
Generierung und Charakterisierung eines *in vivo*
Modells zur BAG3^{P209L}-Mutation im Herzmuskel

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Astrid Ooms

aus Krefeld

Bonn 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Erstgutachter: Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dieter O. Fürst

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2016

Erscheinungsjahr 2017

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2010 bis Dezember 2015 am Institut für Physiologie I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Anleitung von Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann erstellt.

Gewidmet meiner lieben Oma, die 97 Jahre bei uns sein durfte.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Muskulatur	1
1.1.1 Die quergestreifte Muskulatur.....	1
1.1.2 Die Z-Scheibe und ihr molekularer Aufbau	6
1.2 Das Cochaperon BAG3	9
1.2.1 Eigenschaften von BAG3.....	9
1.2.2 Funktionen von BAG3	10
1.2.3 BAG3 als Bestandteil des CASA-Mechanismus	11
1.2.4 Funktionsverlust von BAG3.....	12
1.3 Myofibrilläre Myopathien	13
1.3.1 Pathologische und klinische Merkmale.....	13
1.3.2 Myofibrilläre Myopathie BAG3 ^{P209L}	15
1.4 Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien	19
2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	21
2.3 Geräte	22
2.4 Mikrobiologische Materialien	24
2.4.1 Medien, Puffer und Lösungen	24
2.5 Molekularbiologische Materialien	25
2.5.1 Puffer und Lösungen	25
2.5.2 Plasmide	25
2.5.3 Enzyme.....	26
2.5.4 Oligonukleotide	26
2.5.5 TaqMan®-Sonden	27
2.6 Biochemische Materialien	27
2.6.1 Medien, Puffer und Lösungen	27
2.6.2 Antikörper	28
2.7 Zellbiologische Materialien	29
2.7.1 Medien, Puffer und Lösungen	29
2.7.2 Zelllinien	30

2.7.3 Mauslinien.....	31
2.8 Immunzytochemische Materialien.....	31
2.8.1 Medien, Puffer und Lösungen	31
2.8.2 Antikörper	32
2.8.3 Lektine.....	32
2.9 Mikrobiologische Materialien	33
2.9.1 Sterilisation.....	33
2.9.2 Verwendete Bakterienstämme <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	33
2.9.3 Medium, Anzucht und Lagerung	33
2.9.4 Bestimmung von Zelldichten	34
2.9.5 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen nach der CaCl ₂ -Methode.....	34
2.9.6 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	34
2.10 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.10.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Mini-Präp).....	35
2.10.2 Endotoxin-freie Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
2.10.4 Enzymatische Modifikation von DNA.....	35
2.10.4.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	35
2.10.4.2 Klenow-Auffüllung.....	36
2.10.4.3 Dephosphorylierung von DNA	37
2.10.5 Agarosegelelektrophorese von DNA	37
2.10.6 Extraktion und Reinigung von DNA aus Agarosegelen	38
2.10.7 Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.10.8 Sequenzierung von DNA	38
2.10.9 Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Geweben	38
2.10.10 Isolierung von RNA aus Zellen und Organen	39
2.10.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
2.10.11.1 Qualitative PCR zur Genotypisierung von Mausschwanzbiopsien	40
2.10.11.2 Erststrang-Synthese von komplementärer DNA (RT-PCR).....	40
2.10.11.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	41
2.10.12 Transfektion von Plasmid-DNA in Zelllinien	42
2.10.12.1 Elektroporation von mES-Zellen	42
2.10.12.2 Nukleofektion embryonaler Kardiomyozyten	43
2.10.13 Transduktion von mES-Zellen mit Adeno-assoziierten Viren	43
2.11 Biochemische Methoden	43

2.11.1 Zellaufschluss.....	43
2.11.2 SDS-Gelelektrophorese.....	44
2.11.3 Coomassie-Färbung.....	44
2.11.4 Western Blot mit spezifischen Antikörpern.....	44
2.12 Biophysikalische Methoden.....	45
2.12.1 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung einer DNA-Lösung.....	45
2.12.2 Fluoreszenz-Recovery after Photobleaching (FRAP).....	45
2.12.3 Durchflusszytometrie.....	46
2.13 Zellbiologische Methoden.....	46
2.13.1 Auftauen von Zellen.....	46
2.13.2 Mitotische Inaktivierung und Kultivierung muriner Fibroblasten.....	46
2.13.3 Kultivierung und Passage von mES-Zellen.....	47
2.13.4 Einfrieren von mES-Zellen.....	47
2.13.5 Differenzierung von mES-Zellen.....	48
2.13.6 Dissoziation von EBs.....	48
2.13.7 Karyotypisierung von mES-Zellklonen.....	48
2.14 Immunzytochemische Methoden.....	49
2.14.1 Fixierung von Zellen und Gewebe.....	49
2.14.2 Einfrieren von EBs und Geweben und Anfertigen von Kryoschnitten.....	49
2.14.3 Antigen-Demaskierung für immunzytochemische Färbungen.....	50
2.14.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen und Kryoschnitten.....	50
2.15 Tierexperimentelle Verfahren.....	50
2.15.1 Generierung transgener Mauslinien.....	50
2.15.2 Organentnahme aus adulten Tieren.....	51
2.15.3 Präparation embryonaler Herzen.....	51
2.15.4 Dissoziation von embryonalen Kardiomyozyten aus der Maus.....	51
2.15.5 Fixierung von adulten Herzen durch PFA-Perfusion.....	52
2.15.6 Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten durch Langendorff-Dissoziation.....	52
2.15.7 Kryoläsionen des Herzens.....	53
2.15.8 Linksventrikuläre hämodynamische Messungen mittels eines Katheters.....	53
2.15.9 Ultrastrukturen des Herzens.....	53
2.16 Computeranwendungen.....	53
2.16.1 Computerprogramme.....	53
2.16.2 Datenbanken und Internetprogramme.....	54

2.17 Statistik.....	54
2.18 Durchführung von Experimenten durch andere Experimentatoren	54
3. Ergebnisse	55
3.1 Generierung eines <i>in vitro</i> Modells für die P209L-BAG3opathie mit gewebe-spezifischer BAG3^{P209L}-eGFP-Expression	55
3.1.1. Klonierung der α MHC-Konstrukte zur Expression von BAG3 ^{P209L} -eGFP in Kardiomyozyten	55
3.1.2 Transiente Transfektion von embryonalen Kardiomyozyten.....	57
3.1.3 Stabile Transfektion von mES-Zellen	58
3.1.4 Differenzierung von mES-Zellen in Kardiomyozyten	59
3.1.5 mES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten bilden BAG3 ^{P209L} -eGFP-Aggregate <i>in vitro</i>	62
3.2 Generierung und Charakterisierung transgener Mausmodelle	63
3.2.1 Auswahl geeigneter mES-Zellklone für die Aggregation mit tetraploiden Embryonen ...	64
3.2.2 Analyse der Expression von BAG3 ^{P209L} -eGFP in postnatalen Herzen	65
3.2.3 Heterogenität der BAG3 ^{P209L} -eGFP-Expression in adulten Herzen	67
3.2.4 In Mäusen zeigte nur ein Drittel aller Kardiomyozyten BAG3 ^{P209L} -eGFP-Expression....	69
3.2.5 Bildung von BAG3 ^{P209L} -eGFP-Aggregaten <i>in vivo</i>	70
3.2.6 Zunahme der Aggregatbildung in BAG3 ^{P209L} -eGFP-Kardiomyozyten	72
3.2.7 Veränderte Lokalisation der CASA-Komponenten in Kardiomyozyten mit BAG3 ^{P209L} -eGFP-Expression.....	74
3.2.8 Auflösung des Zytoskeletts in BAG3 ^{P209L} -eGFP-Kardiomyozyten.....	77
3.2.9 Eingeschränkte Mobilität des BAG3 ^{P209L} -eGFP-Proteins.....	79
3.2.10 Mehr endogenes BAG3 vorhanden als BAG3 ^{P209L} -eGFP.....	81
3.2.11 Keine Veränderung der Herzfunktion in BAG3 ^{P209L} -eGFP-Mäusen.....	83
3.2.12 Auflösung der Sarkomerstruktur und Fibrose in BAG3 ^{P209L} -eGFP-Kardiomyozyten....	84
3.3 Generierung eines <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Modells zur konditionalen BAG3^{P209L}-eGFP-Expression.....	85
3.3.1 Klonierung der Konstrukte mit konditionaler BAG3 ^{P209L} -eGFP-Expression	86
3.3.2 Gezielte Integration von BAG ^{P209L} -eGFP ^{fllox} in den <i>Rosa 26</i> -Locus von mES-Zellen	87
3.3.3 Induktion der BAG3 ^{P209L} -Expression <i>in vitro</i>	89
3.3.4 Die BAG3 ^{P209L} -eGFP-Expression <i>in vivo</i> ist im Herzen „undicht“	91
3.3.5 Induktion der BAG3 ^{P209L} -eGFP-Expression in BAG3 ^{P209L} -eGFP ^{fllox} -Mäusen.....	92

4. Diskussion	95
4.1 Generierung eines <i>in-vitro</i>- und <i>in-vivo</i>-Modells der P209L-BAG3opathie.....	95
4.2 Evaluierung des <i>in-vitro</i> Modells in Bezug auf die Z-Scheibenstruktur der Kardiomyozyten.....	95
4.3 Charakterisierung des <i>in vivo</i> Modells der P209L-BAG3opathie	97
4.4. Mögliche Pathomechanismen der P209L-BAG3opathie	104
4.5 Potential als Krankheitsmodell für die P209L-BAG3opathie.....	108
4.6 Perspektive im Hinblick auf klinische Anwendungen	111
5. Zusammenfassung.....	114
6. Literaturverzeichnis.....	116
7. Abkürzungsverzeichnis	116
8. Abbildungsverzeichnis.....	1169
9. Tabellenverzeichnis.....	11641
10. Anhang	142
10.1 Ergänzende Daten	142
10.2 Liste der Publikationen.....	145
10.3 Danksagung	146

1. Einleitung

1.1 Die Muskulatur

Bei der Muskulatur handelt es sich um die kontraktile Organe eines Organismus. Beim Menschen stellt sie in Bezug auf die Masse das größte Organ dar und steuert durch die Abfolge von Kontraktion und Erschlaffung neben willkürlichen Bewegungen auch lebensnotwendige Prozesse wie Herzschlag, Atmung und Darmperistaltik.

Dabei wird die willkürlich beeinflussbare *somatische* Muskulatur (Skelettmuskulatur) von der unwillkürlichen *viszeralen* Muskulatur (glatte Muskulatur und Herzmuskulatur) unterschieden. Bedingt durch morphologische und funktionelle Unterschiede werden Skelett- und Herzmuskulatur der quergestreiften Muskulatur zugeordnet und von der glatten Muskulatur abgegrenzt. Während sich die quergestreifte Muskulatur durch eine Hell-Dunkel-Bänderung auszeichnet (siehe 1.1.1) und schnell unter Verwendung großer ATP-Mengen kontrahiert, weist die glatte Muskulatur keine Bänderung auf und kennzeichnet sich durch eine deutlich langsamere, energieärmere Kontraktion (Alberts *et al.*, 2008). Da der Schwerpunkt in dieser Arbeit auf der quergestreiften Muskulatur (siehe 1.1.1) liegt, wird die glatte Muskulatur im Folgenden nicht weiter thematisiert.

1.1.1 Die quergestreifte Muskulatur

Die Herkunft ihres Namens verdankt die quergestreifte Muskulatur ihrem Erscheinungsbild im Lichtmikroskop. Dort ist zeigt sich eine alternierende Folge heller, anisotroper (doppelbrechender) und dunkler, isotroper (gleichbrechender) Streifen (Abb. 1 A), eine so genannte Hell-Dunkel-Bänderung (Jordan, 1933). Bei genauerer Betrachtung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines histologischen Präparats sind die isotropen Bereiche elektronenärmer und werden als I-Bande bezeichnet, die anisotropen Bereiche sind elektronenreicher und entsprechen der A-Bande. Der in der I-Bande zentral gelegene dunkle, sehr elektronenreiche Streifen wird Z-Scheibe (Rowe, 1971) genannt. Mittig in der A-Bande befindet sich die elektronendichte M-Bande (Knappeis *et al.*, 1968). Deren umgebende Bereiche werden durch die H-Zone gekennzeichnet (Abb. 1 B). Diese Querstreifung ist charakteristisch für Skelett- und Herzmuskulatur und auf die regelmäßige Anordnung bestimmter Strukturen zurück zu führen, auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

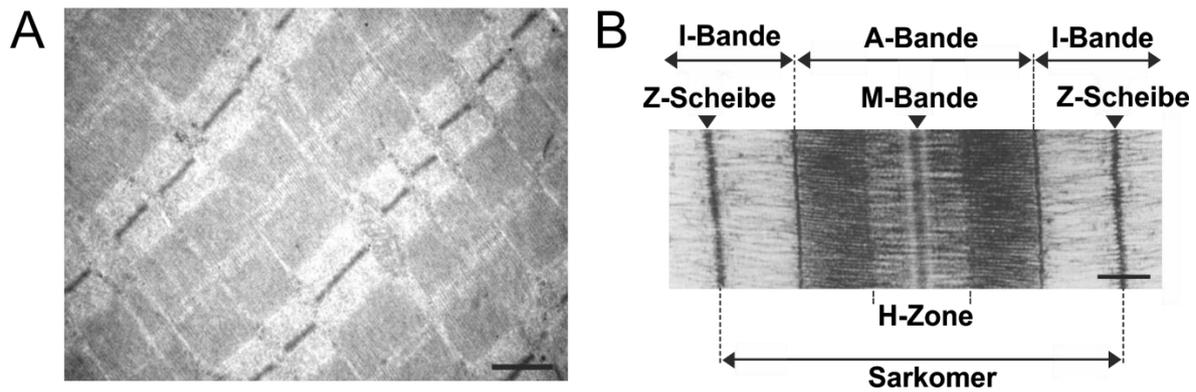


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Skelettmuskels. A. Längsschnitt durch einen Skelettmuskel mit der namensgebenden Hell-Dunkel-Bänderung (modifiziert nach Schmidt *et al.*, 2004). B. Vergrößerte Aufnahme eines Sarkomers, der kleinsten funktionellen Einheit einer Myofibrille. Zu sehen sind die charakteristischen Bereiche wie Z-Scheibe, M-Bande, I-Bande, A-Bande und H-Zone (modifiziert nach Fürst *et al.*, 1988). Maßstab: 500 nm.

1.1.1.1 Die Herzmuskulatur

Das Herz gehört zu den ersten embryonal schon angelegten Organen (Harvey, 2002) und pumpt durch die Abfolge von Kontraktion und Erschlaffung Blut durch den Kreislauf (Harvey, 1628).

Die Myokard, die Muskelschicht des Herzens, besteht aus Kardiomyozyten, die beim Menschen 10-25 μm dick und bis zu 100 μm lang sind (Opie, 2004). Herz- und Skelettmuskulatur haben strukturell und funktionell viel gemeinsam, in einigen wesentlichen Punkten unterscheiden sie sich jedoch Kardiomyozyten fusionieren im Gegensatz zu Myoblasten (siehe 1.1.1.2) während der Embryonalentwicklung nicht, weshalb bspw. beim Menschen im adulten Herzen überwiegend Zellen mit einem Zellkern vorliegen (Olivetti *et al.*, 1996). Eine koordinierte Kontraktion der Kardiomyozyten als funktionelles Synzidium wird durch das Vorliegen besonderer Zell-Zell-Kontakte, den Glanzstreifen, gewährleistet. Diese enthalten *Macula adherens* (Desmosomen) und *gap junctions* (Connexine) (Abb. 2), wodurch eine mechanische und elektrische Kopplung der Zellen untereinander erreicht und eine verzögerungsfreie Erregungsweiterleitung gesichert wird (Franke *et al.*, 2006). Außerdem beinhalten die Glanzstreifen *Fascia adherens* (Adhärenzverbindungen), welche aus Cadherinen und Integrinen bestehen und intrazelluläre Verbindungen zum Aktinzytoskelett aufbauen (Yamada *et al.*, 2005). Der Kontraktionsmechanismus der Herzmuskulatur entspricht generell dem der Skelettmuskulatur, wobei eine Kardiomyozyte 50-100 Myofibrillen bilden (Sanger *et al.*, 2000). Im Herzen wird die Kontraktion jedoch durch einen elektrischen Impuls ausgelöst, der von spezialisierten Kardiomyozyten, den Schrittmacherzellen, generiert wird (Boyett *et al.*, 2007).

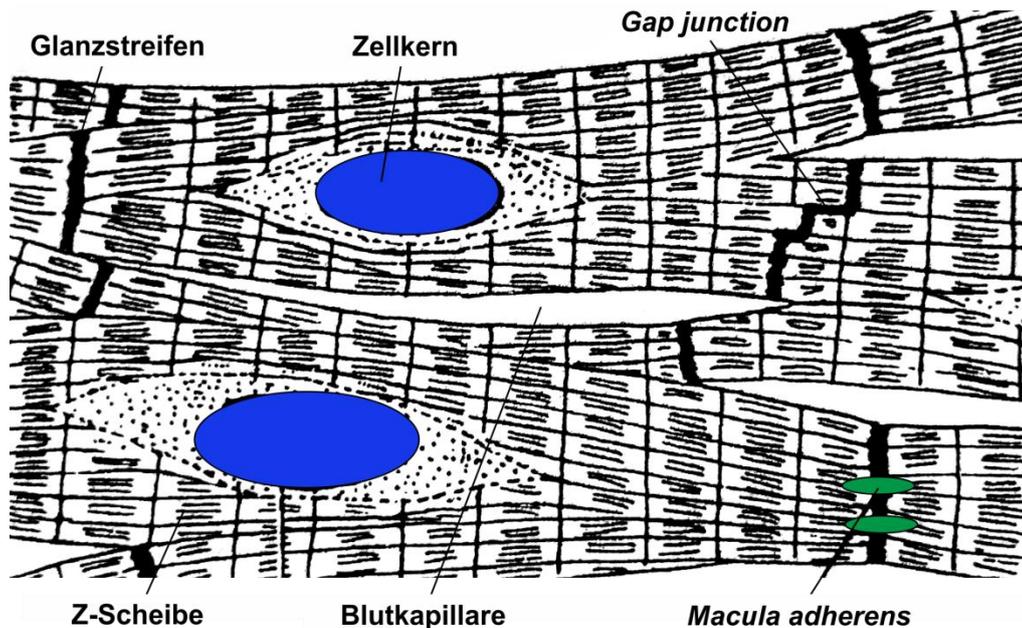


Abb. 2. Schematische Darstellung quergestreifter Herzmuskelzellen. Um ein funktionelles Synzytium zu bilden, sind die einzelnen Kardiomyozyten durch Ganzstreifen miteinander verbunden. Die Glanzstreifen enthalten *macula adherens* und *gap junctions*, die eine mechanische und elektrische Kopplung der Zellen untereinander gewährleisten. Eine Kardiomyozyte setzt sich aus etwa 50-100 Myofibrillen zusammen, welche die Z-Scheiben enthalten (modifiziert nach Schiebler *et al.*, 2009).

1.1.1.2 Die Skelettmuskulatur

Eine Form der quergestreiften Muskulatur ist die Skelettmuskulatur. Bei dieser handelt es sich um diejenigen Muskeln, die durch das *somatische* Nervensystem willkürlich innerviert und durch Sehnen mit dem Knochen verbunden sind. Größtenteils sind dies die Muskeln zur Bewegung von Extremitäten, aber auch des Diaphragmas, der Zunge und des Kehlkopfes (Alberts *et al.*, 2008).

Die Skelettmuskulatur setzt sich aus Bündeln von Muskelfasern (Faserbündel) zusammen, welche beim Menschen eine Länge von bis zu 15 cm erreichen können (Klinke *et al.*, 2009) und sich während der Embryonalentwicklung durch Fusion von Vorläuferzellen, den Myoblasten, entwickeln. Hierbei entstehen vielkernige Myotuben (Synzytien), die zu kontraktile Muskelfasern differenzieren (Parker *et al.*, 2003).

Jede Muskelfaser ist von einer elektrisch erregbaren Membran, dem Sarkolemm, umgeben. Die Verbindung mit Sehnen erfolgt über myotendiöse Übergänge (*myotendinous junctions*, MTJ), wodurch eine Übertragung von Zugkräften möglich ist (Berthie *et al.*, 1997). Eine einzelne Muskelfaser besteht aus hunderten von parallel angeordneten, fadenförmigen Strukturen, den Myofibrillen. Diese sind 1-2 μm dick und stellen die kontraktile Elemente des Muskels dar (Abb. 3). Sie beinhalten eine regelmäßige Anordnung von dünnen und dicken Filamenten, den sogenannten Filamentsystemen. Hierbei stellt das Sarkomer (Abb. 1 und Abb. 4), lateral von zwei Z-Scheiben eingegrenzt, die kleinste kontraktile Einheit des Muskels dar (Clark *et al.*, 2002).

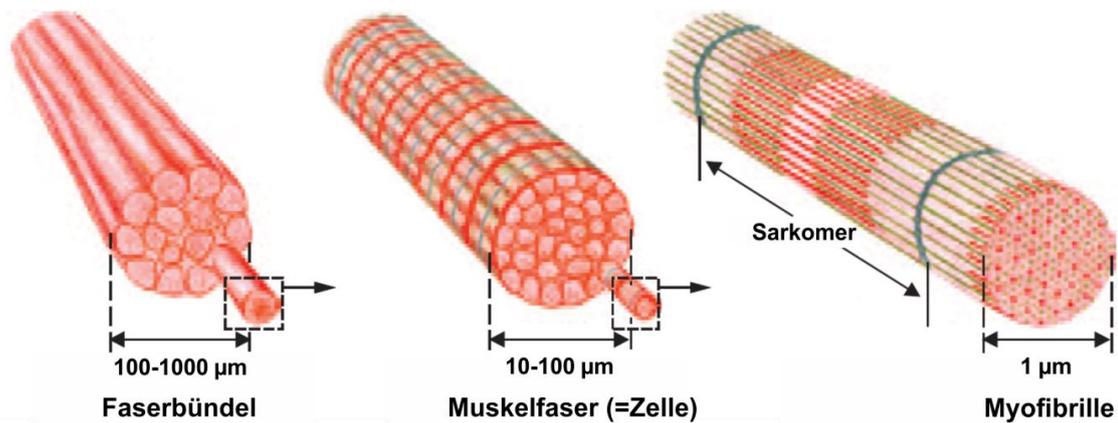


Abb. 3. Schematische Darstellung eines Skelettmuskels. Skelettmuskeln bestehen aus Bündeln von Muskelfasern (Faserbündeln). Jede Muskelfaser stellt eine polynukleäre Muskelzelle dar, die wiederum aus einer Vielzahl von Myofibrillen besteht. Diese setzen sich aus einer regelmäßigen Anordnung von dünnen Aktin- und dicken Myosin-filamenten zusammen, deren kleinste funktionelle Einheit das Sarkomer ist (modifiziert nach Klinke *et al.*, 2009).

Das dünne Filamentsystem wird hauptsächlich von Aktin gebildet, ist in der Z-Scheibe verankert und erstreckt sich über die gesamte I-Bande bis zur Mitte des Sarkomers (Abb. 4). Dabei sind etwa 2000 Aktinfilamente pro Sarkomer an der Z-Scheibe befestigt. Ein Aktinfilament wird von zwei in einander verschlungenen α -Helices gebildet, die mit den Aktin assoziierten Proteinen Tropomyosin und Troponin interagieren (Clark *et al.*, 2002).

Das dicke Filamentsystem, das vom Motorproteine Myosin II gebildet wird, ist in der M-Bande befestigt und erstreckt sich über die gesamte A-Bande (Abb. 4). Ein Myosinfilament setzt sich aus 300 dimeren Myosin II-Molekülen zusammen, wovon jedes zwei globuläre Köpfchen besitzt. Diese sind über biegsame Halsstücke mit dem fadenförmigen Schwanz des Moleküls verknüpft (Klinke *et al.*, 2009), was für bei der Kontraktion der Skelettmuskulatur eine entscheidende Rolle spielt. In der A-Bande überlagern Aktin und Myosin, deshalb erscheint dieser Bereich im Elektronenmikroskop dunkel (Abb. 1).

Das dritte Filamentsystem der quergestreiften Muskulatur wird durch das Protein Titin gebildet (Labeit *et al.*, 1995). Dieses zuerst als Connectin beschriebene Protein (Maruyama *et al.*, 1977) ist in der Z-Scheibe fixiert (Abb. 3) und erstreckt sich bis zu M-Bande (Fürst *et al.*, 1988). Es sorgt für die elastische Verknüpfung von Z-Scheibe und M-Bande (Wang *et al.*, 1979). Der Bereich der I-Bande in der N-Terminalen Region des Titin wirkt dabei wie eine Feder, welche die Elastizität des Sarkomers bestimmt (Linke *et al.*, 1998).

Nebulin stellt das vierte Filamentsystem der quergestreiften Muskulatur des Skelettmuskels dar (Clark *et al.*, 2002). Das Protein ist in der Z-Scheibe befestigt und reicht bis zu den *pointed ends* (depolymerisierende Enden des Aktins) des dünnen Filamentsystems (Millevoi *et al.*, 1998). In der Herzmuskulatur (siehe 1.1.1.1) ist Nebulette, ein mit 107 kDa kleineres Mitglied der Nebulin-Proteinfamilie, exprimiert (Moncman *et al.*, 2002).

Die Z-Scheiben, welche die lateralen Grenzen des Sarkomers definieren, sind wichtige Verankerungspunkte für drei der vier Filamentsysteme (Aktin, Titin und Nebulin). Bedingt hierdurch spielen sie eine essentielle Rolle bei der Übertragung der Kraft, die während der Kontraktion generiert wird (Clark *et al.*, 2002).

Durch Intermediärfilamente werden Strukturen des Zytoskeletts zusammen gehalten und Organellen innerhalb der Zelle fixiert. In quergestreiften Skelettmuskelzellen ist das vorherrschende Intermediärfilament das ~52 kDa schwere Desmin (Lazarides *et al.*, 1980), welches die Z-Scheiben lateral verbindet und die Myofibrillen in das Sarkolemm, den Zellkern und den Mitochondrien einbindet (Clark *et al.*, 2002). Plektine quervernetzen die Intermediärfilamente miteinander (Castañón *et al.*, 2013).

Durch Costamere, welche der Verteilung der Z-Scheiben entsprechen, wird der kontraktile Apparat an das Sarkolemm befestigt (Pardo *et al.*, 1983) und die Strukturintegrität der Membran während der Kontraktion gewährleistet.

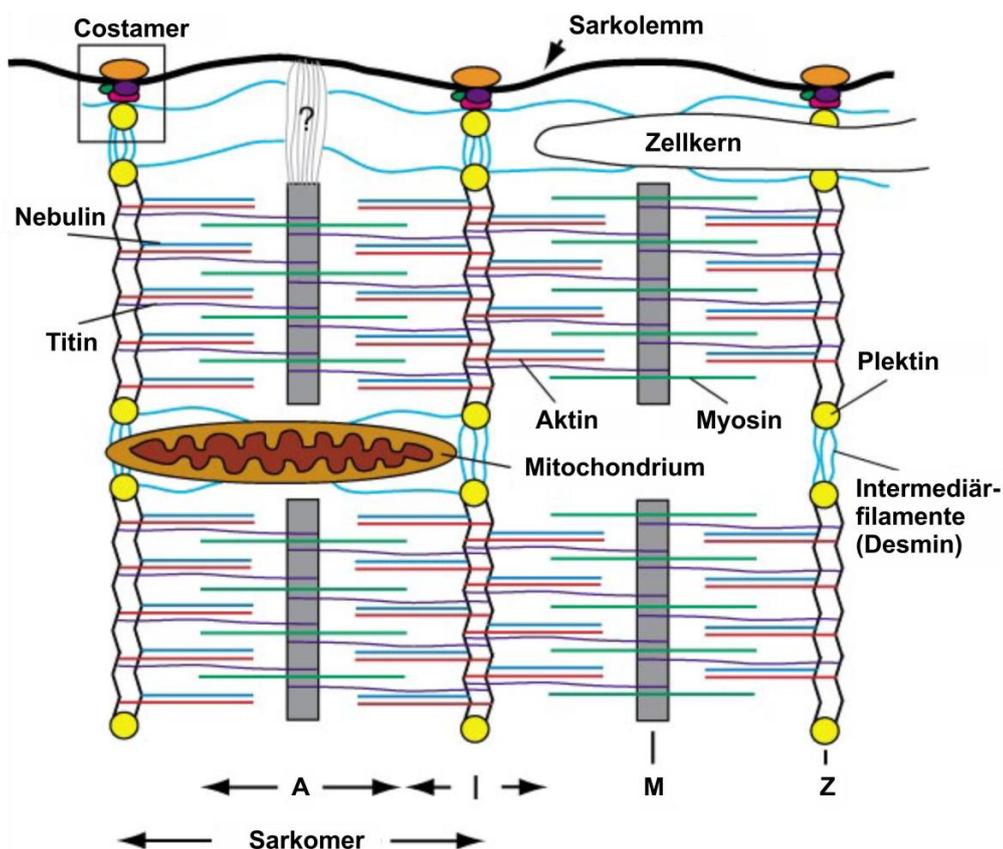


Abb. 4. Molekularer Aufbau eines Sarkomers und seiner Filamentsysteme. Das Sarkomer setzt sich aus parallel angeordneten dünnen Aktinfilamenten zusammen, die in der Z-Scheibe verankert sind. Ebenso parallel angeordnet und an der M-Bande befestigt sind die dicken Myosinfilamente. Titin überspannt beide Filamentsysteme und erstreckt sich von der Z-Scheibe zur M-Bande. Das vierte Filamentsystem, das von Nebulin gebildet wird, ist in der Z-Scheibe befestigt und erstreckt sich bis zu den *pointed ends* des dünnen Filamentsystems. Desmin verbindet die Z-Scheiben lateral und bettet die Myofibrillen in die Zelle ein. Die Fixierung des kontraktile Apparats am Sarkolemm erfolgt über Costamere (modifiziert nach Clark *et al.*, 2002).

1.1.2 Die Z-Scheibe und ihr molekularer Aufbau

Entgegen früherer Vermutungen handelt es sich bei der Z-Scheibe nicht um ein statisches Gebilde zur Verankerung von Filamenten, sondern viel mehr um ein komplexes Netzwerk von Proteinen (Abb. 5), welche an der Z-Scheibe lokalisiert sind (Luther *et al.*, 2009). Durch die Fähigkeit vieler Z-Scheibenproteine in verschiedene Kompartimente, wie bspw. den Nukleus, zu gelangen, können Signale vom Sarkomer in den Zellkern weitergeleitet und Transkriptionsprozesse moduliert werden (Gautel, 2008). Dies macht die Z-Scheibe zu einem hochsensiblen biochemischen Sensor (Hoshijima, 2006) und zu einem wichtigen Knotenpunkt bezüglich Signalübertragung und Krankheit (Frank *et al.*, 2011, Pyle *et al.*, 2004).

Im Folgenden werden nur die Z-Scheibenproteine weiter thematisiert, die im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielen.

α -Aktinin

Das Strukturprotein α -Aktinin (Abb. 5), welches zur Spektrin-Superfamilie gehört, bildet durch seine antiparallele Anordnung in Schichten das Rückgrat der Z-Scheibe. Hierbei bestimmt die Menge an α -Aktininschichten mit ~19 nm die Breite der Z-Scheiben, die in Kardiomyozyten und langsamen Skelettmuskelzellen 100-140 nm beträgt, in schnellen weißen Muskelfasern nur 30-50 nm (Luther *et al.*, 2009).

Die Ultrastruktur des α -Aktinins zeigt eine N-terminale Aktinbindungsdomäne (ABD) gefolgt von vier Spektrin-*Repeats* (ROD-Domänen), die Calmodulin-ähnliche Domäne (CAM-Domäne) befindet sich C-terminal (Davison *et al.*, 1988).

Die ABD der α -Aktininmonomere interagieren miteinander zu Dimeren (Ylänne *et al.*, 2001), welche die Aktinfilamente quervernetzen (Blanchard *et al.*, 1989) und tragen so maßgeblich zum Erhalt der Struktur der Z-Scheiben bei.

Über die CAM-Domäne wird das Riesenmuskelprotein Titin gebunden (Abb. 5), welches an der Lokalisierung des α -Aktinins an der Z-Scheibe mitwirkt (Young *et al.*, 2000). Ebenso ermöglicht diese Domäne eine Interaktion mit den Proteinen Oracle, ZASP und Cypher (Passier *et al.*, 2000, Faulkner *et al.*, 1999, Zhou *et al.*, 1999) (Abb. 5).

Mittels der Spektrin-*Repeats* können die Z-Scheibenproteine FATZ (Faulkner *et al.*, 2000), Calsarcin (Frey *et al.*, 2000), Myozenin (Takada *et al.*, 2001), CapZ (Papa *et al.*, 1999) und Myotilin (Salmikargas *et al.*, 1999) gebunden werden (Abb. 5).

Filamin C

Filamin wurde 1975 erstmals identifiziert (Wang *et al.*, 1975) und liegt in Säugetieren in drei verschiedenen Isoformen vor, Filamin A, B und C (van der Flier *et al.*, 2001). Dabei ist Filamin C

in Zellen der Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert (Thompson *et al.*, 2000), wo das Protein primär in der Z-Scheibe und dem Glanzstreifen lokalisiert ist (van der Ven *et al.*, 2000).

Die Ultrastruktur des Proteins zeigt eine N-terminale ABD (Gardel *et al.*, 2006) gefolgt von 24 Ig-Domänen, von denen die letzte für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich ist (Himmel *et al.*, 2003). Die muskelspezifische Isoform von Filamin C ist durch eine Insertion von 81 Aminosäuren in der 20. Ig-Domäne charakterisiert, wodurch die Positionierung des Proteins an der Z-Scheibe vermittelt wird (van der Ven *et al.*, 2000).

Bekannt sind Interaktionen mit den Proteinen Myotilin (van der Ven *et al.*, 2000), Xin (van der Ven *et al.*, 2006), Myopodin (Linnemann *et al.*, 2010), FATZ/Calsarcin/Myozenin (Frey *et al.*, 2002) und Nebulette (Holmes *et al.*, 2008), welche über die C-terminale Domäne von Filamin C erfolgen. Eine Verbindung zwischen der Membran und dem Aktinzytoskelett wird möglicherweise durch die Interaktion mit dem γ -Sarcoglykan erreicht (Thompson *et al.*, 2000) (Abb. 5).

Zudem übernehmen die Filamine eine wichtige Rolle in Signaltransduktionsprozessen. Dabei kann der C-Terminus des Proteins verschiedene GTPasen der Rho-Familie (Abb. 5) binden und somit indirekt an einem Umbau des Zytoskeletts mitwirken (Bellanger *et al.*, 2000).

Myopodin

Das erstmals 2001 beschriebene Protein Myopodin wird durch das Gen SYNPO2 kodiert (Weins *et al.*, 2011), wobei alternative Spleißvorgänge zu mindestens drei verschiedene Proteinvarianten führen (De Ganck *et al.*, 2008). Das Protein hat in Skelettmuskelzellen eine Größe von 80 kDa, in Kardiomyozyten von 95 kDa und lokalisiert dort an die Z-Scheiben (Weins *et al.*, 2011).

Die molekulare Struktur des Proteins zeigt eine N-terminale PDZ-Domäne, deren Funktion bisher jedoch nicht bekannt ist (De Ganck *et al.*, 2008). Ebenso sind viele PXXP-Motive vorhanden, über die Myopodin mit anderer Proteine interagiert (Abb. 5), zumeist über die WW-Domäne (Kay *et al.*, 2000). Bereits 1999 wurde eine Bindung von „Fesselin“ an Aktin beschrieben (Abb. 5) (Leinweber *et al.*, 1999), bei der das Protein die Nukleation und Polymerisation von F-Aktin stimuliert (Beall *et al.*, 2001). Neun Jahre später wurde „Fesselin“ als Ortholog des Myopodins erkannt (Schroeter *et al.*, 2008). Über eine seiner drei ABD interagiert Myopodin mit dem Z-Scheibenprotein α -Aktinin (Abb. 5) (Linnemann *et al.*, 2010, Takada *et al.*, 2001), die Interaktion mit den IgG-Domänen 19-21 des Filamin C (Abb. 5) findet über die Aminosäuren 240-521 statt (Linnemann *et al.*, 2010). Weitere Bindungspartner des Proteins sind Zyxin (Yu *et al.*, 2006), Calmodulin (Kolakowski *et al.*, 2006) und Myosin (Schroeter *et al.*, 2005) (Abb. 5).

Die Tatsache, dass Myopodin in Myoblasten vorwiegend im Nukleus, in differenzierten Zellen jedoch an den Z-Scheiben lokalisiert ist, lässt vermuten, dass das Protein auch eine wichtige Rolle als Signalprotein zwischen Nukleus und Z-Scheiben einnimmt (Weins *et al.*, 2011).

Titin

Das 3 MDa Riesenmuskelprotein Titin ist als eines der vier Filamentsysteme in der Z-Scheibe verankert (siehe 1.2.1.1). Die 80 kDa große N-terminale Region des Proteins umspannt die ganze Z-Scheibe (Abb. 4). Über die ersten beiden Ig-*Repeats* (Aminosäuren 1-200) erfolgt die Bindung an Telethonin (Zou *et al.*, 2002, Mues *et al.*, 1998), welches ein weiteres Protein der Z-Scheibe ist (Valle *et al.*, 1997) (Abb. 5). Über die Titin-*Repeats* (Aminosäuren 450-750) findet eine Interaktion mit α -Aktinin (Abb. 5) statt, wobei angenommen wird, dass die Anzahl der Titin-*Repeats* die Menge an Vernetzungen des α -Aktinin mit der Z-Scheibe reguliert (Ohtsuka *et al.*, 1997). Zudem konnte eine Interaktion mit Aktin (Linke *et al.*, 1997) und dem ebenso an der Z-Scheibe lokalisiertem Protein Xin nachgewiesen werden (Eulitz *et al.*, 2013). Dies und weitere Studien weisen darauf hin, dass die Assoziation von Titinfilamenten mit Strukturen der Z-Scheiben essentiell ist für die Aufbau der Myofibrillen.

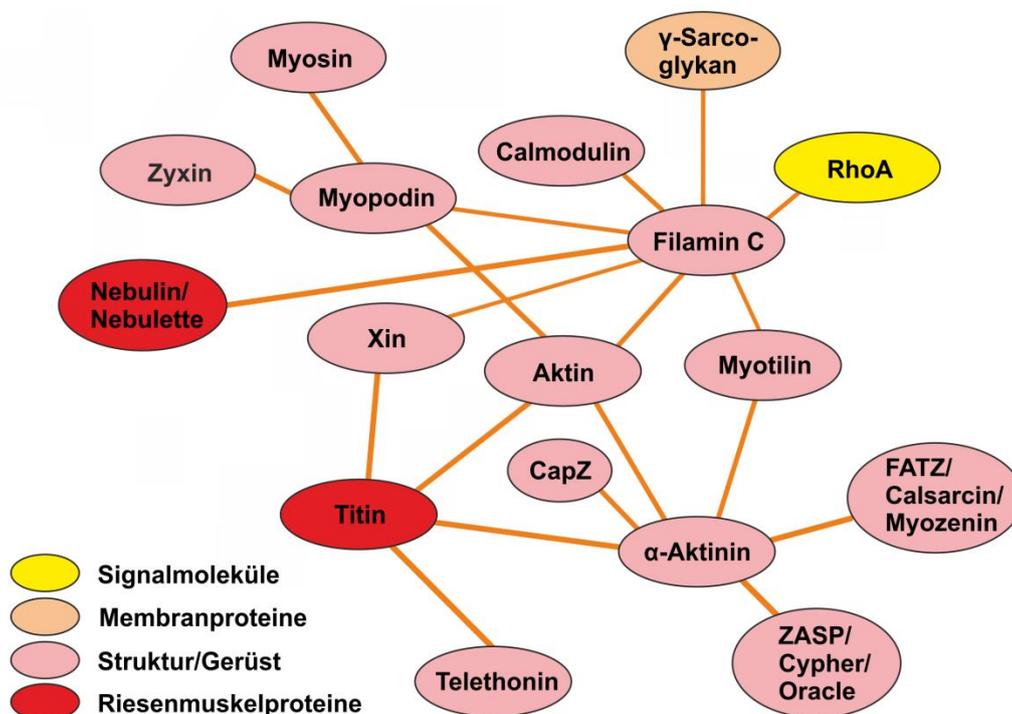


Abb. 5. Schematische Darstellung der Z-Scheibe und ihres molekularen Aufbaus. Die Komplexität der Z-Scheibe stellt ein hoch verflochtenes Netzwerk an Proteinen mit den verschiedensten Funktionen dar, die durch ihre Interaktionen untereinander zur Stabilität der Z-Scheibe beitragen (Lange *et al.*, 2006).

1.2 Das Cochaperon BAG3

Um seine Funktion in der Zelle ausüben zu können, ist die korrekte dreidimensionale Struktur eines Proteins essentiell. Fehlfaltungen von Proteinen führen zu Aggregationen und bilden durch ihre biologische Inaktivität die Hauptursache pathogener Veränderungen wie bspw. der Alzheimer-, Parkinson- oder Huntington-Krankheit (Arndt *et al.*, 2007).

Da Proteine während ihrer Synthese jedoch nicht immer automatisch in ihre native Konformation falten (Höhfeld *et al.*, 2001), wird dieser Prozess durch Chaperone, auch Faltungshelfer genannt, unterstützt (Hartl, 1996). Diese haben die Fähigkeit beschädigte Proteine zu binden und neu zu falten, können aber auch als Proteasen fungieren und den Abbau von Proteine übernehmen. Dabei können sogenannte Cochaperone mitwirken, welche mit den Chaperonen interagieren und deren Aktivität und Substratbeladung bestimmen (Young *et al.*, 2000). Eines dieser Cochaperone ist das Bcl-2-assoziierte Anthanogene 3 (BAG3).

1.2.1 Eigenschaften von BAG3

Im Jahre 1999 als Interaktionspartner des Apoptose-Inhibitors Bcl-2 identifiziert und zunächst als Bis bezeichnet (Lee *et al.*, 1999), konnte BAG3 kurze Zeit später der BAG-Domäne-Proteinfamilie zugeordnet werden (Doong *et al.*, 2000).

Das Protein hat eine Gesamtlänge von 575 Aminosäuren (Abb. 6). Dabei wird die C-terminale BAG-Domäne aus 45 Aminosäuren gebildet und interagiert mit der ATPase-Domäne des Chaperon Hsp70 (Kabbage *et al.*, 2008). Außerdem beinhaltet das Protein eine Prolinreiche PXXP-Domäne (Arndt *et al.*, 2010) sowie mehrere IPV-Motive (Abb. 6), über die es eine Wechselwirkung mit den Chaperonen HspB6 und HspB8 eingehen kann (McCollum *et al.*, 2010). Am N-terminalen Ende der BAG-Domänenstruktur ist eine WW-Domäne lokalisiert (Abb. 6), der eine Interaktion mit Prolinreichen Motiven zugeschrieben wird (Salah *et al.*, 2011). Überdies wurden sieben putative Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C und fünf putative Phosphorylierungsstellen der Casein-Kinase II in BAG3 identifiziert, deren Bedeutung noch unklar sind (Doong *et al.*, 2000).

Das BAG3-Gen ist evolutionär hoch konserviert mit Homologen in Hefen, Invertebraten, Amphibien, Säugern und Pflanzen (Takayama *et al.*, 1999) und nimmt eine vielfältige Rolle in wichtigen zellulären Vorgängen ein. Diese umfasst Funktionen bei der Migration und Adhäsion, Proliferation und Inhibition der Apoptose im Rahmen der Tumorgenese (siehe 1.2.2). Letztlich wird dem Protein eine entscheidende Rolle im Chaperon-assistierte, selektive Autophagie (CASA)-Mechanismus zugeschrieben (siehe 1.2.3). Ein Funktionsverlust von BAG3 in der quergestreiften Muskulatur durch einen *Knockout* des Gens (siehe 1.2.4) oder eine Mutation in diesem (siehe 1.3.2) führt zu einer schweren Myopathie mit Disintegration der Z-Scheiben und früher Letalität.

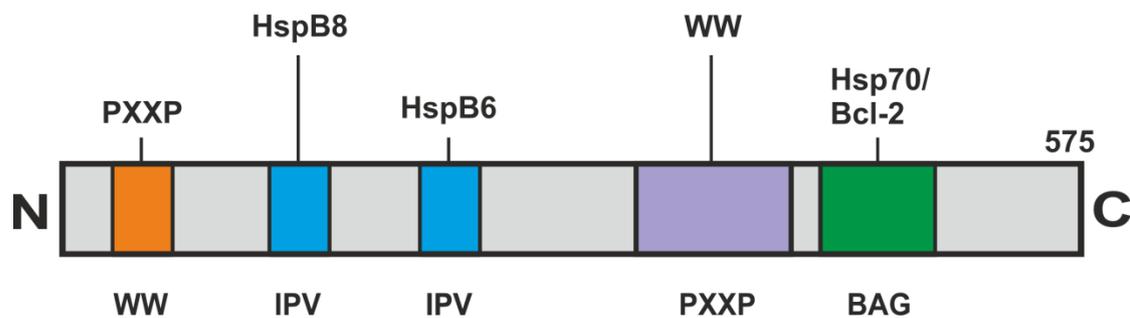


Abb. 6. Molekularer Aufbau der Domänenstruktur von BAG3. Die Domänenstruktur von BAG3 zeigt eine Gesamtproteinlänge von 575 Aminosäuren. Über die C-terminale BAG-Domäne wird die Interaktion mit dem Chaperon Hsp70 bzw. dem Bcl-2 Protein vermittelt. Über die PXXP-Domäne kann eine Interaktion mit WW-Domänen anderer Proteine erfolgen, die Interaktion mit PXXP-Domänen anderer Proteine findet über die N-terminale WW-Domäne statt. Ferner beinhaltet das Protein mehrere IPV-Motive, über die es eine Interaktion mit den Chaperonen HspB6 und HspB8 eingehen kann (modifiziert nach Arndt *et al.*, 2010).

1.2.2 Funktionen von BAG3

Bis *dato* wurden im Maus- bzw. Menschgenom sechs Mitglieder der BAG-Familie identifiziert (Takayama *et al.*, 2001), von denen das BAG3-Gen in Myozyten, primären Tumorzellen oder Tumorzelllinien konstitutiv exprimiert ist (Rosati *et al.*, 2007). BAG3 ist im Zytoplasma lokalisiert und dort hauptsächlich im rauen Endoplasmatischen Retikulum. Als Stressantwort auf bspw. einen Temperaturanstieg, Schwermetallexposition (Pagliuca *et al.*, 2003) oder Serum-mangel (Jung *et al.*, 2010) konnte die Expression aber auch in anderen Zelltypen wie z. B. Leukozyten, Epithel- und Gliazellen induziert werden (Rosati *et al.*, 2011).

Zudem konnte eine BAG3-Expression im Nukleus bei Virus-infizierten Zellen beobachtet werden (Rosati *et al.*, 2011). Dies lässt annehmen, dass das Protein an der Expression von Virusgenen oder der Produktion von Tochterviren beteiligt ist (Kyratsous *et al.*, 2008, Kyratsous *et al.*, 2007).

In diversen Zelltypen wie bspw. epithelialen Brust-, Prostata- und Eierstockkrebszellen führt eine Depletion von BAG3 zu einer verminderter Motilität und Adhäsion der Zellen (Rosati *et al.*, 2011, Suzuki *et al.*, 2011). Hierbei beeinflusst BAG3 die Phosphorylierung der Fokaladhäsionsproteine FAK und Paxillin, wodurch es die Interaktion zwischen FAK und dessen Substrat p130Cas reguliert (Kassis *et al.*, 2006). Eine Depletion des BAG3 in Mausfibroblasten (MEFs) hat einer Verzögerung der Ausbildung von Filopodien und Fokaladhäsionen zur Folge, was über die WW-Domäne des Proteins vermittelt wird (Iwasaki *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu erhöht die Überexpression von BAG3 sowohl in MEFs als auch in epithelialen Zellen der Niere (Cos7) die Motilität der Zellen, wobei das Co-Chaperon die Aktivität der kleinen GTPase Rac1 steigert und so Einfluss auf das Zytoskelett nimmt (Iwasaki *et al.*, 2007).

Interessanterweise ist die BAG3-Expression in zahlreichen Tumorarten wie z. B. Leukämien, Lymphomen, Myelomen oder Neuroblastomen, sowie in Karzinomen des Pankreas, der Schilddrüse, der Brust und der Prostata hochreguliert (Rosati *et al.*, 2011). In Zellen eines oralen

Plattenepithelkarzinoms (OSCC-Tumorzellen) führt eine BAG3-Depletion zu einer verminderten Stressresistenz gegenüber Hitze sowie einer erhöhten Anfälligkeit für Apoptose (Yunoki *et al.*, 2013). In der Lungenkrebszelllinie NSCLC fungiert das Protein als Apoptose-Inhibitor (Zhang *et al.*, 2012). Die molekularen Mechanismen, die diesen zellulären Vorgängen zu Grunde liegen, sind jedoch weitgehend unklar.

1.2.3 BAG3 als Bestandteil des CASA-Mechanismus

Um die Funktionalität des Proteasoms und das Überleben einer Zelle sicher zu stellen, spielt eine Qualitätskontrolle von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum, bestehend aus Erkennen und Abbau fehlgefalteter und defekter Proteine, eine entscheidende Rolle (Hurtley *et al.*, 1989).

Eine Möglichkeit der Eliminierung unerwünschter Proteine, und zugleich der wichtigste intrazelluläre Abbauweg neben dem proteosomalen Proteinabbau, ist der lysosomale Proteinabbau. Bei diesem, auch als Autophagie bezeichneten Vorgang, werden zytoplasmatisches Material, Organellen und Aggregate dem Lysosom zum Abbau zugeführt (Zhang *et al.*, 2015).

Während in allen Zelltypen üblicherweise ein autophagischer Abbau auf einem niedrigen Grundlevel erfolgt, haben Stressreize wie Nährstoffmangel oder Proteinaggregation eine Induktion der Autophagie zur Folge (Levine *et al.*, 2008). Durch Stress in Form von mechanischer Belastung von Knochen oder Muskeln, ist die Autophagie auch im Rahmen der Muskel-Homöostase von physiologischer Bedeutung (King, 2012).

Am Erhalt der Z-Scheibe unter mechanischer Belastung der Muskulatur ist das Cochaperon BAG3 maßgeblich beteiligt. Durch den CASA-Mechanismus können verbrauchte Z-Scheibenproteine dem Lysosom zugeführt und degradiert werden (Arndt *et al.*, 2010). Dabei interagiert BAG3 über seine BAG-Domäne mit Hsc70 (Abb. 7) und über die IPV-Motive mit HspB8 (Abb. 6). Dieser Proteinkomplex kann das Z-Scheibenprotein Filamin binden. Im Folgenden interagieren Hsc70 und HspB8 mit der E3-Ubiquitin-Ligase CHIP (Demand *et al.*, 2001), die das Filamin ubiquitiniert und damit für den Abbau markiert. Gleichzeitig stimuliert BAG3 den autophagischen Ubiquitin-Adapter p62, welcher die Ubiquitinkette von Filamin bindet diese an LC3, einem Marker der Phagophor-Membran, koppelt. Folglich kann Filamin von der Phagophor-Membran eingeschlossen und dem lysosomalen Abbau zugeführt werden (Abb. 7).

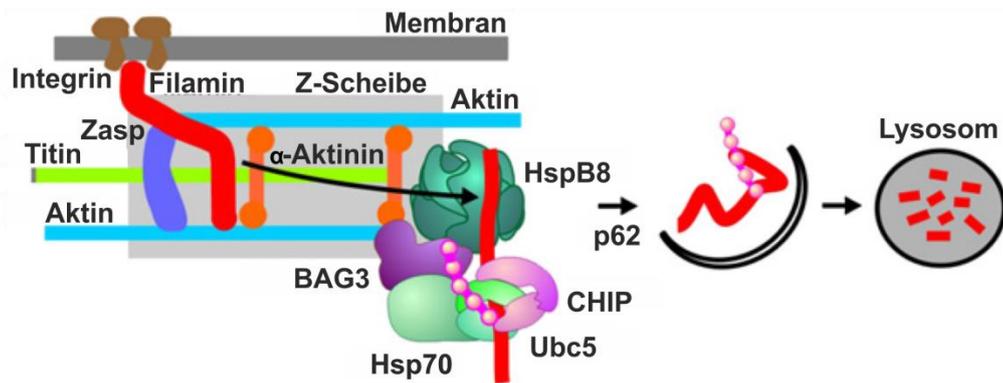


Abb. 7. Schematische Darstellung des CASA-Mechanismus. Durch CASA können verbrauchte Z-Scheibenproteine dem Lysosom zugeführt und degradiert werden. Dabei interagiert BAG3 mit Hsc70 und HspB8. Über die Interaktion mit CHIP wird Filamin ubiquitiniert und so für den Abbau markiert. Das durch BAG3 stimulierte p62 bindet an die Ubiquitinkette von Filamin und koppelt es an LC3, wodurch es letztlich dem lysosomalen Abbau zugeführt wird (modifiziert nach Arndt *et al.*, 2010).

1.2.4 Funktionsverlust von BAG3

In der Skelett- und Herzmuskulatur ist BAG3 konstitutiv exprimiert und lokalisiert dort an die Z-Scheiben (Homma *et al.*, 2006).

Eine Depletion von Starvin, dem Ortholog von BAG3 in Fliegen, hat eine schwere Myopathie mit zur Folge. Während die dabei generierten *starvin*^{-/-} Larven eine normale Muskelentwicklung während der Embryogenese von *Drosophila* zeigen, wird die Beeinträchtigung der Muskelfunktion im Laval-stadium offensichtlich, wenn die Muskeln anfangen zu arbeiten. In den *starvin*^{-/-} Larven äußert sich dies durch die Unfähigkeit Nahrung aufzunehmen, eine Minderung der Lokomotion und einem frühen Tod, ebenso wie eine Disintegration der Z-Scheiben und Delokalisation von Starvin (Arndt *et al.*, 2010, Coulson *et al.*, 2005).

Auch in Mäusen führt ein Funktionsverlust von BAG3 durch eine Depletion des *BAG3*-Gens zu einer schweren Myopathie mit einer nicht-entzündlichen Degeneration der Myofibrillen. Dabei verläuft die Entwicklung der Muskulatur nach der Geburt zunächst normal und die *bag3*^{-/-} Mäuse sind nicht von ihren Wildtyp- oder *bag3*^{+/-} Geschwistertieren zu unterscheiden. Nach der Geburt findet jedoch keine Gewichtszunahme mehr statt und die *bag3*^{-/-} Mäuse erscheinen zwerg-wüchsig (Abb. 8 A). Sie entwickeln eine schwere Myopathie, welche sich durch eine drastische Gewichtsabnahme der Tiere ab Tag 12 nach der Geburt manifestiert (Abb. 8 B). Pathologische Veränderungen sind somit nur in der quergestreiften Muskulatur zu finden und umfassen degenerative Veränderungen und eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Nuklei in Geweben der Skelett- und Herzmuskulatur sowie eine Disintegration der Z-Scheiben und eine Akkumulation von basophilen Abbauprodukten. An Tag 25 nach der Geburt sind alle Tiere verstorben. Somit scheint BAG3 nicht essentiell für die Muskelentwicklung, wohl aber für den Erhalt der Muskulatur unter Belastung zu sein (Homma *et al.*, 2006).

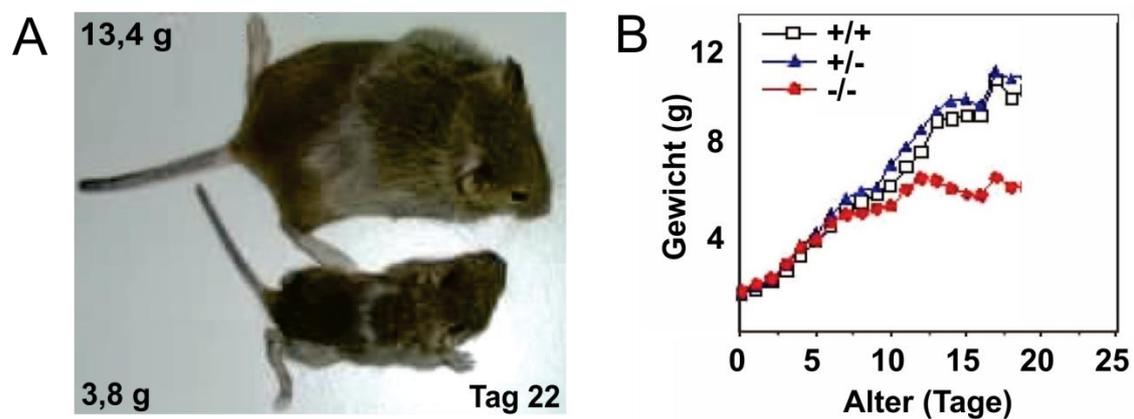


Abb. 8. Funktionsverlust von BAG3 durch Depletion des BAG3-Gens im Mausmodell. **A.** Die *bag3*^{-/-} Mäuse entwickeln sich nach der Geburt zunächst normal, entwickeln jedoch im Laufe ihres Wachstums eine schwere Myopathie und unterscheiden sich an Tag 22 deutlich von ihren Wildtyp-Geschwistertieren. **B.** Wachstumskurven des Körpergewichts von Mäusen machen deutlich, dass die *bag3*^{-/-} Mäuse ab Tag 12 kein Gewicht mehr zulegen (modifiziert nach Homma *et al.*, 2006).

1.3 Myofibrilläre Myopathien

Unter Myofibrillären Myopathien wird eine Gruppe muskulärer Dystrophien der Skelettmuskulatur (siehe 1.1.1.2) mit teilweiser Beteiligung der Herzmuskulatur (siehe 1.1.1.1) zusammengefasst. Die Erkrankung folgt typischerweise einem autosomal dominanten Erbgang, wobei allen Myofibrillären Myopathien eine ähnliche Pathophysiologie (siehe 1.3.1) mit dem Leitsymptom Muskelschwäche zu Grunde liegt. Bisher wurden alle Myofibrillären Myopathien auf Mutationen in den Z-Scheibenproteinen Desmin, Myotolin, $\alpha\beta$ -Crystallin, ZASP, Filamin C und BAG3 (siehe 1.2) zurückgeführt (Selcen *et al.*, 2011).

1.3.1 Pathologische und klinische Merkmale

Das Leitsymptom einer Myofibrillären Myopathie, eine progressive Muskelschwäche, macht sich typischerweise erst in der vierten Lebensdekade bemerkbar. Beginnend in den proximalen Muskeln, breitet sie sich während des Krankheitsverlaufs auf die distalen Muskeln bspw. des Gliedergürtels und des Schulter- und des Brustbereichs aus.

Pathologisch zeichnet sich eine Myofibrilläre Myopathie durch Disintegration von Myofibrillen beginnend an den Z-Scheiben, Akkumulation von Z-Scheibenproteinen und Abbauprodukten und letztlich durch Auflösung der Muskelfibrillen aus (Olivé *et al.*, 2015).

Bei Betrachtung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Muskelbiopsien von Patienten variieren die Muskelfasern hinsichtlich ihrer Größe und Morphologie. Dabei sind atrophe Muskelfasern kleiner, entstehen teilweise durch Aufspaltung existierender Muskelfasern und beinhalten große, blasenförmige Nulei. Ebenso kann die Anzahl nekrotischer Muskelfasern erhöht sein und ein größerer Anteil an Fibrose vorliegen.

Die Disintegration der Myofibrillen beginnt an der Z-Scheibe, was durch ein „Zerfließen“ der Z-Scheibe deutlich wird. Immunhistochemische Studien zeigen eine ektopische Akkumulation von Z-Scheibenproteinen wie Desmin, Myotilin, Dystrophin, Filamin C (siehe 1.1.2) und Aktin in den betroffenen Arealen an den Z-Scheiben, aber auch Co-Chaperone oder Hitzeschockproteine wie bspw. BAG3 (siehe 1.2), $\alpha\beta$ -Crystallin, Hsp27 oder DNAJB2 sind Bestandteile der Aggregate. Interessanterweise ist das Z-Scheibenprotein und Aktin-Quervernetzer α -Aktinin (siehe 1.1.2) niemals in diesen Akkumulationen zu finden (Ferrer *et al.*, 2005).

Zwischen den Myofibrillen sind formlose, körnige, faserartige oder transparente Ablagerungen zu finden, die, ebenso wie die Einlagerung von Fetten und Membranmaterial, charakteristisch sind für eine Myofibrilläre Myopathie. Dort finden sich auch größere Bereiche mit oxidativer Enzymaktivität, welche die Ablagerungen umgeben (Abb. 9 A und B) (Selcen *et al.*, 2011).

Schließlich fallen die betroffenen Sarkomere im Krankheitsverlauf auseinander und sind die Myofibrillen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht länger sichtbar. Zellorganellen sind deplatziert und lokalisieren anstelle „aufgelöster“ Myofibrillen oder liegen in autophagischen Vakuolen vor (Ruparelia *et al.*, 2012). Besonders hervorzuheben sind hier die Mitochondrien, die oft „abnormal“ gestaltet und positioniert sind und in ihrer Anzahl deutlich weniger sind als in gesunden Muskelfasern (Schröder *et al.*, 2009, Konieczny *et al.*, 2008).

Begleitet werden diese Symptome oft durch eine dilatative oder restriktive Kardiomyopathie und eine periphere Neuropathie. Elektronmyographische Messungen betroffener Muskeln, bei denen die Muskelspannung in Ruhe und während einer Kontraktion bestimmt und mittels Muskelaktionspotentialen (MUAPs) dargestellt wird, resultieren in einer verringerten Amplitude und polyphasischen, kürzeren MUAPs.

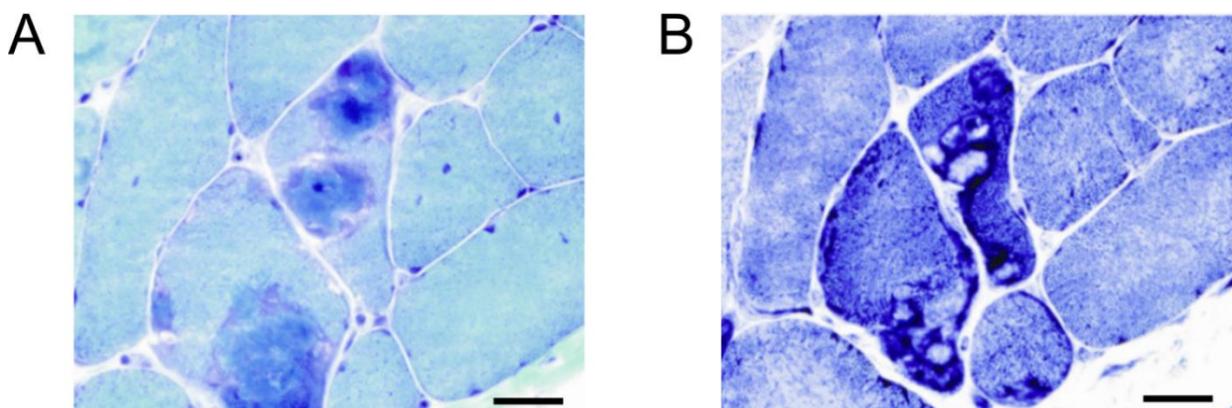


Abb. 9. Charakteristische histologische Befunde in Muskelbiopsien von Patienten mit einer Myofibrillären Myopathie. A. Die Färbung der NADH-Dehydrogenase-Reaktion, welche durch die Kopplung an PAP sichtbar gemacht wurde, zeigt eine erhöhte Aktivität des Enzyms, die die größeren Einlagerungen umgibt. **B.** Die betroffenen Muskelfasern weisen ebenso Ansammlungen von Amyloid auf, die durch eine Kongorot-Färbung detektiert werden können (modifiziert nach Selcen *et al.*, 2011). PAP = Papanicolaou, Maßstab: 20 μ m.

1.3.2 Myofibrilläre Myopathie BAG3^{P209L}

Weltweit sind 5 % der Myofibrillären Myopathien einer Mutation im humanen BAG3-Gen zuzuschreiben. Eine dieser Mutationen, eine spontan auftretende heterozygote Mutation, wurde 2009 identifiziert und führt zu einer schweren Myofibrillären Myopathie, der so genannten P209L-BAG3opathie (Selcen *et al.*, 2011).

Dabei resultiert die Mutation aus einem Austausch der Base Prolin gegen Leucin an Position 209 in Exon 3 (Abb. 10 A) und zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Myofibrillären Myopathien (siehe 1.3.1) durch einen frühen Ausbruch der Krankheit im Kindesalter und einem sehr progressiven Krankheitsverlauf aus (Selcen *et al.*, 2009).

Schon im frühen Kindersalter fallen die Kinder dadurch auf, dass sie auf den Zehen laufen und ihre Muskeln nicht normal belasten können. Klinisch werden die Patienten im Kindealter durch eine Muskelschwäche der Extremitäten, eine Atrophie der Muskeln und ein starres Rückgrat bis hin zu einer Zwerchfellparese und einer schweren Atmungsinsuffizienz mit nächtlicher Beatmung auffällig. Begleitet wird dies durch eine restriktive Kardiomyopathie, wodurch oft schon in der Adoleszenz eine Herztransplantation notwendig wird. Im Einklang damit steht eine bis zu 15 x Erhöhung der Kreatininkinase im Serum. Zusätzlich tritt eine periphere Neuropathie auf, welche sich durch eine Demyelinisierung der Axone äußert (Konersman *et al.*, 2015).

Histologische Aufnahmen von Muskelbiopsien aus Patienten zeigen Aufspaltungen existierender Muskelfasern in kleine Muskelfasern mit kleinen Vakuolen. In zahlreichen Muskelfasern können dabei strukturelle Veränderungen ausgemacht werden, die sich durch die Ansammlung von kleinen, dichten Körnchen, großen, transparenten Ablagerungen oder formloses Material auszeichnen. Umgeben sind diese Ablagerungen von Bereichen mit erhöhter oxidativer Enzymaktivität, die für eine Myofibrilläre Myopathie kennzeichnend sind (siehe 1.3.1). Ebenso kann ein erhöhter Anteil an Nekrose in den betroffenen Muskelfasern sowie ein Anstieg an fibrotischem und fetthaltigem Bindegewebe ausgemacht werden (Selcen *et al.*, 2009).

In elektromikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass minimal betroffene Muskelfasern eine Disintegration der Z-Scheiben (Abb. 10 B) aufweisen, wohingegen in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit eine Akkumulation fragmentierter Filamente, Mitochondrien und Vesikel vorgefunden werden kann (Abb. 10 C).

Immunhistochemische Färbungen betroffener Muskeln weisen eine starke ektopische Expression für BAG3, $\alpha\beta$ -Crystallin, Desmin, Gelsolin, Myotilin, Ubiquitin und Dystrophin auf. Dabei ist BAG3 sowohl an der Z-Scheibe als auch am Sarkolemm lokalisiert (Selcen *et al.*, 2009).

Während die Anzahl an komplett apoptotischen Zellen nur geringfügig erhöht ist, findet sich doch bei 45 % der Zellen eine Veränderung der Chromatinstruktur. Apoptotische Nuklei werden aus dem Zytoplasma ausgestoßen und liegen extrazellulär vor (Selcen *et al.*, 2009).

In vitro Experimente, bei denen FLAG-BAG3^{P209L}-Konstrukte in COS7-Zellen transfiziert wurden, zeigen eine Aggregation des mutierten Proteins im Gegensatz zu mit einem FLAG-BAG3^{WT}-Konstrukt transfizierte Zellen (Selcen *et al.*, 2009).

In einem Zebrafischmodell, bei dem BAG3^{P209L} überexprimiert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Aggregate nicht durch eine Beeinträchtigung der Autophagie ausgelöst wird. Die molekularen Mechanismen, auf denen diese zellulären Vorgängen beruhen, sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Ruparella *et al.*, 2014).

Es sind neun weitere BAG3-Mutationen bekannt, welche spezifisch Kardiomyopathien verursachen, ohne die Skelettmuskulatur zu beeinträchtigen. Umgekehrt treten aber auch Mutationen auf, die nur die Skelettmuskulatur betreffen und keine Kardiomyopathie auslösen (Arimura *et al.*, 2011).

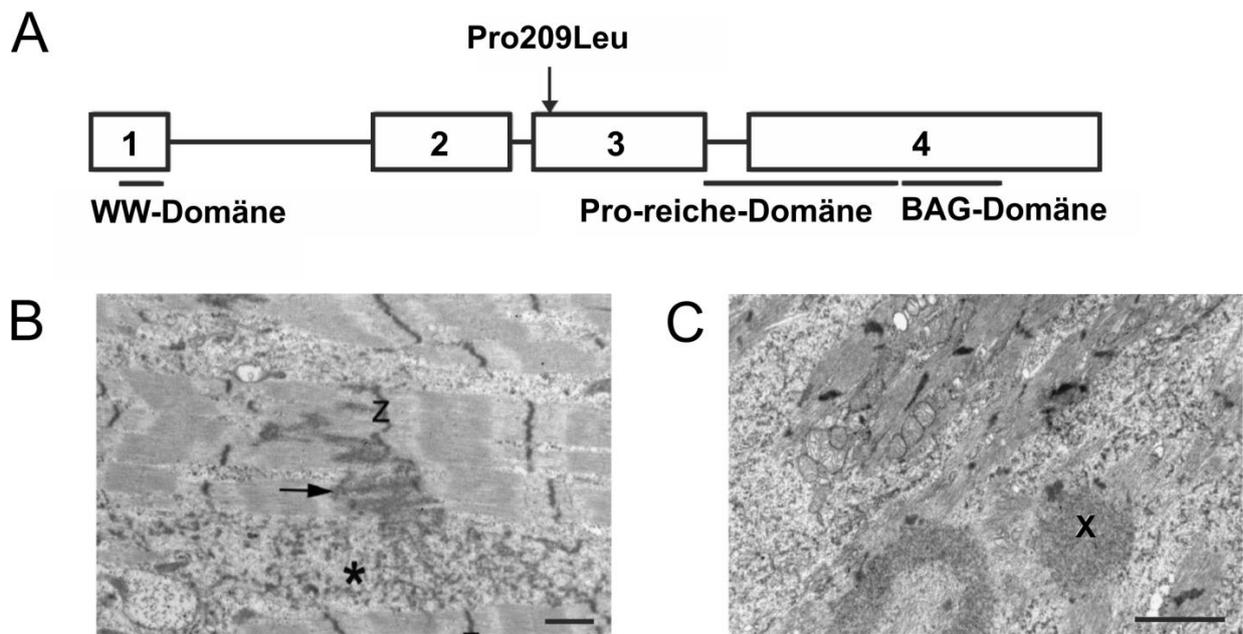


Abb. 10. Durch BAG3^{P209L} Mutation ausgelöste Myofibrilläre Myopathie. A. Domänenstruktur des humanen BAG3-Gens mit der identifizierten BAG3^{P209L}-Mutation an Position 209 in Exon 3. B. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Muskelbiopsie eines Patienten mit „Zerfließen“ der Z-Scheibe (Pfeil) und Akkumulation von dichten Strukturen zwischen den Myofibrillen (*). C. Fortgeschrittenes Stadium mit Disintegration der Z-Scheibe, Myofibrillenauflösung und Aggregation von Abbauprodukten in großen Einlagerungen (X) (modifiziert nach Selcen *et al.*, 2009). Maßstab: 1 μ m (A), 2 μ m (B).

1.4 Zielsetzung

Myofibrilläre Myopathien sind Erkrankungen der Muskulatur. Sie zeigen sich in der Regel erst nach der vierten Lebensdekade und entwickeln sich langsam. Dabei sind weltweit 5 % der Myofibrillären Myopathien einer Mutation im humanen BAG3-Gen zuzuschreiben, einem Cochaperon, welches in Zellen der quergestreiften Muskulatur, also Skelett- und Herzmuskelzellen, an die Z-Scheiben lokalisiert. Im Rahmen des Chaperon-assistierte, selektive Autophagie (CASA)-Mechanismus ist es dort am Erhalt der Z-Scheibe unter mechanischer Belastung der Muskulatur beteiligt und führt verbrauchte Z-Scheibenproteine dem Lysosom zu, damit diese dort degradiert werden können.

Die Myofibrilläre Myopathie, die durch einen spontanen Basenaustausch von Prolin gegen Leucin an Position 209 im BAG3-Gen verursacht wird, die so genannte P209L-BAG3opathie, zeichnet sich dagegen durch einen frühen Ausbruch der Krankheit im Kindesalter aus, beginnend mit einer Muskelschwäche der Extremitäten und einer Atrophie der Muskeln. Die Erkrankung folgt einem sehr progressiven Krankheitsverlauf, unter anderem mit einer selten vorkommenden schweren restriktiven Kardiomyopathie mit einem vermehrten Einbau von Bindegewebe.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen minimal betroffener Muskeln kann eine Disintegration von Z-Scheiben ausgemacht werden, in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit kann eine Aggregatbildung durch Akkumulation fragmentierter Filamente, Mitochondrien und Vesikel beobachtet werden. Außerdem zeigen histologische Aufnahmen eine Aufspaltung betroffener Muskelfasern in kleine Muskelfasern mit kleinen Vakuolen und ein Vorhandensein von transparenten Ablagerungen, welche durch Bereiche mit erhöhter oxidativer Enzymaktivität umgeben sind. Ebenso kann ein erhöhter Anteil an Nekrose in den betroffenen Muskelfasern sowie ein Anstieg an fibrotischem und fetthaltigem Bindegewebe ausgemacht werden.

Warum es zu den diesen pathologischen Veränderungen und der Bildung von Aggregaten kommt und wie diese mechanistisch zu erklären sind, ist bis heute nicht verstanden. Deshalb sind die Aufklärung der Mechanismen, die dieser Krankheit zu Grunde liegen, und die darauf basierende Erforschung möglicher Behandlungsmethoden von großem Interesse.

Da es bis *dato* weder ein *in vitro* noch ein *in vivo* Modell für die Erkrankung gibt, befasst sich diese Arbeit mit der Generierung und Charakterisierung unterschiedlicher transgener BAG3^{P209L}-eGFP-mES-Zelllinien und Mausmodellen.

Hierfür wurden unterschiedliche BAG3^{P209L}-Konstrukte generiert werden, die an einen eGFP-Reporter gekoppelt und deren Proteinprodukt (BAG3^{P209L}-eGFP) untersucht wurde. Hierbei sollte die Expression einerseits unter Kontrolle des Kardiomyozyten-spezifischen α MHC-Promotors

stehen, was eine Untersuchung des Einflusses der BAG3^{P209L}-Mutation auf die Herzmuskulatur und die daraus resultierenden restriktive Kardiomyopathie erlaubt.

Ferner sollte ein weiteres transgenes Mausmodell mit einer induzierbaren ubiquitären BAG3^{P209L}-eGFP-Expression (β -Aktin-Promotor) generiert werden, um die Expression des mutierten Cochaperons auch in der Skelettmuskulatur und in anderen Organen untersuchen zu können. Auch den Krankheitsbeginn und die Progression der Myofibrillären Myopathie können hierbei verfolgt werden. Bei diesem Modell kann die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vitro* durch Applikation einer *Cre*-Rekombinase oder *in vivo* durch Verpaarung mit einem transgenen *Cre*-Mausmodell induziert werden.

Um auszuschließen, dass die alleinige Überexpression des humanen BAG3-Gens in der Maus zu einem Phänotyp führt, sollte ein BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukt als zusätzliche Kontrolle zu der üblichen Wildtypkontrolle verwendet werden. Das BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukt wurde ebenso *in vitro* in stabil, transfizierten, undifferenzierten und differenzierten Stammzellen getestet und *in vivo* zur Generierung eines transgenen Mausmodells verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Adenosinphosphosulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose Standard	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Basic fibroblast growth factor</i> (bFGF)	Life Technologies, Darmstadt
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Butandion-Monoxim (BDM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliantblau R-250	AppliChem, Darmstadt
Demecolcin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC-behandeltes Wasser Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Thermo Scientific, Schwerte
Eindeckmedium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eselserum	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Essigsäure 100 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd-Lösung (Formalin) 4 %	AppliChem, Darmstadt
Fibronektin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FKS) FCS-500	PAN-Biotech, Aidenbach
Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geneticindisulfat (Neomycin, G418)	Life Technologies, Darmstadt
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe

Heparin-Natrium (5000 Injektionseinheiten/ml)	Ratiopharm, Ulm
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hygromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Knockout Dulbecco's Modified Eagle Medium (KO-DMEM)</i>	Life Technolgies, Darmstadt
Kollagenase B	Roche, Mannheim
Laminin	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Leukemia inhibiting factor (LIF), ESGRO</i>	Merck Millipore, Schwalbach
L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Life Technologies, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Life Technologies, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	Life Technologies, Darmstadt
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Puromycin (5 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Taurin	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tissue-Tek [®] O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen a. d. Rijn, Niederlande
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIzol™	Life Technologies, Darmstadt
Trypsin-EDTA 0,05 % (w/v)	Life Technologies, Darmstadt
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	AppliChem, Darmstadt

2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Abstandshalter	Hoefler, Holliston, MA, USA
Blotkassette	Hoefler, Holliston, MA, USA
DNA-Ladepuffer (6x)	Thermo Scientific, Schwerte
DNA-Leiter O´GeneRuler	Thermo Scientific, Schwerte
Elektroporationsküvette (0,2 cm)	Biorad, München
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
FailSafe Pre Mix Selection Kit	Biozym, Hessisch-Oldendorf
FailSafe PCR PreMix E/G/I (2x)	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Fettstift ImmEdge PEN	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Filterpapier	GE Healthcare, Solingen
<i>Freezing container</i> Nalgene® Mr. Frosty	Sigma-Aldrich, Steinheim
Genra Puregene Mouse Tail Kit	Qiagen, Hilden
Gießstand <i>Dual Gel Caster</i>	Hoefler, Holliston, MA, USA
Glasplatten	Hoefler, Holliston, MA, USA
Immersol™ 518F	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kämme	Hoefler, Holliston, MA, USA
Klammern	Hoefler, Holliston, MA, USA
Neon™ Transfection System	Life Technologies, Darmstadt
Nunc™ Kryoröhrchen	Thermo Scientific, Schwerte
Nunc™ <i>Round Bottom Tubes</i>	Thermo Scientific, Schwerte
Objektträger Super Frost	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger Histobond	Marienfeld, Lauda Königshofen
<i>Odyssey BlockingBuffer</i>	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe
Plastikware zur Zellkultivierung	Eppendorf, Wesseling Falcon, Gräfeling-Lochnam Greiner bio-one, Frickenhausen

Probenbehälter aus Plastik zur Kryokonservierung	Vitlab, Großostheim
Protein-Ladepuffer (2x)	Thermo Scientific, Schwerte
Protein-Leiter Page Ruler™ Plus	Thermo Scientific, Schwerte
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Quick & Easy Conditional Knock Out Kit-loxP	Gene Bridges, Heidelberg
Selektionskassette loxP-PGK-gb2-hygro-loxP	Gene Bridges, Heidelberg
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan Gene Expression Master Mix	Life Technologies, Darmstadt
Thoma-Zählkammer	Marienfeld, L. Königshofen
Tissue-Tek® O.C.T. <i>Cryomold</i>	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen a. d. Rijn, Niederlande
Transfermembran Immobilon®-FL	Merck Millipore, Schwalbach

2.3 Geräte

Analysewaage XS 20S <i>Dual Range</i>	Mettler Toledo, Gießen
Antigendemaskierungssystem Histostation	Mikron Instruments, Carlsbad, USA
Bakterienschüttler Excella E24	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Bakterienschüttler <i>Stuart Orbital Incubator SI500</i>	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, Großbritannien
Bunsenbrenner gasprofi 2 scs	WLD-TEC, Arenshausen
Digitalkamera <i>Powershot G5</i>	Canon, Krefeld
Drehrad <i>Mixing Rotor Variospeed</i>	Renner GmbH, Dannstadt
Durchflusszytometer Influx™	Becton-Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammern	Hofer, Holliston, MA, USA Biorad, München
Elektroporationsgerät <i>GenePulser Xcell</i>	Biorad, München
Flockeneismaschine AF-200	Scotsman Industries Inc., Vernon Hills, USA
Fluoreszenz-Gelscanner <i>Universal Hood II</i>	Biorad, München
Gefrierschrank -80°C	Sanyo, München
Geldokumentationssystem <i>Gel-Imager</i>	Intas, Göttingen
Geldokumentationssystem <i>Odyssey infrared imager</i>	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe

Heizblock HLC Biotech	Thermo Scientific, Schwerte
Heizgerät <i>Gene Disc Heat Sealer</i>	Quiagen, Hilden
Homogenisator <i>Tissue Lyser LT</i>	Quiagen, Hilden
Horizontalschüttler Typ 3006	GFL mbH, Großburgwedel
Inkubator BD 240	Binder GmbH, Tuttlingen
Konzentrator <i>SpeedVac Concentrator 5301</i>	Eppendorf, Wesseling
Kryotom CM 3050S	Leica, Solms
Kühlschränke <i>Medline</i>	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Laborautoklav <i>Laboklav 55-195</i>	SHP Steriltechnik AG, Detzel
Laborwaage 440-45	Kern, Balingen
Laser zur Photobleichung 474 nm	Rapp OptoElectronic, Hamburg
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph, Schwabach
Mikroskop <i>Axio Observer 2.1</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert XBO75	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop <i>Cell Observer SD</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskopkamera AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, Oberkochen
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer Smartspec™ 3000	Biorad, München
Pipetten	Gilson Villiers Le Bel, Frankreich
Pipettierhilfe	Eppendorf, Wesseling
Platteninkubator B15	Heraeus, Hanau
qPCR-Gerät <i>Rotor-Gene 6000</i>	Quiagen, Hilden
Reinstwasseranlage	Merck Millipore, Darmstadt
Schüttelrührer	VWR, Darmstadt
Spannungsgeber für Gelelektrophorese	Consort, Turnhout, Belgien
Spatel	VWR, Darmstadt
Stereo-Zoom-Mikroskop AxioZoom.V16	Carl Zeiss, Oberkochen
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
Taumelschüttler RT2S	Fröbel Labortechnik, Lindau
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling
Thermocycler Professional	Biometra, Göttingen
Thermocycler Gradient	Biometra, Göttingen

Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Wesseling
Tischzentrifuge 5424 R	Eppendorf, Wesseling
Transfertank TE22	Hoefer, Holliston, MA, USA
Trockenschrank T20	Heraeus, Hanau
Ultraschallprozessor HP100H	Hielscher, Teltow
UV/VIS-Spektralphotometer Nanodrop® ND-100	Peqlab, Erlangen
Vakuumpumpe BVC Professional	Vacuubrand, Wertheim
Vortexer MiniStar	VWR, Darmstadt
Wasserbad Typ WB 10	PD Industriegesellschaft, Dresden
Zentrifuge Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Stuttgart
Zellinkubator HERAcell 240	Heraeus, Hanau

2.4 Mikrobiologische Materialien

2.4.1 Medien, Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin in Reinstwasser 100 µg/ml Arbeitskonzentration
CaCl ₂ -Lösung	10 mM PIPES-NaOH 50 mM CaCl ₂ 15 % (w/v) Glycerin pH 7,0
FSB-Puffer (1x)	10 mM KOH 1,1 M Glycerin 45 mM CaCl ₂ 100 mM KCl pH 6,3
Hygromycin-Stammlösung	50 mg/ml Hygromycin in Reinstwasser 50 µg/ml Arbeitskonzentration
Kanamycin-Stammlösung	30 mg/ml Kanamycin in Reinstwasser 50 µg/ml Arbeitskonzentration
LB-Agar-Platten	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v) 1,5 % Agar-Agar (w/v)

LB-Medium (1x)	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v)
SOB-Medium (1x)	2 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v) 10 mM NaCl 2,5 mM KCl pH 7,0 autoklaviert
Tetrazyklin-Stammlösung	10 mg/ml Tetrazyklin in Reinstwasser 10 µg/ml Arbeitskonzentration

2.5 Molekularbiologische Materialien

2.5.1 Puffer und Lösungen

Tris-Acetat-EDTA (TAE) Laufpuffer (1x)	40 mM Tris-Base 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7,6
Puffer 1	15 mM Tris-Base 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH 8,0
Puffer 2	200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)
Puffer 3	3 M Kaliumacetat pH 5,5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0

2.5.2 Plasmide

Die nachfolgend aufgeführten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet (siehe Tab. 1).

Tab. 1. Bezeichnung verwendeter Plasmide.

Bezeichnung	Hersteller
pcDNA TM 3.1 ⁽⁺⁾ BAG3	Anna Ulbricht, Bonn
pTYB12-BAG3 ^{P209L}	Anna Ulbricht, Bonn
pCIG2	Carol Schuurmans, Calgary, Kanada
pEGFP-1	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Life Technologies, Darmstadt
αMHC-eGFP	Caroline Geisen, Bonn

2.5.3 Enzyme

Die nachfolgend aufgeführten Enzyme wurden in den zugehörigen Puffern verwendet.

<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>	Thermo Scientific, Schwerte
Klenow-Fragment	Thermo Scientific, Schwerte
Proteinase K	Quiagen, Hilden
RNase A	Quiagen, Hilden
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific, Schwerte
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Life Technologies, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Thermo Scientific, Schwerte

2.5.4 Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies, Darmstadt bezogen (siehe Tab. 2 und Fortsetzung Tab. 2).

Tab. 2. Bezeichnungen und Sequenzen verwendeter Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Geno_BAG3for	ATGAACTCCAGCCCAGCAAC
Geno_BAG3rev	CCGCTTTACTTGTACAGCTC
Geno_floxfor	TTCGGCTTCTGGCGTGTGAC
Geno_floxrev	GCACAGGAATGGGAATGTAG
Geno_PGKfor	GCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCC
Geno_PGKrev	TCCATGAGTGAACGAACCTGGTCCG
<i>loxP</i> -Hygrofor	CTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCA TTTTGGAATTAACCCTCACTAAAGGGCGGCCGC
<i>loxP</i> -Hygrorev	CCGTTGCCGGACGCCACCTGCATCATGGGCGAGTGGGTGGCGG CGTCATATTATGCTGAGTGATATCCCGAGCTC
Rosa26_5'for	GACGTCTCGTCGCTGATTGG
Rosa26_5'rev	CGGGCCATTTACCGTCATTG
Rosa26_3'for	CAGGACATAGCGTTGGCTAC
Rosa26_3'rev	GGAGACATCCACCTGGAAAC
Seq_BAG3for	ATCAAGATCGACCCGCAGAC
Seq_BAG3for2	TCTGACTGCTCATCCTCATC
Seq_BAG3for3	TCAAGTGATCCGCAAAGAGG
Seq_BAG3for4	ATGAACTCCAGCCCAGCAAC
Seq_BAG3rev	TAGTGGTGCGGCTGTTGTGG
Seq_BAG3rev2	GCACAGGAATGGGAATGTAG
Seq_BAG3rev3	AGTGCGTCTTCTGGGCTTGG
Seq_BAG3rev4	TCTCTTCTGTAGCCCACTC
Seq_CAGfor	TTCGGCTTCTGGCGTGTGAC
Seq_CAGrev	CCTATTGGCGTACTATGGG
Seq_EGFPfor	AGCAGAAGAACGGCATCAAG
Seq_EGFPrev	TTCAGCTCGATGCGGTTCCAC

Fortsetzung Tab. 2. Bezeichnungen und Sequenzen verwendeter Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Seq_Hygrofor	GCTTGGTTGACGGCAATTTC
Seq_Hygrorev	CGCCATGTAGTGTATTGACC
Seq_Neofor	GTTTCGCATGATTGAACAAG
Seq_Neorev	GCTCAGAAGAAGCTCGTCAAG
Seq_MHCfor	CTGTGGTCCACATTCTTCAG
Seq_MHCrev	CTTCACGGGCACCCTTAGAG
Seq_pAfor	AGGGGGAGGCTAACTGAAAC
Seq_pArev	TGAGTAACCTGAGGCTATGG

2.5.5 TaqMan®-Sonden

Die nachfolgend aufgeführten TaqMan®-Sonden wurden von der Firma Life Technologies, Darmstadt bezogen (siehe Tab. 3).

Tab. 3. Verwendete TaqMan®-Sonden.

Bezeichnung	Reporter	Hersteller
Humanes BAG3	FAM-MGB	Life Technologies, Darmstadt
eGFP	FAM-MGB	Life Technologies, Darmstadt
18 rRNA	VIC-MGB	Life Technologies, Darmstadt
TfrC	VIC-MGB	Life Technologies, Darmstadt

2.6 Biochemische Materialien

2.6.1 Medien, Puffer und Lösungen

Ammoniumperoxidsulfat (APS)	20 % (w/v)
Coomassie-Färbelösung	0,01 % Coomassie G250 (w/v) 20 % Essigsäure (v/v) 50 % Methanol (v/v)
Entfärbelösung	10 % Essigsäure (v/v) 5 % Methanol (v/v)
Sammelgelpuffer (1x)	31,25 mM Tris-HCl 0,2 % SDS (w/v) pH 6,8
SDS-Laufpuffer nach Lämmli (1x)	2,5 mM Tris-HCl 25 mM Glycin (v/v) 0,01 % SDS (w/v) pH 8,8

SDS-Probenpuffer (1x)	12 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 6 % Glycerin (w/v) 1,5 % β -Mercaptoethanol (w/v) 3 % SDS (w/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v) pH 6,8
TBS-T (1x)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,05 % Tween-20 (w/v) pH 7,9
Trenngelpuffer (1x)	94 mM Tris-HCl 0,2 % SDS (w/v) pH 8,8
Tankblotpuffer (1x)	2,5 mM Tris-HCl 19,2 mM Glycin 0,2 % Methanol 0,001% SDS pH 8,4

2.6.2 Antikörper

Western Blot Analysen (2.11.4) wurden mittels der nachfolgenden Primär- und Sekundärantikörper in den angegebenen Verdünnungen durchgeführt (siehe Tab. 4 und 5).

Tab. 4. Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen.

Epitop	Isotyp	Quelle	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
BAG3	IgG	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Proteintech, Manchester, Großbritannien
GAPDH	IgG	Maus	polyklonal	1:10000	Merck Millipore, Schwalbach

Tab. 5. Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen.

Sekundärer Antikörper	Isotyp	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Odyssey IRDye® 800 nm	Ziege	Kaninchen	1:10000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg auf der Höhe
Odyssey IRDye® 800 nm	Ziege	Ratte	1:10000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg auf der Höhe
Odyssey IRDye® 800 nm	Ziege	Maus	1:10000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg auf der Höhe

2.7 Zellbiologische Materialien

2.7.1 Medien, Puffer und Lösungen

Kultivierung muriner Fibroblasten

Dulbecco's Modified Eagle Serum (DMEM)	Zusätze: 15 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β -Mercaptoethanol
--	---

Kultivierung muriner ES-Zellen (G4)

Knockout Dulbecco's Modified Eagle Serum (KO-DMEM)	Zusätze: 15 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 2 mM L-Glutamin 0,1 mM β -Mercaptoethanol
--	--

Differenzierungsmedium muriner ES-Zellen (G4)/muriner embryonaler Kardiomyozyten

Iscove's Modified Eagle Medium (IMDM)	Zusätze: 20 % FKS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β -Mercaptoethanol
BDM-Lösung	500 mM BDM in Ca^{2+} -freier Tyrode
Ca^{2+} -freie Tyrode	13,5 mM NaCl 0,4 mM KCl 0,1 mM MgCl_2 0,25 mM HEPES
Einfriermedium	80 % FKS (v/v) 20 % DMSO (v/v)
Enzym-Lösung	25 ml Collagenase B (w/v) 1 mg Trypsin (w/v) 50 µM CaCl_2
Fibronectin-Lösung (0,01%)	1 µl Fibronectin-Stammlösung (v/v) 99 µl PBS

Gelatine-Lösung (0,01%)	100 mg Gelatine 100 ml PBS
Kollagenase B-Lösung	10 mg/ml Kollagenase B 10 mM CaCl ₂ in Niedrig-Calcium-Lösung
Laminin-Lösung (0,01%)	1 µl Laminin-Stammlösung (100 %) in 99 µl PBS
LIF	1 µl LIF-Stammlösung (10000U) in 1 ml DMEM
Neomycin (G418)	300 mg/ml Neomycin in DMEM 165 µg/ml Arbeitskonzentration
Niedrig-Calcium-Lösung	120 mM NaCl 5,4 mM KCl 5 mM Magnesiumsulfat 5 mM Natriumpyruvat 20 mM Taurin 10 mM Hepes 20 mM Glucose pH 6,9
Stopp-Lösung	13,5 mM NaCl 0,4 mM KCl 0,1 mM MgCl ₂ 0,25 mM HEPES 5 % FKS (v/v) 25 mM BDM 50 µM CaCl ₂ pH 7,4

2.7.2 Zelllinien

Murine ES-Zellen (G4)

Bei den murinen ES-Zellen handelt es sich um eine Hybridlinie mit SV129/BL6 genetischem Mischhintergrund (George *et al.*, 2007).

Murine embryonale Fibroblasten

Die Kultivierung von murinen ES-Zellen erfolgte auf PMEF-NL primären embryonalen Fibroblasten, die eine Neomycinresistenz und einen FVB genetischen Hintergrund aufweisen und an Tag 13 der Mausentwicklung aus Mausembryonen isoliert wurden (Merck Millipore, Darmstadt). Durch eine Behandlung mit γ -Strahlung (15 Gy, Dosisrate 2-3) wurde eine Inaktivierung der mitotischen Aktivität erreicht (Michaelska, 2007, Corner, 2001).

2.7.3 Mauslinien

α MHC-BAG3^{WT}-eGFP

Die α MHC-BAG3^{WT}-eGFP Mauslinie wurde durch eine Aggregation mit diploiden Embryonen (siehe 2.13.11) generiert. Sie basiert auf dem G4 α MHC-BAG3^{WT}-eGFP ES-Zell-Klon 5. Durch quantitative Echtzeit-PCR (siehe 2.10.11.3) konnte die Kopienzahl des Transgens im Genom dieser Mauslinie auf 18 festgelegt werden.

α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP

Diese Mauslinie wurde durch eine Aggregation mit diploiden Embryonen (siehe 2.13.11) aus mES-Zellen des G4 α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP Klon 2 generiert. Das Genom dieser Mauslinie weist 32 Integrationen des Transgens auf, welches durch quantitative Echtzeit-PCR (siehe 2.10.11.3) bestimmt wurde.

CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{flox}

Die CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{flox} Mauslinie wurde durch eine Aggregation mit diploiden Embryonen (siehe 2.13.11) generiert und basiert auf dem G4 α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP mES-Zell-Klon 3. Das Transgen ist im *Rosa26* Locus integriert (Zambrowicz *et al.*, 1997), es liegt also nur eine Kopie im Genom dieser Mauslinie vor. Ein Nachweis wurde durch eine quantitative Echtzeit-PCR (siehe 2.10.11.3) erbracht.

PGK-CreCAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{flox}

Die transgene PGK-CreCAG-BAG3^{P209L}eGFP^{flox} Nachkommen wurden durch Verpaarung eines transgenen hemizygoten PGK-Cre Männchens mit einem transgenen hemizygoten CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{flox} Weibchen erzeugt. Die PGK-Cre positiven Männchen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Willeke zur Verfügung gestellt.

2.8 Immunzytochemische Materialien

2.8.1 Medien, Puffer und Lösungen

Esel-Serum (5 %)	5 μ l Esel-Serum 95 μ l PBS
Hoechst-Lösung	1 ml Hoechst-Lösung 33342 999 ml PBS
Natriumcitratpuffer (0,01 M)	2,94 g Natriumcitrat 1000 ml Reinstwasser pH 6,0 mit HCl einstellen

Paraformaldehyd (4 %)	4 g PFA 100 ml Reinstwasser Klärung durch NaOH und Wärme pH 7,4 mit NaOH einstellen
Triton-X-100-Lösung (0,2 %)	100 µl Triton-X-100 49,9 ml PBS

2.8.2 Antikörper

Immunzytochemische Färbungen wurden mittels der nachfolgenden Primär- und Sekundärantikörper in den angegebenen Verdünnungen durchgeführt (siehe Tab. 6 und 7).

Tab. 6. Verwendete Primärantikörper für immunzytochemische Färbungen.

Epitop	Isotyp	Quelle	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
α -Aktinin EA-53	IgG1	Maus	polyklonal	1:400	Sigma-Aldrich, Steinheim
BAG3	IgG	Kaninchen	polyklonal	1:400	Proteintech, Manchester, Großbritannien
Filamin C	IgG	Kaninchen	polyklonal	1:100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Myopodin	IgG	Kaninchen	polyklonal	1:400	Sigma-Aldrich, Steinheim
Titin T12	IgG	Maus	polyklonal	1:15	AG Fürst, Bonn
Desmin	IgG	Kaninchen	polyklonal	1:100	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg

Tab. 7. Verwendete Sekundärantikörper für immunzytochemische Färbungen.

Sekundärer Antikörper	Isotyp	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen IgG	Esel	Cy3	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Ratte IgG	Esel	Cy3	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Maus IgG1	Esel	Cy5	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Kaninchen IgG	Esel	Cy5	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien

2.8.3 Lektine

Folgende direkt Fluorophor-gekoppelte Lektine von Vector Laboratories, Peterborough, UK wurden verwendet:

Rhodamin gekoppeltes Weizensamen-Agglutinin (*Wheat Germ Agglutinine*).

2.9 Mikrobiologische Materialien

2.9.1 Sterilisation

Die Sterilisation der verwendeten Nährmedien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien erfolgte durch Dampfsterilisation für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck. Thermolabile Lösungen wurden durch Filtration mit Hilfe eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilisiert.

2.9.2 Verwendete Bakterienstämme *Escherichia coli* (*E. coli*)

Die folgenden *E. coli* Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit verwendet und von den unten stehenden Herstellern bezogen (siehe Tab. 8).

Tab. 8. Verwendete *E. coli* Bakterienstämme und Hersteller.

<i>E. coli</i> Bakterienstamm	Hersteller
One Shot® Mach1™-T1 ^R (ATCC #9637, S. A. Waksman)	Life Technologies, Darmstadt
One Shot® BL21(DE3)	Life Technologies, Darmstadt
One Shot® TOP-10	Life Technologies, Darmstadt

2.9.3 Medium, Anzucht und Lagerung

Sofern nicht anders erwähnt, orientierten sich die Methoden an Sambrook *et al.*, 1989.

Medium

Für die Anzucht von *E. coli* wurde das unter 2.4.1 aufgeführte LB-Medium (Bertani, 1951) verwendet.

Anzucht

Für die Kultivierung auf Festmedium wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt. Flüssigkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten oder mit Zellen aus einer Glycerinkultur angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden üN auf einem Schüttler inkubiert (300 rpm, 37 °C). Die Kultivierung auf LB-Agar-Platten im Brutschrank erfolgte ebenfalls üN bei 37 °C. Durch Zugabe von Antibiotika konnten die Bakterien selektioniert werden, die das gewünschte Plasmid trugen.

Lagerung

Für eine kurzzeitige Lagerung der Bakterienkulturen wurden Flüssigkulturen auf LB-Agar-Platten mit entsprechender Antibiotikakonzentration überimpft, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung wurden Glycerinkulturen

angelegt. Dazu wurden 600 µl einer üN gewachsenen Bakterienkultur in ein Kryoröhrchen überführt, mit 300 µl sterilem 100 % igem (w/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.9.4 Bestimmung von Zelldichten

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde durch Messung der OD bei 578 nm photometrisch bestimmt. Ab einer $OD_{578\text{ nm}} > 0,6$ wurde eine 1:10 Verdünnung der Kultur vermessen. Dabei entspricht eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 1 einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen pro ml (Madigan *et al.*, 2009).

2.9.5 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen nach der CaCl₂-Methode

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen und orientierte sich an der Methode von Mandel *et al.*, 1970. Durch längere Inkubationszeiten mit CaCl₂ kann die Anzahl an kompetenter *E. coli* Zellen noch gesteigert werden (Dagert *et al.*, 1979). Für die hier beschriebene Methode wurden *E. coli* Mach-1™-T1^R-Zellen der Firma Invitrogen verwendet. Dazu wurden 200 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit 1 ml einer üN gewachsenen Bakterienkultur beimpft und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6-0,8 kultiviert (150 xg, 37 °C). Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4 °C. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 min, 2100 xg, RT) und das Zellsediment 3x mit je 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in 12,5 ml eiskaltem FSB-Puffer aufgenommen und in Aliquots zu je 100 µl bei -80°C gelagert.

2.9.6 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Bei der Transformation handelt es sich um die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente *E. coli* Zellen. Dieser Prozess wurde erstmals 1928 als natürlich vorkommend in Bakterien beschrieben (Griffith, 1928). Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen nach Hanahan, 1983 wurde ein 100 µl Aliquot auf Eis aufgetaut und 10 min mit 5-500 ng Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Danach wurde im Heizblock für 2 min ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Zu den Zellen wurde je 1 ml SOB-Medium hinzugegeben und die Ansätze 30-60 min auf dem Schüttler inkubiert (150 xg, 37 °C). Anschließend wurden unterschiedliche Volumina der Zellen auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und die LB-Agar-Platten bei 37 °C üN im Brutschrank inkubiert. Ein Aliquot gleich behandelter Zellen ohne Plasmid-DNA wurde als Kontrolle verwendet.

2.10 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Vorschriften von Sambrook *et al.*, 1989 angewandt.

2.10.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini-Präp)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mittels alkalischer Lyse durchgeführt und orientierte sich an der Methode von Birnboim *et al.*, 1979. Für die Präparation wurde eine 2 ml-üN-Kultur von *E. coli* in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 10000 xg und RT sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendiert. Danach wurden 250 µl Puffer 2 hinzugegeben, was zu einer Lyse der *E. coli* Zellwände und einer Denaturierung von Proteinen führte. Nach einer Inkubation von 2-5 min bei RT wurde das Lysat mit 350 µl Puffer 3 neutralisiert. Die nachfolgende Zentrifugation (1 min, 10000 xg, RT) pelletierte sowohl denaturierte Proteine als auch genomische DNA von *E. coli*. Der Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA mit 600 µl 2-Propanol gefällt (1 min, 10000 xg, 4°C). Das dabei gebildete Pellet wurden 2x mit 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 10000 xg, RT) bevor es an der Luft getrocknet und nach 10 min in 30 µl Reinstwasser resuspendiert wurde. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.10.2 Endotoxin-freie Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Gram-negative Bakterien produzieren Endotoxine, die in der Außenmembran eingebaut und als Antwort auf Stress frei gesetzt werden (Kulp *et al.*, 2010). Während der Präparation von Plasmid-DNA werden Endotoxine bei der Zelllyse frei gesetzt, wenn die Membran der Bakterien durch alkalische Lyse aufgelöst wird. Da sie in vielen Zelltypen eine Immunantwort auslösen und zu Apoptose führen können, müssen sie aus der Präparation entfernt werden (Gorbet *et al.*, 2005). Die Endotoxin-freie Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Plasmid-DNA bei der Elektroporation von murinen ES-Zellen (mES-Zellen) eingesetzt (siehe 2.10.12.1).

2.10.4 Enzymatische Modifikation von DNA

Die zur enzymatischen Modifikation der DNA verwendeten Enzyme wurden aus den unter 2.5.3 aufgelisteten Quellen bezogen und die jeweiligen Reaktionsansätze in dem entsprechenden Puffer und unter den entsprechenden Bedingungen nach Angaben des Herstellers inkubiert

2.10.4.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die hydrolytische Spaltung von DNA erfolgte durch Restriktionsendonukleasen des Typs II, die definierte Erkennungssequenzen von 4-8 Basenpaaren besitzen (Pingoud *et al.*, 1997) und deren Namen sich von dem Organismus ableiten, aus dem sie ursprünglich isoliert wurden (Roberts *et al.*, 2003). Dies führt zur Entstehung von „glatten“ DNA-Enden (*blunt ends*) oder „über-

hängenden“, einzelsträngigen 5'- bzw. 3'- DNA-Enden (*sticky ends*). Bei einem spezifischen Temperaturoptimum schneidet 1 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease 1 µg DNA in 1 h.. Dabei wurden sowohl analytische als auch präparative Reaktionsansätze durchgeführt. Bei den analytischen Spaltungen handelt es sich um eine Methode zur Charakterisierung der Vektor-DNA. Für diese wurden 0,5-1 µg Plasmid-DNA in einem 10 µl-Ansatz 3 h oder üN bei 37 °C mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen inkubiert (siehe Tab. 9). Der Erfolg der Spaltung konnte durch eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.10.5) überprüft werden. DNA-Fragmente, die zur Ligation (siehe 2.10.7) eingesetzt werden sollten, wurden in einem präparativen Reaktionsansatz gespalten. Es wurden 5-15 µg DNA verwendet, die in einem 50 µl-Reaktionsansatz mit einer oder zwei Restriktionsendonukleasen 3 h oder üN bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe eines präparativen Agarosegels aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt (siehe 2.10.6) bevor sie zur Ligation (siehe 2.10.7) eingesetzt wurden.

Tab. 9. Bestandteile eines hydrolytischen Spaltungsansatzes.

Bestandteil	Volumen [20 µl]
DNA (1-5 µg)	x µl
Enzympuffer (10x)	2 µl
1. Enzym (10 U/µl)	1 µl
2. Enzym (10 U/µl)	1 µl
Reinstwasser	ad 20 µl

2.10.4.2 Klenow-Auffüllung

Wenn es nicht möglich ist für eine nachfolgende Ligation (siehe 2.10.7), Plasmid- und Insert-DNA mit Restriktionsendonukleasen zu spalten, die kompatible Enden erzeugen, müssen die einzelsträngigen Nukleotidüberhänge zu doppelsträngige Enden modifiziert werden. Dies geschieht mittels der Klenow-Auffüllung, die durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase ermöglicht wird. Dieses verleiht der DNA-Polymerase I neben der 3'-5'-Exonuklease- auch eine 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität, wodurch bei der hydrolytischen Spaltung entstehende einzelsträngige Enden durch Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) aufgefüllt werden (Klenow *et al.*, 1970). Für eine Klenow-Auffüllung wurden 3-5 µg DNA verwendet, die in einem 30 µl-Reaktionsansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert wurden (siehe Tab. 10). Die Polymerase wurde anschließend 10 min bei 75 °C inaktiviert.

Tab. 10. Bestandteile einer Klenow-Auffüllung.

Bestandteil	Volumen [30 μ l]
DNA (3-5 μ g)	x μ l
Klenow-Puffer (10x)	2 μ l
Klenow-Fragment (10 U/ μ l)	1 μ l
dNTPs (2,5 mM jeweils)	1 μ l
Reinstwasser	ad 30 μ l

2.10.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Wenn die Plasmid-DNA mit nur einer Endonuklease und somit zu *sticky ends* gespalten wurde oder nach der Spaltung mit einer oder zwei Endonukleasen *blunt ends* vorlagen, musste eine Religation durch Phosphorylierung der Plasmid-DNA verhindert werden. Dabei wurde die intestinale, alkalische Phosphatase aus Kalb (*CIAP*) verwendet, die die 5'-Phosphatgruppen von Nucleinsäuren hydrolysiert (Coleman, 1992). Für die Dephosphorylierung wurde 1 μ l CIAP (1 U/ μ l) direkt in den Restriktionsansatz pipettiert und dieser bei Vorliegen von *blunt ends* 15 min bei 50 °C inkubiert; bei *sticky ends* waren 37 °C ausreichend. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Inkubation für 15 min bei 65 °C.

2.10.5 Agarosegelelektrophorese von DNA

Eine Agarosegelelektrophorese erlaubt die Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld (McDonnell *et al.*, 1977). Durch die negative Ladung der Phosphatgruppen wandern die Nucleinsäuren bei Anlegen einer Spannung zur Anode, wobei kleinere Moleküle schneller wandern als große, da ihr Widerstand der Matrix gegenüber geringer ist (Aaij *et al.*, 1972). Die hier verwendete Agarosekonzentration der Gele wurde in Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente gewählt (Lee *et al.*, 2002), wobei Konzentrationen von 0,5-1 % eingesetzt und sowohl analytische als auch präparative Agarosegele angefertigt wurden. Zur Herstellung eines Agarosegels mit 20 Taschen wurden 100 ml TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose in der Mikrowelle aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 5 μ l Ethidiumbromid (0,5 μ l/10 ml) versetzt. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid mit der DNA. Danach wurde die Agaroselösung in den Gelschlitten gegossen, in die Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer bedeckt. Im Anschluss wurden sowohl die mit DNA-Probenpuffer versehenen Proben als auch der DNA-Standard auf das Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids unter UV-Licht kann die DNA sichtbar gemacht werden und die Größenbestimmung mit standardisierten DNA-Markern erfolgen (Prunell *et al.*, 1977).

2.10.6 Extraktion und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Für die Reinigung und Gewinnung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurde das entsprechende Ethidiumbromid gefärbte DNA-Fragment unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel herausgeschnitten und über das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma „Qiagen“ nach Angaben des Herstellers gereinigt. Hierbei bindet die DNA in Anwesenheit chaotroper Salze an die Silica-Membran, während Enzyme und Salze nicht gebunden werden. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA mit einem basischen Puffer mit einer geringen Salzkonzentration von der Säule eluiert (Vogelstein *et al.*, 1979).

2.10.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Plasmid- und Insert-DNA konnten mittels der T4 DNA-Ligase unter Knüpfung neuer Phosphodiesterbindungen ligiert werden (Weiss *et al.*, 1976). Nach Bestimmung der Mengen an Plasmid- bzw. Insert-DNA durch Messung der Konzentration (siehe 2.12.1) wurden diese bei der Ligation entsprechend Tab. 11 eingesetzt. Handelte es sich um eine Ligation von *blunt ends*, wurde dem Ligationsansatz 5 % PEG (w/v) zugegeben (siehe Tab. 11). Dabei belegt PEG Platz innerhalb des Ligationsansatzes und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, dass Insert-DNA und linearisierter Vektor aufeinander treffen. Die 20 µl-Reaktionsansätze wurden üN bei 16 °C inkubiert.

Tab. 11. Bestandteile eines Ligationsansatzes.

Bestandteil	Volumen [20 µl]
Linearisierter Vektor	20-200 ng
Insert-DNA	5:1 (Mengenverhältnis)
Ligase-Puffer (10x)	2 µl
Ligase	1 U
PEG (bei <i>blunt ends</i>)	1 µl
Reinstwasser	ad 20 µl

2.10.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden als Auftragsequenzierung mittels der Methode nach Sanger *et al.*, 1977 durch die Firma „Eurofins Genomics GmbH“ in Ebersberg durchgeführt.

2.10.9 Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Geweben

Unter der genomischer DNA (gDNA) versteht man die Gesamt-DNA eines Organismus. Um sie aus Zellen zu isolieren wurden diese mit PBS gewaschen, mit 300 µl Lysepuffer versetzt, durch Auf- und Abpipettieren lysiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die Isolierung aus Geweben wurden Mausschwanzbiopsien genommen, ebenfalls in 300 µl Lysepuffer überführt und das Gewebe üN lysiert. Durch Zugabe von Proteinase K und RNase A wurden Zellproteine gespalten

und RNAs abgebaut (Hermann *et al.*, 1987). Die Isolierung von gDNA aus Zellen und Organen wurde mit dem „Gentra Puregene Mouse Tail Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt.

2.10.10 Isolierung von RNA aus Zellen und Organen

Zellen wurden mit 200 µl Trizol versetzt, durch Auf- und Abpipettieren gelöst und weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert. Zur Isolierung der RNA wurden sowohl die Zellsuspension als auch die Organe auf Eis aufgetaut. Die Organe wurden danach mit 1 ml Trizol versetzt und im TissueLyser LT mit 10 mm Beads für 7 min bei 50 Hz homogenisiert. Das Homogenisat wurde auf Reaktionsgefäße verteilt, für 15 min bei 10000 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Die nachfolgende Phenol-Chloroform-Fällung isolierte die RNA (Chomczynski *et al.*, 1995). Dabei wurden dem Überstand 200 µl Chloroform pro ml eingesetztem Trizol zugegeben und die Proben 30 s auf dem Tischschüttler gemischt. Die anschließende Zentrifugation (10000 xg, 15 min, 4 °C) führte zu einer Phasentrennung, bei der die obere, wässrige Phase die RNA enthält. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl 2-Propanol pro ml Trizol gefällt. Dazu wurden die Proben auf dem Tischschüttler gemischt, 10 min bei RT inkubiert und für 10 min bei 10000 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-enthaltene Pellet 2x mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen (10000 xg, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde für 30 min getrocknet bevor es in 30 µl DEPC-behandeltem und somit RNase-freiem Wasser resuspendiert wurde.

2.10.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA *in vitro*. Dabei besteht ein Reaktionsansatz aus DNA, Puffer, Oligonukleotiden, *Tag*-Polymerase und Reinstwasser (siehe Tab. 12) und können drei Schritte voneinander unterschieden werden (Mullis, 1997, Mullis *et al.*, 1987). Zuerst erfolgt die Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 94 °C, wodurch die Wasserstoffbrücken aufgebrochen und die doppelsträngige Struktur der DNA zerstört wird (Denaturierung). Anschließend wird die Temperatur für 30 s auf die Temperatur abgesenkt, die für die spezifische Anlagerung der verwendeten Oligonukleotide optimal ist (Anlagerung). Danach füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge von 3' - in 5'-Richtung mit freien Nukleotiden auf (Elongation). Dieser Schritt wird bei einer Temperatur von 72 °C durchgeführt und dauert etwa 30 s pro 500 bp. Je nach PCR-Ansatz wird der Zyklus 30-35x wiederholt. Um die Vollständigkeit der begonnenen Elongation beim letzten Zyklus sicherzustellen, wird die PCR mit einer Inkubation bei 72 °C für 10 min beendet (finale Elongation). Die Temperatur wird bis zur Probenentnahme bei 4 °C konstant gehalten. Durch eine analytische Agarosegelelektrophorese (siehe 2.10.5) konnte die PCR anhand der DNA-Fragmentgröße überprüft werden.

2.10.11.1 Qualitative PCR zur Genotypisierung von Mausschwanzbiopsien

Zur Überprüfung des Vorhandenseins des gewünschten Transgenes wurde eine qualitative PCR durchgeführt. Dabei wurden die Oligonukleotide für die PCR so gewählt, dass nur spezifische Bereiche der genomischen DNA (gDNA) amplifiziert wurden. Nach Aufarbeitung der gDNA aus Mausschwanzbiopsien (siehe 2.10.9) wurde die Amplifikation des BAG3^{wt}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Gens mit den Oligonukleotiden „Geno_BAG3for“ und „Geno_BAG3rev“ in Kombination mit dem Puffer E durchgeführt. Das Vorliegen der *loxP*-DNA-Sequenz wurde mittels der Oligonukleotide „Geno_floxfor“ und „Geno_floxrev“ in Puffer G überprüft. Dabei setzten sich die Reaktionsansätze wie in Tab. 12 beschrieben zusammen. Verwendet wurde das in Tab. 13 aufgelistete PCR-Programm mit der für die jeweiligen Oligonukleotidepaare spezifischen Anlagerungstemperatur (siehe Tab. 14).

Tab. 12. Reaktionsansatz einer Genotypisierungs-PCR.

Bestandteil	Volumen [20 µl]
gDNA	100-200 ng
Puffer E/G (2x)	10 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
Primer	1 µl
Reinstwasser	ad 20 µl

Tab. 13. PCR-Programm einer PCR zur Genotypisierung.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Initiale Denaturierung	94	120
Denaturierung	94	45
Anlagerung	x	45
Elongation	72	60
Finale Elongation	72	600
	4	∞

Tab. 14. Anlagerungstemperatur und -zeit der Oligonukleotidepaare.

Mauslinie	Anlagerung [°C]	Zeit [s]
BAG3 ^{wt} -eGFP	65	120
BAG3 ^{P209L} -eGFP	65	45
BAG3 ^{P209L} -eGFP ^{flox}	60	45

2.10.11.2 Erststrang-Synthese von komplementärer DNA (RT-PCR)

Mittels des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann aus mRNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden (Spiegelman *et al.*, 1971). Dabei wurde das „SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit“ der Firma Life Technologies, Darmstadt

verwendet. Die Reaktionsansätze für die Reverse Transkription wurden nach Angaben des Herstellers pipettiert (siehe Tab. 15) und das in Tab. 16 dargestellte Programm verwendet.

Tab. 15. Reaktionsansatz einer Reverse Transkription.

Bestandteil	Volumen [20 µl]	
mRNA (1 µg)	x µl	30 x
Reaktionsmix (5x)	4 µl	
Enzymmix (10x)	2 µl	
DEPC-Wasser	ad 20 µl	

Tab. 16. Programm einer RT-PCR.

Temperatur [°C]	Zeit [min]
10	25
42	60
85	5
4	∞

2.10.11.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Um die Anzahl der Integrationen des BAG3^{wt}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Transgens im Genom der einzelnen Mauslinien zu bestimmen, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der PCR, macht jedoch eine zusätzliche Quantifizierung der DNA möglich. Diese erfolgt dabei über die Messung der Fluoreszenz, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit detektiert wird und welche proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Dabei kamen fluorogene TaqMan[®]-Sonden zum Einsatz, deren Funktionsweise auf der FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie Transfer)-Technik (Förster, 1948) basiert (Cardullo, 1988). Hierbei wird dem Reaktionsansatz, zusätzlich zu den 5'- und 3'-Oligonukleotiden, eine für das Zielgen spezifische Oligonukleotid-Sequenz (Sonde) zugesetzt. Diese ist am 5' Ende mit einem fluoreszenten *Reporter* (Donor), am 3' Ende mit einem *Quencher* (Akzeptor) markiert (Livak *et al.*, 1995). Da Donor und Akzeptor in einer intakten Sonde nahe beieinander liegen, wird die Fluoreszenz durch den Akzeptor ausgelöscht. Während der qPCR hybridisiert die Sonde spezifisch mit dem Zielgen. Erst wenn die *Taq*-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonucleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde während der PCR-Zyklen abbaut und den Donor freisetzt, entfernen sich Donor und Akzeptor voneinander und die Fluoreszenz kann detektiert werden. Die Detektion des BAG3-Transgens erfolgte mit einer Sonde gegen humanes BAG3 oder eGFP, die an den *Reporter* Carboxyfluorescein (FAM) gekoppelt war und bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen wurde. Für die Normierung der Ergebnisse auf die Menge an eingesetzter cDNA oder gDNA wurde eine 18S rRNA oder TfrC Referenzsonde (VIC) verwendet, deren Signal bei einer Wellenlänge von 555 nm detektiert wurde. Für jede Probe wurde der in Tab. 17

aufgeführte Reaktionsansatz pipettiert, wobei die DNA so vorverdünnt wurde, dass 1 µg DNA in 4 µl A. dest. gelöst wurden. Es wurde das in Tab. 18 dargestellte qPCR-Programm verwendet.

Tab. 17. Reaktionsansatz einer qPCR.

Bestandteil	Volumen [20 µl]
cDNA/gDNA (1 µg)	4 µl
TaqMan Master Mix (2x)	10 µl
Sonde (20x)	4 µl
Reinstwasser	2 µl

Tab. 18. Programm einer qPCR.

Temperatur [°C]	Zeit [s]	
95	600	
95	10	35x
60	45	

Die Quantifizierung der relativen RNA-Menge erfolgte anhand der exponentiellen Phase der qPCR, wobei auf die interne Kontrolle normiert wurde. Der dabei verwendete **Ct-Wert** (*cycle threshold*-Wert) stellt eine theoretische Größe dar, die den Anfang des exponentiellen Wachstums der aufgezeichneten Kurve beschreibt. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und die relative RNA-Menge wie folgt bestimmt.

$$\text{relative RNA-Menge} = 2^{-(\text{Ct Ziel-RNA} - \text{Ct interne Kontrolle})}$$

2.10.12 Transfektion von Plasmid-DNA in Zelllinien

Das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in tierische Zellen wird als Transfektion bezeichnet und wird zur Generierung von genetisch veränderten Zellen benutzt (Kim *et al.*, 2010). Dabei kann die Fremd-DNA vorübergehend in die Zielzelle eingebracht (transiente Transfektion) oder dauerhaft in das Zielgenom eingebaut werden (stabile Transfektion). Während die Expression des zu untersuchenden Gens in transienten Transfektanten nach einer bestimmten Zeit abnimmt (Recillas-Targa, 2006), bleibt diese in stabil transfizierten Zellen bestehen (Glover *et al.*, 2005).

2.10.12.1 Elektroporation von mES-Zellen

Elektroporation bezeichnet die Einschleusung von fremder DNA durch vorübergehend permeabilisierte Zellmembranen (Neumann *et al.*, 1982). Um die Integration der Fremd-DNA in das Genom der Zielzellen zu erleichtern, wurden die verwendeten Plasmide linearisiert. Durch Verwendung von Trypsin wurden die mES-Zellen von den Zellkulturflaschen abgelöst (siehe 2.11.3) und 7×10^6 Zellen für 10 min bei 37 °C auf einer mit 0,1 % Gelatine beschichteten 10 cm-Zellkulturschale plattiert. Die Fibroblasten setzen sich am Schalenboden ab und die sich im

Überstand befindlichen mES-Zellen ($\sim 5 \times 10^6$ Zellen) wurden für 5 min bei 210 xg und RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in 800 μ l kaltem PBS resuspendiert, 30 μ g der linearisierten DNA zugegeben und die Suspension in eine 4 mm Elektroporations-Küvette überführt. Nach Elektroporation bei 240 mV und 500 μ F wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert bevor je $2,5 \times 10^6$ Zellen auf mit Fibroblasten beschichteten 10 cm-Gewebekulturschalen ausgesät wurden. Dem Kulturmedium wurde die ersten 48 h nur LIF zugesetzt, danach erfolgte die Selektion stabil transfizierter Klone durch Zugabe von Neomycin in einer Konzentration von 165 μ g/ml. Etwa 10 Tage später konnten stabil transfizierte Einzelklone unter dem Mikroskop manuell abgelöst und einzeln kultiviert werden (siehe 2.13.3).

2.10.12.2 Nukleofektion embryonaler Kardiomyozyten

Bei einer Nukleofektion handelt es sich um eine Elektroporation, bei der die Fremd-DNA durch besondere Lösungen vom Cytoplasma in den Zellkern gelangt (Aluigi *et al.*, 2005). Für die Nukleofektion embryonaler Kardiomyozyten wurde das „Neon™ Transfection System“ der Firma Life Technologies, Darmstadt verwendet. Dabei wurden pro Reaktionsansatz 5×10^6 embryonale Kardiomyozyten eingesetzt und mit 5 μ g Plasmid-DNA bei 800 mV und 2 Impulsen transfiziert.

2.10.13 Transduktion von mES-Zellen mit Adeno-assoziierten Viren

Auch eine Methode, Fremd-DNA stabil in das Genom einer Zielzelle zu integrieren, ist die virale Transduktion mit Adeno-assoziierten Viren. Diese gehören zur Gattung der Dependoviren und können auch ruhende, nicht proliferierende Zelltypen transduzieren (Büning *et al.*, 2008). Für die Transduktion der mES-Zellen wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte in 3 ml KO-DMEM ausgesät und 24 h danach mit Virus transfiziert.

2.11 Biochemische Methoden

2.11.1 Zellaufschluss

Die durch Durchflusszytometrie isolierten eGFP⁺-Kardiomyozyten (siehe 2.12.3) wurden durch eine Zentrifugation für 10 min bei 200 xg und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1x Probenpuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mittels Ultraschall durchgeführt (90 % Amplitude, 20 Impulse, 0,9 Zyklen), welches eine etablierte Methode ist, um Proteine aus Zellen freizusetzen (Iida *et al.*, 2008). Anschließend wurde das Sonikat in Reaktionsgefäße überführt. Während der nachfolgenden Zentrifugation (5 min, 10000 xg, 4 °C) wurden die Zelltrümmer pelletiert und der Überstand für eine SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.11.2) weiter verwendet.

2.11.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Oberflächenladung ihrer Molekularmasse nach getrennt werden (Lämmli, 1970). Das Detergenz SDS führt dabei zur negativen Ladung aller Proteine, durch den Einsatz von β -Mercaptoethanol wurden Disulfidbrücken innerhalb der Proteinstrukturen zu SH-Gruppen reduziert. Die verwendeten Mini-Gele setzten sich aus einem Sammelgel mit 4,5 % und einem Trenngel mit 12,5 % Acrylamid zusammen, wobei das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid in der Acrylamid-Lösung variiert (siehe Tab. 19). Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min, 10000 xg, RT) wurden sie auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Dabei sammeln sich die Proteine zuerst im Sammelgel bevor sie im Trenngel mit einer hohen Trennleistung aufgetrennt werden (Righetti *et al.*, 1990).

Tab. 19. Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels.

Bestandteile	Trenngel [12 %]	Sammelgel [4,5 %]
Acrylamid 30 % (37,5:1)	2 ml	/
Acrylamid 40 % (19:1)	/	0,21 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,25 ml	/
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	/	0,5 ml
Reinstwasser	1,75 ml	1,29 ml
TEMED	8 μ l	2,5 μ l
10 % APS	30 μ l	20 μ l

2.11.3 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden 30 min bei RT auf einem Taumler in Coomassie-Färbelösung gefärbt und danach bis zum gewünschten Färbungsgrad mit Entfärbelösung entfärbt (Neuhoff *et al.*, 1988).

2.11.4 Western Blot mit spezifischen Antikörpern

Im Anschluss an die Gelelektrophorese konnten die Proteine durch eine immunochemische Reaktion mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Hierbei wurde das Tankblot-Verfahren angewandt, bei dem die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert wurden (Gültekin *et al.*, 1988). Dazu wurde die etwa der Größe des Gels entsprechende Membran 1 min in Methanol *pA* aktiviert. Danach wurden sie 5 min in Tankblot-Puffer inkubiert und anschließend auf drei in Tankblotpuffer getränkte Lagen Filterpapier gelegt. Das SDS-Gel wurde auf die Membran gelegt und mit drei weiteren Lagen in Transferpuffer getränktem Filterpapier bedeckt. Der Ansatz wurde in eine Blotkassette überführt und der Proteintransfer erfolgte μ N bei 250 mA und 4 °C. Danach

wurde die Membran für 2 h mit dem Blockpuffer inkubiert und im Anschluss erfolgte die 2 h Inkubation mit dem in TBS-T verdünnten Primärantikörper (siehe Tab. 4). Dann wurde die Membran 3x für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit dem in TBS-T verdünnten Sekundärantikörper (siehe Tab. 5) inkubiert, an dem ein Fluorchrom gekoppelt war. Nachdem die Membran 3x 10 min mit TBST-T gewaschen und 1x 10 min mit Reinstwasser äquilibriert wurde, erfolgte die Visualisierung der Proteine durch Scannen der Membran im Geldokumentationssystem Odyssey *infrared imager*.

2.12 Biophysikalische Methoden

2.12.1 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung einer DNA-Lösung

Zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit einer DNA-Lösung wurde deren OD mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers bei 260 nm und 280 nm gemessen. Um Messfehler gering zu halten, wurden verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) der DNA-Lösung gegen Wasser als Leerwert gemessen. Dabei entspricht eine $OD_{260nm}=1$ einer DNA-Konzentration von $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Müller, 1993). Da aromatische Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm haben und in Proteinen einer statistischen Verteilung unterliegen, kann die Kontamination der DNA-Lösung mit Proteinen mit dem Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} beschrieben werden. Dabei zeigt ein Verhältnis von 1,7-1,9 das Vorliegen einer reinen DNA-Lösung an.

2.12.2 Fluoreszenz-Recovery after Photobleaching (FRAP)

Die Methode der *Fluoreszenz-Recovery after Photobleaching* (FRAP) macht die Messung von Diffusionsgeschwindigkeiten von Proteinen in Zellen möglich. Dabei werden die zu untersuchenden Moleküle fluoreszenzmarkiert und die Fluoreszenzintensität lokal bestimmt (*Prebleach*). Durch mehrere kurze Laserpulse wird die Fluoreszenz lokal irreversibel ausgelöscht (*Bleach*) und die Zeit vermessen, die vergeht, bis der Austausch gegen fluoreszenzmarkierte Moleküle aus der Umgebung an die gebleichte Stelle erfolgt ist (*Recovery*). Durch Messung der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Zeit kann die Diffusionskonstante berechnet werden, die die Diffusionsgeschwindigkeit des zu untersuchenden Proteins anzeigt (Meyvis *et al.*, 1999). Für die FRAP-Experimente wurden adulte ventrikuläre Kardiomyozyten verwendet, die durch eine Langendorff-Dissoziation isoliert (siehe 2.13.6) und auf Laminin-beschichteten 35 mm-Schalen plattiert wurden. Die Zellen wurden während des gesamten Experiments bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert und eine Kontraktion durch Verwendung von 25 mM BDM im Kultivierungsmedium unterdrückt. Die Fluoreszenzauslöschung ausgewählter Regionen wurde mit einem 473 nm Laser bei höchster Intensität (100 %) und einer Pulszeit von 1 ms mit 8 Wiederholungen durchgeführt.

Bilder wurden vor und nach der Fluoreszenzauslöschung aufgenommen, wobei alle 1-2 s ein Bild erstellt wurde. Die Auswertung der erhaltenen Rohdaten erfolgte durch Julia Braune, Institut für Zellbiologie der Universität Bonn, nach Al Tanoury *et al.*, 2010.

2.12.3 Durchflusszytometrie

Mit Durchflusszytometrie können Zellen, die in hohem Tempo einzeln ein elektrisches Feld oder einen Laserstrahl passieren, anhand ihrer Größe, Granularität oder Fluoreszenz voneinander unterschieden werden (Galbraith, 2012). Eine spezielle Form der Durchflusszytometrie stellt das FACS (*fluorescence activated cell sorting*) dar, bei dem die Zellen je nach Fluoreszenz in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert werden können (Hulett *et al.*, 1969).

Sowohl für die Sortierung der eGFP⁺ Kardiomyozyten als auch für deren Quantifizierung wurden transgene Herzen 10 Wochen alter Mäuse mit der Langendorff-Methode dissoziiert (siehe 2.13.6). Die isolierten Kardiomyozyten wurden in 5 ml Stopp-Lösung aufgenommen und bis zur FACS-Analyse bei 4 °C gelagert. Kurz vorher wurde die Zellsuspension durch einen 100 µm-Filter gegeben und die Zellen wurden im Durchflusszytometer „BD Influx™“ anhand ihrer Fluoreszenz bei 488 nm sortiert. Sektoren wurden anhand dissoziierter CAG-eGFP-Herzen für das eGFP⁺-Signal und nicht transgener Wildtyp-Herzen für die Autofluoreszenz festgesetzt. Die Analyse erfolgte mit der „Flow Jo 7.5“ Software.

2.13 Zellbiologische Methoden

2.13.1 Auftauen von Zellen

Die in der Gasphase des Stickstofftanks gelagerten Zellen (siehe 2.13.4) wurden auf Eis überführt und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Dies sollte möglichst schnell erfolgen, da eine Reihe von Untersuchungen gezeigt haben, dass die Zellen durch den Auftauprozess geschädigt werden (Shier, 1988). Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 ml Kultivierungsmedium verdünnt. Es erfolgte eine 5 min Zentrifugation bei 210 xg und RT, in deren Anschluss der DMSO-enhaltene Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Kultivierungsmedium aufgenommen wurde. G4-mES-Zellen wurden auf immortalisierten Fibroblasten der Maus (siehe 2.13.2) in 25 cm-Kulturflaschen ausgesät und dem Kultivierungsmedium 1000 U/ml LIF zugefügt. Dem Kultivierungsmedium der transgenen mES-Zellen wurde zusätzlich 165 µg/ml Neomycin zugegeben.

2.13.2 Mitotische Inaktivierung und Kultivierung muriner Fibroblasten

Embryonale murine Fibroblasten wurden nach Corner, 2001 mitotisch inaktiviert und kultiviert. Dazu wurden sie aufgetaut und in 15 % DMEM mit einer Zellzahl von 5×10^6 auf 0,1 % Gelatine-

beschichteten 10 cm-Schalen ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Fibroblasten mit 5 ml PBS gewaschen und danach für 5 min mit 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml Medium abgestoppt, die Zellsuspension in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 5 min bei 210 xg und RT zentrifugiert. Die Zellen wurden 1:4 verdünnt und auf 14,5 cm-Zellkulturschalen ausgesät und expandiert. Am Tag der Bestrahlung wurden sie mit 5 ml 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung behandelt und mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgelöst. Gestoppt wurde die Trypsinreaktion mit jeweils 10 ml 15% DMEM. Die Zellsuspension wurde auf Eis überführt und die mitotische Aktivität mittels γ -Strahlung inhibiert (15 Gy, Dosisrate 2-3 Gy). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 210 xg, RT) sedimentiert und 5×10^5 Zellen pro Röhrchen kryokonserviert. Zur Beschichtung von Zellkulturflaschen wurden diese wie die mES-Zellen aufgetaut (siehe 2.13.1) und 5×10^3 Zellen/cm² in 15% DMEM ausgesät.

2.13.3 Kultivierung und Passage von mES-Zellen

Bei mES-Zellen handelt es sich um pluripotente Zellen, die aus dem Blastozystenstadium von Embryonen isoliert wurden (Evans *et al.*, 1981). Um einer Differenzierung der mES-Zellen zu verhindern, wurde dem Kultivierungsmedium LIF zugefügt (Gearing *et al.*, 1987). Um Stress durch zu hohe Dichte vorzubeugen, wurden diese bei 70 % Konfluenz auf neue Fibroblasten beschichtete Zellkulturschalen umgesetzt. Dieser Vorgang wurde nach Corner, 2001 durchgeführt und wird als Passage bezeichnet. Um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, wurden die mES-Zellen mit PBS gewaschen und für 3-5 min bei 37 °C mit 1 ml 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit 5 ml 15% KO-DMEM abgestoppt und die Zellsuspension nach Überführung in ein 15 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert (5 min, 210 xg, RT). Das Pellet wurde in 1 ml KO-DMEM aufgenommen und die Zellzahl mittels einer Thoma-Zählkammer in einer 1:10 Verdünnung bestimmt. Von der Gesamtzahl der Zellen wurden $7,5 \times 10^5$ Fibroblasten subtrahiert und $1,5 \times 10^5$ mES-Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen auf Fibroblasten ausgesät. Die Kultivierung der mES-Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.13.4 Einfrieren von mES-Zellen

Um möglichst viele Zellen in einer niedrigen Passage mit korrektem Karyotyp zu erhalten, wurden Zellklone mit korrektem Karyotyp nach der Transfektion expandiert und Zellen für spätere Experimente kryokonserviert (Mazur, 1970). Zuerst wurden die Zellen wie unter 2.11.3 beschrieben passagiert, danach wurden 1×10^6 Zellen in 0,5 ml 15% KO-DMEM resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Einfriermedium gemischt. Nach Überführung der Zellsuspension in Kryoröhrchen wurden diese in einen mit 2-Propanol befüllten Einfriercontainer gesetzt. Zwei Tage später erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen in die Gasphase des Stickstofftanks.

2.13.5 Differenzierung von mES-Zellen

Die Pluripotenz embryonaler mES-Zellen macht es möglich, diese Zellen in alle drei Keimblätter zu differenzieren (Smith *et al.*, 1987, Bradley *et al.*, 1984). Für die Differenzierung der mES-Zellen wurde die Methode der Hängenden Tropfen angewandt (Wobus *et al.*, 1991).

Hierfür wurden die adhärent wachsenden mES-Zellen von den Kulturflaschen gelöst (siehe 2.13.3) und 2×10^5 Zellen in 10 ml IMDM resuspendiert. Mit Hilfe einer Tropfpipette wurden 20 μ l-Tropfen der Zellsuspension auf die Innenseite des Deckels von 10 cm-Zellkulturschalen gesetzt, so dass jeder Tropfen circa 400 mES-Zellen enthielt. Der Boden der 10 cm-Schale wurde mit 5 ml PBS befüllt und der Deckel mit den Tropfen umgedreht und auf den Schalenboden gesetzt. Während der darauf folgenden zwei Tage, in denen die Schalen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden, sammelten sich die mES-Zellen an der Spitze des Tropfens, wobei sich die sogenannten Embryonalkörperchen (EBs) bildeten (Wang *et al.*, 2008). Jeweils zwei Schalen-deckel mit den darin enthaltenen EBs wurden mit 10 ml IMDM in eine 10 ml-Schale abgespült und weitere sieben Tage bei 37 °C, 5% CO₂ und 70 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Ebenso wurden nach drei Tagen EBs aus der Zellsuspension entnommen und jeweils 3-5 EBs auf 0,1 % Gelatinebeschichteten Deckgläschen in 500 μ l IMDM plattiert.

2.13.6 Dissoziation von EBs

Um Einzelzellsuspensionen von differenzierenden Zellen zu erhalten, wurden die EBs (siehe 2.13.5) dissoziiert (Maltsev *et al.*, 1994). Dazu wurden die EBs aus den 10 cm-Schalen mit IMDM in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und am Gefäßboden gesammelt. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment mit 5 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 0,5 ml 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung und eine 5 min Inkubation bei 37 °C und 800 rpm auf einem Schüttler. Nach dieser Zeit wurden die sich vom Zellverband bereits gelösten Zellen in 5 ml IMDM überführt, die verbleibenden EBs wurden einer erneuten Trypsinbehandlung unterzogen und danach ebenso in IMDM aufgenommen. Schließlich wurde die Zellsuspension 5 min bei 210 xg und RT zentrifugiert und die pelletierten Einzelzellen in 5 ml IMDM aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 1×10^5 Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte in 500 μ l IMDM auf 0,1 % Fibronectin beschichtete Glasplättchen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach zwei Tagen wurden einzelne Zellen auf Glasplättchen für Immunfluoreszenzfärbungen fixiert (siehe 2.12.2).

2.13.7 Karyotypisierung von mES-Zellklonen

Die Karyotypisierung, also die Darstellung des Chromosomensatzes einer Zelle, wurde für gut differenzierende mES-Zellklone durchgeführt. Dazu wurde eine zu 70 % konfluent bewachsene 25 cm²-Zellkulturflasche mit 5 ml KO-DMEM und Demecolcin (0,1 μ g/ml) für 3 h bei 37 °C

inkubiert. Während dieser Zeit wirkt Demecolcin als Spindelgift und unterbricht den Zellzyklus der mES-Zellen in der Metaphase (Tjio *et al.*, 1956). Danach erfolgte eine Trypsinbehandlung mit anschließender Zentrifugation wie in 2.13.3 beschrieben und das Zellpellet wurde in 1 ml einer KCl-Lösung resuspendiert. Es wurden weitere 4 ml KCl-Lösung hinzugegeben und die Zellsuspension für 15 min bei RT inkubiert. Fixiert wurden die Zellen nachfolgend in 1 ml eiskalter Fixierlösung, wobei das Zellpellet nach einer Zentrifugation (5 min, 0,5xg rpm, RT) in 1 ml Fixierlösung aufgenommen und für 30 min in dieser inkubiert wurde. Diese Waschschrte in Fixierlösung wurden 2x wiederholt bevor das Zellpellet in 0,5 ml Fixierlösung aufgenommen wurde. Mit Hilfe einer Glaspipette wurde die Zellsuspension aus einer Höhe von 50 cm auf eiskalte Objektträger getropft, diese getrocknet und für 15 min mit Hoechst-Lösung 33342 (1 µg/ml) inkubiert. Nach 2x Waschen mit PBS konnten diese dann mit Eindeckmedium eingedeckt werden. Die Chromosomen wurden am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines DAPI-Filters aufgenommen und ihre Anzahl pro Zelle ermittelt.

2.14 Immunzytochemische Methoden

2.14.1 Fixierung von Zellen und Gewebe

Durch Fixierung von Geweben mit Formaldehyd können Strukturen von Proteinen und Zellorganellen erhalten und konserviert werden (Ramos-Vara, 2005). Dabei erfolgt eine Bildung von Quervernetzungen aus den reaktiven Carboxyl-Gruppe des Formaldehyds und den reaktiven Aminogruppen der Aminosäuren (Dapson *et al.*, 1990), wobei die nativen Fluoreszenzsignale der jeweiligen Fusionsproteine bewahrt werden. Vor Fixierung wurden die Zellen und Gewebe 1x mit PBS gewaschen. Die darauf folgende Behandlung mit 4 % PFA erfolgte für Zellen 30 min bei RT, für Gewebe 1h bei 4 °C. Nach 2x Waschen mit PBS konnten die Zellen und Gewebe bei 4°C gelagert oder für Immunfluoreszenzfärbungen (2.14.4) verwendet werden.

2.14.2 Einfrieren von EBs und Geweben und Anfertigen von Kryoschnitten

Fixierte und in PBS gelagerte EBs oder Gewebe (siehe 2.14.1) wurden zum Wasserentzug in 20 %igen Sucrose-Lösung überführt und über Nacht in dieser inkubiert. Die EBs wurden danach für 2 h in eine 1:1 Mischung aus 20 %iger Sucrose-Lösung und Tissue-Tek[®] gegeben. Anschließend wurden EBs und Gewebe in Probenbehälter mit Tissue-Tek[®] platziert und diese in Isopentan auf Trockeneis überführt. Die Anfertigung von 10 µm dicken Schnitten erfolgte am Kryotom. Die Schnitte wurden auf Histobond[®] Objektträgern aufgenommen und nach dem Trocknen durch Immunfluoreszenz gefärbt (siehe 2.14.4) oder bei -80 °C gelagert.

2.14.3 Antigen-Demaskierung für immunzytochemische Färbungen

Die Fixierung von Geweben mit PFA führt zu einer Quervernetzung der Proteine und somit zu einer schlechteren Zugänglichkeit der Epitope für Antikörper (Werner *et al.*, 2010). Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus nicht bekannt ist, können Quervernetzungen durch Einwirkung großer Hitze teilweise wieder aufgelöst werden, was als Antigen-Demaskierung bezeichnet wird (Shi *et al.*, 1991). Hierzu wurden die Schnitte in einer Küvette mit 0,01 M Natriumcitratpuffer für 15 min bei 93 °C in der Mikrowelle inkubiert. Nach einer 30 min Abkühlung bei RT konnten die Kryoschnitte für Immunfluoreszenzfärbungen (siehe 2.14.4) benutzt werden.

2.14.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen und Kryoschnitten

Bei der Methode der Immunfluoreszenzfärbungen werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, um spezifische Antigene zu detektieren. Zur Visualisierung kann sowohl der Primärantikörper (direkt) als auch der Sekundärantikörper (indirekt) mit dem Fluorochrom gekoppelt sein (Odell *et al.*, 2013). Bei den Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen und Schnitten wurden alle Färbeschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt und Kryoschnitte wurden mit einem Fettstift umrundet. Zur Rehydrierung wurden die Kryoschnitte für 5 min mit PBS behandelt. Danach wurde für 2 h bei RT oder üN bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert (siehe Tab. 6), der in 0,2 % Triton-X 100 und 5 % Serum verdünnt wurde. Anschließend wurden die Zellen 3x für jeweils 5 min mit PBS gewaschen bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte. Dieser war mit einem Fluorochrom gekoppelt und wurde 1:400 in Hoechst-Lösung 33342 (1 µg/ml) verdünnt (siehe Tab. 7). Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei RT und, aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome, unter Ausschluss von Licht. Erneut wurde 3x für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen und Kryoschnitte luftblasenfrei eingedeckt und getrocknet. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt und bei 4 °C. Die Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt und die Bilder mittels der „Zen 2012“ Software bearbeitet.

2.15 Tierexperimentelle Verfahren

2.15.1 Generierung transgener Mauslinien

Die Erzeugung transgener Mauslinien erfolgte durch Aggregation der mES-Zellen mit diploiden Embryonen der Maus (Martin, 1981). Dabei wurde am Tag vor der Aggregation der ausgewählte G4-mES-Zellklon durch Trypsinisierung von den Fibroblasten getrennt (siehe 2.13.3). Nach Abstoppen der Trypsinreaktion mit KO-DMEM wurde die Zellsuspension für 10 min auf einer mit 0,1 % Gelatine beschichteten 6-cm-Zellkulturschale inkubiert. Während dieser Zeit setzen sich die Fibroblasten ab und die mES-Zellen verbleiben im Überstand. Dieser wurde in unterschiedlichen

Verdünnungsstufen (1:50, 1:25, 1:12,5, 1:8,3) in KO-DMEM mit doppelter LIF-Konzentration auf Gelatine beschichteten 6-cm-Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Aggregation bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Aggregation wurde von Dr. Michael Hesse, Institut für Physiologie I der Universität Bonn, wie in Nagy *et al.*, 1993 beschrieben durchgeführt. Zur Überprüfung der Keimbahngängigkeit wurden aus der Aggregation resultierende Nachkommen mit dunkler Fellfarbe (Chimären) mit Wildtyp-Mäusen (CD1) verpaart. Nachkommen aus dieser Verpaarung konnten anhand ihrer Fellfarbe als transgene (dunkle Fellfarbe) oder Wildtyp-Tiere (weiße Fellfarbe) identifiziert werden. In den Folgegenerationen wurde das Vorliegen des Transgens durch eine PCR (siehe 2.10.11.1) überprüft.

2.15.2 Organentnahme aus adulten Tieren

Adulte Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Der Bauchraum wurde geöffnet, wobei Fell- und Muskelschichten mit einer Schere durchtrennt wurden. Danach wurden die Organe entnommen und in gekühltes PBS überführt, wobei entnommene Herzen durch die Aorta retrograd perfundiert wurden (siehe 2.15.5). Anschließend wurden die Organe entweder für immunhistologische Färbungen mit 4 % PFA-Lösung fixiert (siehe 2.14.1), für Proteinextraktionen (siehe 2.11.1) in Flüssigstickstoff schockgefroren oder für RNA-Isolationen (siehe 2.10.10) verwendet.

2.15.3 Präparation embryonaler Herzen

Embryonale Kardiomyozyten eignen sich besonders als Modellsystem zur Untersuchung der Myofibrillogenese und myofibrillärer Funktionen *in vitro* (Ehler *et al.*, 2013). Zur Präparation embryonaler Kardiomyozyten wurde das trächtige Muttertier durch zervikale Dislokation getötet und der Bauchraum nach Desinfektion mit 70 % Ethanol eröffnet. Der Uterus wurde an den beiden Uterushörnern herausgetrennt, die Embryonen herauspräpariert und in eiskaltem PBS überführt und von Plazenta und Amnion befreit. Die Embryonen wurden dekapitiert und das Herz mit einer Pinzette aus dem Brustraum des Tieres gezogen. Die entnommenen Herzen wurden fixiert (siehe 2.15.5) und für Immunfluoreszenzfärbungen (siehe 2.14.4) verwendet oder dissoziiert, um embryonale Kardiomyozyten zu gewinnen (siehe 2.13.4).

2.15.4 Dissoziation von embryonalen Kardiomyozyten aus der Maus

Harary und Farley konnten 1969 erstmals Rattenherzen erfolgreich dissoziieren und schlagende Kardiomyozyten über einen Zeitraum von 40 Tagen kultivieren (Harary *et al.*, 1960).

Um embryonale Kardiomyozyten zu dissoziieren wurden Embryonen (E16.5-18.5) wie unter 2.13.3 beschrieben präpariert und die Herzen isoliert. Diese wurden mit Hilfe einer Federschere zerkleinert, das zerkleinerte Gewebe in 750 µl Kollagenase B-Lösung aufgenommen und in diese

für 30 min bei 37 °C und 400 xg im Schüttler inkubiert. Um eine bessere Dissoziation zu erreichen, wurden die Gewebestücke alle 15 min in der Kollagenase B-Lösung auf- und abpipettiert. Anschließend wurden die embryonalen Kardiomyozyten durch Zentrifugation pelletiert (700 xg, 5 min, RT), die Kollagenase B-Lösung im Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml IMDM aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in 500 µl IMDM auf Deckgläschen ausgesät, die zuvor mit 0,1 % Fibronektion beschichtet worden waren.

2.15.5 Fixierung von adulten Herzen durch PFA-Perfusion

Um eine Inhibierung der Blutgerinnung zu erreichen, wurden der Maus 20 min vor Präparationsbeginn 150 µl Heparin (5000 U/ml) intraperitoneal gespritzt. Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet, mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Bauchdecke mit einer Schere geöffnet. Die Rippen wurden durchtrennt, der Brustkorb zurück geklappt und das gesamte Herz-Lungenpaket mit einer Pinzette gegriffen und isoliert. Die Organe wurden in eine 10 cm-Schale auf Eis überführt und das Herz unter Zuhilfenahme eines Makroskops von Fett-, Lungengewebe und Thymus befreit. Die Perfusion des Herzens mit PFA erfolgte retrograd nach Langendorff (Bell *et al.*, 2011). Das Herz wurde nach Freilegung der Aorta über diese auf eine entlüftete, mit PBS befüllte Kanüle aufgezoogen. Dabei wurde die Kanüle bis in den linken Ventrikel geschoben und die Aorta mittels eines Baumwollfadens auf der Kanüle fixiert. Über die Kanüle wurde das Herz mit einer entlüfteten, mit PBS befüllten Spritze verbunden. Durch leichtes Betätigen der Spritze wurde das Herz mit PBS gespült und das Blut aus dem Herzen entfernt. Danach wurde das Herz mit 10 ml 4 % PFA-Lösung perfundiert und in dieser ün bei 4 °C fixiert.

2.15.6 Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten durch Langendorff-Dissoziation

Die Vorgehensweise zur Tötung der Maus und der Herausnahme des Herzens entsprach der in 2.15.5 beschriebenen. Die Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten richtet sich nach der Methode von Vahouny *et al.*, 1970. Zur Unterdrückung der Kontraktion betrug die Konzentration an BDM in allen hier verwendeten Lösungen 25 mM. Durch Anschluss der Perfusionsanlage an ein Wasserbad wurde die jeweilige Perfusionslösung auf 37 °C erwärmt. Nach Spülen mit PBS wurde das Herz über die Kanüle an die Langendorff-Perfusionsanlage angeschlossen und mit 30 ml Ca²⁺-freier Tyrode-Lösung perfundiert. Dabei wurde der Durchfluss so reguliert, dass die Perfusionsgeschwindigkeit in etwa 2,2 ml/min betrug (Wolska *et al.*, 1996). Danach erfolgte eine 12 min Perfusion des Herzens mit Enzymlösung, wodurch das Herz eine weiche Struktur bekam. Durch die Volumenvergrößerung und die Entfernung des Bluts aus den Koronargefäßen bekam das Herz ein „blaßes“ Aussehen (Louch *et al.*, 2012). Nach Erreichen dieses Zustandes, wurde das Herz von der Langendorff-Perfusionsanlage genommen und die nicht-perfundierten Atrien

abgetrennt. Anschließend wurden die Ventrikel in 5 ml Enzymlösung in einer 60 mm-Schale mit einer Pinzette mechanisch zerkleinert, um möglichst viele einzelne Kardiomyzyten zu erhalten. Die Enzymreaktion wurde durch 5 ml Stopp-Lösung beendet und grobe Gewebestücke und Zelltrümmer über einen 100 µm-Zellfilter abgetrennt. Der Durchfluss wurde für 5 min bei 200 xg und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 10 ml Stopp-Lösung aufgenommen.

2.15.7 Kryoläsionen des Herzens

Die Kryoläsionen wurden von Dr. Annika Ottersbach, Institut für Physiologie I der Universität Bonn, wie in Roell *et al.*, 2002 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde ein in flüssigem Stickstoff vorgekühlter 3 mm-Kupferstempel drei Mal 20 s auf den linken Ventrikel gedrückt.

2.15.8 Linksventrikuläre hämodynamische Messungen mittels eines Katheters

Die linksventrikulären Katheteruntersuchungen wurden von Dr. Annika Ottersbach, Institut für Physiologie I der Universität Bonn, durchgeführt und ausgewertet. Während dieser Messungen wurde über einen Druck-Volumen-Katheter (Ø 1,4 French) sowohl der Druck in mmHg als auch das Volumen des linken Ventrikels in µl während der Herzaktion aufgezeichnet und die Ergebnisse im Anschluss in einem Druck-Volumen-Diagramm dargestellt (Pacher *et al.*, 2008).

2.15.9 Ultrastrukturen des Herzens

Die Ultrastrukturen des Herzens wurden von Dr. Andreas Unger, Institut für Kardiovaskuläre Physiologie der Universität Bochum, wie in Chevessier *et al.*, 2005 beschrieben durchgeführt.

2.16 Computeranwendungen

2.16.1 Computerprogramme

Die im Folgenden aufgeführten Programme wurden in dieser Arbeit verwendet:

- zur Textverarbeitung wurde „Word 2003“ (Microsoft) verwendet.
- die Erstellung der Oligonukleotide, die Simulation der Klonierung, die Analyse von DNA-Sequenzen und die graphische Darstellung von Plasmidkarten wurde mit dem Programm „Clone manager (Sci Ed Software) durchgeführt.
- zur Auswertungen der qPCRs wurde das Programm „Rotor-Gene 6000“ benutzt.
- die Tabellenkalkulationen und Erstellung von Graphiken erfolgten mit „Excel 2003“ (Microsoft) und „GraphPad Prism 5“ (GraphPad Software).
- Bilddarstellungen und Quantifizierungen wurden mit den Programmen „Zen 2012“ (Zeiss) und „ImageJ“ (NIH) durchgeführt.

- FACS-Analysen/-Quantifizierungen erfolgten mit dem Programm „Flow Jow 7.5“ (FLOWJO LLC).

2.16.2 Datenbanken und Internetprogramme

Die nachfolgend aufgeführten Datenbanken und Internetprogramme wurden für Recherchen und Sequenzanalysen verwendet:

- die Literaturrecherche erfolgte über „Pubmed“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>).
- Sequenzanalysen wurden mit Hilfe der „UCSC Genome Bioinformatics Site“ (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) durchgeführt.

2.17 Statistik

Die statistische Auswertung der gewonnenen Rohdaten wurde mittels des Programms „GraphPad Prism 5“ (siehe 2.16.1) durchgeführt. Die Untersuchung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des *t*-Tests bzw. einer Analyse der Varianz (Analysis of Variance, ANOVA, Posttest: Bonferroni) durchgeführt. Dabei war ein Effekt signifikant, wenn $p < 0,05$. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Werte sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

2.18 Durchführung von Experimenten durch andere Experimentatoren

Die in Tab. 20 aufgeführten Experimente wurden teilweise oder vollständig durch andere Experimentatoren durchgeführt.

Tab. 20. Durchführung von Experimenten durch andere Experimentatoren.

Experiment	Experimentatoren
Generierung transgener Mauslinien durch Aggregation von mES-Zellen mit diploiden Embryonen der Maus	Dr. Michael Hesse Patricia Freitag
Assistenz bei den FRAP-Experimenten und Auswertung der FRAP-Rohdaten	Julia Braune
Kryoläsionen des Herzens	Dr. Annika Ottersbach
Linksventrikuläre hämodynamische Messungen	Dr. Annika Ottersbach Esther Carls
Ultrastrukturuntersuchungen des Herzens	Dr. Andreas Unger

Alle anderen Experimente wurden von mir selbst durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung eines *in vitro* Modells für die P209L-BAG3opathie mit gewebespezifischer BAG3^{P209L}-eGFP-Expression

Zur Untersuchung der P209L-BAG3opathie sollte ein *in vitro* Modell zur Untersuchung des Pathomechanismus der Krankheit generiert und analysiert werden. Hierzu wurden mES-Zellen benutzt, die sich durch eine hohe Proliferationsrate auszeichnen und sich durch ihre Fähigkeit der Differenzierung in Zellen der drei Keimblätter und damit in Muskelzellen als gutes *in vitro* Modell anbieten. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die Möglichkeit der Generierung einer transgenen Mauslinie aus bereits charakterisierten mES-Zellklonen (siehe 3.2).

3.1.1. Klonierung der α MHC-Konstrukte zur Expression von BAG3^{P209L}-eGFP in Kardiomyozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zuerst Konstrukte generiert, die eine ubiquitäre Expression von BAG3^{P209L}-eGFP als auch von BAG3^{WT}-eGFP unter Kontrolle des β -Aktin-Promotors möglich machen. Der β -Aktin-Promotor, der ein synthetisch hergestelltes Hybrid-Konstrukt bestehend aus β -Aktin-Promotor und CMV-Enhancer darstellt, führt zu hohen Expressionsleveln der entsprechenden Proteine in Säugetieren (Miyazaki *et al.*, 1989).

Die generierten Konstrukte wurden in mES-Zellen transfiziert, woraufhin diese sich abrundeten und von den Fibroblasten ablösten - ein Indiz dafür, dass die ubiquitäre Expression von BAG3^{P209L}-eGFP bzw. BAG3^{WT}-eGFP einen Zelltod in diesen Zellen auslöste. Dies konnte durch nachfolgende Experimente bestätigt werden, bei denen die apoptotischen Zellkerne mit einer Propidiumiodid-Färbung angefärbt und die Anzahl an mES-Zellen, in denen sich die Expression von BAG3^{P209L}-eGFP bzw. BAG3^{WT}-eGFP als zelltoxisch erwies, bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt).

Da die P209L-BAG3opathie unter anderem zu einer schweren restriktiven Kardiomyopathie führt, ist eine Untersuchung des Einflusses der BAG3^{P209L}-Mutation auf die Herzmuskulatur von großem Interesse. Nachfolgend wurden daher Konstrukte zur gewebespezifischen Expression der BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-Fusionsproteine generiert (Abb. 11 A).

Um die humane BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-Expression ausschließlich in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde der α MHC-Promotor aus *Mus musculus* gewählt. Dessen Gen kodiert für die α -Untereinheit der schweren Kette des kardialen Myosins. Während α MHC in der Embryonalentwicklung vorwiegend in atrialen Kardiomyozyten exprimiert wird, führt der Einfluss von Thyroidhormonen im spätembryonalen und adulten Organismus zu einem Wechsel von β MHC- zu α MHC-Expression in ventrikulären Kardiomyozyten (Lyons *et al.*, 1990).

Für die Herstellung der α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukte wurden einerseits das zuvor im Rahmen dieser Arbeit generierte CAG-BAG3^{WT}-eGFP-Plasmid, andererseits das pTYB12-BAG3^{P209L}-Plasmid (zur Verfügung gestellt von Prof. Jörg Höhfeld, Institut für Zellbiologie der Universität Bonn) verwendet. Beide Plasmide wurden zur Amplifikation in *E. coli* Bakterien transformiert und die Plasmid-DNA unter Durchführung einer Endotoxin-freien Maxi-Präparation isoliert und aufgereinigt. Die DNA des CAG-BAG3^{WT}-eGFP-Plasmids wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* (*blunt*) und *SalI* (*sticky*) gespalten und ein DNA-Fragment einer Größe von 6605 bp (DNA-Sequenz CAG-eGFP polyA) aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt. Der Austausch des Bereichs der BAG3^{WT}-cDNA-Sequenz gegen den äquivalenten Bereich der BAG3^{P209L}-DNA-Sequenz mit der Punktmutation zur Herstellung des CAG-BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukts, erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* (*blunt*) und *SalI* (*sticky*), wobei ein 896 bp großes DNA-Fragment (Regionen aus BAG3^{P209L} und eGFP polyA) aus dem pTYB12-BAG3^{P209L}-Plasmid isoliert und aufgereinigt wurde (Abb. 11 B). Für den Austausch des CAG- gegen den α MHC-Promotor wurde das CAG-BAG3^{WT}-eGFP-Plasmid über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* (*blunt*) und *NotI* (*sticky*) gespalten und ein 5037 bp großes DNA-Fragment aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt. Ein 8860 bp großes DNA-Fragment, das den 5437 bp großen α MHC-Promotor einschloss, wurde aus dem α MHC-eGFP-Plasmid (zur Verfügung gestellt von Dr. Caroline Geisen, Institut für Physiologie I der Universität Bonn) über die Restriktionsschnittstellen *AgeI* (*blunt*) und *NotI* (*sticky*) isoliert und aufgereinigt und mit dem 5037 bp großen DNA-Fragment ligiert (Abb. 11 C).

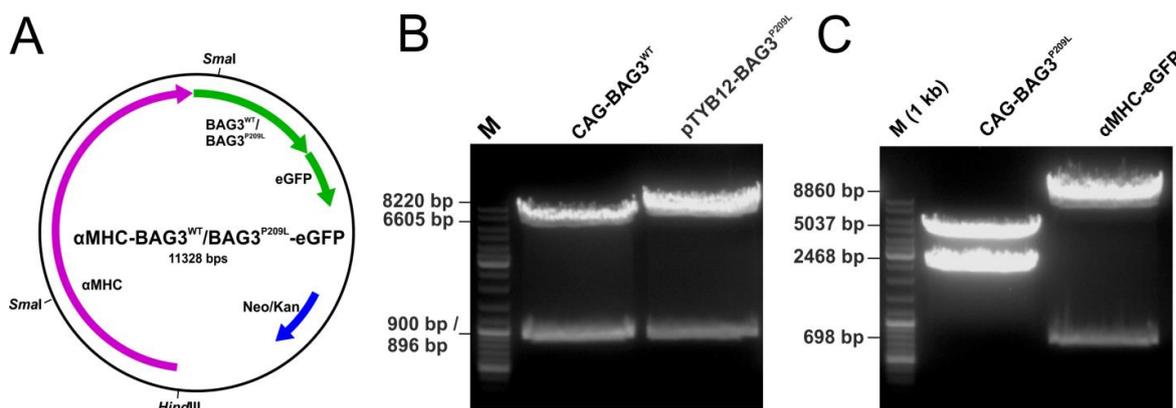


Abb. 11. Schematische Darstellung der Klonierung der BAG3^{WT}-/BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukte mit gewebe-spezifischem α MHC-Promotor. **A.** Plasmidkarte der CAG-BAG3^{WT}-/BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukte. **B.** Austausch der BAG3^{WT}- gegen die BAG3^{P209L}-DNA-Sequenz. Die Spaltung des CAG-BAG3^{WT}-Plasmids mit *EcoRI* und *SalI* führte zu zwei DNA-Fragmenten mit den Größen 6605 bp und 900 bp; das 6605 bp große DNA-Fragment wurde isoliert. Die Spaltung des pTYB12-BAG3^{P209L}-Plasmids mit *NdeI* und *SalI* resultierte in zwei DNA-Fragmente mit den Größen 8220 bp und 896 bp, von denen das 896 bp große DNA-Fragment isoliert wurde. **C.** Austausch des CAG-Promotors gegen den α MHC-Promotor. Das CAG-BAG3^{WT}-Plasmid wurde mit *EcoRI* und *NotI* gespalten, was zu zwei DNA-Fragmenten mit den Größen 5037 bp und 2468 bp führte, wobei das 5037 bp große DNA-Fragment isoliert wurde. Ein 8860 bp großes DNA-Fragment, das den 5437 bp großen α MHC-Promotor beinhaltete, wurde nach der Spaltung des α MHC-eGFP-Plasmids mit *AgeI* und *NotI* isoliert. M = 1 kb-DNA-Leiter.

Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* Bakterien transformiert, die daraus resultierenden Kanamycin-resistenten Einzelkolonien in Flüssigkulturen herangezogen und deren Plasmid-DNA unter Durchführung einer Mini-Präparation isoliert. Durch eine Testspaltung mit *Sma*I konnte der Erfolg der Klonierung anhand der Bandengröße der Spaltungsprodukte (DNA-Fragmente von 7569 bp und 3759 bp) in einer Agarosegelelektrophorese überprüft werden (Abb. 12). Eine nachfolgende Sequenzierung der positiv identifizierten Plasmid-DNA bestätigte die Ergebnisse.

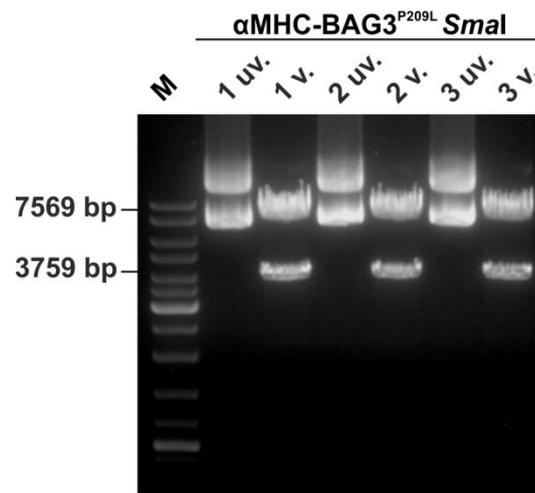


Abb. 12. Elektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA nach Testspaltung mit *Sma*I. Der Erfolg der Klonierung wurde durch die Bandengröße der Spaltungsprodukte in einer Agarosegelelektrophorese überprüft und zeigte zwei DNA-Fragmente der erwarteten Größen 7569 bp und 3759 bp, hier am Beispiel von drei Bakterienklonen gezeigt. uv. = unverdaute Plasmid-DNA, v. = Plasmid-DNA nach Spaltung mit *Sma*I. M = 1 kb-DNA-Leiter.

3.1.2 Transiente Transfektion von embryonalen Kardiomyozyten

Um den Effekt der humanen BAG3^{WT}-eGFP- und BAG3^{P209L}-eGFP-Expression und die Lokalisation der entsprechenden Proteine innerhalb der Zelle zu dokumentieren, wurden die Konstrukte durch eine transiente Transfektion in embryonale Kardiomyozyten, die aus E14.5-16.5 alten Herzen isoliert wurden, eingebracht.

Dabei konnte 48 h nach Transfektion der embryonalen Kardiomyozyten eine Lokalisation des BAG3^{WT}-eGFP-Proteins an die Z-Scheiben nachgewiesen werden, was durch eine Färbung mit dem Kardiomyozyten spezifischen Marker α -Aktinin gezeigt werden konnte (Abb. 13 A, Pfeile in Vergrößerung im unteren Bild in rechter Spalte). Im Gegensatz dazu resultierte die Expression des BAG3^{P290L}-eGFP-Proteins in einer Bildung von BAG3^{P290L}-eGFP-Aggregaten in embryonalen Kardiomyozyten. Die Lokalisation des α -Aktinin an den Z-Scheiben war unbeeinträchtigt (Abb. 13 B, Pfeile in Vergrößerung in unterem Bild in rechter Spalte). Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, dass BAG3^{P209L}-eGFP länger und vor allem früher in der Entwicklung der Kardiomyozyten exprimiert werden muss, um das humane Krankheitsbild mit einer

Desintegrationen der Z-Scheiben hervorzurufen. Aus diesem Grund wurden im Folgenden mES-Zellen stabil mit den Konstrukten transfiziert.

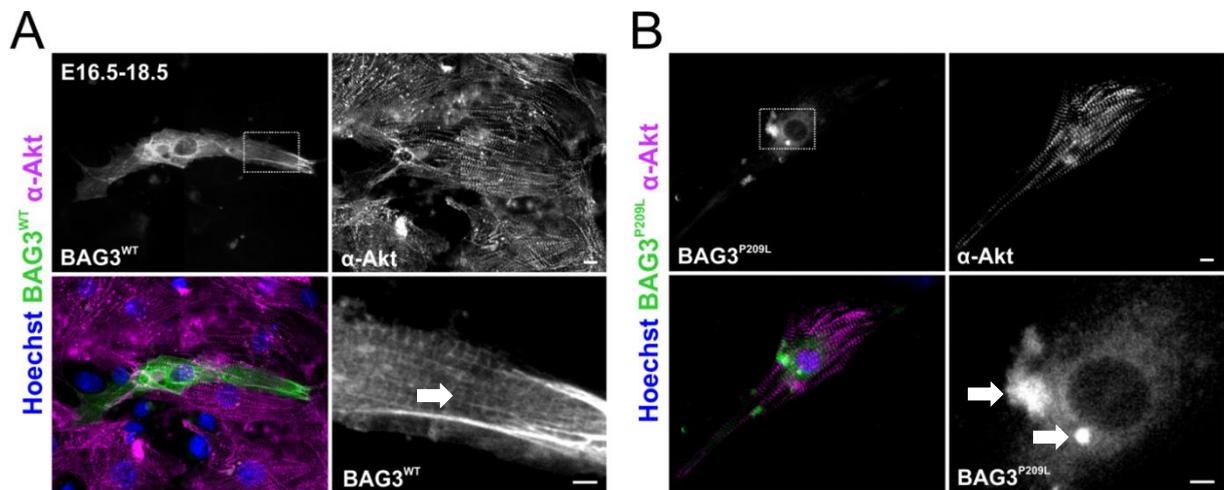


Abb. 13. Transiente Transfektion von α MHC-BAG3^{WT}-eGFP bzw. α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP in embryonalen Kardiomyozyten. Aus E14.5-16.5 alten, embryonalen Herzen isolierte Kardiomyozyten wurden mit einem humanen BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt transfiziert. **A.** Das BAG3^{WT}-eGFP-Protein lokalisierte an den Z-Scheiben, was durch eine Färbung mit dem kardialen Marker α -Aktinin gezeigt wurde (Pfeil in Vergrößerung im unteren Bild in rechter Spalte). **B.** Die Expression des BAG3^{P209L}-eGFP in embryonalen Kardiomyozyten führte zur Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten. Die Lokalisation von α -Aktinin an den Z-Scheiben war jedoch unbeeinträchtigt (Pfeil in Vergrößerung im unteren Bild in rechter Spalte). α -Aktinin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. Maßstab: 10 μ m (Bilder in linker Spalte und oberes Bild in rechter Spalte in A bzw. B), 2 μ m (unteres Bild in rechter Spalte in A bzw. B).

3.1.3 Stabile Transfektion von mES-Zellen

Für die stabile Transfektion der mES-Zellen mit den humanen α MHC-BAG3^{WT}-eGFP und α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukten wurde eine Elektroporation durchgeführt. Es wurden mES-Zellen gewählt, da diese sich durch eine hohe Proliferationsrate auszeichnen und außerdem die Möglichkeit einer Differenzierung in Kardiomyozyten gegeben ist. Außerdem erleichterte die *in-vitro*-Charakterisierung stabil transfizierter BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-mES-Zellen bzw. die Auswahl derjenigen mES-Zellklone mit den erwünschten Eigenschaften, die Generierung einer transgenen Mauslinie (siehe 2.13.1).

Zwei Tage nach Elektroporation der mES-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten konnten die mES-Zellklone, die das Transgen stabil in das Genom integriert hatten, durch Behandlung mit Neomycin selektiert werden (Abb. 14 A). Dabei lieferte die Transfektion der mES-Zellen mit dem BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukt 64 stabile Transfektanten, während aus der Transfektion der mES-Zellen mit dem BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt 72 stabile Transfektanten resultierten. Die Transfektanten wurden expandiert und ihre genomische DNA isoliert, um sie mittels einer PCR auf die Integration des gewünschten Transgens zu untersuchen.

Die PCR zeigte dabei ein positives Ergebnis in 49 der 64 mES-Zellklone der Transfektion mit dem BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukt und in 54 der 72 mES-Zellklone der Transfektion mit dem BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt (Abb. 14 B). Die mES-Zellklone mit einem positiven Ergebnis in der PCR wurden danach mittels der Methode des hängenden Tropfen differenziert.

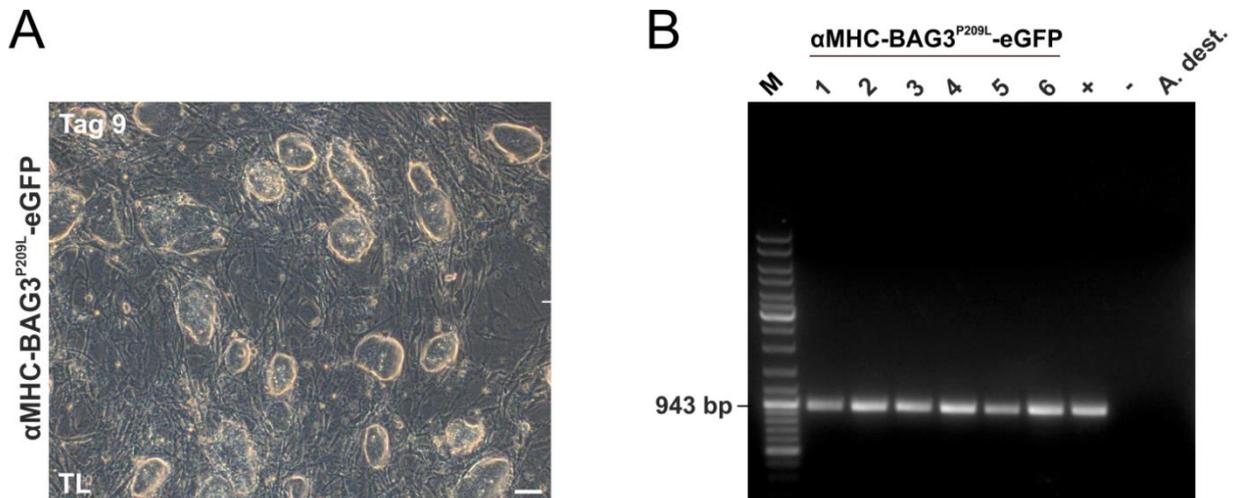


Abb. 14. Stabile Transfektion von mES-Zellen mit α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP. **A.** Die Transfektion der mES-Zellen mit dem BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt lieferte nach Selektion mit Neomycin stabile Transfektanten. **B.** Aus den stabilen Transfektanten wurde die genomische DNA isoliert und mit Hilfe einer PCR ermittelt, ob das Transgen im Genom der mES-Zellen integriert war. M = 1 kb-DNA-Leiter, Maßstab: 100 μ m.

3.1.4 Differenzierung von mES-Zellen in Kardiomyozyten

In vitro können mES-Zellen mittels der Methode des hängenden Tropfen in Zellen der drei Keimblätter (Endo-, Ekto- und Mesoderm) differenziert werden (Eiges *et al.*, 2002). Durch die Kardiomyozyten-spezifische Expression von BAG3^{WT}-eGFP- und BAG3^{P209L}-eGFP jedoch nur die Differenzierung in mES-Zell-abgeleitete Kardiomyozyten von Interesse.

Zur Differenzierung wurden die kryokonservierten mES-Zellklone aufgetaut, expandiert und die Bildung von Embryonalkörpern (EBs) durch hängende Tropfen durchgeführt. Die gebildeten EBs, die in Suspension gehalten wurden, zeigten ab Tag 9 der Differenzierung schlagende Bereiche, die eGFP⁺ waren und für die Bildung mES-Zell abgeleiteter Kardiomyozyten mit BAG3^{WT}-eGFP- und BAG3^{P209L}-eGFP-Expression sprachen (siehe Abb. 15, obere Reihe). Durch Plattierung der EBs auf mit Gelatine beschichteten Schalen an Tag 9 der Differenzierung, konnte der Anteil an in Kardiomyozyten differenzierte Zellen erhöht und schlagende, eGFP⁺ Areale beobachtet werden (siehe Abb. 15, untere Reihe).

Von den 49 stabilen Transfektanten, die aus der Transfektion der mES-Zellen mit dem BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukt resultierten und in der PCR ein positives Ergebnis erzielten, zeigten 15 mES-Zellklone in der Differenzierung zu Kardiomyozyten BAG3^{WT}-eGFP⁺ Signale. Dabei wurden bei

Fluoreszenzaufnahmen mit derselben Belichtungszeit für den GFP-Kanal (1000 ms) graduelle Unterschiede im Expressionsniveau von BAG3^{WT}-eGFP deutlich, was dazu führte, dass nur drei mES-Zellklone (BAG3^{WT}-eGFP-mES-Zellklon 3, 5 und 9) mit starker BAG3^{WT}-eGFP-Expression für nach-folgende Experimente ausgewählt wurden.

Die 54 stabilen Transfektanten aus der Transfektion der mES-Zellen mit dem BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt, die auch in der PCR ein positives Ergebnis ergaben, lieferten zehn mES-Zellklone mit Kardiomyozyten-spezifischen BAG3^{P209L}-eGFP-Signalen. Auch hier wurden bei Fluoreszenzaufnahmen mit derselben Belichtungszeit für den GFP-Kanal (1000 ms) graduelle Unterschiede im Expressionsniveau von BAG3^{P209L}-eGFP ersichtlich, wobei die Expression entweder unter dem Detektionslimit war, in schlagenden Kardiomyozyten gar keine BAG3^{P209L}-eGFP-Expression detektiert werden konnte oder so genannte „Mischklone“ vorlagen. Diese entstehen bei Bildung einer Kolonie aus zwei unterschiedlichen Ursprungszellen, in denen das Transgen an unterschiedlichen Positionen zufällig in das Genom der Zielzelle integriert ist. Nur ein mES-Zellklon zeigte starke Expression des Fusionsproteins in Kardiomyozyten (BAG3^{P209L}-eGFP-mES-Zellklon 2) und wurde für nachfolgende Experimente weiter verwendet. Bei einer sogenannten „Zeitreihe“, bei der BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP- EBs auf Gelatine plattiert und über einen Zeitraum von 14 Tage beobachtet und Fluoreszenzaufnahmen mit derselben Belichtungszeit für den GFP-Kanal (1000 ms) gemacht wurden, konnte weder eine Abnahme der BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Fluoreszenz in den schlagenden Bereichen der EBs aufgezeichnet werden, noch rundeten sich die Zellen ab (Daten nicht gezeigt). Somit erwies sich die Überexpression der beiden Fusionsproteine weder in den BAG3^{WT}-eGFP-mES-Zellklone 3, 5 und 9 noch im BAG3^{P209L}-eGFP-mES-Zellklon 2 als offensichtlich zelltoxisch.

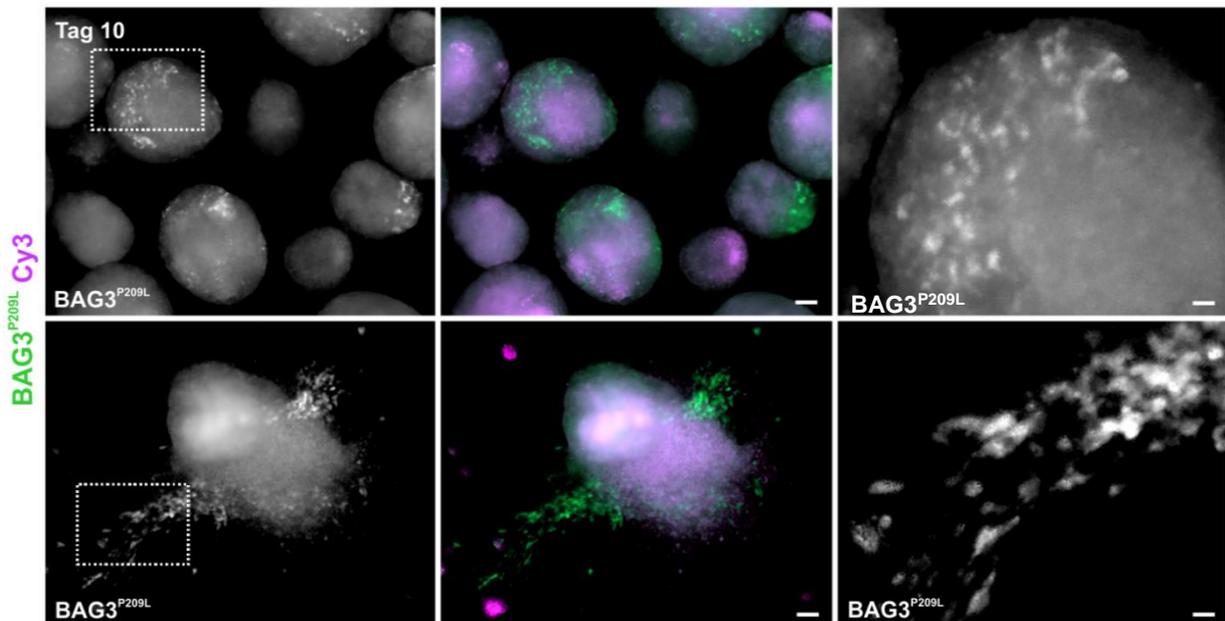


Abb. 15. Differenzierung der mES-Zellen in Zellen der drei Keimblätter mittels der Methode des hängenden Tropfen. EBs des BAG3^{P209L}-eGFP-mES-Zellklons 2 in Suspension (obere Reihe) und plattiert (untere Reihe) an Tag 10 der Differenzierung. Dabei bildeten sich Areale, die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression zeigten und schlugen. α -Aktinin-Färbung in magenta. Cy3 = Indocarbocyanin 3 (Autofluoreszenzkanal), Maßstab: 100 μ m (Bilder in linker und mittlerer Spalte), 20 μ m (Bilder in rechter Spalte).

Um die Spezifität der BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in Kardiomyozyten zu verifizieren, wurden EBs an Tag 10 der Differenzierung fixiert und eine Ko-Färbung mit dem kardialen Marker α -Aktinin durchgeführt (Abb. 15). Hierbei wurde deutlich, dass die Expression von BAG3^{P209L}-eGFP an Tag 10 der Differenzierung in den mES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten nicht einheitlich, sondern heterogen war. Somit wurde das Protein *in vitro* nicht in allen Kardiomyozyten gebildet und in den Kardiomyozyten, in denen es gebildet wurde, gab es graduelle Unterschiede hinsichtlich des Expressionsniveaus (Abb. 16).

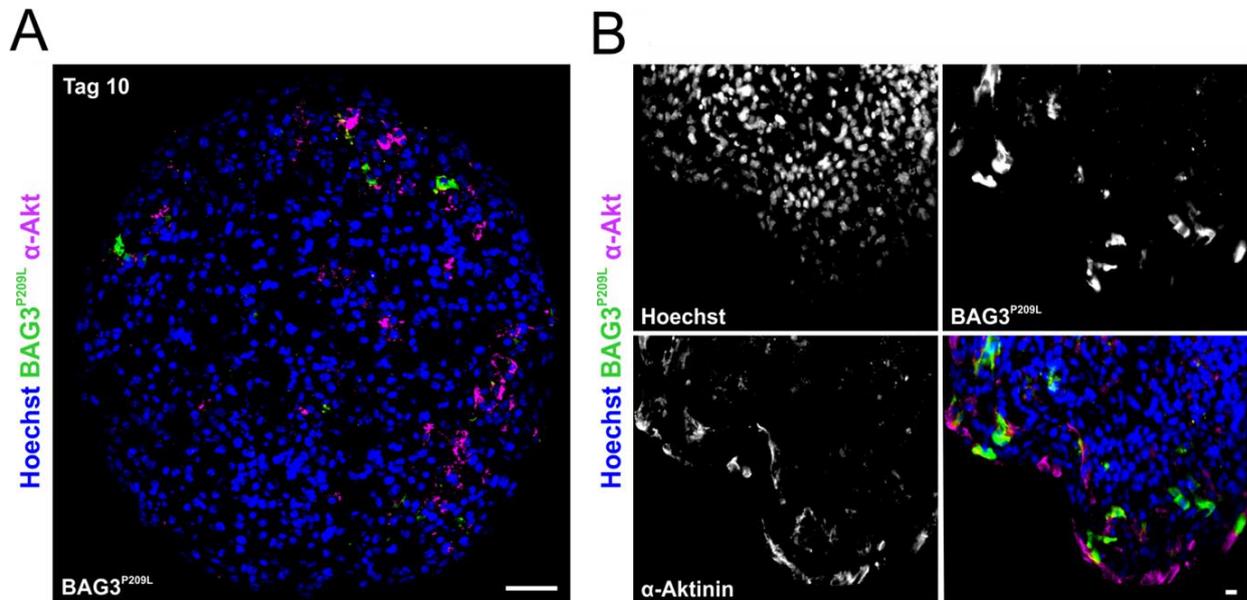


Abb. 16. Heterogene Expression von BAG3^{P209L}-eGFP in mES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten an Tag 10 der Differenzierung. **A.** Querschnitt durch einen EB, der in Suspension gehalten wurde. Eine Ko-Färbung mit dem kardialen Marker α -Aktinin verifiziert die Spezifität die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in mES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten, zeigte aber auch, dass nicht in allen Kardiomyozyten BAG3^{P209L}-eGFP gebildet wurde. **B.** Auch in plattierten EBs konnte in mES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten eine heterogene BAG3^{P209L}-eGFP-Expression beobachtet werden. α -Aktinin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in weiss bzw. blau. Maßstab: 20 μ m.

Um die genaue Lokalisation der BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Proteine innerhalb der Kardiomyozyten noch besser aufzulösen und zu evaluieren, wo bzw. an welchen Strukturen die Proteine dort genau lokalisieren, war eine Dissoziation der EBs in Einzelzellen notwendig.

3.1.5 mES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten bilden BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate *in vitro*

Um die Lokalisation der beiden BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Proteine in den Kardiomyozyten präzise aufzulösen und zur Evaluierung der Z-Scheibenstruktur der Kardiomyozyten, erfolgte an Tag 9 der Differenzierung die Dissoziation der EBs in Einzelzell-suspensionen. Die Einzelzellen wurden replattiert, an Tag 12 der Differenzierung fixiert und die Z-Scheibenstruktur durch eine Ko-Färbung mit dem kardialen Marker α -Aktinin bestimmt.

Dabei wurden sowohl für die mES-Zelllinie des BAG3^{WT}-eGFP-Klons 5 als auch für den BAG3^{P209L}-eGFP-Klon 2 pro Experiment ($N=3$) jeweils 50 Kardiomyozyten aufgenommen ($n=150$) und die Z-Scheibenstruktur anhand von zwei unterschiedlichen Kategorien, den Kategorien „normal“ und „abnormal“, beurteilt. Während die Kategorie „normal“ alle Kardiomyozyten umfasste, bei denen das BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Protein an der Z-Scheibe lokalisiert war, wurden unter der Kategorie „abnormal“ die Kardiomyozyten zusammengefasst, die jegliche Form von Aggregaten, seien es Aggregate der Fusionsproteine oder α -Aktinin-Aggregate, enthielten.

Dabei zeigte die Mehrheit der mES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten, die das BAG3^{WT}-eGFP-Protein exprimierten, intakte Z-Scheiben und keine Aggregatbildung (Abb. 17 A, obere Reihe). Die Quantifizierung ergab einen prozentualen Anteil von $70 \pm 5,29 \%$, während der Anteil an Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben bzw. mit Aggregaten bei $30 \pm 5,29 \%$ lag (Abb. 17 B). In Gegensatz dazu konnte bei den meisten mES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten, die das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein exprimierten, ein erhöhter Anteil an Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben bzw. Aggregaten beobachtet werden (Abb. 17 A untere Reihe). Dieser lag bei $66,67 \pm 6,43 \%$, wohingegen nur $34 \pm 5,29 \%$ der Kardiomyozyten intakte Z-Scheiben und keine Bildung von Aggregaten aufwiesen und demzufolge in die Kategorie „normal“ eingestuft wurden (Abb. 17 B). Somit stellen aus mES-Zellen-abgeleitete Kardiomyozyten ein gutes *in vitro* Modell zur Untersuchung des Pathomechanismus dar.

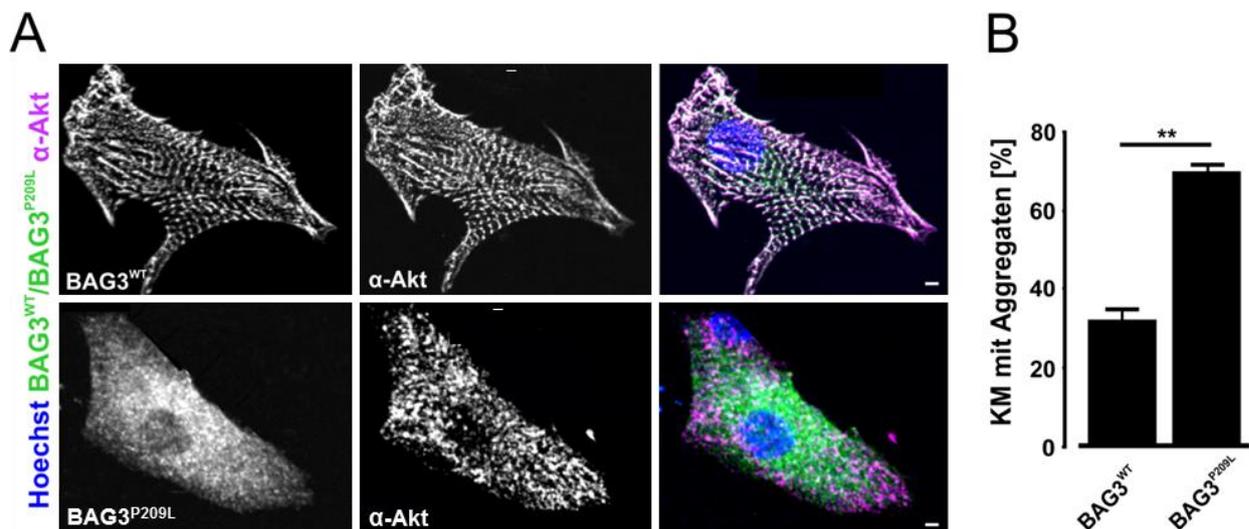


Abb. 17. Lokalisation der BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Proteine in mES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten. **A.** Während die Mehrheit der Kardiomyozyten, die BAG3^{WT}-eGFP exprimierten, intakte Z-Scheiben hatten und somit der Anteil an Kardiomyozyten mit Aggregaten nur bei $30 \pm 5,29 \%$ lag, fanden sich bei den Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, deutlich mehr Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben. **B.** Quantifizierung der Z-Scheibenstruktur anhand des prozentualen Anteils der Kardiomyozyten mit Aggregaten. α -Aktinin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. KM=Kardiomyozyten. $N=3$, $n=150$. $*= p < 0.05$. Maßstab: 10 μ m.

3.2 Generierung und Charakterisierung transgener Mausmodelle

Nachdem sich bereits in transfizierten Kardiomyozyten BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate beobachten ließen und sich aus mES-Zellen-abgeleitete Kardiomyozyten als ein gutes *in vitro* Modell zur Untersuchung des Pathomechanismus der Krankheit erwiesen, musste evaluiert werden, ob und in wie weit sich dies auf den lebenden Organismus übertragen lies. Dazu wurden im Folgenden *in vivo* α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP bzw. α MHC-BAG3^{WT}-eGFP Modelle in Form von transgenen Mäusen generiert.

3.2.1 Auswahl geeigneter mES-Zellklone für die Aggregation mit tetraploiden Embryonen

Zur Generierung der beiden transgenen Mauslinien aus den mES-Zellklonen wurde die Methode der Aggregation von mES-Zellen mit diploiden Embryonen angewandt (Nagy *et al.*, 1993).

Dabei wurden die diploiden mES-Zelllinien α MHC-BAG3^{WT}-eGFP Klon 5 bzw. α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP Klon 2 mit diploiden Wildtypembryonen aus CD1 Mäusen aggregiert. Die Auswahl der mES-Zellklone für die Aggregation erfolgte hierbei nach der Expressionsstärke der Fusionsproteine in mES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten, der Spezifität des Signals, dem Differenzierungspotential und dem Karyotyp der entsprechenden mES-Zelllinie. Da die *in-vitro*-Kultivierung und genetische Manipulation von mES-Zellen zu chromosomalen Aberrationen und epigenetischen Veränderungen des Genoms führen kann und dies den Erfolg der diploiden Komplementation und vor allem die Keimbahngängigkeit der Chimären deutlich vermindert (Carstea *et al.*, 2009), war es wichtig, die mES-Zellen durch einen zeitigen Mediumwechseln mit Nährstoffen zu versorgen bzw. durch eine „Passage“ immer in der logarithmischen Phase des Zellzyklus zu halten. Nach Isolierung und Fixierung der Chromosomen konnte deren absolute Anzahl pro Zellkern mittels einer Hoechst-Färbung festgelegt werden.

Die Karyotypisierung der mES-Zelllinie α MHC-BAG3^{WT}-eGFP Klon 5 lieferte dabei 70 % Kerne mit 40 Chromosomen, 26,67 % Kerne mit 41 Chromosomen und 3,3 % Kerne mit 39 Chromosomen ($n=40$ ausgezählte Karyogramme). Die Auswertung der Karyotypisierung der mES-Zelllinie α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP Klon 2 ergab 73,33 % Kerne mit 40 Chromosomen, 6,67 % Kerne mit 41 Chromosomen und 6,67 % Kerne mit 39 Chromosomen ($n=40$ ausgezählte Karyogramme) und ist im Folgenden beispielhaft dargestellt (Abb. 18). Somit hatten beide mES-Zelllinien größtenteils einen normalen Karyotyp mit 40 Chromosomen und kamen für die Generierung transgener Mauslinien in Betracht.

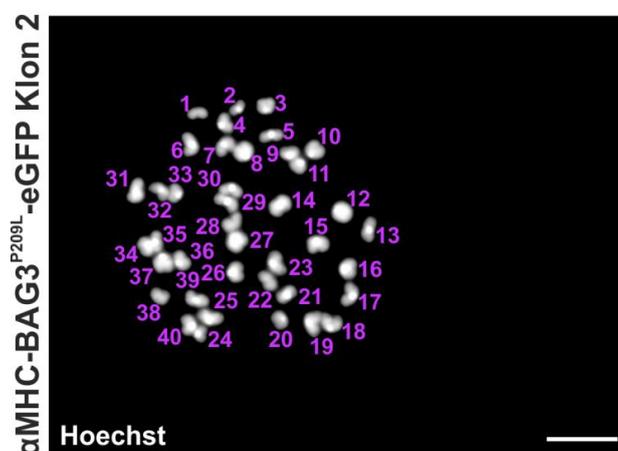


Abb.18. Karyogramm der transgenen mES-Zelllinie α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP Klon 2. Die Zellteilung der mES-Zellen wurde durch Verwendung von Colchizin in der Metaphase des Zellzyklus gestoppt. Das dargestellte Karyogramm zeigt 40 Chromosomen, die zur Visualisierung mit Hoechst gefärbt wurden. $n=40$. Maßstab: 10 μ m.

3.2.2 Analyse der Expression von BAG3^{P209L}-eGFP in postnatalen Herzen

Nach Erzeugung der transgenen Mauslinien durch Aggregation der mES-Zellen mit diploiden Embryonen (siehe 2.13.1), wurden die aus der Aggregation resultierenden Nachkommen mit dem höchsten Fell-Chimärismus mit Wildtyp-Mäusen verpaart. Männliche Nachkommen aus dieser Verpaarung, in denen anhand einer PCR das Vorliegen des Transgens im Genom nachgewiesen werden konnte, wurden zur weiteren Zucht verwendet.

Dabei war das Verhältnis der Nachkommen in der F2-Generation in Übereinstimmung mit dem Mendelschen Gesetz (3:1), wobei sich transgene Tiere nicht von ihren Wildtyp-Geschwistertieren unterschieden. Auch in Bezug auf ihr Verhalten, die Lebenserwartung und die Fertilität waren keine Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren auszumachen. Nachfolgend wurde immer ein hemizygot transgenes α MHC-BAG3^{WT}-eGFP- bzw. α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Männchen mit einem Wildtyp-Weibchen verpaart; die Herzen dieser Nachkommen wurden zur Analyse der α MHC-BAG3^{WT}-eGFP- bzw. α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Expression verwendet.

Hierzu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Entwicklung der Mäuse (P 1, P 3, P 6, P 10) deren Herzen entnommen und die Expression der beiden Fusionsproteine in den Atrien bzw. den Ventrikeln anhand der eGFP-Fluoreszenz dokumentiert bevor die Herzen fixiert und Kryoschnitte angefertigt wurden.

Obwohl der α MHC-Promotor in der Embryonalentwicklung in atrialen Kardiomyozyten aktiv ist (Lyons *et al.*, 1990), war weder in embryonalen Herzen der α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP- noch in der α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie eine Expression der Proteine detektierbar (Daten im Anhang).

In postnatalen Herzen der α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie konnte erstmals an P 1 eine starke Expression des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins in den Atrien beobachtet werden, die an P 3 in gleicher Intensität beobachtet werden konnte (Abb. 19 A, erste und zweite Spalte von links, mittlere Reihe). Im Ventrikel war weder an P 1 noch an P 3 eine Expression des Proteins nachweisbar (Abb. 19 A, erste und zweite Spalte von links, untere Reihe).

Im weiteren Verlauf der Herzentwicklung nahm die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in den Atrien ab, so dass an P 6 nur noch wenige Bereiche in den Atrien eGFP+ waren (Abb. 19 A, zweite Spalte von rechts, mittlere Reihe), wohingegen im Ventrikel erste Bereiche mit BAG3^{P209L}-eGFP-Expression detektiert werden konnten (Abb. 19 A, zweite Spalte von rechts, untere Reihe). Dieser Prozess ist auf den Einfluss von Thyroidhormonen im postnatalen Entwicklungsstadium zurück zu führen, der einen Wechsel von β MHC- zu α MHC-Expression in ventrikulären Kardiomyozyten mit sich bringt. Somit sollten in diesem Entwicklungsstadium Atrien und Ventrikel den α MHC-Promoter exprimieren (Lyons *et al.*, 1990).

Während die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression im Ventrikel relativ konstant blieb (Abb. 19 A, zweite Spalte von rechts, untere Reihe), nahm sie in den Atrien ab, so dass dort an P 10 eher einzelne Areale mit BAG3^{P209L}-eGFP-Expression vorherrschten (Abb. 19 A, erste Spalte von rechts, mittlere Reihe). Somit zeigte sich, ebenso wie *in vitro* in den mES-Zellen beobachtet, auch *in vivo* eine Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression und wurde das Protein nicht in allen Kardiomyozyten gebildet.

Die postnatalen Herzen der α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie zeigten erst ab P 10 eine Expression des BAG3^{WT}-eGFP-Proteins im Ventrikel (Abb. 19 B, rechte Spalte, untere Reihe); vor diesem Zeitpunkt war weder in den Atrien noch im Ventrikel eine Expression auf makroskopischer Ebene nachweisbar (Abb. 19 B, rechte Spalte, mittlere Reihe).

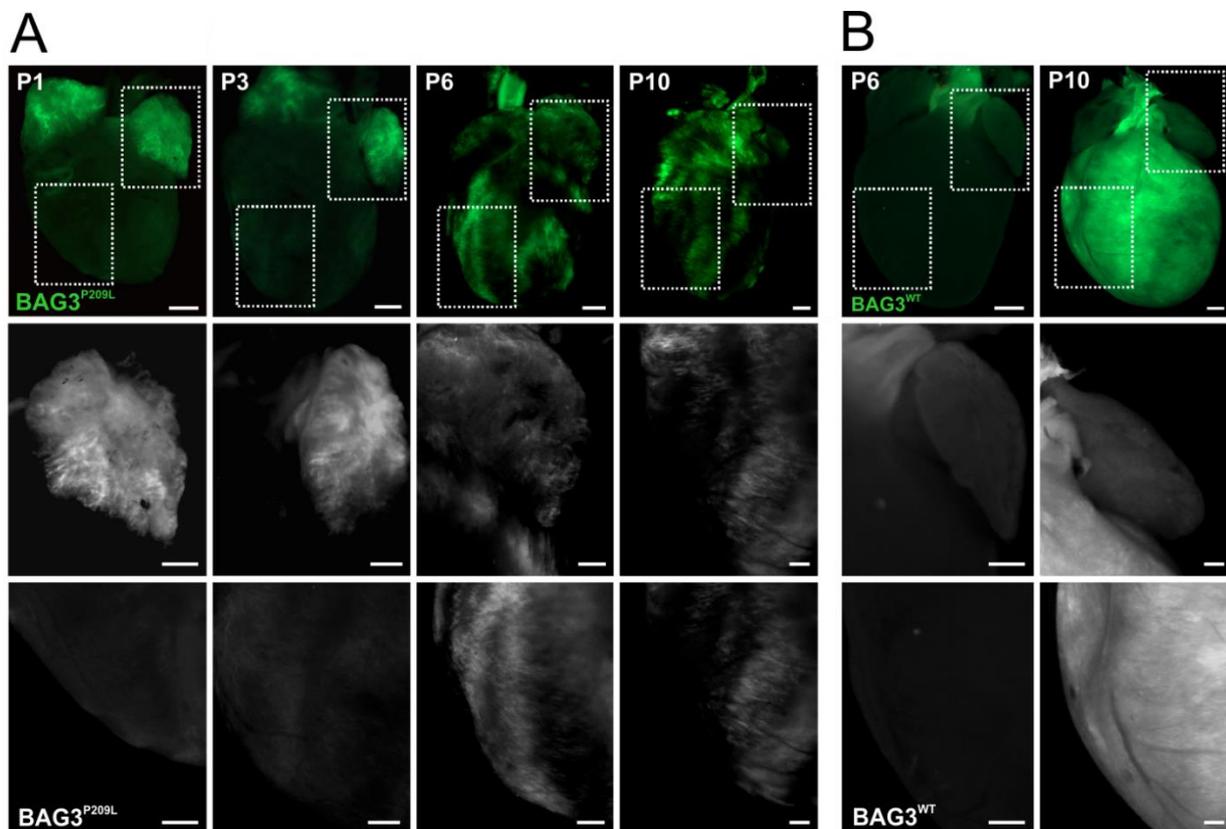


Abb. 19. Expression von BAG3^{P209L}-eGFP und BAG3^{WT}-eGFP in postnatalen Herzen. **A.** Während sich die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression an P 1 und P 3 makroskopisch auf die Atrien beschränkte, nahm sie dort bis P 6 bzw. P 10 ab und war vorwiegend in bestimmten Arealen zu finden und im Ventrikel nachweisbar. **B.** In postnatalen Herzen, die das BAG3^{WT}-eGFP-Protein exprimierten, konnte erst ab P 10 eine eGFP-Fluoreszenz beobachtet werden. $n=15$. Maßstab: 500 μ m (Bilder in oberer Reihe in A und in B), 200 μ m (Bilder in mittlerer Reihe in A und B), 10 μ m (Bilder in unterer Reihe in A und B).

Nach Fixierung und Kryokonservierung der Herzen konnte die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in histologischen Schnitten mit einer höheren räumlichen Auflösung verfolgt werden. Dabei war das Protein an P 3 in atrialen Kardiomyozyten (Abb. 20 A) teilweise an der Z-Scheibe lokalisiert (Abb. 20 B). Es konnte aber auch eine beginnende Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten,

dem pathologischen Befund der Muskelbiopsien der Patienten entsprechend, im Bereich der Glanzstreifen festgestellt werden (Abb. 20 B, Pfeil in rechter Spalte, untere Reihe).

Die Tatsache, dass nicht alle ventrikulären Kardiomyozyten das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein bildeten, lies sich auch auf atrialen Kardiomyozyten übertragen, eine Beobachtung, die auch in adulten Herzen verifiziert werden konnte (siehe 3.2.3). Der prozentuale Anteil an BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten wurde nachfolgend quantitativ erfasst (siehe 3.2.4).

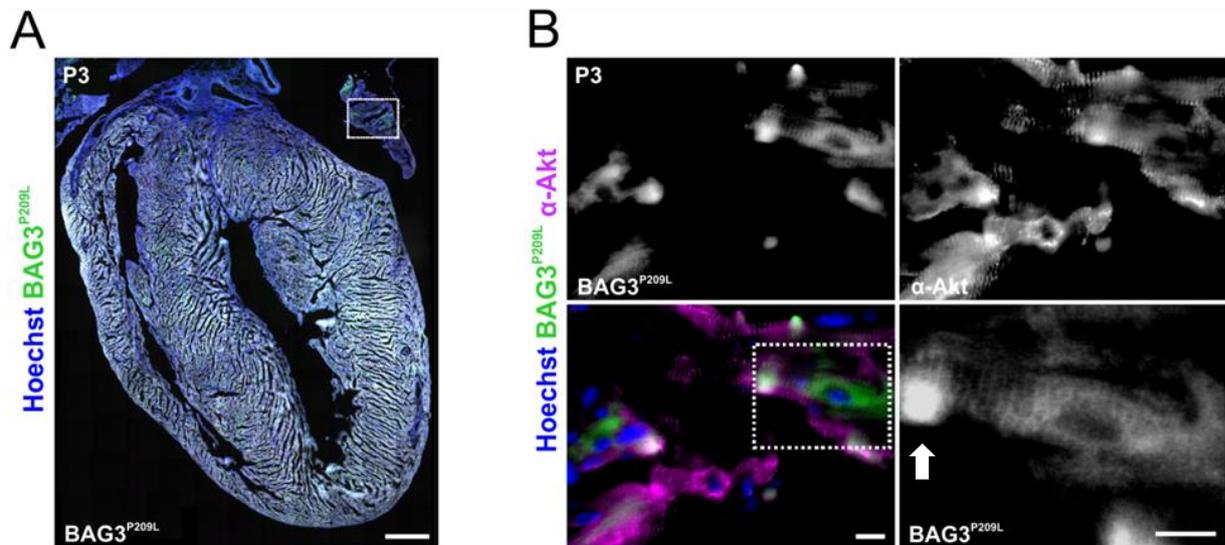


Abb. 20. Expression des BAG3^{P209L}-Proteins *in vivo* an P 3. A. Die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression beschränkte sich an P 3 auf die Atrien. **B.** BAG3^{P209L}-eGFP war an der Z-Scheibe lokalisiert, zeigte aber auch eine BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregatbildung, vermutlich im Bereich der Glanzstreifen (Pfeile in Vergrößerung im unteren Bild in rechter Spalte). α -Aktinin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. Maßstab: 500 μ m (A), 10 μ m (B).

3.2.3 Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Herzen

Während der weiteren Experimente wurden Herzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung aus den transgenen Mäusen entnommen, um die Expression des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins auf makroskopischer Ebene und in Schnitten zu verfolgen (Kontrollen in Form von makroskopischen Aufnahmen von Herzen aus Wildtyp-Geschwistertieren und PCR-Ergebnissen der Genotypisierung dieser Tiere im Anhang).

Auffallend hierbei war die fortdauernde uneinheitliche Expression des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins in den transgenen Herzen (siehe 3.2.2), die altersunabhängig war und sich von Wurf zu Wurf in Bezug auf die Stärke und die Quantität unterschied, je nach dem welches transgene Männchen in der Verpaarung eingesetzt wurde (Daten im Anhang).

Schließlich wurde das transgene Männchen für die weiteren Verpaarungen ausgewählt, dessen Nachkommen makroskopisch die stärkste Expression des BAG3^{P209L}-eGFP im Herzen aufwiesen, und dieses für die Zucht der transgenen Mauslinie verwendet (α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP #21).

Während der Analyse der Herzen aus den einzelnen Würfen wurde jedoch auch hier sowohl von Wurf zu Wurf als auch innerhalb der Würfe eine Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression deutlich. Dabei erwies sich die Expressionsstärke zwar als relativ konstant, jedoch variierte der Anteil der exprimierenden Kardiomyozyten. Die Atrien von drei Wochen alten Herzen zeigten bspw. unterschiedlich hohe Anteile an „exprimierenden Arealen“, in denen die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression besonders lokalisiert zu sein schien. Auch im Ventrikel wurde heterogene Expression ersichtlich, die in männlichen Tieren etwas stärker war als in weiblichen (Abb. 21 A).

Im Vergleich dazu wiesen drei Wochen alte Herzen der transgenen BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie eine starke und homogene Expression des BAG3^{WT}-eGFP-Proteins auf. Wie bereits während des postnatalen Entwicklungsstadiums konnte im adulten Entwicklungsstadium auf makroskopischer Ebene nur ventrikuläre BAG3^{WT}-eGFP-Expression nachgewiesen werden (siehe 3.2.2), während in den Atrien makroskopisch zu keinem Zeitpunkt Expression detektiert werden konnte (Abb. 21 B), obwohl in diesem Entwicklungsstadium Atrien und Ventrikel den α MHC-Promoter exprimieren sollten (Lyons *et al.*, 1990). Geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke des Proteins waren nicht vorhanden.

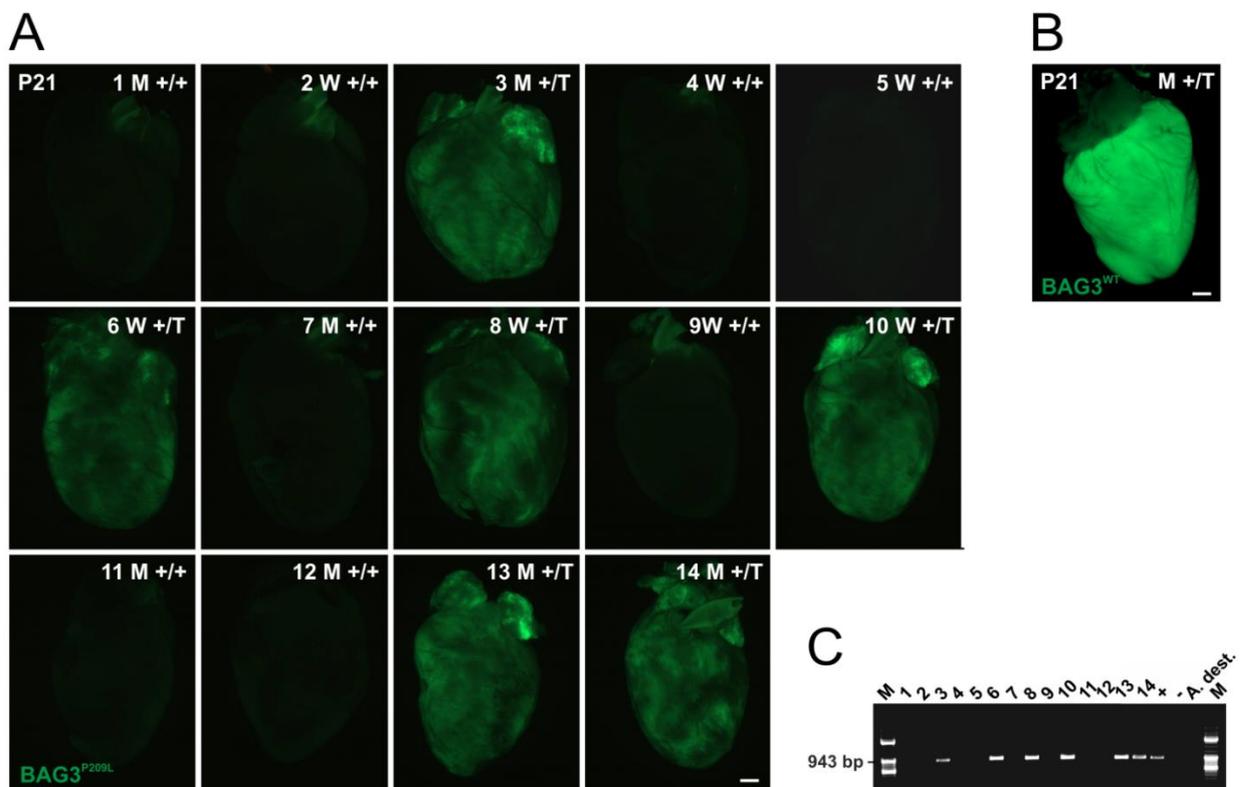


Abb. 21. Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Herzen innerhalb eines Wurfes nach Verpaarung mit Männchen #21. A. Die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in drei Wochen alten Herzen war heterogen und variierte innerhalb der Würfe und auch von Wurf zu Wurf; die Expression war in den männlichen Tieren etwas stärker war. B. Die Expression zum gleichen Zeitpunkt in Herzen der transgenen BAG3^{WT}-Mauslinie war homogen und es wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede beobachtet. C. Die PCR zur Genotypisierung des Wurfes aus A zeigte ein DNA-Fragment einer Größe von 943 bp in den Tieren, die auch makroskopisch eine BAG3^{P209L}-eGFP-Expression aufwiesen. M: Männchen, W: Weibchen. +/+ : Wildtyp, +/T: Transgen. Maßstab: 500 μ m.

3.2.4 In Mäusen zeigte nur ein Drittel aller Kardiomyozyten BAG3^{P209L}-eGFP-Expression

Wie bereits beschrieben zeigte sich schon in einem Alter von P 10 eine heterogene Expression des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins in den Herzen der BAG3^{P209L}-eGFP-Mäuse, während die Herzen der BAG3^{WT}-eGFP-Mäuse zum gleichen Zeitpunkt eine homogene Expression aufwiesen (siehe 3.2.3). Diese Tatsache änderte sich auch im Verlauf der postnatalen Entwicklung nicht, so dass die Expression in den BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen in einem Alter von 10 Wochen nach wie vor eine Heterogenität zeigte, wohingegen das BAG3^{WT}-eGFP-Protein in Herzen der BAG3^{WT}-eGFP-Mäuse gleichen Alters homogen exprimiert wurde (Abb. 22 A). Um eine Aussage über den prozentualen Anteil an exprimierenden Kardiomyozyten im adulten Entwicklungsstadium treffen zu können, wurde die Anzahl an eGFP-Kardiomyozyten in den Herzen quantitativ erfasst. Dazu wurden Schnitte der Herzen gegen den kardialen Marker α -Aktinin gefärbt, die Anzahl der BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten in jeweils 5 Schnitten pro Herz ($n=15$) bestimmt und deren Anteil an der Gesamtzahl an Kardiomyozyten errechnet. In 10 Wochen alten Herzen der BAG3^{P209L}-eGFP-Mäuse war ein Anteil von $36,28 \pm 5,56$ % der Kardiomyozyten BAG3^{P209L}-eGFP-positiv, während in Herzen gleichaltriger BAG3^{WT}-eGFP-Mäuse $83,13 \pm 2,58$ % der Kardiomyozyten BAG3^{WT}-eGFP exprimierten (Abb. 22 C).

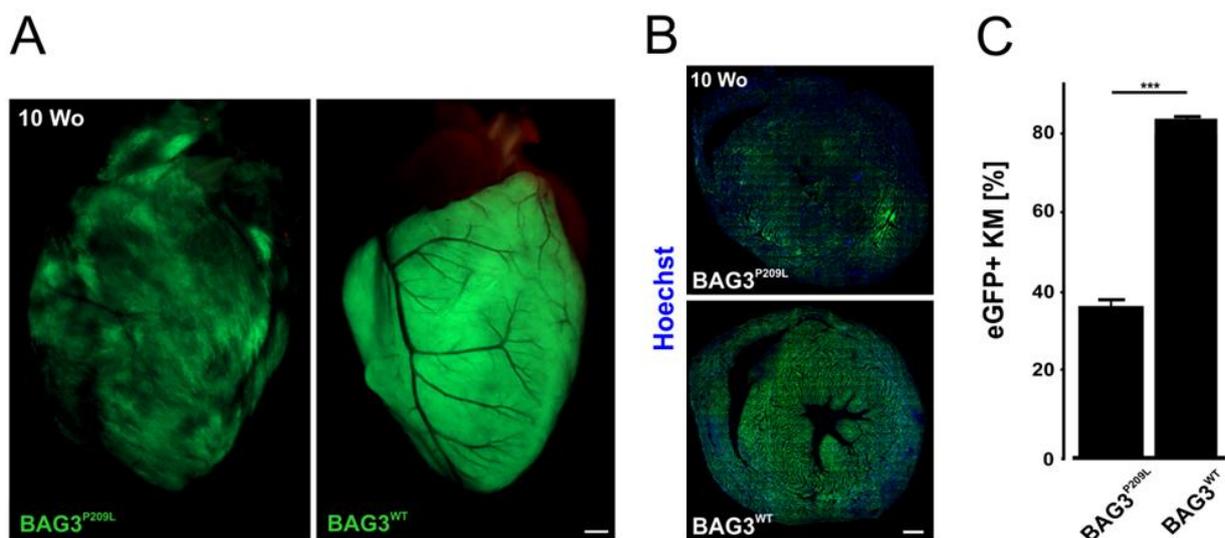


Abb. 22. Quantifizierung der BAG3^{WT}-eGFP- und BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-Mäusen. A. In 10 Wochen alten Herzen ist BAG3^{P209L}-eGFP heterogen exprimiert, das BAG3^{WT}-eGFP-Protein wird makroskopisch homogen exprimiert. **B.** Querschnitt durch ein BAG3^{WT}-eGFP- und BAG3^{P209L}-eGFP-Herz. **C.** Weniger als 40 % der Kardiomyozyten der BAG3^{P209L}-eGFP-Herzen exprimieren das Protein. $n=15$. eGFP+ KM=eGFP+ Kardiomyozyten. $*=p < 0.05$. Maßstab: 500 μ m.

Die Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression innerhalb eines Herzens und die Tatsache, dass nur ca. 40 % der Kardiomyozyten das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein exprimierten (Abb. 22 C), führte zu der Frage, ob und in wie weit sich die Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, bezüglich ihrer Z-Scheibenstruktur von den Kardiomyozyten unterschieden, die BAG3^{P209L}-eGFP nicht exprimierten.

3.2.5 Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten *in vivo*

Um zu untersuchen, ob Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimieren, im Vergleich zu nicht-exprimierenden Kardiomyozyten derselben Herzen veränderte Eigenschaften zeigten, wurden 3 und 10 Wochen alte transgene BAG3^{P209L}-eGFP-Hezen entnommen und sowohl histologische Schnitte als auch isolierte Kardiomyozyten gegen den kardialen Marker α -Aktinin gefärbt. Dabei konnte in histologischen Schnitten bei Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, eine Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten beobachtet werden. Außerdem waren dort, wo BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate zu sehen waren, keine Z-Scheiben mehr zu erkennen (Abb. 23 A Pfeile in linker Spalte). Nicht-exprimierende Kardiomyozyten dagegen zeigten eine regelmäßige Anordnung der Z-Scheiben (Abb. 23 A linke Spalte). In Kardiomyozyten, die BAG3^{WT}-eGFP exprimierten, konnte eine Lokalisation von BAG3^{WT}-eGFP an die Z-Scheiben nachgewiesen werden (Abb. 23 A rechte Spalte). In Einzelzellen, die aus BAG3^{P209L}-eGFP-Hezen gewonnen wurden, wurde diese Tatsache noch deutlicher. Hier zeigten BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierende Kardiomyozyten eine Lokalisation des Proteins an die Glanzstreifen und eine Auflösung der Struktur der Z-Scheiben, während in nicht-exprimierenden Kardiomyozyten eine regelmäßige Anordnung der Z-Scheiben zu erkennen war (Abb. 23 B Pfeile in linker und mittlerer Spalte). In isolierten Kardiomyozyten, die BAG3^{WT}-eGFP-exprimierten, lokalisierte das BAG3^{WT}-eGFP, wie auch zuvor in Kardiomyozyten aus histologischen Schnitten, an die Z-Scheiben (Abb. 23 B rechte Spalte).

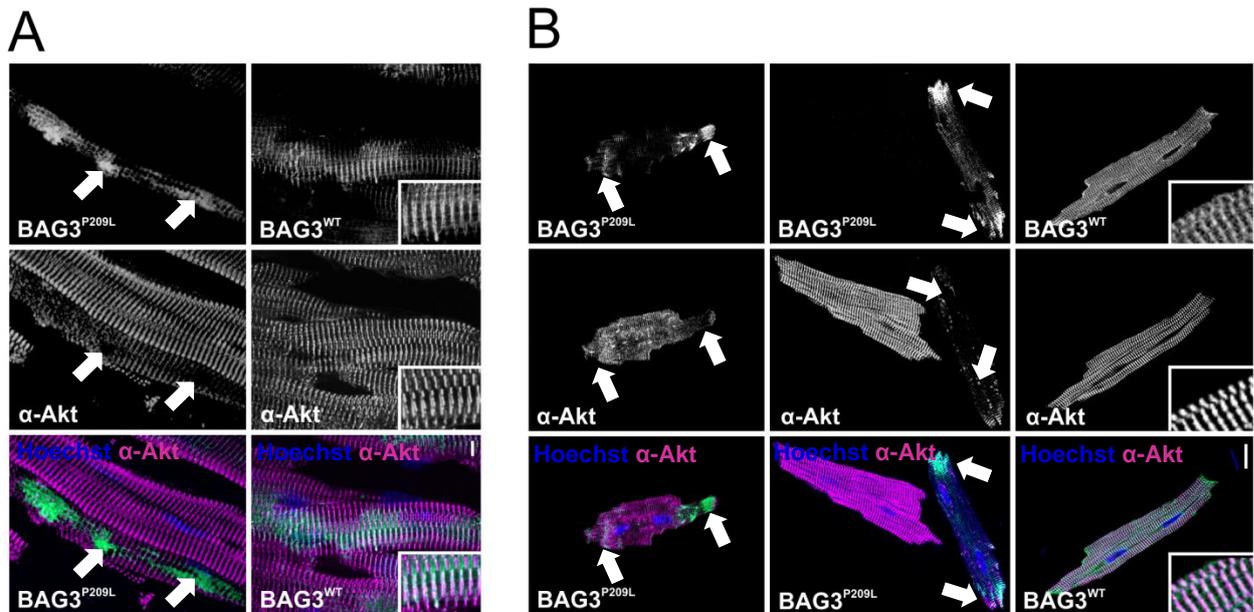


Abb. 23. Aggregatbildung in 3 und 10 Wochen alten Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen. **A.** BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregatbildung (Pfeile in oberem und unterem Bild in linker Spalte) und Auflösung der Z-Scheiben in diesen Bereichen in Schnitten (Pfeile in mittlerem Bild in linker Spalte). Die Z-Scheiben der Kardiomyozyten, die BAG3^{WT}-eGFP exprimierten, waren intakt (Bilder in rechter Spalte). **B.** In Einzelzellen konnte besonders im Bereich der Glanzstreifen eine BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregatbildung (Pfeile in oberem und unterem Bild in linker und mittlerer Spalte) und eine Auflösung der Z-Scheibenstruktur nachgewiesen werden (Pfeile in mittlerem Bild in linker und mittlerer Spalte), während Kardiomyozyten, die keine BAG3^{P209L}-eGFP-Expression zeigten, intakte Z-Scheiben aufwiesen (linke Zelle in Bildern in mittlerer Spalte). Die Z-Scheibenstruktur in Kardiomyozyten, die BAG3^{WT}-eGFP exprimierten, war ebenso unbeeinträchtigt (Bilder in rechter Spalte). α -Aktinin-Färbung in magenta. Kernfärbung in blau. $N=5$, $n=5$. Maßstab: 10 μ m.

Während schon im postnatalen Entwicklungsstadium an P 3 in Schnitten von Herzen eine beginnende Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten in den Atrien beobachtet werden konnte (siehe 3.2.2), wurde dieser Beobachtung in 3 Wochen alten Herzen nun detaillierter nachgegangen. Dazu wurden von unterschiedlichen Ebenen der transgenen BAG3^{P209L}-eGFP- und BAG3^{WT}-eGFP- Herzen histologische Schnitte angefertigt und diese gegen den kardialen Marker α -Aktinin gefärbt. Darüber hinaus wurde eine zusätzliche Kontrolle in Form von Wildtypherzen verwendet, die der gleichen Behandlung unterzogen wurde. Diese wurde benutzt, um auszuschließen, dass die vergleichbare Überexpression des humanen BAG3^{WT}-eGFP im Mausmodell *in vivo* zu einem Phänotyp führt.

Zur Beurteilung der Z-Scheibenstruktur wurden zwei Kategorien herangezogen. Während die Kategorie „normal“ alle Kardiomyozyten umfasste, bei denen das BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Protein an der Z-Scheibe lokalisiert war, wurden unter der Kategorie „abnormal“ jegliche Aggregate, seien es Aggregate der Fusionsproteine oder α -Aktinin-Aggregate, zusammengefasst (Beispiele für „normal“ und „abnormal“ siehe Abb. 23 A).

Anhand dieser Kategorien wurde die Z-Scheibenstruktur bei jeweils 50 Kardiomyozyten pro Experiment ($N=5$) bestimmt und der prozentuale Anteil der Kardiomyozyten pro Kategorie ermittelt.

Während der Anteil an Kardiomyozyten mit „normalen“ Z-Scheiben in den Herzen der Wildtypmäuse erwartungsgemäß überwog und nur $3,2 \pm 0,55$ % Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben vorlagen (Abb. 23 B), war dieser Anteil mit $55,6 \pm 4,40$ % in den Herzen mit BAG3^{P209L}-eGFP-Expression signifikant erhöht (Abb. 22 B), was den pathologischen Befund in Skelettmuskelbiopsien der Patienten widerspiegelt. In den Kardiomyozyten, die kein BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten (interne Kontrolle), waren keine „abnormale“ Z-Scheiben zu beobachten.

Mit $8,8 \pm 0,58$ % leicht erhöht war der Anteil an Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben in BAG3^{WT}-eGFP-Hezen (Abb. 23 B).

Um zu überprüfen, ob das hier generierte *in-vivo*-Modell auch den progressiven Krankheitsverlauf im Menschen reflektiert, wurden nachfolgend Herzen aus 10 Wochen alten Mäusen zu Einzelzellen dissoziiert und die Kardiomyozyten auf die Integrität der Z-Scheiben hin untersucht.

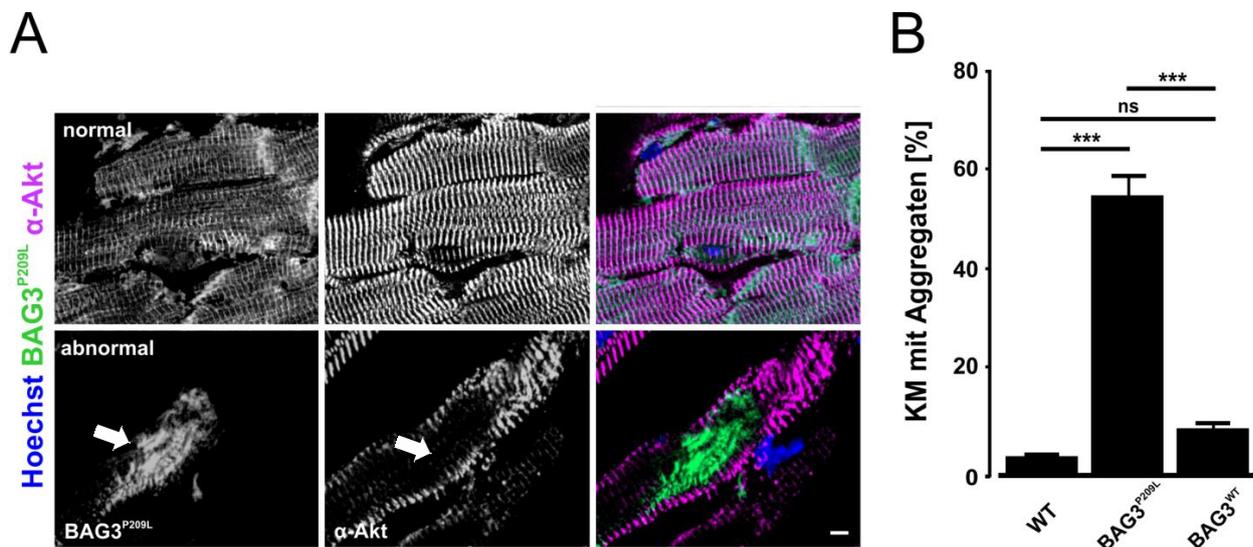


Abb. 23. Quantifizierung der Integrität der Z-Scheiben in 3 Wochen alten Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen. **A.** Beispiele für die Kategorien „normal“ und „abnormal“ zur Bestimmung der Z-Scheibenstruktur (BAG3^{P209L}-eGFP- und α-Aktinaggregate, Pfeile in unteren Bildern in linker und mittlerer Spalte). **B.** Während der Anteil an „abnormalen“ Z-Scheiben in Herzen von Wildtyp- und BAG3^{WT}-eGFP-Mäusen gering war, zeigte sich eine deutliche Erhöhung dieses Anteils in Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten. α-Aktinin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. $N=5$, $n=250$. * = $p < 0.05$. Maßstab: 10 μ m.

3.2.6 Zunahme der Aggregatbildung in BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten

Wie in 3 Wochen alten Herzen (siehe 3.2.4), wurde die Z-Scheibenstruktur der Kardiomyozyten aus 10 Wochen alten Herzen, unter Anwendung der Kategorien „normal“ und „abnormal“ (Abb. 23 A), evaluiert. Um Schnittartefakte auszuschließen und die Morphologie der Z-Scheibenstruktur

besser zu beurteilen, wurden einzelne Kardiomyozyten von transgene BAG3^{P209L}-eGFP-, BAG3^{WT}-eGFP- und Wildtypherzen durch eine Langendorff-Dissoziation isoliert.

Ebenso wie in 3 Wochen alten Herzen, überwog in Herzen aus 10 Wochen alten Wildtypmäusen der Anteil an Kardiomyozyten mit „normalen“ Z-Scheiben. Der Anteil der Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben war mit einem Wert von $3,33 \pm 0,58$ % gering (Abb. 23 B) und vergleichbar mit den zuvor ermittelten Ergebnissen (siehe 3.2.4). Dazu signifikant erhöht war der Anteil der Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, und „abnormale“ Z-Scheiben aufwiesen (Abb. 24 B). Hier war ein Wert von $64,66 \pm 1,57$ % zu verzeichnen (Abb. 24 B), so dass 10 % mehr Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben vorlagen als in 3 Wochen alten Herzen (siehe 3.2.4). Der Anteil an BAG3^{WT}-positiven Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben in 10 Wochen alten Herzen war mit $10,67 \pm 1,15$ % ähnlich (Abb 24 B). Somit konnte eine Zunahme der Aggregation und ein Rückgang der Z-Scheibenstruktur in BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten gezeigt werden.

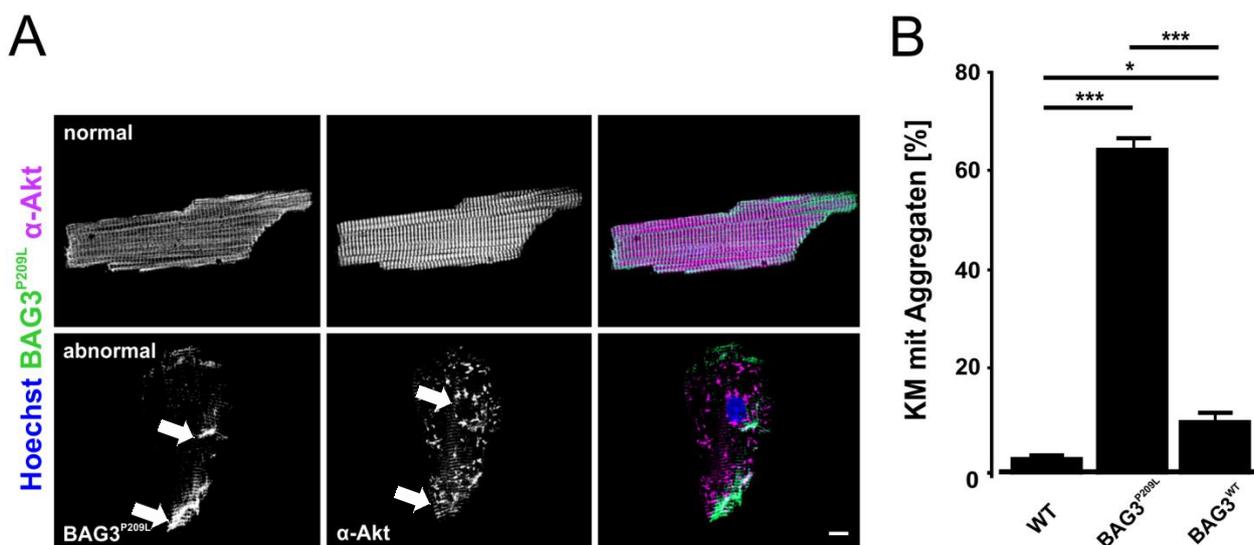


Abb. 24. Quantifizierung der Integrität der Z-Scheiben in isolierten Kardiomyozyten von 10 Wochen alten Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen. A. Kategorien „normal“ (BAG3^{P209L}-eGFP und α -Aktinin an der Z-Scheibe lokalisiert) und „abnormal“ (BAG3^{P209L}-eGFP- und α -Aktininaggregate, Pfeile in unteren Bildern in linker und mittlerer Spalte) zur Bestimmung der Z-Scheibenstruktur. Dabei zeigte die Überexpression des BAG3^{P209L}-eGFP zeigte eine deutliche Zunahme von Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben. **B.** Der Anteil an Kardiomyozyten mit „abnormalen“ Z-Scheiben in Herzen 10 Wochen alten BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen ist mit über 60 % signifikant erhöht. α -Aktinin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. $n=3$. * = $p < 0.05$. Maßstab: 10 μ m.

Die Tatsache, dass nur 40 % der Kardiomyozyten das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein exprimierten (siehe 3.2.4) und in 65 % davon ein Rückgang der Integrität der Z-Scheibe vorlag (siehe 3.2.5), führte zu der Frage, ob dies Auswirkungen auf die Lokalisation anderer Z-Scheibenproteine, insbesondere die der CASA-Komponenten, hatte bzw. das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein selbst veränderte Eigenschaften aufwies.

3.2.7 Veränderte Lokalisation der CASA-Komponenten in Kardiomyozyten mit BAG3^{P209L}-eGFP-Expression

Da eine Expression des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins in Kardiomyozyten aus 3 und 10 Wochen alten Herzen in einer zunehmenden Bildung von Aggregaten und einem Rückgang der Integrität der Z-Scheiben resultierte (siehe 3.2.5 und 3.2.6), war es von Interesse, die Beteiligung des CASA-Komplexes und seiner autophagischen Funktion in diesem Zusammenhang zu untersuchen und die Lokalisation einzelner CASA-Komponenten zu evaluieren.

Die folgenden Immunfluoreszenzfärbungen wurden in 10 Wochen alten Herzen von Wildtyp-, BAG3^{P209L}-eGFP- und BAG3^{WT}-eGFP-Mäusen in histologischen Schnitten und in isolierten Kardiomyozyten durchgeführt ($N=3$, $n=10$).

Endogenes BAG3 als Bestandteil der BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate

Als einer der Hauptbestandteile des CASA-Mechanismus und am Erhalt der Z-Scheibe unter mechanischer Belastung der Muskulatur maßgeblich beteiligt (Ulbricht *et al.*, 2013) wurde zuerst die ektopische Aktivität des Chaperons BAG3 detektiert. Der hier verwendete Antikörper erkannte dabei sowohl das murine endogene als auch das humane überexprimierte BAG3.

In Herzen von Wildtypmäusen war BAG3 sowohl in Schnitten als auch in isolierten Kardiomyozyten an den Z-Scheiben lokalisiert (Abb 25 A und B, obere Reihe).

Im Gegensatz dazu bildete das exprimierte BAG3^{P209L}-eGFP-Protein sowohl in Schnitten als auch in isolierten Kardiomyozyten große Aggregate an den Glanzstreifen und ko-lokalisierte dort mit dem endogenen BAG3-Protein. (Abb 25 A, Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). Dies wurde insbesondere in isolierten Kardiomyozyten deutlich, wo sich in den Glanzstreifen eine Ko-Lokalisation von exprimiertem BAG3^{P209L}-eGFP und endogenem BAG3 beobachten lies und endogenes BAG3 am Sarkolemm lokalisiert war (Abb. 25 B, Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe).

In Schnitten von 10 Wochen alten Herzen, in denen das BAG3^{WT}-eGFP-Protein exprimiert wurde, konnte deutlich mehr Ko-Lokalisation des exprimierten BAG3^{WT}-eGFP und des endogenen BAG3 ausgemacht werden. In Schnitten wurde dies besondere im Bereich der Z-Scheiben offensichtlich (Abb 25 A, untere Reihe), in isolierten Kardiomyozyten zeigte sich das gleiche Bild (Abb 25 B, untere Reihe).

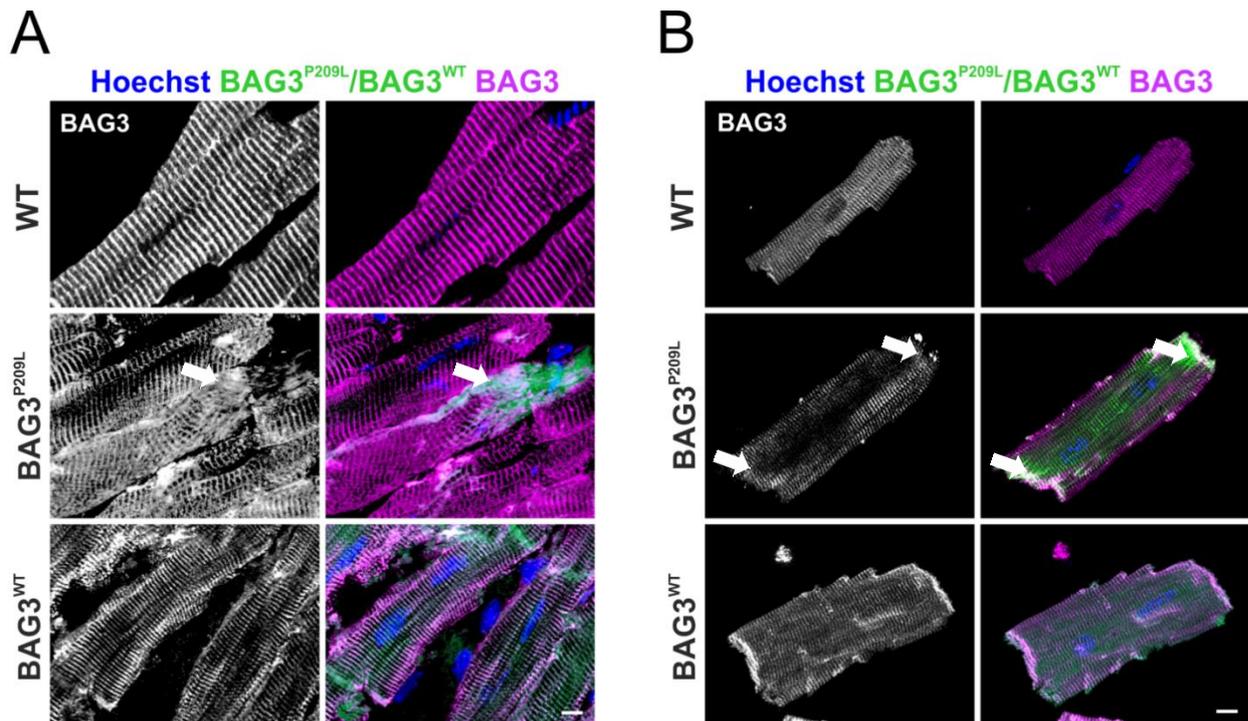


Abb. 25. Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen BAG3. **A.** In Schnitten konnte besonders im Bereich der Glanzstreifen eine Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten, welche mit endogenem BAG3 kolo-kalisiert, beobachtet werden (Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). Sowohl in Wildtypherzen (obere Reihe) als auch in Kardiomyozyten, die BAG3^{WT}-eGFP exprimierten, war das endogene BAG3 an der Z-Scheibe lokalisiert. **B.** In isolierten Kardiomyozyten zeigten sich dieselben Lokalisationen, wobei auch dort die Ko-Lokalisation von BAG3^{P209L}-eGFP und endogenem BAG3 im Bereich der Glanzstreifen besonders hoch war (Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). BAG3-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. $N=3$, $n=10$. Maßstab: 10 μm .

Dislokalisierung von Myopodin und Filamin C

Als Interaktionspartner des BAG3 im CASA-Komplex und weiteres zentrales Z-Scheibenprotein erfolgte ebenso eine Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion des Myopodin-Antigens.

In Herzen der Wildtypmäuse war Myopodin in Schnitten (Abb. 26 A, obere Reihe) und in isolierten Kardiomyozyten (Abb. 26 B, obere Reihe), an den Z-Scheiben lokalisiert (Weins *et al.*, 2011).

In Schnitten der Herzen der BAG3^{P209L}-eGFP-Mäuse dagegen, in denen das exprimierte BAG3^{P209L}-eGFP teilweise an der Z-Scheibe lokalisiert war und teilweise in Aggregaten vorlag, konnte kein oder nur sehr geringfügig Myopodin an der Z-Scheibe nachgewiesen werden. Die Z-Scheibenstruktur des Myopodins schien in manchen Bereichen vollständig aufgelöst (Abb. 26 A, Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). In isolierten Kardiomyozyten war deutlich mehr BAG3^{P209L}-eGFP an den Glanzstreifen vorzufinden, wo die Expression stärker war. In diesen Kardiomyozyten war Myopodin im Zytoplasma verteilt (Abb. 26 B, Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe).

Ähnliche Ergebnisse wie in Wildtypherzen waren in Schnitten der Herzen der BAG3^{WT}-eGFP-Mäuse zu finden. Hier war Myopodin an den Z-Scheiben lokalisiert (Abb. 26 A, untere Reihe). Isolierte Kardiomyozyten zeigten die gleiche Lokalisation des Proteins (Abb. 26 B, untere Reihe).

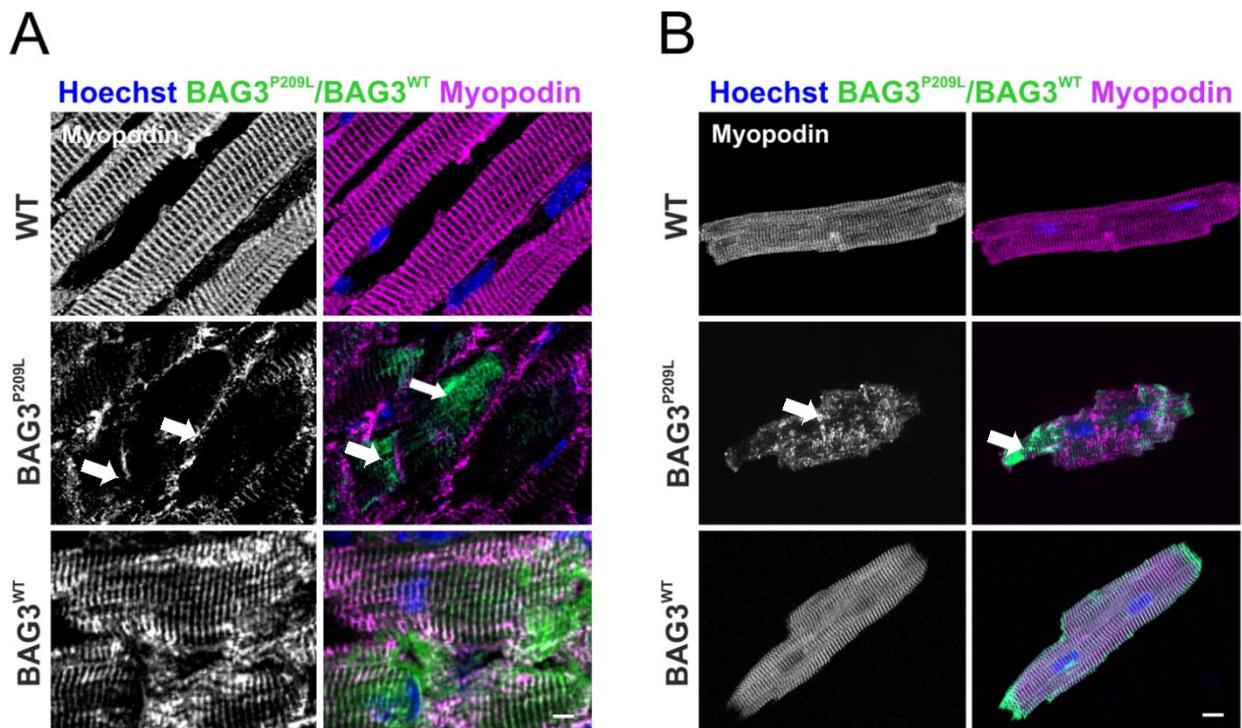


Abb. 26. Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen Myopodin. **A.** In Schnitten von Herzen der BAG3^{P209L}-eGFP-Mäuse war BAG3^{P209L}-eGFP sowohl an der Z-Scheibe lokalisiert als auch in BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten zu finden. In diesen Kardiomyozyten war Myopodin nicht mehr an der Z-Scheibe lokalisiert (Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe), während in Kardiomyozyten aus Wildtypheren und Kardiomyozyten, die BAG3^{WT}-eGFP exprimierten, eine deutliche Z-Scheibenlokalisation nachzuweisen war (oberes und unteres Bild linker Spalte). **B.** In isolierten Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, war BAG3^{P209L}-eGFP hauptsächlich an den Glanzstreifen und Myopodin im Zytoplasma zu finden (Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). Myopodin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. $N=3$, $n=10$. Maßstab: 10 μm .

Ebenso untersucht wurde die Lokalisation von Filamin C, das durch den CASA-Mechanismus dem Lyosom zugeführt und dort abgebaut wird. Als weiterer Vertreter der Z-Scheibenproteine interagiert es mit dem zuvor beschriebenen Myopodin (Linnemann *et al.*, 2010).

Die Herzen aus 10 Wochen alten Wildtypmäusen wiesen eine deutliche Lokalisation des Proteins an der Z-Scheibe auf, zusätzlich war es in den Glanzstreifen zu finden (Abb. 27 A, obere Reihe). In isolierten Kardiomyozyten zeigte sich das gleiche Bild (Abb. 27 B, obere Reihe).

Eine Dislokalisierung von Filamin C fand sich in den Schnitten der Herzen der BAG3^{P209L}-eGFP-Mäuse. Hier war das Protein nicht mehr an der Z-Scheibe zu finden und lag im Zytoplasma vor, wobei besonders in den Glanzstreifen eine Ko-Lokalisation mit BAG3^{P209L}-eGFP aufgezeigt werden konnte (Abb. 27 A, Pfeile in mittlerem Bild in linker Spalte). In isolierten Kardiomyozyten, in denen insbesondere an den Glanzstreifen BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate zu finden waren, lokalisierte Filamin C vornehmlich am Sarkolemm und nicht mehr an die Z-Scheiben (Abb. 27 B, Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe).

Vergleichbar zum Wildtyp war die Lokalisation in Schnitten aus Herzen der BAG3^{WT}-eGFP-Mäuse. Filamin C lag hier an der Z-Scheibe und an den Glanzstreifen vor (Abb. 27 A, untere

Reihe). Isolierte Kardiomyozyten zeigten die gleiche Lokalisation des Proteins (Abb. 27 B, untere Reihe).

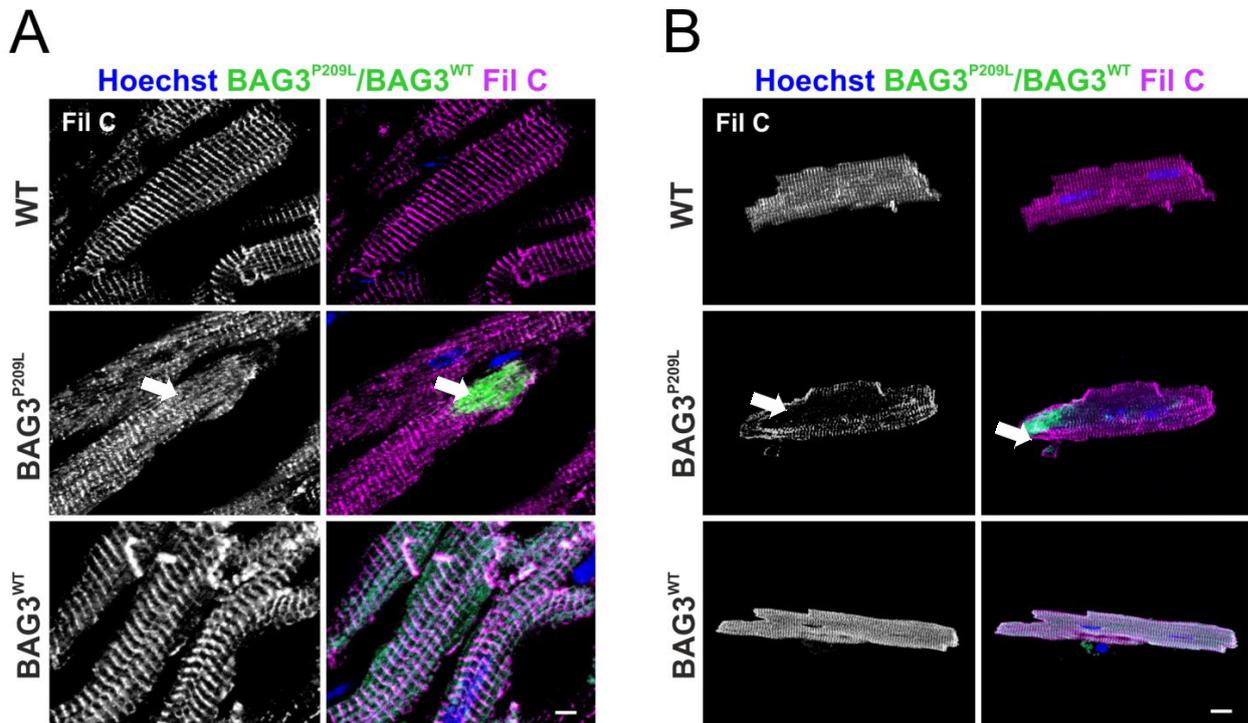


Abb. 27. Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen Filamin C. A. Eine Dislokation von Filamin C zeigte sich in Schnitten der BAG3^{P209L}-eGFP-Heerden, wo das Protein in den Aggregaten mit BAG3^{P209L}-eGFP ko-lokalisiert (Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). In Schnitten aus Wildtyp- oder BAG3^{P209L}-eGFP-Heerden war Filamin C an der Z-Scheibe lokalisiert (oberes und unteres Bild in linker Spalte). B. In isolierten Kardiomyozyten war dies ebenso der Fall, zusätzlich war eine sarkolemmale Lokalisation von Filamin C in Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, nachzuweisen (Pfeile in mittlerem Bild in linker Spalte). Filamin C-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. Fil C= Filamin C. *N*=3, *n*=10. Maßstab: 10 µm.

3.2.8 Auflösung des Zytoskeletts in BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten

Ob und inwieweit die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression auch Auswirkungen auf das Zytoskelett hatte, wurde durch Detektion von Titin und Desmin nachgegangen.

BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten zeigten deutlich schwächere Titinexpression

Dabei wurde die Lokalisation von Titin, als eines der vier Filamentsysteme in der Z-Scheibe verankert, zuerst detektiert. Der Antikörper richtete sich gegen das T12-Epitop, eines von vielen Epitopen, die anhand ihrer Position im Sarkomer durchnummeriert wurden (Fürst *et al.*, 1988).

In Schnitten von Wildtypherzen war Titin an den Z-Scheiben lokalisiert (Abb. 28 A, obere Reihe), isolierte Kardiomyozyten zeigten die gleiche Lokalisation (Abb. 28 B, obere Reihe).

In Schnitten der Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen war die Titinexpression in den Bereichen schwächer, in denen BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate vorlagen. Die typische Lokalisation an den Z-Scheiben war jedoch erhalten (Abb. 28 A und B, Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe).

In Schnitten und isolierten Kardiomyozyten der BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie zeigte sich das gleiche Bild wie in Wildtypherzen (Abb. 28 A und B, untere Reihe).

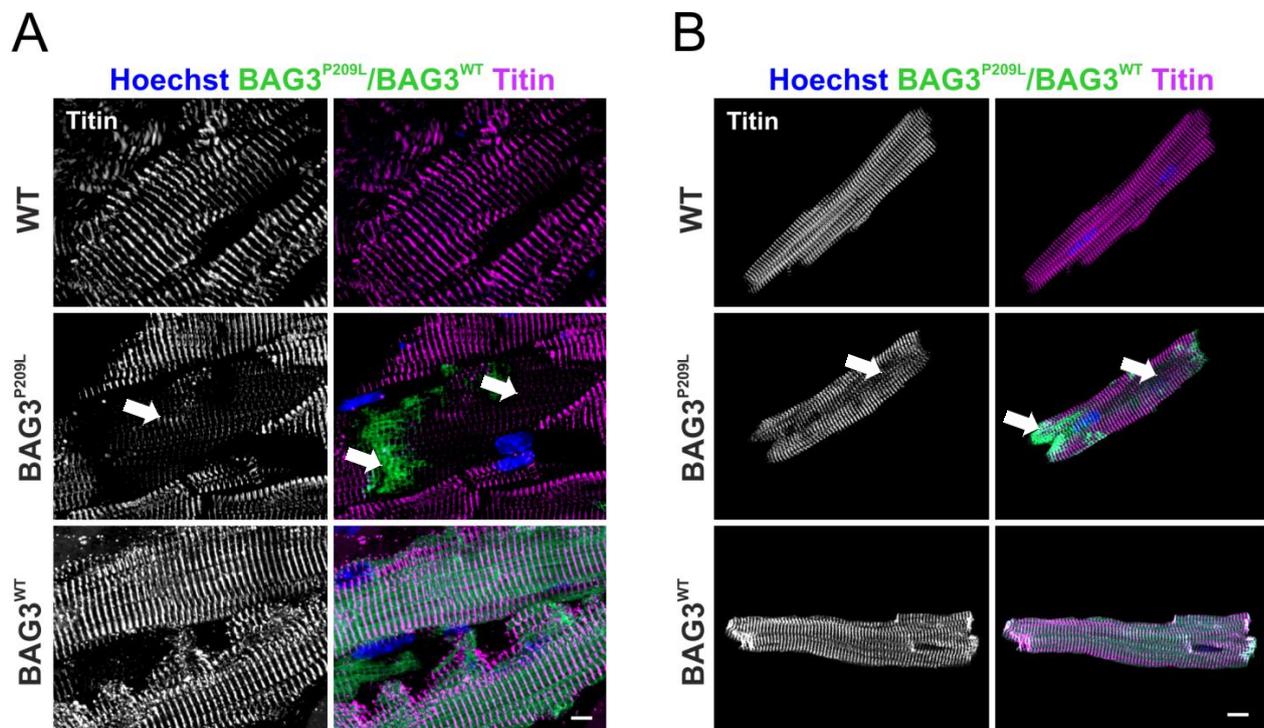


Abb. 28. Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen Titin. **A.** In Schnitten von BAG3^{P209L}-eGFP-Hezen war Titin dort an den Z-Scheiben in geringerer Intensität exprimiert, wo BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate vorlagen (Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). In Schnitten aus Wildtyp- oder BAG3^{P209L}-eGFP-Hezen war Titin an der Z-Scheibe zu finden (obere und untere Bilder in linker Spalte). **B.** In isolierten Kardiomyozyten aus BAG3^{P209L}-eGFP-Hezen, die eine BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregatbildung zeigten, konnte zwar eine Z-Scheibenlokalisation des Titins aufgezeigt werden, diese war jedoch deutlich schwächer (Pfeile in mittlerem Bild in linker Spalte) als in Kardiomyozyten aus Wildtyp- und BAG3^{P209L}-eGFP-Hezen (oberes und unteres Bild in linker Spalte). Titin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. $N=3$, $n=10$. Maßstab: 10 µm.

Desmin ist Bestandteil der BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate

Intermediärfilamente halten die Strukturen des Zytoskeletts zusammen und fixieren Organellen innerhalb der Zelle. Somit sorgen sie für eine mechanische Stabilität. Um zu untersuchen, ob die Expression von BAG3^{P209L}-eGFP hierauf eine Auswirkung hat, wurde das in der quergestreiften Muskulatur vorherrschende Intermediärfilament Desmin mit einem Antikörper detektiert.

In histologischen Schnitten (Abb. 29 A, obere Reihe) und in isolierten Kardiomyozyten (Abb. 29 B, obere Reihe) von Wildtypherzen war Desmin dabei Z-Scheibe lokalisiert.

In Schnitten der Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen konnte Desmin an den Z-Scheiben dort detektiert werden, wo kein BAG3^{P209L}-eGFP zu erkennen war. In den Glanzstreifen wurde eine Ko-Lokalisation zwischen den beiden Proteinen deutlich (Abb. 29 A, Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). In isolierten Kardiomyozyten war die Lokalisation zu der in den histologischen Schnitten deckungsgleich (Abb. 29 B, Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe).

Sowohl in Schnitten (Abb. 29A, untere Reihe) als auch in isolierten Kardiomyozyten (Abb. 29 B, untere Reihe) der BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie zeigte sich das gleiche Expressionsmuster für Desmin wie in Wildtypherzen.

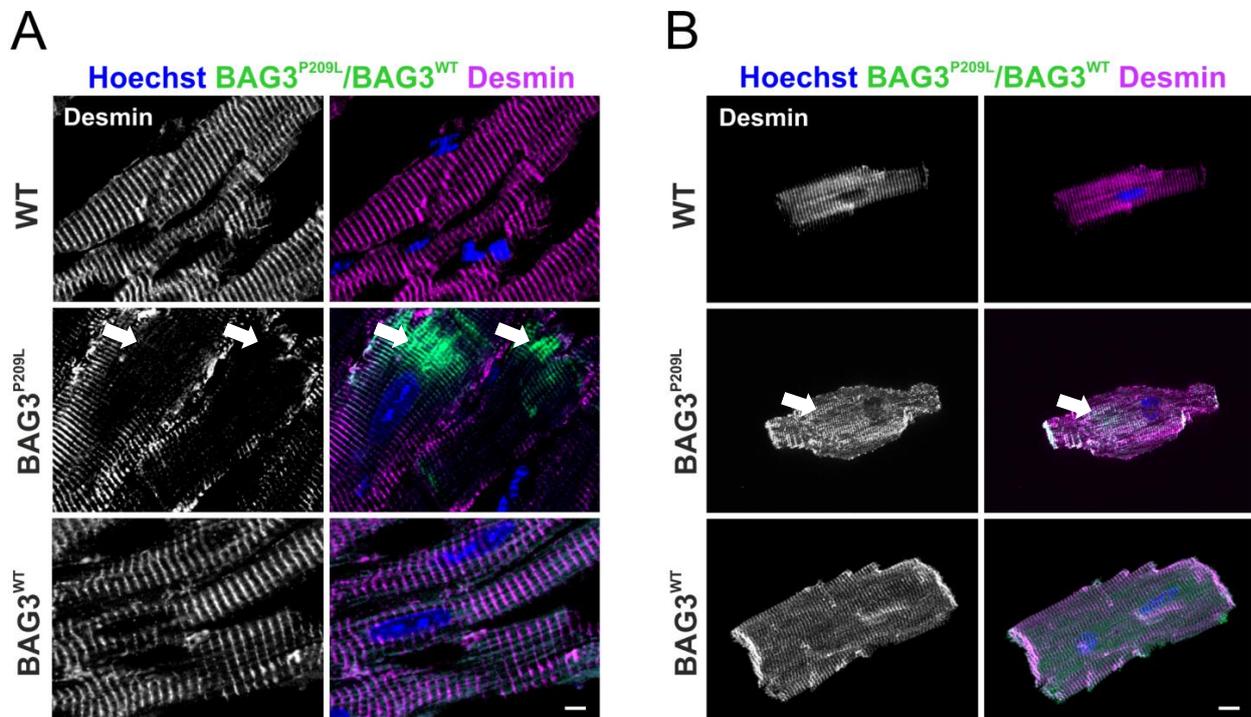


Abb. 29. Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen Desmin. **A.** In Schnitten der Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen war Desmin nur an den Z-Scheiben lokalisiert, wo kein BAG3^{P209L}-eGFP zu beobachten war (Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). In Schnitten aus Wildtyp- oder BAG3^{P209L}-eGFP-Hezen war Desmin an den Z-Scheiben lokalisiert (obere und untere Bilder in linker Spalte). **B.** In isolierten Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, konnte dort ebenfalls keine Z-Scheibenlokalisierung des Desmins mehr nachgewiesen werden, wo BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate vorlagen (Pfeile in Bildern in mittlerer Reihe). Isolierte Kardiomyozyten aus Wildtyp- und BAG3^{WT}-eGFP-Hezen zeigten eine Z-Scheibenlokalisierung des Proteins. Desmin-Färbung in weiss bzw. magenta. Kernfärbung in blau. $N=3$, $n=10$. Maßstab: 10 µm.

3.2.9 Eingeschränkte Mobilität des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins

Die Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten und der damit einhergehende Rückgang der der Z-Scheibenstruktur in 65 % der Kardiomyozyten, (siehe 3.2.5), führten zu der Frage, ob dies durch die verringerte Löslichkeit und somit durch veränderte dynamische Eigenschaften des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins ausgelöst wurde.

Mit Hilfe der FRAP-Methode wurde deshalb im Folgenden das dynamische Verhalten des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins in adulten ventrikulären Kardiomyozyten bestimmt, die durch eine Langendorff-Dissoziation aus 10 Wochen alten Herzen isoliert wurden. Als Kontrolle dienten adulte Kardiomyozyten, die aus den Ventrikeln der BAG3^{WT}-eGFP-Hezen isoliert wurden. Die Fluoreszenzintensität wurde lokal an einer Z-Scheibe bestimmt (*Prebleach*), durch mehrere kurze Laserpulse bei höchster Intensität irreversibel ausgelöscht (*Bleach*) und die Zeit vermessen, bis der

Austausch gegen fluoreszenzmarkierte Moleküle aus der Umgebung an die gebleichte Stelle erfolgt war (*Recovery*) (Abb 30A). Die Auswertung der erarbeiteten Rohdaten erfolgte durch Julia Braune, Institut für Zellbiologie der Universität Bonn, nach Al Tanoury *et al.*, 2010.

Die FRAP-Experimente mit isolierten Kardiomyozyten der BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie ergaben einen prozentualen Anteil von $73,17 \pm 14,97$ % des BAG3^{WT}-eGFP-Proteins in der mobilen Fraktion (Abb. 30 B und Abb. 30 C). Die Halbwertszeit, also die Zeit, in der die Hälfte der fluoreszenzmarkierten Moleküle des BAG3^{WT}-eGFP-Proteins an der gebleichten Stelle ausgetauscht waren, betrug 12,99 s (Abb. 30 B und Abb. 30 C).

Im Vergleich dazu lagen in FRAP-Experimenten mit isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie nur $13,37 \pm 6,83$ % des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins in der mobilen Fraktion vor. Für das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein wurde dabei eine verringerte Halbwertszeit von 9,43 s deutlich (Abb. 30 B und Abb. 30 C).

Das veränderte dynamische Verhalten des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins an der Z-Scheibe, was sich in der verringerten Mobilität des Proteins wieder spiegelt, zeigt, dass die Löslichkeit und somit die dynamischen Eigenschaften des Proteins durch die BAG3^{P209L}-Mutation beeinflusst werden.

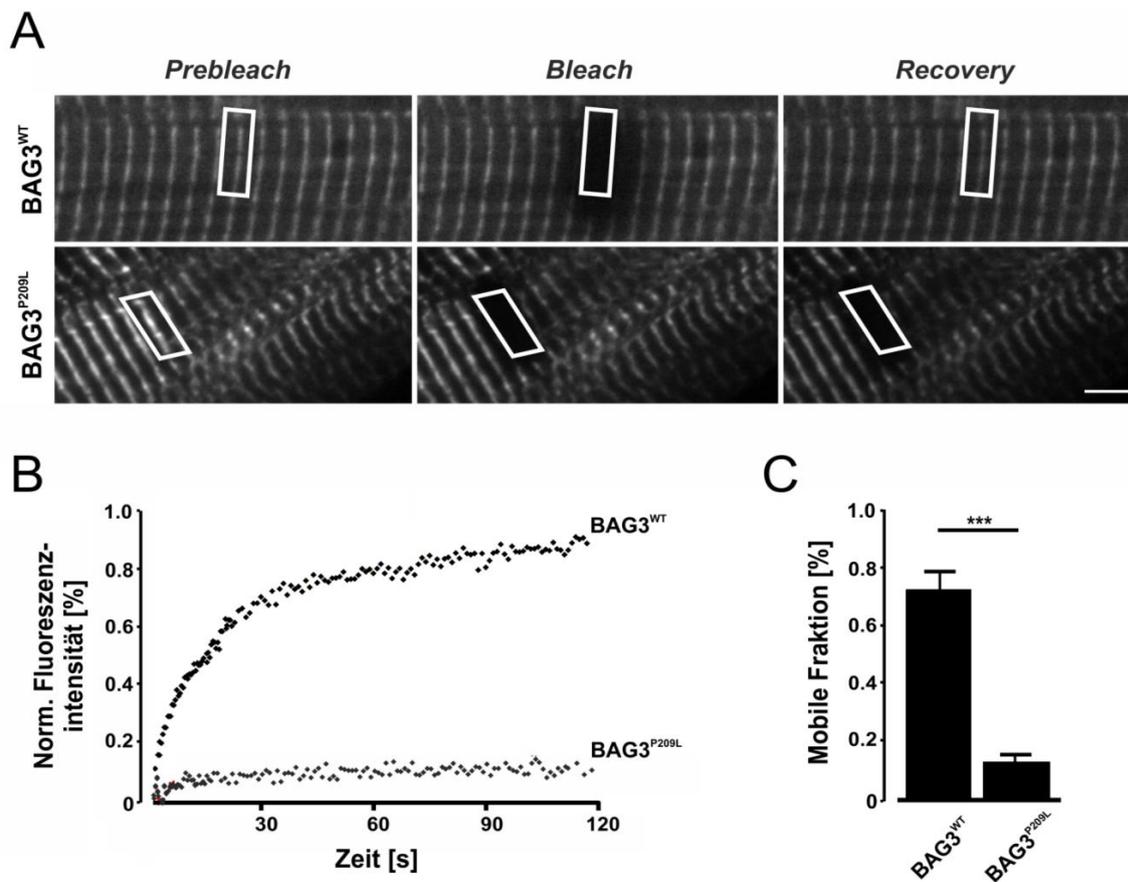


Abb. 30. Eingeschränkte Mobilität von BAG3^{P209L}-eGFP in adulten Kardiomyozyten. **A.** Prinzip der FRAP-Methode mit *Prebleach*, *Bleach* und *Recovery*. **B.** In isolierten Kardiomyozyten der BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie lag die Mobilität des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins mit $13,37 \pm 6,83$ % deutlich verringert. **C.** Quantifizierung der mobilen Fraktion. $N=3$, $n=10$. $*=p < 0.05$. Maßstab: 5 μ m.

3.2.10 Mehr endogenes BAG3 vorhanden als BAG3^{P209L}-eGFP

Um eine Aussage über das Expressionsniveau der exprimierten BAG3^{P209L}-eGFP- und BAG3^{WT}-eGFP-Proteine auf Proteinebene treffen zu können und diese mit dem Phänotyp des generierten *in-vivo*-Modells zu korrelieren, war es notwendig, das Verhältnis von exprimiertem humanen BAG3^{WT}-eGFP bzw. BAG3^{P209L}-eGFP zu endogenem murinen BAG3 zu ermitteln. Dazu wurden Kardiomyozyten aus Herzen 10 Wochen alter BAG3^{WT}-eGFP bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Mäuse durch eine Langendorff-Dissoziation isoliert und mittels Durchfluss-zytometrie anhand ihrer eGFP-Fluoreszenz getrennt. Aus den sortierten eGFP⁺-Kardiomyozyten wurden Proteinextrakte gewonnen, die durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Um das Verhältnis von exprimiertem humanen BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP zu endogenem murinen BAG3 zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt, bei denen die Membran mit einem BAG3-Antikörper inkubiert wurde, der sowohl humanes exprimiertes BAG3^{WT}-eGFP bzw. BAG3^{P209L}-eGFP als auch murines endogenes BAG3 detektierte. Als Kontrolle wurden Proteinextrakte aus Langendorff-dissoziierten und durch Durchflusszytometrie sortierte Kardiomyozyten aus 10 Wochen alten Herzen von CAG-eGFP-Mäusen verwendet.

Der Anteil an BAG3^{WT}-eGFP-Kardiomyozyten lies sich nach der Durchflusszytometrie auf $76,32 \pm 2,03$ % festlegen (Beispiel für ein Ergebnis einer Durchflusszytometrie eines BAG3^{WT}-eGFP-Herzes in Abb. 31 A, linke Spalte), in den Herzen der BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen waren $21,59 \pm 2,64$ % der Kardiomyozyten eGFP⁺ (Beispiel für ein Ergebnis einer Durchflusszytometrie eines BAG3^{P209L}-eGFP-Herzes Abb. 31 A, mittlere Spalte). Der Anteil an eGFP⁺-Kardiomyozyten aus den Herzen der CAG-eGFP-Mäusen betrug $71,81 \pm 0,21$ % (Beispiel für ein Ergebnis einer Durchflusszytometrie eines CAG-eGFP-Herzes Abb. 31 A, rechte Spalte).

Dies deckt sich mit den Anteilen an BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten (BAG3^{WT}-eGFP: $83,13$ % $\pm 2,58$ %, BAG3^{P209L}-eGFP: $36,28$ % $\pm 5,56$ %), die bereits in Schnitten von Herzen aus 10 Wochen alten Mäusen ermittelt wurden (siehe 3.2.4).

In den danach folgenden Western Blot Analysen mit Proteinextrakten der sortierten eGFP⁺-Kardiomyozyten, wurde nach Inkubation mit dem BAG3-Antikörper bereits ersichtlich, dass in Kardiomyozyten der BAG3^{WT}-eGFP-Herzen mehr exprimiertes humanes BAG3^{WT}-eGFP-Protein vorlag als endogenes murines BAG3 (Abb. 31 B, linke Spalte). Im Gegensatz dazu war in Kardiomyozyten der BAG3^{P209L}-eGFP-Herzen mehr endogenes murines BAG3 nachzuweisen (Abb. 31 B, rechte Spalte). Die Quantifizierung der Bandenstärke resultierte in einem Verhältnis von exprimiertem humanen BAG3^{WT}-eGFP zu endogenem murinen BAG3 von $1,27 \pm 0,66$ in Kardiomyozyten der BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie wurde ein Verhältnis von exprimiertem humanen BAG3^{P209L}-eGFP zu endogenem murinen BAG3 von $0,87 \pm 0,4$ ermittelt (Abb. 31 C).

Aufgrund der vorangegangenen Sortierung der eGFP+ Kardiomyozyten wurde das Verhältnis von exprimiertem humanen BAG3^{P209L}-eGFP zu endogenem murinen BAG3 somit nur in den Kardiomyozyten bestimmt, die das BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-Protein bildeten. Die Ergebnisse zeigten, dass deutlich weniger BAG3^{P209L}-eGFP in BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten gebildet wird, als BAG3^{P209L}-eGFP in BAG3^{WT}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten. Dies weist einerseits auf ein mögliches *Silencing* des BAG3^{P209L}-eGFP hin, andererseits zeigt es, dass schon geringe Expressionslevel von BAG3^{P209L}-eGFP um den beobachteten Phänotyp hervorzurufen.

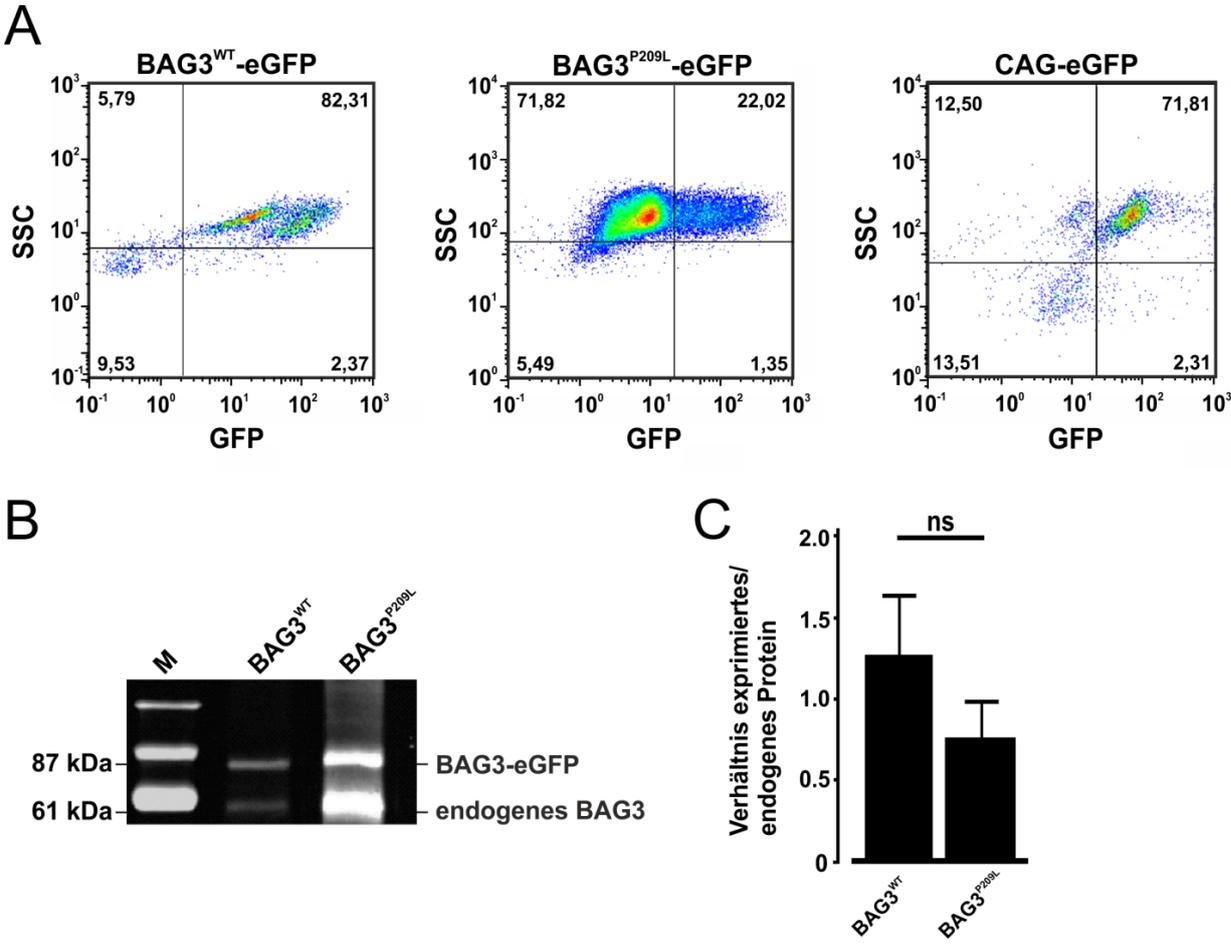


Abb. 31. Ermittlung des Verhältnisses von BAG3^{WT}-eGFP und BAG3^{P209L}-eGFP zu murinem BAG3 in adulten Kardiomyozyten. **A.** Durchflusszytometrische Profile von BAG3^{WT}-eGFP, BAG3^{P209L}-eGFP und CAG-eGFP-Herzen. **B.** Western Blot Analysen von Proteinextrakten der eGFP+ Kardiomyozyten. **C.** Quantifizierung der Bandenstärke aus Western Blot Analysen. In Kardiomyozyten der BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie lag deutlich mehr endogenes BAG3 vor als exprimiertes BAG3^{P209L}-eGFP-Protein. Aufgetragen wurden 30 µg Protein. SSC: Seitwärtsstreulicht, GFP: Grünfluoreszierendes Protein. N=3, n=3. *= p < 0.05. Ns: nicht signifikant. M = 10-250 kDa-Protein-Leiter..

3.2.11 Keine Veränderung der Herzfunktion in BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen

Im Hinblick auf mögliche funktionelle Unterschiede der Herzen aus BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen wurden linksventrikuläre hämodynamische Messungen mittels eines Katheters gemacht, bei denen Druck und Volumen im linken Ventrikel dargestellt wurden (Pacher *et al.*, 2008). Zur Belastung der Herzen wurde 14 Tage vorher ein Myokardinfarkt in Form einer Kryoläsion (Roell *et al.*, 2002) gesetzt, wobei sowohl die linksventrikulären hämodynamischen Messungen als auch die Kryoläsionen durch Dr. Annika Ottersbach, Institut für Physiologie I der Universität Bonn, durchgeführt wurden.

Dabei basieren heutzutage übliche Läsionsmodelle auf einem Gefäßverschluss durch eine LAD-Ligatur (Ligatur des *R. interventricularis anterior*) oder das Setzen einer Kryoläsion durch Verwendung eines Kryostempels. Obwohl die LAD-Ligatur dem physiologischen Infarktgeschehen am nächsten kommt, ist die Infarktgröße bei diesem Läsionsmodell sehr variabel und mit einer hohen Sterblichkeitsrate der Tiere verbunden (Kanno *et al.*, 2002). Eine gute Reproduzierbarkeit in Bezug auf ihre Größe haben dagegen Kryoinfarkte (van den Bos *et al.*, 2005). Auch wenn sie nicht dem physiologischen Infarktgeschehen entspricht, stellt diese Methode somit ein gutes Läsionsmodell dar und wurde deshalb als Schädigungsmodell angewandt.

Verwendet wurden 10 Wochen alte Tieren der BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie, als Kontrolle wurden Mäuse desselben Alters der BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie verwendet (BAG3^{P209L}-eGFP $N=3$, BAG3^{WT}-eGFP $N=5$). Aufgezeichnet wurden die in Tab. 20 aufgeführten Parameter.

Bezüglich der Funktion zeigten die Herzen der α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie dabei jedoch keine signifikanten Unterschiede verglichen mit denen der α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie (Tab. 20).

Tab. 20: Linkventrikuläre hämodynamische Kathetermessungen

Parameter	α MHC-BAG3 ^{WT} -eGFP	α MHC-BAG3 ^{P209L} -eGFP	Signifikanz [p]
Herzfrequenz [Schläge/min]	483,23 ± 47,66	507,00 ± 24,5	0,46
Endsystolischer Druck [mmHg]	83,38 ± 11,8	86,01 ± 4,63	0,73
Enddiastolischer Druck [mmHg]	16,40 ± 6,69	14,04 ± 8,37	0,68
Schlagvolumen [μ l]	18,97 ± 3,6	17,26 ± 2,18	0,49
Ejektionsfraktion [μ l]	28,51 ± 6,35	29,93 ± 7,01	0,78
Herzminutenvolumen [μ l/min]	9054,41 ± 1207,47	8722,35 ± 671,37	0,68
dPdt max [mmHg/s]	6540,23 ± 1224,09	6189,44 ± 1297,17	0,71
dPdt min [mmHg/s]	-5154,00 ± 1368,72	-4528,33 ± 827,09	0,51

dPdt max: maximale Rate der Druckveränderung im Ventrikel, *dPdt min*: minimale Rate der Druckveränderung im Ventrikel, *mmHg*: Millimeter Quecksilbersäule. $n=5$ (α MHC-BAG3^{WT}-eGFP), $n=3$ (α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP)

3.2.12 Auflösung der Sarkomerstruktur und Fibrose in BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten

Um eine höhere Auflösung der Z-Scheibenstrukturen und der dort lokalisierten Proteine zu bekommen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Herzen aus 10 Wochen alten BAG3^{P209L}-eGFP-, BAG3^{WT}-eGFP- und Wildtypmäusen gemacht, die von Dr. Andreas Unger, Institut für Physiologie der Ruhr-Universität Bochum, durchgeführt wurden. Nach Perfusion der Herzen wurden Mikrotomschnitte angefertigt und am Elektronenmikroskop Aufnahmen gemacht. Die Kardiomyozyten der 10 Wochen alten Herzen der Wildtypmäuse zeigten eine gleichmäßige Anordnung der Sarkomere mit lateraler Begrenzung durch die Z-Scheiben (Abb. 32, Pfeile in linker Spalte). Die Mitochondrien waren zwischen den Sarkomeren angeordnet und ebenso gleichmäßig verteilt wie die Z-Scheiben (Abb. 32, linke Spalte).

Im Gegensatz dazu konnten in Schnitten der Herzen aus 10 Wochen alten α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen atrophische und schmalere Sarkomere in den Kardiomyozyten nachgewiesen werden, wobei eine teilweise Lyse der Sarkomere nachzuweisen war. Hier waren einerseits Kardiomyozyten zu finden, die vital erschienen, andererseits lagen aber auch Zellen vor, die großflächige Degenerationserscheinungen mit einer Dislokation der Mitochondrien und massiven, großflächigen Proteinaggregaten (Abb. 32, Pfeile in mittlerer Spalte), ebenso wie das Vorhandensein von autophagischen Vesikeln und Vakuolen aufwies (Abb. 32, mittlere Spalte). In einzelne Zellen war der kontraktile Apparat sogar vollständig aufgelöst.

Überraschenderweise konnte auch in Herzen aus 10 Wochen alten α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Mäusen eine Dislokation der Mitochondrien detektiert werden. Diese waren verformt und lagen zufällig verteilt zwischen den Sarkomeren in der Zelle vor (Abb. 32, rechte Spalte). Auch hier konnte eine großflächige Degeneration der Myofibrillen, eine Akkumulation zahlreicher autophagischer Vesikel und Vakuolen (Abb. 32, Pfeile in mittlerer Spalte) sowie Proteinaggregate nachgewiesen werden, die Sarkomere *per se* waren aber nicht so stark betroffen wie in den Herzen der α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie. Dies zeigt jedoch, dass schon die alleinige Überexpression des humanen BAG3^{WT}-eGFP in der Maus zu einem „Mitochondrien-Phänotyp“ führt.

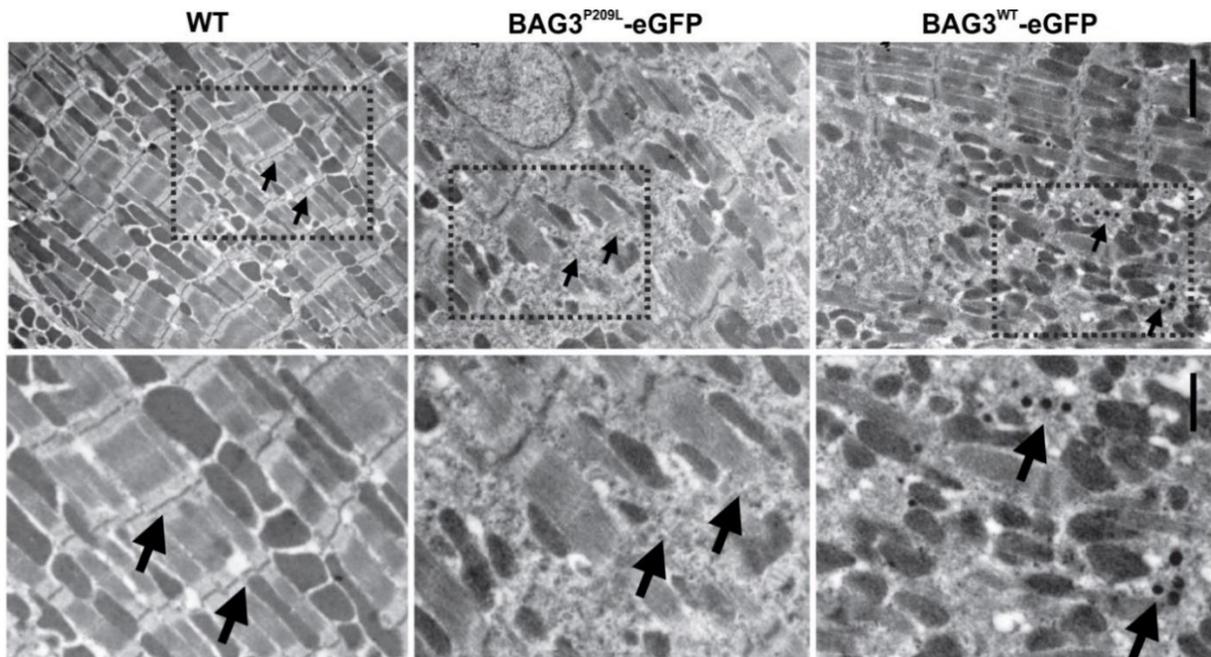


Abb. 32. Auflösung der Sarkomerstruktur in BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Herzen aus 10 Wochen alten Wildtypmäusen zeigten eine gleichmäßige Anordnung der Sarkomere mit lateraler Begrenzung durch die Z-Scheiben (Pfeile in Bildern in linker Spalte) und einheitlicher Verteilung der Mitochondrien (Bilder in linker Spalte). Herzen aus α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen desselben Alters hingegen wiesen großflächige Degenerationserscheinungen mit Proteinaggregaten, einer Dislokalisierung der Mitochondrien (Pfeile in Bildern in mittlerer Spalte) und Kardiomyozyten mit atrophen, schmalen Sarkomeren auf (Bilder in mittlerer Spalte). In Herzen aus 10 Wochen alten α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Mäusen konnte ebenfalls eine Dislokalisierung mit verformten Mitochondrien gezeigt werden (Bilder in rechter Spalte). Zudem fand sich eine Akkumulation auto-phagischer Vesikel und Vakuolen (Pfeile in rechter Spalte). $N=5$, $n=10$. Maßstab: 5 μ m (obere Reihe), 10 μ m (untere Reihe).

Die Herzen sowohl der α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP- als auch der α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie zeigten ultrastrukturell Hinweise auf eine Fibrose, die durch nachfolgende Untersuchungen bestätigt werden müsste.

3.3 Generierung eines *in vitro* und *in vivo* Modells zur konditionalen BAG3^{P209L}-eGFP-Expression

Um die Expression des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins auch in anderen Organen untersuchen zu können und den Zeitpunkt des Beginns und die Progression der P209L-BAG3opathie bestimmen zu können, wurden im Folgenden ein weiteres transgenes Mausmodell generiert, welches sich durch die Möglichkeit auszeichnet, die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression gewebespezifisch induzieren zu können.

3.3.1 Klonierung der Konstrukte mit konditionaler BAG3^{P209L}-eGFP-Expression

Da sich die ubiquitäre BAG3^{P209L}-eGFP- als auch die BAG3^{WT}-eGFP-Expression in mES-Zellen als toxisch erwies und die Expression der Fusionsproteine unter Kontrolle des α MHC-Promotors nur Kardiomyozyten-spezifisch ist (siehe 3.1 und 3.2), wurde zusätzlich ein Konstrukt generiert, mit dem eine konditionaler BAG3^{P209L}-eGFP-Expression möglich war.

Als Basis wurde dabei das in dieser Arbeit beschriebene und generierte CAG-BAG3^{P209L}-eGFP-Plasmid verwendet, bei dem die ubiquitäre BAG3^{P209L}-eGFP-Expression unter der Kontrolle des β -Aktin-Promotors steht und welches homologe Regionen zur Integration in den *Rosa26*-Locus aufwies (Abb 33 A). Bei diesem Promotor handelt es sich um einen synthetisch hergestelltes Hybrid-Konstrukt bestehend aus β -Aktin-Promotor und CMV-Enhancer, das zu hohen Expressionsleveln der entsprechenden Proteine in Säugetieren führt (Miyazaki *et al.*, 1989). Um eine Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression zu ermöglichen, musste *downstream* des CAG-Promotors eine durch *loxP*-Sequenzen flankierte Hygromycin-Stopp-Kassette eingefügt werden. Dadurch wird die Expression des BAG3^{P209L}-eGFP so lange verhindert bis die Hygromycin-Stopp-Kassette durch Verwendung einer *Cre*-Rekombinase entfernt wird. Hierzu wurde das „Quick & Easy Conditional Knock Out Kit-*loxP*“ in Kombination mit einer „*loxP*-PGK-gb2-hygro-*loxP* Selektionskassette“ der Firma Gene Bridges verwendet.

Nach Anlegen einer *E. coli* CAG-BAG3^{P209L}-eGFP Flüssigkultur wurde diese mit dem im Reagenziensatz enthaltenen pRedET-Plasmid transformiert und üN bei 30 °C auf Tetracyclin-enthaltene Agar-Platten kultiviert. Dies ist wichtig, da die Transformation bei 30 °C erfolgen kann, die Proteinprodukte des RedET-Plasmids aber bei dieser Temperatur inaktiv sind und erst bei einem Temperaturwechsel zu 37 °C ihre Wirksamkeit entfalten können.

Im Folgenden wurden zwei Primer entworfen, deren 50 bp am jeweiligen 3'-Ende Sequenzen der *loxP*-PGK-gb2-hygro-*loxP*-Selektionskassette binden (Abb 33 B). Die letzten 50 bp des 5'-Ende des jeweiligen Primers bestanden dabei aus Sequenzen, die zu Sequenzen der cDNA des CAG-Promotors und des BAG3^{P209L} des zuvor generierten CAG-BAG3^{P209L}-eGFP-Plasmids homolog (hR = homologe Regionen) waren (Abb 33 A und Abb. 33 B). Nach Durchführung einer PCR, bei der unter Anderem ein 3743 bp großes DNA-Fragment mit den entsprechenden homologen Regionen entstand (Abb. 33 C), wurde dieses mittels einer Gelextraktion isoliert und aufgereinigt. Das deutlich größere DNA-Fragment ist ein unspezifisches Produkt, welches nachfolgend verworfen wurde. Im Anschluss daran wurde eine Elektroporation durchgeführt, bei der das amplifizierte DNA-Fragment in *E. coli* CAG-BAG3^{P209L}-eGFP pRedET eingebracht wurde. Während der Inkubation üN bei 37 °C erfolgte die Rekombination der homologen Regionen (Zhang *et al.*, 1998), woraus das CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{fllox}-Plasmid resultierte (Abb. 33 C). Das

entstandene Plasmid wurde aufgereinigt und zur Amplifikation in *E. coli* Bakterien transformiert, daraus resultierende Hygromycin-resistente Einzelkolonien in Flüssigkulturen herangezogen und deren Plasmid-DNA unter Durchführung einer Mini-Präparation isoliert. Durch eine Testspaltung mit *AseI* konnte die erfolgreiche Rekombination anhand der Bandengröße der Spaltungsprodukte (DNA-Fragmente von 5804 bp, 2288 bp und 1238 bp) in einer Agarosegelelektrophorese überprüft werden (Abb. 33 D). Eine nachfolgende Sequenzierung der positiv identifizierten Plasmid-DNA bestätigte die erfolgreiche Generierung des Konstrukts, bevor dieses stabil in den *Rosa26*-Locus von mES-Zellen eingebracht wurde.

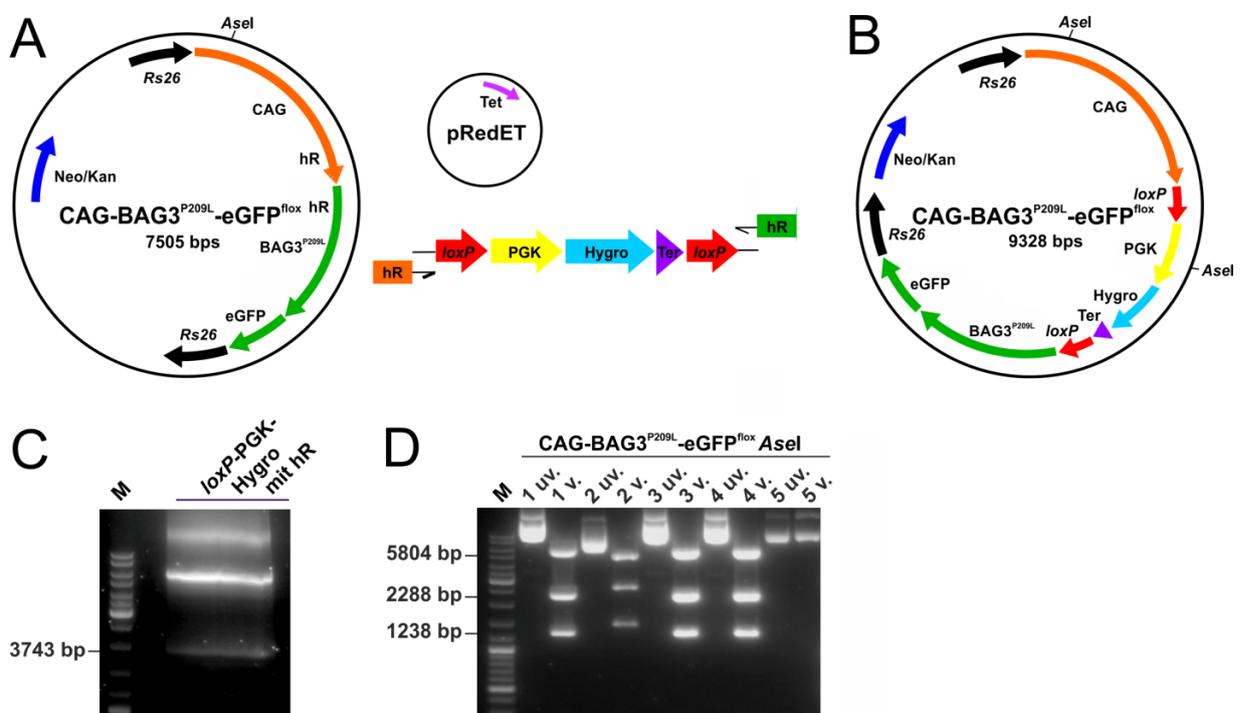


Abb. 33. Schematische Darstellung der Klonierung des CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{floX}-Konstrukts zur konditional- en BAG3^{P209L}-eGFP-Expression. **A.** Die *loxP*-Sequenzen wurden über die homologen Regionen in das CAG-BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt eingefügt. **B.** Generiertes CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{floX}-Konstrukt. **C.** Die PCR der Hygro-mycin-Stopp-Kassette lieferte ein 3743 bp großes DNA-Fragment mit homologen Regionen **D.** Eine erfolgreiche Rekombination zeigte drei DNA-Fragmente der Größen 5804 bp, 2288 bp und 1238 bp. uv. = unverdaute Plasmid-DNA, v. = Plasmid-DNA nach Spaltung mit *AseI*. hR = homologe Regionen, M = 1 kb-DNA-Leiter.

3.3.2 Gezielte Integration von BAG^{P209L}-eGFP^{floX} in den *Rosa 26*-Locus von mES-Zellen

Mit Hilfe einer Elektroporation wurde das CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{floX}-Konstrukt in den *Rosa26*-Locus des murinen Genoms eingebracht. Dieser eignet sich besonders gut zur Integration von Geninformationen in das Mausgenom, da dort keine *Silencing*-Effekte wirksam werden und somit eine konstitutive, ubiquitäre Expression der betreffenden Gene erlaubt (Casola *et al.*, 1991).

Die Integration in den *Rosa26*-Locus erfolgte durch homologe Rekombination im Bereich der *Rosa26*-Arme in Kombination mit für Zinkfinger-nukleasen-kodierenden Plasmiden (Perez-Pinera *et al.*, 2012), die von Prof. Charles Gersbach, Abteilung für Biomedizinisches Ingenieurwesen der Duke Universität, bereitgestellt wurden (Abb. 34 A).

Die Elektroporation der mES-Zellen mit dem CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{fllox}-Konstrukt und die nachfolgende Selektion mit Hygromycin resultierte in 15 stabilen Transfektanten. Diese wurden expandiert und ihre genomische DNA isoliert. Mittels einer PCR mit zwei Primerpaaren, die am 5'- und am 3'-Ende sowohl im Konstrukt als auch im *Rosa26*-Locus banden und die durch Dr. Caroline Geisen, Institut für Physiologie der Universität Bonn, bereit gestellt wurden, konnte die Integration in den *Rosa26*-Locus überprüft werden (Abb 34 B).

Die PCR detektierte ein positives Ergebnis in einem der 15 mES-Zellklone der Transfektion mit dem CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{fllox}-Konstrukt (DNA-Fragmente einer Größe von 1053 bp und 1189 bp) und ist anhand von sieben mES-Zellklone beispielhaft gezeigt (Abb 34 B). In einzelnen mES-Zellklonen, wie bspw. mES-Zellklon 7, erfolgte die homologe Rekombination nur im Bereich eines *Rosa26*-Arms und war somit unvollständig (Abb 34 C).

Die genomische DNA des mES-Zellklons 3, welcher sich durch eine erfolgreiche Rekombination im Bereich beider *Rosa26*-Arme auszeichnete (Abb 34 C), wurde im Anschluss in eine qPCR eingesetzt. Nachfolgend wurde die Kopienzahl des Transgens im Genom des mES-Zellklons 3 bestimmt. Dabei zeigte das Ergebnis der qPCR das Vorliegen einer einzigen Integration des CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{fllox}-Konstrukts im Genom des generierten mES-Zellklons 3. Die relative Expression war hier vergleichbar mit der einer Kontrolle, bei der die genomische DNA eine Integration des eGFP-Reporters beinhaltet (Abb. 34 D).

Durch eine nachfolgende Induktion der Expression durch Verwendung einer *Cre*-Rekombinase wurde das generierte mES-Zell Modell *in vitro* überprüft, bevor die Generierung einer transgenen Mauslinie mittels Komplementation mit diploiden Embryonen durchgeführt wurde.

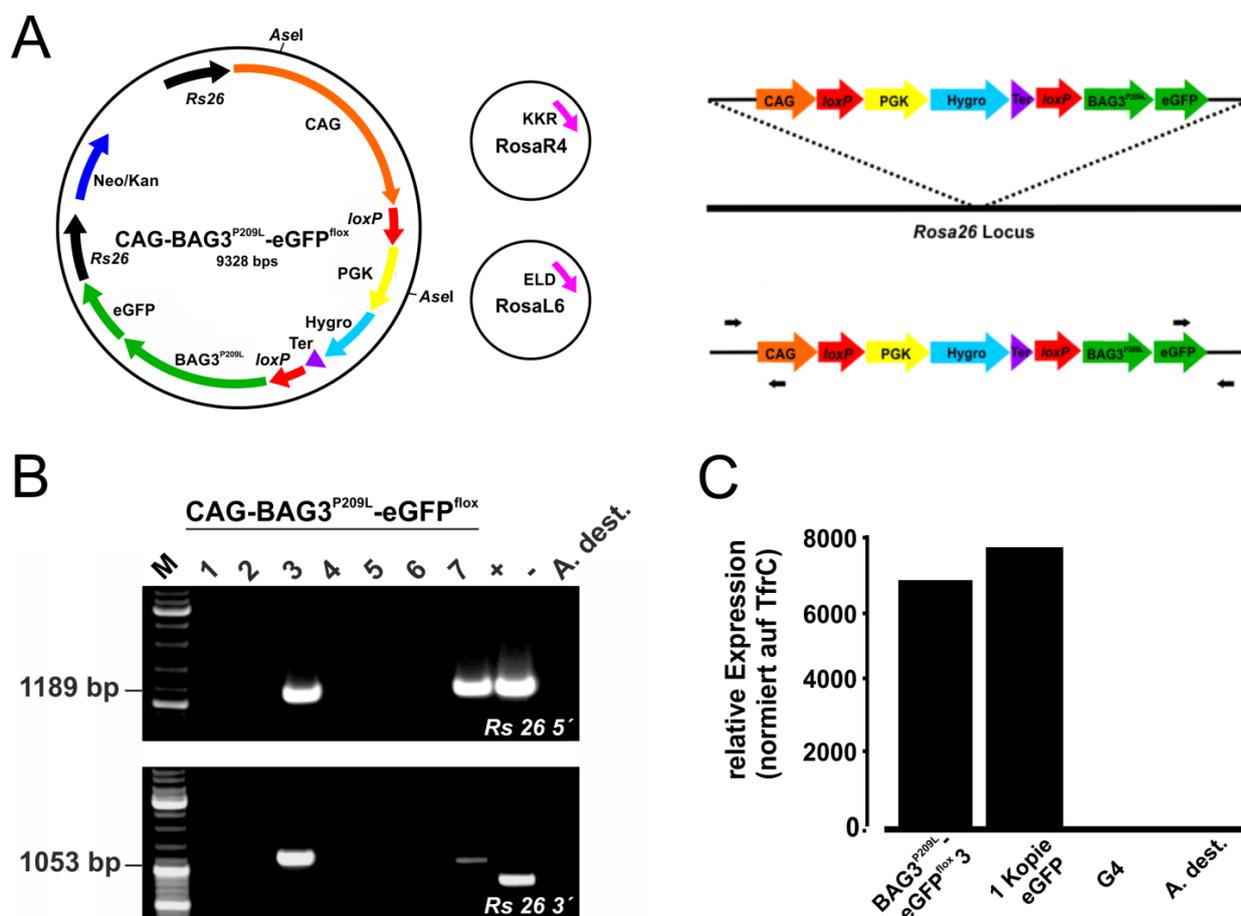


Abb. 34. Gezielte Integration des humanen CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{floxed}-Konstrukts in den Rosa26-Locus. A. Bei der Elektroporation verwendete Konstrukte. **B.** Die Integration in den Rosa26-Locus erfolgte durch homologe Rekombination im Bereich der Rosa26-Arme. **C.** PCR zur Überprüfung der kIntegration in den Rosa26-Locus. **D.** Eine qPCR bestätigte das Vorliegen einer Integration im Genom des positiven CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{floxed} Klons 3. KKR-/ELD: Mutationen in den Zinkfinger nukleasen, TfrC: Transferrin-Rezeptor. M: 1 kb-DNA-Leiter.

3.3.3 Induktion der BAG3^{P209L}-Expression *in vitro*

Um die Expression des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins *in vitro* zu induzieren, wurde ein für ein Cre-Rekombinase kodierender Adeno-assoziiertes Virus verwendet, das durch Prof. Philipp Sasse, Institut für Physiologie I der Universität Bonn, bereitgestellt wurde (Abb. 35 A). Dieses erkennt und bindet die ins Genom der mES-Zellen eingefügten loxP-Sequenzen und schneidet die entsprechenden DNA-Sequenzen (in diesem Fall loxP-PGK-Hygromycin-loxP) aus, wenn sie so wie in dem hier generierten Konstrukt in gleicher Richtung orientiert sind (Sternberg *et al.*, 1981), so dass die für BAG3^{P209L}-eGFP-kodierende cDNA abgelesen werden kann.

Für die Transduktion mit dem für die Cre-Rekombinase-kodierenden Virus wurde der mES-Zellklon CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{floxed} 3 aufgetaut, expandiert, auf beschichtete Schalen ausgesät und mit Virus behandelt. Nach einer Zeitspanne von 48 h nach der Transduktion mit dem Virus konnten die ersten mES-Zellen beobachtet werden, in denen die Expression des BAG3^{P209L}-eGFP erfolgte

(Abb 35 B). Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrolle, unbehandelte mES-Zellen desselben Klon, keine eGFP-positiven Signale (Abb 35 B).

Nach Dissoziation der mES-Zellen zu Einzelzellen konnte die Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression auch durch Durchflusszytometrie-Analysen bestätigt werden. Durch eine Verschiebung zugunsten des eGFP-Signals setzte sich die Population von mES-Zellen, die das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein exprimierten, deutlich von den nicht-induzierten Zellen ab (Abb 35 C), das generierte *in vitro* Modell für die konditionelle Expression des BAG3^{P209L}-eGFP war also wirksam.

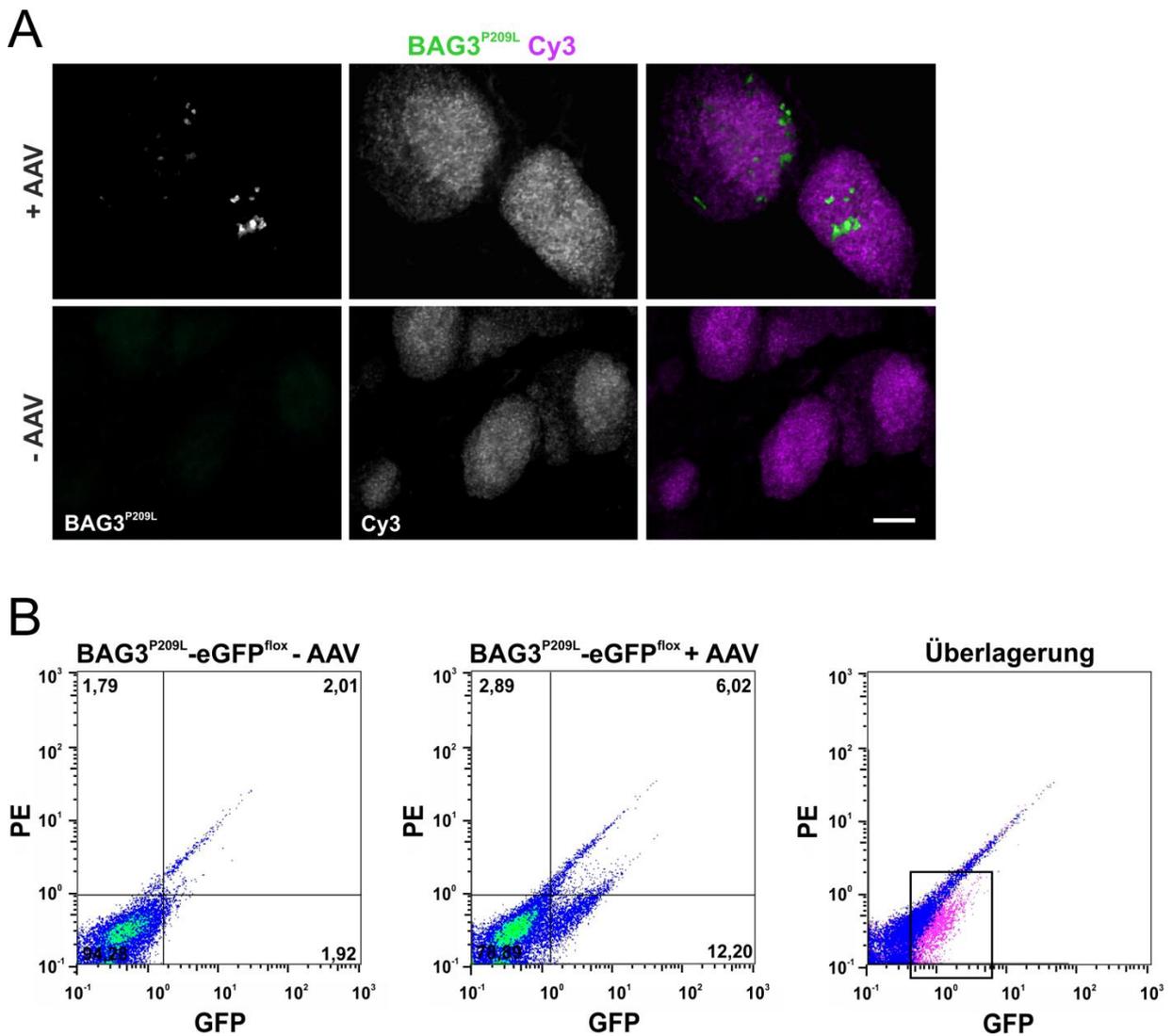


Abb. 35. Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vitro* durch Verwendung einer Cre-Rekombinase. A. Die Transduktion des CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{flox} Klon 3 führte 48 h später zu Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in mES-Zellen. **B.** FACS-Analysen, die mit den entsprechenden Populationen durchgeführt wurden, bestätigten die Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression. AAV = Adeno-assoziiertes Virus, Cy3 = Indocarbocyanin 3 (Autofluoreszenzkanal), PE = Phycoerythrin (Autofluoreszenzkanal), GFP: Grünfluoreszierendes Protein, Maßstab: 10 μ m.

3.3.4 Die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vivo* ist im Herzen „undicht“

Nachdem sich die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vitro* in mES-Zellen durch eine *Cre*-Rekombinase induzieren lies, wurde mittels Komplementation mit diploiden Embryonen eine transgene Mauslinie generiert. In den Nachkommen dieser Mauslinie wurde das Modell nun auch *in vivo* bezüglich seiner Funktionalität überprüft werden. Vor dem Hintergrund, dass es sich beim CAG-Promotor um einen sehr starken Promotor handelt, der zu hohen Genexpressionen in Säugetieren führt (Miyazaki *et al.*, 1989), musste evaluiert werden, ob möglicherweise vor Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression eine Transkription der BAG3^{P209L}-eGFP-Sequenz erfolgte und diese durch die *loxP*-PGK-Hygromycin-Stopp-*loxP*-Selektionskassette nicht ausreichend blockiert wurde.

Hierfür wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (embryonal, postnatal, adult) diverse Organe (Gehirn, Lunge, Herz, Darm, Leber, Skelettmuskel, Niere, Diaphragma) aus hemizygoten, transgenen CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{flox}-Mäusen entnommen und sowohl makroskopisch als auch in histologischen Schnitten in Hinblick auf BAG3^{P209L}-eGFP-Expression untersucht.

In Organen aus 10 Wochen alten Mäusen konnte makroskopisch und in histologischen Schnitten von Gehirn, Lunge, Darm, Leber, Skelettmuskel, Niere und Diaphragma keine BAG3^{P209L}-eGFP-Expression detektiert werden (Abb. 36 A), im Gegensatz zum Herzen, in dem BAG3^{P209L}-eGFP-Expression beobachtet werden konnte (Abb. 36 A). Dabei zeigten immer wieder unterschiedliche kleine Regionen im Ventrikel BAG3^{P209L}-eGFP-Expression, die makroskopisch zwar nicht sichtbar war, in histologischen Schnitten jedoch eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abb. 36 B). Diese so genannte „Leakyness“ der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression trat zudem nur in männlichen Tieren auf, alle weiblichen Tiere desselben Alters waren immer eGFP-negativ. In den Atrien war weder makroskopisch noch in Schnitten BAG3^{P209L}-eGFP-Expression nachweisbar (Abb. 36 B).

Bei genauerer Betrachtung der ventrikulären BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in histologischen Schnitten von Herzen konnte eine Lokalisation des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins insbesondere an den Glanzstreifen beobachtet werden (Abb. 36 C). Hier war die Expression besonders stark und teilweise wurde hier eine beginnende Aggregatbildung sichtbar (Pfeile in Abb 36 C).

Somit war das generierte Mausmodell zur induzierbaren Expression von BAG3^{P209L}-eGFP hinsichtlich der Expression des Proteins *in vivo* im Herzen zwar „undicht“, jedoch waren die BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Regionen klein. Nachfolgend wurde das generierte Mausmodell deshalb auf eine Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression und deren Stärke *in vivo* untersucht (siehe 3.3.5).

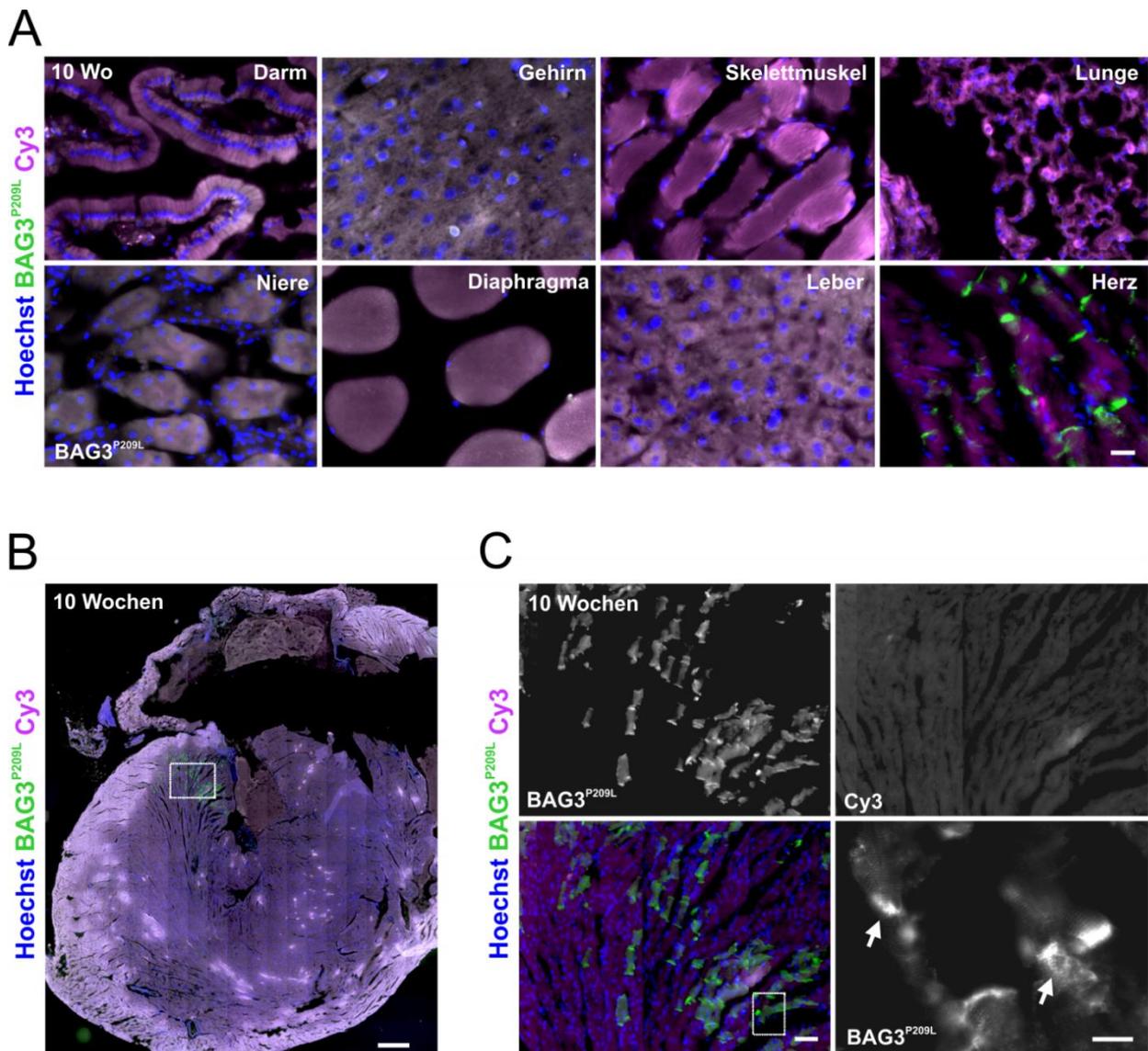


Abb. 36. „Leakyness“ der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vivo*. **A.** Um sicher zu stellen, dass die BAG3^{P209L}-eGFP-Sequenz erst nach Induktion abgelesen wird, wurden diverse Organe entnommen und untersucht. Dabei konnte in histologischen Schnitten nur im Herzen eine BAG3^{P209L}-eGFP-Expression detektiert werden. **B.** Nur männliche Tiere zeigten eine BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in unterschiedlichen Regionen im Ventrikel. **C.** Vergrößerung eines Ausschnitts mit BAG3^{P209L}-eGFP-Expression. Besonders in den Glanzstreifen war diese sehr stark (Pfeil in Vergrößerung im unteren Bild in rechter Spalte). α -Aktinin-Färbung in magenta. Kernfärbung in blau. Cy3 = Indocarbocyanin 3 (Autofluoreszenzkanal), Cy5 = Indo-dicarbocyanin 5 (Autofluoreszenzkanal), $n=10$. Maßstab: 10 μ m (A und Vergrößerung in C), 500 μ m (B), 20 μ m (C).

3.3.5 Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in BAG3^{P209L}-eGFP^{fllox}-Mäusen

Zur ubiquitären Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vivo* erfolgte die Verpaarung von hemizygoten Weibchen der CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{fllox}-Mauslinie mit hemizygoten Männchen der Mauslinie PGK-*Cre*, die freundlicherweise von Prof. Klaus Willecke, Abteilung für molekulare Genetik und Zellbiologie der Universität Bonn, zur Verfügung gestellt wurde. Gemäß der Mendelschen Vererbungslehre waren 25 % der aus dieser Verpaarung resultierenden Nachkommen positiv für sowohl das *Cre*-Gen als auch das BAG3^{P209L}-eGFP-Gen, woraus ein Entfernen der *loxP*-

PGK-Hygromycin-*loxP*-Sequenz in diesen Tieren resultierte. Hieraus resultierte eine makroskopisch schon im Embryonalstadium (E.16.5-18.5) sichtbare Expression des BAG3^{P209L}-eGFP-Gens in doppelt-transgenen Tieren im Vergleich zu einfach- oder nicht-transgenen Geschwistertieren (Abb. 37 A).

Durch eine PCR, bei der die Primer so gewählt wurden, dass einer der Primer im CAG-Promotor und der andere Primer im BAG3^{P209L}-eGFP-cDNA band, konnte das Entfernen der *loxP*-PGK-Hygromycin-*loxP*-Sequenz bestätigt werden. Während die Agrosegelelektrophorese einer PCR mit genomischer DNA eines nicht-transgenen Tieres kein sichtbares DNA-Fragment lieferte (Abb. 37 B, erste Spalte von links), konnte bei der PCR mit gDNA eines doppelt-transgenen Tieres ein DNA-Fragment der Größe von 418 bp nachgewiesen werden (Abb. 37 B, zweite Spalte von links). Die Positivkontrolle, welche ein einfach-transgenes Tier darstellte, das für das PGK-Cre-cDNA negativ und für das BAG^{P209L}-eGFP-cDNA negativ war, lieferte ein DNA-Fragment von 2248 bp, da hier die *loxP*-PGK-Hygromycin-*loxP*-Sequenz noch vorlag (Abb. 37 B, dritte Spalte von links).

Aus den doppelt-transgenen Tieren wurden daraufhin diverse Organe (Herz, Lunge, Gehirn, Niere, Leber, Darm, Skelettmuskel, Diaphragma) entnommen, Gesamtprotein isoliert und Western Blot Analysen durchgeführt. Nach Inkubation mit einem BAG3-Antikörper, der sowohl humanes (BAG3^{P209L}-eGFP) als auch murines (endogenes BAG3) detektiert, war das Verhältnis von humanen BAG3 zu endogenem BAG3 in Gehirn, Leber und Skelettmuskel nahezu 1 und entsprach am ehesten der genetischen Grundlage der humanen Pathologie (Abb. 37 C und D). Diese Untersuchungen müssten jedoch aufgrund der geringen Probenanzahl (jeweils $n=1$) wiederholt und bestätigt werden.

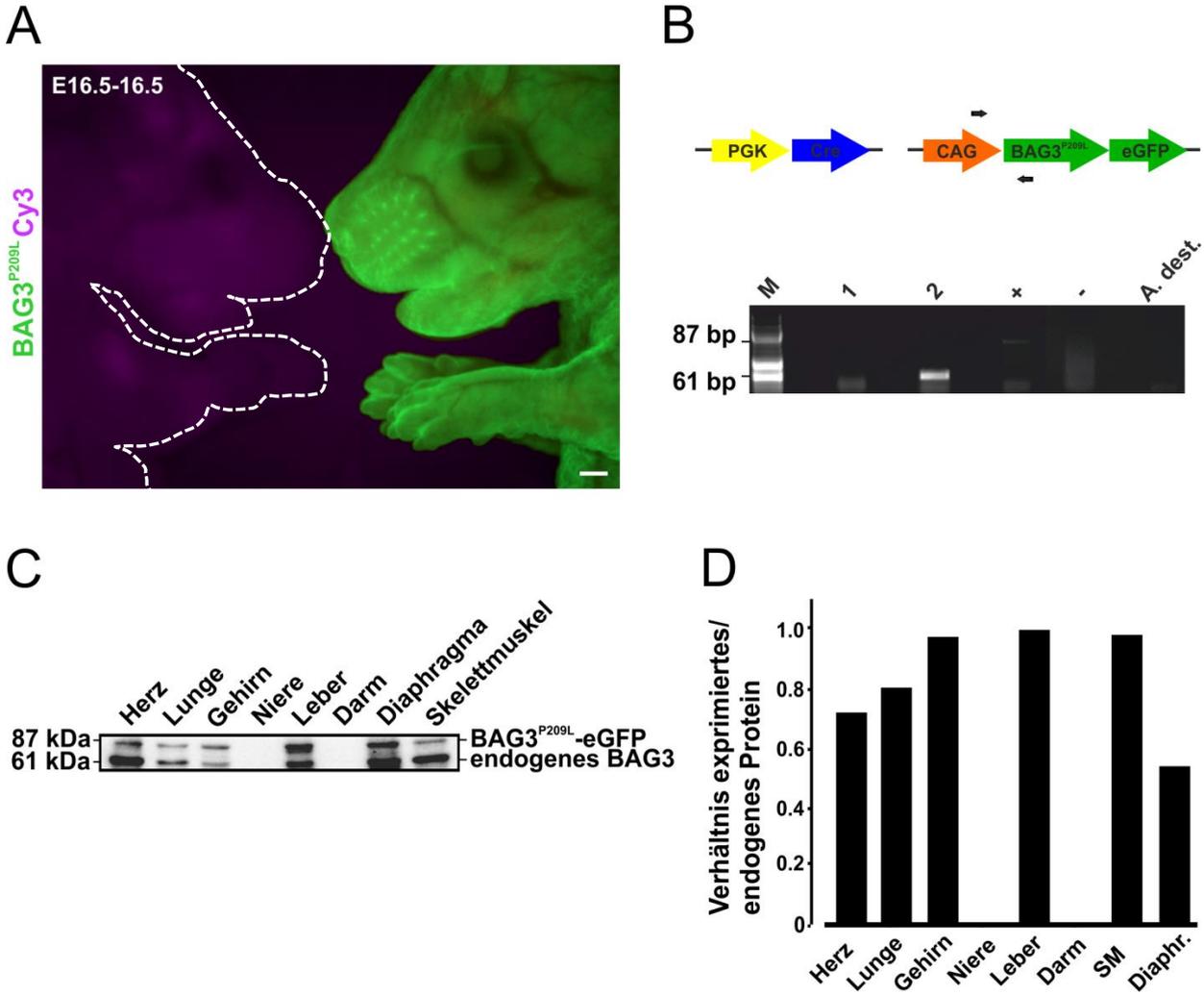


Abb. 37. Konditionale Expression von BAG3^{P209L}-eGFP in Embryonen. **A.** Doppelt-transgenes Tier, in dem BAG3^{P209L}-eGFP ubiquitär exprimiert wird, neben einem nicht-transgenen Geschwistertier. **B.** Das Ergebnis der PCR, bei der die Primer im CAG-Promoter und dem BAG3^{P209L} banden, zeigte eine DNA-Fragment der Größe 418 bp und bestätigte die Deletion der *loxP*-PGK-Hygromycin-*loxP*-Sequenz im doppelt-transgenen Tier. **C.** Western Blot Analysen nach Isolierung des Gesamtproteins aus diversen Organen Signal zeigen, dass das Verhältnis von humanem BAG3 zu endogenem BAG3 in Gehirn, Leber und Skelettmuskel nahezu 1 war. Aufgetragen wurden 30 µg Protein. SM = Skelettmuskel, Diaphr. = Diaphragma. Maßstab: 1 mm.

4. Diskussion

4.1 Generierung eines *in-vitro*- und *in-vivo*-Modells der P209L-BAG3opathie

Im Gegensatz zu anderen Myofibrillären Myopathien, die erst nach dem 40. Lebensjahr auftreten und sich langsam entwickeln, ist die humane P209L-BAG3opathie durch einen frühen Ausbruch im Kindesalter und einen progressiven Krankheitsverlauf mit einer schweren Atmungsinsuffizienz und einer restriktiven Kardiomyopathie gekennzeichnet (Selcen *et al.*, 2011, Selcen *et al.*, 2009).

Wesentliche Aspekte der humanen Pathologie sind die Fragmentierung der Muskelfibrillen und eine Bildung von BAG3^{P209L}-Aggregaten, die in immunhistochemischen Färbungen betroffener Muskeln nachgewiesen wurden (Ruparelia *et al.*, 2012). Diese Daten, seien sie pathologischer oder klinischer Art, basieren jedoch ausschließlich auf Muskelbiopsien von Patienten und *bis dato* ist kein Mausmodell bekannt, das das humane Krankheitsbild der P209L-BAG3opathie darstellt.

Ein einziges Mausmodell beschreibt die pathologischen Veränderungen bei Funktionsverlust von BAG3. Die aus der Depletion des BAG3-Gens resultierende schwere Myofibrilläre Myopathie hat die für diese Erkrankung typischen Merkmale wie die Disintegration der Z-Scheiben und eine Akkumulation von basophilen Abbauprodukten in Geweben der quergestreiften Muskulatur zur Folge (Homma *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde sowohl ein *in-vitro*- als auch ein *in-vivo*-Modell für die humane P209L-BAG3opathie generiert, welches die Untersuchung der Myofibrillären Myopathie ausschließlich in Kardiomyozyten ermöglicht. Neben der Untersuchung der physiologischen Funktion von BAG3^{P209L}, könnte das Modell zukünftig für die Testung möglicher Therapieansätze von Nutzen sein.

4.2 Evaluierung des *in-vitro* Modells in Bezug auf die Z-Scheibenstruktur der Kardiomyozyten

Da wesentliche pathologische Merkmale der P209L-BAG3opathie die Disintegration der Z-Scheiben und die Bildung von Aggregaten sind (Olivé *et al.*, 2015), wurden diese Parameter zur Evaluierung der Z-Scheibenstruktur der Kardiomyozyten des *in vitro* Modells, bestehend aus mES-abgeleiteten und zu Einzelzellen dissoziierten Kardiomyozyten, herangezogen. Dabei diente der kardiale Marker α -Aktinin, das als Strukturprotein das Rückgrat der Z-Scheibe bildet (Ylänné *et al.*, 2001, Blanchard *et al.*, 1989) und so zu deren Erhalt beiträgt, als Indikator.

Schon bei der transienten Transfektion von embryonalen Kardiomyozyten mit den α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP bzw. α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukten wurde eine Bildung von BAG3^{P209L}-

eGFP-Aggregaten sichtbar, eine Beobachtung, die sich mit zuvor publizierten Ergebnissen deckte. So konnte in Experimenten, in denen ein FLAG-BAG3^{P209L}-Konstrukt in COS7-Zellen transfiziert wurde, eine Aggregation des mutierten Proteins im Vergleich zu mit FLAG-BAG3^{WT}-transfizierten COS7-Zellen gezeigt werden (Selcen *et al.*, 2009). Auch in einem Zebrafischmodell, bei dem humanes BAG3^{P209L}-eGFP überexprimiert wurde, konnte eine Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten in Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden während humanes BAG3^{WT}-eGFP an die Z-Scheiben lokalisierte (Ruparelia *et al.*, 2014)

In einer anderen Studie wiederum konnte nach Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten mit einem humanen BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt eine Lokalisation des BAG3^{P209L}-eGFP an die Z-Scheiben ohne eine Bildung von Aggregaten gezeigt werden (Arimura *et al.*, 2011). Dies lässt sich aber wohl darauf zurück führen, dass das eingebrachte BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurde, welcher aufgrund seiner verminderten basalen Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten als schwacher Promotor klassifiziert werden kann (Bauer *et al.*, 2005, Maass *et al.*, 2003) und das Expressionsniveau somit nicht ausreichend war, um eine Dislokalisierung der Z-Scheibe und eine Bildung von Aggregaten auszulösen.

In nachfolgenden Transfektionsexperimenten, bei denen embryonaler Kardiomyozyten mit α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP bzw. α MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukten transfiziert wurden, zeigte sich jedoch, dass die Lokalisation des α -Aktinins an der Z-Scheibe trotz Verwendung des starken Kardiomyozyten-spezifischen α MHC-Promotors unbeeinträchtigt war. Dies führte zu der Hypothese, dass das BAG3^{P209L}-eGFP früher während der Entwicklung der Kardiomyozyten und somit über einen deutlich längeren Zeitraum exprimiert werden muss, um das humane Krankheitsbild mit einer Disintegrationen der Z-Scheiben hervorzurufen. Dies ist bspw. von CHAP (*cytoskeletal heart-enriched actin-associated protein*), ein weiteres Protein der Z-Scheibe mit starker Expression in der Herz- und Skelettmuskulatur, bekannt. Eine Überexpression von CHAP in neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten führte zu einer Disorganisation von α -Aktinin (Beqqali *et al.*, 2010). Auch eine Überexpression verschiedener Titinfusionsproteine in Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen führte zu einer Bildung von Titinaggregaten und einem Sarkomerabbau (Peckham *et al.*, 1997, Turnacioglu *et al.*, 1997). Sogar die Überexpression einzelner Titin-*Repeats* in embryonalen Kardiomyozyten hatte eine Disintegration von Myofibrillen zur Folge (Ayoob *et al.*, 2000, Gregorio *et al.*, 1998).

Dass eine BAG3^{P209L}-eGFP-Expression zu einem früheren Zeitpunkt während der Kardiomyozytenentwicklung und somit über einen deutlich längeren Zeitraum den humanen Phänotyp mit einer Disintegrationen der Z-Scheiben widerspiegelt, wurde durch die anschließende Generierung eines *in vitro* Modells mit stabiler Integration des BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukts in das

Genom von mES-Zellen bestätigt. Hier konnte nach Differenzierung der mES-Zellen in Kardiomyozyten ein prozentualer Anteil von $66,67 \pm 6,43\%$ an BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten ausgemacht werden, der „abnormale“ Z-Scheiben mit Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Agregaten und einer Disorganisation von α -Aktinin aufwies. Im Vergleich dazu war dieser Anteil bei BAG3^{WT}-eGFP-Kardiomyozyten mit $30 \pm 5,29\%$ deutlich geringer.

4.3 Charakterisierung des *in vivo* Modells der P209L-BAG3opathie

Die Entwicklung der transgenen BAG3^{P209L}-eGFP Mäuse ist nicht beeinträchtigt

Dass BAG3^{P209L}-eGFP die Entwicklung der Mäuse nicht beeinträchtigt, zeigt die Tatsache, dass weder im Hinblick auf die Generationszeit der Mäuse noch das Verhältnis der transgenen Tiere zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren Unterschiede festzustellen waren und sich transgene Tiere, die das mutierte BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, nicht von ihren Wildtyp-Geschwistertieren unterschieden. Während *starvin*^{-/-} Larven, wobei es sich bei Starvin um das Orthlog zu BAG3 in Fliegen handelt, eine normale Muskelentwicklung während der Embryogenese von *Drosophila* zeigen, wird die Beeinträchtigung der Muskelfunktion im Lavalstadium offensichtlich, wenn die Muskeln anfangen zu arbeiten (Arndt *et al.*, 2010, Coulson *et al.*, 2005). Auch in *bag3*^{-/-} Mäusen, bei denen die Entwicklung der Muskulatur nach der Geburt zunächst normal verläuft, findet ab Tag 12 nach der Geburt keine Gewichtszunahme mehr statt (Homma *et al.*, 2006). Während es sich bei der Deletion von Starvin in Fliegen bzw. von BAG3 in Mäusen jedoch um einen *Knock-Out* handelt (Arndt *et al.*, 2010, Homma *et al.*, 2006), ist die Expression des BAG3^{P209L}-eGFP in dem hier generierten Mausmodell zum einen „nur“ Kardiomyozyten-spezifisch, zum anderen ist das Expressionsniveau nicht hoch genug einen so starken Phänotyp mit einem frühen Tod der Tiere herbeizuführen. Zum anderen zeigen jedoch auch die Tiere des Mausmodells zur R350P-Desminopathie weder Änderungen ihres Verhaltens noch eine geringere Lebenserwartung. Zudem sind die die transgenen Desmin^{R350P}-Mäuse, ebenso wie die BAG3^{P209L}-eGFP-Mäuse, fertil (Clemen *et al.*, 2015). Hingegen konnte in einem weiteren Mausmodell, bei dem die Mäuse das humane Nebulette^{Q128R} überexprimieren, welches im Menschen eine dilatative Kardiomyopathie hervorruft, schon eine embryonale Letalität der transgenen Tiere nachgewiesen werden (Purajev *et al.*, 2010). Eine Erklärung dafür, dass die Überexpression von Nebulette^{Q128R} im Gegensatz zu der von BAG3^{P209L}-eGFP embryonal letal ist, könnte darin begründet liegen, dass Nebulette als eines der vier Filamentsysteme der quergestreiften Muskulatur (Clark *et al.*, 2002) eine größere Rolle bei der Entwicklung und Stabilität der Z-Scheibenstrukturen während der Myofibrillogenese einnimmt (Esham *et al.*, 2007).

Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression im *in-vivo* Modell

Im hier generierten Mausmodell konnte im embryonalen Entwicklungsstadium weder makroskopisch noch in Schnitten eine Expression des BAG3^{P209L}-eGFP in den Atrien beobachtet werden, obwohl der α MHC-Promotor zu diesem Zeitpunkt in atrialen Kardiomyozyten aktiv sein sollte (Kolossoff *et al.*, 2005). Somit war das Signal des BAG3^{P209L}-eGFP entweder so schwach, dass es nicht sichtbar war, oder die Expression wurde durch ein so genanntes Gen-*Silencing* gemindert (Redberry, 2006). Dieses Phänomen wurde 1990 erstmals in Pflanzen beobachtet, bei denen sich das eingeführte und das endogene Gen für die Blütenfarbe gegenseitig unterdrückten (Napoli *et al.*, 1990, van der Krol *et al.*, 1990). Darüber, ob das *Silencing* im Falle der fehlenden BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in den Atrien durch eine Hemmung der Transkription (transkriptionelles Gen-*Silencing*) oder während der nachfolgenden Translation, bei der die gebildete mRNA nicht abgelesen wird (post-transkriptionelles Gen-*Silencing* oder RNA-*Silencing*), stattfindet, würde eine qPCR von atrialem Gewebe Aufschluss geben.

Für das Expressionslevel des eingebrachten Genabschnitts spielt die Anzahl an *random* Integrationen des entsprechenden Konstrukts, in diesem Fall BAG3^{P209L}-eGFP, in das Genom der Zielzelle eine entscheidende Rolle. So resultieren unterschiedliche Anzahlen an Integrationen in verschiedenen Expressionsstärken des Konstrukts. Als natürlicher Prozess kommt dies vor allem im Rahmen der Kopienzahlvariation vor, bei der Abweichungen der Anzahl an Kopien eines bestimmten DNA-Abschnittes innerhalb eines Genoms erzeugt werden, was zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen führt (Henrichsen *et al.*, 2009). Da das Genom der BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Mauslinie 32 *random* Integrationen des BAG3^{P209L}-eGFP-Genabschnitts enthielt, könnte auch im Ventrikel ein teilweises Gen-*Silencing* vorliegen, welches durch eine gegenseitige Beeinflussung oder Unterdrückung von exprimiertem BAG3^{P209L}-eGFP und endogenem BAG3 ausgelöst wurde. Verschiedene Studien belegen, dass das Einbringen von Fremd-DNA in Säugergenome zu einer Zellantwort führt, welche zu einer Histonmodifikation und einer DNA-Methylierung führt und letztlich in einem Gen-*Silencing* resultiert (Kirov *et al.*, 2015). Ein Gen-*Silencing* als Antwort auf einen ein-gebrachten „schädlichen“ Genabschnitt ist bspw. aus Pflanzen bekannt. Nach einem Pathogenbefall wird dort die Expression der pathogenen Gene supprimiert (Al-Kaff *et al.*, 1998). Ein Ausfall der *Silencing*-Maschinerie in Mäusen durch Depletion der entsprechenden Gene hat schon im frühen Entwicklungsstadium tödliche Folgen (Bernstein *et al.*, 2003). Dass die Heterogenität in Bezug auf den Anteil an exprimierenden Kardiomyozyten sowohl von Wurf zu Wurf als auch innerhalb der Würfe variierte, könnte durch eine Segregation der BAG3^{P209L}-eGFP-enthaltenen Genbereiche bei der Zellteilung erklärt werden. Bei dieser werden die homologen Chromosomen in der Meiose getrennt und auf die

Gameten aufgeteilt (Duro *et al.*, 2015, Kakui *et al.*, 2015). Wenn auch Integrationen des BAG3^{P209L}-eGFP-Genabschnitts auf den Geschlechtschromosomen vorliegen, ist die Segregation zusätzlich auch geschlechts-spezifisch gekoppelt. Hierfür spricht besonders, dass bei männlichen Tieren eine stärkere BAG3^{P209L}-eGFP-Expression auszumachen war, als bei den weiblichen Tieren desselben Wurfes.

Die Tatsache, dass die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression eine Heterogenität zeigte, erwies sich im weiteren Verlauf der Charakterisierung der Mauslinie jedoch als vorteilhaft.

Dadurch, dass nur Kardiomyozyten, die BAG3^{P209L}-eGFP exprimierten, die erwähnten phänotypische Eigenschaften aufwiesen, und nicht-exprimierenden Kardiomyozyten keinen Phänotyp zeigten, konnte letztere als interne Kontrolle verwendet werden. In elektronenmikroskopische Aufnahmen von Herzschnitten, bei denen die Hälfte der Kardiomyozyten als „vital“ erschien, konnte die Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression bestätigt werden.

Progressive Aggregatbildung und Dislokalisierung von Z-Scheibenproteinen in Kardiomyozyten der BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie

In immunhistochemischen Aufnahmen von BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten von Schnitten und Einzelzellen konnte eine deutliche Lokalisation des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins an die Glanzstreifen mit Aggregatbildung und eine teilweise Lokalisation an die Z-Scheiben beobachtet werden. Dies konnte auch im Zebrafischmodell *in vivo* nachgewiesen werden. Während in Skelettmuskelzellen 32 Stunden nach Befruchtung eine Lokalisation des BAG3^{WT}-eGFP-Proteins an die Z-Scheiben ersichtlich wurde, lokalisierte das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein zwar auch teilweise dort, formte jedoch auch BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate (Ruparelia *et al.*, 2014).

Hinsichtlich der Lokalisation des BAG3^{P209L}-eGFPs war in dem hier generierten Mausmodell in Schnitten jedoch mehr BAG3^{P209L}-eGFP-Protein an den Z-Scheiben lokalisiert als in isolierten Kardiomyozyten, wo oft nur noch eine Lokalisation an den Glanzstreifen vorhanden war. Dies könnte mit der Durchführung der Langendorff-Dissoziation der adulten Herzen zur Gewinnung von isolierten Kardiomyozyten in Zusammenhang stehen. Durch Verwendung von Proteinasen während des Dissoziationsvorgangs ist eine leichte Schädigung der Kardiomyozyten nicht ausgeschlossen (Louch *et al.*, 2012). Eine starke Lokalisation vieler Z-Scheibenproteine an den Glanzstreifen als pathologische Veränderung auf Krankheit oder Stress ist nicht ungewöhnlich (Clemen *et al.*, 2015). Eine Dissoziation von adulten Herzen in isolierte Kardiomyozyten kann dabei als Stress für das noch schlagenden Herz angesehen werden, was diesen Effekt noch verstärkt und eine Lokalisation von BAG3^{P209L}-eGFP an den Glanzstreifen ist daher nicht erstaunlich.

An den Z-Scheiben konnte wenig Ko-Lokalisation des exprimierten BAG3^{P209L}-eGFP und des endogenen BAG3 ausgemacht werden. Generell war das exprimierte BAG3^{P209L}-eGFP dort lokalisiert, wo kein endogenes BAG3 lokalisiert war. Dies deutet darauf hin, dass es eine Art „Kompetition“ des exprimierten BAG3^{P209L}-eGFP und des endogenen BAG3 geben muss.

Das endogene BAG3 war oft am Sarkolemm lokalisiert. Dies ist von Filamin C bekannt, welches in Zellen der Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert ist (Thompson *et al.*, 2000), und dort sowohl an die Z-Scheiben als auch an die Glanzstreifen lokalisiert (van der Ven *et al.*, 2000). Eine Dislokalisierung von Filamin C an das Sarkolemm konnte ebenso in Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit Gliedergürtel- bzw. Duchenne-Muskeldystrophie beobachtet werden (Thompson *et al.*, 2000). Aber auch für Desmin, das in quergestreiften Skelettmuskelzellen das vorherrschende Intermediärfilament ist und Strukturen des Zytoskeletts verbindet bzw. Organellen innerhalb der Zelle fixiert (Lazarides *et al.*, 1980), konnte eine Dislokalisierung in Kardiomyozyten aus BAG3^{P209L}-eGFP- Herzen nachgewiesen werden. In Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit R350P-Desminopathie konnte das mutierte Desmin^{R350P} durch Verwendung eines spezifischen Desmin^{R350P}-Antikörpers in subsarkolemmalen Regionen lokalisiert werden (Clemen *et al.*, 2015). In dem im Rahmen dieser Arbeit generierten Mausmodell für die P209L-BAG3opathie konnte eine Ko-Lokalisation von exprimiertem BAG3^{P209L}-eGFP und endogenem BAG3 an den Glanzstreifen beobachtet werden. Hier fand sich sowohl in Schnitten als auch in Einzelzellen eine sehr starke BAG3^{P209L}-eGFP-Expression mit großen BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten, die an den Glanzstreifen „verschmierten“ oder zu „zerfließen“ schienen. Das zuvor erwähnte Mausmodell zur R350P-Desminopathie wies diese pathologischen Veränderungen mit einem abnormalen Verteilungsmuster von Desmin ebenfalls auf. Durch Dissoziation von adulten Herzen aus homozygoten Tieren konnte in immunhistochemischen Analysen von isolierten Kardiomyozyten ebenfalls eine Anreicherung des Desmin^{R350P}-Proteins an den Glanzstreifen und eine Bildung von Desmin^{R350P}-Aggregaten im Sarkoplasma aufgezeigt werden (Clemen *et al.*, 2015).

Ein Vorhandensein von massiven BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten an den Glanzstreifen und deren „Zerfließen“, konnte auch in elektromikroskopischen Aufnahmen von Herzmuskelgewebe der α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie bestätigt werden. Dabei waren etwa in der Hälfte der Kardiomyozyten (grobe Schätzung von Dr. Andreas Unger, Institut für Kardiovaskuläre Physiologie der Universität Bochum) großflächige Degenerationserscheinungen zu finden mit atrophischen und schmalere Sarkomere, was sich in etwa mit dem ermittelten Anteil von $36,28 \pm 5,56$ % an BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten deckt und die zuvor erwähnte Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression (siehe 4.1) auch auf elektronenmikroskopischer Ebene verifiziert. Tatsächlich wurden in elektronenmikroskopischen Aufnahmen auch

Kardiomyozyten ausgemacht, deren kontraktile Apparat vollständig aufgelöst war. Während der Apoptose findet ein Schrumpfen der Zelle und ein Zusammenbruch der Zellmembran statt (Bouchier-Hayes *et al.*, 2008). Daraus könnte ein Austreten des BAG3^{P209L}-eGFP aus der Zelle resultieren. Somit wäre es sinnvoll, den Anteil an apoptotischen Kardiomyozyten in den BAG3^{P209L}-eGFP-Herzen zu bestimmen und zu überprüfen wie viele der „kaputten“ Kardiomyozyten keine BAG3^{P209L}-eGFP-Signale mehr aufweisen. Ebenfalls könnte ein erhöhter Anteil an Makrophagen, durch die während der Apoptose anfallende Zelltrümmer phagozytiert werden (Hengartner, 2000), darüber Aufschluss geben, ob in Kardiomyozyten der BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie generell mehr Apoptose vorliegt.

Das Vorhandensein von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten in den betroffenen Kardiomyozyten hatte ebenso eine veränderte Lokalisation anderer Z-Scheibenproteine, bspw. der Komponenten BAG3, Myopodin und Filamin C der CASA-Maschinerie (siehe 3.2.7 und ausführliche Diskussion in 4.4) und der Proteine Titin und Desmin zur Stabilität des Zytoskeletts (siehe 3.2.8) zur Folge.

In immunhistochemischen Analysen von Schnitten und isolierten Kardiomyozyten von Herzen aus 10 Wochen alten BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen konnte dabei auch eine deutliche schwächere Expression von Titin an den Z-Scheiben beobachtet werden. Dies könnte damit zu erklären sein, dass Titin als eines der vier großen Filamentsysteme (Labeit *et al.*, 1995) in den Z-Scheiben verankert ist und als sehr großes Protein maßgeblich zur Stabilität des Zytoskeletts beiträgt. Deshalb könnte eine Dislokation von Titin wahrscheinlich erst nachgewiesen werden, wenn das Zytoskelett vollständig zusammen gebrochen ist. Diese Kardiomyozyten wären in histologischen Schnitten aufgrund des Austretens von BAG3^{P209L}-eGFP aus der Zelle nicht mehr eGFP+ und werden nicht mehr erfasst. Ebenso in isolierten Kardiomyozyten war niemals Titin-Dislokation zu sehen, da diese entsprechenden Zellen schon während der Langendorff-Dissoziation sterben.

Überraschenderweise wurde auf elektronenmikroskopischer Ebene auch in Kardiomyozyten der BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie ein Phänotyp gezeigt, der in immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht sichtbar war. Die phänotypische Merkmalsausprägung bestand hauptsächlich aus einer Dislokation der Mitochondrien, welche verformt und zufällig verteilt in der Zelle vorlagen. Zusätzlich konnte jedoch auch hier eine Degeneration der Myofibrillen sowie Proteinaggregate nachgewiesen werden. Verglichen mit den BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten waren die Sarkomere der Kardiomyozyten, die BAG3^{WT}-eGFP-Expression zeigten, nicht so stark betroffen. Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp könnte die hohe Integrationszahl von 18 Kopien des BAG3^{WT}-eGFP-Gens in das Genom der Mauslinie sein, die zu einer starken Expression des BAG3^{WT}-eGFP führt. So exprimierten in Herzen aus 10 Wochen alten Tieren $83,13 \pm 2,58$ % der Kardiomyozyten das BAG3^{WT}-eGFP-Protein. Aus anderen Studien ist

geläufig, dass Stress-faktoren für den Organismus, wie ihn eine Überexpression von Proteinen darstellt, in einer Überlastung des proteosomalen Proteinaabbaus resultieren. So führte in Pflanzen ein Hitzeschock als Stressfaktor zu einer Überlastung des proteosomalen Proteinabbaus (Kurepa *et al.*, 2009). In Mäusen konnte eine Überlastung des proteosomalen Proteinaabbaus bspw. als Ursache für eine erbliche Degeneration der Retina nachgewiesen werden (Lobanova *et al.*, 2013). Da die Überexpression des BAG3^{WT}-eGFP hier zu einem totalen Überfluss des Proteins für die Zelle führen würde, wäre auch hier eine Überlastung des Proteasoms schlüssig. Während Proteine, die normalerweise für den proteosomalen Abbau bestimmt sind, mit einer Polyubiquitinkette markiert und so von den 19S-Komplexen des Proteasoms erkannt werden (Baumeister *et al.*, 1998), würde eine Überexpression von BAG3^{WT}-eGFP deutlich mehr Protein synthetisiert werden als durch das Proteasom abgebaut werden kann. Das „überschüssige“ BAG3^{WT}-eGFP würde in ubiquitiniertes Form in der Zelle in Aggregaten akkumulieren, wodurch der erwähnte Phänotyp ausgelöst wird. Tatsächlich ist dies von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson bekannt, bei denen eine Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten zu finden ist (Glickman *et al.*, 2002).

Aggregatbildung führt zu verringerter Mobilität des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins

Das dynamische Verhalten des BAG3^{P209L}-eGFP in adulten ventrikulären Kardiomyozyten, welches durch FRAP-Experimente bestimmt wurde, zeigte auf, dass experimentell keine *Recovery* des Proteins erfolgte. Ein Grund für ein verändertes dynamisches Verhalten eines Proteins kann das Fehlen von Bindungspartnern sein. Dies würde bedeuten, dass die Mutation in eine veränderten Konformation bzw. eine Fehlfaltung des Proteins resultiert, wodurch normalerweise vorhandene Bindungspartner bspw. durch allosterische Effekte nicht mehr gebunden werden.

Der geringe prozentuale Anteil von $13,37 \pm 6,83$ % des BAG3^{P209L}-eGFP in der mobilen Fraktion, lässt sich mit der beobachteten Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten in diesen Zellen in Einklang bringen. Dabei wird lösliches BAG3^{P209L}-eGFP-Protein dem *Pool* an löslichem Protein entzogen und liegt in der immobilen Fraktion vor, wodurch nach einem *Bleach* kein BAG3^{P209L}-eGFP-Protein keine *recovery* mehr stattfinden kann. Dies ist bekannt von FRAP-Experimenten, bei denen der Autophagosomenmarker LC3 mit einem eGFP-Marker gekoppelt und in Bezug auf sein dynamisches Verhalten analysiert wurde. Dort, wo das eGFP-LC3-Protein in Aggregaten vorlag, konnte keine *Recovery* der Fluoreszenz nach einem *Bleach* nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2013).

In anderen Studien, in denen ein BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukt im transgenen Zebrafischmodell überexprimiert wurde, konnte in Skelettmuskelzellen 32 Stunden nach Befruchtung zusätzlich zu

der Lokalisation an den Z-Scheiben auch eine Bildung von BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten nachgewiesen werden. Im äquivalenten Experiment, in dem ein BAG3^{WT}-eGFP-Konstrukt überexprimiert wurde, konnte eine Lokalisation des BAG3^{WT}-eGFP-Proteins an den Z-Scheiben nachgewiesen werden. Bei nachfolgenden FRAP-Experimenten mit den beiden Proteinen konnten sowohl in Bezug auf die mobile Fraktion als auch hinsichtlich der Halbwertszeiten keine signifikanten Unterschiede untereinander festgestellt werden. Dabei wurde für beide Proteine eine Halbwertszeit von 60 s ermittelt und es lagen 95 % des BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-Proteins in der mobilen Fraktion vor (Ruparella *et al.*, 2014). Schon der prozentuale Anteil des in der mobilen Fraktion vorliegenden BAG3^{WT}-eGFP-Proteins weicht mit 95 % deutlich von den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten $73,17 \pm 14,97$ % ab. Bei Vergleich des prozentualen Anteils der mobilen Fraktion des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins im Zebrafischmodell, welche sich ebenso auf einen Wert von 95 % beläuft und dem im Rahmen dieser Arbeit ermittelten prozentualen Anteil von $13,37 \pm 6,83$ %, zeigt sich jedoch eine große Diskrepanz. Dies würde bedeuten, dass sowohl das BAG3^{WT}-eGFP- als auch das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein zu 95 % in der mobilen Fraktion vorlagen und es keine Unterschiede hinsichtlich des dynamischen Verhaltens geben würde. Dies erscheint seltsam, da auch in Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden Skelettmuskelzellen BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate detektiert werden konnten (Ruparella *et al.*, 2014) und die mobile Fraktion des löslichen BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins somit geringer sein müsste als die des löslichen BAG3^{WT}-eGFP-Proteins, welches nachweislich keine BAG3^{WT}-eGFP-Aggregate bildete (Ruparella *et al.*, 2014). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass im Zebrafischmodell eine Mikroinjektion der entsprechenden DNA-Konstrukte in die Vorkerne des Zygotenstadium vorgenommen wird (Rosen *et al.*, 2009). Bei der nachfolgenden Verschmelzung der beiden Kerne, bei der das Fremdgen in die DNA eingebaut wird, ist der Integrationsort wie in dem hier generierten Mausmodell zufällig und die Kopienanzahl des Transgens nicht beschrieben. Es ist auch nicht bekannt, wie hoch die Anzahl an Integration des BAG3^{P209L}-eGFP-Gens in das Genom des Zebrafisches ist (Ruparella *et al.*, 2014). Somit könnte das Expressionslevel des BAG3^{P209L}-eGFP geringer sein und demzufolge weniger BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate gebildet werden. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte durch die Zuordnung von Maus und Mensch zu den Säugetieren und die hohe Sequenzhomologie von 90 % derer Genome geliefert werden (Chen *et al.*, 2001), wodurch posttranskriptionelle oder post-translationale Modifikationen auf ähnliche Weise erfolgen wie im Menschen (Olsen *et al.*, 2006). So könnte das eingebrachte humane BAG3^{P209L}-eGFP bzw. BAG3^{WT}-eGFP in der Maus anders modifiziert werden wie im Zebrafisch.

Um das mutierte BAG3^{P209L}-eGFP-Protein nicht nur in Hinblick auf sein dynamisches Verhalten zu untersuchen, sondern auch einen möglichen Einfluss der P209L-Mutation auf die Halbwertszeit

des Proteins nachzuweisen, wäre die Durchführung von Western-Blot-Analysen sinnvoll. Durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers für das mutierte Desmin^{R350P} konnte in hemizygoten Mäusen der bereits zuvor erwähnten Desmin^{R350P}-*Knock-In*-Mauslinie die Umsatzrate des Proteins ermittelt werden. Bei gleichzeitiger Inhibition der Proteinbiosynthese wurde dazu die Signalstärke des mutierten Desmin^{R350P}-Proteins und des Wildtyp-Desmins in Abhängigkeit der Zeit in Western-Blot-Analysen detektiert und mit Daten der Wildtypkontrolle verglichen. Interessanterweise konnte in hemizygoten Mäusen sowohl ein schnellerer Abbau des mutierten Desmin^{R350P} als auch des Wildtyp-Desmin im Vergleich zur Kontrolle, resultierend in einer höheren Umsatzrate des Proteins, gezeigt werden (Clemen *et al.*, 2015). Zum Nachweis eines möglichen Einflusses der P209L-Mutation auf die Halbwertszeit des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins, wäre die Durchführung von Western-Blot-Analysen sinnvoll. Bei gleichzeitiger Inhibition der Proteinbiosynthese würde dazu die Signalstärke des mutierten humanen BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins und des endogenen Wildtyp-BAG3 in Abhängigkeit der Zeit bestimmt, wobei die Verwendung einer Kombination aus BAG3- und eGFP-Antikörpern zweckmäßig wäre.

4.4. Mögliche Pathomechanismen der P209L-BAG3opathie

BAG3^{P209L}-Mutation führt zu einer Einschränkung des CASA-Mechanismus

In immunhistochemische Färbungen konnte eine deutliche Dislokalisierung von endogenem BAG3 und Myopodin bzw. Filamin C aufgezeigt werden. In manchen Bereichen war die Z-Scheibenstruktur gänzlich aufgelöst, insbesondere in isolierten Kardiomyozyten lag das Protein überwiegend im Zytoplasma vor. Die fehlende Ko-Lokalisation mit BAG3^{P209L}-eGFP und das Vorliegen von Myopodin in separaten Aggregaten, spricht für ein Vorhandensein von Autophagosomen, in denen das Z-Scheibenprotein schon vorher in *in-vitro*-Experimenten beobachtet werden konnte (Ulbricht *et al.*, 2013). Um dies *in vivo* zu verifizieren, müsste jedoch eine Ko-Lokalisation von Myopodin und dem Autophagosomenmarker LC3 nachgewiesen werden.

In Bindungsstudien, die durch Jan Daerr, Institut für Zellbiologie der Universität Bonn, wurden Myopodin bzw. Filamin C mit gleicher Intensität sowohl von BAG3^{P209L}-eGFP als auch von BAG3^{WT}-eGFP gebunden, so dass die P209L-Mutation demzufolge keinen Einfluss auf die Bindepartner zu haben scheint. Ob die Interaktion von BAG3^{P209L}-eGFP und Myopodin *per se* beeinträchtigt ist, könnte nur durch FRET-Analysen, bei denen eine Protein-Protein-Interaktion anhand einer Fluoreszenz verfolgt wird, aufgeklärt werden.

Diese Ergebnisse würden dafür sprechen, dass die P209L-Mutation im BAG3-Gen den CASA-Mechanismus zumindest beeinflusst. In einem Zebrafischmodell, in dem BAG3^{P209L}-eGFP überexprimiert wurde, konnte hingegen gezeigt werden, dass die Bildung der BAG3^{P209L}-eGFP-

Aggregate nicht durch eine Beeinträchtigung der Autophagie ausgelöst wird. Die Tatsache, dass in den Aggregaten auch endogenes BAG3 detektiert werden konnte, lässt auf einen Mechanismus schließen, bei dem die Menge an verfügbarem endogenem BAG3 durch Bildung von BAG3^{P209L}-Aggregate, die endogenes BAG3 mitziehen, vermindert wird. Folglich führt dies zu einer unzureichenden Zufuhr von BAG3^{WT}-Protein an der Z-Scheibe, was letztendlich eine Auflösung der Myofibrillen nach sich zieht (Ruparella *et al.*, 2014).

Die Bildung der BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate in den Kardiomyozyten zeigten eine deutliche Ko-Lokalisation mit dem endogenen BAG3, was den vorgeschlagene Mechanismus auch hier plausibel erscheinen lässt. Da das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein in Bindungsstudien keine veränderten Bindungspartner aufwies und in Skelettmuskelzellen des Zebrafisches, in denen das BAG3^{P209L}-eGFP überexprimiert wurde, eine Stimulation der Autophagie eine Auflösung der BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate mit sich brachte, scheint das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein funktionell nicht beeinträchtigt zu sein und könnte somit als Bestandteil des CASA-Komplexes im CASA-Mechanismus fungieren. Verglichen mit dem BAG3^{WT}-eGFP-Protein neigt das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein jedoch zur Aggregatbildung. Dies könnte eine Folge der möglichen veränderten Konformation sein, welche aus dem Austausch von Prolin zu Leucin an Position 209 resultiert. Während der Iminoring des Proteins der Polypeptidkette eines Proteins strukturelle Stabilität liefert (Perálvarez-Marín *et al.*, 2008), würde ein Austausch von Prolin gegen Leucin eine alternative Faltung von BAG3^{P209L} mit sich bringen (Homma *et al.*, 2009).

Aus *in-vitro*-Studien ist bekannt, dass die Proteinqualitätskontrolle unter physiologischen Bedingungen durch das Proteasom durchgeführt wird (Gamerding *et al.*, 2009). Stressbedingungen, wie sie eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine darstellt, führen jedoch zu einem Wechsel zur Autophagie, da das Proteasom unlösliche Proteinaggregate nicht abbauen kann (Ding *et al.*, 2008). Da das endogene BAG3 normalerweise über das Proteasom abgebaut wird (Gamerding *et al.*, 2009), wäre davon auszugehen, dass BAG3^{P209L}-eGFP auch über das Proteasom abgebaut wird. Bedingt durch die BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregatbildung wird auch hier die Autophagie im Rahmen des CASA-Mechanismus aktiviert mit der Intention diese abzubauen. Da das BAG3^{P209L}-eGFP-Protein grundsätzlich funktionell ist, könnte nicht-aggregiertes BAG3^{P209L}-eGFP als Bestandteil des CASA-Komplexes an diesem Prozess mitwirken. Da das Protein jedoch zur Aggregatbildung neigt und die Anzahl der BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate in Abhängigkeit der Zeit zunimmt, ist der CASA-Mechanismus schließlich überlastet. Dies würde sowohl die teilweise Lokalisation des Proteins an der Z-Scheibe, an denen der CASA-Komplex lokalisiert ist (Arndt *et al.*, 2010), als auch die progressive BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregatbildung erklären. Schließlich nimmt die Menge an BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten Überhand, Filamin C und vermutlich andere Z-Scheibenproteine

werden in die BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate gezogen, das Zytoskelett der Kardiomyozyten bricht zusammen. Dies äußert sich in der Bildung von α -Aktininaggregaten, welche in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ebenso nachgewiesen wurden wie die Auflösung der Myofibrillen. Um die Beteiligung des CASA-Mechanismus an dem vorgeschlagenen Mechanismus definitiv zu bestätigen, wären jedoch noch weitere immunhistochemische Färbungen von Nöten. In erster Linie sollte dabei die Lokalisation der weiteren Komponenten der CASA-Maschinerie HspB8, Hsc70 und CHIP in Bezug auf eine Dislokalisierung untersucht werden. Eine Verifizierung dafür, dass durch die BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregatbildung die Autophagie im Rahmen des CASA-Mechanismus aktiviert wird, könnte auch durch immunhistochemische Färbungen gegen den Autosomenmarker LC3 erbracht werden.

Überexpression von BAG3^{P209L}-eGFP hat eine sekundäre Desminopathie zur Folge

Zusätzlich zu einer Dislokalisierung von Myopodin und Filamin C konnte in immunhistochemischen Färbungen eine Dislokalisierung von Desmin gezeigt werden, ein Merkmal, dass für Myofibrilläre Myopathien charakteristisch ist (Claeys *et al.*, 2013) und auch das Krankheitsbild der humanen Pathologie der P209L-BAG3opathie reflektiert (Selcen *et al.*, 2009). Dabei konnte Desmin in Kardiomyozyten von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen dort an den Z-Scheiben detektiert werden, wo kein BAG3^{P209L}-eGFP vorzufinden war. In diesen Bereichen schien die Sarkomerstruktur und somit auch die Anordnung der Intermediärfilamente also noch intakt zu sein. Folglich scheint es einen Zusammenhang zwischen der Dislokalisierung von Desmin und BAG3^{P209L}-eGFP zu geben, der einen Pathomechanismus plausibel erscheinen lässt, bei dem die Intermediärfilamente eine Rolle spielen. Aus primären Desminopathien, bei denen die Desminopathie aus einer Mutation im Desmin-Gen resultiert, ist bekannt, dass das Vorliegen von Desmin-Aggregaten auf eine Veränderung des extrasarkomerischen Intermediärfilament-Zytoskeletts zurück zu führen ist (Li *et al.*, 1996, Milner *et al.*, 1996). In Studien, in denen Epithelzellen mit humanen Desmin^{R406W}- und Desmin^{WT}-Konstrukten transfiziert wurden, konnte beobachtet werden, dass Desmin-Mutanten keine Desmin-Intermediärfilamentnetzwerke mehr bilden (Bär *et al.*, 2005, Schröder *et al.*, 2003). Eine Ko-Lokalisation von BAG3^{P209L}-eGFP und Desmin, insbesondere in den Glanzstreifen von BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten, könnte auch in dem im Rahmen dieser Arbeit generierten Modell auf eine Desminopathie hindeuten. Die Tatsache, dass sowohl BAG3^{P209L}-eGFP als auch die BAG3^{WT}-eGFP-Aggregate in elektronenmikroskopischen Aufnahmen intersarkomerisch und nicht wie in Immunofluoreszenzaufnahmen zunächst angenommen an den Z-Scheiben lokalisiert waren, macht einen Pathomechanismus denkbar, bei dem BAG3 auf den Intermediärfilamenten wie bspw. Desmin lokalisiert sein könnte. So ist bekannt, dass BAG3 die Stabilität der Myofibrillen

reguliert, in dem es die Interaktion von Hsc70 und CapZ vereinfacht (Hishiya *et al.*, 2010). Aufgrund seiner veränderten Konformation und der Neigung zur Aggregatbildung, würde eine Überexpression von BAG3^{P209L}-eGFP demnach dazu führen, dass sich intersarkomerisch BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate bilden. Diese würden die Intermediärfilamente, in diesem Fall Desmin, destabilisieren und diese mit in die BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate ziehen. Somit wären die Dislokalisierung von Desmin und der Kollaps des vorhandenen Desmin-Zytoskeletts (Bär *et al.*, 2004) ein *sekundärer* Effekt, der durch den Zusammenbruch des Zytoskeletts ausgelöst wird und also eine *sekundäre* Desminopathie darstellt. Dies würde auch erklären, warum eine Dislokalisierung von α -Aktinin vorlag, das aber niemals mit den BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten kolo-kalisiert (Ferrer *et al.*, 2005). Um vollständig aufzuklären, wo genau und ob BAG3 tatsächlich auf Desmin oder auf anderen Intermediärfilamenten lokalisiert ist, könnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen in 3D nachgewiesen werden. Interessant wäre außerdem, ob und wie genau die Stabilisierung von Desmin erfolgt. Hierbei wäre eine direkte Interaktion zwischen BAG3 und Desmin ebenso wie eine indirekte Interaktion über dritte Komponenten denkbar, was durch FRET-Analysen und *in vitro* Studien bestätigt werden müsste.

Einen Hinweis auf eine indirekte Interaktion über dritte, noch unbekannte Bindepartner könnte das veränderte dynamische Verhalten von BAG3^{P209L}-eGFP in den FRAP-Experimenten geben (siehe 4.3). Obwohl in Bindungsstudien zumindest hinsichtlich der Bindungspartner der CASA-Maschinerie keine Unterschiede zwischen dem BAG3^{P209L}-eGFP- und dem BAG3^{WT}-eGFP-Protein zu finden waren, könnten die Intensität der Bindung und Interaktionen mit anderen das Zytoskelett stabilisierenden Proteinen oder sogenannten *Linkern*, welche als Verbindungsproteine agieren, eingeschränkt sein.

Grundsätzlich schließt ein Pathomechanismus, bei dem BAG3^{P209L}-eGFP eine Destabilisierung der Intermediärfilamente mit sich bringt, eine Beteiligung des BAG3^{P209L}-eGFP im CASA-Mechanismus und dessen Beeinträchtigung nicht aus. So wäre eine Lokalisation des CASA-Komplexes, mit oder ohne BAG3^{P209L}-eGFP als Bestandteil, auf den Intermediärfilamenten im Einklang mit den beobachteten Resultaten.

BAG3^{P209L}-eGFP-Expression erhöht die Sensitivität der Kardiomyozyten für Apoptose

Das Protein BAG3 wurde 1999 als Interaktionspartner des Apoptose-Inhibitors Bcl-2 identifiziert (Lee *et al.*, 1999) und hat nachweislich eine anti-apoptotische Aktivität, die über die BAG3-Domäne des Proteins vermittelt wird und insbesondere im Rahmen der Tumorgenese aktiv ist (Zhang *et al.*, 2012). Dabei sind die molekularen Mechanismen, die diesen zellulären Vorgängen zu Grunde liegen, jedoch weitgehend unklar.

In einer Studie, in der bei Patienten mit Herzversagen die BAG3-Konzentration im Blutplasma bestimmt wurde, konnte eine deutlich geringere Konzentration des Proteins festgestellt werden im Vergleich zu der in Kontrollpersonen (Gandhi *et al.*, 2015). Auch in Western Blot Analysen, bei denen Proteinextrakte, die aus dem linken Ventrikel eines Patienten mit Herztransplantation isoliert wurden, konnte ein um mehr als die Hälfte reduziertes BAG3-Level im Vergleich zu dem der Kontrollgruppe festgestellt werden (Feldman *et al.*, 2014). In *in vivo* Studien im Mausmodell konnte ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Hier zeigten Mäuse, die 18 Wochen nach einer *aortic banding* Operation an Herzversagen litten, ebenfalls eine signifikante Abnahme der BAG3-Konzentration im Blutplasma (Knezevic *et al.*, 2015). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es eine noch nicht aufgeklärte Korrelation zwischen der BAG3-Konzentration und einem Herzversagen geben muss. Liegt eine Mutation im BAG3-Gen vor, so wie im Fall der P209L-BAG3opathie, und das BAG3^{P209L}-eGFP aggregiert, könnte das Protein seine anti-apoptotische Wirksamkeit nicht mehr entfalten, was eine Apoptose der Kardiomyozyten zur Folge hätte. Hierfür spricht, dass in neonatalen Kardiomyozyten aus der Ratte, die mit Konstrukten BAG3^{P209L} transfiziert wurden, bei Stressinduktion eine wesentliche Erhöhung der Apoptoserate festzustellen war (Arimura *et al.*, 2011). So sollten weitere Experimente mit dem hier generierten BAG3^{P209L}-eGFP-Mausmodell eine Bestimmung der Anzahl an apoptotischen Kardiomyozyten adressieren.

4.5 Potential als Krankheitsmodell für die P209L-BAG3opathie

Als Krankheitsmodelle und zur Untersuchung von Genfunktionen *in vivo* bieten transgene Mausmodelle eine Vielzahl von Möglichkeiten für die Wissenschaft (Chung *et al.*, 1997). Die hohe Sequenz-homologie der Genome von 90 % zwischen Mensch und Maus (Chen *et al.*, 2001) und die ähnlichen posttranskriptionellen bzw. posttranslationale Modifikationen (Olsen *et al.*, 2006) machen Mausmodelle auch im Hinblick auf pharmakologische Fragestellungen zu einem beliebten Forschungsobjekt.

Da für die P209L-BAG3opathie bisher alle pathologischen und klinischen Daten auf Patienten-muskelbiopsien basieren (Selcen *et al.*, 2009), eröffnet das hier generierte und bisher einzige Mausmodell für die P209L-BAG3opathie neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Erkrankung ausschließlich in Kardiomyozyten.

Im Hinblick auf die deutliche Progression der BAG3^{P209L}-eGFP- und α -Aktinin-Aggregatbildung, korreliert das hier generierte Mausmodell mit dem progressiven Krankheitsverlauf der humanen P209L-BAG3opathie (Selcen *et al.*, 2009). Hier reichte jedoch die heterogene Expression wohl nicht aus, um die restriktive Kardiomyopathie der humanen Pathologie auszulösen. Die Belastung der Herzen durch Kryoinfarkte und anschließende Evaluierung der Herzfunktion, bei denen die

„gesunden“ nicht-exprimierenden Kardiomyozyten die Funktion der „pathologischen“ exprimierenden Kardiomyozyten wahrscheinlich kompensierten, bekräftigten dies.

Die Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in den Herzen macht jedoch eine Unterscheidung von exprimierenden „pathologischen“ und nicht-exprimierenden „gesunden“ Kardiomyozyten möglich, die sich auch für nachfolgende Untersuchungen als vorteilhaft erweisen würde. So könnten in zukünftigen Experimenten Herzen eines postnatalen Entwicklungsstadium zu einzelnen Kardiomyozyten dissoziiert und diese untersucht werden. Dies hätte gegenüber der Langendorff-Dissoziation adulter Herzen den Vorteil, dass Kardiomyozyten dieses Entwicklungsstadiums einfacher und länger kultiviert werden können (Louch *et al.*, 2012). Dies würde einen direkten Vergleich „pathologischen“ und „nicht-pathologischen“ Kardiomyozyten auch aus funktioneller Sicht möglich machen. Hierbei bietet sich die Messung von Schlagfrequenzen ebenso an wie elektrophysiologische Untersuchungen. Erste Analysen an adulten linksventrikulären Kardiomyozyten aus der Maus deuten dabei darauf hin, dass ein geringeres Niveau an endogenem BAG3, wie es ja auch in BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten aufgrund der Aggregatbildung vorliegt, in einer reduzierten Kontraktion resultiert (Feldman *et al.*, 2016).

Eine weitere Anwendung, die Charakteristika von „pathologischen“ und „nicht-pathologischen“ Kardiomyozyten auf Genexpressionebene genauer zu evaluieren, wäre die Methode des RNA-Seqs (Wang *et al.*, 2009). Diese Methode hat sich insbesondere bei der Erforschung von veränderten Genexpressionen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder Krebs als sehr aufschlussreich erwiesen (Costa *et al.*, 2013). So konnte bei Parkinson Patienten erfolgreich auf RNA-Seq Daten zurück gegriffen werden, die von Homogenisaten der *Substantia Nigra (Pars Compacta)* erhoben und mit RNA-Seq Daten von gesunden Individuen verglichen wurden (Sutherland *et al.*, 2011, Soldner *et al.*, 2009). Speziell im Hinblick auf die Genotyp-Phänotyp-Varianz in den Patienten, die an P209L-BAG3opathie erkranken, wäre diese Methode von großem Wert. Dabei stellt die P209L-BAG3opathie mit ihrem frühen Ausbruch in der Kindheit zwar eine besonders schwere Myofibrilläre Myopathie dar, jedoch bricht die Erkrankung nicht in allen Patienten zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Heftigkeit aus (Konersman *et al.*, 2015). Zur Entschlüsselung des zugrunde liegenden Pathomechanismus der P209L-BAG3opathie könnten deshalb Informationen über Genexpressionslevel von BAG3^{P209L}, aber auch von endogenem BAG3 und anderen Proteinen der Sarkomerstruktur bzw. Interaktionspartnern, von großem Nutzen sein. Ein wesentlicher Aspekt der humanen Pathologie ist die Bildung von BAG3^{P209L}-Aggregaten, die in immunhistochemischen Färbungen betroffenen Muskeln von Patienten und auch in dem hier generierten Mausmodell nachgewiesen wurden (Selcen *et al.*, 2009). Um einen tieferen Einblick in die Pathologie der P209L-BAG3opathie zu gewinnen, bietet sich eine Laserdissektion der

BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate mit anschließender massenspektrometrischer Analyse an. Hierbei könnte die Zusammensetzung der Aggregate bzw. weitere Komponenten, möglicherweise auch die der CASA-Maschinerie, evaluiert werden. Diese Methode hat sich als sehr erfolgsversprechend bei der Dissektion von Aggregaten im Rahmen der Filaminopathie erwiesen und lieferte neue, wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die Zusammensetzung der Aggregate (Kley *et al.*, 2013).

Bisher wurden elf *missense*-Mutationen im humanen BAG3-Gen beschrieben, von denen zwei zu einer Myofibrillären Myopathie führen, im Falle der P209L-Mutation mit restriktiven Kardiomyopathie (Lee *et al.*, 2012, Selcen *et al.*, 2009). Die übrigen neun resultieren in einer reinen dilatativen Kardiomyopathie (Norton *et al.*, 2011, Arimura *et al.*, 2011). In einer Studie, in der Testpersonen auf mögliche Mutationen im BAG3-Gen getestet wurden, konnte gezeigt werden, dass *missense*-Mutationen, bei denen für eine andere Aminosäure kodiert wird, eine dilatative Kardiomyopathie zur Folge haben. Die Personen dagegen, bei denen zwar genetisch *nonsense*-Mutationen vorliegen, bei denen für ein Stopp der Translation kodiert wird und welche somit zu einem kürzeren BAG3 führen, wurden pathologisch viel später auffällig (Franaszczyk *et al.*, 2012). Es scheint also eine Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp zu geben und *missense*-Mutationen im BAG3-Gen haben offenbar einen früheren Ausbruch und einen stärkeren Phänotyp zur Folge wie *nonsense*-Mutationen. Diese Beobachtungen wären im Einklang mit der P209L-BAG3opathie, bei der es sich ja um eine *missense*-Mutation im BAG3-Gen handelt und welche sich durch einen sehr frühen Ausbruch im Kindesalter und seinem progressiven Krankheitsverlauf auszeichnet (Selcen *et al.*, 2011, Odgerel *et al.*, 2010). Interessanterweise widersprechen diese Beobachtungen jedoch denen, die für Mutationen im LMNA-Gen gemacht wurden. Mutationen im LMNA-Gen, welches für Laminin A/C kodiert (Wydner *et al.*, 1996), führen zu einer Laminopathie (Capell *et al.*, 2006). Dabei haben hier *nonsense*-Mutationen, die in einem verkürzten Laminin resultieren, eine deutlich heftigere dilatative Kardiomyopathie zur Folge als *missense*-Mutationen (van Rijsingen *et al.*, 2012). Deshalb müssten diese Beobachtungen an deutlich mehr Testpersonen in weiteren Studien noch verifiziert werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

Um den Zeitpunkt des Beginns der P209L-BAG3opathie könnte das generierte Mausmodell, welches eine induzierbare BAG3^{P209L}-eGFP-Expression erlaubt, hilfreich sein. Außerdem ist es für eine Untersuchung der Auswirkungen der P209L-Mutation in anderen Organen gut einsetzbar. Die Tatsache, dass das BAG3^{P209L}-eGFP-Gen in den *Rosa26* Locus integriert wurde, schließt Integrationseffekte aus und sorgt für eine gleichmäßige ubiquitäre Expression (Miyazaki *et al.*, 1989). Besonders eine homozygote Mauslinie, die zu einem höheren BAG3^{P209L}-eGFP-Expressionsniveau führen würde, macht die Untersuchung des Proteins in anderen Organen interessant. Insbesondere im Hinblick auf die humane Pathologie würden Skelettmuskelzellen in den Fokus der Unter-

suchungen treten. Hier könnten morphologische Analysen in Form von immunhistochemischen Färbungen durchgeführt werden, aber auch funktionelle Messungen wie die Bestimmung der Muskelkontraktion und -kraft wären denkbar. Im Mausmodell zur R350P-Desminopathie konnte in homozygoten Tieren bei den zuvor erwähnten Messungen ein signifikanter Rückgang hinsichtlich der Muskelkontraktion und -kraft ausgemacht werden (Clemen *et al.*, 2015). Schließlich wäre auch eine Untersuchung der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in Nervenzellen durchaus auch sehr interessant. Die humane Pathologie beschreibt eine periphere Neuropathie, die sich durch eine Demyelinisierung der Axone äußert (Konersman *et al.*, 2015). Dies könnte durch Differenzierung der mES-Zellen in Neurone *in vitro* als auch in dem hier generierten Mausmodell nach Verpaarung mit einem Männchen mit Neuronen-spezifischer Expression der Cre-Rekombinase, bspw. NSE (*neuron specific enolase*)-Cre, *in vivo* untersucht werden.

Ob die P209L-Mutation in murinen BAG3-Gen zu den gleichen pathologische Veränderungen führt wie ihr Pendant im Menschen, könnte nur durch die Generierung eines BAG3^{P215L}-Knock-In-Mausmodells (in Maus BAG3^{P209L} = BAG3^{P215L}) definitiv aufgeklärt werden. Diese Strategie hätte den Vorteil, dass das Transgen gezielt in das Mausgenom eingebracht wird (Doyle *et al.*, 2012), wodurch ein Gene-Silencing durch zufällige Integrationen ausgeschlossen werden kann (Redberry, 2006). Dabei bietet sich die Methode des CRISPR/Cas-Systems (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Doudna *et al.*, 2014, Charpentier *et al.*, 2013, Jinek *et al.*, 2012) sowie die Verwendung von TALENen (*Transcription activator-like effector nuclease*) (Christian *et al.*, 2010, Boch, 2011) oder Zinkfinger nukleasen (Doyon *et al.*, 2011) an, welche ein gezieltes Genom-Editing im Sinne eines Einfügens, Entfernens oder Ausschaltens von Genen erlauben (Ochiai, 2015). Dies würde die Untersuchung der BAG3^{P209L}-Mutation in allen Geweben der quergestreiften Muskulatur und Neuronen erlauben und würde die humane Pathologie am besten widerspiegeln.

4.6 Perspektive im Hinblick auf klinische Anwendungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte sowohl ein *in-vitro*- als auch ein *in-vivo*-Modell für die humane P209L-BAG3opathie entwickelt werden, welches eine Untersuchung der Auswirkungen der BAG3^{P209L}-Mutation spezifisch in Kardiomyozyten erlaubt.

Als Therapiemaßnahmen bei einer durch die P209L-BAG3opathie ausgelösten Kardiomyopathie mit Atmungsinsuffizienz bietet sich in erster Linie eine Herztransplantation und eine nächtliche Beatmung an wie sie auch in einer Vielzahl von Patienten durchgeführt wird (Konersman *et al.*, 2015, Selcen *et al.*, 2009). Zur Erhaltung der Muskulatur ist der Einsatz von Orthesen und Physiotherapie sinnvoll, ebenfalls werden Kreatinpräparate verwendet (Walter *et al.*, 1999).

Da ein wesentlicher Aspekt der humanen Pathologie die Bildung von BAG3^{P209L}-Aggregaten ist (Selcen *et al.*, 2009) und diese auch in dem hier generierten Mausmodell nachgewiesen wurden, könnten mögliche klinische Anwendungen in Richtung der autophagischen Auflösung der Aggregate gehen. Dies könnte durch eine pharmakologische Verstärkung der Autophagie erfolgen, wie sie in einigen neurodegenerativen Erkrankungen bereits erfolgreich angewandt wurde (Pan *et al.*, 2008). So konnte bspw. in einem Mausmodell durch Behandlung mit Rapamycin ein deutlicher Rückgang an Proteinaggregaten erreicht werden (Ravikumar *et al.*, 2004). Da sowohl in Kardiomyozyten als auch in den Skelettmuskelzellen des Zebrafischmodells endogenes BAG3 mit in die BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate gezogen wurde (Ruparella *et al.*, 2015) und auch in Patientenstudien ein reduziertes Level an endogenem BAG3 im Blutplasma nachgewiesen werden konnte (Knezevic *et al.*, 2015, Feldman *et al.*, 2014), könnte ein weiterer Therapieansatz in der oralen oder intravenösen Gabe von synthetisch BAG3-Präparaten bestehen. Diese Methode wurde bereits erfolgreich bei Hämophilie-Erkrankungen eingesetzt, bei denen die fehlenden Faktoren durch die Injektion von rekombinanten Proteinpräparaten substituiert werden (Peyvandi *et al.*, 2016).

Andere Vorgehensweisen adressieren die Behandlung des zugrunde liegenden genetischen Defekts, wobei bspw. die Methode der RNA-Interferenz sehr erfolgsversprechend erscheint. Bei dieser Methode, welche als natürlicher Mechanismus in Eukaryoten vorkommt, werden Gene durch ein *Silencing* der RNA zielgerichtet abgeschaltet (Fire *et al.*, 1999, Fire *et al.*, 1998). Dies kommt bereits in Form sogenannter Aptamere, kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide oder Peptide, welche ein spezifisches Molekül binden können (Ellington *et al.*, 1990), in Therapeutika zur Anwendung. Zur Behandlung der AMD (feuchte altersbedingte Makuladegeneration) wurde bspw. das Therapeutikum Pegaptanib entwickelt, ein RNA-Aptamer, das hochspezifisch und mit hoher Affinität an die mRNA von VEGF bindet und so gezielt die Neovaskularisierung stoppt (Ng *et al.*, 2006). Im Rahmen der P209L-BAG3opathie ebenso ein Einsatz von Aptameren denkbar, die direkt injiziert oder über AAV-Viren in die quergestreifte Muskulatur gelangen und die P209L-RNA dort binden und abschalten könnten. Wenn aber tatsächlich ein geringeres endogenes Level an BAG3 auch pathologische Folgen hat, sollte die Therapie in Kombination mit der bereits erwähnten Gabe von synthetisch hergestelltem BAG3-Präparaten erfolgen.

Ein weiterer Ansatz, der ebenfalls die Behandlung des zugrunde liegenden genetischen Defekts verfolgt und im Sinne des Genom-*Editing* hoch aktuell ist, wäre der Einsatz von AAV-Viren in Kombination mit dem bereits erwähnten *CRISPR/Cas*-System (Doudna *et al.*, 2014, Charpentier *et al.*, 2013, Jinek *et al.*, 2012). So könnten in einem möglichen Therapieansatz für die quergestreifte Muskulatur spezifische AAV-Viren verwendet werden, die Gene des *CRISPR/Cas*-System

enthalten und über ein Genom-*Editing* das mutierte BAG3^{P209L}-Allel in ein Wildtyp-Allel konvertieren. Erste Erfolge konnten mit dieser Methode bei der Erkrankung der Duchenne-Muskeldystrophie, bei der das Muskelstrukturprotein Dystrophin durch eine Mutation im mdx-Gen nicht synthetisiert wird, erzielt werden. Durch Injektion der *CRISPR/Cas*-Gene mittels eines AAVs in murine Skelettmuskelzellen konnte das Exon, das die Mutation trägt, „übersprungen“ und so entfernt werden. Dies führte zu einer kürzeren, aber funktionierenden Form des Dystrophin-Proteins. In Experimenten, bei denen die Muskelkontraktion und -kraft bestimmt wurde, zeigten die mit AAV behandelten mdx-Mäuse im Vergleich mit unbehandelten mdx-Tieren zwar eine Steigerung der Muskelkontraktion und -kraft, diese entsprachen jedoch nie der Muskelkontraktion und -kraft, die bei den Wildtyptieren gemessen wurde (Long *et al.*, 2015, Tabebordbar *et al.*, 2015). Obwohl zum heutigen Zeitpunkt alle diese therapeutischen Ansätze noch in der Anfangsphase sind, erscheinen diese doch in Bezug auf klinische Anwendungen sehr erfolgsversprechend und könnten somit in naher Zukunft auch zur Therapie der P209L-BAG3opathie beitragen.

.

5. Zusammenfassung

Myofibrilläre Myopathien sind Erkrankungen der Muskulatur mit teilweiser Beteiligung der Herzmuskulatur, die oft einen frühzeitigen Tod zur Folge haben. Dabei macht sich das Leitsymptom einer Myofibrillären Myopathie, eine progressive Muskelschwäche, typischerweise in der vierten Lebensdekade bemerkbar.

Die Myofibrilläre Myopathie, die durch einen spontanen Basenaustausch von Prolin gegen Leucin an Position 209 im BAG3-Gen verursacht und als P209L-BAG3opathie bezeichnet wird, ist hingegen durch einen frühen Ausbruch und einen sehr progressiven Krankheitsverlauf, unter anderem mit einer selten vorkommenden schweren restriktiven Kardiomyopathie, charakterisiert. Das Cochaperon BAG3, welches in Zellen der quergestreiften Muskulatur an die Z-Scheiben lokalisiert, trägt als Bestandteil des CASA-Komplexes dazu bei, dass verbrauchte Z-Scheibenproteine dem Lysosom zugeführt und dort degradiert werden.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen betroffener Muskeln kann eine Disintegration von Z-Scheiben und eine Aggregatbildung durch Akkumulation fragmentierter Filamente, Mitochondrien und Vesikel beobachtet werden.

Warum es zu den diesen pathologischen Veränderungen und der Bildung von Aggregaten kommt und wie diese mechanistisch zu erklären sind, ist bis heute nicht verstanden. Deshalb sind die Aufklärung der Mechanismen, die dieser Krankheit zu Grunde liegen, und die darauf basierende Erforschung möglicher Behandlungsmethoden von großem Interesse.

In dieser Arbeit wurde daher die Generierung und Charakterisierung unterschiedlicher transgener BAG3^{P209L}-eGFP-mES-Zelllinien und Mausmodellen etabliert. Dazu erfolgte die Herstellung unterschiedlicher BAG3^{P209L}-Konstrukte, die zur Visualisierung des Lokalisation des Proteins an einen eGFP-Reporter gekoppelt (BAG3^{P209L}-eGFP) und untersucht wurde. Hierbei war die Expression einerseits unter Kontrolle des Kardiomyozyten-spezifischen α MHC-Promotors, was eine Untersuchung des Einflusses der BAG3^{P209L}-Mutation auf die Herzmuskulatur und die daraus resultierenden restriktive Kardiomyopathie erlaubt. Andererseits sollte ein weiteres transgenes Mausmodell mit einer induzierbaren ubiquitären BAG3^{P209L}-eGFP-Expression (β -Aktin-Promotor) generiert werden, um die Expression des mutierten Cochaperons auch in der Skelettmuskulatur und in anderen Organen untersuchen zu können. Auch den Beginn der Krankheit und die Progression der Myofibrillären Myopathie verfolgen zu können, war hierbei von großem Nutzen. Bei diesem Modell kann die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vitro* durch Applikation einer Cre-Rekombinase oder *in vivo* durch Einkreuzen eines transgenen Cre-Männchens induziert werden.

Während die Expression von BAG3^{P209L}-eGFP in den transgenen Tieren heterogen und nicht hoch genug war, um eine Beeinträchtigung der Entwicklung bzw. veränderte Herzfunktion herbei zu führen, konnten der humanen Pathologie entsprechend in über der Hälfte der BAG3^{P209L}-eGFP-exprimierenden Kardiomyozyten ein Rückgang der Z-Scheibenstruktur und eine BAG3^{P209L}-eGFP- und α -Aktinin-Aggregatbildung detektiert werden. Die degenerativen Muskelveränderungen und die Bildung der BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregate stand dabei in Zusammenhang mit einer deutlich verringerten Mobilität des BAG3^{P209L}-eGFP-Proteins. Diese Kardiomyozyten zeigten ebenso eine Dislokalisierung der Z-Scheibenproteine Myopodin und Filamin C, Interaktionspartner von BAG3 und Substrat im CASA-Mechanismus, was auf eine Beeinträchtigung des CASA-Mechanismus hinweist. Ebenso konnte Desmin, das in der quergestreiften Muskulatur vorherrschende Intermediärfilament, in den Aggregaten nachgewiesen werden, was zeigte, dass die Expression von BAG3^{P209L}-eGFP in Kardiomyozyten zu einer *sekundären* Desminopathie führte. Im Einklang mit der beobachteten Auflösung des Zytoskeletts stand dabei die schwächere Titinexpression in den Bereichen, in denen BAG3^{P209L}-eGFP-Aggregaten vorlagen.

Durch Verwendung des CAG-Promotors in einem weiteren transgenen Mausmodell konnte eine konditionale BAG3^{P209L}-eGFP-Expression erreicht werden. Dies bietet den Vorteil den Beginn der Erkrankung zu evaluieren und erlaubt die Untersuchung der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression insbesondere der Skelettmuskulatur und anderen Organen.

Erste Untersuchungen von Organen eines embryonalen Entwicklungsstadiums zeigten eine ubiquitäre Expression des Proteins, die besonders in Zellen der quergestreiften Muskulatur sehr stark war.

6. Literaturverzeichnis

Aaij C, Borst P (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **269**(2): 192-200.

Adra DN, Boer PH, McBurney MW (1987). Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promoter. *Gene* **60**: 65-74.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). *Molecular Biology of the Cell.* 5th Edition. Garland Science Textbooks.

Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, Page AM, Pinder R, Dale PJ (1998). Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science.* **279**(5359): 2113-5.

Al Tanoury Z., Schaffner-Reckinger E, Halavatyi A, Hoffmann C, Moes M, Hadzic E, Catillon M, Yatskou M, Friederich E (2010). Quantitative kinetic study of the actin-bundling protein L-plastin and of its impact on actin turn-over. *PLoS One.* **5**: e9210.

Aluigi M, Fogli M, Curti A, Isidori A, Gruppioni E, Chiodoni C, Colombo MP, Versura P, D'Errico-Grigioni A, Ferri E, Baccarani M, Lemoli RM (2005). Nucleofection Is an Efficient Nonviral Transfection Technique for Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* **24**(2): 454-61.

Arimura T, Ishikawa T, Nunoda S, Kawai S, Kimura A (2011). Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. *Hum. Mutat.* **32**(12): 1481-91.

Arndt VC, Rogon C, Höfeld J (2007). To be, or not to be - molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol. Life Sci.* **64**(19-20): 2525-41.

Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, Fürst DO, Saftig P, Saint R, Fleischmann BK, Hoch M, Höfeld J (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr. Biol.* **20**(2): 143-8.

Ayoob JC, Turnacioglu KK, Mittal B, Sanger JM, Sanger JW (2000). Targeting of cardiac muscle titin fragments to the Z-bands and dense bodies of living muscle and non-muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* **45**(1): 67-82.

Bär H, Strelkov SV, Sjöberg G, Aebi U, Herrmann H (2004). The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J. Struct Biol.* **148**(2): 137-52.

Bär H, Fischer D, Goudeau B, Kley RA, Clemen CS, Vicart P, Herrmann H, Vorgerd M, Schröder R (2005). Pathogenic effects of a novel heterozygous R350P desmin mutation on the assembly of desmin intermediate filaments *in vivo* and *in vitro*. *Hum. Mol. Genet.* **14**(10):1251-60.

- Bauer S, Maier SK, Neyes L, Maass AH (2005).** Optimization of gene transfer into neonatal rat cardiomyocytes and unmasking of cytomegalovirus promoter silencing. *DNA Cell Biol.* **24**(6): 381-7.
- Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E (1998).** The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell.* **92**(3): 367-380.
- Beall B, Chalovich JM (2001).** Fesselin, a synaptopodin-like protein, stimulates actin nucleation and polymerization. *Biochemistry.* **40**(47): 14252-14259.
- Bellanger JM, Astier C, Sardet C, Ohta, Stossel TP, Debant A (2000).** The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat. Cell Biol.* **2**(12): 888-892.
- Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM (2011).** Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**(6): 940-50.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ (2003).** Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* **35**(3): 215-7.
- Bertani G (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 293-300.
- Berthier C, Blaineau S (1997).** Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. A review. *Biol. Cell.* **89**(7): 413-434.
- Beqqali A, Monshouwer-Kloots J, Monteiro R, Welling M, Bakkers J, Ehler E, Verkleij A, Mummery C, Passier R (2010).** CHAP is a newly identified Z-disc protein essential for heart and skeletal muscle function. *J. Cell Sci.* **123**(7): 1141-50.
- Birnboim HC, Doly J (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* **7**: 1513-1523.
- Blanchard A, Ohanian V, Critchley D (1989).** The structure and function of alpha-actinin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **10**: 280-89.
- Boch J (2011).** TALEs of genome targeting. *Nature Biotechnology.* **29**(2): 135-6.
- Bouchier-Hayes L, Muñoz-Pinedo C, Connell S, Green DR (2008).** Measuring apoptosis at the single cell level. *Methods.* **44**(3): 222-8.
- Boyett MR, Dobrzynski H (2007).** The Sinoatrial Node Is Still Setting the Pace 100 Years After its Discovery. *Circ. Res.* **100**: 1543-1545.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984).** Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature.* **309**(5965): 255-6.
- Capell BC, Collins FS (2006).** Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nature Reviews Genetics.* **7**: 940-952.

- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988).** Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(23): 8790-4.
- Carstea AC, Purity MK, Dinnyes A (2009).** Germline competence of mouse ES and iPS cell lines: Chimera technologies and genetic background. *World J. Stem Cells.* **1**(1): 22-29.
- Casola S (2010).** Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. *Methods Mol. Biol.* **667**: 145-63.
- Castañón MJ, Walko G, Winter L, Wiche G (2013).** Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochem. Cell Biol.* **140**(1): 33-53.
- Charpentier E, Doudna JA (2013).** Biotechnology: Rewriting a genome. **495**(7439): 50-1.
- Chen R, Bouck JB, Weinstock GM, Gibbs RA (2001).** Comparing Vertebrate Whole-Genome Shotgun Reads to the Human Genome. *Genome Res.* **11**(11): 1807-1816.
- Chevessier F, Schuld J, Orfanos Z, Plank AC, Wolf L, Maerkens A, Unger A, Schlötzer-Schrehardt U, Kley RA, von Hörsten S, Marcus K, Linke WA, Vorgerd M, van der Ven PF, Fürst DO, Schröder R (2015).** Myofibrillar instability exacerbated by acute exercise in filaminopathy. *Hum. Mol. Genet.* pii: ddv421.
- Chomczynski P, Sacchi N (1995).** Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal. Biochem.* **225**(1): 163-4.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF (2010).** Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics.* **186**(2): 757-761.
- Chung SK, Lee AY, Chung SS (1997).** Mouse models for human diseases. *Hong Kong Med. J.* **3**(2): 201-209.
- Claeys KG, Fardeau M (2013).** Myofibrillar Myopathies. *Handb. Clin. Neurol.* **113**: 1337-42.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002).** Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**: 637-706.
- Clemen CS, Stöckigt F, Strucksberg KH, Chevessier F, Winter L, Schütz J, Bauer R, Thorweihe JM, Wenzel D, Schlötzer-Schrehardt U, Rasche V, Krsmanovic P, Katus HA, Rottbauer W, Just S, Müller OJ, Friedrich O, Meyer R, Herrmann H, Schrickel JW, Schröder R (2015).** The toxic effect of R350P mutant desmin in striated muscle of man and mouse. *Acta Neuropathol.* **129**(2): 297-315.
- Coleman JE (1992).** Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 441-483.
- Cooper GM (2000).** Structure and Organization of Actin Filaments. *The Cell*, 2nd edition: A Molecular Approach, Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Corner DA (2001). Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Feeder Cell Preparation. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **51**: 23.2:23.2.1-23.2.7.

Corner DA (2001). Mouse embryonic stem (ES) cell culture. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **51**: 23.2:23.2.1-23.2.7.

Costa V, Aprile M, Esposito R, Ciccodicola A (2013). RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. *European Journal of Human Genetics.* **21**: 134-142.

Coulson M, Robert S, Saint R (2005). *Drosophila* starvin encodes a tissue-specific BAG domain protein required for larval food uptake. *Genetics.* **171**(4): 1799-812.

Dagert M, Ehrlich SD (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* **6**(1): 23-8.

Dapson RW (1993). Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. *Biotech. Histochem.* **68**: 75-82.

Davidson MD, Critchley DR (1988). Alpha-actinins and the dmd protein contain spectrin-like repeats. *Cell.* **52**(2): 159-160.

De Ganck A, Corte VD, Staes A, Gevaert K, Vandekerckhove J, Gettemans J (2008). Multiple isoforms of the tumor suppressor myopodin are simultaneously transcribed in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**(2): 269-273.

Demand J, Alberti S, Patterson C, Höhfeld J (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr. Biol.* **11**(20): 1569-77.

Ding WX, Xin XM (2008). Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy.* **4**(2): 141-50.

Doong H, Price J, Kim YS, Gasbarre C, Probst J, Liotta LA, Blanchette J, Rizzo K, Kohn E (2000). CAIR-1/BAG-3 forms an EGF-regulated ternary complex with phospholipase C-gamma and Hsp70/Hsc70. *Oncogene.* **19**(38): 4385-95.

Doudna JA, Charpentier E (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* **346**(6213): 1258096.

Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ (2012). The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res.* **21**(2): 327-49.

Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC (2011). Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods.* **8**(1):74-9.

Duro E, Marston AL (2015). From equator to pole: splitting chromosomes in mitosis and meiosis. *Genes Dev.* **29**(2): 109-22.

- Ehler E, Moore-Morris T, Lange S (2013).** Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *J. Vis. Exp.* **6**(79): 10.3791/50154.
- Eiges R, Benvenisty N (2002).** A molecular view on pluripotent stem cells. *FEBS Lett.* **529**: 135-141.
- Ellington AD, Szostak JW (1990).** *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* **346**: 818-822.
- Esham M, Bryan k, Milnes J, Holmes WB, Moncam CL (2007).** Expression of nebulette during early cardiac development. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* **64**(4): 258-273.
- Eulitz S, Sauer F, Pelissier MC, Boisguerin P, Molt S, Schuld J, Orfanos Z, Kley RA, Volkmer R, Wilmanns M, Kirfel G, van der Ven PF, Fürst DO (2013).** Identification of Xin-repeat proteins as novel ligands of the SH3 domains of nebulin and nebulette and analysis of their interaction during myofibril formation and remodeling. *Mol. Biol. Cell.* **24**(20): 3215-26.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981).** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* **292**(5819): 154-6.
- Faulkner G, Pallavicini A, Formentin E, Comelli A, Ievolella C (1999).** ZASP: a new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J. Cell Biol.* **146**: 465-75.
- Feldman AM, Begay RL, Knezevic T, Myers VD, Slavov DB, Zhu W, Gowan K, Graw SL, Jones KL, Tilley DG, Coleman RC, Walinsky P, Cheung JY, Mestroni L, Khalili K, Taylor MR (2014).** Decreased levels of BAG3 in a family with a rare variant and in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Cell Physiol.* **229**(11):1697-702.
- Feldman AM, Gordon J, Wang J, Song J, Zhang XQ, Myers VD, Tilley DG, Gao E, Hoffman NE, Tomar D, Madesh M, Rabinowitz J, Koch WJ, Su F, Khalili K, Cheung JY (2016).** BAG3 regulates contractility and Ca(2+) homeostasis in adult mouse ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **92**: 10-20.
- Ferrer I, Carmona M, Blanco R, Moreno D, Torrejon-Escribano B, Olive M (2005).** Involvement of clusterin and the aggresome in abnormal protein deposits in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *Brain Pathol.* **15**: 101-108.
- Fire AZ, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806-811.
- Fire AZ (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* **15**(9): 358-63.
- Fletcher DA, Mullins RD (2010).** Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* **463**(7280): 485-92.
- Förster T (1948).** Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik.* **437**.

Franaszczyk M, Bilinska ZT, Sobieszcańska-Malek M, Michalak E, Sleszycka J, Sioma A, Malek LA, Kaczmarek D, Walczak E, Włodarski P, Hutnik L, Milanowska B, Dzielinska Z, Religa G, Grzybowski J, Zieliński T, Ploski R (2014). The *BAG3* gene variants in Polish patients with dilated cardiomyopathy: four novel mutations and a genotype-phenotype correlation. *J. Transl. Med.* **12**: 192.

Franke WW, Borrmann CM, Grund CM, Pieperhoff S (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **85**(2): 69-82.

Frank D, Frey N (2011). Cardiac Z-disc Signaling Network. *J. Biol Chem.* **286**(12): 9897-9904.

Frey N, Richardson JA, Olson EN (2000). Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 14632-37.

Frixione E (2000). Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell motility and the cytoskeleton.* **46**(2): 73-94.

Frey N, Olson EN (2002). Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J. Biol. Chem.* **277**: 13998-4004.

Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J. Cell Biol.* **106**(5): 1563-72.

Fürst DO, Nave R, Osborn M, Weber K (1989). Repetitive titin epitopes with a 42 nm spacing coincide in relative position with known A band striations also identified by major myosin-associated proteins. An immunoelectron-microscopical study on myofibrils. *J. Cell. Sci.* **94**: 119-125.

Galbraith D (2012). Flow cytometry and cell sorting: The next generation. *Methods.* **57**: 249-250.

Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J.* **28**(7): 889-901.

Gandhi PU, Gaggin HK, Belcher AM, Harisiades JE, Basile A, Falco A, Rosati A, Piscione F, Januzzi JL Jr., Turco MC (2015). Analysis of BAG3 plasma concentrations in patients with acutely decompensated heart failure. *Clin. Chim. Acta.* **20**(445):73-8.

Gardel ML, Nakamura F, Hartwig JH, Crocker JC, Stossel TP, Weitz DA (2006). Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**(6): 1762-7.

Gautel M (2008). The sarcomere and the nucleus: functional links to hypertrophy, atrophy and sarcopenia. *Adv. Exp. Med. Biol.* **642**: 176.191.

Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* **6**(13): 3995-4002.

George SH, Gertsenstein M, Vintersten K, Korets-Smith E, Murphy J, Stevens ME, Haigh JJ, Nagy A (2007). Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**(11): 4455-4460.

Glickman MH, Ciechanover A (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews.* **82**(2): 373-428.

Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.* **6**(4): 299-310.

Gorbet MB, Sefton MV (2005). Endotoxin: The Uninvited Guest. *Biomaterials.* **26**: 6811-6817.

Gregorio CC, Trombitás K, Centner T, Kolmerer B, Stier G, Kunke K, Suzuki K, Obermayr F, Herrmann B, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S (1998). The NH₂ terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J. Cell Biol.* **143**(4): 1013-27.

Griffith J (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113-159.

Grzanka D, Gagat M, Izdebska M (2013). Actin is required for cellular death. *Acta Histochemica.* **115**(8): 775-782.

Gültekin H, Heermann KH (1988). The use of PDVF membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**: 320-329.

Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-80.

Harary I, Farley B (1960). *In vitro* studies of single isolated beating heart cells. *Science.* **131**(3414): 1674-5.

Hartl FU (1996). Molecular chaperones in protein folding. *Nature.* **381**: 571-580.

Harvey RP (2002). Patterning the Vertebrate Heart. *Nat. Rev. Genet.* **3**(7): 544-556.

Harvey W (1628). On the Motion of The Heart And Blood in Animals. *The Harvard Classics.* **8**: 62-64.

Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **407**(6805): 770-6.

Henrichsen CN, Vinckenbosch N, Zöllner S, Chaignat E, Pradervand S, Schütz F, Ruedi M, Kaessmann H, Reymond A (2009). Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes. *Nat. Genet.* **41**(4): 424-9.

Hermann BG, Frischauf AM (1987). Isolation of genomic DNA. *Methods Enzymol.* **152**: 75-134.

- Himmel M, Van der Ven PF, Stöcklein W, Fürst DO (2003).** The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins. *Biochemistry*. **42**(2): 430-439.
- Hishiya A, Kitazawa T, Takayama S (2010).** BAG3 and Hsc70 interact with actin capping protein CapZ to maintain myofibrillar integrity under mechanical stress. *Circ Res*. **107**(10): 1220-31.
- Höhfeld J, Cyr DM, Patterson C (2001).** From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep*. **2**(10): 885-90.
- Homma S, Iwasaki M, Shelton GD, Engvall E, Reed JC, Takayama S (2006).** BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am. J. Pathol*. **169**(3): 761-73.
- Hoshijima M (2006).** Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. **290**(4): H1313-H1325.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren SM, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y (2013).** The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. **496**: 498-503.
- Huber F, Schnauß J, Rönicke S, Rauch P, Müller K, Fütterer C, Käs J (2013).** Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Advances in Physics*. **62**(1): 1-112.
- Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969).** Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*. **166**(3906): 747-9.
- Hurtley SM, Helenius A (1989).** Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol*. **5**: 277-307.
- Iida Y, Tuziuzi T, Yasui K, Kozuka T, Towata A (2008).** Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field. *Ultrasonics Sonochemistry*. **15**(6): 995-1000.
- Iwasaki M, Homma S, Hishiya A, Dolezal SJ, Reed JC, Takayama S (2007).** BAG3 Regulates Motility and Adhesion of Epithelial Cancer Cells. *Cancer Research*. **67**(21): 10252-10259.
- Iwasaki M, Tanaka R, Hishiya A, Homma S, Reed JC, Takayama S (2010).** BAG3 directly associates with guanine nucleotide exchange factor of Rap1, PDZGEF2, and regulates cell adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **400**(3): 413-418.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012):** A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. **337**(6096): 816-821.
- Jordan HE (1933).** The structural changes in striped muscle during contraction. *Physiological Reviews*. **13**(3): 301-324.

Jung SE, Kim YK, Youn DY, Lim MH, Ko JH, Ahn YS, Lee JH (2010). Down-modulation of Bis sensitizes cell death in C6 glioma cells induced by oxygen-glucose deprivation. *Brain Res.* **1349**: 1-10.

Kabbage M, Dickman MB (2008). The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell Mol. Life Sci.* **65**(9): 1390-402.

Kadmas JL, Beckerle MC (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**(11): 920-31.

Kakui Y, Sato M (2015). Differentiating the roles of microtubule-associated proteins at meiotic kinetochores during chromosome segregation. *Chromosoma.* 1-12.

Kassis JN, Guancial EA, Doong H, Virador V, Kohn E (2006). CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Experimental Cell Research* **312**(15): 2962-2971.

Kay BK, Williamson MP, Sudol M (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **14**(2): 231-41.

King JS (2012). Mechanical stress meets autophagy: potential implications for physiology and pathology. *Trends in molecular medicine.* **18**(10): 583-588.

Kirov JV, Adkisson M, Nava AJ, Cipollone A, Willis B, Engelhard EK, Lloyd KC, de Jong P, West DB (2015). Reporter Gene Silencing in Targeted Mouse Mutants Is Associated with Promoter CpG Island Methylation. *PLoS One.* **10**(8): e0134155.

Klenow H, Henningsen I (1979). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **65**(1): 168-75.

Klenow H, Henningsen I (1979). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **65**(1): 168-75.

Kley RA, Maerkens A, Leber Y, Theis V, Schreiner A, van der Ven PF, Uszkoreit J, Stephan C, Eulitz S, Euler N, Kirschner J, Müller K, Meyer HE, Tegenthoff M, Fürst DO, Vorgerd M, Müller T, Marcus K (2013). A combined laser microdissection and mass spectrometry approach reveals new disease relevant proteins accumulating in aggregates of filaminopathy patients. *Mol. Cell Proteomics.* **12**(1): 215-27.

Kim S, Coulombe PA (2010). Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nature Reviews molecular Cell Biology.* **11**: 75-81.

Kim TK, Eberwine JH (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**(8): 3173-3178.

Klinke R, Silbernagl S (2009). Lehrbuch der Physiologie. **6.** Auflage. Thieme.

- Knappeis GG, Carlsen F (1968).** The ultrastructure of the M-line in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **38**(1): 202-211.
- Kolakowski J, Wrzosek A, Dabrowska R (2004).** Fesselin is a target protein for calmodulin in a calcium-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**(4): 1251-1256.
- Kolossov E, Lu Z, Drobinskaya I, Gassanov N, Duan Y, Sauer H, Manzke O, Bloch W, Hescheler J, Fleischmann BK (2005).** Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *The FASEB Journal.* **10**:1096/fj.03-1451fje.
- Konersman CG, Bordini BJ, Scharer G, Lawlor MW, Zangwill S, Southern JF, Amos L, Geddes GC, Kliegman R, Collins MP (2015).** BAG3 myofibrillar myopathy presenting with cardiomyopathy. *Neuromuscul. Disord.* pii: **S0960-8966**(15)00028-0.
- Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeöld A, Fischer I, Paulin D, Schröder R, Wiche G (2008).** Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J. Cell Biol.* **181**(4): 667-81.
- Knezevic T, Myers VD, Gordon J, Tilley DG, Sharp TE 3rd, Wang J, Khalili K, Cheung JY, Feldman AM (2015).** BAG3: a new player in the heart failure paradigm. *Heart Fail. Rev.* **20**(4):423-34.
- Kulp A, Kuehn JM (2010).** Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 163-184.
- Kurepa J, Wang S, Li Y, Smalle J (2009).** Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signal Behav.* **4**(10): 924-927.
- Kyratsous CA, Silverstein SJ (2007).** BAG3, a host cochaperone, facilitates varicella-zoster virus replication. *J. Virol.* **81**: 7491-7503.
- Kyratsous CA, Silverstein SJ (2008).** The co-chaperone BAG3 regulates *Herpes simplex* virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**: 20912-20917.
- Labeit S, Kolmerer B (1995).** Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* **270**(5234): 293-6.
- Lange S, Ehler E, Geutel M (2006).** From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends in Cell Biol.* **16**(1): 11-18.
- Lämmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lazarides E (1980).** Desmin and intermediate filaments in muscle cells. *Results Probl. Cell Differ.* **11**: 124-31.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH (2012).** Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* **20**(62). pii: 3923. doi: 10.3791/3923.

- Lee JH, Takahashi T, Yasuhara N, Inazawa J, Kamada S, Tsujimoto Y (1999).** Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene*. **18**(46): 6183-90.
- Levine B, Kroemer G (2008).** Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. **132**(1): 27-42.
- Leinweber BD, Fredricksen RS, Hoffman DR, Chalovich JM (1999).** Fesselin: a novel synaptopodin-like actin binding protein from muscle tissue. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **20**(5-6): 539-545.
- Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quiñones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R (1999).** Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. **100**(5): 461-4.
- Linke WA, Granzier H (1998).** A spring tale: new facts on titin elasticity. *Biophys. J.* **75**(6): 2613-4.
- Linnemann A, van der Ven PF, Vakeel P, Albinus B, Simonis D, Bendas G, Schenk JA, Micheel B, Kley RA, Fürst DO. (2010).** The sarcomeric Z-disc component myopodin is a multiadapter protein that interacts with filamin and alpha-actinin. *Eur. J. Cell Biol.* **89**(9): 681-92.
- Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995).** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**(6): 357-62.
- Lobanova ES, Finkelstein S, Skiba NP, Arshavsky VY (2013).** Proteasome overload is a common stress factor in multiple forms of inherited retinal degeneration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **110**(24): 9986-9991.
- Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, Bhattacharyya S, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN (2016).** Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*. **351**(6271): 400-3.
- Louch EW, Sheehan KA, Wolska BM (2011).** Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**(3): 288-298.
- Luther PK (2009).** The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **30**: 171-185.
- Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M (1990).** Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J. Cell Biol.* **111**(6 Pt 1): 2427-2436.
- Maass A, Langer SJ, Oberdorf-Maass S, Bauer S, Neyses L, Leinwand LA (2003).** Rational promoter selection for gene transfer into cardiac cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**(7): 823-31.
- Madigan MT, Martinko JM (2009).** Brock Mikrobiologie. **11.** aktualisierte Auflage. Pearson Studium.

Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J (1994). Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ. Res.* **75**(2): 233-44.

Mandel M, Higa A (1970). Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.

Martin GR (1981). Isolation of pluripotent stem cells from mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Rproc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 7634-7638.

Maruyama K, Murakami F, Ohashi K (1977). Connectin, an elastic protein of muscle. comparative biochemistry. *J. Biochem.* **82**(2): 339-345.

McBurney MW, Staines WA, Boekelheide K, Parry D, Jardine K, Pickavance L (1994). Murine PGK-1 promoter drives widespread but not uniform expression in transgenic mice. *Dev. Dyn.* **200**(4): 278-93.

McCollum AK, Casagrande G, Kohn EC (2010). Caught in the middle: the role of Bag3 in disease. *Biochem. J.* **425**(1): e1-3.

McDonell MW, Simon MN, Studier FW (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* **110**(1): 119-46.

Metscher BD, Ahlberg PE (1999). Zebrafish in Context: Uses of a Laboratory Model in Comparative Studies. *Dev. Biol.* **210**: 1-14.

Meyvis TK, De Smedt SC, Van Oostveldt P, Demeester J (1999). Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. *Pharm. Res.* **16**(8): 1153-62.

Michalska AE (2007): Isolation and Propagation of Mouse Embryonic Fibroblasts and Preparation of Mouse Embryonic Feeder Layer Cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* **3**: C:1C.3:1C.3.1-1C.3.17.

Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y (1996). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *The Journal of cell biology* **134**: 1255-70.

Millevoi S, Trombitas K, Kolmerer B, Kostin S, Schaper J, Pelin K, Granzier H, Labeit S (1998). Characterization of nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. *J. Mol. Biol.* **282**(1): 111-123.

Miyazaki J, Takaki S, Araki, K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K, Yamamura K (1989). Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene.* **79** (2): 269-77.

Moncman CL, Wang K (2002). Targeted disruption of nebulin protein expression alters cardiac myofibril assembly and function. *Exp. Cell Res.* **273**: 2014-218.

- Mues A, van der Ven PF, Young P, Fürst DO, Gautel M (1998).** Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin. *FEBS Lett.* **428**: 111-114.
- Müller H, Ziegler B, Schweizer B (1993):** UV-/VIS-Spektroskopie in der Nukleinsäureanalytik. *Bio. Tech.* **4**: 25-29.
- Mullis K, Faloona, F (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **55**: 335-350.
- Mullis KB (1997).** System for automated performance of the polymerase chain reaction. United States Patent **5**: 656, 493.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993).** Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**(18): 8424-8428.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990).** Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *petunia* results in reversible co-suppression of homologous gene introns. *Plant Cell.* **2**: 279-289.
- Neuhoff V, Harold N, Taube D, Ehrhardt W (1988):** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* **9**: 255-262.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. (1982).** Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**(7): 841-5.
- Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR, Adamis AP (2006).** Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**(2): 123-32.
- Norton N, Li D, Rieder MJ, Siegfried JD, Rampersaud E, Züchner S, Mangos S, Gonzalez-Quintana J, Wang L, McGee S, Reiser J, Martin E, Nickerson DA, Hershberger RE (2011).** Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **88**(3): 273-82.
- Ochiai H (2015).** Single-Base Pair Genome Editing in Human Cells by Using Site-Specific Endonucleases. *International journal of molecular sciences.* **16**(9): 21128-21137.
- Odell ID, Cook D (2013).** Immunofluorescence Techniques. *Journal of Investigative Dermatology.* **133**(1): e4.
- Odgerel Z, Sarkozy A, Lee HS, McKenna C, Rankin J, Straub V, Lochmüller H, Paola F, D'Amico A, Bertini E, Bushby K, Goldfarb LG (2010).** Inheritance patterns and phenotypic features of myofibrillar myopathy associated with a BAG3 mutation. *Neuromuscul Disord.* **20**(7): 438-42.
- Ohtsuka H, Yajima H, Maruyama K, Kimura S (1997).** The N-terminal Z repeat 5 of connectin/titin binds to the C-terminal region of alpha-actinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**: 1-3.

- Olivé M, Odgerel Z, Martínez A, Poza JJ, Bragado FG, Zabalza RJ, Jericó I, Gonzalez-Mera L, Shatunov A, Lee HS, Armstrong J, Maraví E, Arroyo MR, Pascual-Calvet J, Navarro C, Paradas C, Huerta M, Marquez F, Rivas EG, Pou A, Ferrer I, Goldfarb LG (2015).** Clinical and myopathological evaluation of early- and late-onset subtypes of myofibrillar myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **21**(8): 533-42.
- Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Corradi D, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P (1996).** Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**(7): 1463-77.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006).** Global, *In Vivo*, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell.* **127**(3): 635-648.
- Opie LH (2004).** *Heart Physiology. From Cell to Circulation.* 4th Edition. Lippincott Williams Wilkins.
- Otterbein LR., Grace AP, Dominguez R (2001).** The crystal structure of uncomplexed actin in the adp state. *Science.* **293**(5530): 708-711.
- Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Kass DA (2008).** Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat. Protoc.* **3**(9): 1422-34.
- Pagliuca MG, Leroise R, Cigliano S, Leone A (2003).** Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett.* **541**: 11-13.
- Pan T, Kondo S, Zhu W, Xie W, Jankovic J, Le W (2008).** Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiol. Dis.* **32**:16-25.
- Pardo JV, Siliciano JD, Craig SW (1983).** A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 1008-12.
- Passier R, Richardson JA, Olson EN (2000).** Oracle, a novel PDZ-LIM domain protein expressed in heart and skeletal muscle. *Mech. Dev.* **92**: 277-84.
- Peckham M, Young P, Gautel M (1997).** Constitutive and variable regions of Z-disk titin/connectin in myofibril formation: a dominant-negative screen. *Cell Struct. Funct.* **22**(1): 95-101.
- Perálvarez-Marín A, Lórenz-Fonfría VA, Simón-Vázquez R, Gomariz M, Meseguer I, Querol E, Padrós E (2008).** Influence of proline on the thermostability of the active site and membrane arrangement of transmembrane proteins. *Biophys. J.* **95**(9): 4384-95.
- Peyvandi F, Garagiola I, Young G (2016).** The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *The Lancet.* doi: **10.1016/S0140-6736(15)01123-X**.
- Pingoud A, Jeltsch, A (1997):** Recognition and cleavage of DNA by type-I1 restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* **246**: 1-22.

- Ponte P, Gunning P, Blau H, Kedes L (1983).** Human Actin Genes Are Single Copy for α -Skeletal and α -Cardiac Actin but Multicopy for β - and γ -Cytoskeletal Genes: 3' Untranslated Regions Are Isotype Specific but Are Conserved in Evolution. *Molecular and Cellular Biology*. **3**(10): 1783-1791.
- Prunell A, Strauss F, Leblanc B (1977).** Photographic Quantitation of DNA in Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **78**: 57-65.
- Purevjav E, Varela J, Morgado M, Kearney DL, Li H, Taylor MD, Arimura T, Moncman CL, McKenna W, Murphy RT, Labeit S, Vatta M, Bowles NE, Kimura A, Boriek AM, Towbin JA (2010).** Nebulette mutations are associated with dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **56**(18): 1493-502.
- Pyle WG, Solaro RJ (2004).** At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ. Res.* **94**: 296-305.
- Ramos-Vara JA (2005):** Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* **42**(4): 405-26.
- Recillas-Targa F (2006).** Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol. Biotechnol.* **34**(3): 337-354.
- Redberry GW (2006).** Gene Silencing: New Research. **1.** Auflage. Nova Biomedical.
- Righetti P, Gianazza E, Gelfi C, Chairi M (1990).** In Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. **2nd** edition. Oxford University Press.
- Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SKh, Dryden DT, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumpport RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Krüger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw PC, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JM, Wilson GG, Xu SY. (2003).** A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1805-1812.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Francesco Scaravilli³, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2004).** Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics.* **36**: 585-595.
- Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y, Stoecker E, Fleischmann M, Bohlen H, Stehle R, Kolossov E, Brem G, Addicks K, Pfitzer G, Welz A, Hescheler J, Fleischmann BK (2002).** Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation.* **105**(20): 2435-2441.

Rosati A, Ammirante M, Gentilella A, Basile A, Festa M, Pascale M, Marzullo L, Belisario MA, Tosco A, Franceschelli S, Moltedo O, Pagliuca G, Leroise R, Turco MC (2007). Apoptosis inhibition in cancer cells: a novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 1337-1342.

Rosati A, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC (2011). BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death Dis.* **2**(4): e141.

Rosen JN, Sweeney MF, Mably JD (2009). Microinjection of Zebrafish Embryos to Analyze Gene Function. *J. Vis. Exp.* **25**: 1115.

Rowe RW (1971). Ultrastructure of the Z-line of skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* **51**: 674-685.

Ruparelia AA, Vaz R, Bryson-Richardson RJ (2012). Myofibrillar Myopathies and the Z-Disk Associated Proteins. Book Chapter **14** in the book "Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations". ISBN 978-953-51-0712-5.

Ruparelia AA, Oorschot V, Vaz R, Ramm G, Bryson-Richardson RJ (2014). Zebrafish models of BAG3 myofibrillar myopathy suggest a toxic gain of function leading to BAG3 insufficiency. *Acta Neuropathol.* **128**(6): 821-33.

Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **18**(21): 6409-6412.

Salah Z, Aqeilan RI (2011). WW domain interactions regulate the Hippo tumor suppressor pathway. *Cell Death Dis.* **2**(6): e172.

Salmikangas P, Mykkanen OM, Gronholm M, Heiska L, Kere J, Carpen O (1999). Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 1329-36.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.

Sanger JW, Ayoob JC, Chowrashi P, Zurawski D, Sanger JM (2000). Assembly of myofibrils in cardiac muscle cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **481**: 89-105.

Selcen D, Muntoni F, Burton BK, Pegoraro E, Sewry C, Bite AV, Engel AG (2009). Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **65**(1): 83-9.

Selcen D (2011). Myofibrillar Myopathies. *Neuromuscul. Disorders.* **21**(3): 161-171.

Schiebler TH (2004). *Anatomie.* **9.** Auflage. Springer.

- Schmidt A, Marescau B, Boehm EA, Renema WK, Peco R, Das A, Steinfeld R, Chan S, Wallis J, Davidoff M, Ullrich K, Waldschütz R, Heerschap A, De Deyn PP, Neubauer S, Isbrandt D (2007).** Severely altered guanidino compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **13**(9): 905-21.
- Schröder R, Goudeau B, Simon MC, Fischer D, Eggermann T, Clemen CS, Li Z, Reimann J, Xue Z, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, van der Ven PF, Fürst DO, Kunz WS, Vicart P (2003).** On noxious desmin: functional effects of a novel heterozygous desmin insertion mutation on the extrasarcomeric desmin cytoskeleton and mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* **12**(6): 657-69.
- Shier WT (1988).** Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze-thaw cycle: conditions that prevent cell killing using nucleated freezing. *Cryobiology.* **25**(2): 110-120.
- Smith AG, Hooper ML (1987).** Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **121**(1): 1-9.
- Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL (1971).** Synthesis of DNA Complements of Natural RNAs. A General Approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**(11): 2843-2845.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R (2009).** Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell.* **136**(5): 964-77.
- Schroeder R, Schoser B (2009).** Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. *Brain Pathol.* **19**(3): 483-92.
- Schroeter MM, Chalovich JM (2005).** Fesselin binds to actin and myosin and inhibits actin-activated atpase activity. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**(4-5): 183-189.
- Schroeter MM, Beall B, Heid HW, Chalovich JM (2008).** *In vitro* characterization of native mammalian smooth-muscle protein synaptopodin 2. *Biosci. Rep.* **28**(4): 195-203.
- Sternberg N, Hamilton D (1981).** Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between *loxP* sites. *J. Mol. Biol.* **150**(4): 467-86.
- Sutherland GT, Janitz M, Kril JJ (2011):** Understanding the pathogenesis of Alzheimer's disease: will RNA-Seq realize the promise of transcriptomics? *J. Neurochem.* **116**: 937-946
- Suzuki Y, Craigie R (2007).** The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nature Reviews Microbiology.* **5**: 187-196.
- Suzuki M, Iwasaki M, Sugio A, Hishiya A, Tanaka R, Endo T, Takayama S, Saito T (2011).** "BAG3 (BCL2-associated athanogene 3) interacts with MMP-2 to positively regulate invasion by ovarian carcinoma cells." *Cancer Letters.* **303**(1): 65-71.
- Takada F, Van der Woude DL, Tong HQ, Thompson TG, Watkins SC, Kunkel LM, Beggs AH (2001).** Myozenin: an alpha-actinin- and gammafilamin- binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 1595-600.

- Takayama S, Xie Z, Reed JC (1999).** An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.* **274**(2): 781-6.
- Takayama S, Reed JC (2001).** Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat. Cell Biol.* **3**(10): e237-41.
- Takebordbar M, Zhu K, Cheng JK, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Measner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA, Cong L, Zhang F, Vandenberghe LH, Church GM, Wagers AJ (2016).** *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science.* **351**(6271): 407-11.
- Thompson TG, Chan YM, Hack AA, Brosius M, Rajala M, Lidov HG, McNally EM, Watkins S, Kunkel LM (2000).** Filamin 2 (n2): A musclespecific sarcoglycan interacting protein. *J. Cell Biol.* **148**(1): 115-126.
- Tjio JH, Levan A (1956).** The chromosome number of man. *Hereditas.* **42**: 1-6.
- Turnacioglu KK, Mittal B, Dabiri GA, Sanger JM, Sanger JW (1997).** Zeugmatin is part of the Z-band targeting region of titin. *Cell Struct. Funct.* **22**(1): 73-82.
- Ulbricht A, Eppler FJ, Tapia VE, van der Ven PF, Hampe N, Hersch N, Vakeel P, Stadel D, Haas A, Saftig P, Behrends C, Fürst DO, Volkmer R, Hoffmann B, Kolanus W, Höfeld J (2013).** Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr. Biol.* **23**(5): 430-5.
- Ulbricht A, Gehlert S, Leciejewski B, Schiffer T, Bloch W, Höfeld J (2015).** Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy.* **11**(3): 538-46.
- Vahouny GV, Wei R, Starkweather R, Davis C (1970).** Preparation of beating heart cells from adult rats, *Science.* **167**: 1616-1618.
- Valle G, Faulkner G, De Antoni A, Pacchioni B, Pallavicini A, Pandolfo D, Tiso n, Toppo S, Trevisan S, Lanfranchi G (1997).** Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Letters.* **415**(2): 163-168.
- Vandekerckhove J, Weber K. (1978).** At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* **126**(4): 783-802.
- Van der Flier A, Sonnenberg A (2001).** Structural and functional aspects of Filamins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1538**(2-3): 99-117.
- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR (1990).** Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of genes copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**: 291-299.
- Van der Ven PFM, Obermann WMJ, Lemke B, Gautel M, Weber K, Fürst DO (2000).** Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of gamma-filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* **45**: 149-162.

- Van der Ven PF, Wiesner S, Salmikangas P, Auerbach D, Himmel M, Kempa S, Hayess K, Pacholsky D, Taivainen A, Schröder R, Carpén O, Fürst DO (2000).** Indications for a novel muscular dystrophy pathway. gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J. Cell Biol.* **151**(2): 235-248.
- Van der Ven PF, Ehler E, Vakeel P, Eulitz S, Schenk JA, Milting H, Micheel B, Fürst DO (2006).** Unusual splicing events result in distinct Xin isoforms that associate differentially with filamin c and Mena/VASP. *Exp. Cell Res.* **312**: 2154-67.
- Van Rijsingen IA, Arbustini E, Elliott PM, Mogensen J, Hermans-van Ast JF, van der Kooi AJ, van Tintelen JP, van den Berg MP, Pilotto A, Pasotti M, Jenkins S, Rowland C, Aslam U, Wilde AA, Perrot A, Pankuweit S, Zwinderman AH, Charron P, Pinto YM (2012).** Risk factors for malignant ventricular arrhythmias in lamin a/c mutation carriers a European cohort study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**(5): 493-500.
- Vogelstein B, Gillespie D (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- Wang L, Chen M, Yang J, Zhang Z (2013).** LC3 fluorescent puncta in autophagosomes or in protein aggregates can be distinguished by FRAP analysis in living cells. *Autophagy.* **9**(5): 756-69.
- Weiss B, Richardson CC (1967).** Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from *Escherichia coli* infected with T4 bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **57** (4): 1021-1028.
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. (2000).** Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* **24**(7): 1016-9.
- Walter MC, Lochmüller H, Hartard M, Reilich P, Pongratz D und Müller-Felber W (1999):** Creatine monohydrate in muscular dystrophies: a double-blind, placebo-controlled clinical study. *Neurology.* **52**(9): 2, A543.
- Wang K, Ash JF, Singer SJ (1975).** Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**(11): 4483-4486.
- Wang K, McClure J, Tu A (1979).** Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**(8): 3698-3702.
- Wang X, Yang P (2008).** *In vitro* Differentiation of Mouse Embryonic Stem (mES) Cells Using the Hanging Drop Method. *J. Vis. Exp.* **17**: 825.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009):** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics.* **10**(1): 57-63.
- Weins A, Schwarz K, Faul C, Barisoni L, Linke WA, Mundel P (2001).** Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein. *J. Cell Biol.* **155**(3): 393-404.

- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1991).** Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation*. **48**(3): 173-182.
- Wolosewick JJ, Porter KR (1976).** Stereo high-voltage electron microscopy of whole cells of the human diploid line, WI-38. *Am. J. Anat.* **147**: 303-323.
- Wolska BM, Solaro RJ (1996).** Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. *Am. J. Physiol.* **271**: H1250-H1255.
- Wydner KL, McNeil JA, Lin F, Worman HJ, Lawrence JB (1996).** Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. **32**(3): 474-8.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ (2005).** Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. **123**(5): 889-901.
- Ylännä, J, Scheffzek K, Young P, Saraste M (2001).** Crystal structure of the alpha-actinin rod: Four spectrin repeats forming a tight dimer. *Cell Mol. Biol. Lett.* **6**(2): 234.
- Young P, Gautel M (2000).** The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *The EMBO Journal*. **19**(23): 6331-6340.
- Young JC, Hartl FU (2000).** Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J.* **19**(21): 5930-40.
- Yunoki T, Kariya A, Kondo T, Hayashi A, Tabouchi Y (2013).** The combination of silencing BAG3 and inhibition of the JNK pathway enhances hyperthermia sensitivity in human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer letters*.
- Yu YP, Luo JH (2006).** Myopodin-mediated suppression of prostate cancer cell migration involves interaction with zyxin. *Cancer Res.* **66**(15): 7414-7419.
- Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Sorino P (1997).** Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta-geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **94**(8): 3789-3794.
- Zhang H, Baehrecke EH (2015).** Eaten alive: novel insights into autophagy from multicellular model systems. *Trends Cell Biol.* pii: **S0962-8924**(15): 00047-1.
- Zhang Y, Wang JH, Lu Q, Wang YJ (2012).** Bag3 promotes resistance to apoptosis through Bcl-2 family members in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **27**: 109-113.
- Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF (1998).** A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* **20**(2): 123-8.
- Zhou Q, Ruiz-Lozano P, Martone ME, Chen J (1999).** Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **274**: 19807-13.

Zou P, Pinotsis N, Lange S, Song YH, Popov A, Mavridid I, Mayans OM, Gautel M, Willmanns M (2006). Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. **439**: 229-233.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α MHC	<i>alpha-myosin heavy chain</i> , α -Myosin Schwere Kette
β MHC	<i>beta-myosin heavy chain</i> , β -Myosin Schwere Kette
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAG	<i>Bcl-2 associated anthanogene</i> , Bcl-2 assoziierte Anthanogene
bar	barometrischer Druck, 10^5 Pa
BDM	Butanedion-Monoxim
<i>blund ends</i>	stumpfe Enden, bei der Spaltung mit Endonukleasen entstehende Enden
bspw.	beispielsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
CAG	β -Aktin Promotor des Huhns mit Cytomegalie-Virus Verstärker
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyriboneukleinsäure
CMV	Cytomegalie-Virus
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> , intestinale alkaline Phosphatase des Kalbs
Ct	<i>Cycle Threshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
c-terminal	carboxy-terminal
Cy	<i>Cyanine</i> , Cyanin, synthetischer Farbstoff
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Tag der Embryonalentwicklung
EBs	Embryonalkörper
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verstärktes Grün fluoreszierendes Protein
FA	Formaldehyd (Formalin)
FAM	Carboxy-Fluorescein
Fc	konstanter Teil der schweren Kette
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKS	Fötales Kälberserum
FRAP	<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i> , Fluoreszenz-Wiederherstellung nach Photoauslöschung
FSB	<i>filamentous sulfur bacteria</i> , Nährmedium für Bakterien
gDNA	genomische Desoxyriboneukleinsäure
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Grey
Hz	Hertz
<i>h</i>	<i>hours</i> , Stunden
IgG	Immunglobulin G
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
KI	Kryoinfarkt
KO	Knock-out
LB	<i>lysogeny broth</i> , Nährmedium für Bakterien
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i> , Leukämie-inhibierender Faktor

mES-Zellen	murine embryonale Stammzellen
min	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MUAPs	<i>motor unit action potentials</i> , Aktionspotentials motorischer Einheiten
MW	Mittelwert
μ	Mikro
<i>n</i>	Anzahl
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i> , nicht essentielle Aminosäuren
P	postnataler Tag
p. A.	<i>pro analysi</i> , für die Analyse
PAP	Papanicolaou
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglycerate Kinase 1
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative polymerase Kettenreaktion
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SOB	<i>super optimal broth</i> , komplexes Nährmedium für Bakterien
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
<i>sticky ends</i>	klebrige Enden, bei der Spaltung mit Endonukleasen entstehende Enden
T12	herzspezifisches Titin-Epitop
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TfR	Transferrin-Rezeptor
U	<i>unit</i> , Einheit der katalytischen Aktivität eines Enzyms
üN	über Nacht
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i> , Weizenkeim-Agglutinin

8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Skelettmuskels.
- Abb. 2.** Schematische Darstellung quergestreifter Herzmuskelzellen.
- Abb. 3.** Schematische Darstellung eines Skelettmuskels.
- Abb. 4.** Molekularer Aufbau eines Sarkomers und seiner Filamentsysteme.
- Abb. 5.** Schematische Darstellung der Z-Scheibe und ihres molekularen Aufbaus.
- Abb. 6.** Molekularer Aufbau der Domänenstruktur von BAG3.
- Abb. 7.** Schematische Darstellung des CASA-Mechanismus.
- Abb. 8.** Funktionsverlust von BAG3 durch Depletion des BAG3-Gens im Mausmodell.
- Abb. 9.** Charakteristische histologische Befunde in Muskelbiopsien von Patienten mit einer Myofibrillären Myopathie.
- Abb. 10.** Durch BAG3^{P209L} Mutation ausgelöste Myofibrilläre Myopathie.
- Abb. 11.** Schematische Darstellung der Klonierung der BAG3^{WT}-/BAG3^{P209L}-eGFP-Konstrukte mit gewebespezifischem α MHC-Promotor.
- Abb. 12.** Elektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA nach Testspaltung mit *Sma*I.
- Abb. 13.** Transiente Transfektion von α MHC-BAG3^{WT}-eGFP bzw. α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP in embryonalen Kardiomyozyten.
- Abb. 14.** Stabile Transfektion von mES-Zellen mit α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP.
- Abb. 15.** Differenzierung der mES-Zellen in Zellen der drei Keimblätter mittels der Methode des hängenden Tropfen.
- Abb. 16.** Heterogene Expression von BAG3^{P209L}-eGFP in mES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten an Tag 10 der Differenzierung.
- Abb. 17.** Lokalisation der BAG3^{WT}-eGFP- bzw. BAG3^{P209L}-eGFP-Proteine in mES-Zell-abgeleiteten Kardio-myozyten.
- Abb. 18.** Karyogramm der transgenen mES-Zelllinie α MHC-BAG3^{P209L}-eGFP Klon 2.
- Abb. 19.** Expression von BAG3^{P209L}-eGFP und BAG3^{WT}-eGFP in postnatalen Herzen
- Abb. 20.** Expression des BAG3^{P209L}-Proteins *in vivo* an P 3.
- Abb. 21.** Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Herzen innerhalb eines Wurfes nach Verpaarung mit Männchen #21.
- Abb. 22.** Quantifizierung der BAG3^{WT}-eGFP- und BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-Mäusen.
- Abb. 23.** Quantifizierung der Integrität der Z-Scheiben in 3 Wochen alten Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen.
- Abb. 24.** Quantifizierung der Integrität der Z-Scheiben in isolierten Kardiomyozyten von 10 Wochen alten Herzen von BAG3^{P209L}-eGFP-Mäusen.
- Abb. 25.** Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen BAG3.
- Abb. 26.** Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen Myopodin.

- Abb. 27** Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen Filamin C.
- Abb. 28.** Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen Titin.
- Abb. 29.** Immunfluoreszenzfärbung von 10 Wochen alten Herzen gegen Desmin.
- Abb. 30.** Eingeschränkte Mobilität von BAG3^{P209L}-eGFP in adulten Kardiomyozyten.
- Abb. 31.** Ermittlung des Verhältnisses von BAG3^{WT}-eGFP und BAG3^{P209L}-eGFP zu murinem BAG3 in adulten Kardiomyozyten.
- Abb. 32.** Auflösung der Sarkomerstruktur in BAG3^{P209L}-eGFP-Kardiomyozyten.
- Abb. 33.** Schematische Darstellung der Klonierung des CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{fllox}-Konstrukts zur konditionalen BAG3^{P209L}-eGFP-Expression.
- Abb. 34.** Gezielte Integration des humanen CAG-BAG3^{P209L}-eGFP^{fllox}-Konstrukts in den *Rosa26*-Locus.
- Abb. 35.** Induktion der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vitro* durch Verwendung einer *Cre*-Rekombinase.
- Abb. 36.** „Leakyness“ der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression *in vivo*.
- Abb. 37.** Konditionale Expression von BAG3^{P209L}-eGFP in Embryonen.
- Abb. 38.** Fehlende BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-Expression im embryonalen Entwicklungsstadium.
- Abb. 39.** Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Kardiomyozyten innerhalb eines Wurfes nach Verpaarung mit Männchen #13.
- Abb. 40.** Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Kardiomyozyten innerhalb eines Wurfes nach Verpaarung mit Männchen #20.

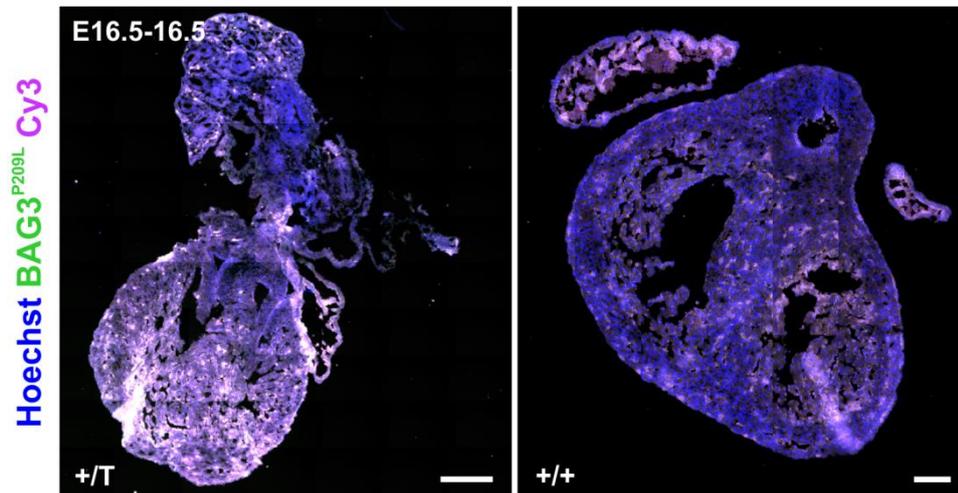
9. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.** Bezeichnung verwendeter Plasmide.
- Tab. 2.** Bezeichnungen und Sequenzen verwendeter Oligonukleotide.
- Tab. 3.** Verwendete TaqMan-Sonden.
- Tab. 4.** Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen.
- Tab. 5.** Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen.
- Tab. 6.** Verwendete Primärantikörper für immunzytochemische Färbungen.
- Tab. 7.** Verwendete Sekundärantikörper für immunzytochemische Färbungen.
- Tab. 8.** Verwendete *E. coli* Bakterienstämme und Hersteller.
- Tab. 9.** Bestandteile eines Spaltungsansatzes.
- Tab. 10.** Bestandteile einer Klenow-Auffüllung.
- Tab. 11.** Bestandteile eines Ligationsansatzes.
- Tab. 12.** Reaktionsansatz einer PCR zur Genotypisierung.
- Tab. 13.** PCR-Programm einer PCR zur Genotypisierung.
- Tab. 14.** Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide.
- Tab. 15.** Reaktionsansatz einer Reverse Transkription.
- Tab. 16.** Programm einer RT-PCR.
- Tab. 17.** Reaktionsansatz einer qPCR.
- Tab. 18.** Programm einer qPCR.
- Tab. 19.** Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels.
- Tab. 20.** Linkventrikuläre hämodynamische Kathetermessungen.

10. Anhang

10.1 Ergänzende Daten

A



B

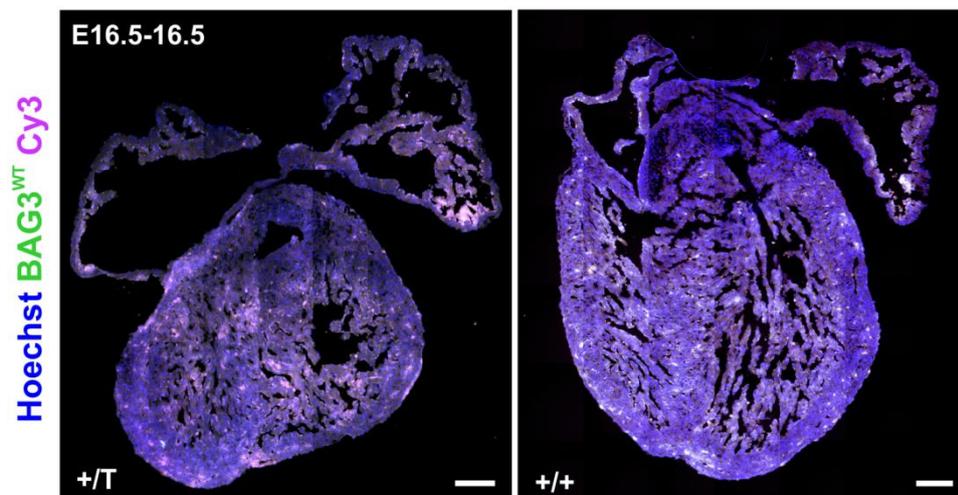


Abb. 38. Fehlende BAG3^{P209L}-eGFP- bzw. BAG3^{WT}-eGFP-Expression im embryonalen Entwicklungsstadium. A. Herzen der MHC-BAG3^{P209L}-eGFP-Mauslinie eines transgenen Tieres und eines Wildtyp-Geschwistertieres. B. Herzen der MHC-BAG3^{WT}-eGFP-Mauslinie eines transgenen Tieres und eines Wildtyp-Geschwistertieres. α -Aktinin-Färbung in magenta. Kernfärbung in blau. $n=3$. $*= p < 0.05$. Maßstab: 200 μm .

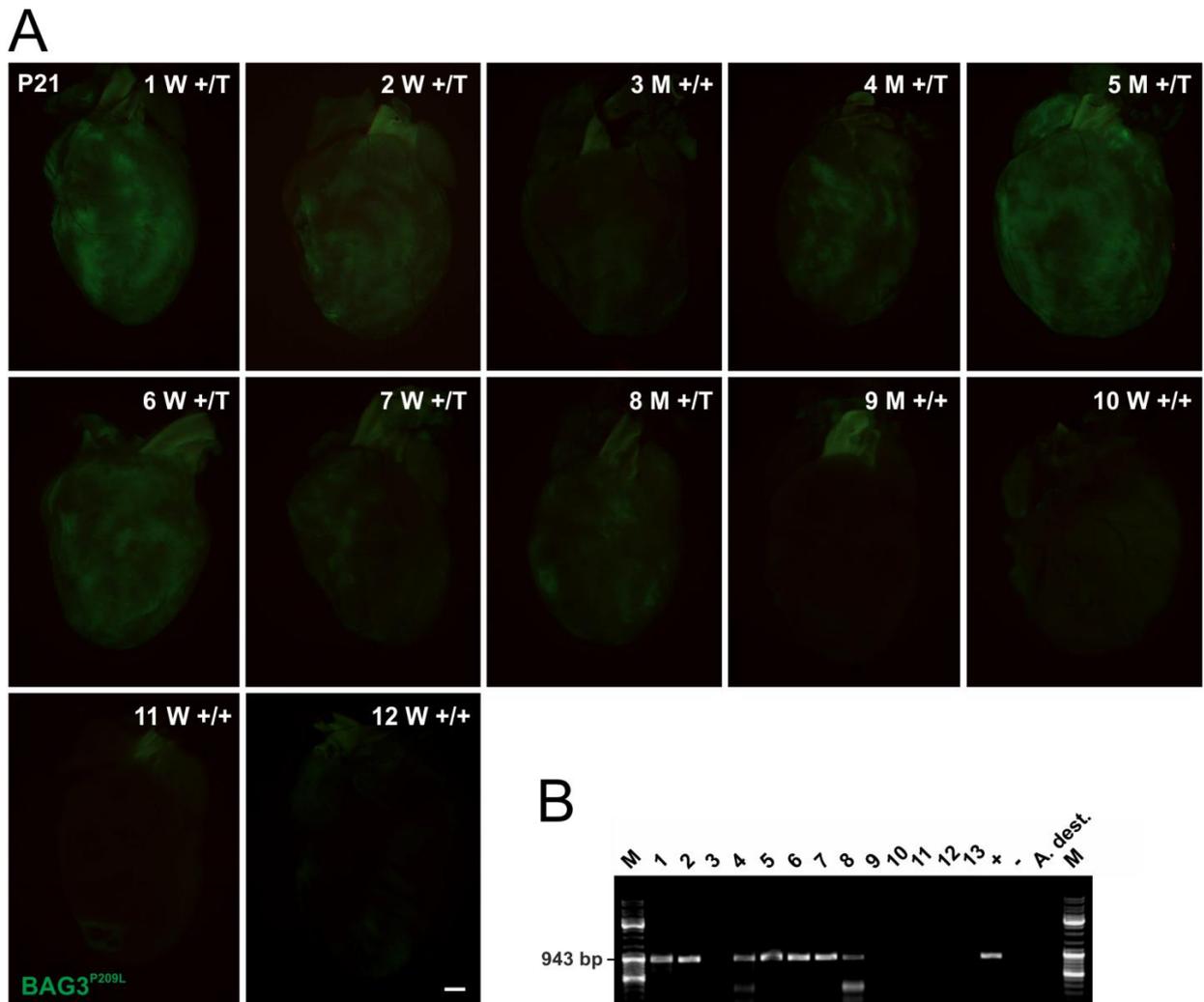


Abb. 39. Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Kardiomyozyten innerhalb eines Wurfes nach Verpaarung mit Männchen #13. Die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in drei Wochen alten Herzen war heterogen und variierte sowohl innerhalb der Würfe als auch von Wurf zu Wurf, wobei die Expression in den männlichen Tieren etwas stärker war. **B.** Die PCR zur Genotypisierung des in B gezeigten Wurfes zeigte ein DNA-Fragment einer Größe von 943 bp. M: Männchen, W: Weibchen. +/+ : Wildtyp, +/T: Transgen. Maßstab: 500 µm.

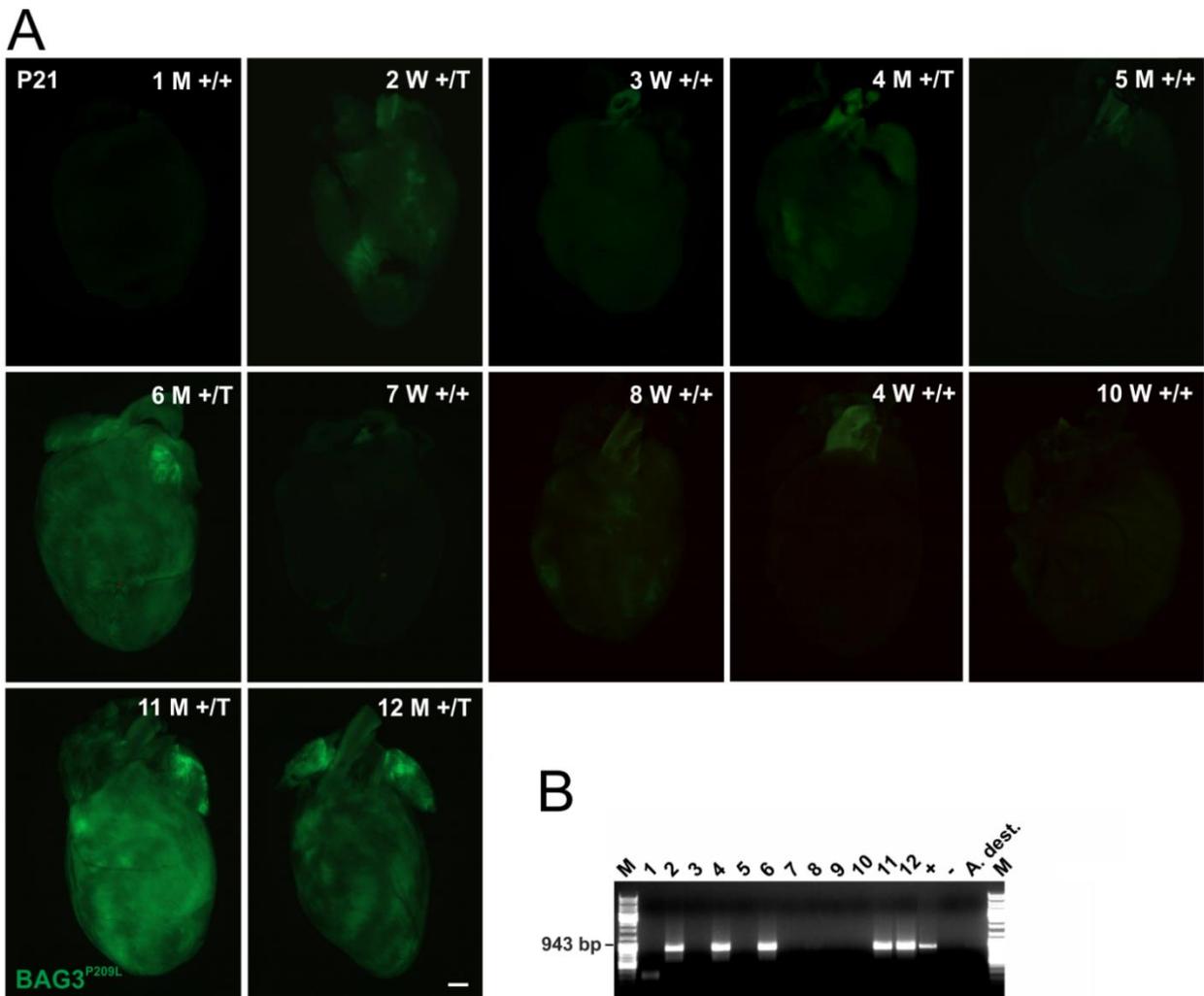


Abb. 40. Heterogenität der BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in adulten Kardiomyozyten innerhalb eines Wurfes nach Verpaarung mit Männchen #20. A. Die BAG3^{P209L}-eGFP-Expression in drei Wochen alten Herzen war heterogen und variierte sowohl innerhalb der Würfe als auch von Wurf zu Wurf, wobei die Expression in den männlichen Tieren etwas stärker war. **B.** Die PCR zur Genotypisierung des in B gezeigten Wurfes zeigte ein DNA-Fragment einer Größe von 943 bp. M: Männchen, W: Weibchen. +/+ : Wildtyp, +/T: Transgen. Maßstab: 500 μ m.

10.2 Liste der Publikationen

Vorträge

- 06/2012 Vortrag im Rahmen der jährlichen Tagung des Forschungsbereichs FOR 1352 in Bonn
 Titel: *Function of BAG3 in skeletal and cardiac Muscles.*
- 10/2012 Vortrag im Rahmen der jährlichen Tagung der Graduiertenschule THEME in Bad Honnef
 Titel: *Function of BAG3 in skeletal and cardiac Muscles.*

Posterbeiträge

- 03/2015 Poster im Rahmen der 94. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Magdeburg
 Titel: *Z-disk disruption of BAG3^{P209L} expressing cardiomyocytes is accompanied by impaired mobility and altered binding characteristics.*
- 06/2014 Poster im Rahmen der Tagung „Molecular Insights into Muscle Function and Protein Aggregate Myopathies“ in Potsdam
 Titel: *Function of BAG3 in skeletal and cardiac Muscles.*
- 03/2014 Poster im Rahmen der 12. Deutsch-Niederländischen Tagung der Arbeitsgruppen der molekularen Kardiologie in Groningen
 Titel: *Function of BAG3 in skeletal and cardiac Muscles.*
- 03/2014 Poster im Rahmen der 93. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Mainz
 Titel: „Function of BAG3 in skeletal and cardiac Muscles“
- 10/2013 Poster im Rahmen der jährlichen Tagung der Graduiertenschule THEME in Bad Honnef
 Titel: *Function of BAG3 in skeletal and cardiac Muscles.*
- 10/2013 Poster im Rahmen der Konferenz „Myofibrillar Z-disk Structure and Dynamics“ in Hamburg
 Titel: *Signaling-Pathways Regulating the Dynamic Localization of Z-disk-Associated Proteins.*
- 05/2012 Poster im Rahmen der Konferenz „Cardiac Regeneration and Vascular Biology“ in Venedig
 Titel: *Function of BAG3 in skeletal and cardiac Muscles.*
- 10/2011 Poster im Rahmen der jährlichen Tagung der Graduiertenschule THEME in Bad Honnef
 Titel: *Function of BAG3 in skeletal and cardiac Muscles.*

10.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen mich bei all denjenigen zu bedanken, die zur Entstehung und zum erfolgreichen Gelingen dieser Dissertationsschrift beigetragen haben. Der größte Dank gebührt dabei Herrn Prof. B K. Fleischmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit dieses spannende Promotionsthema zu bearbeiten und die anregenden Diskussionen diesbezüglich.

Herrn Prof. Dr. D. O. Fürst danke ich sehr herzlich für die freundliche Übernahme der Zweitbetreuung dieser Promotionsarbeit und die konstruktiven Anregungen zu BAG3.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Höhfeld bedanke ich mich ebenfalls herzlich für die Anregungen im Rahmen dieser Promotionsarbeit und dafür, zusammen mit Herrn Prof. Dr. K. Mohr der Promotions-kommission beizuwohnen. Vielen Dank dafür.

Ebenso ein herzliches Dankeschön an Herr Dr. M. Hesse für seine Diskussionsbereitschaft bezüglich des BAG3-Projekts.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Physiologie I sowie ehemaligen Kollegen für die Bereitstellung der Materialien und die experimentellen Anregungen. Mein ganz besonderer Dank geht außerdem an Frau Dr. Sarah Rieck und an Frau Dr. Sarah Vosen für die Versorgung mit Süßigkeiten, an Herr Tianyuan Hu als allerbesten Kollegen und Nachbarn und an Herr Dr. Kenichi Kimura, Herr Hendrik Lapp, Frau Esther Carls und Herr Florian Winkler für deren konstante fröhliche Stimmung und positive Lebenseinstellung.

Auch meinem Freund Kristoffer bin ich zu großem Dank verpflichtet. Vielen Dank für deine Geduld und deine Unterstützung, obwohl du selber so beschäftigt warst mit deiner eigenen Dissertation, und für die schönen Reisen in die ganze weite Welt als Ablenkung zum Laboralltag.

Meinen lieben Eltern und meinem Bruder Mark für deren bedingungslose Unterstützung, den unerschütterlichen Glauben an mich und die schönen Bonn-Besuche. *Bedankt!!*

Meinen Freunden und Nachbarn, ob in Krefeld, Bonn oder Aachen, vielen lieben Dank für die Unterstützung und die fröhlichen Abende in geselliger Runde.

Hartelijk Dank allemaal!