -Promoters, da die Luciferaseaktivität von p27PF\_muta-2604 derjenigen des normalen  $p27^{kip1}$ -Promoters entsprach ( $101 \pm 9$  %;  $n=6$ ; *ns*). Die Koexpression von p27PF\_muta-2604 resultierte in der gleichen Aktivität wie der des wildtypischen  $p27^{kip1}$ -Promoters ( $73 \pm 11$  %;  $n=6$ ; *ns*).

Die soeben beschriebenen Ergebnisse validieren die Hypothese, dass Eya4 seine Wirkung auf die Aktivität des  $p27^{kip1}$ -Gens über die Interaktion mit Six1 ausübt. Es kommt zytoplasmatisch zur Komplexbildung mit Six1 und dieser Komplex wird in den Zellkern transloziert, wo er seine Zielgene, in diesem Fall das des Zellzyklusregulators  $p27^{kip1}$ , reguliert. Ferner konnte gezeigt werden, dass für die Wirkung des Eya4/Six1-Komplexes die Bindungsstelle an Position -1794 diejenige ist, welche intakt und funktionell sein muss. Die Bindungsstelle an Position -2604 scheint für diesen Vorgang keine Relevanz zu besitzen.

Entsprechend der *in vitro*-Ergebnisse, könnte gemäß der in Abbildung 10 dargelegten Hypothese ein Defekt in der Eya4/Six1-Signalkaskade, wie bei der E193-Mutante, aufgrund einer permanenten Erhöhung der intrazellulären  $p27^{kip1}$ -Level und der daraus resultierenden verminderten Anpassungsfähigkeit des Myokards an alltägliche Belastungen zu einer nach Jahren einsetzenden Herzinsuffizienz führen. Die Überexpression von Eya4 hingegen könnte durch starke Hemmung von  $p27^{kip1}$  zu einer überschießenden Hypertrophiereaktion führen.

#### **4.4 Generierung von HA-E193- und HA-Eya4-überexprimierenden Mäusen**

Um die bereits formulierte Hypothese (Abbildung 10) zu verifizieren und *in vivo*-Ergebnisse zu sammeln, wurde in einem FVB-Hintergrund ein Mausmodell konstruiert, in welchem die Tiere eine konstitutive myokardspezifische Überexpression von HA-Eya4 oder HA-E193 zeigen. Die verwendeten Tiere waren ausnahmslos FVB-Mäuse und die Myokardspezifität der Überexpression wurde durch eine Fusion des HA-markierten Eya4- bzw. E193-Konstruktes mit dem kardiospezifischen  $\alpha$ -MHC-Promoter gewährleistet (siehe Abbildung 21).



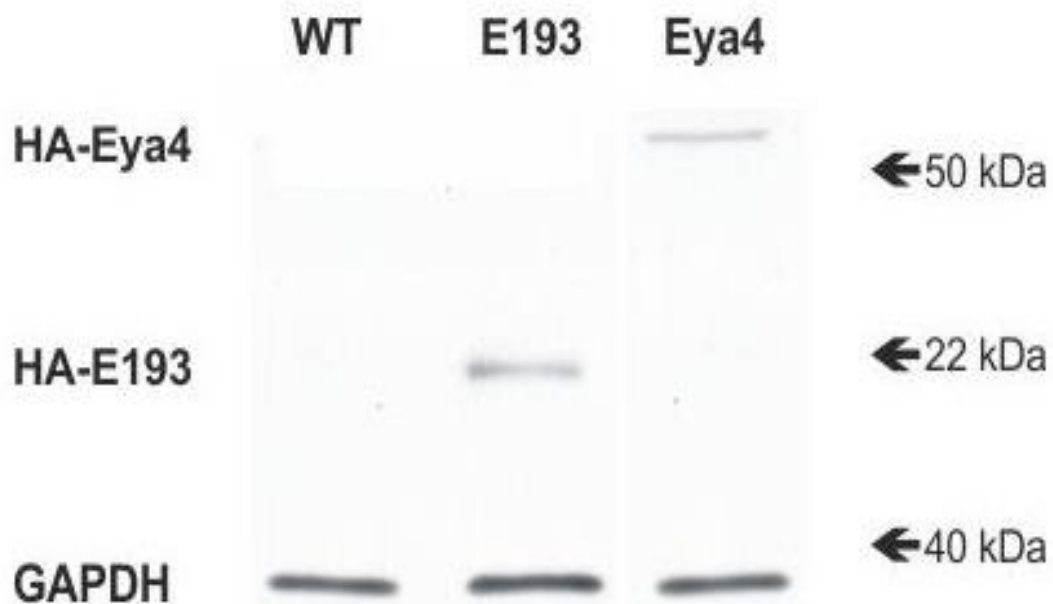
**Abbildung 21: Schemazeichnung des Vektors der verwendet wurde, um eine myokardspezifische Überexpression von HA-markiertem Eya4 bzw. E193 zu gewährleisten**

Aus initial 3 Indextieren, in welche das Plasmid per Mikroinjektion eingebracht wurde, hat man jeweils eine Mauslinie gezüchtet. Die in dieser Arbeit präsentierten Experimente stammen von Tieren der Linie HA-Eya4\_10 und HA-E193\_7.

Die Tiere wurden mittels PCR genotypisiert. Hierzu wurden speziell angefertigte Primer verwendet, welche ausschließlich bei den transgenen Tieren, nicht jedoch bei Wildtypmäusen, eine Bande bei ca. 250 bp in der Gelelektrophorese ergaben.

Um eine stabile Expression des Konstruktes *in vivo* nachweisen zu können, wurden Western Blots mit einem spezifischen HA-Antikörper (Sigma-Aldrich™, München) aus Herzproben der Tiere angefertigt (siehe Abbildung 22).

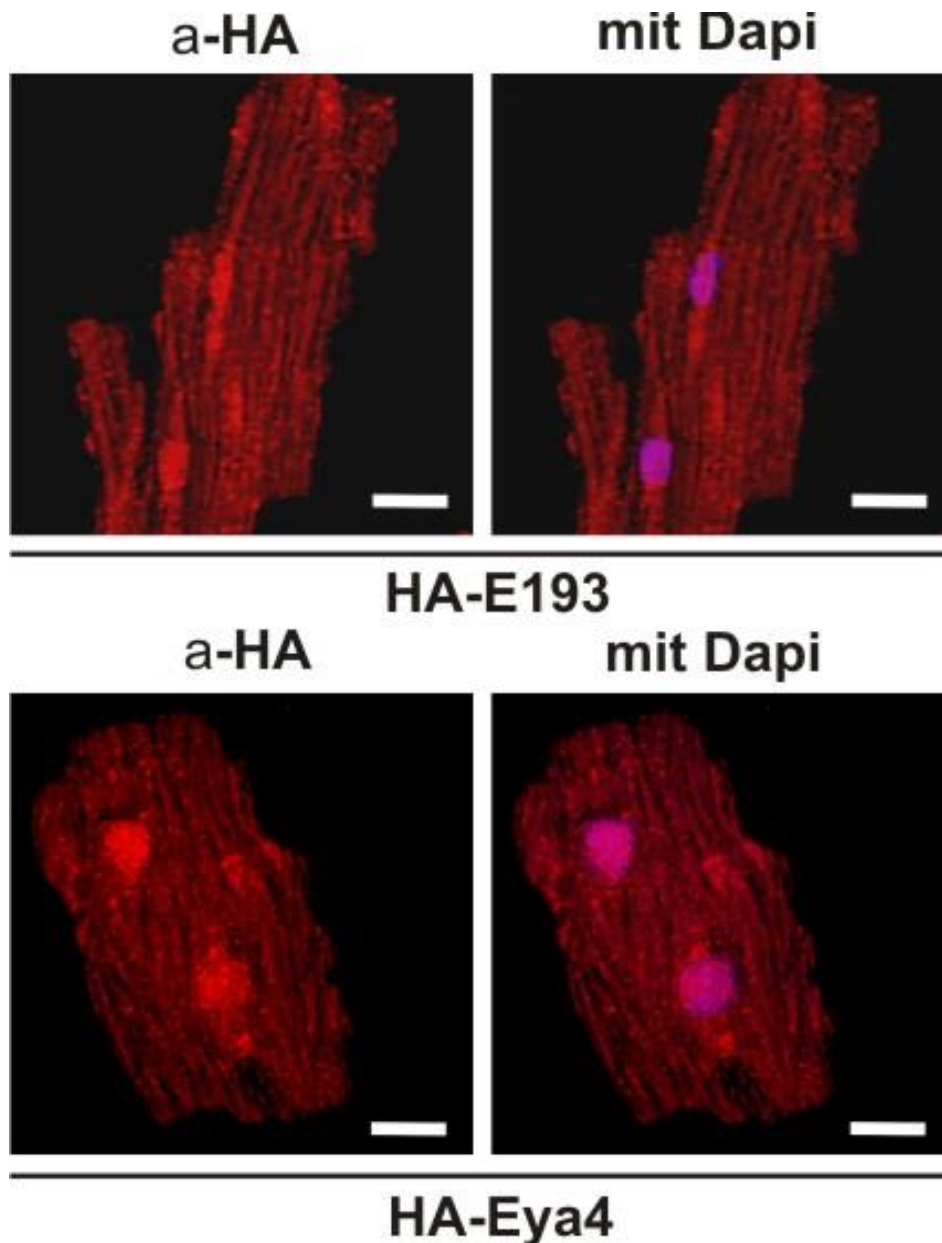




**Abbildung 22: Western Blot Analyse aus Herzlysaten transgener Tiere**

Das Transgen (HA-Eya4 bzw. HA-E193) wird jeweils stabil exprimiert, GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Um die Western Blot-Ergebnisse zu verifizieren, wurde an Gewebeschnitten aus Herzen der transgenen Tiere zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung angefertigt. Hierzu musste das Gewebe mit einem  $\alpha$ -HA-spezifischen Primärantikörper und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (Biozero Keyence BZ-8000, siehe Abbildung 23).

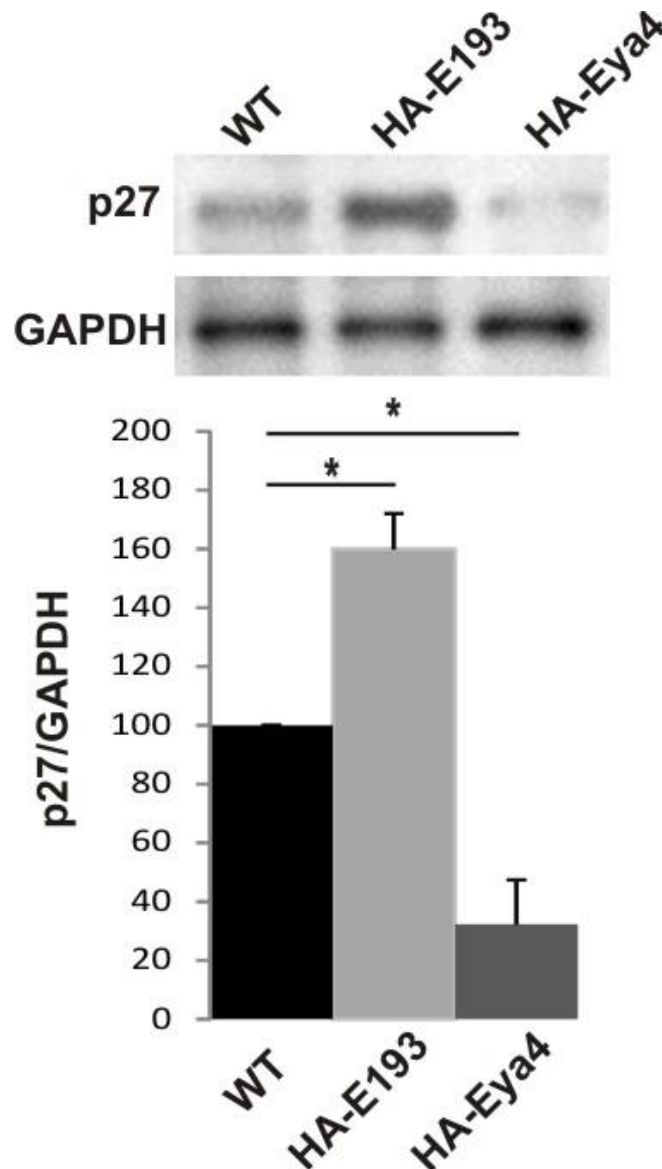


**Abbildung 23: Immunfluoreszenz der zellulären Verteilung von HA-Eya4 und HA-E193**

Die Immunfluoreszenzaufnahmen beweisen eine homogene Verteilung des HA-Eya4 bzw. HA-E193 im Zytoplasma und im Nucleus der Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen. Links: a-HA-Antikörper-Färbung mit fluoreszierendem Sekundärantikörper, Rechts: Überlagerung mit DAPI. Ein Weißer Balken entspricht 20 µm.

In den angefertigten Bildern (Abbildung 23) zeigte sich die Bestätigung der Western Blot-Ergebnisse: Unter Basalbedingungen konnte eine homogene Verteilung des jeweiligen HA-markierten Transgens (Eya4 bzw. E193) im Zytoplasma sowie im Nucleus der isolierten Kardiomyozyten demonstriert werden.

Da die Wirkung von Eya4 bzw. E193 auf die Expression von p27<sup>kip1</sup> in dieser Arbeit bisher nur *in vitro* gezeigt werden konnte, wurden entsprechende Western Blot-Analysen mit Herzlysaten transgener Tiere angefertigt. Hierzu war die zusätzliche Verwendung eines p27<sup>kip1</sup>-spezifischen Antikörpers nötig. Anschließend erfolgte eine densitometrische Analyse der Ergebnisse (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24: Western Blot und densitometrische Analyse der *in vivo*-Expression von p27<sup>kip1</sup> in Abhängigkeit von Eya4 bzw. E193, Wildtyp-Proben zum Vergleich und GAPDH als Ladekontrolle**

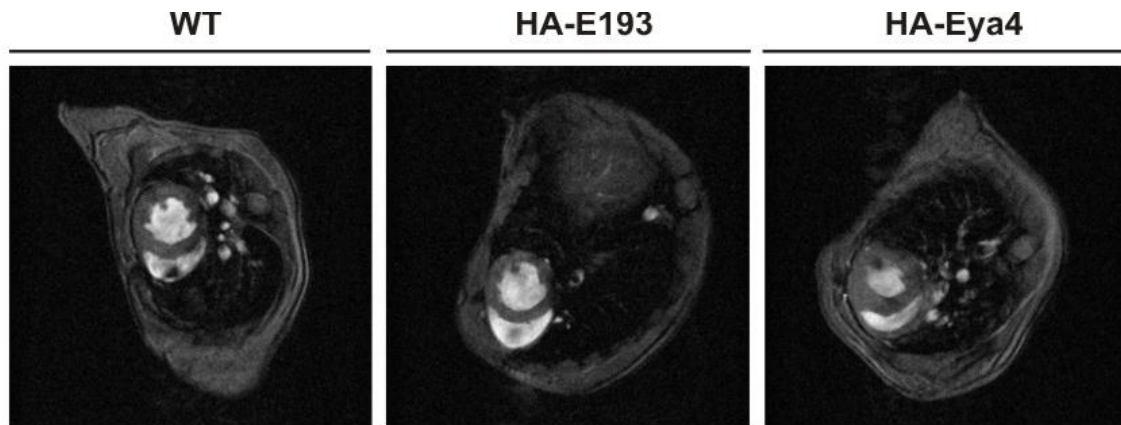
Signifikant niedrigere p27<sup>kip1</sup>-Expression in Eya4-überexprimierenden Tieren (32±18 %, n=6;  $p<0.05$ ). Signifikante Erhöhung der p27<sup>kip1</sup>-Expression in E193-überexprimierenden Tieren (160±10 %, n=6;  $p<0.05$ ) im Vergleich zu Wildtypen (definiert als 100 %).

Die Analyse der Untersuchungsergebnisse bestätigte die bisher *in vitro* erbrachten Befunde: Während es bei HA-E193-überexprimierenden Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der p27<sup>kip1</sup>-Proteinlevel kommt ( $160 \pm 10$  %, n=6;  $p < 0.05$ ), führen erhöhte HA-Eya4-Proteinlevel in Kardiomyozyten der Versuchstiere zu signifikant niedrigeren p27<sup>kip1</sup>-Proteinleveln ( $32 \pm 18$  %, n=6;  $p < 0.05$ ). Die p27<sup>kip1</sup>-Proteinlevel in Wildtypmäusen wurden hierbei als 100 % Wert herangezogen.

### **4.5 Kardio-MRI-Untersuchungen transgener Tiere**

Das kardiovaskuläre Magnetresonanz-Imaging (MRI) ist eine gute Methode um phänotypische Auswirkungen auf das Herz transgener Tiere zu visualisieren. Es ermöglicht nicht nur die korrekte Ausmessung der Herzhöhlen sondern kann ebenfalls dynamische Befunde, wie Ejektionsfraktion und enddiastolisches wie auch endsystolisches Volumen sowie die Kontraktilität des Myokards suffizient darstellen<sup>200, 201</sup>. Zusätzlich lassen sich, abhängig vom eingesetzten Gerätetypus, auch Inflammationsvorgänge sowie eine myokardiale Infiltration von Fett und Bindegewebe nachweisen<sup>202</sup>.

Hierfür waren Untersuchungen von HA-E193 bzw. HA-Eya4-überexprimierenden Tieren sowie wildtypischen Mäusen zu einem definierten Zeitpunkt nötig. Es zeigte sich, dass bei den 9 Monate alten, HA-E193 transgenen Tieren eine altersabhängige Herzinsuffizienz ähnlich der Entwicklung bei Trägern der humanen E193-Mutation auftritt (siehe Abbildung 25). Bei den 9 Monate alten HA-Eya4-transgenen Tieren, zeigte sich hingegen eine signifikante Vermehrung der LV-Hypertrophie im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 25). Dies spricht für die Entstehung einer signifikanten konzentrischen Myokardhypertrophie durch eine Eya4-Überexpression im Sinne einer diastolischen Herzinsuffizienz (HFpEF).



**Abbildung 25: MRI-Untersuchung transgener (HA-E193/HA-Eya4) Mäuse im Vergleich zum Wildtyp**

Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen ist bei HA-E193-überexprimierenden Tieren signifikant erhöht (siehe auch Abbildung 29). Signifikante LV-Hypertrophie bei HA-Eya4-überexprimierenden Tieren (siehe auch Abbildung 29).

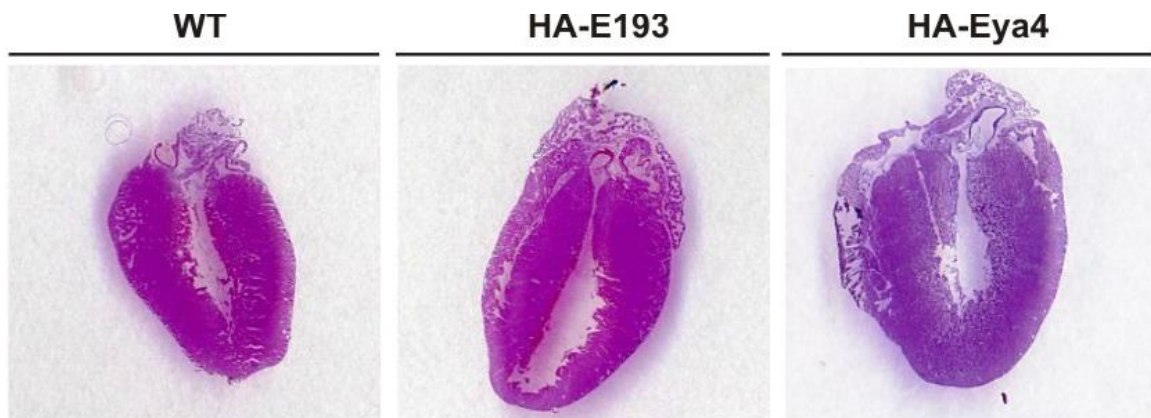
Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen, welches bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz erhöht sein kann<sup>203</sup>, war bei den HA-E193-exprimierenden Tieren signifikant höher ( $27 \pm 1 \mu\text{l}$ ) als bei wildtypischen Mäusen ( $20 \pm 0,5 \mu\text{l}$ ) oder HA-Eya4-überexprimierenden Tieren ( $21 \pm 1,5 \mu\text{l}$ ) (siehe Abbildung 29).

Die Reduktion der LVEF ist ebenfalls ein Substitut des Spätstadiums einer Herzinsuffizienz und kann durch MRI genau bestimmt werden<sup>204-206</sup>. Die linksventrikuläre Auswurfraction war bei den HA-E193-überexprimierenden Tieren signifikant verringert (27 %, siehe Abbildung 29), während sie bei Wildtypmäusen (67 %, Abbildung 29) und HA-Eya4-überexprimierenden Tieren (61 %, Abbildung 29) normal war.

Die Dicke des interventrikulären Septums, welches den linken vom rechten Ventrikel funktionell und anatomisch separiert, kann ebenfalls im Rahmen einer Herzinsuffizienz zunehmen und spiegelt das Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie gut wieder. Im Falle der transgenen Mäuse zeigten sich zwischen dem HA-E193-Typ (0,8 mm), dem HA-Eya4-Typ (1,5 mm) und dem Wildtyp (1,1 mm) signifikante Unterschiede. So war die Septumdicke bei den HA-Eya4-transgenen Tieren im Sinne einer beginnenden myokardialen Hypertrophie deutlich höher als beim Wildtyp und beim HA-E193-Typ, bei dem eher eine DCM-typische Morphologie mit Ausdünnung des apiko-septalen Myokards zu finden war.

#### 4.6 Histomorphologie myokardialer Gewebeschnitte

Die Morphologie histologischer Präparate aus Herzgewebe zeigt bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz oft eine Ausdünnung der myokardialen Wand des linken oder rechten Ventrikels infolge einer Dilatation der betroffenen Herzhöhle. Von 9 Monate alten Tieren der 2 gezüchteten transgenen Linien wurden nach der Entnahme von Herzen entsprechende Gewebeschnitte angefertigt und mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefärbt (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: HE-gefärbte Myokardschnitte unterschiedlicher Tiere**

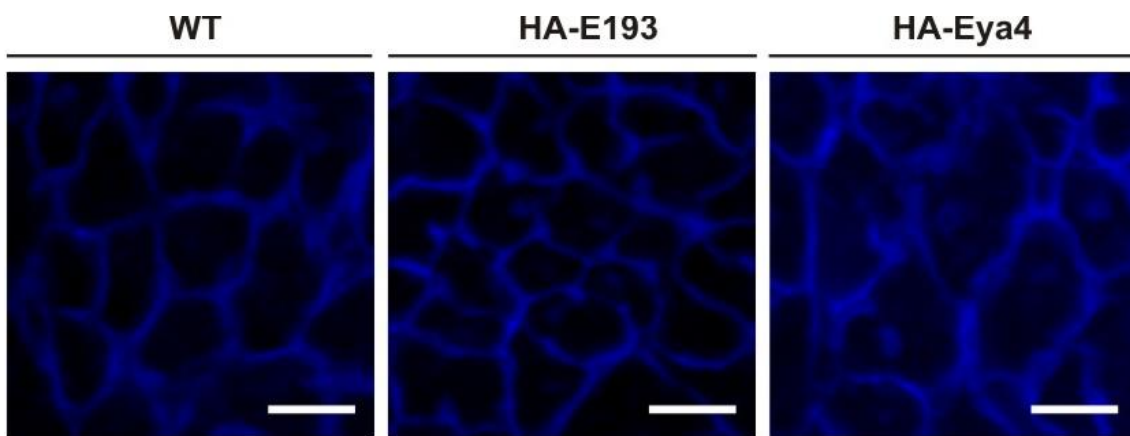
HE-gefärbte Myokardschnitte zeigen im Falle der HA-E193-überexprimierenden Tiere eine Ausdünnung der linksventrikulären Wand und Dilatation der Herzhöhle. Bei HA-Eya4-überexprimierenden Tieren zeigen sich hingegen typische Zeichen einer beginnenden kardialen Hypertrophie.

In der Färbung zeigte sich bei den HA-E193-überexprimierenden Tiere eine Ausdünnung der linksventrikulären myokardialen Wand und der Herzspitze infolge einer Dilatation des linken Ventrikels, welche bei Vergleichsproben aus wildtypischen Tieren nicht zu sehen war. Bei den HA-Eya4-überexprimierenden Tieren zeigte sich, entsprechend der MRI-Ergebnisse, eine signifikante Dickenzunahme des LV-Myokards typisch für eine kardiale Hypertrophie.

Das Herzgewicht bezogen auf das Gesamtkörpergewicht, die Heart-Weight to Body-Weight-Ratio<sup>207</sup>, ist ebenfalls Surrogat einer kardialen Hypertrophie und Ausdruck der als kardiales Remodeling bezeichneten Umbauvorgänge während der progressiven Herzinsuffizienz. Die Heart-Weight to Body-Weight-Ratio war bei HA-E193-transgenen Mäusen ( $5.2 \pm 0.12$ ) im Vergleich zu wildtypischen Mäusen ( $4.08 \pm 0.08$ )

signifikant erhöht. Beim Vergleich wildtypischer Mäuse ( $4.08 \pm 0.08$ ) und HA-Eya4-transgener Tiere war diese signifikante Erhöhung in noch ausgeprägterer Form festzustellen ( $6.1 \pm 0.2$ ).

Auch in der Ausmessung der Kardiomyozytengröße (CCSA) bestätigte sich die Entwicklung einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz bei HA-E193-exprimierenden Tieren und einer Hypertrophie bei HA-Eya4-überexprimierenden Tieren (siehe Abbildung 27).

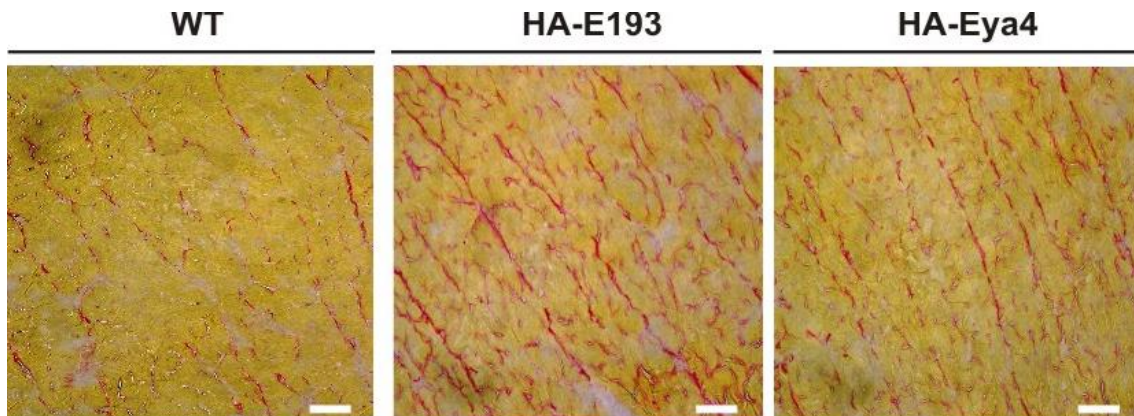


**Abbildung 27: CCSA-Färbungen von Wildtyp, HA-E193 und HA-Eya4-Mäusen**

Die CCSA war bei den HA-E193-überexprimierenden Tieren signifikant verringert, während sie bei den HA-Eya4-Mäusen signifikant erhöht war (Details siehe Abbildung 29). Ein weißer Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Die Auswertung der CCSA-Messung ergab eine signifikant niedrigere Zytoplasmafläche bei den für HA-E193 transgenen Mäusen ( $274 \pm 10 \mu\text{m}^2$ ), verglichen mit den wildtypischen Mäusen ( $597 \pm 15 \mu\text{m}^2$ ). Vergleicht man die HA-Eya4-transgenen Tiere ( $676 \pm 19 \mu\text{m}^2$ ) mit den wildtypischen ( $597 \pm 15 \mu\text{m}^2$ ), bestätigt sich durch die signifikant höhere Zytoplasmafläche auch hier die Entstehung der kardialen Hypertrophie.

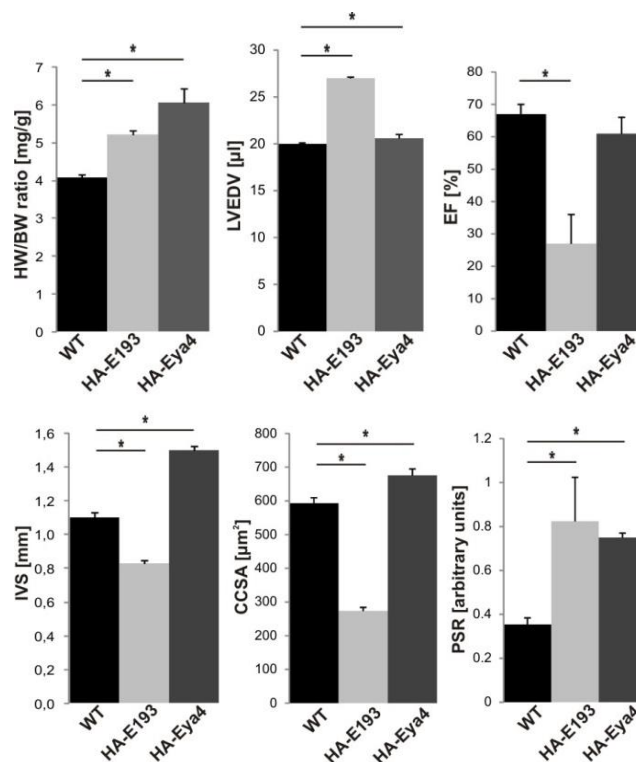
Mittels der Picrosirius-Red-Färbung (PSR) lässt sich die Akkumulation von Kollagen, welches bei progredienter Herzinsuffizienz vermehrt in den interstitiellen Raum zwischen den Zellen eingelagert wird und untergegangene Kardiomyozyten ersetzt, gut darstellen, da durch sie eine spezifische Kollagenanfärbung möglich ist<sup>208, 209</sup>. Von Herzgewebe unterschiedlicher Tiere angefertigte PSR-Färbungen zeigten in Bezug auf die Akkumulation von Kollagen eindeutige Ergebnisse (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28: PSR-Färbung von Myokard unterschiedlicher Tiere**

Es zeigt sich eine deutliche Kollagenakkumulation bei den HA-E193- sowie den HA-Eya4-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu Wildtypmäusen. Ein Weißer Balken entspricht 20µm.

Die Kollagenkonzentration in Gewebeschnitten von HA-E193-Mäusen war signifikant höher ( $0.824 \pm 0.2$  a.u.) als bei den Wildtyptieren ( $0.354 \pm 0.03$  a.u.). Bei HA-Eya4-Mäusen findet sich, wenn auch in leicht reduzierter Form, ebenfalls eine signifikante Erhöhung der intramyokardialen Kollageneinlagerung.



**Abbildung 29: Zusammenfassung und Auswertung der Durchschnittsmessungen, MRI-Ergebnisse und kardialer Histomorphologie**



## 5. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind, im Besonderen in Industrienationen, immer noch die häufigste Todesursache und werden bei stetig steigender Lebenserwartung und Lebensalter zukünftig noch an Bedeutung zunehmen<sup>210</sup>. Die Ursachen für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind mannigfaltig und, da auch extrakardiale Erkrankungen wie zum Beispiel die Chronisch-obstruktive-Lungenerkrankung Symptome einer Herzinsuffizienz imitieren können, teilweise schwierig zweifelsfrei zu identifizieren<sup>20</sup>. Jedoch ist, vor allem seit der erstmaligen Beschreibung eines Kardiomyopathie-verursachenden Gens im Jahr 1990, die genetisch determinierte Entstehung einer Herzinsuffizienz in den Fokus der Forschung sowie der klinischen Diagnosestellung gerückt<sup>211</sup>. Im Fall der DCM wird von einer familiär-genetischen Ursache der Erkrankung in bis zu 48 % der Fälle ausgegangen<sup>102</sup>. Die große Heterogenität möglicher genetischer Ursachen reicht von zytoskelettalen, myofilamentären und nukleären Proteinen bis hin zu Proteinen, die für Ionenkanäle kodieren<sup>134, 212, 213</sup>.

Die beschriebene E193-Mutation in humanem Eya4, welche zu SNHL und später einsetzender familiärer DCM führt, ist hierbei besonders zu erwähnen. Durch sie kommt es zu einer 4.846 Basenpaar langen Deletion im Gen eines Transkriptionskofaktors und nicht, wie in den meisten beschriebenen Fällen, eines Strukturproteins<sup>139</sup>.

Eya4, als eines der 4 Vertebratenhomologe des Drosophila-Gens „*eyes absent*“, zählt zu den Transkriptionskofaktoren, welche keine eigene DNA-Bindedomäne besitzen. Deshalb ist die Komplexbildung aus Eya4 und Six1 essentiell für die nukleäre Translokation von Eya4 und ermöglicht erst die Wirkung auf die Zielgene<sup>142</sup>. Bei Vertebraten sind für Eya-Proteine verschiedene Zielgene beschrieben worden: Hierzu zählen Myogenin, die Kreatinkinase der Muskulatur sowie Cyclin A1 und D1<sup>214-216</sup>. Bis zur Beschreibung der Regulation einer für die kardiale Entwicklung bei Zebrafischen essentiellen Untereinheit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase war von einer Bedeutung der Eya-Proteine in der kardialen Entwicklung nichts bekannt<sup>177</sup>. Das Bekanntwerden der Repression von p27<sup>kip1</sup> durch Six6 sowie die Regulation postmitotischer Kardiomyozyten durch p27<sup>kip1</sup> ergaben neue Ansätze hinsichtlich einer möglichen Regulation desselben durch den

Eya4-/Six1-Komplex<sup>186, 187</sup>. Die Untersuchung der p27<sup>kip1</sup>-Gensequenz hinsichtlich einer möglichen Regulation durch diesen Komplex zeigte eine Bindungsstelle für Six1 im p27<sup>kip1</sup>-Promoterbereich. Die Literatur zum Einfluss verschiedener Eya-Proteine auf Proteine der Six-Familie und letztlich auf die Ziele des Eya/Six-Komplexes beschreibt in den meisten Berichten eine starke Aktivierung von Six durch Eya (beispielsweise Eya3 und Six1<sup>196</sup>) und somit eine Aktivierung der Transkription in den durch Eya/Six regulierten Zielgenen<sup>190, 196, 198</sup>. Aufgrund dieser Berichte war zu erwarten, dass auch die Interaktion von Eya4 und Six1, insbesondere im Hinblick auf die Regulation des Promoters von p27<sup>kip1</sup>, zu einer Aktivierung der Transkription von p27<sup>kip1</sup> führen würde. Entgegen der Annahme kam es in den hier durchgeführten Versuchen, bei Überexpression von Eya4, jedoch zu einer starken Hemmung der Transkription von p27<sup>kip1</sup>. Im Falle der trunkierenden Mutante E193 konnte hingegen eine Aktivierung der Transkription gezeigt werden.

Der zyklinabhängige Kinaseinhibitor (CDK) p27<sup>kip1</sup> ist bisher vor allem als Zellzyklusregulator bekannt. Hier besitzt er eine wichtige Kontrollfunktion innerhalb der Zelle am Übergang vom G1 zum S-Punkt. Hierbei führen vermehrte antiproliferative Zellsignale zu einer Akkumulation von p27<sup>kip1</sup> innerhalb der Zelle und via Inhibition der Interaktion von E-CDK2 und D-CDK4 kann dies den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus verhindern<sup>192, 217, 218</sup>. p27<sup>kip1</sup> wird ebenso in postmitotischen, adulten Kardiomyozyten exprimiert und sorgt durch seine zelluläre Akkumulation für einen konsequenten Zellzyklusarrest der in einen Wachstumsstopp mündet. Die p27<sup>kip1</sup>-Spiegel erreichen nach der 25. Woche des humanen Fetus ihren Höhepunkt und bleiben danach konstant<sup>219</sup>. Über diese Funktion hinaus ist bislang allerdings sehr wenig über mögliche weitere Funktionen von p27<sup>kip1</sup> bekannt. Die Höhe der intrazellulären Konzentration von p27<sup>kip1</sup> korreliert zwar mit hypertrophischen und antihypertrophischen Signalen der Zelle, allerdings war die Bedeutung solcher Ergebnisse, angesichts des Umstands physiologischer Suppression der meisten Cycline und ihrer Partner-CDKs, unklar<sup>220</sup>. Sind bei Fehlen von hypertrophischen Reizen die Spiegel von p27<sup>kip1</sup> hoch, so sinken sie bei prohypertrophischen Reizen stark ab<sup>221</sup>. Dazu passend konnte gezeigt werden, dass es bei genotypisch modifizierten Knock-out-Mäusen für p27<sup>kip1</sup> durch Verengung des Lumens der Aorta („aortic banding“) zu einer exorbitanten Hypertrophie der Kardiomyozyten kommt, die in einer final verlaufenden DCM endet, während diese Reaktion bei Wildtyptieren

deutlich geringer ausfiel<sup>187</sup>. Ebenso scheint p27<sup>kip1</sup> eine wichtige kardioprotektive Bedeutung im post-myokardial infarzierten Herzen zu haben. So konnten Konecny *et al.*<sup>222</sup> kürzlich zeigen, dass bei Mäusen, welchen nach einem Myokardinfarkt ein p27<sup>kip1</sup>-Fusionsprotein verabreicht wurde, die Rate an kardialer Hypertrophie sowie Fibrose deutlich geringer war als bei unbehandelten Vergleichstieren. Die detaillierten Mechanismen der Aktivierung bzw. Suppression von p27<sup>kip1</sup> im Zusammenhang mit Hypertrophie im adulten Myokard bleiben noch zu untersuchen. Dennoch konnten mittlerweile einige Faktoren der Hypertrophieregulation identifiziert werden. So wurde gezeigt, dass die CK2- $\alpha'$  im Falle prohypertrophischer Signale der Zelle zu einer Phosphorylierung von p27<sup>kip1</sup> führt, was zu dessen Degradierung beiträgt. Genauso konnte aber im Umkehrschluss eine Inhibition von CK2- $\alpha'$  durch p27<sup>kip1</sup> nachgewiesen werden<sup>187</sup>. Dieser Rückkopplungsmechanismus ist insofern interessant, als dass CK2- $\alpha'$  viele weitere Targets besitzt, welche ebenfalls mit Hypertrophieregulation in Zusammenhang gebracht werden, darunter zum Beispiel HDAC1 und HDAC2 oder NFATc<sup>220</sup>. Des Weiteren konnte von Li *et al.*<sup>223</sup> gezeigt werden, dass Nuclear factor erythroid-2-related factor (Nrf2) ein zusätzliches Target in der p27<sup>kip1</sup>-Hypertrophiekaskade ist. Nrf2 ist bekannt als zytoprotektiver Transkriptionsfaktor, der durch Aktivierung von Genen detoxifizierender Proteine den oxidativen Stress der Zelle zu mindern hilft<sup>224</sup>. Nrf2 sorgt jedoch auch für eine Reduktion maladaptiven kardialen Remodelings nach übermäßiger Stimulation mit Angiotensin II und erhöht die zellulären p27<sup>kip1</sup>-Spiegel, wodurch eine überschießende Hypertrophie effizient verhindert wird. Zusammenfassend scheint die Funktion von p27<sup>kip1</sup> nicht nur in der Phase der fetalen Organogenese, sondern insbesondere auch in postmitotischen adulten Kardiomyozyten sehr bedeutsam zu sein.

Die Interaktionen innerhalb des sogenannten PSEDN wurden bereits von mehreren Autoren beschrieben<sup>155, 159, 161</sup>. Ebenso wurde bewiesen, dass die Fähigkeit von Six-Proteinen, als Aktivator oder auch Suppressor zu agieren, zumindest partiell von Kofaktoren wie Eya bzw. Dach abhängt. Eya-Proteine wirken hierbei als Koaktivatoren, während Dach-Proteine eher als Kosuppressoren agieren. Eya benötigt als reiner Transkriptionskofaktor ohne eigene DNA-Bindedomäne andere Transkriptionsfaktoren, während bei Dach davon auszugehen ist, dass es spezifisch an die vorgesehenen DNA-Sequenzen binden kann<sup>225, 226</sup>. Ebenso scheint die Interaktion von Eya und Dach die Funktion von Dach als Suppressor in Richtung Aktivator lenken zu können: So konnte bei *Drosophila*

durch synergistische Interaktion von Eya und Dach die Induktion ektooper Augen ausgelöst werden<sup>169</sup>. Auch bei Säugetieren scheint durch synergistische Interaktion von Eya und Dach eine Induktion von Gewebewachstum möglich. Hierbei konnte durch Interaktion von Eya2 und Dach2 bei Mäusen die Myogenese induziert werden<sup>191</sup>. Möglicherweise wird die Interaktion zwischen Eya und Dach sogar durch ein Mediatorprotein, das sogenannte „CREB-binding protein“ (CBP), ausgelöst<sup>227</sup>. Insbesondere Eya3 besitzt die Möglichkeit, Dach von einem Suppressor zu einem Aktivator zu transformieren, welcher dann weitere Koaktivatoren initiieren kann<sup>196</sup>.

Die oben beschriebenen Lokalisierungsstudien der einzelnen Proteine *in vitro* zeigten wie erwartet, dass die Majorität der Six-Proteine im Nukleus der Zelle nachzuweisen waren, während Eya4 und E193 hauptsächlich im Zytoplasma zu finden waren. In Kolokalisierungsstudien mit gemeinsamer Expression von jeweils Eya4 bzw. E193 und Six1 ergab sich überraschenderweise auch im Fall der trunkierenden Mutante E193 eine nukleäre Nachweisbarkeit. Dieses Ergebnis war unerwartet, weil bereits beschrieben wurde, dass die Mutante E193 weder mit wildtypischem Eya4 noch mit Proteinen der Six-Familie dimerisiert bzw. komplexiert<sup>139</sup>. Insofern dürfte analog zu der fehlenden NLS bei humanem Eya eigentlich keine nukleäre Translokation von E193 möglich sein. Da dieses Ergebnis auch ohne Koexpression von Six1 beobachtet werden konnte, ist die Translokation von E193 möglicherweise weniger Six-abhängig als bisher gedacht. Denkbar wäre hier der passive Transport des Proteins in den Kern, da die Größe der E193-Mutante mit ca. 21 kDa die kritische Größe von 40 kDa nicht überschreitet und daher keine Import-Rezeptoren beansprucht werden müssen. Andererseits wäre auch die Dimerisierung mit einem bisher unbekanntem Kofaktor möglich. Eya-Proteine besitzen bekanntermaßen eine ungewöhnlich große Fülle an Interaktionspartnern, zudem werden mehrere bisher Unbekannte vermutet<sup>228</sup>. Ebenso könnte die fehlende Möglichkeit der Dimerisierung von E193 mit wildtypischem Eya4 eine Ursache für eine nukleäre Lokalisation des Proteins darstellen. Eine zusätzliche Möglichkeit könnte eine immer noch funktionelle Aktivierungssequenz in der N-terminalen Domäne der trunkierenden Mutante E193 sein. Wie in der Literatur beschrieben, verliert das E193-Protein im Vergleich zum wildtypischen Eya4-Protein die gesamte C-terminal gelegene ED, während der N-Terminus des Proteins zu großen Teilen erhalten bleibt. In diesem Zusammenhang konnten Xu *et al.*<sup>162</sup> nachweisen, dass eine transkriptionelle

Aktivierung von Zielgenen allein durch die N-terminal gelegene Prolin-Serin und Threonin-reiche Domäne von Eya1-3 in abgeschwächtem Umfang möglich war. Schließlich darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Eya-Proteine eine Phosphatasefunktion besitzen. Hierzu besitzen die Proteine 2 unterschiedliche Phosphatasen: Eine C-terminal lokalisierte Tyrosinphosphatase, sowie eine N-terminale Serin/Threonin-Phosphatase, für welche beschrieben wurde, dass die Aminosäuresequenz zwischen Position 58 und 120 für Ihre Funktionalität kodiert<sup>163, 164</sup>. Diese ist beim wildtypischen Eya4-Protein genauso wie im Falle der E193-Mutante also noch funktionell. Da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten beide Proteine im Kern nachgewiesen werden konnten, hierfür das heute gültige Erklärungsmodell allerdings nicht ausreicht, ist eine Spekulation über eine mögliche Involvierung der Serin/Threonin-Phosphatase in die nukleäre Lokalisierung der beiden Proteine diesbezüglich denkbar. Bis dato konnte zwar noch kein Substrat dieser Phosphatase identifiziert werden<sup>155</sup>, unter Beachtung der steigenden Relevanz von Eya-Proteinen in verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ist in absehbarer Zukunft jedoch damit zu rechnen.

In dieser Arbeit wurden 2 transgene Mausmodelle etabliert, um etwaige Folgen der Veränderung der p27<sup>kip1</sup>-Spiegel durch erhöhte bzw. fehlende Suppression bei Eya4-überexprimierenden sowie E193-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu wildtypischen Mäusen detektieren zu können. Wie beschrieben (siehe Abschnitt Ergebnisse) führte die Überexpression von Eya4 zu einer signifikanten Suppression der p27<sup>kip1</sup>-Spiegel innerhalb der Zelle. Phänotypisch zeigte sich bei den betroffenen Mäusen eine signifikante Zunahme der Dicke des LV-Myokards, entsprechend einer myokardialen Hypertrophie. Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei Tieren mit einer Überexpression von HA-markiertem E193 diese Suppression der intrazellulären p27<sup>kip1</sup>-Spiegel nicht auftrat. Konträr zu den Ergebnissen der Tiere mit hohen Eya4-Spiegeln zeigten die hiervon betroffenen Tiere, abhängig von der Altersentwicklung, eine letal verlaufende Kardiomyopathie mit bereits früh einsetzender Verschlechterung der LVEF und Erhöhung des LVEDV. Hierbei waren unter Betrachtung phänotypischer und histomorphologischer Gesichtspunkte sowie kardiomyopathiesensitiver Parameter in der MRI und des altersabhängigen Verlaufs deutliche Ähnlichkeiten zur syndromalen Erkrankung des Menschen im Falle der hereditären E193-Mutation zu beobachten. Auch bei diesen Tieren zeigten sich hingegen keinerlei Entwicklungsstörungen. Ausgehend von

den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen kann das mutierte E193-Protein keine direkt supprimierende Wirkung mehr auf die intrazellulären Eya4-Spiegel ausüben. Die hier präsentierte Hypothese geht von einer essentiellen Bedeutung der Höhe endogener p27<sup>kip1</sup>-Spiegel für die Erhaltung der kardialen Homöostase sowie einer adäquaten Reaktion auf hypertrophische Reize aus. Weil diese durch funktionsfähiges Eya4 im Komplex mit seinem Interaktionspartner Six1 reguliert werden, scheint ein direkter Effekt von E193 auf p27<sup>kip1</sup> oder einen seiner multiplen Interaktionspartner, abweichend von bisher untersuchten Signalwegen, möglich. Beispielsweise durch Induktion mitogener Reize, welche nach einer permanenten Überstimulation über lange Zeit zur Dekompensation und Entwicklung einer DCM führen könnten. Andererseits wäre auch eine Veränderung der Stabilität des p27<sup>kip1</sup>-Proteins durch E193 bzw. dessen Einfluss auf einen oder mehrere Interaktionspartner von p27<sup>kip1</sup> denkbar. Zum Beispiel kann die rezeptor-assoziierte Janus Kinase 2 (JAK2) nach Aktivierung durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren Tyrosinreste des p27<sup>kip1</sup>-Proteins phosphorylieren und somit zu dessen schnellem Abbau beitragen<sup>229</sup>. Eine direkte oder indirekte Hemmung der JAK2 durch E193 würde somit zur Erhaltung höherer p27<sup>kip1</sup>-Spiegel führen. Andere Autoren konnten in diesem Zusammenhang bereits eine Beschleunigung der Biodegradibilität der mutierten Eya-Proteine im Vergleich zu wildtypischen Proteinen zeigen<sup>142</sup>. Genauso wäre eine mutable Lokalisierung von p27<sup>kip1</sup> in der Zelle denkbar, welche ihrerseits wieder zu Abweichungen im Wachstumsverhalten der Zelle führt. Folglich entsteht der kardiale Phänotyp durch eine E193-Überexpression, welche, durch Aktivierung der Expression von p27<sup>kip1</sup>, mit erhöhten intrazellulären Spiegeln von p27<sup>kip1</sup> einhergeht. Die Überexpression von Eya4 führt hingegen zu einer übermäßigen Hemmung der Expression von p27<sup>kip1</sup>, wodurch es zu kardialer Hypertrophie kommt. Diesbezüglich ist unklar, auf welchem Weg die Eya4-induzierte Suppression von p27<sup>kip1</sup> posttranskriptionell zur Induktion kardialer Hypertrophie führt. Eine Möglichkeit wäre eine Beeinflussung der Ck2- $\alpha'$  von der gezeigt werden konnte, dass Sie, je nach Phosphorylierungszustand, die Hypertrophie adulter Kardiomyozyten ermöglicht oder verhindert<sup>187</sup>. Denkbar wäre ebenfalls die Aktivierung der Histon Deacetylase 2 (HDAC2), von der kürzlich gezeigt werden konnte, dass Sie ebenfalls essentiell für die Aktivierung myokardialer Hypertrophie ist<sup>230</sup> und dass Sie durch Ck2- $\alpha'$  beeinflusst wird<sup>231</sup>. Es stellt sich die Frage, wieso es bei wildtypischen Tieren, mit ebenfalls kontinuierlichen p27<sup>kip1</sup>-Spiegeln, nicht zur

Exazerbation und Krankheitsentwicklung auf kardialer Ebene kommt. Diese steht jedoch keinesfalls im Widerspruch zu der hier präsentierten Hypothese, bedenkt man, dass die Erhaltung der kardialen Homöostase kein starrer Vorgang aus fest vorgegebenen pro- und antihypertrophischen Zeitspannen ist. Vielmehr erfordert eine adäquate Hypertrophieregulation höchste Dynamik und verlangt stetige Anpassung an externe und interne Reize, sei es in Form verstärkter körperlicher Belastung oder im Rahmen einer Entzündungsreaktion.

Da p27<sup>kip1</sup> als Zellzyklusregulator vor allem eine wichtige regulatorische Aufgabe während der frühen Phasen der Entwicklung, und somit Phasen mit hoher mitotischer Aktivität der Zellen, wahrnimmt, ist unverständlich, wieso die beobachteten Veränderungen nicht früher bei betroffenen Versuchstieren phänotypisch auffällig wurden. In den in der vorliegenden Arbeit präsentierten spezifischen Untersuchungen, könnte die Verwendung eines transgenen Vektors, welcher unter Kontrolle des  $\alpha$ -MHC Promoters exprimiert wird, hierfür verantwortlich sein. Dieser Promoter zeigt während der Entwicklung von Kardiomyozyten lediglich sehr moderate Aktivität und könnte die frühe phänotypische Ausprägung der Erkrankung insofern beeinträchtigen. Generell könnten bisher unidentifizierte Zielgene von Eya4 bzw. E193 abweichend von p27<sup>kip1</sup> für die Erhaltung der kardialen Homöostase relevant sein, welche ebenfalls über einen gewissen Zeitraum eine Kompensation ermöglichen, jedoch nicht ausreichen, um die altersabhängige Krankheitsmanifestation zu verhindern. Des Weiteren wäre eine selektive Reaktion auf erhöhte p27<sup>kip1</sup>-Spiegel innerhalb der Zelle denkbar. Beispielsweise nutzen viele Malignome die Möglichkeit, die intrazellulären p27<sup>kip1</sup>-Spiegel auf posttranskriptioneller Ebene negativ zu beeinflussen. Hierzu aktivieren sie die natürlich vorkommende Ubiquitin-Ligase „Skp2“ dazu, das p27<sup>kip1</sup> zu markieren, damit es durch Cyclin D1 und/oder D3 vermehrt abgebaut wird<sup>232, 233</sup>. Ein ähnlicher Vorgang, allerdings in regulierter Form, wäre ebenso im Fall der durch die trunkierende E193-Mutation permanent hohen p27<sup>kip1</sup>-Spiegel möglich. Zuletzt könnten auch Veränderungen der Lokalisation des p27<sup>kip1</sup>-Proteinspiegels innerhalb der Zelle auf Dauer zu den beschriebenen Veränderungen führen. So sind in der Literatur einige Beispiele beschrieben, bei denen der Abfall des nukleären bei steigendem zytoplasmatischen p27<sup>kip1</sup>-Spiegel zur Aktivierung verschiedener onkogener Signalwege und somit zu ungehemmtem Zellwachstum führte

234-236

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die DCM und die hieraus resultierende final verlaufende Herzinsuffizienz sind bei stetig steigender Lebenserwartung des Patientenkollektivs und Zunahme kardial bedingter Erkrankungen von exponentieller Bedeutung. Ebenso wird die Klassifizierung der DCM durch detailliertere Untersuchungsmethoden und neue Ansätze in der Grundlagenforschung immer genauer und es werden in kurzen Abständen bisher unbekannte Ätiologien für diese Erkrankung identifiziert. Nur für etwa die Hälfte der DCM kann eine spezifische Ursache gefunden werden, die andere Hälfte der Fälle wird als unspezifisch definiert<sup>68</sup>. Ein wachsender Anteil der Erkrankungen wird genetischen Ursachen zugeschrieben, zum Beispiel durch Mutationen in verschiedensten Genen. Mit Zunahme der technischen Möglichkeiten zur Sequenzierung kompletter Genome und der höheren Verbreitung der Methode in der klinischen Praxis konnten in der Vergangenheit zahlreiche, bis dato als unspezifisch klassifizierte, DCM einer spezifischen Ursache zugeschrieben werden<sup>237</sup>. Die Häufigkeit der genetisch bedingten Formen der Erkrankung variiert hierbei in der Literatur zwischen 20-50 %<sup>100-104</sup>. Charakteristisch für die DCM ist ein, im Vergleich zu anderen Ursachen einer Herzinsuffizienz, relativ frühes Manifestationsalter der Betroffenen, welches im Erwachsenenalter seinen Höhepunkt erreicht<sup>129</sup>.

Der Transkriptionskofaktor Eya4 ist eines von 4 Homologen (Eya1-4) des Gens „*eyes absent*“ (*Eya*), welches bei *Drosophila melanogaster* vor allem an der Entwicklung retinaler Strukturen beteiligt ist<sup>165, 166</sup>. In den letzten 3 Jahren wird immer mehr über die Beteiligung humaner EYA-Proteine an der Entstehung sowie Metastasierung von Tumoren berichtet<sup>155</sup>. So ist EYA4 während der Entstehung peripherer maligner Nervenscheidentumoren, Ösophagus- sowie Kolon- und Rektalkarzinomen hochreguliert<sup>238-242</sup>. Bei Vertebraten ist Eya4 als Teil eines Netzwerkes vor allem für die Regulation embryonaler Entwicklungsvorgänge in unterschiedlichen Geweben zuständig. Diese regulierende Funktion im Nukleus der Zelle führt Eya4 vor allem im Komplex mit Six1 durch. Eine 4.846 bp deletierende Mutante von humanem EYA4, E193, führt bei betroffenen Patienten zu SNHL und altersabhängig einsetzender, final verlaufender DCM<sup>139</sup>. Im myokardialen Gewebe waren bislang nur wenige Ziele des Eya4/Six1-Komplexes



bekannt. Aufgrund von Untersuchungen die zeigten, dass Six6 zusammen mit Dach den CDK-Inhibitor p27<sup>kip1</sup> reguliert<sup>186</sup> und dieser auch an der Hypertrophieregulation in adulten, postmitotischen Kardiomyozyten beteiligt ist<sup>187</sup>, wurde in Vorarbeiten nach einer Six1-Bindungsstelle im p27<sup>kip1</sup>-Promoter gesucht (unpublished data). Aufgrund dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass Eya4 zusammen mit Six1 im Nukleus der Zelle die Expression von p27<sup>kip1</sup> reguliert. Hierdurch ist der Komplex an der Aufrechterhaltung der kardialen Homöostase maßgeblich beteiligt.

Hierzu wurde zunächst die zelluläre Lokalisation von Eya4 sowie von E193 in Abhängigkeit von Six1 untersucht. Durch Transfektion von NRCM mit DsRed-markiertem Eya4, E193 und GFP-markiertem Six1 konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden, dass Eya4 nach Kotransfektion mit Six1 zum größten Teil im Kern der Zelle nachweisbar war, während Eya4 alleine auch nach 48 h hauptsächlich im Zytoplasma zu finden war. Auch eine densitometrische Analyse von Western Blots der transfizierten Zellen bestätigte dieses Ergebnis. Anschließend wurde die Korrelation von p27<sup>kip1</sup>-Spiegeln innerhalb der Zelle in Abhängigkeit von der jeweiligen Überexpression von Eya4 bzw. E193 untersucht. Hierbei konnte durch Western Blot-Analysen gezeigt werden, dass eine Überexpression von Eya4 die p27<sup>kip1</sup>-Spiegel signifikant supprimiert, während die Überexpression von E193 zu einer signifikanten Erhöhung der Spiegel führte. Ein spezifischer Knockdown von Eya4 mittels siRNA hob die Suppression von p27<sup>kip1</sup> auf.

Mittels Promoterstudien in NRCM unter Verwendung eines p27-Promoterfragmentes (p27PF) konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Eya4 zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität des p27-Promoters führte ( $67 \pm 7$  %;  $n=6$ ;  $p < 0.05$ ). Ferner konnte gezeigt werden, dass die durch Eya4-Überexpression induzierte Suppression von p27<sup>kip1</sup>, nach Veränderung einer Six1-Bindungsstelle im p27-Promoterbereich, entsprechend aufgehoben werden konnte ( $161 \pm 9$  %;  $n=6$ ;  $p < 0.05$ ). Konträr zeigte sich im Falle der Mutante E193 ein aktivierender Effekt auf die Promoteraktivität von p27<sup>kip1</sup> ( $120 \pm 7$  %;  $n=6$ ;  $p < 0.05$ ).

Um mögliche Auswirkungen von Störungen in der Eya4/Six1-Signalkaskade auf die Erhaltung der kardialen Physiologie zu untersuchen, wurden 2 transgene Tierlinien konstruiert, welche jeweils eine myokardspezifische Überexpression von

HA-markiertem Eya4 bzw. E193 zeigten. Anschließend durchgeführte MRI-Untersuchungen mit Auswertung der Hämodynamik betroffener Tiere zeigten für die HA-E193-überexprimierenden Tiere eine altersabhängig entstehende Kardiomyopathie, die in Morphologie und Hämodynamik deutliche Ähnlichkeiten zu den Trägern der humanen E193-Mutation aufwies. Bei den HA-Eya4-überexprimierenden Mäusen zeigte sich hierbei das Bild einer signifikanten myokardialen Hypertrophie bei noch erhaltener LVEF, entsprechend einer diastolischen Herzinsuffizienz (HFpEF). Anschließend vorgenommene histomorphologische Untersuchungen von myokardialen Gewebeschnitten dieser Tiere wiesen, passend zu den MRI-Befunden, eine deutliche Dilatation des linken Ventrikels, einhergehend mit einer Reduktion der Wanddicke bei den HA-E193-transgenen Mäusen auf. Die HA-Eya4-transgenen Mäuse zeigten konträr dazu eine konzentrische Hypertrophie, mit Dickenzunahme des LV-Myokard. Ebenfalls durchgeführte Spezialfärbungen zeigten eine Zunahme der interstitiellen Fibrosierung des kardialen Gewebes, welche charakteristisch für kardiale Erkrankungen im fortgeschrittenen Stadium ist, bei Gewebeproben beider transgener Tiere.

Eine trunkierende Mutation im humanen Transkriptionskofaktor EYA4 führt zu altersabhängiger Entwicklung einer DCM<sup>109, 139</sup>. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Komplex aus Eya4 und Six1 eine supprimierende Wirkung auf den CDK-Inhibitor p27<sup>kip1</sup> hat, welcher die Hypertrophie von adulten Kardiomyozyten negativ reguliert. Somit führt die Überexpression von HA-Eya4 im Mausmodell über die Hemmung der Aktivität von p27<sup>kip1</sup> zur Induktion einer kardialen Hypertrophie. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mausmodell mit HA-E193-überexprimierenden Tieren unterstützte die oben beschriebene Hypothese, wonach E193 aufgrund seiner Infunktionalität nicht supprimierend auf p27<sup>kip1</sup> einwirken kann, weshalb letztendlich durch jahrelange mangelhafte Adaptationsvorgänge eine DCM entstehen kann.

Die hier beschriebenen Befunde sind bis dato noch nicht von therapeutischer Relevanz für die Behandlung der DCM oder der Verhinderung von Myokardhypertrophie in der klinischen Praxis. Während mittlerweile genetische Untersuchungen und ebenso die Sequenzierung kompletter Genome Einzug in die klinische Diagnostik gehalten haben, ist die in dieser Arbeit beschriebene Mutation vor allem von Relevanz für die Primärprävention betroffener Patienten. Mit Zunahme des Einsatzes und Verbreitung

genetischer Testungen werden diese in naher Zukunft mit geringerem finanziellen Aufwand zu realisieren sein und es dem Untersucher ermöglichen, bekannte Mutationen mit klinischen Auswirkungen frühestmöglich zu identifizieren. Dies kann die Mortalität, vor allem aber die Morbidität von Erkrankungen weiter reduzieren. Im Falle der DCM, für die außer der Herztransplantation keine Kausaltherapie bekannt ist, könnte dies neben Vorteilen für die Lebensqualität der Patienten auch enorme ökonomische Vorteile bieten. So könnte bei frühem Bekanntwerden der Mutation eine engmaschigere Überwachung begonnen werden und auch frühzeitiger therapiert werden, falls eine Notwendigkeit besteht.

Zusätzlich zu dem präventiven Gedanken, dürften Eya-Proteine in absehbarer Zukunft aber auch weitaus interessantere therapeutische Ziele darstellen. Neben der in dieser Arbeit vorgestellten Eya4-Mutation führen auch Mutationen in Eya2 bzw. Eya3 zu kardialen Funktionsstörungen<sup>183, 243</sup>. Bei der Sichtung der aktuellen Literatur nach weiteren Auswirkungen mutierter Eya-Proteine bzw. deren Beteiligung an unterschiedlichsten pathophysiologischen Prozessen, öffnet sich eine Fülle weiterer Anwendungsmöglichkeiten für zukünftige Medikamente, welche diesen Signalweg wirksam beeinflussen könnten: Neben Induktion der Angiogenese<sup>244, 245</sup> werden Eya-Proteinen nach heutigem Wissensstand auch wichtige Rollen in der Regulation von Invasivität, Wachstum und Metastasierung diverser maligner Tumore zugeschrieben<sup>238, 246-248</sup>. Eya-Inhibitoren bzw. die Wiederherstellung der physiologischen Funktion eines mutierten Eya-Proteins mittels Gentherapie werden zukünftig also mit hoher Wahrscheinlichkeit von großem Interesse sein. Denn auch die kardiale Hypertrophie führt bei Überschreitung gewisser Grenzen zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Insofern könnte eine Modulation des Eya4-Signalweges die an den HA-Eya4-transgenen Tieren beobachtete Myokardhypertrophie günstig beeinflussen und gegebenenfalls auch beim Menschen frühzeitig zur Verhinderung irreversibler myokardialer Hypertrophie eingesetzt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. WHO. Fact sheet on cardiovascular diseases. 2011;Fact Sheet No 317
2. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. Esc guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the european society of cardiology. Developed in collaboration with the heart failure association of the esc (hfa) and endorsed by the european society of intensive care medicine (esicm). *Eur J Heart Fail.* 2008;10:933-989
3. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. Acc/aha 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: A report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines (writing committee to update the 2001 guidelines for the evaluation and management of heart failure): Developed in collaboration with the american college of chest physicians and the international society for heart and lung transplantation: Endorsed by the heart rhythm society. *Circulation.* 2005;112:e154-235
4. deFilippi CR, Seliger SL, Maynard S, Christenson RH. Impact of renal disease on natriuretic peptide testing for diagnosing decompensated heart failure and predicting mortality. *Clin Chem.* 2007;53:1511-1519
5. Emdin M, Passino C, Prontera C, Fontana M, Poletti R, Gabutti A, Mammini C, Giannoni A, Zyw L, Zucchelli G, Clerico A. Comparison of brain natriuretic peptide (bnp) and amino-terminal probnp for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem.* 2007;53:1289-1297
6. Sakai H, Tsutamoto T, Ishikawa C, Tanaka T, Fujii M, Yamamoto T, Takashima H, Horie M. Direct comparison of brain natriuretic peptide (bnp) and n-terminal pro-bnp secretion and extent of coronary artery stenosis in patients with stable coronary artery disease. *Circ J.* 2007;71:499-505
7. Bhardwaj A, Januzzi JL, Jr. Natriuretic peptide-guided management of acutely destabilized heart failure: Rationale and treatment algorithm. *Crit Pathw Cardiol.* 2009;8:146-150
8. Spanaus KS, Kronenberg F, Ritz E, Schlapbach R, Fliser D, Hersberger M, Kollerits B, Konig P, von Eckardstein A. B-type natriuretic peptide concentrations predict the progression of nondiabetic chronic kidney disease: The mild-to-moderate kidney disease study. *Clin Chem.* 2007;53:1264-1272
9. Fox KF, Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Gibbs JS, Underwood SR, Turner RM, Poole-Wilson PA, Davies SW, Sutton GC. Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population. *Eur Heart J.* 2001;22:228-236
10. Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, Krumholz HM, Levy D, Mensah GA, Narula J, Shor ES, Young JB, Hong Y. Prevention of heart failure: A

- scientific statement from the american heart association councils on epidemiology and prevention, clinical cardiology, cardiovascular nursing, and high blood pressure research; quality of care and outcomes research interdisciplinary working group; and functional genomics and translational biology interdisciplinary working group. *Circulation*. 2008;117:2544-2565
11. Manuals M. Heart failure. *Merck Manuals for Healthcare Professionals*.
  12. Aurigemma GP, Gaasch WH. Clinical practice. Diastolic heart failure. *N Engl J Med*. 2004;351:1097-1105
  13. Gaasch WH, Zile MR. Left ventricular diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Annu Rev Med*. 2004;55:373-394
  14. Brutsaert DL, De Keulenaer GW. Diastolic heart failure: A myth. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21:240-248
  15. Forrester JS, Waters DD. Hospital treatment of congestive heart failure. Management according to hemodynamic profile. *Am J Med*. 1978;65:173-180
  16. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL. 2013 accf/aha guideline for the management of heart failure: A report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:e147-239
  17. ISEG IfSEuGH. Barmer gek report krankenhaus 2013. 2013
  18. Till Neumann JB, Anja Neumann, Jürgen Wasem., Georg Ertl RD, Raimund Erbel. Herzinsuffizienz: Häufigster grund für krankenhausaufenthalte. *Deutsches Ärzteblatt*. 2009:269-275
  19. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347:1397-1402
  20. MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JW, Boyd J, Finlayson A, Redpath A, Pell JP, McMurray JJ. Evidence of improving prognosis in heart failure: Trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation*. 2000;102:1126-1131
  21. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, Hellermann-Homan JP, Killian J, Yawn BP, Jacobsen SJ. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *Jama*. 2004;292:344-350
  22. Bridgen. Uncommon myocardial diseases: The non-coronary cardiomyopathies. *The Lancet*. 1957;270:1243-1249
  23. Goodwin JF. Cardiac function in primary myocardial disorders. I. *Br Med J*. 1964;1:1527-1533
  24. Goodwin JF. Cardiac function in primary myocardial disorders ii. *Br Med J*. 1964;1:1595-1597
  25. Goodwin JF, Oakley CM. The cardiomyopathies. *British heart journal*. 1972;34:545-552
  26. Report of the who/isfc task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *British heart journal*. 1980;44:672-673
  27. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 world health organization/international society and federation of

- cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-842
28. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: An american heart association scientific statement from the council on clinical cardiology, heart failure and transplantation committee; quality of care and outcomes research and functional genomics and translational biology interdisciplinary working groups; and council on epidemiology and prevention. *Circulation*. 2006;113:1807-1816
  29. Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, Dearani JA, Fifer MA, Link MS, Naidu SS, Nishimura RA, Ommen SR, Rakowski H, Seidman CE, Towbin JA, Udelson JE, Yancy CW. 2011 accf/aha guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: Executive summary: A report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines. *Circulation*. 2011;124:2761-2796
  30. Maskatia SA. Hypertrophic cardiomyopathy: Infants, children, and adolescents. *Congenit Heart Dis*. 2012
  31. Moon JC, McKenna WJ, McCrohon JA, Elliott PM, Smith GC, Pennell DJ. Toward clinical risk assessment in hypertrophic cardiomyopathy with gadolinium cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1561-1567
  32. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burbanc M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. Hypertrophic cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003;107:2227-2232
  33. Kushwaha SS, Fallon JT, Fuster V. Restrictive cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1997;336:267-276
  34. Ammash NM, Seward JB, Bailey KR, Edwards WD, Tajik AJ. Clinical profile and outcome of idiopathic restrictive cardiomyopathy. *Circulation*. 2000;101:2490-2496
  35. Roberts WC, Glancy DL, DeVita VT, Jr. Heart in malignant lymphoma (hodgkin's disease, lymphosarcoma, reticulum cell sarcoma and mycosis fungoides). A study of 196 autopsy cases. *Am J Cardiol*. 1968;22:85-107
  36. Gottdiener JS, Katin MJ, Borer JS, Bacharach SL, Green MV. Late cardiac effects of therapeutic mediastinal irradiation. Assessment by echocardiography and radionuclide angiography. *N Engl J Med*. 1983;308:569-572
  37. Billingham ME. Pharmacotoxic myocardial disease: An endomyocardial study. *Heart Vessels Suppl*. 1985;1:278-282
  38. Mortensen SA, Olsen HS, Baandrup U. Chronic anthracycline cardiotoxicity: Haemodynamic and histopathological manifestations suggesting a restrictive endomyocardial disease. *British heart journal*. 1986;55:274-282
  39. Nava A, Bauce B, Basso C, Muriago M, Rampazzo A, Villanova C, Daliento L, Buja G, Corrado D, Danieli GA, Thiene G. Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2226-2233
  40. Peters S, Trummel M, Meyners W. Prevalence of right ventricular dysplasia-cardiomyopathy in a non-referral hospital. *Int J Cardiol*. 2004;97:499-501

41. Corrado D, Basso C, Pavei A, Michieli P, Schiavon M, Thiene G. Trends in sudden cardiovascular death in young competitive athletes after implementation of a preparticipation screening program. *Jama*. 2006;296:1593-1601
42. Nava A, Thiene G, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Buja G, Martini B, Stritoni P, Fasoli G. Familial occurrence of right ventricular dysplasia: A study involving nine families. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:1222-1228
43. Basso C, Thiene G, Corrado D, Angelini A, Nava A, Valente M. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis? *Circulation*. 1996;94:983-991
44. Corrado D, Basso C, Thiene G, McKenna WJ, Davies MJ, Fontaliran F, Nava A, Silvestri F, Blomstrom-Lundqvist C, Wlodarska EK, Fontaine G, Camerini F. Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: A multicenter study. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1512-1520
45. Thiene G, Basso C. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: An update. *Cardiovasc Pathol*. 2001;10:109-117
46. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*. 2009;373:1289-1300
47. Corrado D, Basso C, Rizzoli G, Schiavon M, Thiene G. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1959-1963
48. Wichter T, Borggrefe M, Haverkamp W, Chen X, Breithardt G. Efficacy of antiarrhythmic drugs in patients with arrhythmogenic right ventricular disease. Results in patients with inducible and noninducible ventricular tachycardia. *Circulation*. 1992;86:29-37
49. Wichter T, Paul TM, Eckardt L, Gerdes P, Kirchhof P, Bocker D, Breithardt G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Antiarrhythmic drugs, catheter ablation, or icd? *Herz*. 2005;30:91-101
50. Dalal D, Jain R, Tandri H, Dong J, Eid SM, Prakasa K, Tichnell C, James C, Abraham T, Russell SD, Sinha S, Judge DP, Bluemke DA, Marine JE, Calkins H. Long-term efficacy of catheter ablation of ventricular tachycardia in patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:432-440
51. Park NH. Familial dilated cardiomyopathy. *Jaapa*. 2011;24:69, 71
52. Gillum RF. Idiopathic cardiomyopathy in the united states, 1970-1982. *Am Heart J*. 1986;111:752-755
53. Coughlin SS, Szklo M, Baughman K, Pearson TA. The epidemiology of idiopathic dilated cardiomyopathy in a biracial community. *Am J Epidemiol*. 1990;131:48-56
54. Nishikawa T, Ishiyama S, Sakomura Y, Nakazawa M, Momma K, Hiroe M, Sekiguchi M, Kasajima T. Ultrastructural features of the myocardium of children with dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels*. 1999;14:52-56
55. Tamburro P, Wilber D. Sudden death in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*. 1992;124:1035-1045
56. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the cooperative north scandinavian enalapril survival study (consensus). The consensus trial study group. *N Engl J Med*. 1987;316:1429-1435

57. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The solvd investigators. *N Engl J Med.* 1991;325:293-302
58. Packer M, Poole-Wilson PA, Armstrong PW, Cleland JG, Horowitz JD, Massie BM, Ryden L, Thygesen K, Uretsky BF. Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. Atlas study group. *Circulation.* 1999;100:2312-2318
59. The cardiac insufficiency bisoprolol study ii (cibis-ii): A randomised trial. *Lancet.* 1999;353:9-13
60. Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjekshus J, Wikstrand J, El Allaf D, Vitovec J, Aldershvile J, Halinen M, Dietz R, Neuhaus KL, Janosi A, Thorgeirsson G, Dunselman PH, Gullestad L, Kuch J, Herlitz J, Rickenbacher P, Ball S, Gottlieb S, Deedwania P. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: The metoprolol cr/xl randomized intervention trial in congestive heart failure (merit-hf). Merit-hf study group. *Jama.* 2000;283:1295-1302
61. Packer M, Fowler MB, Roecker EB, Coats AJ, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Staiger C, Holcslaw TL, Amann-Zalan I, DeMets DL. Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: Results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (copernicus) study. *Circulation.* 2002;106:2194-2199
62. Gheorghide M, Khan S, Blair JE, Harinstein ME, Krum H, Mukherjee R, Pitt B. The effects of eplerenone on length of stay and total days of heart failure hospitalization after myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J.* 2009;158:437-443
63. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized aldactone evaluation study investigators. *N Engl J Med.* 1999;341:709-717
64. Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, Smith R, Dunkman WB, Loeb H, Wong M, et al. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1991;325:303-310
65. Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber PA, Parameshwar J, Mohacsi P, Augustine S, Aaronson K, Barr M. Listing criteria for heart transplantation: International society for heart and lung transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates--2006. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25:1024-1042
66. Butler J, Khadim G, Paul KM, Davis SF, Kronenberg MW, Chomsky DB, Pierson RN, 3rd, Wilson JR. Selection of patients for heart transplantation in the current era of heart failure therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:787-793
67. Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelman WH, Harlan WR. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a national heart, lung, and blood institute workshop. *Am J Cardiol.* 1992;69:1458-1466
68. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in



- patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;342:1077-1084
69. Manolio TA, Levy D, Garrison RJ, Castelli WP, Kannel WB. Relation of alcohol intake to left ventricular mass: The framingham study. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:717-721
70. Fuster V, Gersh BJ, Giuliani ER, Tajik AJ, Brandenburg RO, Frye RL. The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1981;47:525-531
71. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ, 3rd. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in olmsted county, minnesota, 1975-1984. *Circulation.* 1989;80:564-572
72. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J.* 1997;18:208-225
73. Rakar S, Sinagra G, Di Lenarda A, Poletti A, Bussani R, Silvestri F, Camerini F. Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies. The heart muscle disease study group. *Eur Heart J.* 1997;18:117-123
74. Diaz RA, Obasohan A, Oakley CM. Prediction of outcome in dilated cardiomyopathy. *British heart journal.* 1987;58:393-399
75. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The registry of the international society for heart and lung transplantation: Eighteenth official report-2001. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20:805-815
76. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, Messere J, Cox GF, Lurie PR, Hsu D, Canter C, Wilkinson JD, Lipshultz SE. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *Jama.* 2006;296:1867-1876
77. Segel LD, Rendig SV, Choquet Y, Chacko K, Amsterdam EA, Mason DT. Effects of chronic graded ethanol consumption on the metabolism, ultrastructure, and mechanical function of the rat heart. *Cardiovasc Res.* 1975;9:649-663
78. Aberle IN, Ren J. Experimental assessment of the role of acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy. *Biol Proced Online.* 2003;5:1-12
79. Suter TM, Ewer MS. Cancer drugs and the heart: Importance and management. *Eur Heart J.* 2012
80. Dimitrakis P, Romay-Ogando MI, Timolati F, Suter TM, Zuppinger C. Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res.* 2012
81. Tabet JY, Meurin P, Ben Driss A, Berthaux X, Weber H, Renaud N, Cohen Solal A. Beta-blockade intolerance in anthracycline-induced cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2006;106:132-134
82. Janeway C. TP. *Immunologie.* 1997.
83. Konstadoulakis MM, Kroumbouzou H, Tsiamis E, Trikas A, Toutouzas P. Clinical significance of antibodies against tropomyosin, actin and myosin in patients with dilated cardiomyopathy. *J Clin Lab Immunol.* 1993;40:61-67
84. Portig I, Pankuweit S, Maisch B. Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2245-2251
85. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T. Autoantibodies against cardiac

- troponin i are responsible for dilated cardiomyopathy in pd-1-deficient mice. *Nat Med.* 2003;9:1477-1483
86. Cooper LT, Jr. Myocarditis. *N Engl J Med.* 2009;360:1526-1538
87. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, Ramondo A, Carturan E, Iliceto S, Thiene G, Daliento L. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: Prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J.* 2007;28:1326-1333
88. Lau RC. Coxsackie b virus infections in new zealand patients with cardiac and non-cardiac diseases. *J Med Virol.* 1983;11:131-137
89. Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:127-155
90. Martino TA, Liu P, Sole MJ. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 1994;74:182-188
91. Wanderley DM, Correa FM. Epidemiology of chagas' heart disease. *Sao Paulo Med J.* 1995;113:742-749
92. Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol.* 2006;112:132-133
93. Hagar JM, Rahimtoola SH. Chagas' heart disease in the united states. *N Engl J Med.* 1991;325:763-768
94. Kessler DA, Shi PA, Avecilla ST, Shaz BH. Results of lookback for chagas disease since the inception of donor screening at new york blood center. *Transfusion.* 2012
95. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in spain, the united states and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115:22-27
96. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med.* 2000;343:1388-1398
97. Dettmeyer Rea. Myokarditis. *Rechtsmedizin.* 2006;16:138-142
98. Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, Huber SA. Coxsackievirus b-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol.* 1987;128:455-463
99. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: Quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:314-318
100. Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesebro JH, Tazelaar HD. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1992;326:77-82
101. Keeling PJ, Gang Y, Smith G, Seo H, Bent SE, Murday V, Caforio AL, McKenna WJ. Familial dilated cardiomyopathy in the united kingdom. *British heart journal.* 1995;73:417-421
102. Baig MK, Goldman JH, Caforio AL, Coonar AS, Keeling PJ, McKenna WJ. Familial dilated cardiomyopathy: Cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:195-201
103. Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus HA. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:186-194

104. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:969-981
105. Mestroni L, Rocco C, Gregori D, Sinagra G, Di Lenarda A, Miodini S, Vatta M, Pinamonti B, Muntoni F, Caforio AL, McKenna WJ, Falaschi A, Giacca M, Camerini. Familial dilated cardiomyopathy: Evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart muscle disease study group. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:181-190
106. Franz WM, Cremer M, Herrmann R, Grunig E, Fogel W, Scheffold T, Goebel HH, Kircheisen R, Kubler W, Voit T, et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Novel mutation of the dystrophin gene. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;752:470-491
107. Li YY, Maisch B, Rose ML, Hengstenberg C. Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2699-2709
108. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science.* 1998;280:750-752
109. Schonberger J, Seidman CE. Many roads lead to a broken heart: The genetics of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2001;69:249-260
110. Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev.* 2002;82:945-980
111. Foster H, Popplewell L, Dickson G. Genetic therapeutic approaches for duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther.* 2012;23:676-687
112. Hoogerwaard EM, Ginjaar IB, Bakker E, de Visser M. Dystrophin analysis in carriers of duchenne and becker muscular dystrophy. *Neurology.* 2005;65:1984-1986
113. Wagner S, Knipp S, Weber C, Hein S, Schinkel S, Walther A, Bekeredjian R, Muller OJ, Friedrich O. The heart in duchenne muscular dystrophy: Early detection of contractile performance alteration. *J Cell Mol Med.* 2012
114. Balci-Hayta B, Talim B, Dincer P, Topaloglu H. Coexistence of two distinct intragenic dystrophin deletions in two maternal cousins with duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2012
115. Michels VV, Pastores GM, Moll PP, Driscoll DJ, Miller FA, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Tajik JA, Beggs AH, Kunkel LM, et al. Dystrophin analysis in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Med Genet.* 1993;30:955-957
116. Oldfors A, Eriksson BO, Kyllerman M, Martinsson T, Wahlstrom J. Dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene: An illustrated review. *British heart journal.* 1994;72:344-348
117. Johnson EK, Zhang L, Adams ME, Phillips A, Freitas MA, Froehner SC, Green-Church KB, Montanaro F. Proteomic analysis reveals new cardiac-specific dystrophin-associated proteins. *PLoS One.* 2012;7:e43515
118. Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, Smoot L, Mullen MP, Woolf PK, Wigle ED, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;343:1688-1696
119. Olson TM, Kishimoto NY, Whitby FG, Michels VV. Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:723-732
120. Roe CRD, J. *Mitochondrial fatty acid oxidation disorders.* 2001.

121. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Pierpont ME, Fricker FJ, Lipshultz SE, Perez-Atayde A. Specific mitochondrial DNA deletions in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 1996;31:306-313
122. Arbustini E, Diegoli M, Fasani R, Grasso M, Morbini P, Banchieri N, Bellini O, Dal Bello B, Pilotto A, Magrini G, Campana C, Fortina P, Gavazzi A, Narula J, Vigano M. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1998;153:1501-1510
123. Santorelli FM, Mak SC, El-Schahawi M, Casali C, Shanske S, Baram TZ, Madrid RE, DiMauro S. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial trna(lys) gene (g8363a). *Am J Hum Genet.* 1996;58:933-939
124. Hoshijima M. Models of dilated cardiomyopathy in small animals and novel positive inotropic therapies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1015:320-331
125. Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, Li GH, Ahmad F, Mende U, Kranias EG, MacLennan DH, Seidman JG, Seidman CE. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science.* 2003;299:1410-1413
126. Engelfriet PM, Hoogenveen RT, Boshuizen HC, van Baal PH. To die with or from heart failure: A difference that counts: Is heart failure underrepresented in national mortality statistics? *Eur J Heart Fail.* 2011;13:377-383
127. Schonberger J, Levy H, Grunig E, Sangwatanaroj S, Fatkin D, MacRae C, Stacker H, Halpin C, Eavey R, Philbin EF, Katus H, Seidman JG, Seidman CE. Dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: A heritable syndrome that maps to 6q23-24. *Circulation.* 2000;101:1812-1818
128. Luk A, Ahn E, Soor GS, Butany J. Dilated cardiomyopathy: A review. *J Clin Pathol.* 2009;62:219-225
129. Serio A, Narula N, Kodama T, Favalli V, Arbustini E. Familial dilated cardiomyopathy. Clinical and genetic characteristics. *Herz.* 2012;37:822-829
130. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1994;331:1564-1575
131. Yoshikawa T, Baba A, Nagatomo Y. Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy. *Circ J.* 2009;73:602-607
132. Parvari R, Levitas A. The mutations associated with dilated cardiomyopathy. *Biochem Res Int.* 2012;2012:639250
133. Bick AG, Flannick J, Ito K, Cheng S, Vasani RS, Parfenov MG, Herman DS, Depalma SR, Gupta N, Gabriel SB, Funke BH, Rehm HL, Benjamin EJ, Aragam J, Taylor HA, Jr., Fox ER, Newton-Cheh C, Kathiresan S, O'Donnell CJ, Wilson JG, Altshuler DM, Hirschhorn JN, Seidman JG, Seidman C. Burden of rare sarcomere gene variants in the framingham and jackson heart study cohorts. *Am J Hum Genet.* 2012;91:513-519
134. Hershberger RE, Morales A, Siegfried JD. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: A review for genetics professionals. *Genet Med.* 2010;12:655-667
135. Belmont JW, Craigen W, Martinez H, Jefferies JL. Genetic disorders with both hearing loss and cardiovascular abnormalities. *Adv Otorhinolaryngol.* 2011;70:66-74
136. Gorlin R.J. THV, Cohen M.M. *Hereditary hearing loss and its syndromes.* New York: Oxford University Press; 1995.

137. Collin GB, Marshall JD, Cardon LR, Nishina PM. Homozygosity mapping at alstrom syndrome to chromosome 2p. *Hum Mol Genet.* 1997;6:213-219
138. Tranchant C, Mousson B, Mohr M, Dumoulin R, Welsch M, Weess C, Stepien G, Warter JM. Cardiac transplantation in an incomplete kearns-sayre syndrome with mitochondrial DNA deletion. *Neuromuscul Disord.* 1993;3:561-566
139. Schonberger J, Wang L, Shin JT, Kim SD, Depreux FF, Zhu H, Zon L, Pizard A, Kim JB, Macrae CA, Mungall AJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutation in the transcriptional coactivator *eya4* causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet.* 2005;37:418-422
140. Wayne S, Robertson NG, DeClau F, Chen N, Verhoeven K, Prasad S, Tranebjarg L, Morton CC, Ryan AF, Van Camp G, Smith RJ. Mutations in the transcriptional activator *eya4* cause late-onset deafness at the *dfna10* locus. *Hum Mol Genet.* 2001;10:195-200
141. Pfister M, Toth T, Thiele H, Haack B, Blin N, Zenner HP, Sziklai I, Nurnberg P, Kupka S. A 4-bp insertion in the *eya*-homologous region (*eyahr*) of *eya4* causes hearing impairment in a hungarian family linked to *dfna10*. *Mol Med.* 2002;8:607-611
142. Zhang Y, Knosp BM, Maconochie M, Friedman RA, Smith RJ. A comparative study of *eya1* and *eya4* protein function and its implication in branchio-oto-renal syndrome and *dfna10*. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2004;5:295-304
143. Silver SJ, Davies EL, Doyon L, Rebay I. Functional dissection of eyes absent reveals new modes of regulation within the retinal determination gene network. *Mol Cell Biol.* 2003;23:5989-5999
144. Tootle TL, Silver SJ, Davies EL, Newman V, Latek RR, Mills IA, Selengut JD, Parlikar BE, Rebay I. The transcription factor eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature.* 2003;426:299-302
145. Azuma N, Hirakiyama A, Inoue T, Asaka A, Yamada M. Mutations of a human homologue of the drosophila eyes absent gene (*eya1*) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. *Hum Mol Genet.* 2000;9:363-366
146. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. A human homologue of the drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (*bor*) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet.* 1997;15:157-164
147. Vincent C, Kalatzis V, Abdelhak S, Chaib H, Compain S, Helias J, Vaneecloo FM, Petit C. *Bor* and *bo* syndromes are allelic defects of *eya1*. *Eur J Hum Genet.* 1997;5:242-246
148. Collet JF, van Schaftingen E, Stroobant V. A new family of phosphotransferases related to p-type atpases. *Trends Biochem Sci.* 1998;23:284
149. Thaller MC, Schippa S, Rossolini GM. Conserved sequence motifs among bacterial, eukaryotic, and archaeal phosphatases that define a new phosphohydrolase superfamily. *Protein Sci.* 1998;7:1647-1652
150. Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG. Tyrosine dephosphorylation of h2ax modulates apoptosis and survival decisions. *Nature.* 2009;458:591-596

151. Krishnan N, Jeong DG, Jung SK, Ryu SE, Xiao A, Allis CD, Kim SJ, Tonks NK. Dephosphorylation of the c-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone h2a.X is mediated by the protein phosphatase eyes absent. *J Biol Chem.* 2009;284:16066-16070
152. Hunter T. Signaling--2000 and beyond. *Cell.* 2000;100:113-127
153. Heinrich R, Neel BG, Rapoport TA. Mathematical models of protein kinase signal transduction. *Mol Cell.* 2002;9:957-970
154. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Binder B, Geest CR, de Vaate AJ, Lankelma J, Heinrich R, Westerhoff HV. Principles behind the multifarious control of signal transduction. Erk phosphorylation and kinase/phosphatase control. *Febs J.* 2005;272:244-258
155. Tadjuidje E, Hegde RS. The eyes absent proteins in development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2012
156. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 2004;117:699-711
157. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:833-846
158. Musharraf A, Marksches N, Teichmann K, Pankratz S, Landgraf K, Englert C, Imhof D. Eyes absent proteins: Characterization of substrate specificity and phosphatase activity of mutants associated with branchial, otic and renal anomalies. *Chembiochem.* 2008;9:2285-2294
159. Bonini NM, Bui QT, Gray-Board GL, Warrick JM. The drosophila eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development.* 1997;124:4819-4826
160. Bui QT, Zimmerman JE, Liu H, Bonini NM. Molecular analysis of drosophila eyes absent mutants reveals features of the conserved eya domain. *Genetics.* 2000;155:709-720
161. Mutsuddi M, Chaffee B, Cassidy J, Silver SJ, Tootle TL, Rebay I. Using drosophila to decipher how mutations associated with human branchio-oto-renal syndrome and optical defects compromise the protein tyrosine phosphatase and transcriptional functions of eyes absent. *Genetics.* 2005;170:687-695
162. Xu PX, Cheng J, Epstein JA, Maas RL. Mouse eya genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:11974-11979
163. Okabe Y, Sano T, Nagata S. Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of eyes absent. *Nature.* 2009;460:520-524
164. Sano T, Nagata S. Characterization of the threonine-phosphatase of mouse eyes absent 3. *FEBS Lett.* 2011;585:2714-2719
165. Wawersik S, Maas RL. Vertebrate eye development as modeled in drosophila. *Hum Mol Genet.* 2000;9:917-925
166. Silver SJ, Rebay I. Signaling circuitries in development: Insights from the retinal determination gene network. *Development.* 2005;132:3-13
167. Bonini NM, Leiserson WM, Benzer S. Multiple roles of the eyes absent gene in drosophila. *Dev Biol.* 1998;196:42-57
168. Leiserson WM, Benzer S, Bonini NM. Dual functions of the drosophila eyes absent gene in the eye and embryo. *Mech Dev.* 1998;73:193-202

169. Chen R, Amoui M, Zhang Z, Mardon G. Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in drosophila. *Cell*. 1997;91:893-903
170. Hsiao FC, Williams A, Davies EL, Rebay I. Eyes absent mediates cross-talk between retinal determination genes and the receptor tyrosine kinase signaling pathway. *Dev Cell*. 2001;1:51-61
171. Rebay I, Silver SJ, Tootle TL. New vision from eyes absent: Transcription factors as enzymes. *Trends Genet*. 2005;21:163-171
172. Treisman JE. A conserved blueprint for the eye? *Bioessays*. 1999;21:843-850
173. Jemc J, Rebay I. The eyes absent family of phosphotyrosine phosphatases: Properties and roles in developmental regulation of transcription. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:513-538
174. Hanson IM. Mammalian homologues of the drosophila eye specification genes. *Semin Cell Dev Biol*. 2001;12:475-484
175. Heanue TA, Davis RJ, Rowitch DH, Kispert A, McMahon AP, Mardon G, Tabin CJ. Dach1, a vertebrate homologue of drosophila dachshund, is expressed in the developing eye and ear of both chick and mouse and is regulated independently of pax and eya genes. *Mech Dev*. 2002;111:75-87
176. Pignoni F, Hu B, Zavitz KH, Xiao J, Garrity PA, Zipursky SL. The eye-specification proteins so and eya form a complex and regulate multiple steps in drosophila eye development. *Cell*. 1997;91:881-891
177. Wang L, Sewell WF, Kim SD, Shin JT, MacRae CA, Zon LI, Seidman JG, Seidman CE. Eya4 regulation of na<sup>+</sup>/k<sup>+</sup>-atpase is required for sensory system development in zebrafish. *Development*. 2008;135:3425-3434
178. Ingwall JS, Balschi JA. Energetics of the na<sup>(+)</sup> pump in the heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006;17 Suppl 1:S127-S133
179. Zhang S, Yuan JX, Barrett KE, Dong H. Role of na<sup>+</sup>/ca<sup>2+</sup> exchange in regulating cytosolic ca<sup>2+</sup> in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288:C245-252
180. Shu X, Cheng K, Patel N, Chen F, Joseph E, Tsai HJ, Chen JN. Na<sup>+</sup>,k<sup>+</sup>-atpase is essential for embryonic heart development in the zebrafish. *Development*. 2003;130:6165-6173
181. Yuan S, Joseph EM. The small heart mutation reveals novel roles of na<sup>+</sup>/k<sup>+</sup>-atpase in maintaining ventricular cardiomyocyte morphology and viability in zebrafish. *Circ Res*. 2004;95:595-603
182. Lee SH, Yang DK, Choi BY, Lee YH, Kim SY, Jeong D, Hajjar RJ, Park WJ. The transcription factor eya2 prevents pressure overload-induced adverse cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46:596-605
183. Lee SH, Kim J, Ryu JY, Lee S, Yang DK, Jeong D, Kim JM, Hajjar RJ, Park WJ. Transcription coactivator eya2 is a critical regulator of physiological hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:718-726
184. Stiftung B. Wegweiser demographischer wandel 2020. Analysen und handlungskonzepte für städte und gemeinden. 2006
185. Oka T, Komuro I. Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure. *Circ J*. 2008;72 Suppl A:A13-16
186. Li X, Perissi V, Liu F, Rose DW, Rosenfeld MG. Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science*. 2002;297:1180-1183

187. Hauck L, Harms C, An J, Rohne J, Gertz K, Dietz R, Endres M, von Harsdorf R. Protein kinase ck2 links extracellular growth factor signaling with the control of p27(kip1) stability in the heart. *Nat Med.* 2008;14:315-324
188. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254
189. Corporation I. Gateway pentr<sup>tm</sup> dual selection vectors. 2008
190. Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga SI, Ozaki H, Sato S, Kawakami K. Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of eya. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6815-6824
191. Heanue TA, Reshef R, Davis RJ, Mardon G, Oliver G, Tomarev S, Lassar AB, Tabin CJ. Synergistic regulation of vertebrate muscle development by dach2, eya2, and six1, homologs of genes required for drosophila eye formation. *Genes Dev.* 1999;13:3231-3243
192. Berthet C, Kaldis P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. *Oncogene.* 2007;26:4469-4477
193. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(kip1)-deficient mice. *Cell.* 1996;85:733-744
194. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(kip1). *Cell.* 1996;85:721-732
195. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY. Mice lacking p27(kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell.* 1996;85:707-720
196. Li X, Oghi KA, Zhang J, Krones A, Bush KT, Glass CK, Nigam SK, Aggarwal AK, Maas R, Rose DW, Rosenfeld MG. Eya protein phosphatase activity regulates six1-dach-eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature.* 2003;426:247-254
197. Zhu X, Rosenfeld MG. Transcriptional control of precursor proliferation in the early phases of pituitary development. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14:567-574
198. Patrick AN, Schiemann BJ, Yang K, Zhao R, Ford HL. Biochemical and functional characterization of six six1 branchio-oto-renal syndrome mutations. *J Biol Chem.* 2009;284:20781-20790
199. Kirchman D, K'Nees E, Hodson R. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49:599-607
200. Tseng WY, Liao TY, Wang JL. Normal systolic and diastolic functions of the left ventricle and left atrium by cine magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2002;4:443-457
201. Haemers P, Claus P, Willems R. The use of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnostic workup and treatment of atrial fibrillation. *Cardiol Res Pract.* 2012;2012:658937
202. Attili AK, Parish V, Valverde I, Greil G, Baker E, Beerbaum P. Cardiovascular mri in childhood. *Arch Dis Child.* 2011;96:1147-1155



203. Drazner MH, Hamilton MA, Fonarow G, Creaser J, Flavell C, Stevenson LW. Relationship between right and left-sided filling pressures in 1000 patients with advanced heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18:1126-1132
204. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The solvd investigattors. *N Engl J Med*. 1992;327:685-691
205. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The save investigators. *N Engl J Med*. 1992;327:669-677
206. Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K, Videbaek J, Cole DS, Auclert L, Pauly NC. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril cardiac evaluation (trace) study group. *N Engl J Med*. 1995;333:1670-1676
207. Joseph DR. The ratio between the heart-weight and body-weight in various animals. *J Exp Med*. 1908;10:521-528
208. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red fba. *Beitr Pathol*. 1973;150:174-187
209. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-455
210. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Jr., Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: Appreciating the scope of the heart failure epidemic. *Jama*. 2003;289:194-202
211. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Camm AJ, Ellinor PT, Gollob M, Hamilton R, Hershberger RE, Judge DP, Le Marec H, McKenna WJ, Schulze-Bahr E, Semsarian C, Towbin JA, Watkins H, Wilde A, Wolpert C, Zipes DP. Hrs/ehra expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the heart rhythm society (hrs) and the european heart rhythm association (ehra). *Heart Rhythm*. 2011;8:1308-1339
212. Judge DP, Johnson NM. Genetic evaluation of familial cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res*. 2008;1:144-154
213. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 2010;375:752-762
214. Coletta RD, Christensen K, Reichenberger KJ, Lamb J, Micomonaco D, Huang L, Wolf DM, Muller-Tidow C, Golub TR, Kawakami K, Ford HL. The six1 homeoprotein stimulates tumorigenesis by reactivation of cyclin a1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:6478-6483
215. Grifone R, Laclef C, Spitz F, Lopez S, Demignon J, Guidotti JE, Kawakami K, Xu PX, Kelly R, Petrof BJ, Daegelen D, Concordet JP, Maire P. Six1 and eya1 expression can reprogram adult muscle from the slow-twitch phenotype into the fast-twitch phenotype. *Mol Cell Biol*. 2004;24:6253-6267

216. Himeda CL, Ranish JA, Angello JC, Maire P, Aebersold R, Hauschka SD. Quantitative proteomic identification of six4 as the trex-binding factor in the muscle creatine kinase enhancer. *Mol Cell Biol.* 2004;24:2132-2143
217. Nabel EG. Cdks and ckis: Molecular targets for tissue remodelling. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1:587-598
218. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell.* 1994;78:59-66
219. Burton PB, Yacoub MH, Barton PJ. Cyclin-dependent kinase inhibitor expression in human heart failure. A comparison with fetal development. *Eur Heart J.* 1999;20:604-611
220. Litchfield DW. Protein kinase ck2: Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* 2003;369:1-15
221. Li JM, Brooks G. Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997;273:H1358-1367
222. Konecny F, Zou J, Husain M, von Harsdorf R. Post-myocardial infarct p27 fusion protein intravenous delivery averts adverse remodelling and improves heart function and survival in rodents. *Cardiovasc Res.* 2012;94:492-500
223. Li J, Zhang C, Xing Y, Janicki JS, Yamamoto M, Wang XL, Tang DQ, Cui T. Up-regulation of p27(kip1) contributes to nrf2-mediated protection against angiotensin ii-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2011;90:315-324
224. Li J, Ichikawa T, Villacorta L, Janicki JS, Brower GL, Yamamoto M, Cui T. Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1843-1850
225. Kim SS, Zhang RG, Braunstein SE, Joachimiak A, Cvekl A, Hegde RS. Structure of the retinal determination protein dachshund reveals a DNA binding motif. *Structure.* 2002;10:787-795
226. Zhou J, Wang C, Wang Z, Dampier W, Wu K, Casimiro MC, Chepelev I, Popov VM, Quong A, Tozeren A, Zhao K, Lisanti MP, Pestell RG. Attenuation of forkhead signaling by the retinal determination factor dach1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:6864-6869
227. Ikeda K, Watanabe Y, Ohto H, Kawakami K. Molecular interaction and synergistic activation of a promoter by six, eya, and dach proteins mediated through creb binding protein. *Mol Cell Biol.* 2002;22:6759-6766
228. Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhaute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M. A map of the interactome network of the metazoan c. *Elegans.* *Science.* 2004;303:540-543
229. Jakel H, Peschel I, Kunze C, Weigl C, Hengst L. Regulation of p27 (kip1) by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. *Cell Cycle.* 2012;11:1910-1917
230. Kee HJ, Eom GH, Joung H, Shin S, Kim JR, Cho YK, Choe N, Sim BW, Jo D, Jeong MH, Kim KK, Seo JS, Kook H. Activation of histone deacetylase 2 by inducible heat shock protein 70 in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2008;103:1259-1269

231. Eom GH, Cho YK, Ko JH, Shin S, Choe N, Kim Y, Joung H, Kim HS, Nam KI, Kee HJ, Kook H. Casein kinase-2 $\alpha$ 1 induces hypertrophic response by phosphorylation of histone deacetylase 2 s394 and its activation in the heart. *Circulation*. 2011;123:2392-2403
232. Lim MS, Adamson A, Lin Z, Perez-Ordonez B, Jordan RC, Tripp S, Perkins SL, Elenitoba-Johnson KS. Expression of skp2, a p27(kip1) ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: Correlation with p27(kip1) and proliferation index. *Blood*. 2002;100:2950-2956
233. O'Connor OA. Targeting histones and proteasomes: New strategies for the treatment of lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:6429-6436
234. Li R, Wheeler TM, Dai H, Sayeeduddin M, Scardino PT, Frolov A, Ayala GE. Biological correlates of p27 compartmental expression in prostate cancer. *J Urol*. 2006;175:528-532
235. Hidaka T, Hama S, Shrestha P, Saito T, Kajiwara Y, Yamasaki F, Sugiyama K, Kurisu K. The combination of low cytoplasmic and high nuclear expression of p27 predicts a better prognosis in high-grade astrocytoma. *Anticancer Res*. 2009;29:597-603
236. Chen G, Cheng Y, Zhang Z, Martinka M, Li G. Prognostic significance of cytoplasmic p27 expression in human melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:2212-2221
237. Merrill SL, Vaidya A, Pyeritz RE. Ethical challenges of the use of whole exome sequencing in the clinic. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*. 2013;4:58-61
238. Miller SJ, Lan ZD, Hardiman A, Wu J, Kordich JJ, Patmore DM, Hegde RS, Cripe TP, Cancelas JA, Collins MH, Ratner N. Inhibition of eyes absent homolog 4 expression induces malignant peripheral nerve sheath tumor necrosis. *Oncogene*. 2010;29:368-379
239. Zou H, Osborn NK, Harrington JJ, Klatt KK, Molina JR, Burgart LJ, Ahlquist DA. Frequent methylation of eyes absent 4 gene in barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:830-834
240. Osborn NK, Zou H, Molina JR, Lesche R, Lewin J, Lofton-Day C, Klatt KK, Harrington JJ, Burgart LJ, Ahlquist DA. Aberrant methylation of the eyes absent 4 gene in ulcerative colitis-associated dysplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:212-218
241. Schatz P, Distler J, Berlin K, Schuster M. Novel method for high throughput DNA methylation marker evaluation using pna-probe library hybridization and maldi-tof detection. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:e59
242. Kim YH, Lee HC, Kim SY, Yeom YI, Ryu KJ, Min BH, Kim DH, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Rhee JC, Kim HC, Chun HK, Grady WM, Kim YS. Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:2338-2347
243. Soker T, Dalke C, Puk O, Floss T, Becker L, Bolle I, Favor J, Hans W, Holter SM, Horsch M, Kallnik M, Kling E, Moerth C, Schrewe A, Stigloher C, Topp S, Gailus-Durner V, Naton B, Beckers J, Fuchs H, Ivandic B, Klopstock T, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Bally-Cuif L, de Angelis MH, Graw J. Pleiotropic effects in *eya3* knockout mice. *BMC Dev Biol*. 2008;8:118

244. Pandey RN, Rani R, Yeo EJ, Spencer M, Hu S, Lang RA, Hegde RS. The eyes absent phosphatase-transactivator proteins promote proliferation, transformation, migration, and invasion of tumor cells. *Oncogene*. 2010;29:3715-3722
245. Tadjuidje E, Wang TS, Pandey RN, Sumanas S, Lang RA, Hegde RS. The eye tyrosine phosphatase activity is pro-angiogenic and is inhibited by benzobromarone. *PLoS One*. 2012;7:e34806
246. Smith AN, Miller LA, Song N, Taketo MM, Lang RA. The duality of beta-catenin function: A requirement in lens morphogenesis and signaling suppression of lens fate in periocular ectoderm. *Dev Biol*. 2005;285:477-489
247. Zhang L, Yang N, Huang J, Buckanovich RJ, Liang S, Barchetti A, Vezzani C, O'Brien-Jenkins A, Wang J, Ward MR, Courreges MC, Fracchioli S, Medina A, Katsaros D, Weber BL, Coukos G. Transcriptional coactivator drosophila eyes absent homologue 2 is up-regulated in epithelial ovarian cancer and promotes tumor growth. *Cancer Res*. 2005;65:925-932
248. Farabaugh SM, Micalizzi DS, Jedlicka P, Zhao R, Ford HL. Eya2 is required to mediate the pro-metastatic functions of six1 via the induction of tgf-beta signaling, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem cell properties. *Oncogene*. 2012;31:552-562

## 8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
°C	Grad Celcius
μ	mikro
a. u.	arbitrary units
Abb.	Abbildung
ACC	American College of Cardiology
ACE	Angiotensin Convertin Enzyme
AHA	American Heart Association
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ARVC	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATPase	Adenosin-Triphosphatase
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CBP	CREB-binding protein
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	komplementäre DNA
CH <sub>3</sub> COOH	Essigsäure
CK2-α'	Casein Kinase 2

## Abkürzungsverzeichnis

---

cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein
CVD	cardiovascular diseases
Dac	dachshund
Dach	Säugetier-Homolog von dachshund
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdeoxycholat
DpnI	Diplococcus pneumoniae G41
DsRed	rot fluoreszierendes Protein
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E193	Trunkierende EYA4-Mutante
ECL	ElektroChemoLumineszenz
ED	Eya-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EGFP	enhanced GFP
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
ERASH	Endokardialen Radiofrequenzablation der Septumhypertrophie

## Abkürzungsverzeichnis

---

ESC	European Society of Cardiology
EYA	Eyes Absent (human)
Eya	Eyes Absent (nicht human)
Eya 1-4	Eyes Absent Homologe 1-4
eye	eyeless-Gen von <i>Drosophila melanogaster</i>
FCS	foetal calf serum; Fötales Kälberserum
FVB	Friend Leukemia Virus B
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
H1	Histonprotein
H2AX	Histonprotein
H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Humanes Influenza Hämagglutinin
HAD	Haloazid-Dehalogenasen
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HDAC1	Histon Deacetylase 1
HDAC2	Histon Deacetylase 2
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK293	human embryonic kidney 293
HeLa	humane epitheliale Zellen aus einem Cervixkarzinom, Henrietta Lacks, 1951
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HFpEF	Heart Failure with preserved Ejection Fraction
HFrEF	Heart Failure with reduced Ejection Fraction
HNCM	Nicht-obstruktive Form einer hypertrophen Kardiomyopathie
HOcm	Obstruktive Form einer hypertrophen Kardiomyopathie

## Abkürzungsverzeichnis

---

HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
ICD	Implantierbarer Cardioverter-Defibrillator
ICH	Immunhistochemie
IGEPAL	Polyoxyethylen-2-iso-octylphenyl Ether
IgG	Immunglobulin G
INVM	Isolierte ventrikuläre Non-Compaction Kardiomyopathie
JAK2	Janus Kinase 2
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
kB	Kilobyte
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LA	Linkes Atrium
LV	Linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	Molar
MEM	Minimal Essential Medium
MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRI	Magnet Resonanz Imaging
mt-RNA	mitochondriale t-RNA
Na <sup>+</sup>	Natrium
Na <sub>2</sub> EDTA	Dinatrium Ethylendiamintetraacetat



## Abkürzungsverzeichnis

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NFATc	cytosolic Nuklear Factor of Activated T-Cell
NLS	Nukleäre Lokalisierungssequenz
nm	Nanometer
NRCM	Neonatal Rat Cardiomyocytes
Nrf2	Nuclear factor erythroid-2-related factor
ns	nicht signifikant
NTpro-BNP	N-Terminale pro-BNP
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p27 <sup>kip1</sup>	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor p27kip1
PAGE	PolyAcrylamidGelElektrophorese
Pax6	Säugetier-Homolog von toy und eye
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
PIPES	Peperazin-1,4-Ethansulfonsäure
pmol	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRSMC	engl. primary rat smooth muscle cells; Primäre Zellkultur aus glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte
PSEDN	Pax-Six-Eya-Dach-Netzwerk

## Abkürzungsverzeichnis

---

PSR	PicroSirus-Red
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RA	Rechtes Atrium
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RD	Retinal Determination
RIPA	RadioImmunoPrecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SERCA2a	Sarkoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
SGK-1	Glukokortikoid-induzierbare Kinase-1
siRNA	small interfering RNA
Six	Säugetier-Homolog von sine oculis
Six1	Transkriptionsfaktor
Six6	Transkriptionsfaktor
SNHL	Sensorineuraler Hörverlust
So	sine oculis-Gen von <i>Drosophila melanogaster</i>
Strep	Streptomycin
<i>T. cruzi</i>	Trypanosoma cruzi
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermophilus aquaticus
TASH	Transkoronare Ablation der Septumhypertrophie
TCF21	Transkriptionsfaktor Epikardin-21
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Toy	twin of eyeless-Gen von <i>Drosophila melanogaster</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSM	Transaortalen subvalvulären Myektomie
U	Units
UCM	Unklassifizierbare Kardiomyopathien
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation
$\alpha$	alpha; anti (bei Antikörper)
$\alpha$ -MHC	schwere Kette des alpha-Myosin
$\beta$	beta
$\beta$ -MHC	Schwere Kette des beta-Myosin

## Danksagung

„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.“

(Marcus Tullius Cicero, 106-43 v. Chr.)

Besonderer Dank gilt zuerst **Prof. Dr. Oliver Ritter** für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in seiner Forschungsgruppe anfertigen zu können. Des Weiteren für etliche sehr konstruktive Ratschläge und die stete Möglichkeit der Kontaktaufnahme bei etwaigen Fragestellungen, welche prompt beantwortet wurden.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Betreuerin **Dr. rer. nat. Tatjana Williams** für ihr beständiges Engagement und die Geduld, die vor allem zu Anfang nötig war, wenn es darum ging, gewisse Methoden zu erlernen. Trotz ihrer knappen Zeit war sie äußerst bemüht, bei jeglichen Problemen ihren großen Wissensschatz helfend zur Verfügung zu stellen und einen guten Tipp parat zu haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei **Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh** für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der Funktion des Zweitgutachters.

Bei der **Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg** möchte ich mich für die Gewährung eines Stipendiums zur Förderung der Medizinischen Promotion bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bzw. des Labors. Ich kann mich glücklich schätzen, diese mittlerweile als Kollegen bezeichnen zu dürfen:

**Dr. rer. nat. Martin Czolbe** danke ich für die permanente Unterstützung mit guten Ratschlägen und seine stets motivierenden Worte, sowie die vielen humoristischen Unterhaltungen, die in Zeiten gewisser Frustration sehr hilfreich waren.

**Dr. rer. nat. Melanie Mühlfelder** hatte viel Geduld, mir diverse Dinge zu erklären und dennoch die nötige Disziplin, mir als Mediziner die wichtige Aufrechterhaltung der Ordnung im Labor einzuprägen. Für alles vielen Dank!

**Dr. rer. nat. Paula Arias-Loza** danke ich für ihre Geduld und Unterstützung, in diversen Fragen zur Mikroskopie sowie zu Spezialfärbungen, bei denen sie stets hilfreich zur Seite stand.

**Dr. med. Jörn Strasen** und **Dr. med. Lea Seidlmayer** möchte ich herzlichen Dank aussprechen für die informativen Tipps zur medizinischen Promotion im Allgemeinen.

Auch bei **Daniela Kraemer** möchte ich mich für diverse Ratschläge und konstruktive Kritik bei vielen Methoden bedanken. Ebenso gilt mein Dank **Vera Pekarek** und **Silvana Olivarez Florez**.

Ebenso möchte ich mich bei meiner **Familie**, insbesondere bei meiner Mutter, **Jutta Hundertmark**, für den bedingungslosen Rückhalt bedanken. Ohne sie wäre das Studium der Humanmedizin ebenso wenig wie die Entstehung dieser Promotionsarbeit möglich gewesen.

Last but not least möchte ich dir, **Sara**, in jeder erdenklichen Form danken! Du hast mich immer unterstützt und musstest oft die mit nach Hause genommene schlechte Laune ertragen wenn Versuche nicht geklappt haben! Danke, dass du an meiner Seite bist!

## Lebenslauf

### Persönliches

Name Moritz Jens Hundertmark

### Studium

- 07.06.2013 Erteilung der Approbation als Arzt durch die Regierung von Unterfranken
- 29.05.2013 Abschluss des humanmedizinischen Studiums mit Bestehen der ärztlichen Prüfung  
Gesamtnote: 1,66
- 05/2010 - 06/2013 Experimentelle medizinische Promotionsarbeit  
Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie  
Leitung: Prof. Dr. O. Ritter  
Zentrum für Experimentelle und Molekulare Kardiologie,  
Universitätsklinikum Würzburg
- 10/2012 - 01/2013 3. Tertial des Praktischen Jahres: Anästhesiologie  
Universitätsklinikum Würzburg
- 06/2012 - 10/2012 2. Tertial des Praktischen Jahres: Kardiologie  
Schweizer Herz- und Gefäßzentrum, Universitätsspital Bern
- 02/2012 - 10/2012 1. Tertial des Praktischen Jahres: Trauma Surgery  
Chris Hani Baragwanath Academic Hospital  
Soweto, Johannesburg
- 08/2011 - 09/2011 Famulatur: Anästhesiologie  
St. Vinzenz Hospital Coesfeld
- 04/2011 Gewährung des Stipendiums zur Förderung der medizinischen Promotion der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg
- 08/2010 - 09/2010 Famulatur: Kardiologie  
Med. Klinik I, Universitätsklinikum Würzburg
- 03/2010 - 04/2010 Famulatur: Herz-Thoraxchirurgie  
Universitätsklinikum Würzburg
- 02/2010 - 03/2010 Famulatur: Kardiologie  
Herzzentrum des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg
- 09/2009 - 10/2009 Famulatur: Kinderarztpraxis Dr. Meinhard

Coesfeld

### **Ausbildung**

- 10/2005 - 04/2007 Ausbildung zum Rettungsassistenten  
Rettungsschule DRK-Landesverband Münster e.V.,  
Lehrrettungswache DRK-Coesfeld e.V.
- 08/2004 - 05/2005 Zivildienst im Behindertenfahrdienst,  
DRK-Kreisverband Coesfeld e.V.
- 08/2001 - 06/2004 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife,  
Gymnasium Nepomucenum, Coesfeld
- 08/1999 - 06/2001 Erlangen der Fachoberschulreife,  
Theodor-Heuss-Realschule, Coesfeld
- 08/1995 - 06/1999 Bischöfliches St.Pius-Gymnasium, Coesfeld

### **Sprachen**

- Deutsch Muttersprache
- Englisch Fließend in Wort und Schrift
- Französisch Erweiterte Grundkenntnisse

Würzburg, den 18. Dezember 2013

Moritz Jens Hundertmark