

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller-

**Identifizierung und Charakterisierung von CREM-  
Spleißvarianten im murinen und humanen Herzen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Daniel Sebastian Kranick

aus Solingen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

2. Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. sc. hum. Monika Stoll

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller  
Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. sc. hum. Monika Stoll

## **ZUSAMMENFASSUNG**

### **Identifizierung und Charakterisierung von CREM-Spleißvarianten im murinen und humanen Herzen**

Daniel Sebastian Kranick

In der Progression der Herzinsuffizienz spielen die  $\beta$ -adrenerge Stimulation und die folgende Aktivierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges eine wichtige Rolle. Transkriptionsfaktoren wie CREM (cAMP Responsive Element Modulator) und CREB (cAMP Response Element Binding Protein) regulieren die Transkription ihrer Zielgene in Abhängigkeit von der Steigerung des cAMP-Levels. Das CREM-Gen besitzt 14 Exons und kann durch sechs intronische Promotoren eine Vielzahl von Isoformen hervorbringen. Allerdings ist bisher wenig über das kardiale Expressionsmuster der CREM-Isoformen bekannt; es wurde daher in dieser Arbeit in humanen und murinen Herzen detailliert charakterisiert. Es konnten im murinen Herzen 17 und im humanen Herzen 12 CREM-Spleißvarianten identifiziert werden, von denen die Transkripte B- $\gamma$ -H-Ib, B-F-H-Ia,  $\Theta$ 2-C-E-F-H-Ia,  $\gamma$ -H-Ia und H-Ia bisher nicht beschrieben wurden. Eine repressorische Funktion der Spleißvarianten auf die Transkription liegt nahe, da in keinem nachgewiesenen Transkript eine vollständige Transaktivierungsdomäne vorhanden ist. Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation konnte eine charakteristische Kinetik mit einem Anstieg der Expression nach 10 Stunden, gefolgt von einem starken Abfall sämtlicher untersuchter Spleißvarianten im murinen Herzen beobachtet werden. Ein Vergleich der Expression von CREM-Spleißvarianten in Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mit nicht insuffizienten Spenderherzen zeigte eine signifikante Induktion der Spleißvariante B-H-Ib. Die erhobenen Daten belegen, dass multiple CREM-Isoformen zur transkriptionellen Regulation der  $\beta$ -adrenergen Stimulation am Herzen beitragen. Somit kann CREM vor allem durch die inhibitorische Modulation der Genexpression an der Progression der Herzinsuffizienz beteiligt sein.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2016

## **ERKLÄRUNG**

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Identifizierung und Charakterisierung von CREM-Spleißvarianten im murinen und humanen Herzen“

in der/im (Klinik, Institut, Krankenhaus):

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

unter der Anleitung von:

Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Name: Daniel Sebastian Kranick  
(in Druckbuchstaben)

Unterschrift

# INHALTSVERZEICHNIS

---

1	Einleitung.....	7
1.1	Herzinsuffizienz .....	7
1.2	Kardiales Remodelling und veränderte Genexpression bei Herzinsuffizienz.....	10
1.3	Transkriptionelle Regulation durch cAMP.....	11
1.3.1	Der cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg.....	11
1.3.2	Die Familie der cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren .....	12
1.3.3	CREM: cAMP responsive element modulator.....	13
2	Zentrale Fragestellungen .....	22
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Vorgehensweise .....	23
3.2	Ausgangsmaterial .....	25
3.3	Identifikation der CREM-Spleißvarianten .....	25
3.3.1	Reverse-Transkriptase PCR.....	25
3.3.2	Polymerasekettenreaktion.....	27
3.3.3	5'-Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR .....	31
3.3.4	Agarosegelelektrophorese .....	37
3.3.5	Aufreinigung der cDNA aus Agarosegelen .....	39
3.3.6	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> nach der Rubidiumchlorid-Methode.....	39
3.3.7	Klonierung der cDNA in einen prokaryotischen Expressionsvektor.....	41
3.3.8	Transformation der Plasmide in <i>Escherichia coli</i> .....	42
3.3.9	Bakterienkultur zur Vermehrung der Plasmide.....	42
3.3.10	Plasmidextraktion durch alkalische Lyse.....	43
3.3.11	Restriktionsverdau zur Validerung der Inserts.....	45
3.3.12	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und Verdünnung.....	46
3.3.13	Sequenzierung der Spleißvarianten .....	46
3.4	Klonierung von CREM-Spleißvarianten in eukaryotische Expressionsvektoren .....	47
3.4.1	PCR Site-directed Mutagenesis der CREM-cDNA .....	47
3.4.2	Linearisierung des eukaryotischen Expressionsvektors .....	48

3.4.3	Aufreinigung der PCR Site-directed Mutagenesis und des linearisierten Vektors mit DNA Clean & Concentrator™-5	49
3.4.4	Restriktionsverdau und Aufreinigung der mutierten CREM-cDNA	49
3.4.5	Abschätzen von DNA-Konzentrationen auf Agarosegelen	50
3.4.6	Klonierung der CREM-Spleißvarianten in den eukaryotischen Expressionsvektor	50
3.4.7	Vermehrung der Vektoren in <i>Escherichia coli</i> mit anschließender Plasmidextraktion	50
3.4.8	Restriktionsverdau und Sequenzierung der Vektoren zur Verifikation des Inserts	51
3.5	Nachweis der CREM-Expression durch SDS-PAGE und Western Blot	51
3.5.1	Kultur und Transfektion von HEK293-Zellen	51
3.5.2	Aufbereitung der Zellen durch Sonifizieren	53
3.5.3	Proteinbestimmung nach Bradford	54
3.5.4	SDS-PAGE und Western-Blot	55
3.5.5	Darstellung der Proteine mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System	57
3.6	Funktionelle Charakterisierung von CREM-Spleißvarianten im Luciferase-Assay	58
3.6.1	Kultur und Transfektion von HEK293-Zellen	58
3.6.2	Stimulation der transfizierten HEK293-Zellen mit Forskolin	58
3.6.3	Luciferase-Reportergen-Analyse mit Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader	59
3.7	Quantitative Analyse von CREM-Spleißvarianten durch quantitative-Real-Time-PCR	60
3.7.1	qPCR mit Hydrolyse-Sonden und dem LightCycler® 480II	60
3.7.2	Quantifizierung der Daten	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Identifikation von CREM-Spleißvarianten	65
4.1.1	Identifizierte CREM-Spleißvarianten im Herzen der Maus	65
4.1.2	Identifizierte CREM-Spleißvarianten im Herzen des Menschen	73
4.1.3	Translation der CREM-Isoformen	81
4.2	Quantifizierung der CREM-Spleißvarianten	85
4.2.1	Isoformen im Herzen der Maus im physiologischen Zustand und unter Isoprenalinstimulation	85
4.2.2	Isoformen in nicht-insuffizienten, humanen Herzen und insuffizienten Herzen von DCM-Patienten	90
4.3	Luziferase-Reportergen-Analyse von CREM-Isoformen	91

5	Diskussion .....	93
5.1	Beschreibung der Spleißvarianten .....	96
5.1.1	Spleißvarianten, die ausgehend von P1/P5 transkribiert werden 96	
5.1.2	Spleißvariante, die ausgehend von P4 transkribiert wird .....	100
5.1.3	ICER-Spleißvarianten .....	100
5.1.4	smICER-Spleißvarianten .....	102
5.2	Ausblick.....	102
6	Zusammenfassung.....	105
7	Literaturverzeichnis .....	106
8	Abbildungsverzeichnis .....	116
9	Tabellenverzeichnis.....	118
10	Danksagung.....	119
11	Lebenslauf.....	120

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

5'-RACE-PCR	5'-Rapid-amplification-of-cDNA-ends-PCR
AANAT	Serotonin-N-Acetyltransferase
Abk.	Abkürzung
AC	Adenylylcyclase
ACC/AHA	American College of Cardiology Foundation/ American Heart Association
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACT	Transcriptional Activator of CREM in the Testis
ADB	Agarose Dissolving Buffer
ADH	Vasopressin
AP-1	Activator Protein-1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Aqua (bi)dest.	(zweifach) destilliertes Wasser
AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten
ATF-1	Activating Transcription Factor-1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BR	Basische Region
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP	Basic-Leucin-Zipper
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumdichlorid
CaMK	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARE	cAMP Autoregulatory Responsive Element
CBP	CREB-Binding-Protein
CD86	Cluster of Differentiation 86
cDNA	complementary DNA
C <sub>p</sub>	Crossing Point
CRE	cAMP Responsive Element
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CREM	cAMP Response Element Modulator
DAG	Diacylglycerol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dC	Desoxycytidin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dG	Desoxyguanidin
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
Dir.	Ausrichtung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

EDTA.....	<i>Ethlendiamintetraacetat</i>
FKS.....	<i>Fetales Kälberserum</i>
For.....	<i>Sense</i>
FSH .....	<i>Follikel-Stimulierendes-Hormon</i>
GFP.....	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPCR .....	<i>G-Protein-gekoppelter Rezeptor</i>
GRK .....	<i>G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase</i>
GSP .....	<i>Genspezifischer Primer</i>
HCl .....	<i>Hydrogenchlorid</i>
HDAC.....	<i>Histon-Deacetylase</i>
HEK293-Zellen .....	<i>Human-Embryonic-Kidney-293-Zellen</i>
HF .....	<i>Herzfrequenz</i>
hnRNA.....	<i>heteronukleäre RNA</i>
HPRT1 .....	<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1</i>
Hs .....	<i>Homo sapiens</i>
HZV .....	<i>Herzzeitvolumen</i>
ICER .....	<i>Inducible cAMP Early Repressor</i>
IP <sub>3</sub> .....	<i>Inositoltriphosphat</i>
JNK.....	<i>c-Jun-N-terminal-Kinase</i>
KAc.....	<i>Kaliumacetat</i>
kb.....	<i>Kilobase(n)</i>
kDa.....	<i>Kilodalton</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	<i>Kaliumbiphosphat</i>
KID.....	<i>Kinase Inducible Domain</i>
KOH.....	<i>Kaliumhydroxid</i>
LB-Medium .....	<i>Lysogeny-Broth-Nährmedium</i>
LNA.....	<i>Locked Nucleic Acids</i>
LVP <sub>max</sub> .....	<i>Maximaler linksventrikulärer Druck</i>
MAP .....	<i>Mittlerer arterieller Druck</i>
MAPK .....	<i>Mitogen-Activated-Protein-Kinase</i>
MCS .....	<i>Multiple Cloning Site</i>
MgCl <sub>2</sub> .....	<i>Magnesiumdichlorid</i>
Mm.....	<i>Mus musculus</i>
MnCl <sub>2</sub> .....	<i>Mangandichlorid</i>
MOPS .....	<i>4-Morpholinopropansulfonsäure</i>
mRNA .....	<i>messenger RNA</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	<i>Dinatriumhydrogenphosphat</i>
NaI .....	<i>Natriumiodid</i>
NaOH.....	<i>Natriumhydroxyd</i>
NF .....	<i>Non-Failing</i>
NFAT.....	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NYHA .....	<i>New York Heart Association</i>
OD.....	<i>Optische Dichte</i>
P1-6.....	<i>Promotor 1-6</i>
P-Box.....	<i>Phosphorylation-Box</i>
PBS.....	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCR .....	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PDE3A.....	<i>Phosphodiesterase 3A</i>
pH .....	<i>potentia Hydrogenii</i>
PH .....	<i>Partielle Hepatektomie</i>

PKA.....	<i>Proteinkinase A</i>
PLB.....	<i>Phospholamban</i>
PLC.....	<i>Phospholipase C</i>
PP2A.....	<i>Protein-Phosphatase 2A</i>
qPCR.....	<i>Quantitative Real-Time-PCR</i>
RAAS.....	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>
RbCl.....	<i>Rubidiumchlorid</i>
Rev.....	<i>Antisense</i>
RNA.....	<i>Ribonukleinsäure</i>
RNase.....	<i>Ribonuklease</i>
rpm.....	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
RT-PCR.....	<i>Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion</i>
Ryr2.....	<i>Ryanodin-Rezeptor 2</i>
RyR2.....	<i>Ryanodin-Rezeptor 2</i>
SCN.....	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
S-CREM.....	<i>Small-CREM</i>
SDS.....	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE.....	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
SERCA2.....	<i>Sarcoplasmic/ endoplasmic-calciumATPase 2</i>
SiO <sub>2</sub> .....	<i>Siliciumdioxid</i>
SLE.....	<i>Systemischer Lupus erythematoses</i>
smICER.....	<i>small ICER</i>
SOC-Medium.....	<i>Super-Optimal-broth-with-Catabolite-repression-Nährmedium</i>
SP-1.....	<i>Specifity Protein-1</i>
ss-DNA.....	<i>Einzelstrang-DNA</i>
SV.....	<i>Schlagvolumen</i>
Ta.....	<i>Annealingtemperatur (°C)</i>
TAE-Puffer.....	<i>Tris-Acetat-EDTA-Puffer</i>
TAF110.....	<i>TATA-binding protein Associated Factor 110</i>
TdT.....	<i>Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase</i>
TE-Puffer.....	<i>Tris-EDTA-Puffer</i>
TFB.....	<i>Transformation Buffer</i>
Tm.....	<i>Schmelztemperatur (°C)</i>
Tris.....	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
Tween 20.....	<i>Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat</i>
UPL.....	<i>Universal ProbeLibrary</i>
UV-Licht.....	<i>Ultraviolettes Licht</i>
$\Delta P / \Delta t_{\max}$ .....	<i>Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit</i>
$\Delta P / \Delta t_{\min}$ .....	<i>Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit</i>
$\beta$ -Blocker.....	<i><math>\beta</math>-Adrenozeptor-Antagonisten</i>

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 HERZINSUFFIZIENZ

„Bei der Herzinsuffizienz ist das Herz nicht mehr in der Lage, den Organismus mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel unter Ruhe- wie unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten.“ (16,49)

Diese pathophysiologische Definition der Herzinsuffizienz wird durch die Kardinalsymptome Dyspnoe, Leistungsminderung und kardial bedingte Ödeme komplementiert. Die Symptome der Herzinsuffizienz sind vor allem durch mangelndes Herzzeitvolumen (HZV) und ungenügenden venösen Rückstrom (erhöhte Vorlast) gekennzeichnet (56).

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz steigt mit fortschreitendem Lebensalter (13,47), ihr Inzidenzgipfel findet sich in der siebten bis achten Lebensdekade (16). Hierbei kann eine Vielzahl struktureller und funktioneller Störungen ursächlich für eine Herzinsuffizienz sein. Die NHANES-I-Studie beschreibt die Koronare Herzkrankheit, das Zigarettenrauchen und die Arterielle Hypertonie als wichtigste Ätiologien (44). Unter anderem werden auch nicht-ischämische Kardiomyopathien (z.B. Dilatative Kardiomyopathie) als Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz angeführt (16).

Die Einteilung der Herzinsuffizienz nach ihrem Schweregrad erfolgt durch die Klassifikationssysteme der New York Heart Association (NYHA) und der American College of Cardiology Foundation/American Heart Association (ACC/AHA) (16).

Zu den pathophysiologischen Charakteristika der Herzinsuffizienz gehört es, dass kein ausreichender mittlerer arterieller Druck (MAP) aufgebaut werden kann. Dieser ist jedoch notwendig, um die erforderliche Gewebepfusion sicherzustellen. Über den Frank-Starling-Mechanismus und neurohormonelle Veränderungen wird ein absinkender MAP kompensatorisch erhöht. Das insuffiziente Herz mit systolischer Dysfunktion und erhöhter Vorlast antwortet so aufgrund des Frank-Starling-Mechanismus mit einem erhöhten

Schlagvolumen (SV). Die Reaktion ist im Vergleich zum gesunden Herzen allerdings wesentlich abgeschwächt (56).

Zunächst seien die Grundlagen der neurohumoralen Aktivierung und des kardialen Remodellings bei chronischer Herzinsuffizienz erläutert.

Bei niedrigem MAP werden durch eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet (56). Adrenalin wirkt u.a. als Agonist an  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren, dies gilt auch für Noradrenalin wobei hier die Affinität zu  $\beta_1$ -Adrenozeptoren wesentlich größer ist, als die für  $\beta_2$ -Adrenozeptoren. Das Arbeitsmyokard des Herzens hat  $\alpha_1$ -,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren. Die Aktivierung der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren wirkt sich positiv chronotrop, positiv inotrop, positiv dromotrop und positiv lusitrop auf das Herz aus.  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren vermitteln am Herzen eine positiv inotrope Wirkung. Im Gesamtkreislauf wirkt Noradrenalin hauptsächlich über  $\alpha$ -Adrenozeptoren vasokonstriktorisch (5). Die Aktivierung von  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Adrenozeptoren in den peripheren Gefäßen führt zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (56). Ein abnehmendes zirkulierendes Blutvolumen führt über Barorezeptoren zur Ausschüttung von Vasopressin (ADH) aus der Neurohypophyse (5). Zusammenfassend wird durch die sinkende Herzleistung ein Circulus vitiosus (siehe Abbildung 1) eingeleitet. Durch die sinkende Durchblutung wird eine neurohumorale Antwort induziert, die Herzkraft, Puls und Blutdruck erhöhen kann, aber auch schädliche Effekte hervorruft. So wird durch Gefäßverengung die Nachlast erhöht und durch die sinkende Herzleistung kommt es zur steigenden Vorlast. Langfristig kommt es zu einem schädlichen Umbau der Herzstruktur, dem kardialen Remodelling. Diese Folgen der neurohumoralen Aktivierung bewirken auf Dauer eine weitere Verschlechterung der Herzleistung.

Die Therapie der Herzinsuffizienz beruht auf mehreren Strategien, so gilt es zunächst Risikofaktoren wie z.B. arterielle Hypertonie und Arteriosklerose zu therapieren. Ist eine bestimmte Krankheit als ursächlich für die Herzinsuffizienz anzusehen, soll diese kausal therapiert werden (16).



## **1.2 KARDIALES REMODELLING UND VERÄNDERTE GENEXPRESSION BEI HERZINSUFFIZIENZ**

Das kardiale Remodelling bei Herzinsuffizienz stellt eine durch neurohormonelle und chronische, hämodynamische Umstellungen hervorgerufene, komplexe und ultrastrukturelle Veränderung der physiologischen Herzstruktur dar (30).

Katecholamine sowie Angiotensin II und Endothelin I aktivieren G-Proteingekoppelte Rezeptoren.  $G_q$ -Proteine aktivieren die Phospholipase C (PLC), sodass Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) gebildet werden. Der gestiegene  $IP_3$ -Spiegel induziert durch die Aktivierung des  $IP_3$ -Rezeptors eine intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (71). Dies führt u. a. über den Calcium/Calmodulin-CaMK-HDAC-Signalweg und den Calcium/Calmodulin-Calcineurin-NFAT-Signalweg zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten (9,71). Als Mediatoren der pathologischen kardialen Hypertrophie dienen auch p38, die c-Jun-N-terminal-Kinase (JNK) und Teile der MAPK-Signalkaskade (71). Katecholamine aktivieren ebenfalls durch Stimulation von  $G_s$ -Proteinen den cAMP-abhängigen Signalweg, über den die Adenylylcyclase (AC) und somit die Proteinkinase A (PKA) aktiviert werden (5,71). Die anschließende Phosphorylierung von Ziel-Proteinen wie dem L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal, dem Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2), Phospholamban, dem Myosin Binding Protein c und dem Protein Phosphatase Inhibitor-1 führt zu einer gesteigerten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung und -Wiederaufnahme und wirkt dadurch positiv inotrop und lusitrop. Die Hyperphosphorylierung des RyR2 durch anhaltende  $\beta$ -adrenerge Stimulation führt zu  $Ca^{2+}$ -Leckströmen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, welche die Kontraktilität beeinträchtigen und zu kardialen Arrhythmien führen können (72). Über den Adenylylcyclase-Signalweg kommt es längerfristig zu Kardiomyozytenapoptose und -nekrose (71). Die Reexpression pro-apoptotischer embryonaler Gene führt zu einer Abnahme der kardialen Kontraktilität. Zusätzlich versteift das Gewebe durch eine Fibroblastenhyperplasie und gesteigerte Kollagensynthese (30).

## 1.3 TRANSKRIPTIONELLE REGULATION DURCH cAMP

### 1.3.1 Der cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg

Die freigesetzten Katecholamine binden, wie in Abbildung 2 dargestellt, an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), und stimulieren das Herz  $\beta$ -adrenerg. Diese GPCRs sind jeweils mit einem heterotrimeren  $G_s$ -Protein verbunden, dessen  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit dissoziiert und die membrangebundenen AC aktiviert. Daraufhin synthetisiert die AC zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). Die Erhöhung des cAMP-Spiegels führt zur Aktivierung der PKA. Die PKA ist ein tetrameres Holoenzym mit zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten (22). Das cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten, woraufhin die katalytischen Untereinheiten vom Zytosol in den Nucleus migrieren (87). Im Zellkern vermittelt die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie von CREB und CREM oder auch ATF-1 (Activating Transcription Factor-1), die Modulation der cAMP-abhängigen Genexpression (25).

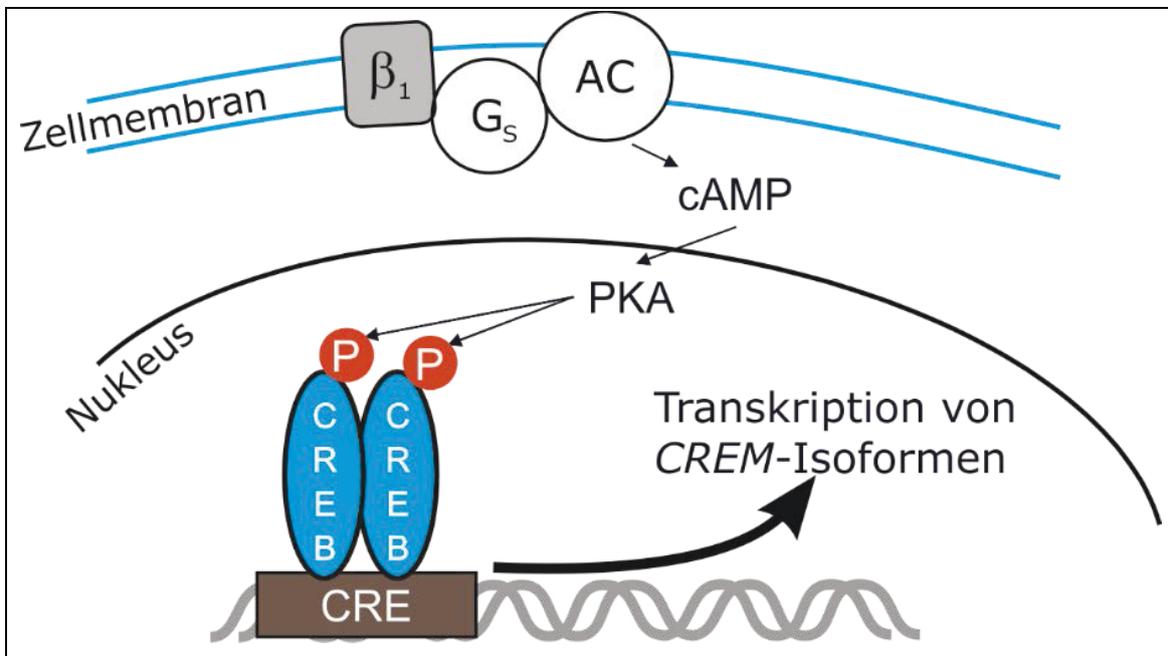


Abbildung 2: **Darstellung des Adenylcyclase-Signalwegs mit Modulation der CREM-Expression durch CREB;** Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation aktiviert die  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit des  $G_s$ -Proteins ( $G_s$ ) die Adenylcyclase (AC). Diese synthetisiert daraufhin cAMP, das die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) bindet und deren katalytische

*Untereinheit zur Migration in den Nukleus anregt. Dort phosphoryliert die katalytische Untereinheit cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren, die anschließend die CRE-abhängige Transkription modulieren können. Ein wichtiger Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung ist die hier dargestellte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise CREB.*

### **1.3.2 Die Familie der cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren**

Die Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP Response Element Binding Protein), CREM (cAMP Responsive Element Modulator) und ATF-1 bilden aufgrund ihrer konservierten, homologen Struktur (wie aus Abbildung 3 ersichtlich wird) eine eigene Unterklasse von Transkriptionsfaktoren. Sie besitzen eine Basic-Leucin-Zipper (bZIP)-Domäne, mit deren basischen Residuen sie an die DNA binden und über deren Leucin-Zipper-Region die Homo- und Heterodimerisierung der Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Ein weiterer Bestandteil dieser Proteine ist die Kinase-Inducible Domain (KID), die auch als Phosphorylation-Box (P-Box) bezeichnet wird. Die glutaminreichen Regionen vor und nach der KID, vermitteln eine Transaktivierung. Die PKA phosphoryliert CREB an der KID und bewirkt damit die Transaktivierung der Transkriptionsfaktoren (22). CREB, CREM und ATF-1 binden cAMP Responsive Elements (CREs) in den Promotoren ihrer Zielgene. Die acht Basenpaare (bp) umfassende, palindromische DNA-Konsensussequenz der CREs (TGACGTCA) befindet sich oft innerhalb eines Abstandes von 100 bp zur TATA-Box (79).

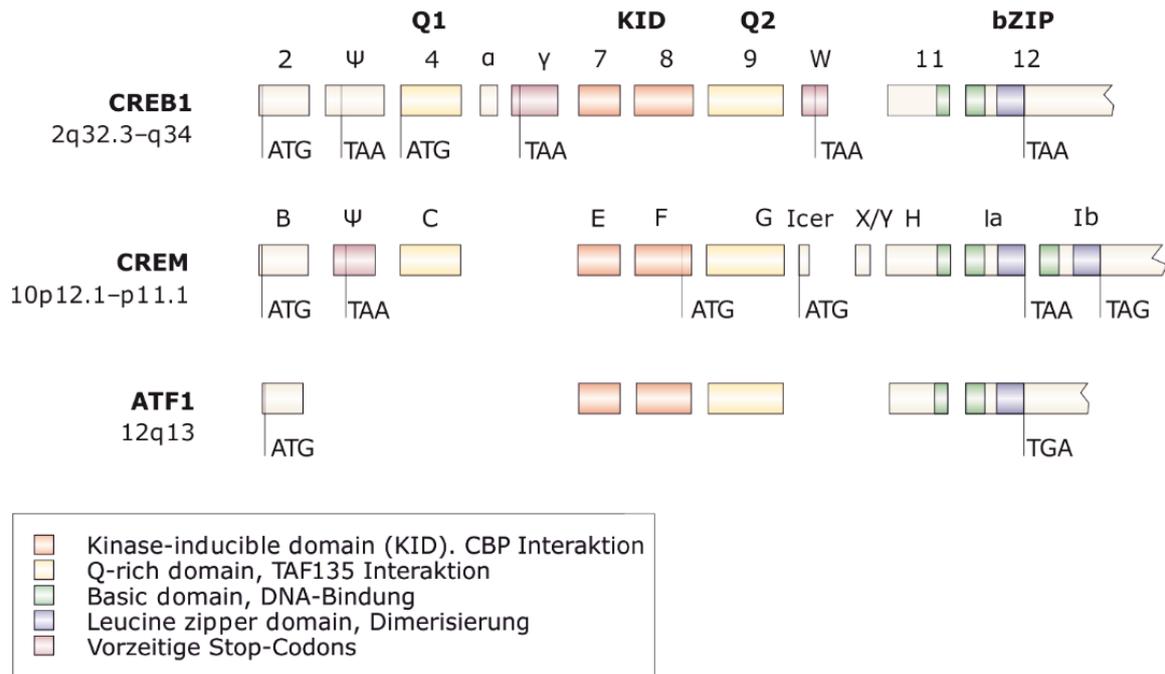


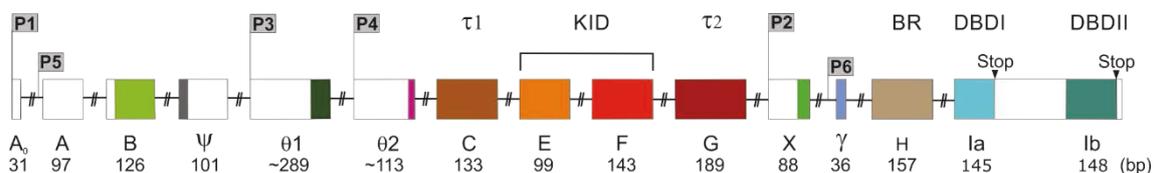
Abbildung 3: **Gegenüberstellung der genomischen Organisation der cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB, CREM und ATF-1;** Abbildung nach Mayr & Montminy, 2001 (75); Die Lokalisation innerhalb des humanen Genoms ist unterhalb des Gennamens beschrieben. Die codierenden Abschnitte der Exons sind durch korrespondierende, farbige Kästen dargestellt. Ihre Zuordnung zu den entsprechenden funktionellen Domänen kann aus der Legende entnommen werden. Zusätzlich sind Stopp- und Startcodons durch senkrechte Striche gekennzeichnet.

### 1.3.3 CREM: cAMP responsive element modulator

#### 1.3.3.1 Aufbau des CREM-Gens

Das humane CREM-Gen besteht aus 14 Exons und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 (10p12.1-p11.1, Abbildung 4) (1,42,112). Exons E und F kodieren für die KID in der v. a. Serin<sup>117</sup>, aber auch zusätzliche Serin- und Threoninresiduen, durch die PKA und andere Kinasen phosphoryliert werden können (24,28,40). Dadurch kann die KID über das CREB-Binding-Protein (CBP) mit der RNA-Polymerase II interagieren (42,79). Notwendig für die Transaktivierung sind auch die glutaminreichen Domänen  $\tau$ 1 und  $\tau$ 2, die von Exons C und G kodiert werden. Sie tragen zur Transaktivierung bei, indem sie mit Bestandteilen des basalen Transkriptionsapparates der RNA-Polymerase wie z. B. TAF110 interagieren (8,40,50). Die Domäne  $\tau$ 2 wirkt stärker transaktivierend, als  $\tau$ 1 (63). Die basische Region (BR) der bZIP-

Domäne wird von Exons H (5'-Anteil) und I (3'-Anteil) kodiert, wobei Exons Ia und Ib für die alternativen DNA-Bindungsdomänen (DBD I und DBD II) kodieren (38,40,112). Die DBD I bindet mit geringerer Affinität an CREs als die DBD II. CREM-Isoformen können über ihre bZIP-Domäne untereinander homo- und heterodimerisieren und mit CREB heterodimere Komplexe bilden (63). Exon X (Exon ICER) ist in den inhibitorischen Inducible-cAMP-Early-Repressor (ICER)-Isoformen vorhanden und Exon  $\Psi$  wurde zunächst in complementary DNA (cDNA) humaner endometrialer Stromazellen entdeckt. Exon  $\Psi$  führt, von P1 transkribiert, ein frühes In-Frame-Stoppcodon ein (41,77). Die Transkription von CREM-mRNA wird durch sechs unterschiedliche Promotoren reguliert, von denen der ICER-Promotor (P2) und der smICER-Promotor (P6) cAMP-abhängig induziert werden können (23,42,77,98). P2 enthält vier CREs (auch benannt als CAREs für cAMP-Autoregulatory-Responsive-Elements) die jeweils im Tandem als zwei eng benachbarte Paare organisiert sind (40,77). Im P6-Promotor ist ein Tandem aus zwei CREs vorhanden, welches eine cAMP- und CRE-abhängige Transkription ermöglicht (98). P1 wurde als GC-reich und konstitutiv-aktiv beschrieben, P5 befindet sich vor Exon A und wurde zuerst in humanen T-Zellen beschrieben (40,42,92). Die Isoformen, welche die Exons  $\theta$ 1 und  $\theta$ 2 enthalten, werden vom P3- und P4-Promoter ausgehend transkribiert (23,42). Der Aufbau des murinen CREM-Gens ist homolog zum humanen Gen, wobei anstatt Exon  $\Psi$  ein davon abweichendes Exon L beschrieben wurde (67,74).



**Abbildung 4: Das humane CREM-Gen;** *Abbildung modifiziert nach Gellersen et al., 2002 (43); Dargestellt sind, als Kästen, die Exons des Genes, wobei die codierenden Abschnitte farblich gehalten sind. Die Annotationen P1 bis 6 bezeichnen die Lokalisation der Promotoren 1 bis 6. "ATG" definiert die Lage der Startcodons und "Stop" die Lage der Stoppcodons. Ebenfalls angegeben sind, unter den Exons, deren Größe in Basenpaaren und darüber die Domänen, für die die entsprechenden Exons kodieren. Die Horizontale zwischen zwei Exons stellt das Intron dar.*

### **1.3.3.2 CREM-Isoformen**

Das multiexonische *CREM*-Gen kodiert für eine schwer überschaubare Vielfalt von Spleißvarianten und Isoformen. Die Funktion einer Isoform als Aktivator oder Repressor ergibt sich dabei aus der unterschiedlichen Zusammenstellung der funktionellen Domänen. Um dies zu ermöglichen, können unterschiedliche Transkripte durch alternative Promotorwahl generiert werden. Diese bringen durch alternatives Spleißen verschiedene mRNAs hervor, welche wiederum durch alternative Translationsinitiation in unterschiedliche aktivatorische oder repressorische Proteine umgesetzt werden (27,40,42,63). Verschiedene Polyadenylierungs-Sites führen zu einer Regulation der Haltbarkeit der mRNA, wobei die Anzahl der angehängten Motive umgekehrt-proportional zur Haltbarkeitsdauer der mRNA ist (8,40). Prototypisch für aktivierende Isoformen sei hier *CREM- $\tau$*  (B-C-E-F-G- $\gamma$ -H-Ib) angeführt. Die Anwesenheit der intakten KID in Kombination mit den glutaminreichen Domänen  $\tau$ 1 (Exon C) und  $\tau$ 2 (Exon G) begründet die aktivatorische Funktion. Aus der Spleißvariante *CREM- $\tau$*  entsteht durch eine alternative, interne Kozak-Konsensussequenz in Exon F ebenfalls das repressorische Protein S-*CREM* (F-G- $\gamma$ -H-Ib). Die in diesem Protein trunkeierte KID kann deshalb keine transaktivatorische Funktion vermitteln. *CREM- $\alpha$*  (B-E-F- $\gamma$ -H-Ia), *CREM- $\beta$*  (B-E-F- $\gamma$ -H-Ib) und *CREM- $\gamma$*  (B-E-F-H-Ib) fehlen beide glutaminreiche Domänen und den ICER- und smICER-Isoformen sogar die KID und die glutaminreichen Domänen, was deren Funktion als Repressoren erklärt (27,38,40,77,98).

Tabelle 1: **Auswahl aktivatorischer und repressorischer Isoformen des murinen *Crem*-Gens**; Abbildung nach Foulkes et al., 1996 (40)

	B	L	Θ1	Θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib		
	x				x	x	x	x		x	x		x	CREM-τ	Aktivatoren
	x				x	x	x			x	x		x	CREM-τ1	
	x					x	x	x		x	x		x	CREM-τ2	
	x				x	x	x	x		x	x	x		CREM-τα	
							x	x		x	x		x	S-CREM	Repressoren
	x					x	x			x	x	x		CREM-α	
	x					x	x			x	x		x	CREM-β	
	x					x	x				x		x	CREM-γ	
									x	x	x	x		ICER-I	
									x		x	x		ICER-Iγ	
									x	x	x		x	ICER-II	
									x		x		x	ICER-IIγ	

### 1.3.3.3 Funktionen des Transkriptionsfaktors CREM

Im Folgenden dient der Abschnitt 1.3.3.3 zur Beschreibung der Funktionen des Transkriptionsfaktors CREM im Organismus, wobei die Funktion von CREM im Herzen im Abschnitt 1.3.3.4 gesondert dargestellt wird.

#### Spermatogenese

Männliche CREM-knock-out-Mäuse sind steril. Bei den männlichen Mäusen findet die Spermatogenese nur bis zum Entwicklungsstadium der runden Spermatozyten statt (12,85). Im Verlauf der Spermatogenese erfolgt ein physiologischer Wechsel der *CREM*-Expression von der Expression inhibitorischer Isoformen zur Expression aktivatorischer Isoformen. CREM-τ stellt die vorherrschende Isoform in runden Spermatozyten dar (28,39). Es ist fraglich, ob dieser Wechsel FSH-abhängig induziert wird und ob eine phosphorylierungsunabhängige Transkriptionsaktivierung durch ACT (Transcriptional Activator of CREM in the Testis) stattfindet (6). Eine FSH-Stimulation von primären Sertoli-Zellen führt zu einer bis zu zwölf Stunden anhaltenden Phosphorylierung von CREM-τ. Ebenso kommt es durch FSH-Stimulation zur Induktion von ICER-Isoformen, die wiederum die Expression des FSH-Rezeptor-Gens reprimieren (78). Im Gegensatz zu gesunden Probanden konnten bei infertilen Männern mit einem Reifungsarrest im Stadium der runden Spermatozyten weder durch In-Situ-Hybridisierung *CREM*-

mRNA mit der DBD I, noch immunhistochemisch das CREM- $\tau$ -Protein nachgewiesen werden (103). Bei Männern mit Reifungsarrest der Spermatogenese konnte inakkurates Spleißen sowie die Expression von CREM- $\tau$ 2 mit Exon  $\gamma$  beobachtet werden. In Proben gesunder Probanden war jedoch CREM- $\tau$ 2 ohne Exon  $\gamma$  gefunden worden (6). Die im humanen Hoden reichlich vorhandenen und die Exons  $\Theta$ 1 und  $\Theta$ 2 enthaltenden mRNAs wurden in ihrer Funktion noch nicht genau charakterisiert. Sie codieren über alternative Translationsinitiationscodons für Aktivatoren und Repressoren und weisen, in der Ratte und der Maus ein von den Stadien der Spermatogenese abhängiges Expressionsprofil auf (23,42,53).

### **Circadiane Regulation der Melatoninsynthese**

Die ICER-Isoformen wurden zuerst in der Zirbeldrüse beschrieben. Dort unterliegt ihre Expression einer ausgeprägten circadianen Rhythmik und nimmt Einfluss auf die Melatoninsynthese (104). Die Kinetik der ICER-Expression entspricht der eines Early-Response-Gens (97). Während der Nacht sind die ICER-Expression und die Melatoninsynthese erhöht, nicht aber tagsüber. Im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) wurde ebenfalls eine circadiane Expression von ICER-Isoformen nachgewiesen, wo sie ihr Maximum jedoch tagsüber erreicht. Da in der Nacht noradrenerge, postganglionäre Neurone aus dem Ganglion cervicale superius die Melatoninsynthese anregen, wird ein Zusammenhang mit der CREM-Expression vermutet. Dies wird dadurch gestützt, dass im Promoter des Schlüsselenzyms der Melatoninsynthese, der Serotonin-N-Acetyltransferase (AANAT), ein CRE vorhanden ist, an das ICER bindet (97,104). CREB steigert die Expression der *Aanat*-mRNA auf das über 100-fache. Der Repressor ICER moduliert diese Induktion (58).

### **T-Zell-Physiologie**

Die Expression der inhibitorischen Isoform CREM- $\alpha$  wird in humanen T-Zellen durch die Aktivität der Promotoren P1 und P5 moduliert. In den aktivierten T-Zellen von gesunden Menschen wird CREM- $\alpha$  hauptsächlich ausgehend von P5 transkribiert. Die Transkription wird hierbei durch Dimere der Activator-Protein-1-Familie (AP-1), zu der die Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun gehören, induziert. Bei Patienten, die an systemischem Lupus erythematoses

(SLE) erkrankt sind, wurde eine erhöhte Expression von CREM- $\alpha$  beschrieben. Durch die erhöhte CREM- $\alpha$ -Konzentration wird die Expression von c-Fos inhibiert und somit die Aktivität von P5 reduziert. Da bei SLE-Patienten die Expression der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) erhöht ist, wird das Specificity-Protein-1 (SP-1) vermehrt dephosphoryliert und P1 über eine Konsensus-SP-1-Bindungssequenz induziert (55,92). Interessanterweise besitzt der Promotor der PP2A ein CRE, an das phosphoryliertes CREB bindet (105). Die CREM- $\alpha$ -Expression bei SLE unterdrückt die Expression von Interleukin-2, Interleukin-17 und der  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors (93,102,106). In antigenpräsentierenden Zellen (APCs) von CREM-knock-out-Mäusen wurde eine erhöhte Expression des auf die T-Zell-Proliferation kostimulierend wirkenden CD86 beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass in humanen APCs CREM- $\alpha$  ein Repressor der CD86-Expression ist (4).

### **Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse**

Werden Ratten chirurgischem Stress ausgesetzt, steigt der *ICER*-mRNA-Level in der Nebenniere. Nach Hypophysektomie ist keine *ICER*-Expression in der Nebenniere nachweisbar. Wird diesen Ratten nun Adrenocorticotropin injiziert, kann in der Nebennierenrinde durch In-Situ-Hybridisierung die Expression von *ICER* nachgewiesen werden (26).

### **Hepatozytenproliferation**

Nach partieller Hepatektomie (PH) wurde in der Ratte eine Induktion von *ICER*-mRNA-Isoformen beobachtet (99). Bei CREM-knock-out-Mäusen beobachtete man nach PH eine Abnahme von DNA-Synthese und Mitosen. Der Proliferationspeak ist wesentlich schwächer und erfolgt zehn Stunden später als beim Wildtyp. Eine Modulation der Expression verschiedener Cycline, von der Cyclin-abhängigen Kinase 2, c-Fos und den Enzymen Tyrosin-Aminotransferase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wurde beschrieben. Der Eintritt in die S-Phase der Mitose erfolgt verspätet (100).

### **Weitere Funktionen in Schilddrüse und Pankreas**

In der Schilddrüse ist CREM an der Modulation der Expression des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) beteiligt, was im Zusammenhang mit der verringerten Expression des NIS bei Schilddrüsenkarzinomen Beachtung findet (33,88). Auch der Promotor des Insulingens enthält CREs und wird

durch CREM-Isoformen reguliert (50). In  $\beta$ -Zellen wird ICER durch Hyperglykämie cAMP-abhängig induziert und soll die Insulinexozytose unterdrücken (3).

Wie aus den obigen Erläuterungen hervorgeht, haben die CREM-Isoformen eine wichtige Rolle in verschiedenen Organsystemen der Vertebraten. So sind sie in die physiologischen Abläufe von Fortpflanzung, Zellproliferation, circadianer Rhythmik und hormoneller Steuerung von Stressreaktionen und Stoffwechsel integriert.

#### **1.3.3.4 Funktion des Transkriptionsfaktors CREM im Herzen**

Die kardiale Expression von CREM-Spleißvarianten wurde zuerst 1992 nachgewiesen, eine Southern-Blot-Analyse gab Hinweis auf die repressorischen Spleißvarianten *CREM- $\alpha$* , *CREM- $\beta$*  und *CREM- $\gamma$*  (39). 1998 wurde die mRNA für *CREM-Ib $\Delta$ C-X* (B-H-Ib) aus humanem Herzgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und daraus resultierender Herzinsuffizienz isoliert. *CREM-Ib $\Delta$ C-X* kodiert für die Proteine HIbI (11 kDa) und HIbII (9 kDa) (80). Es ähnelt dem in humanen endometrialen Stromazellen beschriebenen *CREM- $\Delta$ 1,P,2* (B-H-Ia), das für SS-*CREM- $\alpha$*  (HIa) mit einer Molekülmasse von 9 kDa kodiert (41). Bei herzspezifischer Expression von *CREM-Ib $\Delta$ C-X* in der Maus zeigen sich eine Dilatation der Atrien und eine Hypertrophie der Ventrikel. Eine Zunahme der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $\Delta P / \Delta t_{\max}$ ) und der linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit ( $\Delta P / \Delta t_{\min}$ ) unter basalen Bedingungen und Isoprenalinstimulation wird beobachtet. Das Protein-Level der Sarcoplasmic/endoplasmic-calcium-ATPase 2 (SERCA2) und die Aktivität der Protein-Phosphatase-1 sind gesteigert und die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) verringert. Der  $\beta_1$ -Adrenozeptor wird in diesem Modell vermehrt exprimiert. Es kommt zur Abnahme der mRNAs für den Transkriptionsfaktor dHAND und das kleine G-Protein RhoB. *CREM-Ib $\Delta$ C-X*-transgene Mäuse entwickeln Vorhofflimmern und sterben verfrüht (83). Müller et al. charakterisierten die kardiale Funktion von CREM-knock-out-Mäusen. Diese zeigten kardiale Funktionsveränderungen, die denen bei

humaner Herzinsuffizienz ähnlich sind. Es fand sich eine Abnahme des maximalen linksventrikulären Druckes ( $LVP_{max}$ ), der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $\Delta P / \Delta t_{max}$ ) und der linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit ( $\Delta P / \Delta t_{min}$ ). Dies wird mit einer Abnahme des SERCA2-Protein-Level erklärt. Eine Herunterregulation der  $\beta_1$ -Adrenozeptors auf dem Protein-Level führte zu reduzierter inotroper und lusitroper Antwort auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Dobutamin (81,89). Isoda et al. konnten in einem anderen, murinen CREM-knock-out-Modell mit volumenunabhängigen, hämodynamischen Messmethoden keine Abnahme der basalen Kontraktilität und Relaxation nachweisen. Bei Stimulation mit Isoprenalin konnte lediglich eine abgeschwächte Steigerung der Herzfrequenz, aber keine verringerte Kontraktilität festgestellt werden. Auch konnte kein verminderter SERCA2-Protein-Level, dafür aber eine Abnahme von totalem und phosphoryliertem PLB gezeigt werden (52).

Die Rolle von CREM in der Pathophysiologie und Pathobiochemie der Herzinsuffizienz unterstreichen Ergebnisse, wonach die schädlichen Effekte einer  $\beta_1$ -Adrenozeptor-Überexpression in Mäusen durch einen Knock-out des *Crem*-Gens abgemildert werden. So schützt der CREM-Knock-out partiell vor Kardiomyozyten-Hypertrophie, kardialer Fibrose und stellt die beeinträchtigte linksventrikuläre Funktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation wieder her. Eine Hochregulation der Expression des Ryanodin-Rezeptors 2 (Ryr2) auf dem mRNA und Protein-Level, sowie der Protein-Level des Tropomyosins  $1\alpha$  und des kardialen  $\alpha$ -Actins wird beobachtet und als ursächlich diskutiert (65).

Über eine Feedback-Schleife regulieren ICER und die Phosphodiesterase 3A (PDE3A) die Apoptose von Kardiomyozyten und das SERCA2-Protein-Level. Kommt es bei Herzinsuffizienz zur Reduktion der PDE3A, steigt die Kardiomyozytenapoptose an und eine Reduktion des SERCA2-Protein-Gehaltes wird beobachtet (113).

Kürzlich konnte eine weitere Gruppe von kleinen CREM-Isoformen, die small ICER (smICER) genannt wurde, identifiziert werden. Ihre Transkription geht bei Maus und Mensch vom neu charakterisierten, cAMP-abhängig induzierbaren P6-Promotor aus. Es wurden auf dem mRNA-Level die zwei Spleißvarianten *smICER*  $\gamma$ *Hib* und *Hib* beschrieben. Sie kodieren durch

alternative Translationsinitiationscodons für drei (smICER  $\gamma$ Hib) beziehungsweise zwei (smICER Hib) Proteine, nämlich  $\gamma$ Hib, HibI und HibII. Die Proteine HibI und HibII entsprechen dabei den von Müller et al. beschriebenen, von *CREM-Ib $\Delta$ C-X* ausgehend translatierten Isoformen (80). Im murinen Organismus wird smICER ubiquitär exprimiert, auch in Herz und Lunge. Die smICER-Proteine werden ebenfalls mit erhöhter Apoptosesensitivität in Verbindung gebracht, weshalb die Rolle der ICER-Isoformen u. a. in der Induktion der Kardiomyozytenapoptose neu überdacht werden sollte (98).

## 2 ZENTRALE FRAGESTELLUNGEN

---

Auf Grundlage der beschriebenen Rolle  $\beta$ -adrenerger Stimulation und assoziierter Aktivierung der cAMP Signalkaskade bei der Progression der Herzinsuffizienz, kommt es zur Phosphorylierung und vermehrten Expression von Spleißvarianten aus der Familie der cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren. Im Fokus dieser Arbeit stand daher die Identifikation und Charakterisierung des kardialen Expressionsmusters des *CREM*-Gens. Weil eine solche Untersuchung bisher für keinen Organismus durchgeführt wurde, sollte zunächst untersucht werden, welche *CREM*-Spleißvarianten im murinen und humanen Herzen unter physiologischen Bedingungen exprimiert werden. Da unter Stress beziehungsweise  $\beta$ -adrenerger Stimulation die intrazelluläre cAMP-Konzentration ansteigt, ist es von Interesse, ob es unter diesen Bedingungen zur Veränderung der Gentranskription von *CREM*-Spleißvarianten kommt und ob sich Aussagen über eine eventuell typische Expressionskinetik formulieren lassen. Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse sollte anschließend analysiert werden, welche repressorischen oder aktivatorischen *CREM*-Isoformen aus den mRNA-Spleißvarianten synthetisiert werden könnten.

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

---

### **3.1 VORGEHENSWEISE**

#### **Identifikation der CREM-Spleißvarianten**

Zunächst wurde die RNA mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA diente in der folgenden Polymerasekettenreaktion (PCR) mit CREM-spezifischen Primern als Template. Die CREM-Spleißvarianten wurden dann durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die einzelnen DNA-Banden daraufhin ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde die aufgereinigte cDNA in einen prokaryotischen Expressionsvektor kloniert, um nach Transformation in der Bakterienkultur amplifiziert zu werden. Die gewonnenen Plasmide wurden zur Validierung der Inserts mit Restriktionsenzymen verdaut und sequenziert. Die Identifikation der messenger RNA(mRNA)-Isoformen erfolgte durch Sequenzvergleich mit dem Programm Geneious (Biomatters, Auckland, NZ).

#### **Quantitative Analyse von CREM-Spleißvarianten**

Durch quantitative Real-Time-PCR (qPCR) mit Hydrolyse-Sonden (TaqMan-Sonden) wurde die Expression der unterschiedlichen CREM-Spleißvarianten in den Herzen von FVB/N-Mäusen unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit Isoprenalin untersucht.

#### **Luciferase-Reportergen-Analyse und Western-Blot-Analyse von CREM-Spleißvarianten**

Für bestimmte Spleißvarianten erfolgte eine zielgerichtete Mutagenese (PCR Site-directed Mutagenesis), um sie anschließend in einen eukaryotischen Expressionsvektor klonieren zu können. Zur Durchführung einer Luciferase-Reportergen-Analyse wurden nun HEK293-Zellen mit den Vektoren und einem Luciferase-Reportergenkonstrukt transfiziert und nach Expression der Isoformen mit Forskolin stimuliert. Die lysierten Luciferase-Assay-Ansätze

wurden mit einem Microplate Reader ausgelesen. Zusätzlich fand ein Nachweis der Protein-Expression der transfizierten CREM-Isoformen mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), Western Blotting und anschließender Detektion mittels antikörpervermittelter Chemolumineszenz statt.

Das methodische Vorgehen kann in der Übersicht aus der folgenden Abbildung entnommen werden. Die Abschnittsnummern sind mit aufgeführt, um eine schnellere Orientierung im Kapitel zu ermöglichen.

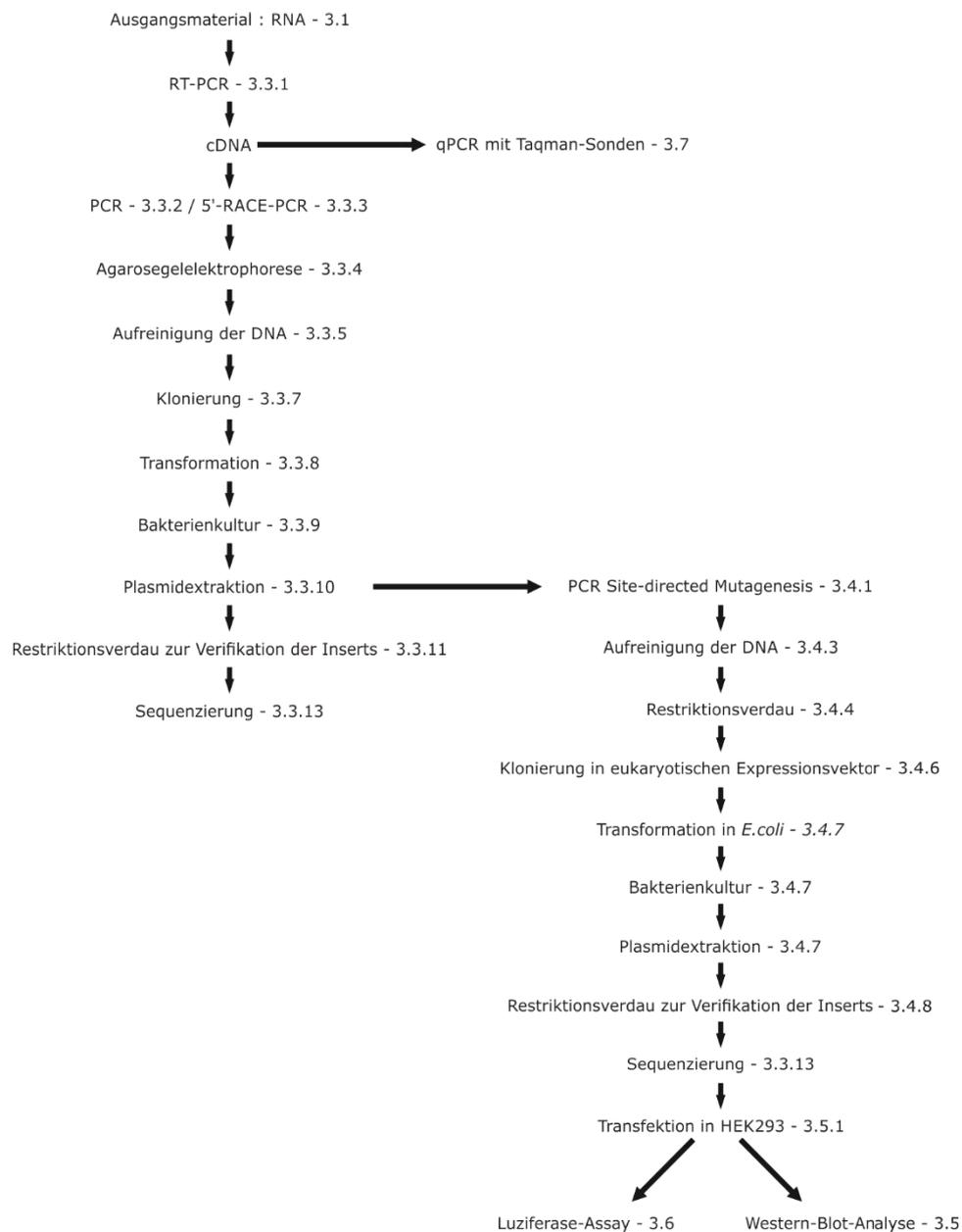


Abbildung 5: **Arbeitsflussdiagramm der angewandten Methodik**; dem Arbeitsschritt ist die entsprechende Abschnittsnummer zugeordnet.

## **3.2 AUSGANGSMATERIAL**

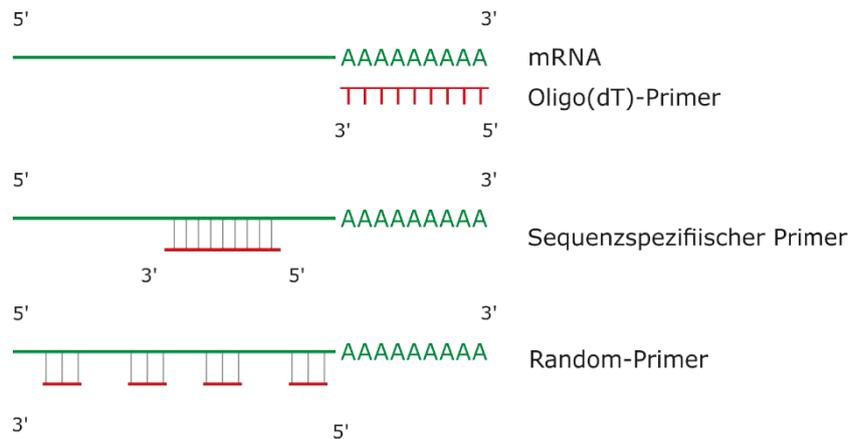
Bei dem Ausgangsmaterial handelte es sich um Gesamt-RNA aus Herzventrikeln sowie um Gesamt-RNA aus Kardiomyozyten. Die Ventrikel-RNA wurde aus den Herzen von Mäusen der Inzuchtlinien C57BL/6 und FVB/N isoliert. Die C57BL/6-Tiere waren 16 bis 18 Wochen alt und männlich und die FVB/N-Tiere acht bis zehn Wochen alt und männlich. Den FVB/N-Tieren wurden osmotische Minipumpen (ALZET®/ DURECT Corporation, Cupertino, USA) implantiert, um sie mit Isoprenalin (3mg/ kg KG/ d) zu stimulieren. Die chronische Stimulation fand für 10 Stunden, 24 Stunden sowie 7 Tage statt (Implantation der osmotischen Minipumpen und Isolation von RNA aus FVB/N-Tieren durch Herrn Benedikt Fels). Die Kardiomyozyten-RNA wurde aus isolierten C57BL/6-Kardiomyozyten gewonnen. Aus humanen Proben von Patienten ohne Herzinsuffizienz (non-failing = NF; wir danken Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Böhm, ehemals Köln, für die freundliche Überlassung der Proben aus nicht-insuffizienten, humanen Herzgeweben) und mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM; Ethikvotum Reg.Nr.: 0Xneum) wurde Ventrikel-RNA isoliert. Es wurden rechte und linke Herzventrikel verwendet. Die RNA-Isolation erfolgte gemäß der Methode nach Chomczynski und Sacchi (17,18) mit dem TRIzol® Reagenz der Fa. Life Technologies (Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben.

## **3.3 IDENTIFIKATION DER CREM-SPLEIßVARIANTEN**

### **3.3.1 Reverse-Transkriptase PCR**

Um die mRNA analysieren zu können, wurde die isolierte RNA durch RT-PCR in Einzelstrang-cDNA (ss-cDNA) umgeschrieben (69). Der Ablauf der Methode wird durch die unten stehende Abbildung 6 visualisiert. Bei dieser Methode wurde mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Rotkreuz, CH) gearbeitet. Mittels Random-Hexamer-Primern wurde eine repräsentative, reverse Transkription der mRNA erreicht.

## Priming-Optionen in der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion



## Ablauf der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

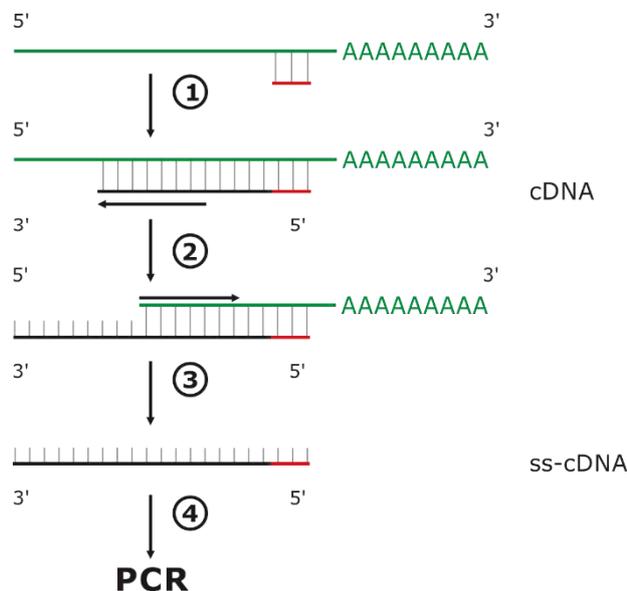


Abbildung 6: **Schema der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion und ihrer Priming-Optionen;** Abbildung nach (69); die Möglichkeit, sich bei der RT-PCR drei verschiedener Priming-Methoden zu bedienen, wird aus der Abbildung ersichtlich. In dieser Arbeit wurden Random-Primer verwendet, die eine zufällige Sequenz besitzen und somit mehrere reverse Transkripte hervorbringen. So kann die mRNA repräsentativ in cDNA umgeschrieben werden. Des Weiteren ist der Ablauf der RT-PCR abgebildet: 1. Primer-Annealing; 2. Elongation; 3. Degradation der mRNA; 4. Single-stranded cDNA (ss-cDNA) kann nun in der PCR weiter verwendet werden

Die RT-PCR wurde nach folgendem Protokoll ausgeführt:

Reagenzien	Endkonzentration	pro Probe ( $\mu$ l)
5x Reaktionspuffer	1 x	4
dNTP-Mix	1 mM	2
Random-Hexamer-Primer	60 $\mu$ M	2
RNAse Inhibitor	20 Units	0,5
Transkriptor Reverse Transkriptase	10 Units	0,5

Sterile Filterspitzen wurden verwendet und der ganze Ansatz auf Eis pipettiert. Zunächst wurde 1  $\mu$ g RNA in 11  $\mu$ l Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Aus den oben aufgeführten Reagenzien wurde ein Mix hergestellt, der mit der RNA-Probe gemischt wurde und 20  $\mu$ l Ansatz ergab. Dieser wurde im GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 Thermocycler (PerkinElmer, Shelton, USA) nach folgendem Programm inkubiert und im letzten Schritt denaturiert:

Temperatur (C°)	Zeit (min)
25	10
50	60
85	5

Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis gekühlt mit Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und bei -20 C° tiefgefroren.

### 3.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von DNA (69,84). Ihr Prinzip wird schematisch in Abbildung 7 gezeigt. Die im vorherigen Schritt erzeugte cDNA wurde eingesetzt, um mit für das *CREM*-Gen spezifischen Primern verschiedene mRNA-Spleißvarianten zu amplifizieren. Die Primer-Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Softwares

Primer3 (59,109) und Oligo Calc (57) designt und von der Invitrogen™/ Life Technologies (Carlsbad, USA) hergestellt. Die Sequenzdaten wurden der Genomdatenbank Ensembl (34-36) entnommen und mit Hilfe der Software Geneious (10) analysiert. Aus folgender Tabelle sind die verwendeten CREM-spezifischen Oligonukleotide zu entnehmen:

**Tabelle 2: Übersicht der in der PCR verwendeten Primer;** Erläuterung der Abkürzungen: Mm = *Mus musculus*, Hs = *Homo sapiens*; Abk. = Abkürzung; Dir. = Ausrichtung; For= sense; Rev = antisense; Tm = Schmelztemperatur (°C); Ta = Annealingtemperatur (°C)

Spezies	Primerbezeichnung	Abk.	Sequenz	Dir.	Tm	Ta
Mm	Mm_CREM_Domain_B	B	ATGACCATGGAAACAGTTGAA	For	58	53
Mm	Theta 2	θ2	ATGGTTTCTGTAGCTGGATCA	For	57	52
Mm	Mm_CREMExonX2_for	X2	ATGGCTGTAACTGGAGATGAAAC	For	60	55
Mm	Mm_CREMintronexongamma_for	P6	CCCATTTTACAGATGAGGAGA	For	60	55
Mm	Mm_CremExonIa_Rev	Ia	GATTTTCAAGCACAGCCACA	Rev	56	51
Mm	Mm_CremExonIb_Rev	Ib	GAACTTCCAGCACTGCGACT	Rev	60	55
Mm	Mm_Crem_Ia_end_R	Iag	TTACTCTGCTTTATGGCAATA	Rev	56	51
Mm	Mm_Crem_Ib_end_R	Ibg	CTAATCTGTTTTGGGAGAGCA	Rev	60	55
Hs	Hs_CREMExonB_for	hB	ATGACCATGGAAACAGTTGAA	For	58	53
Hs	Hs_CREMExonX_for	hX	TGGAACACTTTATGTTGAACTG	For	60	55
Hs	Hs_CREMintronexongamma_for	hP6	TTACAGATGAGGAAACTGAACT	For	60	55
Hs	Hs_CREMExonIa_rev	hIa	TTACTCTACTTTATGGCAATAAAG	Rev	62	57
Hs	Hs_CREMExonIb_rev	hIb	CTAGTAATCTGTTTTGGGAG	Rev	56	51

Werden Primerpaare für humane Templates abgekürzt, so wird ein „h“ hinzugefügt (z.B. hB-Ia).

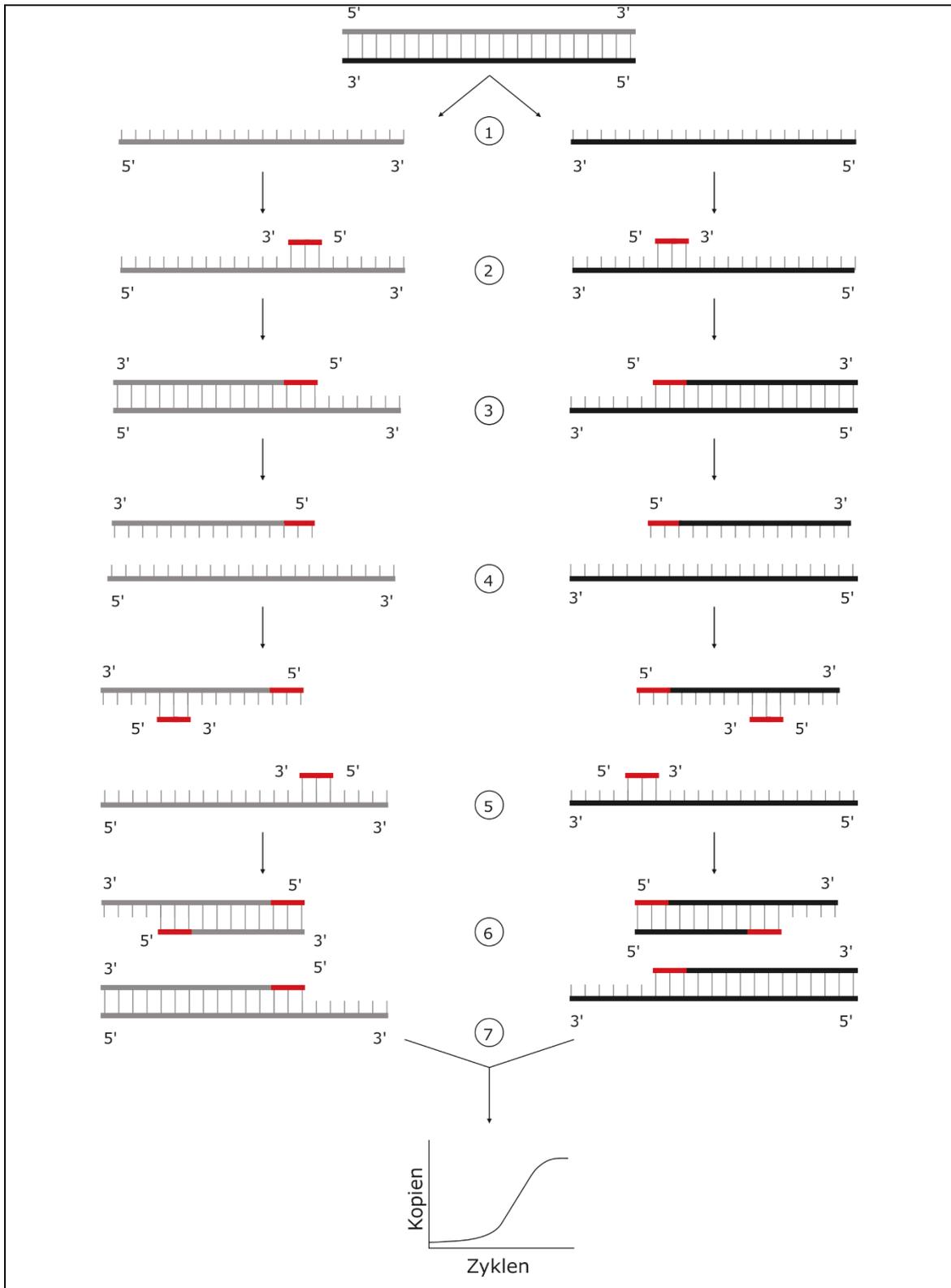


Abbildung 7: **Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerasekettenreaktion;**  
 1. Denaturierung-1.Zyklus; 2. Primerannealing-1.Zyklus; 3. Elongation-1.Zyklus; 4.  
 Denaturierung-2.Zyklus; 5. Primerannealing-2. Zyklus; 6. Elongation-2.Zyklus; 7.  
 Exponentielle Amplifikation in den folgenden Zyklen

Die PCRs wurden nach folgenden Protokollen ausgeführt:

1. Für die PCRs zur Identifikation der CREM-Spleißvarianten in C57BL/6-Ventrikelhomogenaten (zusammengeführte RNA von 3 Tieren) wurde das GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit (Promega, Madison, USA) verwendet.

<b>Reagenzien</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Pro Probe (µl)</b>
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O		22
5x Green GoTaq Flexi Buffer	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	10
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	9 mM	18
dNTPs (je 10 mM)	je 0,3 mM	1,5
Sense-Primer (10 µM)	0,3 µM	1,5
Antisense-Primer (10 µM)	0,3 µM	1,5
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (5u/ µl)	2,5 u	0,5
Template cDNA		10,0

Der Reaktionsansatz wurde in der obigen Reihenfolge mit sterilen Pipettenspitzen in sterile 0,2 ml PCR-Gefäße auf Eis pipettiert. Die Reaktion wurde im GeneAmp® PCR System 9700 Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Temperatur (C°)</b>	<b>Zeit (min)</b>
Initiale Denaturierung	1	94	4,0
Denaturierung	35	94	0,5
Annealing	35	57	0,5
Elongation	35	72	1,0
Finale Elongation	1	72	4,0
Pause	1	4	∞

2. Für die PCRs zur Identifikation der CREM-Spleißvarianten in C57BL/6-Kardiomyozyten (zusammengeführte RNA von 5 Tieren) und in humanen Proben wurde das Phusion® High Fidelity DNA Polymerase Kit (New England

Biolabs, Ipswich, USA) eingesetzt. Aufgrund der Proof-Reading-Funktion dieser thermostabilen DNA-Polymerase (86) konnten die amplifizierten Spleißvarianten für Klonierungen eingesetzt werden.

Reagenzien	Endkonzentration	Pro Probe ( $\mu\text{l}$ )
Nuklease-freies $\text{dH}_2\text{O}$		23,5
5x Phusion HF Buffer	1x	10,0
dNTPs (je 10 mM)	je 0,2 mM	1,0
Sense-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{M}$	2,5
Antisense-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{M}$	2,5
Phusion DNA Polymerase (1u/ $\mu\text{l}$ )	0,5 u	0,5
Template cDNA		10,0

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in sterile 0,2 ml-PCR-Gefäße pipettiert. Dazu wurden sterile Pipettenspitzen benutzt. Die Reaktionen wurden im Biometra TProfessional Standard Thermocycler (Biometra, Göttingen) und im GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt. Die Annealingtemperatur wurde jeweils 5 °C geringer als der niedrigste Schmelzpunkt der verwendeten Primer gewählt.

Reaktionsschritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initialdenaturierung	1	98	30
Denaturierung	35	98	10
Annealing	35	$T_a$	30
Elongation	35	72	15-30 s/ 1 kb
Finalelongation	1	72	420
Pause	1	4	$\infty$
$T_a \sim T_m - 5^\circ\text{C}$			

### 3.3.3 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR

Die 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR ist eine Methode zur Amplifikation unbekannter 5'-Enden von messenger RNAs. Ausgehend von

einer bekannten, genspezifischen Sequenz erfolgt durch reverse Transkription (mittels Gen-spezifischer Primer/ GSPs) eine Einzelstrangsynthese des 5'-Endes der mRNA (siehe Abbildung 8). Durch das Anhängen mehrerer Desoxycytintriphosphate wird eine Möglichkeit geschaffen, dass am unbekanntem 5'-Ende ein sense-orientierter Anker-Primer (Abridged Anchor Primer), der eine Poly-dG-Sequenz enthält, binden kann. In den folgenden Schritten wird die Zielsequenz im Sinne einer Nested PCR durch Primer vermehrt.

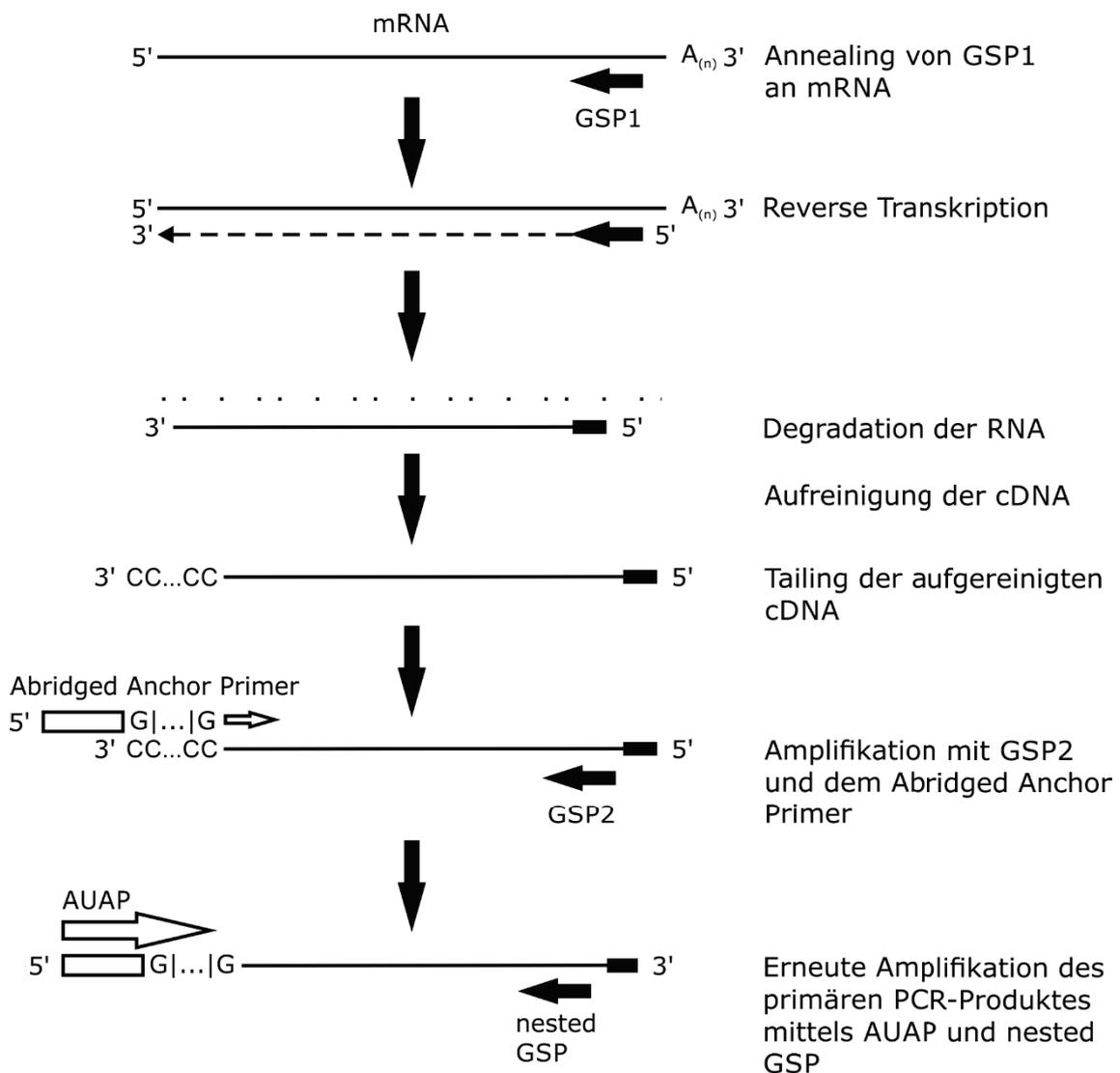


Abbildung 8: **Übersicht über die Arbeitsschritte der 5'-RACE-PCR mit dem 5' RACE System for Rapid Amplifikation of cDNA Ends, Version 2.0;** Abbildung modifiziert nach (51)

Es wurde das 5' RACE System for Rapid Amplifikation of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen™/ Life Technologies) benutzt. Die genspezifischen Primer

(GSPs) wurden mit Hilfe der Softwares Primer3 (59,109) und Oligo Calc (57) designt und von der Fa. Invitrogen™/ Life Technologies hergestellt. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA aus Herzen von 8-10 Wochen alten, männlichen FVB/N-Mäusen. Die Mäuse wurden durch osmotische Minipumpen (ALZET®/ DURECT Corporation, Cupertino, USA) über 10 h mit Isoprenalin (3mg/ kg KG/ d) stimuliert.

**Tabelle 3: Übersicht der in der 5'-RACE-PCR verwendeten Primer;** Erläuterung der Abkürzungen: Mm = *Mus musculus*; Dir. = Ausrichtung; Rev = antisense; Tm = Schmelztemperatur (°C); Ta = Annealingtemperatur (°C)

Spezies	Primerbezeichnung	Sequenz	Dir.	Tm	Ta
Mm	MmRACE_GSP1_Ib_rev_comp	CCTCTATAAGCTTCTT	Rev	44	39
Mm	MmRACE_GSP2_Ib_rev_comp	ACTCGACTCTCAAGACACTTCAC	Rev	61	56
Mm	MmRACE_GSPnested_HIb_rev_comp	CGTCGACATTCTTTAGCAGCTTCCCTGT	Rev	68	63
Mm	MmRACE_GSP1_Ia_rev_comp	TTATGGCAATAAAGGT	Rev	43	38
Mm	MmRACE_GSP2_Ia_rev_comp	CTTTGAGGGCCTTGAGTTCC	Rev	61	56
Mm	MmRACE_GSPnested_Ia_rev_comp	TTCTTTCTTCTTCTGCGACTCCCG	Rev	67	62

Protokoll:

Zunächst wurde die reverse Transkription vorbereitet. Der 1x Wash Buffer wurde angesetzt. Dafür wurde 1 ml Wash Buffer-Konzentrat mit 18 ml dH<sub>2</sub>O und 21 ml absolutem Ethanol gemischt. Für die First Strand cDNA Synthesis wurde folgender Ansatz pipettiert:

Komponente	Menge/Volumen
GSP1 (10µM)	0,25 µl
Sample RNA	1,00 - 5,00 µg
DEPC-Wasser (oder Nuklease-frei)	ad 15,50 µl

Dieser Ansatz wurde 10 min bei 70°C inkubiert um die RNA zu denaturieren. Anschließend wurde er eine Minute auf Eis gekühlt. Dem Inhalt des Reaktionsgefäßes wurden folgende Reagenzien hinzugefügt und alles für eine Minute bei 42 °C inkubiert:

Komponente	Volumen (µl)
10x PCR Buffer	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5

10 mM dNTP mix	1,0
0,1 M DTT	2,5

1 µl SuperScript™II Reverse Transkriptase wurde dazugeben. Nach dem Mischen wurde für 50 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase bei 70 °C 15 min lang denaturiert. Der Reaktion wurde 1 µl RNase-Mix hinzugefügt. Die Template RNA wurde für 30 min bei 37°C degradiert. Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt.

Um die cDNA aufzureinigen, wurde jede Probe mit 120 µl Binding Solution (6 M NaI) versetzt und die DNA-NaI-Lösung auf eine S.N.A.P.-Säule (Säule mit Membran auf SiO<sub>2</sub>-Basis (110)) gegeben. Die Säule wurde bei 13000x g für 20 s zentrifugiert. Danach fanden 4 Waschschriffe mit 400 µl 4 °C kaltem 1x Wash Buffer statt. Es wurde jeweils bei 13000x g für 20 s zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff erfolgte eine erneute Zentrifugation für 1 min bei 13000x g. Die gereinigte DNA wurde mit 50 µl auf 65 °C erhitztem, Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O bei 13000x g für 20 s eluiert.

Es erfolgte nun das Anhängen eines homopolymeren 5'-Tails an die cDNA durch die Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT). Folgende Reagenzien wurden in einem Reaktionsgefäß angesetzt:

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (µl)</b>
DEPC-behandeltes Wasser	6,5
5x Tailing Buffer	5,0
2 mM dCTP	2,5
S.N.A.P.-gereinigte cDNA	10,0

Der Ansatz wurde bei 94°C für 2-3 min inkubiert und anschließend 1 min auf Eis gekühlt. 1 µl TdT wurde dazugegeben und der Reaktionsansatz 10 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der TdT fand für 10 min bei 65 °C statt.

Es folgte die PCR cDNA mit homopolymerem dC-Überstand. Dafür wurde der Biometra TProfessional Standard Thermocycler (Biometra, Göttingen) auf 94 °C vorgeheizt und der PCR-Ansatz aus folgenden Reagenzien auf Eis in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) pipettiert:

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Nuklease-freies dH <sub>2</sub> O	31,5
10x PCR Buffer	5,0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3,0
10 mM dNTP Mix	1,0
GSP2 (10 µM)	2,0
Abridged Anchor Primer (10 µM)	2,0
dC-tailed cDNA	5,0
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (5u/ µl)	0,5

Die PCR wurde nach folgendem Programm ausgeführt:

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Temperatur (C°)</b>	<b>Zeit (min)</b>
Initiale Denaturierung	1	94	1,5
Denaturierung	35	94	0,5
Annealing	35	55	0,5
Elongation	35	72	1,0
Finale Elongation	1	72	5,0
Pause	1	4	∞

Anschließend erfolgte eine erneute PCR im Sinne einer Nested Amplification. Hierfür wurden 5 µl der obigen PCR in 495 µl TE-Puffer verdünnt. Der Thermocycler wurde erneut auf 94 °C vorgeheizt und auf Eis folgende PCR-Reaktion angesetzt.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Nuklease-freies dH <sub>2</sub> O	33,5
10x PCR Buffer	5,0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3,0
10 mM dNTP Mix	1,0
nested GSP (10 µM)	1,0
AUAP (10 µM)	1,0

verdünntes PCR-Produkt	5,0
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (5u/ µl)	0,5

Die PCR wurde nach folgendem Programm ausgeführt:

Reaktionsschritt	Zyklen	Temperatur (C°)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	1	94	1,5
Denaturierung	35	94	0,5
Annealing	35	55	0,5
Elongation	35	72	1,0
Finale Elongation	1	72	5,0
Pause	1	4	∞

Schließlich wurden 20 µl des PCR-Produktes auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die getrennten DNA-Banden wurden ausgeschnitten und mittels Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, CA) nach unten aufgeführtem Protokoll (siehe 3.3.5) aufgereinigt.



Abbildung 9: **Agarosegelelektrophorese zur Darstellung der 5'-RACE-PCR-Produkte mit einem GSP für Exon Ia;** die rot markierten Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt.



Abbildung 10: **Agarosegelelektrophore zur Darstellung der 5'-RACE-PCR-Produkte mit einem GSP für Exon Ib**; die rot markierten Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt.

### 3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt eine Methode zur Analyse von Nukleinsäuren dar, die auf der negativen Ladung des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats beruht. Im elektrischen Feld können Nukleinsäuren nach Größe aufgetrennt, anschließend dargestellt und deren Mengen abgeschätzt werden (69). Die Nukleinsäure wandert ihrer Ladung entsprechend zur Anode. Für das Gießen von Agarosegelen wurde Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer verwendet. Die 50x TAE-Stammlösung wurde nach folgendem Protokoll hergestellt:

Reagens	Masse/ Volumen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	242,2 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	17,4 g
Aqua dest.	Ad 1,0 l

Je nach gewünschter Sensitivität der Auftrennung wurden verschiedene Agarosekonzentrationen gewählt.

**Tabelle 4: Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration; Tabelle aus (69).**

<b>Agarosekonzentration (in % w/v)</b>	<b>Optimaler Auftrennungsbereich linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente (in kb)</b>
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,23
2,0	0,1-2

Mit 1x TAE-Puffer wurden, je nach erwarteter Größe der zu trennenden DNA, 1 %ige oder 1,5 %ige Agarosegele hergestellt. Das Volumen des 1x TAE-Puffers wurde geteilt und eine Hälfte in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Darin wurde die abgewogene Agarose aufgenommen und in einem Mikrowellengerät aufgeköcht. Dann wurde die verbliebene Hälfte des 1x TAE-Puffers unter Schwenken hinzugegeben. Zur Visualisierung der DNA wurden 1,5 µl Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) pro 100 ml Gelansatz beigefügt und die Gele in vorbereitete 80 ml, 150 ml oder 200 ml Kammern gegossen. Die Gele wurden in die Gelelektrophoresekammern BlueMarine™ 100 oder BlueMarine™ 200 (Serva Electrophoresis, Heidelberg) eingesetzt. Die Kammern wurden anschließend mit 1x TAE-Puffer befüllt und die Proben mit dem entsprechenden Volumen 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) gemischt. Zur Größenbestimmung und ungefähren Quantifizierung wurden der GeneRuler 1 kb DNA Ladder und der GeneRuler 100 bp DNA Ladder Größenstandard (Thermo Fisher Scientific) mit 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) versetzt und aufgetragen. Danach erfolgten das Auftragen der DNA-Proben und das Anlegen einer Spannung von 100-200 V für 45-90 min.

### **3.3.5 Aufreinigung der cDNA aus Agarosegelen**

Der organische Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert durch seine aromatischen Ringe mit den heteroaromatischen Ringen von Aminosäuren und ermöglicht es, doppelsträngige DNA ab einer Masse von 10-20 ng visuell darzustellen. UV-Licht mit Wellenlängen von 254-366 nm regt das interkalierte Ethidiumbromid an, Licht der Wellenlänge 590 nm zu emittieren (69). Die Darstellung der DNA im Agarosegel erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Fluo-Link (MWG-Biotech, Ebersberg) unter UV-Licht. Die DNA-Banden wurden mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem Gel extrahiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Präparation der DNA wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) verwendet. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Die Proben wurden mit dem dreifachen Volumen ADB (Agarose Dissolving Buffer) versetzt und bei 50 °C für 10 min im Thermoblock leicht schüttelnd inkubiert. Die Zymo-Spin-Säulen wurden auf die Luer-Lock-Dreiwegehähne des Vac-Man® Vacuum Manifold (Promega), der mit einer Welch® Vacuum Pump (Gardner Denver, Quincy, USA) verbunden wurde, gesteckt. Die DNA-Agarose-ADB-Lösung wurde nun unter Vakuum durch die Silikamembran der Säulen gezogen. Anschließend erfolgten zwei Waschgänge mit je 200 µl DNA Wash Buffer. Die Elution der DNA erfolgte durch Zentrifugation der Säulen mit je 12 µl Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O bei 13000x g für 45 s.

### **3.3.6 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* nach der Rubidiumchlorid-Methode**

Um transformationskompetente *Escherichia coli* des Stammes XL-1 Blue (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) zu erzeugen, erfolgte zunächst die Herstellung der Transformation Buffer (TFB) 1 und 2 sowie des Lysogeny-Broth (LB)-Nährmediums.

### TFB1-Puffer

Reagenz	Masse/ (Endkonzentration)	Volumen
RbCl	0,60 g (100 mM)	
MnCl <sub>2</sub>	0,31 g (50 mM)	
KAc	0,15 g (30 mM)	
CaCl <sub>2</sub>	0,06 g (10 mM)	
Glycerol	7,50 ml (15 %)	
Aqua dest.	Ad 50,00 ml	

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt. Anschließend erfolgte eine Sterilfiltration der Lösung.

### TFB2-Puffer

Reagenz	Masse/ (Endkonzentration)	Volumen
MOPS (4-Morpholinopropansulfonsäure)	0,10 g (10 mM)	
RbCl	0,06 g (10 mM)	
CaCl <sub>2</sub>	0,42 g (75 mM)	
Glycerol	7,50 ml (15 %)	
Aqua dest.	Ad 50,00 ml	

Der pH-Wert wurde mit KOH auf pH 6,5 eingestellt. Anschließend erfolgte eine Sterilfiltration der Lösung.

### LB-Medium

Reagens	Masse/ Volumen
Pepton C	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Aqua dest.	Ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert.

Zunächst wurden XL-1-Blue-Übernachtskulturen angesetzt. Diese erfolgten in jeweils 5 ml LB, das mit 5 µg/ml Tetracyclin versetzt wurde. Die Röhren wurden mit Aluminiumfolie lichtundurchlässig gemacht und der Deckel nicht komplett zugeklippt. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden 2x 25 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium mit jeweils 1 ml Übernachtskultur inokuliert. Die Kultur wurde dann bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 inkubiert. Es erfolgte die Kühlung der Kultur auf Eis für 5 min und anschließend eine Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in je 10 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert. Die Bakterienlösung ruhte für 90 s auf Eis und wurde dann erneut für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet in je 1 ml eiskaltem TFB2 aufgenommen. Die vereinten Suspensionen kühlten anschließend für 15 min auf Eis und wurden, zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **3.3.7 Klonierung der cDNA in einen prokaryotischen Expressionsvektor**

Unter Klonierung versteht man das Einbringen eines beliebigen DNA-Fragments in einen Vektor, wodurch die Amplifikation in einem Wirtszellmechanismus ermöglicht wird (94). Für die Klonierung der blunt-ended PCR-Produkte wurden mit dem CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) gearbeitet. Der Ligationsansatz wurde hierfür auf Eis angesetzt und gemischt.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen/Menge</b>
2x Reaction Buffer	10 µl
PCR-Produkt	3:1 Ratio (molar) zwischen PCR-Produkt und pJET1.2
pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ 1 µl)	

Nuklease-freies dH <sub>2</sub> O	bis zu 8 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

Anschließend wurde der Ansatz bei 22 °C für 5 min inkubiert und für die Transformation verwendet.

### **3.3.8 Transformation der Plasmide in *Escherichia coli***

#### **Herstellung von LB-Agarplatten**

1 l LB-Medium (3.3.6) wurde mit 15 g Agar (1,5 %) versetzt und autoklaviert. Entsprechend der Ampicillinresistenz des pJET1.2/blunt Cloning Vector (*bla* (Ap<sup>R</sup>)-β-Lactamase-Gen) wurden, nach Abkühlung der Lösung auf 50 °C 100 µg/ ml Ampicillin zugefügt.

#### **Transformation**

Der Ligationsansatz (3.3.7) wurde zwecks Transformation zu kompetenten, auf Eis angetauten XL-1 Blue (3.3.6) gegeben (64) und 20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden über 1 min einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Nach Zugabe von 1 ml auf 37 °C vorgewärmten LB-Mediums wurde eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Durch eine 2 min andauernde Zentrifugation bei 2000x g wurden die Bakterien pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet daraufhin in 1 ml, 37 °C warmem LB-Medium resuspendiert. Schließlich wurde die gesamte Bakteriensuspension auf Ampicillin-LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### **3.3.9 Bakterienkultur zur Vermehrung der Plasmide**

#### **Herstellung von Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)-Nährmedium**

<b>Reagenz</b>	<b>Masse/ Volumen</b>
Pepton C	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g
0,25 M KCl	10,0 ml
2 M MgCl <sub>2</sub>	5,0 ml

1 M Glucose	20,0 ml
Aqua dest.	Ad 1,0 l

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert.

### **Selektion der Klone und anschließende Bakterienkultur:**

Zur Vermehrung der Plasmide wurden am nächsten Tag die auf den Agarplatten gewachsenen Kulturen (pro Agar-Platte 5 Klone), mit sterilen Pipettenspitzen, aufgenommen. Damit wurden je 5x 3 ml SOC-Medium angeimpft. Das SOC-Medium wurde zuvor mit 100 µg/ ml Ampicillin versetzt. Die Vermehrung erfolgte als Übernachtskultur bei 37°C unter Schütteln und aeroben Bedingungen.

### **3.3.10 Plasmidextraktion durch alkalische Lyse**

Bei der Plasmidextraktion durch alkalische Lyse handelt es sich um eine Methode zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien (11). Es wurden dafür folgenden Lösungen hergestellt:

#### **P1**

<b>Reagenz</b>	<b>Masse/ (Endkonzentration)</b>	<b>Volumen</b>
2,0 M Tris	2,5 ml (25 mM)	
0,5 M EDTA	2,0 ml (10 mM)	
Aqua bidest.	Ad 100,0 ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert. Kurz vor Gebrauch musste der Lösung 1 % RNase (Endkonzentration: 100 µg/ ml) zugesetzt werden.

#### **P2**

<b>Reagenz</b>	<b>Masse/Volumen (Endkonzentration)</b>
10 M NaOH	2,0 ml (0,2 M)
20 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	5,0 ml (1 %)

Aqua bidest.	Ad 100,0 ml
--------------	-------------

### P3

Reagenz	Masse/Volumen (Endkonzentration)
KAc	29,45 g (3 M)
Aqua bidest.	Ad 100,00 ml

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 5,5 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert.

#### **DNase-freie RNase A-Lösung (Stocklösung 10 mg/ ml)**

Die RNase A wurde in sterilem, Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O aufgenommen (10 mg/ml). Das Reaktionsgefäß wurde anschließend für 15 min in einem Becherglas mit Wasser gekocht.

#### **Durchführung der Plasmidextraktion**

Von den Übernachtskulturen (3.3.9) wurden jeweils 2 ml Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt. Der nächste Schritt bestand aus 2 min Zentrifugation bei 5000 rpm. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen sowie das erhaltene Pellet in 300 µl P1 (mit RNase A) resuspendiert. Die Lyse wurde mit 300 µl P2 durchgeführt; nach Zugabe von 300 µl P3 wurden mit dem sichtbaren Kalium-SDS-Niederschlag Proteine und genomische DNA gefällt. Nach Mischen des Ansatzes erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C. Der entstehende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol gemischt. Die DNA wurde nun bei -20 °C über 30 min ausgefällt. Der nächste Zentrifugationsschritt wurde für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 %igem, eiskaltem Ethanol gewaschen. Es wurde für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Trocknung des Pellets erfolgte bei 37 °C auf einem Thermoblock. Zuletzt wurde das Pellet in 20 µl Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.3.11 Restriktionsverdau zur Validerung der Inserts

Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen (REs) gemäß der Angaben des Herstellers verdaut. Verwendet wurde die RE ApaLI um den pJET1.2/blunt Cloning Vector (Thermo Fisher Scientific) in zwei Fragmente spalten zu können. Von diesen zwei Fragmenten besitzt das konstante Fragment ohne Multiple Cloning Site (MCS) eine Größe von 1246 bp. Das Fragment mit der MCS besitzt eine Größe von 1728 bp, die sich bei gelungener Klonierung um die Größe des Inserts vermehrt. Die Restriktionsverdau wurden mit Enzymen der Fa. Fermentas/Thermo Fisher Scientific und der Fa. New England Biolabs durchgeführt.

#### Plasmidverdau mit ApaLI (Alw44I) von Fermentas/Thermo Fisher Scientific

Die folgenden Reagenzien wurden in angegebener Reihenfolge auf Eis zusammengegeben:

Reagenz	Volumen/ Masse
Nuklease-freies dH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
10x Fast Digest (Green) Buffer	2 µl
DNA	1 µg
Restriktionsenzym	1 µl

Der Restriktionsansatz wurde bei 37 °C für 60 min verdaut und das RE anschließend durch Erhitzung auf 80 °C für 5 min inaktiviert. Da der Fast Digest (Green) Buffer auch als Ladepuffer dient, konnte die geschnittene DNA direkt auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

#### Plasmidverdau mit ApaLI von New England Biolabs

Die folgenden Reagenzien wurden in angegebener Reihenfolge auf Eis zusammengegeben:

Reagenz	Volumen/ Masse
Nuklease-freies dH <sub>2</sub> O	ad 25,00 µl
10x NEBuffer 4	2,50 µl
BSA (Bovine Serum Albumin)	0,25 µl

DNA	1,00 µg
Restriktionsenzym (10 u/ µl)	0,50 µl

Der Restriktionsansatz wurde bei 37 °C für 60 min verdaut und anschließend mit 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt. Es erfolgte die sofortige Agarosegelelektrophorese.

### **3.3.12 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und Verdünnung**

Nukleinsäuren haben, bedingt durch die aromatischen Ringe ihrer Basen, ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 260$  nm. Bei der photometrischen Messung der Absorption einer Lösung bei  $\lambda = 260$  nm in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke hat eine Lösung von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  dsDNA,  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  ssDNA oder  $33 \mu\text{g ml}^{-1}$  RNA eine optische Dichte (OD) von 1 (69). Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt, ebenfalls aufgrund ihrer aromatischen Reste, bei  $\lambda = 280$  nm. Zur Messung der Reinheit bildet man den  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Quotienten, mit dem man Verunreinigungen durch Proteine oder RNA bestimmen kann. Bei einem  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Quotienten von 1,8 liegt eine reine DNA-Lösung vor, bei 2,0 handelt es sich um eine reine RNA-Lösung und bei Werten, die signifikant unter 1,8 liegen, um eine Kontamination mit Proteinen oder Phenol (69). Die Konzentrationsbestimmungen wurden mit dem BioPhotometer® 6131 (Eppendorf, Hamburg) oder dem NanoPhotometer® P 300 (Implen, München) durchgeführt. Für die Messung mit dem BioPhotometer® 6131 wurden die Proben 1:50 verdünnt. Bei der Messung mit dem NanoPhotometer® P 300 wurde jeweils 1 µl unverdünnte Probe eingesetzt.

### **3.3.13 Sequenzierung der Spleißvarianten**

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurde durch die Fa. GATC Biotech durchgeführt. Hierfür wurden nach Vorgabe des Dienstleisters 30-100 ng der entsprechenden Plasmid-DNA-Proben eingesandt. Die Sequenzierreaktion erfolgte gemäß der Didesoxymethode nach Sanger (96).

### 3.4 KLONIERUNG VON CREM-SPLEIßVARIANTEN IN EUKARYOTISCHE EXPRESSIONSVEKTOREN

#### 3.4.1 PCR Site-directed Mutagenesis der CREM-cDNA

Sequenzierte Plasmide mit den Inserts B-H-Ia, B-H-Ib und B- $\gamma$ -H-Ib wurden als Template für eine gerichtete Mutagenese (PCR Site-directed Mutagenesis) eingesetzt, um Restriktionsschnittstellen zu erzeugen, die ein Umklonieren in einen eukaryotischen Expressionsvektor ermöglichen. Die Inserts entstammen der Kardiomyozyten-RNA von Mäusen der Inzuchtlinie C57BL/6. Es wurde mit den unten gezeigten Primern eine BamHI-Schnittstelle vor Exon B und eine PstI-Schnittstelle nach den Exonen Ia und Ib eingefügt.

Mutagenese-Primer für Exon B und BamHI (Mm\_MutBamHI\_CREMB\_for):

TCAGGATCCTATGACCATGGAAACAGTTGAA

$T_m = 65\text{ °C}$

Mutagenese-Primer für Exon Ib und PstI(Mm\_MutPstI\_CREMIb\_rev):

TAGCTGCAGTAATCTGTTTTGGGAGAGC

$T_m = 65\text{ °C}$

Mutagenese-Primer für Exon Ia und PstI(Mm\_MutPstI\_CREMIa\_rev):

TAGCTGCAGTACTCTGCTTTATGGCAATA

$T_m = 64\text{ °C}$

#### PCR-Protokoll

Reagenz	Endkonzentration	Masse/ Volumen
Nuklease-freies dH <sub>2</sub> O		ad 33,5 $\mu$ l
5x Phusion HF Buffer	1x	10,0 $\mu$ l
dNTPs (je 10 mM)	je 0,2 mM	1,0 $\mu$ l
Sense-Primer (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
Antisense-Primer (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
Phusion DNA Polymerase (1u/ $\mu$ l)	0,5 u	0,5 $\mu$ l
Template Plasmid-DNA		1,0 $\mu$ g

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in sterile 0,2 ml PCR-Gefäße pipettiert. Dazu wurden sterile Pipettenspitzen benutzt. Die Reaktionen wurden im Biometra TProfessional Standard Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt. Die Annealingtemperatur wurde jeweils 5 °C geringer als der niedrigste Schmelzpunkt der verwendeten Primer gewählt.

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit (s)</b>
Initiale Denaturierung	1	98	30
Denaturierung	25	98	10
Annealing	25	61	30
Elongation	25	72	20
Finale Elongation	1	72	420
Pause	1	4	∞

### **3.4.2 Linearisierung des eukaryotischen Expressionsvektors**

Der eukaryotische Expressionsvektor pQE-TriSystem-6 (Qiagen, Venlo, NL) wurde mit den REs BamHI und PstI der Fa. Fermentas/Thermo Fisher Scientific linearisiert.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen/ Masse</b>
Nuklease-freies dH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
10 x Buffer R	2 µl
Vektor-DNA	1 µg
PstI (10 u/ µl)	1 µl
BamHI (10 u/ µl)	1 µl

Die Reagenzien wurden in obiger Reihenfolge angesetzt und anschließend bei 37 °C für 90 min inkubiert.

### **3.4.3 Aufreinigung der PCR Site-directed Mutagenesis und des linearisierten Vektors mit DNA Clean & Concentrator™-5**

Mit dem DNA Clean & Concentrator™-5-Kit (Zymo Research, Irvine, CA) erfolgte die Aufreinigung der DNA aus den PCR- und Restriktionsansätzen. Verwendet wurde folgendes Protokoll:

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 13000 g ausgeführt. Zu jedem Volumen DNA-Probe wurden 2-7 Volumina (s. Tabelle) DNA Binding Buffer gegeben.

<b>Anwendung</b>	<b>DNA Binding Buffer : Probe</b>	<b>Beispiel</b>
Plasmid, genomische DNA (>2kb)	2V : 1V	200µl : 100µl
PCR-Produkt, DNA-Fragment	5V : 1V	500µl : 100µl
ssDNA (z.B. cDNA, M13 phage)	7V : 1V	700µl : 100µl

Nach kurzem, schonendem Mischen wurde der Mix auf eine Zymo-Spin-Säule in einem Sammelgefäß gegeben. Für 30s wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 200 µl DNA Wash Buffer auf die Säule pipettiert und diese für 30 s zentrifugiert. Der Waschschrift wurde anschließend wiederholt. 6-15 µl Nuklease-freies dH<sub>2</sub>O wurden direkt auf die Säulenmatrix appliziert und bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert. Die Säule wurde dann auf ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA durch 30 s Zentrifugation eluiert.

### **3.4.4 Restriktionsverdau und Aufreinigung der mutierten CREM-cDNA**

Der Doppelverdau der mutierten CREM-cDNA erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie in 3.4.2, es wurde lediglich der ganze PCR-Ansatz eingesetzt und nach 1 h, zwecks Templateverdau, 0,2 µl DpnI (20 u/ µl) (New England Biolabs) hinzugefügt. Bei der Aufreinigung des PCR-Ansatzes vor dem Verdau und später des Restriktionsansatzes wurde auf das Protokoll aus 3.4.3 zurückgegriffen.

### 3.4.5 Abschätzen von DNA-Konzentrationen auf Agarosegelen

Vor der Ligation der sticky-Inserts mit dem linearisierten pQE-TriSystem-6 (Qiagen) wurden die Konzentrationen auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel abgeschätzt. Die Einschätzung der Konzentration wird durch Vergleich der Banden mit denen von Größenstandards bekannter Konzentration, in diesem Falle des GeneRuler 1 kb DNA Ladder und des GeneRuler 100 bp DNA Ladder Größenstandards, ermöglicht.

### 3.4.6 Klonierung der CREM-Spleißvarianten in den eukaryotischen Expressionsvektor

Die Sticky-End-Ligation erfolgte nach folgendem Protokoll. Die Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge dem Ansatz hinzugefügt. Die T4 DNA Ligase und der 10x T4 DNA Ligase Buffer wurden von der Fa. Thermo Fisher Scientific bezogen.

Reagenz	Volumen/ Masse
Nuclease-freies dH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
10x T4 DNA Ligase Buffer	
Lineare Vektor-DNA	100 ng
Insert-DNA	3:1-molare Ratio über Vektor
T4 DNA Ligase	1 µl

Die Inkubation erfolgte bei 16 °C über Nacht.

### 3.4.7 Vermehrung der Vektoren in *Escherichia coli* mit anschließender Plasmidextraktion

Die Transformation der Vektoren in XL-1-Blue-Bakterien erfolgte wie in 3.3.8 beschrieben. Hierfür wurden 10 µl des Ligationsansatzes aus 3.4.6 zu 100 µl kompetenter Zellen gegeben. Zur Plasmidextraktion wurde das Protokoll aus 3.3.10 angewandt.

### **3.4.8 Restriktionsverdau und Sequenzierung der Vektoren zur Verifikation des Inserts**

Der Restriktionsverdau und die Sequenzierung der Vektoren zur Validierung der Inserts erfolgte wie in 3.3.11 und in 3.3.13 beschrieben.

## **3.5 NACHWEIS DER CREM-EXPRESSION DURCH SDS-PAGE UND WESTERN BLOT**

### **3.5.1 Kultur und Transfektion von HEK293-Zellen**

#### **Zellkultur**

HEK293-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), high glucose (Gibco®/ Life Technologies, Carlsbad, USA) kultiviert, dem 10 % fetales Kälberserum (FKS) (Lonza, Basel, CH) zugesetzt wurden. Die antibiotisch-antimykotische Prävention wurde mit Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ mL) (Gibco®) in einer 1:100-Verdünnung (Endkonzentration: 100 U/ ml) durchgeführt. Die Zellkultur erfolgte im BD53-Inkubator (Binder, Tuttlingen) bei 5 % CO<sub>2</sub>. Jeden 2. Tag wurde das Medium gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen durch Trypsinierung subkultiviert.

#### **Herstellung von 10x Phosphate Buffered Saline (PBS)**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen/ Masse</b>
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
Aqua bidest.	ad 1,0 l

Mit HCl oder NaOH wurde der pH auf 7,4 eingestellt und der Puffer anschliessend autoklaviert.

#### **Trypsinierungs-Protokoll für 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen**

Das Medium wurde abgenommen und die HEK293-Zellen mit 2 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml 37 °C-warme, 0,25 %ige Trypsin-EDTA-

Lösung hinzugegeben. Die Zellen wurden 5-10 min trypsinisiert und das Ablösen unter einem Durchlichtmikroskop kontrolliert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 6 ml DMEM gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 19 ml DMEM verdünnt und 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit jeweils 5 ml Zellsuspension besät. Ihrer Größe entsprechend wurden die 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen mit 12,5 ml Zellsuspension besät.

### **Transfektion**

Unter Transfektion versteht man das Einbringen fremder DNA in eukaryotische Zellen. Es wurde hierzu das TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) verwendet, eine Lösung kationischer Polymere in Wasser, die mit DNA positiv geladene Komplexe bilden und mit der Zellmembran fusionieren (107); eine Methode, die der Lipofektion (31) ähnlich ist. Die Transfektion von HEK293-Zellen für den Western Blot fand bei einer Konfluenz von 70-90 % statt. Je 4 µg Vektor-DNA (pQE-TriSystem-6) mit den Inserts B-H-Ia, B-H-Ib und B-γ-H-Ib (3.4) und 2 µg pEGFP-C1 (Clontech Laboratories, Mountain View, USA) wurden in 500 µl Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Life Technologies) aufgenommen und mit 2,4 µl TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt. Der pEGFP-C1-Vektor kodiert für eine mutierte Variante des Wildtyp Green Fluorescent Protein (GFP) mit Absorptionsmaximum bei 488 nm und Emissionsmaximum bei 507 nm. Die Kotransfektion mit pEGFP-C1 erfolgte zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion. Nach 15 min Wartezeit wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und die Kultur für 2 Tage fortgeführt, um eine ausreichende Proteinexpression zu ermöglichen.

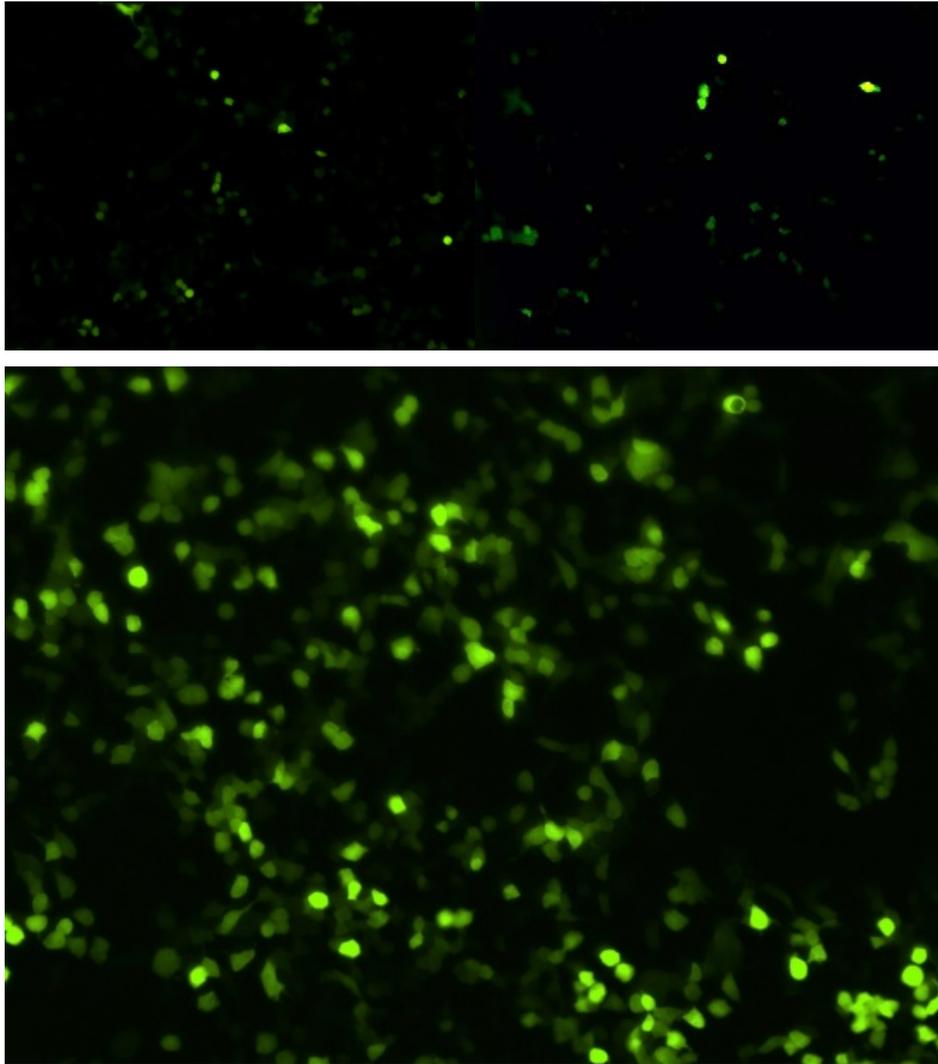


Abbildung 11: **Nachweis der Transfektion von HEK293-Zellen mit pQE-TriSystem-6 und pEGFP-C1**; HEK293-Zellen wurden mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pQE-TS6 (mit folgenden Inserts, oben: B-H-Ia; unten links: B- $\gamma$ -H-Ib; unten rechts: B-H-Ib) und dem Expressionsvektor pEGFP-C1 zum Transfektionsnachweis transfiziert. Die Aufnahme erfolgte 2 Tage nach Transfektion mit dem Nikon TI Fluoreszenzmikroskop.

### **3.5.2 Aufbereitung der Zellen durch Sonifizieren**

Um die Zellen für SDS-PAGE und Western-Blot verwenden zu können, wurden diese zunächst durch Sonifizieren aufgeschlossen. Von den Kulturen wurde zwei Tage nach der Transfektion das Medium abgenommen und ein Waschgang mit 4 ml 1x PBS durchgeführt. Danach wurde das PBS abgenommen und die Zellen durch Abwaschen mit 1,5 ml 1x PBS und einem

Nunc™ Cell Scraper (Thermo Fisher Scientific) abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 3,5 min bei 200x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei -80 °C gelagert.

### Herstellung der M1-Lösung

Reagenz	Volumen/ Masse
200 mM EDTA	1 ml
β-Mercaptoethanol	50 µl
Aqua bidest.	ad 50 ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung vor Verwendung sterilfiltriert.

### Sonifizieren

Die Zellpellets wurden auf Eis angetaut. 1/8 Tablette cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics) wurde in 1,25 ml M1-Lösung aufgenommen. Pro Pellet wurden 200 µl der M1-Proteaseinhibitor-Lösung verwendet. Die Zellen wurden auf Eis mit 3 Pulsen à 10 s bei 60 % der Amplitude durch den HTU SONI-130 MiniFIER-Ultraschallstab (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes, gekühltes Reaktionsgefäß überführt.

### 3.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford (15) beruht auf dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250, der sein Absorptionsmaximum in Gegenwart von Proteinen von 465 zu 595 nm verschiebt. Die Komplexbildung des Farbstoffes erfolgt mit basischen und aromatischen Aminosäureresten, besonders mit Arginin (19). Die Standard-Verdünnungsreihe wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) im Dreifach-Ansatz hergestellt. Dazu wurden 0-10 µg BSA/ 800 µl Aqua bidest. mit jeweils 200 µl Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, USA) versetzt und im BioPhotometer® 6131 (Eppendorf, Hamburg) bei  $\lambda = 595$  nm die Absorption gemessen. Die zu bestimmenden Proben wurden so verdünnt,

dass sich die vermutete Konzentration etwa auf der Mitte der Standardkurve befand. Die Proteinproben wurden mit Aqua bidest. auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Protein Assay Dye Reagent Concentrate versetzt und ebenfalls bestimmt. Die jeweilige Proteinmasse und -konzentration wurden anhand der Korrelation der Probenwerte mit denen der Standardkurve berechnet.

### 3.5.4 SDS-PAGE und Western-Blot

Zum Nachweis der Proteine wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western-Blotting (108) durchgeführt.

#### Benötigte Puffer

##### 4x Tris-Glycin-Laufpuffer

Reagenz	Masse/ Volumen
Tris Base	50 g
Glycin	90 g
SDS	8 g
Aqua bidest.	ad 2 l

Der pH-Wert wurde kontrolliert und sollte etwa bei pH 8,8 liegen. Er wurde gemäß Protokoll nicht eingestellt.

##### 2x Lämmli-Puffer

Reagenz	Masse/ Volumen
Tris Base	1,89 g
SDS	25,00 g
Glycerol	50,00 ml
Bromphenol-Blau	1 Spatelspitze
Aqua bidest.	ad 250,00 ml

Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 6,8 eingestellt.

##### 1x Towbin-Puffer

Reagenz	Masse/ Volumen
Tris Base	3,03 g

Glycin	15,04 g
Methanol	200,00 ml
Aqua bidest.	ad 1,00 l

Der pH-Wert sollte zwischen pH 8,1 und 8,5 sein, wurde aber gemäß Protokoll nicht eingestellt.

### **Tris Buffered Saline (TBS)-Puffer**

<b>Reagenz</b>	<b>Masse/ Volumen</b>
NaCl	9,00 g
Tris Base	1,58 g
Aqua bidest.	ad 1,00 l

#### **Für TBS Tween (TBS-T) Puffer zusätzlich**

Tween 20	1,00 ml
----------	---------

Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

### **Durchführung der Tris-Glycin-SDS-PAGE**

Die sonifizierten Proben wurden, wie die Gewichtsmarker, bei 95 °C für 10 min im Thermoblock denaturiert. Die Gelelektrophoresekammer wurde nach Einsetzen des Gels mit 600 ml 1x Tris-Glycin-Laufpuffer befüllt. Zu den Proben wurde das gleiche Volumen 2x Lämmli-Puffer pipettiert. Eingesetzt wurden 50 µg Protein pro Probe. Als Marker wurden 10 µl des Spectra Multicolor Low Range Protein Ladders und des PageRuler Prestained Protein Ladders (beide Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das 4-15 % Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gel (Bio-Rad) wurde mit den Proben und Markern befüllt und die Gelelektrophorese bei 200 V und 6 °C Umgebungstemperatur für 45 min durchgeführt.

### **Durchführung des Western-Blots**

Eine Amersham Protran 0.45 NC Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) und 2 Filterpapiere wurden auf Größe des Gels zurechtgeschnitten. Der Schaumstoff, die Blotkassette, die Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran wurden mit Towbin-Puffer bedeckt und eingeweicht. Das Gel wurde aus der Gelelektrophoresekammer entnommen und die Blotkassette nach folgendem Schema zusammengesetzt:

Kathode|Schaumstoff-Filterpapier-Gel-Membran-Filterpapier-  
Schaumstoff|Anode

Die Blotkassette wurde in die Transferkammer gesetzt und diese komplett mit Towbin-Puffer befüllt. Das Blotting der Proteine erfolgte bei 1,5 A und 6 °C Umgebungstemperatur für 3 h. Anschließend wurde der Western-Blot für 2-3 min durch Schwenken in Ponceau-Rot angefärbt. Das überschüssige Farbreagenz wurde durch 3 Waschschrirte à 2-3 min in Aqua bidest entfernt. Die Membran wurde an der Luft getrocknet. Für das Blocken freier Bindungsstellen der Nitrocellulose-Membran wurden 5% Milchpulver in 100 ml TBS-T gelöst. Die Membran wurde zurechtgeschnitten und die Markerbanden eingekerbt. Der Blot wurde für 10 s in Aqua bidest. gewaschen. Bei 21 °C Umgebungstemperatur erfolgte das Blocken mit der 5 %igen Milchpulver-TBS-T-Lösung für 1 h auf dem Schüttler. Der Tetra·His Antibody, BSA-free (Qiagen) wurde mit 10 ml 5 %iger Milchpulver-TBS-T-Lösung in einer 1:1000-Verdünnung angesetzt. Der Blot wurde aus der Milchpulver-TBS-T-Lösung genommen und 10 s in Aqua bidest gewaschen. Danach wurde der primäre Antikörper-Ansatz auf den Blot gegeben und dieser bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für jeweils 5 min zunächst mit TBS-Puffer, dann zweimal mit TBS-T-Puffer und schließlich erneut mit TBS-Puffer gewaschen. Der ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep) (GE Healthcare Life Sciences) wurde mit 10 ml 5 %iger Milchpulver-TBS-T-Lösung in einer 1:5000-Verdünnung angesetzt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte bei 21 °C Umgebungstemperatur für 2 h auf dem Schüttler. Danach wurde der Western-Blot, wie nach der Inkubation mit dem primären Antikörper, gewaschen.

### **3.5.5 Darstellung der Proteine mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System**

Die Darstellung der CREM-Isoformen erfolgte mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Der Western-Blot wurde hierfür aus dem TBS-Puffer entnommen und auf die Bildplatte des Gerätes überführt. Die Blot-

Membran wurde fotografiert. 300 µl ECL Western Blotting Substrate (Promega) wurden auf den Blot pipettiert und dieser blasenfrei mit einer Gefrierfolie abgedeckt. Die Entwicklung der Chemilumineszenz wurde über 180 s verfolgt und fotografiert. Die beiden Fotografien wurden übereinandergelegt, um anhand des Gewichtsmarkers das Gewicht der luminiszierenden Banden bestimmen zu können.

## **3.6 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON CREM-SPLEIBVARIANTEN IM LUCIFERASE-ASSAY**

### **3.6.1 Kultur und Transfektion von HEK293-Zellen**

Die HEK293-Zellen wurden, wie in 3.5.1 beschrieben, in einer 24-Well-Mikrotiterplatte kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen mit dem pQE-TriSystem-6-Expressionsvektor mit den Inserts B-H-Ia, B-H-Ib und B- $\gamma$ -H-Ib (3.4), sowie dem pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] Vector (Promega) und dem pRL-TK Vector (Promega) kotransfiziert. Von den Vektoren pQE-TriSystem-6 und pGL4.29 Vector wurden jeweils 500 ng/Well in 100 µl/Well Opti-MEM® I Reduced Serum Medium aufgenommen und mit 2,1 µl/Well TurboFect Transfection Reagent vermischt. Von dem pRL-TK Vector wurden pro Ansatz jeweils 50 ng/Well hinzugefügt. Nachdem der Ansatz 15-20 min geruht hatte, wurden die Zellen mit je 100 µl Ansatz pro Well transfiziert. Bei dem pGL4.29 Vector handelt es sich um ein CRE-kontrolliertes Luziferase-Reportergenkonstrukt, welches die Firefly-Luziferase exprimiert. Die Kotransfektion mit dem konstitutiv exprimierenden pRL-TK Vector, einem Renilla-Luziferase-Expressionsvektor, erfolgte als interne Kontrolle zur Normalisierung der Glühwürmchen-Luziferase-Expression.

### **3.6.2 Stimulation der transfizierten HEK293-Zellen mit Forskolin**

Am Folgetag wurde jeweils die Hälfte der Zellkulturen mit 10 µl 1 mM Forskolin (in DMSO gelöst) stimuliert, die andere Hälfte zur Kontrolle mit 10 µl 1 %iger DMSO-Lösung behandelt. Nach 6 h Stimulation wurde das Medium

abgenommen. Die Zellen wurden mit 1x PBS von Mediumresten befreit. Danach wurden die Zellen mit dem 5x Passive Lysis Buffer der Fa. Promega lysiert.

### **3.6.3 Luciferase-Reportergen-Analyse mit Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader**

Die Firefly-Luziferase (aus *Photinus pyralis*) setzt ihr Substrat Luziferin unter Sauerstoffverbrauch und in Gegenwart der Cofaktoren ATP und  $Mg^{2+}$  in Oxyluziferin, AMP, Pyrophosphat und  $CO_2$  um. Bei dieser Reaktion erfolgt die Emission von Licht der Wellenlänge  $\lambda = 562$  nm, welches in einem Luminometer gemessen und in relativen Lichteinheiten quantifiziert ein Maß für die Transkriptionsrate des Reportergenkonstruktes ist (69). Die Renilla-Luziferase (aus *Renilla reniformis*) katalysiert die Reaktion von Coelenterazin (Renilla Luziferin) mit Sauerstoff zu Coelenteramid und  $CO_2$ , wobei kein ATP verbraucht und Licht der Wellenlänge  $\lambda = 480$  nm emittiert wird (101). Der Dual-Luciferase-Assay wurde mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) im Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad) ausgewertet. Die lysierten HEK293-Zellen (3.6.2) wurden bei 21 °C Umgebungstemperatur 25 min geschüttelt. Anschließend wurden 25  $\mu$ l Zelllysate aus jedem Well in eine Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. 900  $\mu$ l Luciferase Assay Reagent II (LAR II) wurden in einem Röhrchen mit dem entsprechenden Ansaugschlauch des Microplate-Readers angesaugt und nach Einlegen der Mikrotiterplatte jeweils 25  $\mu$ l pro Well injiziert. Daraufhin wurden die relativen Lichteinheiten pro Probe in acht Replikaten ausgelesen und somit die Firefly-Luziferase-Aktivität bestimmt. Zur Bestimmung der Renilla-Luziferase-Aktivität wurden 900  $\mu$ l des Stop & Glo® Reagent in einer 1:50 Verdünnung angesetzt. Diese wurde in einem Röhrchen ebenfalls mit einem anderen Ansaugschlauch verbunden und pro Well 25  $\mu$ l des Reagenz injiziert. Die relativen Lichteinheiten wurden pro Probe in acht Replikaten ausgelesen.

## **3.7 QUANTITATIVE ANALYSE VON CREM-SPLEIßVARIANTEN DURCH QUANTITATIVE-REAL-TIME-PCR**

### **3.7.1 qPCR mit Hydrolyse-Sonden und dem LightCycler® 480II**

Als quantitative-Real-Time-PCR wird eine Variation der PCR bezeichnet, die den quantitativen Nachweis der DNA-Amplifikation in Echtzeit mittels Fluoreszenz ermöglicht (46). Hydrolyse-Sonden (auch TaqMan-Sonden als Portmanteau-Wort aus *Taq*-Polymerase und Pac-Man) können verwendet werden, um die Spezifität der Methode zu erhöhen. In diesem Falle wird die Detektion unterschiedlicher CREM-Isoformen ermöglicht. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase (21) können zu amplifizierten Sequenzen komplementäre Sonden zersetzt werden (48). Im Falle der verwendeten Hydrolyse-Sonden ist das 5'-Ende kovalent mit einem Fluorophor verknüpft, wohingegen an das 3'-Ende ein Quencher gebunden ist. Im intakten Zustand absorbiert der Quencher die Fluoreszenz, die vom angeregten Fluorophor emittiert wird und gibt dafür Energie in Form von Wärme ab. Die Fluoreszenz der hydrolysierten Sonde kann somit nicht mehr durch Förster-Resonanzenergietransfer absorbiert werden und wird detektiert (45,68).

**Tabelle 5: : Übersicht der in der qPCR mit Hydrolyse-Sonden verwendeten Primer;**  
 Erläuterung der Abkürzungen: Mm = *Mus musculus*, Hs = *Homo sapiens*; Dir. = Ausrichtung;  
 For = sense; Rev = antisense; Tm = Schmelztemperatur (°C); Ta = Annealingtemperatur (°C)

<b>Spezies</b>	<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Dir.</b>	<b>Tm</b>	<b>Ta</b>
Mm	MmRT_CREMintronexon_B_for	GGCAAATGACCATGGAAACAGT	For	60	55
Mm	MmRT_CREMExonTheta2_for	CAGTGACTACCTCCTAATGGTT	For	60	55
Mm	MmRT_CREMintronexonIa_rev	ATGGCAATAAAGGTCTTTGAGGG	Rev	60	55
Mm	MmRT_CREMintronexonIb_rev	CTACTAATCTGTTTTGGGAGAGC	Rev	59	54
Mm	MmRT_CREMExonH_for	TCCTACTACTGCTTTGCCAC	For	60	55
Mm	MmRT_CREMExonB_E_for	CTCTAGCTCAGGTAGCAACAAT	For	60	55
Mm	MmRT_CREMintronexongamma_for	TCCCCATTTTACAGATGAGGAGA	For	60	55
Mm	MmRT_CREMintronexonX_for	CCAACATGGCTGTAAGTGGGA	For	60	55
Mm	MmRT_CREMExonB_Gamma_for	CTAGCTCAGATGAGGAGACTG	For	60	55
<b>Spezies</b>	<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Dir.</b>	<b>Tm</b>	<b>Ta</b>
Hs	HsRT_CREMExonB_for	GCTCATGTGCAGACTCAGAC	For	60	55
Hs	HsRT_CREMExonIa_rev	TTCAAGCACAGCCACACGAT	Rev	60	55
Hs	HsRT_CREMExonIb_rev	GACTTCCAGCACTGCAACT	Rev	60	55
Hs	HsRT_CREMExonB_E_for	GCTTTAGCTCAGGTAGCAG	For	59	54
Hs	HsRT_CREMExonB_G_for	GCTTTAGCTCAGTTGCTATAGC	For	60	55
Hs	HsRT_CREMExonX_for	GTGGTAGAGGAAACAAGACAGT	For	60	55
Hs	HsRT_CREMintronexonGamma_for	GTATCCCCATTTTACAGATGAGG	For	59	54
<b>Spezies</b>	<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Dir.</b>	<b>Tm</b>	<b>Ta</b>
Mm	MmRT_HPRT_001_for	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	For	58	53
Mm	MmRT_HPRT_001_rev	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	Rev	57	52
<b>Spezies</b>	<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Dir.</b>	<b>Tm</b>	<b>Ta</b>
Hs	HsRT_HPRT_001_for	GACCAGTCAACAGGGGACATA	For	59	54
Hs	HsRT_HPRT_001_rev	TCCACAATCAAGACATTCTTTCC	Rev	57	52

Tabelle 6: **Übersicht der in der qPCR verwendeten Hydrolyse-Sonden**; Erläuterung der Abkürzungen: Mm = Mus musculus, Hs = Homo sapiens; Klass. = Klasse der Sonde; 5' = 5'-Modifikation; 3' = 3'-Modifikation; FAM = 6-Carboxyfluorescein; BHQ 1 = Black Hole Quencher 1

Spezies	Sondenbezeichnung	Klass.	Sequenz	5'	3'
Mm	Mm_CREMTaq_B_H	Taqman	GCTCAGCTGCCACAGGTGACATGC	FAM	BHQ1
Mm	Mm_CREMTaq_B_Gamma	Taqman	CCTACTCTAGCTCAGATGAGGAGACTGACC	FAM	BHQ1
Mm	Mm_CREMTaq_Gamma_H	Taqman	GGCTGCTGCCACAGGTGACATGC	FAM	BHQ1
Mm	Mm_CREMTaq_F_H	Taqman	ACGGGGCAATACACTGCCACAGGT	FAM	BHQ1
Mm	Mm_CREMTaq_F_Gamma	Taqman	ACGGGGCAATACAATGAGGAGACTGACC	FAM	BHQ1
Mm	Mm_CREMTaq_X_H2	Taqman	GAAACTGCTGCCACAGGTGACATGCC	FAM	BHQ1
Mm	Mm_CREMTaq_H	Taqman	ACAAGGTGTGGTGTGGCTGCCTC	FAM	BHQ1
Spezies	Sondenbezeichnung	Klass.	Sequenz	5'	3'
Hs	Hs_CREMTaq_B_H	Taqman	CCCTGCTTTAGCTCAGCTGCCACT	FAM	BHQ1
Hs	Hs_CREMTaq_Psi_G	Taqman	TTCTGCTGATGGATTGAGTTGCTATAGCCC	FAM	BHQ1
Hs	Hs_CREMTaq_F_H	Taqman	CGGGGCAATACACTGCCACTGGT	FAM	BHQ1
Hs	Hs_CREMTaq_F_Gamma	Taqman	AGACTAGCACGGGGCAATACAATGAGGA	FAM	BHQ1
Hs	Hs_CREMTaq_G_H	Taqman	GCCAGGTTGTTGTTCAAGCTGCCACT	FAM	BHQ1
Hs	Hs_CREMTaq_Gamma_H	Taqman	GTCACATGGCTGCTGCCACTGGT	FAM	BHQ1
Hs	Hs_CREMTaq_X_H	Taqman	GGAGATGACACAGCTGCCACTGGTGA	FAM	BHQ1

Die Hydrolyse-Sonden wurden von der Fa. Eurofins MWG Synthesis (Ebersberg) hergestellt. Das 6-Carboxyfluorescein hat ein Absorptionsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum bei 520 nm, der Black Hole Quencher 1 hat ein Absorptionsspektrum von 480-580 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 534 nm.

Für die Quantifizierung des Referenzgens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) verwendete Hydrolyse-Sonden aus der Universal Probelibrary (UPL) (Roche):

#95: CTGGGACT mit MmRT\_HPRT\_001\_for und mit MmRT\_HPRT\_001\_rev

#22: CTCCACCA mit HsRT\_HPRT\_001\_for und mit HsRT\_HPRT\_001\_rev

Die UPL-Sonden aus Locked Nucleic Acids (LNA) besitzen eine 5'-Modifikation mit 6-Carboxyfluorescein und sind am 3'-Ende mit einem Dark Quencher Dye verbunden. Für die Ansätze der qPCR wurde das LightCycler® 480 Probes Master-Kit (Roche) verwendet.

Der Ansatz erfolgte auf Eis. Verwendet wurden 96-Well-Mikrotiterplatten und sterile Pipettenspitzen mit Filter. Aus humanen Proben von Patienten ohne Herzinsuffizienz (NF) und mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) isolierte

Gesamt-RNA wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Gesamt-RNA aus Herzen von 8-10 Wochen alten, männlichen FVB/N-Mäusen wurde eingesetzt. Ein Teil der Mäuse wurde mittels osmotischer Minipumpen (ALZET®/ DURECT Corporation) über 10 h, 24 h und 7 d mit Isoprenalin (3mg/ kg KG/ d) stimuliert. Eine Standardreihe aus jeweils 10 zusammengeführten Proben wurde unverdünnt und mit den Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:20 hergestellt. Dabei wurden immer entweder NF-oder DCM-Proben sowie bei Mäusen die jeweiligen Proben einer Stimulationsdauer gepoolt. Zunächst wurde der unten beschriebene Ansatz ohne cDNA-Template gemischt und dann auf die jeweiligen Wells verteilt. Danach wurden entweder 2 µl der verdünnten cDNA der Standardreihe, der Proben 1-10 oder das gleiche Volumen Nuklease-freies H<sub>2</sub>O für die Negativprobe hinzugefügt.

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Nuklease-freies dH <sub>2</sub> O		5,8
Sense-Primer (10 µM)	0,5 µM	1,0
Antisense-Primer (10 µM)	0,5 µM	1,0
Hydrolyse-Sonde (10 µM)	0,1 µM	0,2
2x Probes Master	1x	10,0
cDNA-Template		2,0

45 Zyklen PCR wurden nach folgendem Programm im LightCycler® 480II (Roche) ausgeführt:

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit (s)</b>	<b>Ramp Rate (°C/ s)</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	95	10	4,4
<b>Zyklus:</b>			
<b>Denaturierung</b>	95	10	4,4
<b>Annealing</b>	60	30	2,2
<b>Extension</b>	72	5	4,4
<b>Gefolgt von:</b>			

<b>Cooling</b>	40	10	1,5
----------------	----	----	-----

Die Detektion der freigesetzten Fluoreszenz erfolgte im Extensionsschritt des Zyklus.

### **3.7.2 Quantifizierung der Daten**

Die quantitative Analyse der Rohdaten erfolgte mit der REST 2008-Software Version 2.0.7 (90) (Corbett Research/ Qiagen und Michael W. Pfaffl). Die Expression des Zielgens wurde auf die Expression des Referenzgens HPRT1 normalisiert. Aus den Crossing-Point ( $C_p$ )-Werten zweier Gruppen wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler bestimmt. Die Reaktionseffizienz wurde in die Berechnung des Standardfehlers einbezogen. Die Signifikanztestung zwischen den Mittelwerten der Kontrolle und den Mittelwerten der Vergleichsgruppe erfolgte durch den Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test<sup>©</sup> (91).

## 4 ERGEBNISSE

---

### 4.1 IDENTIFIKATION VON CREM-SPLEIßVARIANTEN

Im Folgenden werden die Spleißvarianten, um Verwechslungen vorzubeugen, durch ihre Exonzusammenstellung beschrieben, da bei der Benennung der mRNA-Isoformen uneinheitlich vorgegangen wurde. So wird beispielsweise die Spleißvariante B-E-F-H-Ia als CREM- $\alpha$ (41,112) bezeichnet diese Benennung wurde vorher jedoch bereits für die Spleißvariante B-E-F- $\gamma$ -H-Ia (40) vergeben. Die Benennung der Exons erfolgt nach Walker et al. (112).

#### 4.1.1 Identifizierte CREM-Spleißvarianten im Herzen der Maus

##### CREM-Spleißvarianten in C57BL/6-Ventrikelhomogenaten

Mit Hilfe der dargestellten Methodik (Übersicht: Abbildung 5) gelang es, in Gesamt-RNA aus Herzhomogenaten von C57BL/6-WT-Tieren sechs Spleißvarianten zu identifizieren. Transkribiert ausgehend von P1 oder P5 wurden mRNA-Isoformen mit beiden DBDs gefunden, wie in den unten gezeigten Abbildungen dargestellt wird. Mit der DBD I sind es B-H-Ia, B-E-F-H-Ia. Die DBD II enthalten die Isoformen B-H-Ib, B- $\gamma$ -H-Ib, B-E-F-H-Ib und B-E-F- $\gamma$ -H-Ib. Eine heteronukleäre RNA (hnRNA) B-H-Ia-Ib, aus der die Isoformen B-H-Ia oder B-H-Ib gespleißt werden können, wurde ebenfalls sequenziert.

Tabelle 7: **Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren B-Ia und B-Ib amplifiziert werden konnten**; die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des Crem-Gens, die roten Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons. Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4.

→												←	←
	B	L	Θ1	Θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib
	x										x	x	
	x										x		x
	x										x	x	x
	x									x	x		x
	x					x	x				x	x	
	x					x	x				x		x
	x					x	x			x	x		x

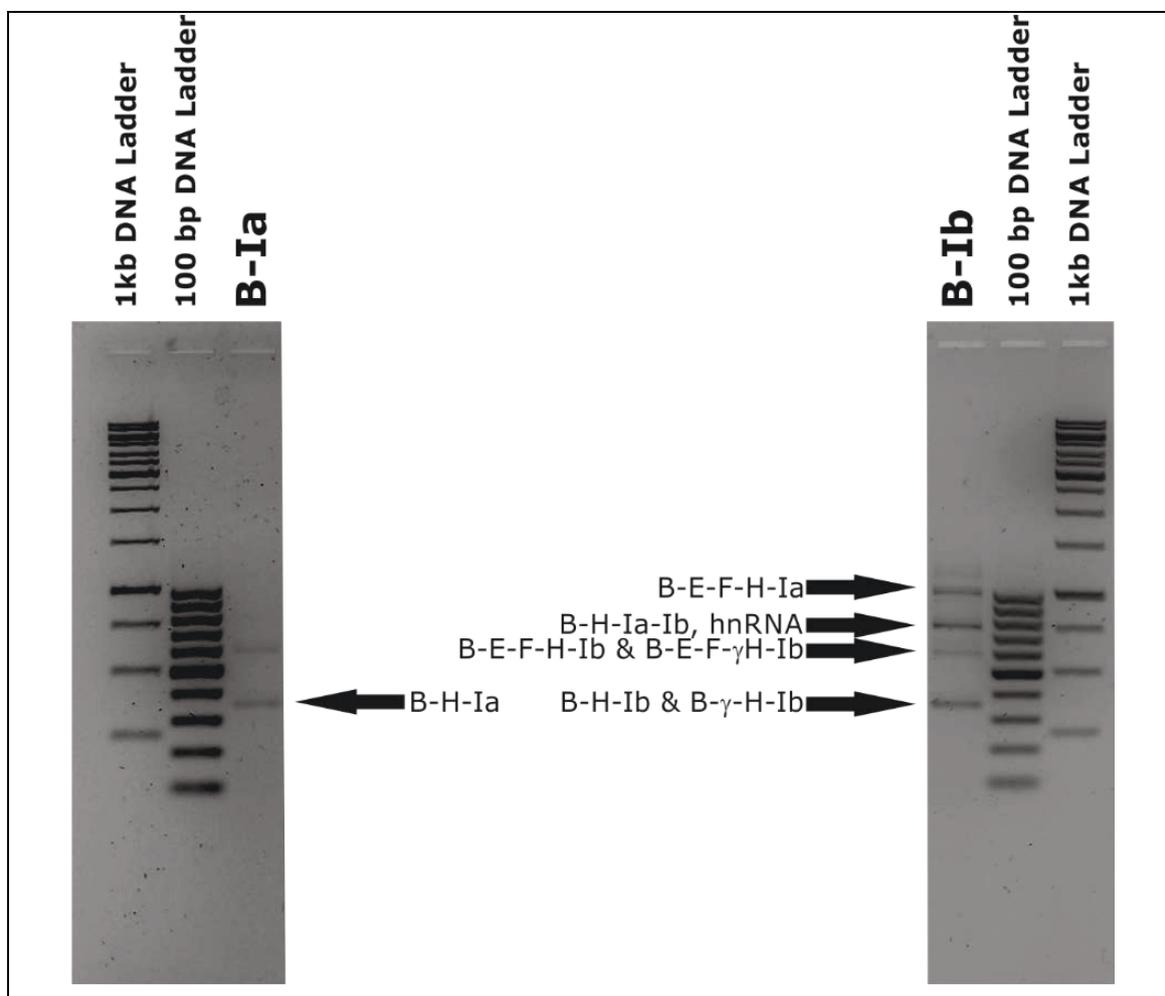


Abbildung 12: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P1/P5 in Gesamt-RNA von Mäuseherzen**; gezeigt werden Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA aus Herzhomogenaten von C57BL/6-WT-Tieren. Den Banden sind die entsprechenden sequenzierten CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

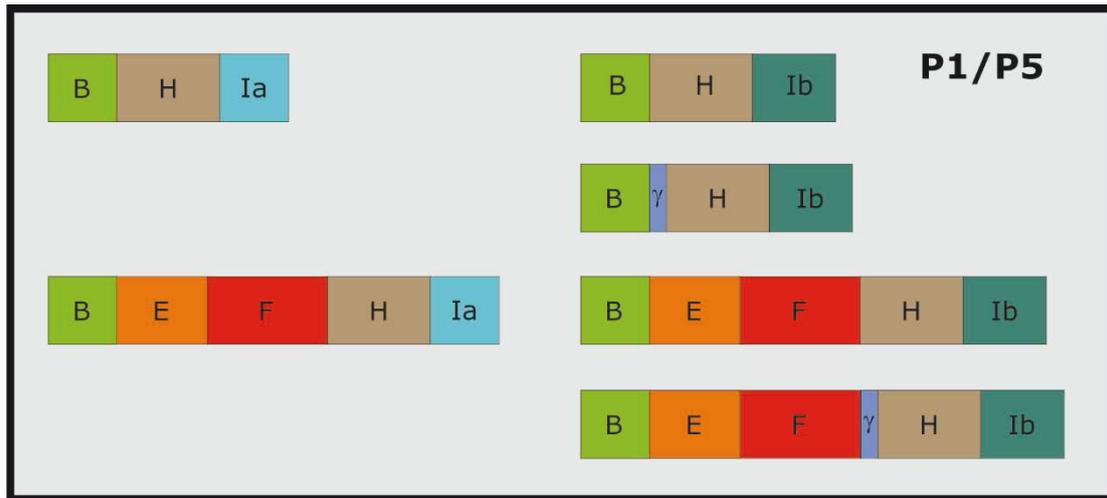


Abbildung 13: **Übersicht der identifizierten CREM-Spleißvarianten in C57BL/6-Ventrikelhomogenaten**; die sequenzierten Isoformen sind farblich entsprechend Abbildung 4 kodiert und dem Promotor zugeordnet.

### **CREM-Spleißvarianten in Kardiomyozyten-RNA von C57BL/6-Mäusen**

In Kardiomyozyten-RNA von C57BL/6-WT-Tieren wurden ausgehend vom P1/P5-Promotor sechs Spleißvarianten identifiziert (siehe Abbildung 14), von denen vier die DBD I und zwei die DBD II besitzen. Die DBD I enthielten die Isoformen B-H-Ia, B- $\gamma$ -H-Ia, B-E-F-H-Ia und B-E-F- $\gamma$ -H-Ia. Die Spleißvariante B-E-F-H-Ia hat eine Länge von 654 bp. Da sie aus zwei DNA-Banden isoliert wurde, von denen eine auf der Höhe von etwa 550 bp und die andere auf der Höhe von etwa 700 bp lief, kann man annehmen, dass die Isoform zur 700-bp-Bande gehört. Bei den Spleißvarianten, deren Länge nicht mit der DNA-Bande, aus der sie aufgereinigt wurde, übereinstimmt, wird von einer Kreuzkontamination beim Ausschneiden der Banden ausgegangen. Die Isoformen B-H-Ib und B- $\gamma$ -H-Ib werden als einzige Isoformen mit der DBD II in Kardiomyozyten-RNA exprimiert. Drei Proben wiesen die hnRNA B-H-Ia-Ib auf.

Tabelle 8: **Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren B-Iag und B-Ibg amplifiziert werden konnten;** die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des Crem-Gens, die roten Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons. Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4.

→												←	←
B	L	Θ1	Θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib	
x										x	x		
x										x		x	
x										x	x	x	
x									x	x	x		x
x									x	x		x	
x					x	x				x	x		
x					x	x			x	x	x		

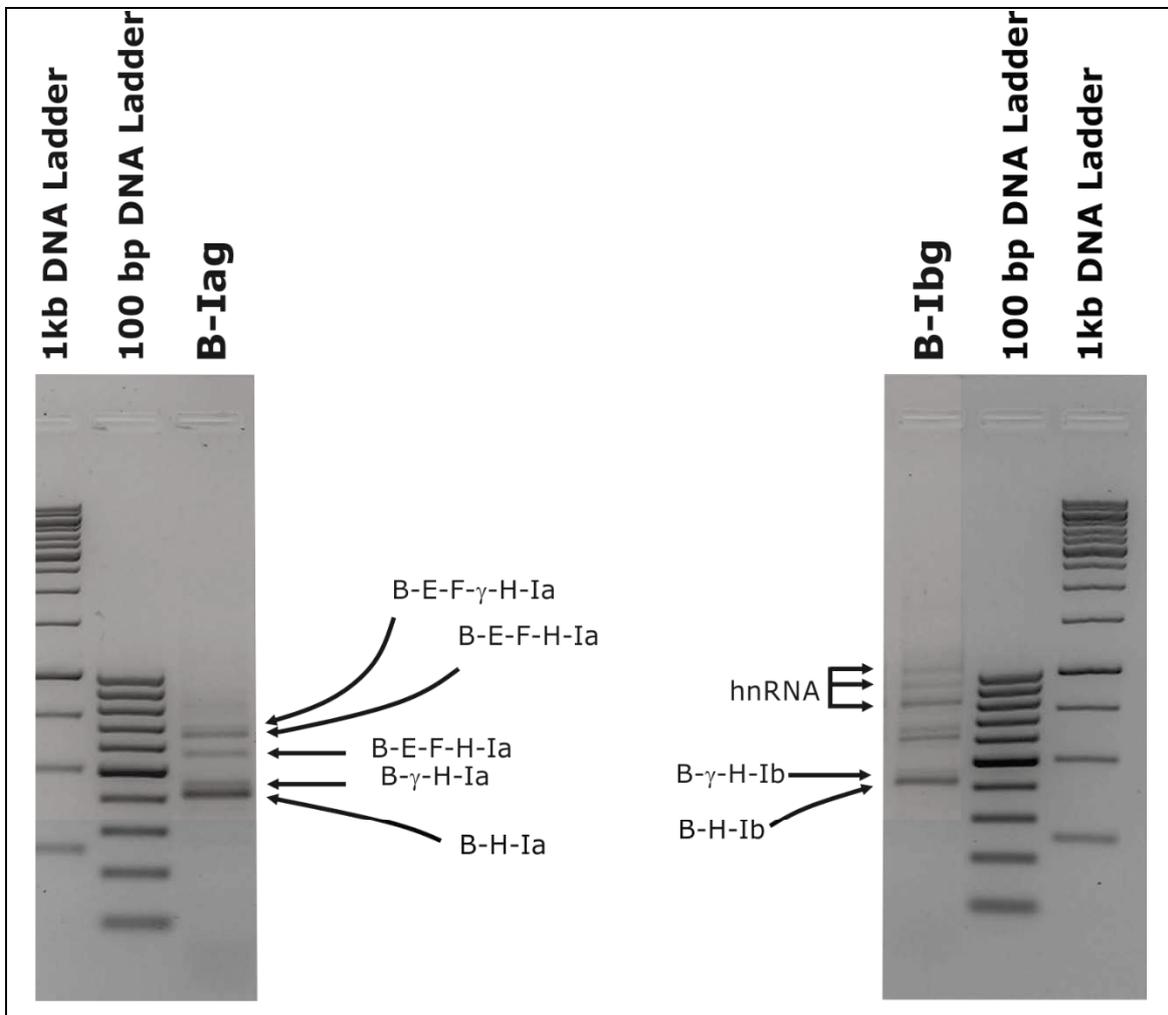


Abbildung 14: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P1/P5 in Kardiomyozyten-RNA von Mäuseherzen;** gezeigt werden Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA von Kardiomyozyten-RNA von C57BL/6-WT Tieren. Den Banden sind die entsprechenden sequenzierten CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Transkribiert ausgehend von P4 fand sich in Kardiomyozyten-RNA von C57BL/6-WT-Tieren auch eine mRNA-Isoform beginnend mit Exon  $\Theta 2$  (siehe Abbildung 15). Exon  $\Theta 2$  wurde, wie von Gellersen et al. (42) für Spleißvarianten der Testes beschrieben, an Exon C gespleißt, um die Isoform  $\Theta 2$ -C-E-F-H-Ia zu generieren.

Tabelle 9: **Übersicht der Spleißvariante, die mit dem Primerpaar  $\Theta 2$ -Iag amplifiziert werden konnte**; die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des Crem-Gens, die roten Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons. Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4.

			→									←	
B	L	$\Theta 1$	$\Theta 2$	C	E	F	G	X	$\gamma$	H	Ia	Ib	
			x	x	x	x				x	x		

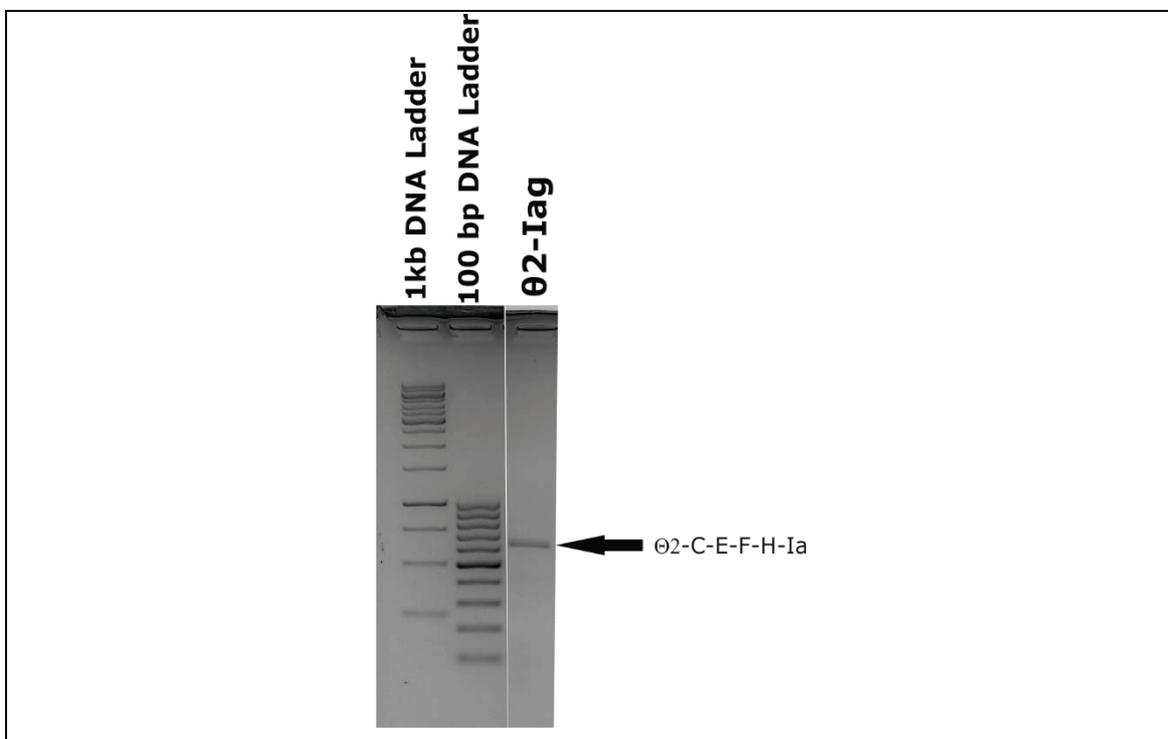


Abbildung 15: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P4 in Kardiomyozyten-RNA von Mäuseherzen**; gezeigt werden Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA von Kardiomyozyten-RNA von C57BL/6-WT Tieren. Der Bande ist die entsprechend sequenzierte Isoform zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Auch die ICER-Spleißvarianten X-H-Ia und X-H-Ib werden in murinen Kardiomyozyten exprimiert (siehe Abbildung 16). Es fanden sich hingegen keine Isoformen, die Exon  $\gamma$  enthalten.

Tabelle 10: **Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren X2-Iag und X2-Ibg amplifiziert werden konnten**; die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des Crem-Gens, die roten Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons. Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4.

									→			←	←
B	L	Θ1	Θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib	
								x		x	x		
								x		x		x	

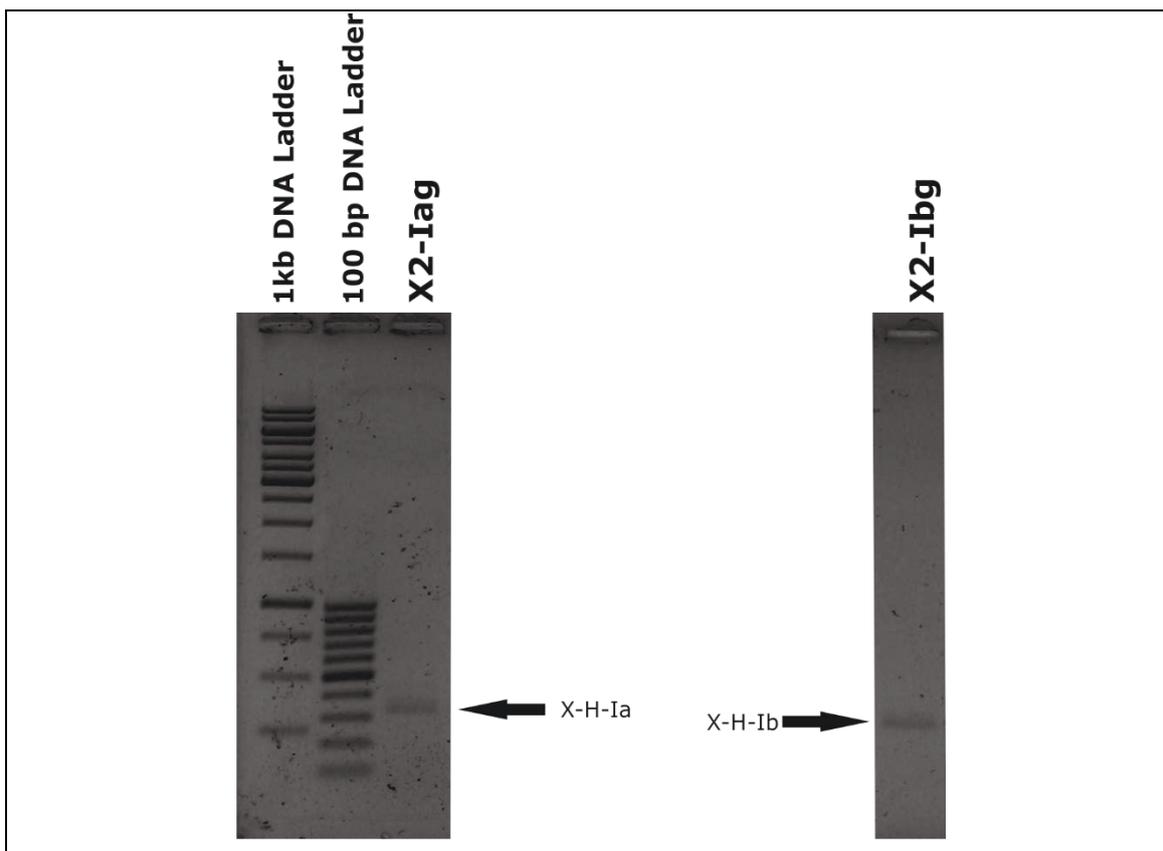


Abbildung 16: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P2 in Kardiomyozyten-RNA von Mäuseherzen**; gezeigt werden Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA von Kardiomyozyten-RNA von C57BL/6-WT Tieren. Den Banden sind die entsprechenden sequenzierten CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Der neu identifizierte P6 bringt in C57BL/6-WT-Kardiomyozyten zwei smICER-Spleißvarianten mit unterschiedlicher DBD hervor, wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist. Die längeren smICER-Isoformen  $\gamma$ -H-Ia und  $\gamma$ -H-Ib konnten isoliert werden.

Tabelle 11: **Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren P6-Iag und P6-Ibg amplifiziert werden konnten**; die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des Crem-Gens, die Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons (im Falle des grünen Pfeiles beginnt der Primer im Intron). Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4.

										→		←	←
B	L	⊖1	⊖2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib	
									x	x	x		
									x	x		x	

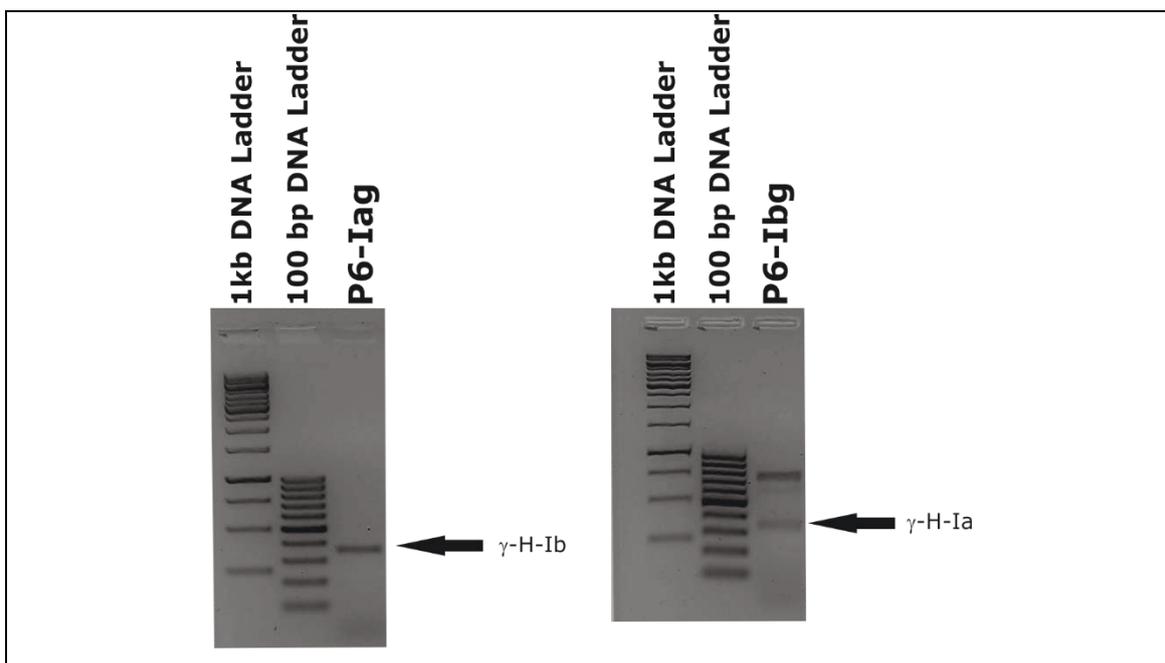


Abbildung 17: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P6 in Kardiomyozyten-RNA von Mäuseherzen**; gezeigt werden Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA von Kardiomyozyten-RNA von C57BL/6-WT Tieren. Den Banden sind die entsprechenden sequenzierten Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Zusammenfassend werden in C57BL/6-Kardiomyozyten, wie in Abbildung 18 dargestellt, elf Spleißvarianten exprimiert. Die Expression dieser Isoformen wird von fünf Promotoren moduliert, wobei von den Promotoren P1/P5, P2 und P6 ausgehend Transkripte mit beiden DBDs generiert werden. Lediglich ⊖2-C-E-F-H-Ia codiert für eine glutaminreiche Domäne. Dahingegen gibt es von P4 ausgehend keine Isoformen mit der DBD II und überhaupt keine, die ausgehend von P3 entstehen. In drei Spleißvarianten ist eine KID vorhanden. B-H-Ia/Ib und B-E-F-H-Ia sind auch mit Exon γ vorhanden. Kein Transkript

ausgehend von P1/P5, das die DBD II enthält, codiert für eine KID. ICER- und smICER-mRNAs sind mit beiden DBDs vorhanden. Die ICER-Isoformen enthalten kein Exon  $\gamma$ , im Kontrast sind die smICER-Spleißvarianten nicht ohne dieses Exon vorhanden.

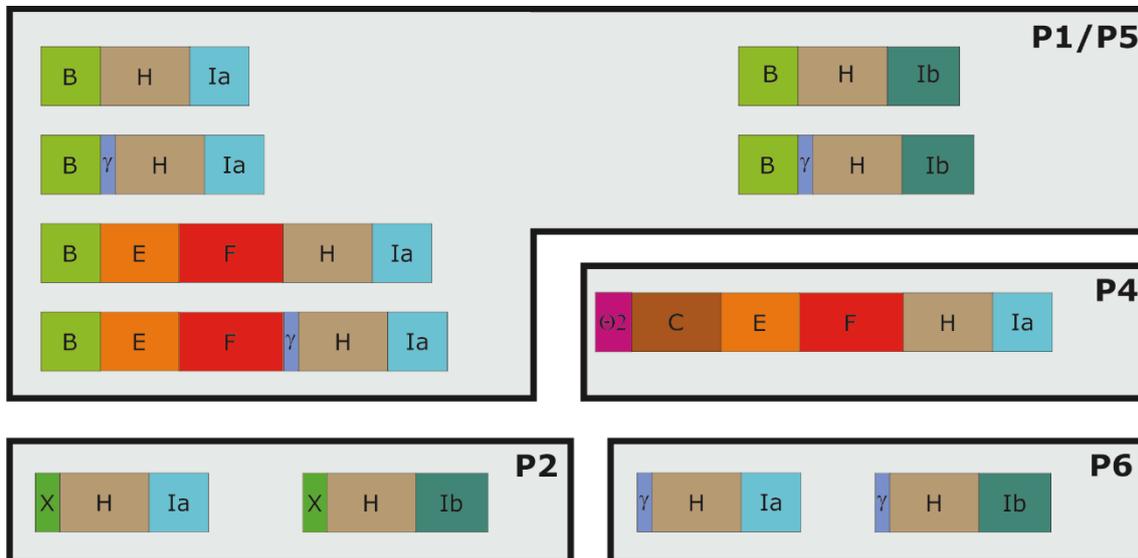


Abbildung 18: **Übersicht der identifizierten CREM-Spleißvarianten in C57BL/6-Kardiomyozyten;** die sequenzierten Isoformen sind farblich entsprechend Abbildung 4 kodiert und nach Promotoren geordnet.

### Durch 5'-RACE identifizierte CREM-Spleißvarianten in FVBN-Ventrikelhomogenaten

Die 5'-RACE-PCR mit der Gesamt-RNA der isoprenalinstimulierten FVB/N-Herzen zeigte die Expression von sechs unterschiedlichen Transkripten, wie sie in Abbildung 19 dargestellt werden. Die vier smICER-Spleißvarianten  $\gamma$ -H-Ia, H-Ia,  $\gamma$ -H-Ib und H-Ib werden von P6 ausgehend transkribiert und weisen eine bisher unbekannte 5'-UTR auf. Sie entsprechen den von Seidl et al. (98) beschriebenen smICER-Transkripten mit DBD I oder II und alternativem Gebrauch des Exons  $\gamma$ . Ausgehend vom ICER-Promotor P2 konnten die zwei ICER-Isoformen X- $\gamma$ -H-Ia und X- $\gamma$ -H-Ib identifiziert werden. ICER-Transkripte ohne Exon  $\gamma$  wurden im Ausgangsmaterial nicht nachgewiesen.

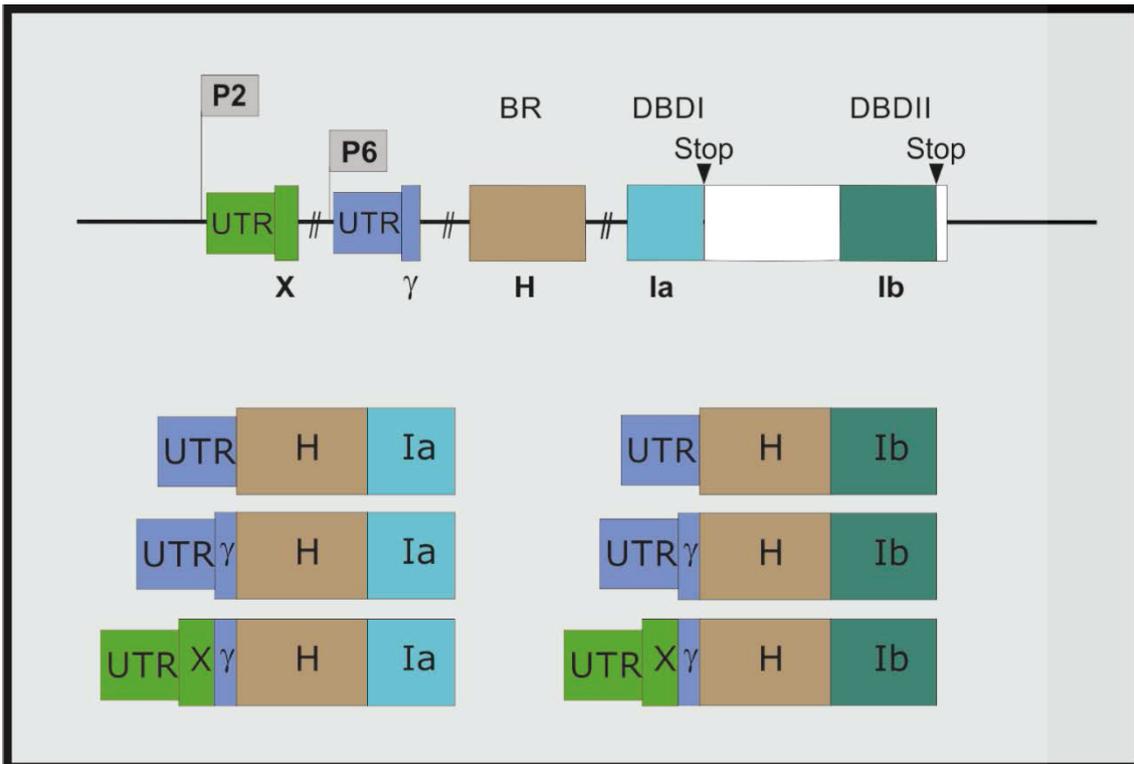


Abbildung 19: **Übersicht der durch 5'-RACE identifizierten CREM-Spleißvarianten in FVB/N-Ventrikelhomogenaten**; für die 5'-RACE-PCR wurde cDNA von FVBN-Tieren, die 10h mit Isoprenalin (3mg/kg KG/d) mittels osmotischen Minipumpen stimuliert wurden, als Template verwendet. Es wurde ein vorher unbekannter 5'-UTR in Exon  $\gamma$  gefunden.

#### 4.1.2 Identifizierte CREM-Spleißvarianten im Herzen des Menschen

##### **CREM-Spleißvarianten in humanem, nicht-insuffizientem Herzgewebe**

Zehn Spleißvarianten konnten in humanem Herzgewebe von Patienten ohne Herzinsuffizienz sequenziert werden (Übersicht siehe Abbildung 20). Dies sind, ausgehend von P1/P5, die sechs Isoformen B-H-Ib, B-F-H-Ia, B-G-H-Ia, B- $\Psi$ -G-H-Ia, B-E-F-H-Ia und B-E-F-H-Ia, ausgehend vom ICER-Promotor die drei Spleißvarianten X-H-Ia, X-H-Ib und X- $\gamma$ -H-Ib und ausgehend vom smICER-Promotor das Transkript  $\gamma$ -H-Ia. Durch die Exons F, G und  $\Psi$  werden frühzeitige Stopcodons eingeführt, die den offenen Leserahmen (ORF) unterbrechen. Die Spleißvarianten B-G-H-Ia und B- $\Psi$ -G-H-Ia sowie Isoformen mit Exon  $\Psi$  wurden von Gellersen et al. in humanen endometrialen Stromazellen beschrieben (41). Allerdings enthielten die Isoformen mit Exon  $\Psi$  entweder die KID oder die zweite glutaminreiche Domäne. Die ICER-

Variante X- $\gamma$ -H-Ib konnte nicht mit der ersten DBD identifiziert werden. Weder konnte das smICER-Transkript  $\gamma$ -H-Ia mit zweiter DBD, noch konnten Isoformen ohne Exon  $\gamma$  sequenziert werden.

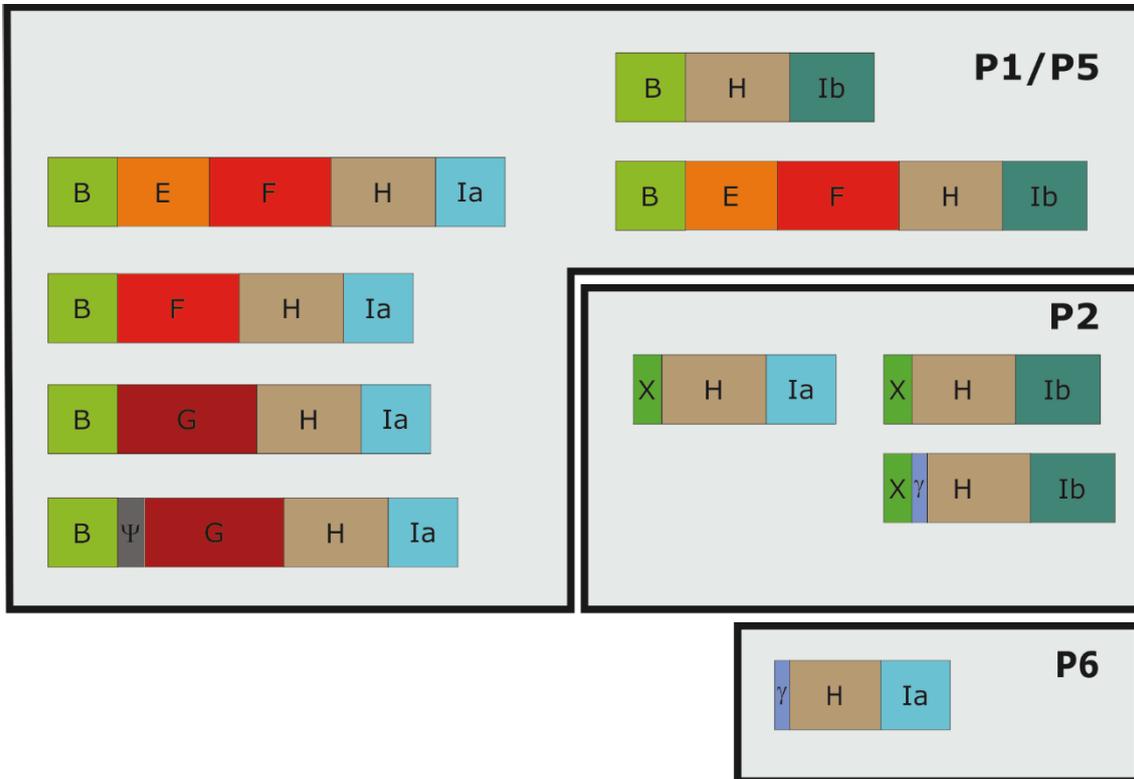


Abbildung 20: **Übersicht der sequenzierten CREM-Spleißvarianten in Ventrikelhomogenaten von Patienten ohne Herzinsuffizienz (Non-Failing);** die sequenzierten Isoformen sind farblich entsprechend Abbildung 4 kodiert und den Promotoren zugeordnet.

### **CREM-Spleißvarianten in humanem, insuffizientem Herzgewebe von Patienten mit DCM**

In humanem DCM-Herzgewebe konnten sechs Isoformen identifiziert werden (Übersicht siehe Abbildung 21), die ausgehend von P1/P5 transkribiert werden. Es handelt sich um die Transkripte B-H-Ia, B-H-Ib, B-G-H-Ia und B-G-H-Ib, B-E-F-H-Ia und B-E-F-H-Ib. Es sind jeweils beide DBDs vertreten, wobei zwei Isoformen die glutaminreiche Transaktivierungsdomäne  $\tau$ 2

kodieren und zwei weitere Isoformen die KID. Durch Exon G wird ein frühzeitiges Stoppcodon eingeführt.

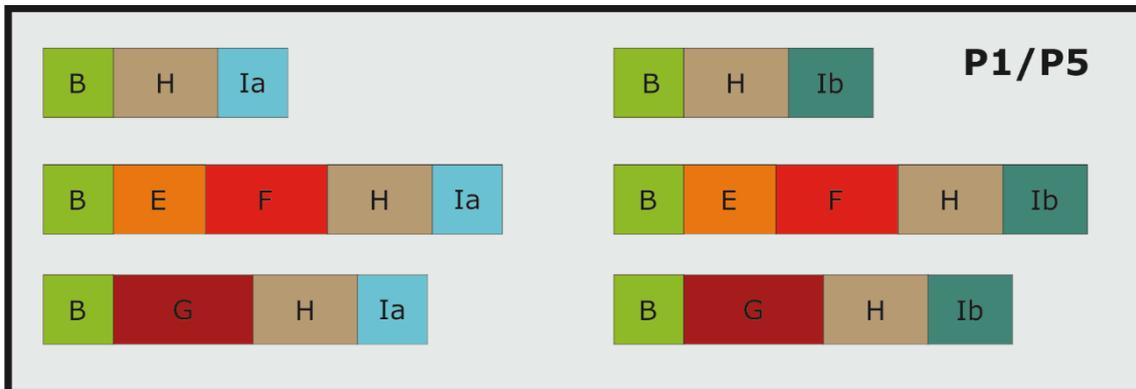


Abbildung 21: **Übersicht der sequenzierten CREM-Spleißvarianten in Ventrikelhomogenaten von Patienten mit DCM;** die sequenzierten Isoformen sind farblich entsprechend Abbildung 4 kodiert und dem Promotor zugeordnet.

### **Nachfolgende Abbildungen zur Identifikation von CREM-Spleißvarianten in humanem Herzgewebe**

Bei den nachfolgenden Abbildungen wurden, wie oben beschrieben, die sequenzierten Spleißvarianten sowohl dem Herzgewebe von DCM-Patienten als auch NF-Herzgewebe zugeordnet. Diese Zuordnung wurde aufgrund des korrespondierenden Migrationsverhaltens der CREM-cDNA in der Agarosegelelektrophorese getroffen. Dies lässt vermuten, dass die Transkripte, obwohl sie teilweise nicht in DCM- und NF-Proben sequenziert werden konnten, dennoch in beiden Ausgangsmaterialien vorhanden sind.

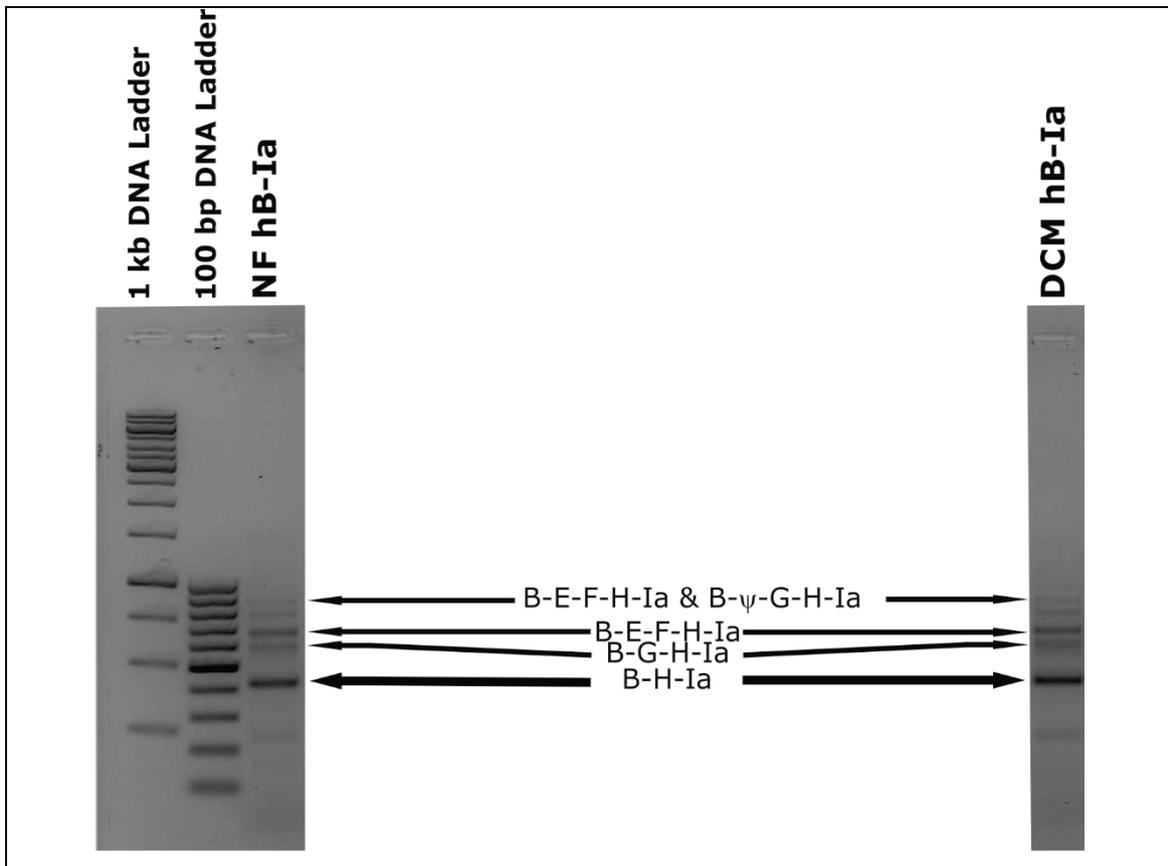


Abbildung 22: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P1 in Gesamt-RNA von humanen Herzen;** die Abbildung zeigt Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA aus Herzhomogenaten humaner Proben von Probanden mit und ohne DCM. Den DNA-Banden sind die entsprechenden CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Tabelle 12: **Übersicht der Spleißvarianten, die mit dem Primerpaar hB-Ia amplifiziert werden konnten;** die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des CREM-Gens, die roten Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons. Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4. Es handelt sich um eine kumulative Aufführung der in NF- und DCM-Hezen identifizierten Spleißvarianten, die mit dem Primerpaar hB-Ia amplifiziert werden konnten (separat: Abbildung 20 und Abbildung 21).

→	B	Ψ	Θ1	Θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib	←
x											x	x		
x								x			x	x		
x	x							x			x	x		
x						x	x				x	x		

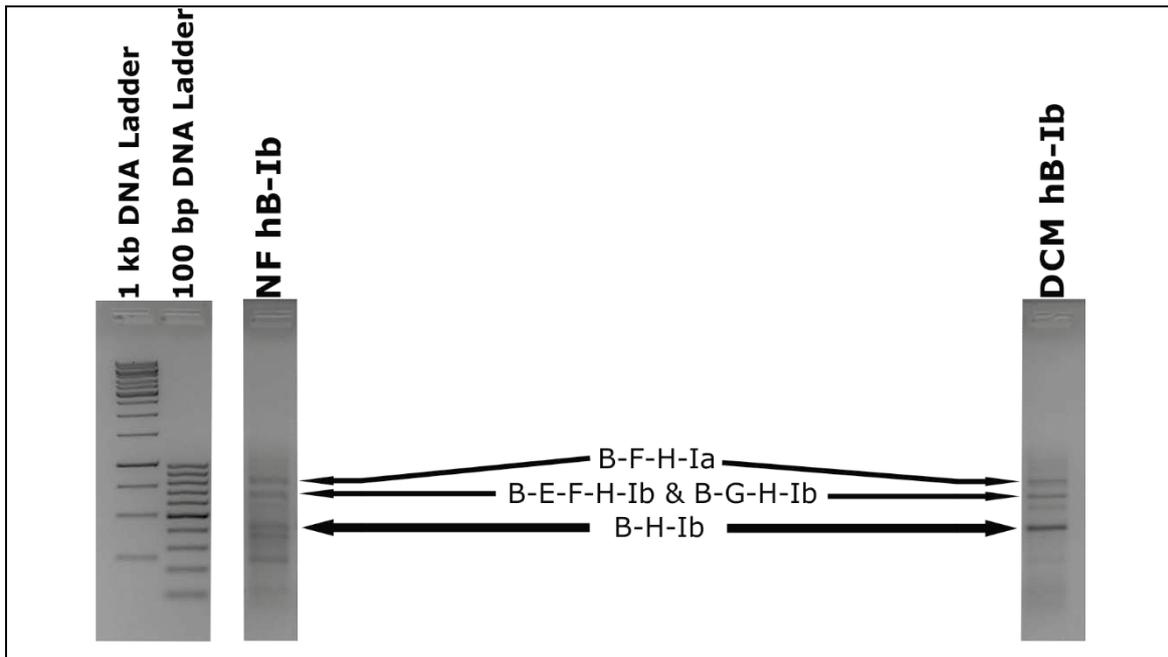


Abbildung 23: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P1 in Gesamt-RNA von humanen Herzen;** die Abbildung zeigt Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA aus Herzhomogenaten humaner Proben von Probanden mit und ohne DCM. Den DNA-Banden sind die entsprechenden CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Tabelle 13: **Übersicht der Spleißvarianten, die mit dem Primerpaar hB-Ib amplifiziert werden konnten;** Die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des CREM-Gens, die roten Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons. Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4. Es handelt sich um eine kumulative Aufzählung der in NF- und DCM-Heizen identifizierten Spleißvarianten, die mit dem Primerpaar hB-Ib amplifiziert werden konnten (separat: Abbildung 20 und Abbildung 21).

→	B	Ψ	Θ1	Θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib	←
x											x		x	
x								x			x		x	
x							x				x	x		
x						x	x				x		x	

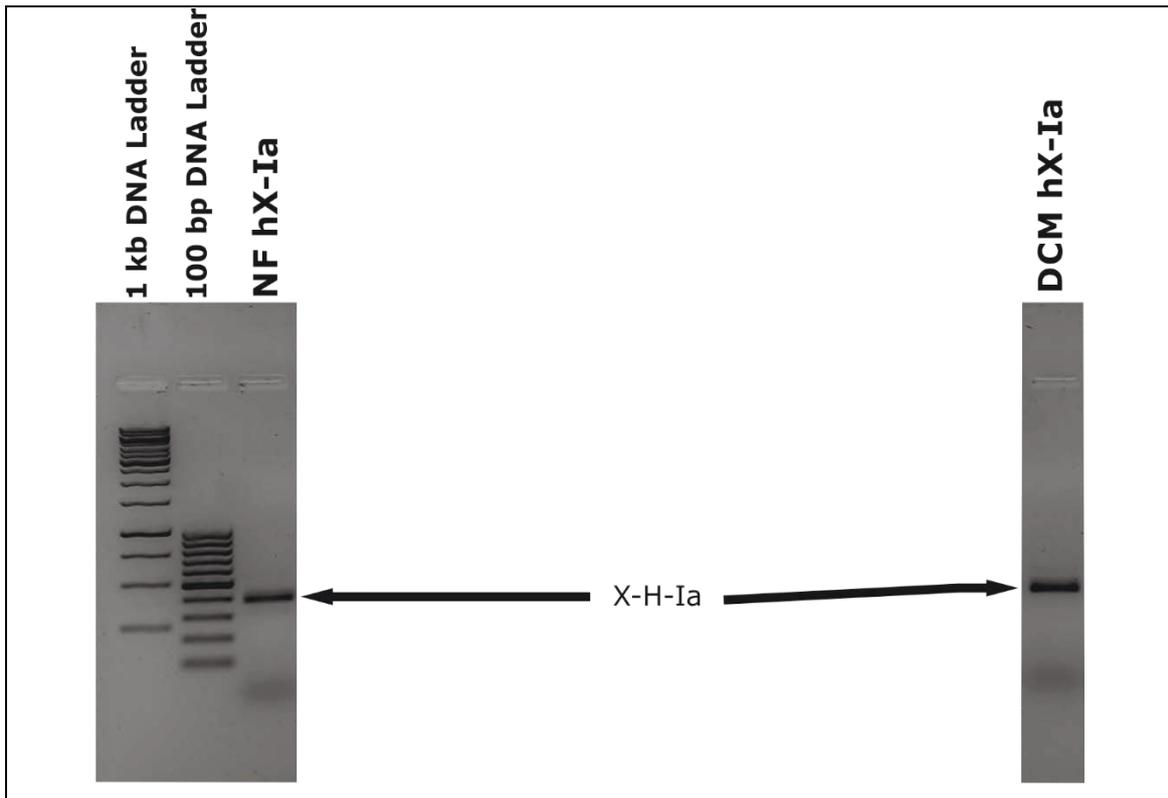


Abbildung 24: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P2 in Gesamt-RNA von humanen Herzen;** die Abbildung zeigt Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA aus Herzhomogenaten humaner Proben von Probanden mit und ohne DCM. Den DNA-Banden sind die entsprechenden CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Tabelle 14: **Übersicht der Spleißvariante, die mit dem Primerpaar hX-Ia amplifiziert werden konnte;** die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des CREM-Gens, die roten Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons. Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4.

								→			←	
B	Ψ	θ1	θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib
								x		x	x	

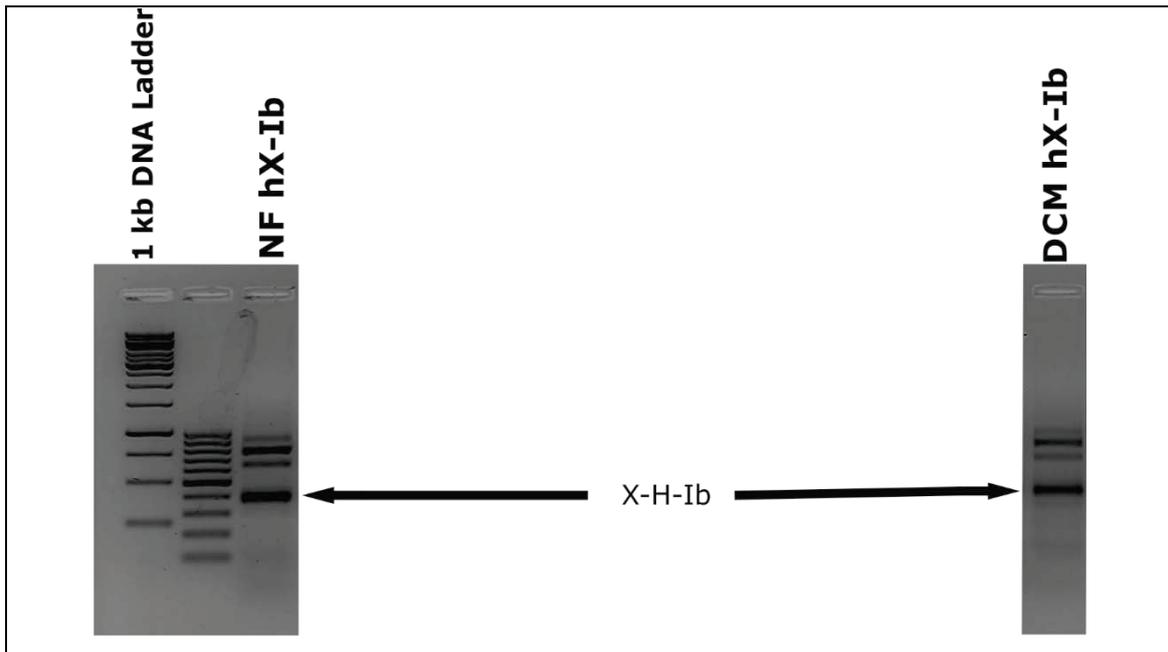


Abbildung 25: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P2 in Gesamt-RNA von humanen Herzen;** die Abbildung zeigt Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA aus Herzhomogenaten humaner Proben von Probanden mit und ohne DCM. Den DNA-Banden sind die entsprechenden CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Tabelle 15: **Übersicht der Spleißvariante, die mit dem Primerpaar hX-Ib im NF-Herzen amplifiziert werden konnte;** die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des Crem-Gens, die roten Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons. Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4.

									→				←
B	Ψ	θ1	θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib	
								x		x		x	

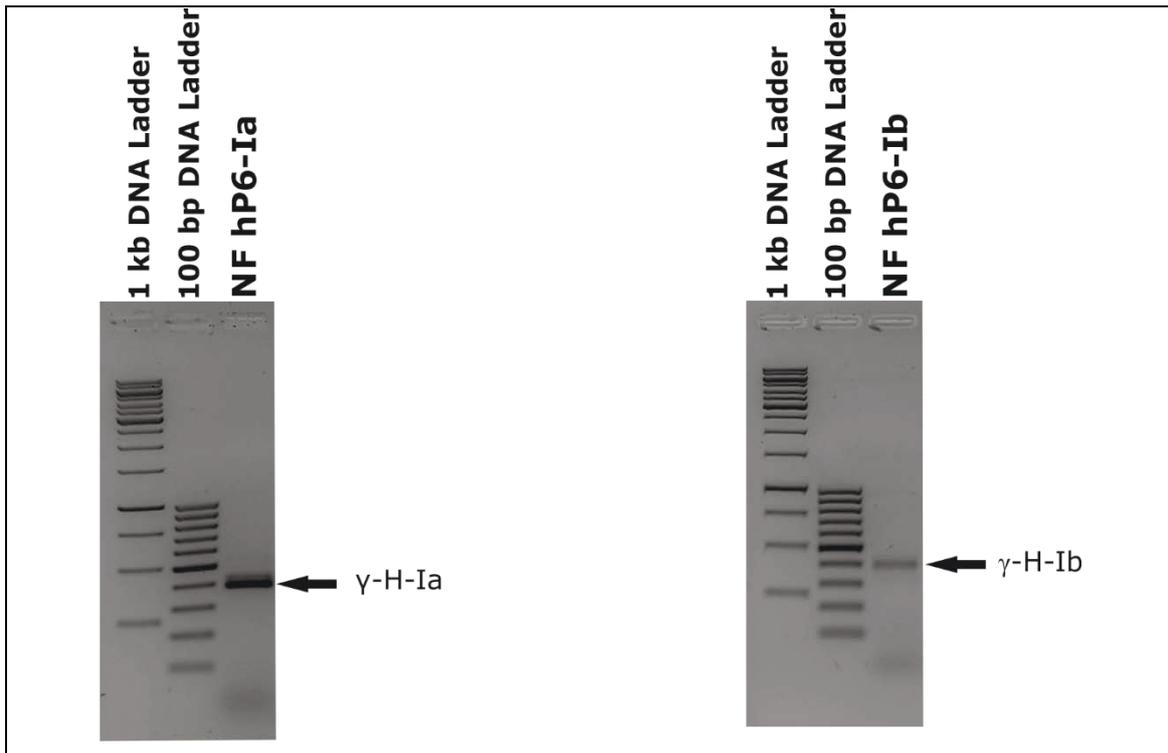


Abbildung 26: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P6 in Gesamt-RNA von humanen Herzen;** Die Abbildung zeigt Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA aus Herzhomogenaten humaner Proben von Probanden mit und ohne DCM. Den DNA-Banden sind die entsprechenden CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

Tabelle 16: **Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren hP6-Ia und hP6-Ib in NF-Hezen amplifiziert werden konnten;** Die Buchstaben in der zweiten Zeile repräsentieren den Aufbau des Crem-Gens, die Pfeile die Lage der Primer in den entsprechenden Exons (im Falle des grünen Pfeiles beginnt der Primer im Intron). Die farbliche Codierung entspricht Abbildung 4.

										→			←
B	Ψ	Θ1	Θ2	C	E	F	G	X	γ	H	Ia	Ib	
									x	x	x		
								x	x	x		x	

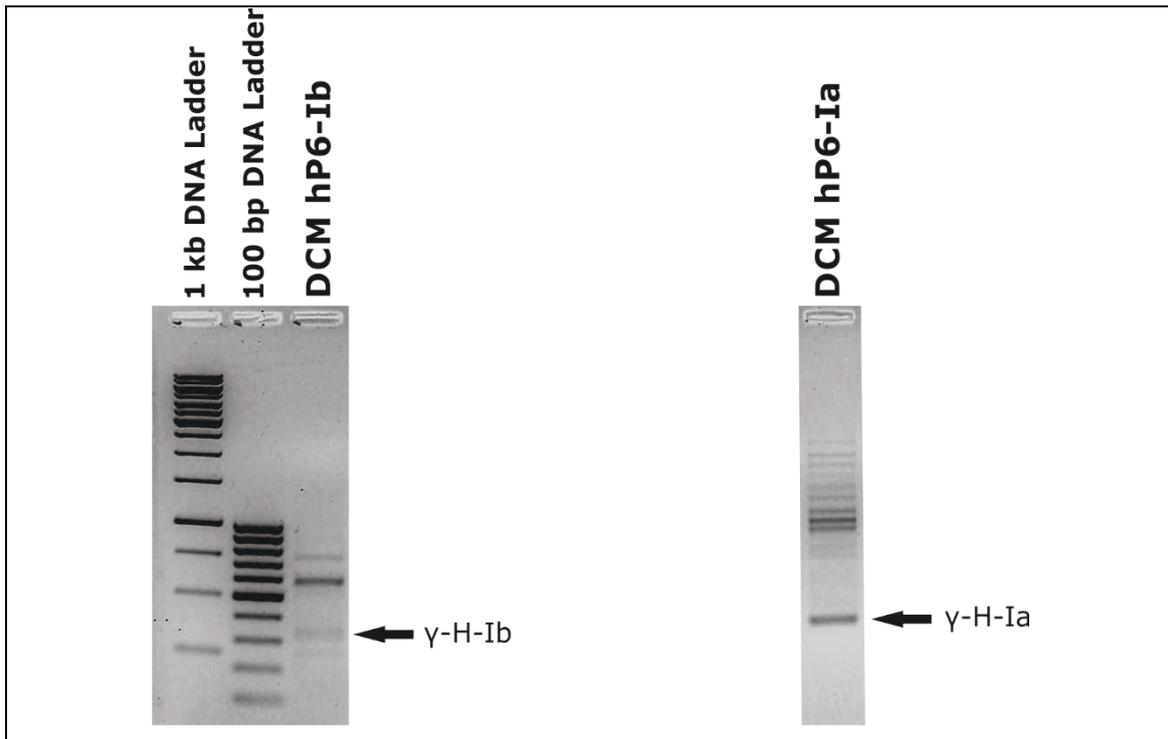


Abbildung 27: **Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P6 in Gesamt-RNA von humanen Herzen;** Die Abbildung zeigt Agarosegelelektrophoresen von Polymerasekettenreaktionen auf cDNA aus Herzhomogenaten humaner Proben von Probanden mit und ohne DCM. Den DNA-Banden sind die entsprechenden CREM-Spleißvarianten zugeordnet. Die nicht bezeichneten Banden konnten nicht als CREM-Spleißvarianten identifiziert werden.

#### 4.1.3 Translation der CREM-Isoformen

##### Virtuelle Translation der identifizierten CREM-Spleißvarianten

Mit Hilfe der Software ATGpr (95) wurden die identifizierten cDNA-Sequenzen auf putative Kozak-Sequenzen hin untersucht (60-62). Als Grenzwert für die Wertung als putative Kozak-Sequenz wurde eine programmspezifische Reliabilität von 0,1 gewählt. Wurden in der Literatur Kozaksequenzen beschrieben, die von dem Programm mit einer geringeren Reliabilität bewertet wurden, so wurden diese trotzdem berücksichtigt. Anhand dieser Kozak-Sequenzen erfolgte die virtuelle Translation der cDNAs in ihre Aminosäuresequenz durch die Geneious-Software. Es fällt auf, dass im Herzen eine Vielzahl an cDNAs, neben einzelnen längeren Proteinen nur eine begrenzte Anzahl kurzer Repressoren hervorbringt. So können beispielsweise die Spleißvarianten B-H-Ib, X-H-Ib und  $\gamma$ -H-Ib ein längeres (X-H-Ib und  $\gamma$ -H-

Ib) oder trunkiertes Protein (B1-H und B2-H) codieren, durch alternative Translationsinitiation können jedoch von allen mRNAs die Proteine H1-Ib und H2-Ib (entsprechend HIbI und HIbII) generiert werden.

Tabelle 17: **Translation der identifizierten Spleißvarianten anhand putativer Kozaksequenzen (Sequenzanalyse erfolgte mit den Programmen ATGpr (95) und Geneious (10));** die Zusammenstellung der Proteine ergibt sich aus den Exonzusammenstellungen der cDNAs, wobei für den Fall, dass mehrere Kozak-Sequenzen in einem Exon vorhanden sind, die resultierenden Proteine entsprechend nummeriert wurden. Die Spleißvarianten und zugehörigen Proteine sind entsprechend ihrer zugehörigen Promotoren und Spezies geordnet.

Spezies	Promotor	Isoformen	mögl. Proteine
<b>Mus musculus</b>	<b>P1/P5</b>	B-H-1a	B1-H; B2-H; H1-1a; H2-1a
		B-H-1b	B1-H; B2-H; H1-1b; H2-1b
		B-y-H-1a	B1-H; B2-H; y-H-1a; H1-1a; H2-1a
		B-y-H-1b	B1-H; B2-H; y-H-1b; H1-1b; H2-1b
		B-E-F-H-1a	B1-E-F-H-1a; B2-E-F-H-1a; B3-E-F-H-1a; F-H-1a; H1-1a; H2-1a
		B-E-F-H-1b	B1-E-F-H-1b; B2-E-F-H-1b; B3-E-F-H-1b; F-H-1b; H1-1b; H2-1b
		B-E-F-y-H-1a	B1-E-F-y-H-1a; B2-E-F-y-H-1a; B3-E-F-y-H-1a; F1-y-H-1a; y-H-1a; H1-1a; H2-1a
		B-E-F-y-H-1b	B1-E-F-y-H-1b; B2-E-F-y-H-1b; B3-E-F-y-H-1b; F1-y-H-1b; y-H-1b; H1-1b; H2-1b
	<b>P4</b>	θ2-C-E-F-H-1a	θ2-C-E-F-H-1a; F-H-1a; H1-1a; H2-1a
	<b>P2</b>	X-H-1a	X-H-1a; H1-1a; H2-1a
		X-H-1b	X-H-1b; H1-1b; H2-1b
		X-y-H-1a	X-y-H-1a; y-H-1a; H1-1a; H2-1a
		X-y-H-1b	X-y-H-1b; y-H-1b; H1-1b; H2-1b
<b>P6</b>	y-H-1a	y-H-1a; H1-1a; H2-1a	
	y-H-1b	y-H-1b; H1-1a; H2-1a	
	H-1a	H1-1a; H2-1a	
	H-1b	H1-1b; H2-1b	
<b>Homo sapiens</b>	<b>P1/P5</b>	B-H-1a	B1-H; B2-H; H1-1a; H2-1a
		B-H-1b	B1-H; B2-H; H1-1b; H2-1b
		B-E-F-H-1a	B1-E-F-H-1a; B2-E-F-H-1a; F-H-1a; H1-1a; H2-1a
		B-E-F-H-1b	B1-E-F-H-1b; B2-E-F-H-1b; F-H-1b; H1-1b; H2-1b
		B-ψ-G-H-1a	B1-Psi; B2-Psi; G-H-1a; H1-1a; H2-1a
		B-F-H-1a	B1-F; B2-F; F-H-1a; H1-1a; H2-1a
		B-G-H-1a	B1-G; B2-G; G-H-1a; H1-1a; H2-1a
		B-G-H-1b	B1-G; B2-G; G-H-1b; H1-1b; H2-1b
	<b>P2</b>	X-H-1a	X-H-1a; H1-1a; H2-1a
		X-H-1b	X-H-1b; H1-1b; H2-1b
	<b>P6</b>	y-H-1a	y-H-1a; H1-1a; H2-1a

### Translation der murinen CREM-Spleißvarianten B-H-Ia, B-H-Ib und B- $\gamma$ -H-Ib

Mittels der in 3.4 und 3.5 beschriebenen Methodik gelang es, die Spleißvarianten B-H-Ia, B-H-Ib und B- $\gamma$ -H-Ib zu exprimieren und darzustellen. Für jede Spleißvariante sind zwei Proteinbanden erkenntlich. Der angehängte 10x His-Tag mit klonierungsbedingtem Überhang hat eine Molekülmasse von 2,4 kDa. Geht man von obiger virtueller Translation aus, erwartet man für H1-Ia (11,1 kDa) mit His-Tag eine Bande bei 13,5 kDa und für H2-Ia (9,1 kDa) eine Bande bei 11,5 kDa; für H1-Ib (11,0 kDa) erwartet man die Bande bei 13,4 kDa und für H2-Ib (9,1 kDa) bei 11,4 kDa. Die Bande für  $\gamma$ -H-Ib (11,6 kDa) wird bei 14,0 kDa und die Bande für H1-Ib (11,0) bei 13,4 kDa erwartet. Vergleicht man diese Molekülmassen mit der unten abgebildeten Western-Blot-Analyse, erkennt man, dass die errechneten Werte mit den erzielten Ergebnissen konsistent sind. Es fällt auf, dass die Spleißvariante B- $\gamma$ -H-Ib nicht in H2-Ib translatiert wird.

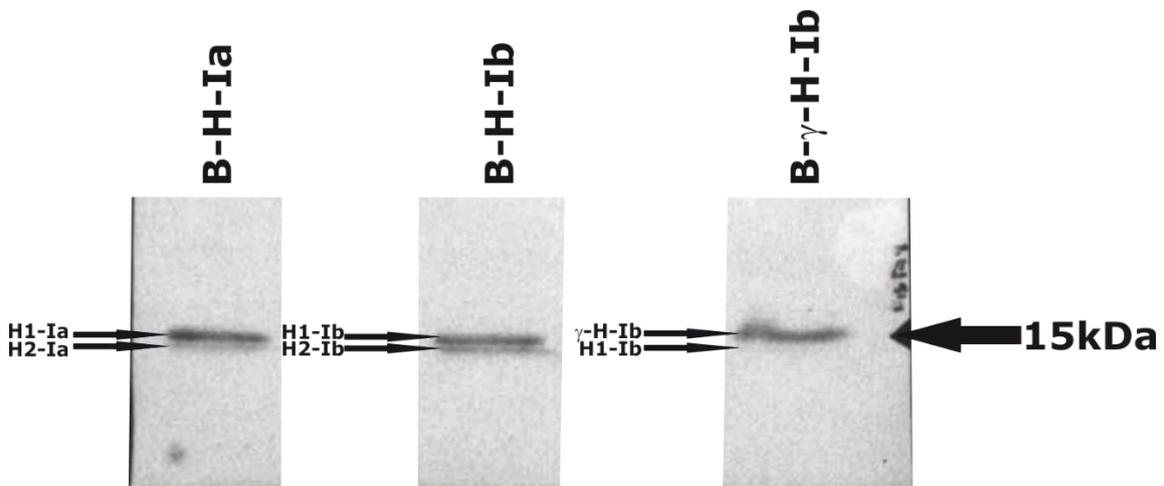


Abbildung 28: **Western-Blot-Analyse der in HEK293-Zellen translatierten Proteine der CREM-Spleißvarianten B-H-Ia, B-H-Ib und B- $\gamma$ -H-Ib**; die Darstellung erfolgte mittels Tetra-His Antibody, BSA-free (Qiagen). Angegeben ist die Molekülmasse in kDa.

## 4.2 QUANTIFIZIERUNG DER CREM-SPLEIßVARIANTEN

### 4.2.1 Isoformen im Herzen der Maus im physiologischen Zustand und unter Isoprenalinstimulation

Die Quantifizierung der CREM-Spleißvarianten im murinen Herzen erfolgte mittels qPCR und Isoform-spezifischen Hydrolyse-Sonden (3.7.1). Nach zehnstündiger Isoprenalinstimulation (3.2) konnte in den FVB/N-Herzen eine signifikante Induktion aller untersuchten Isoformen im Vergleich zu den Ausgangswerten beobachtet werden (siehe Abbildung 29), trotzdem nur P2 und P6 durch cAMP induzierbar sind. Die Expressionskinetik der untersuchten Spleißvarianten zeigte in allen Fällen eine Abnahme der Expression zu den Stimulationszeitpunkten 24 Stunden und sieben Tage im Vergleich zum Zehn-Stunden-Peak. Der geringsten Induktion unterlagen die Spleißvarianten B-H-Ib (1,7-fach) und B-H-Ia (1,5-fach), deren Expression anschließend nach 24-stündiger und siebentägiger Isoprenalinstimulation wieder auf das Ausgangslevel zurückfiel (siehe Abbildung 30). Die Transkripte B-E-F-H-Ib (3,2-fach) und B-E-F-H-Ia (2,2-fach) unterlagen nach zehn Stunden einer stärkeren Induktion (siehe Abbildung 31). B-E-F-H-Ib war auch nach 24 Stunden noch signifikant induziert (2-fach) und fiel erst nach sieben Tagen auf das Ausgangsniveau ab. Die Expression von B-E-F-H-Ia erreichte ihre Ausgangswerte bereits nach 24 Stunden und blieb auch nach siebentägiger Isoprenalinstimulation konstant. Die smICER-Isoformen waren zum Zeitpunkt zehn Stunden signifikant induziert ( $\gamma$ -H-Ib: 3,7-fach und  $\gamma$ -H-Ia: 3,6-fach) und wiesen nach weiterer Stimulation über 24 Stunden und sieben Tage ihr basales Expressionsniveau auf (siehe Abbildung 33). Der stärksten Induktion unterlagen die ICER-Spleißvarianten, wie aus Abbildung 32 entnommen werden kann. Sie waren zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikant hochreguliert (X-H-Ib: 10 h vs. basal = 33,4-fach; 24 h vs. basal = 11,3-fach; 7 d vs. basal = 2,9-fach/ X-H-Ia: 10 h vs. basal = 21,6-fach; 24 h vs. basal = 5,1-fach und 7 d vs. basal = 2,5-fach).

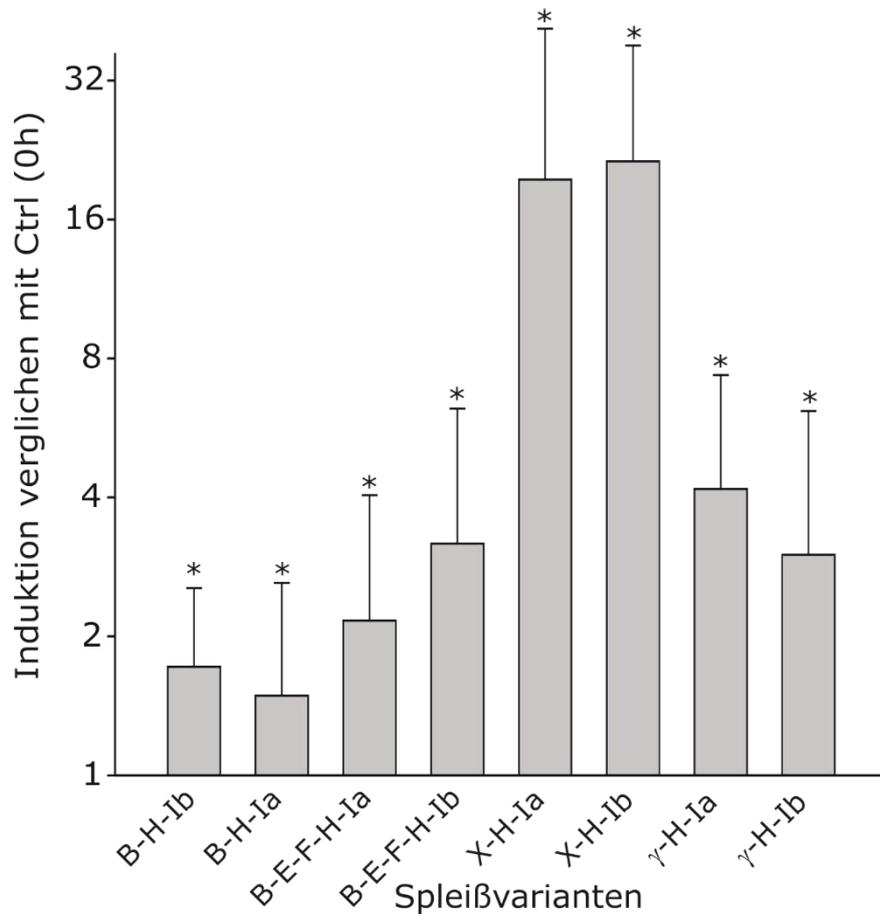


Abbildung 29: **Induktion der CREM-Expression in FVB/N-Ventrikeln nach 10 h Isoprenalinstimulation**; die Mäuse wurden über implantierte osmotische Minipumpen (Fa. Alzet) mit 3 mg/ kg KG/d stimuliert. Um die Crem-mRNA-Expression zu quantifizieren, wurden qPCRs mit spezifischen Hydrolyse-Sonden durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben ( $n=10$ ;  $*=p<0,05$  vs. basale Expression der CREM-Spleißvarianten).

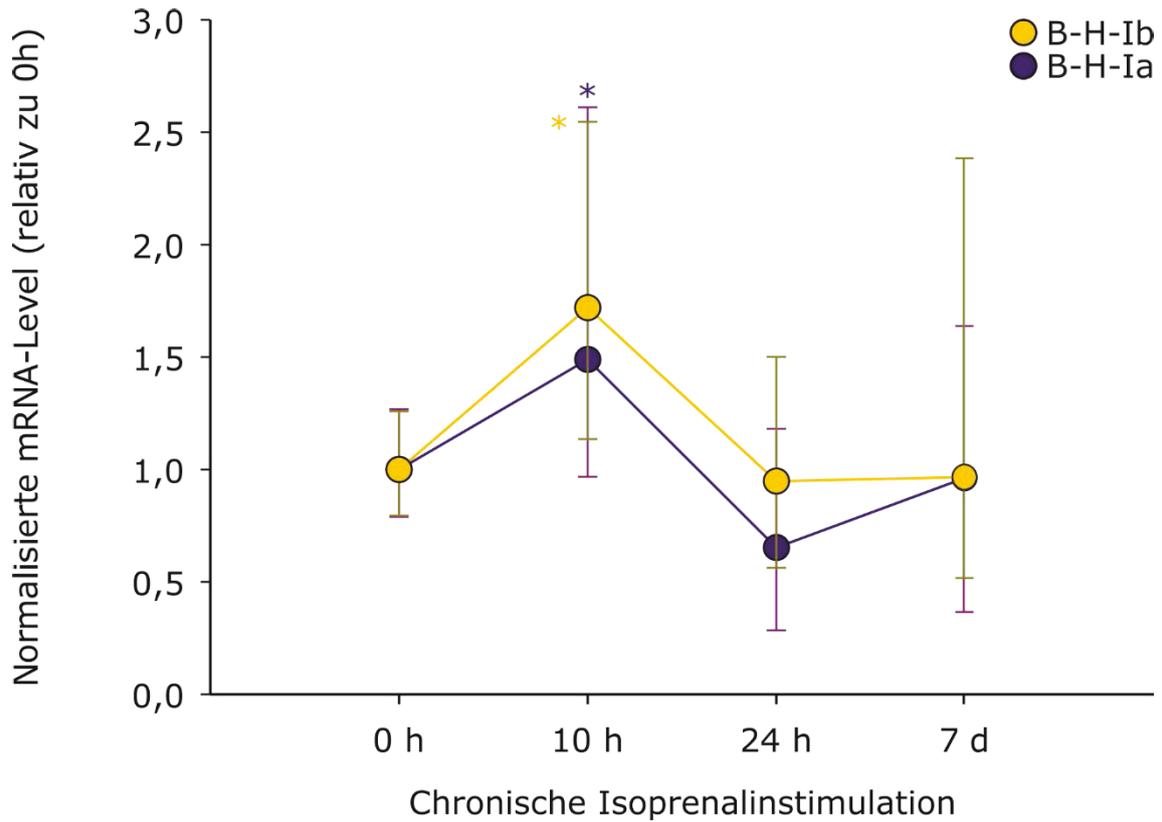


Abbildung 30: **Induktion der Isoformen B-H-Ia und B-H-Ib durch Isoprenalinstimulation**; die Mäuse wurden über implantierte osmotische Minipumpen (Fa. Alzet) mit 3 mg/ kg KG/d stimuliert. Um die mRNA-Expression der Isoformen zu quantifizieren, wurden qPCRs mit spezifischen Hydrolyse-Sonden durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben ( $n=10$ ;  $*=p<0,05$  vs. basale Expression).

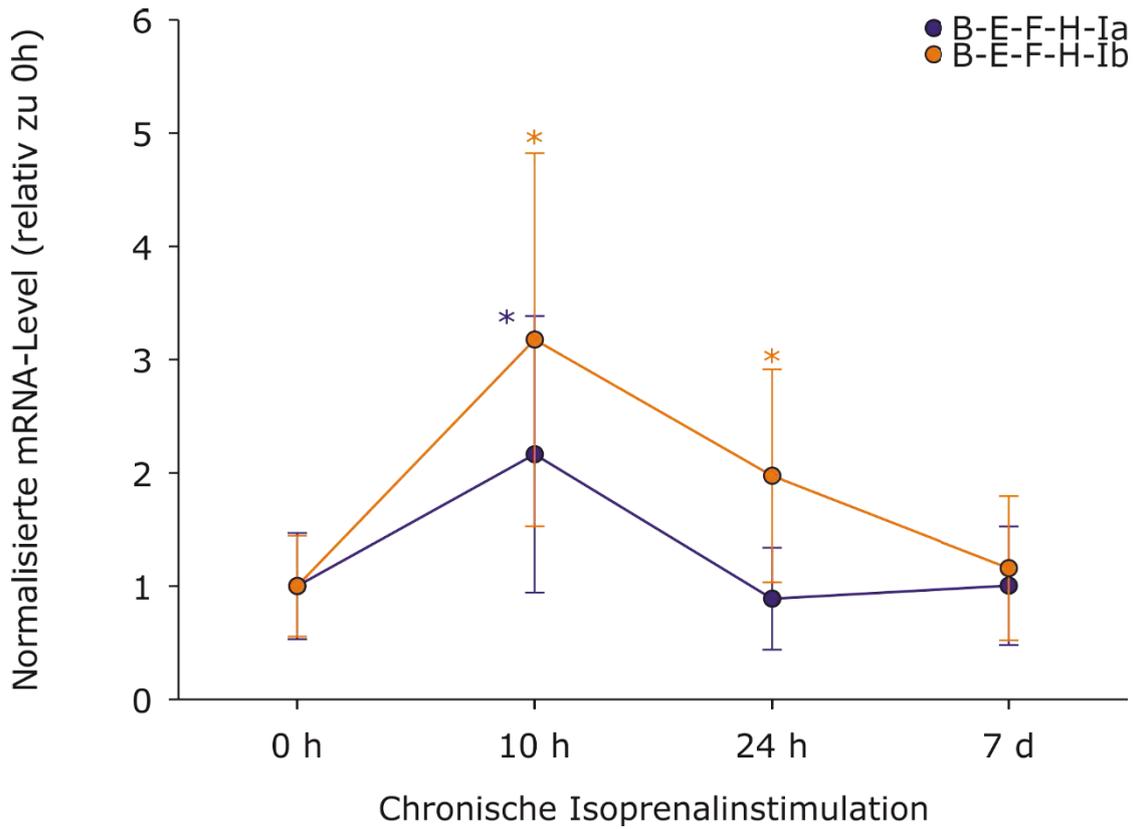


Abbildung 31: **Induktion der Isoformen B-E-F-H-Ia und B-E-F-H-Ib durch Isoprenalininstimulation;** die Mäuse wurden über implantierte osmotische Minipumpen (Fa. Alzet) mit 3 mg/ kg KG/d stimuliert. Um die mRNA-Expression der Isoformen zu quantifizieren, wurden qPCRs mit spezifischen Hydrolyse-Sonden durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben ( $n=10$ ;  $*=p<0,05$  vs. basale Expression).

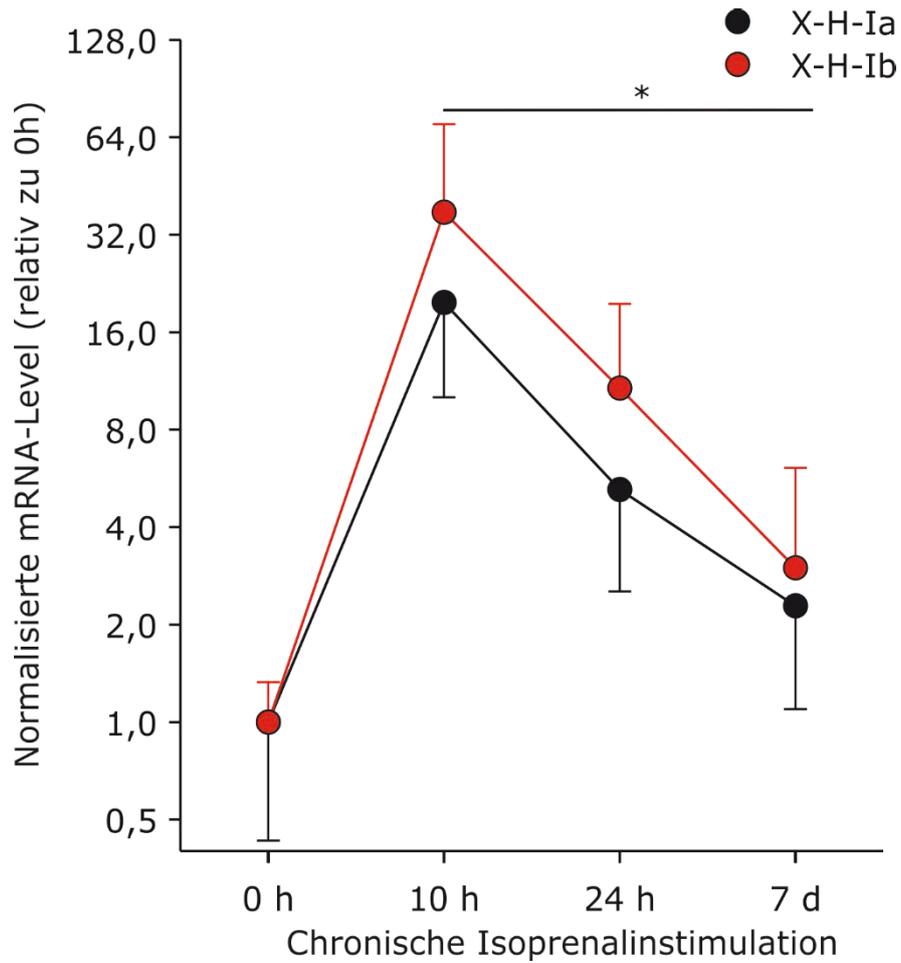


Abbildung 32: **Induktion von ICER durch Isoprenalinstimulation**; die Mäuse wurden über implantierte osmotische Minipumpen (Fa. Alzet) mit 3 mg/ kg KG/d stimuliert. Um die ICER-mRNA-Expression zu quantifizieren, wurden qPCRs mit spezifischen Hydrolyse-Sonden durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=10;  $*=p<0,05$  vs. basale Expression).

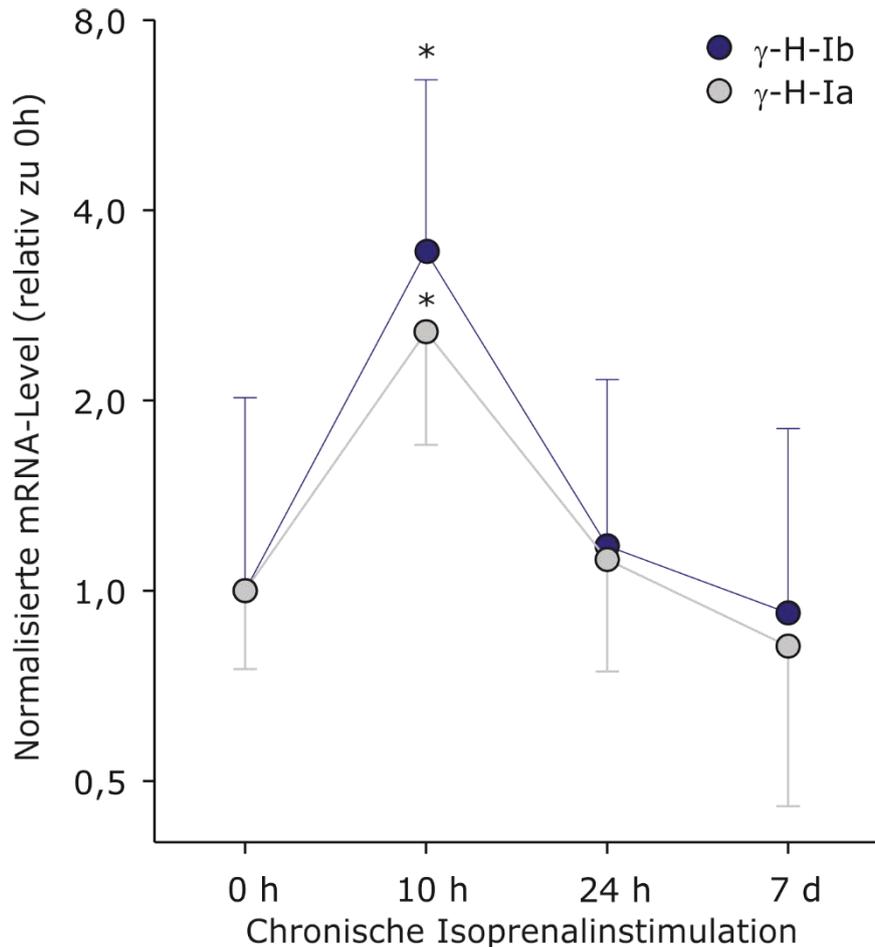


Abbildung 33: **Induktion von smICER durch Isoprenalinstimulation**; die Mäuse wurden über implantierte osmotische Minipumpen (Fa. Alzet) mit 3 mg/ kg KG/d stimuliert. Um die smICER-mRNA-Expression zu quantifizieren, wurden qPCRs mit spezifischen Hydrolyse-Sonden durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben ( $n=10$ ;  $*=p<0,05$  vs. basale Expression).

#### 4.2.2 Isoformen in nicht-insuffizienten, humanen Herzen und insuffizienten Herzen von DCM-Patienten

Die Expression von CREM-Spleißvarianten in nicht-insuffizienten, humanen Herzen und insuffizienten Herzen von DCM-Patienten wurde mittels qPCR und spezifischen Hydrolyse-Sonden verglichen (3.7.1). Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse sind in Abbildung 34 dargestellt. Eine signifikante Induktion konnte für die Isoform B-H-Ib (1,8-fach) gezeigt werden. Die anderen untersuchten Spleißvarianten, die ausgehend von P1/P5 transkribiert

werden (B-H-Ia, B-E-F-H-Ia, B-E-F-H-Ib und B-G-H-Ia), waren im insuffizienten Herzen zwar stärker exprimiert, jedoch war dieser Anstieg der Transkription nicht signifikant. Die Transkription der ICER-Spleißvarianten X-H-Ia und X-H-Ib wies in dieser Stichprobe keinen signifikanten Unterschied auf. Tendenziell war die Transkription der Spleißvarianten X-H-Ia und X-H-Ib erniedrigt.

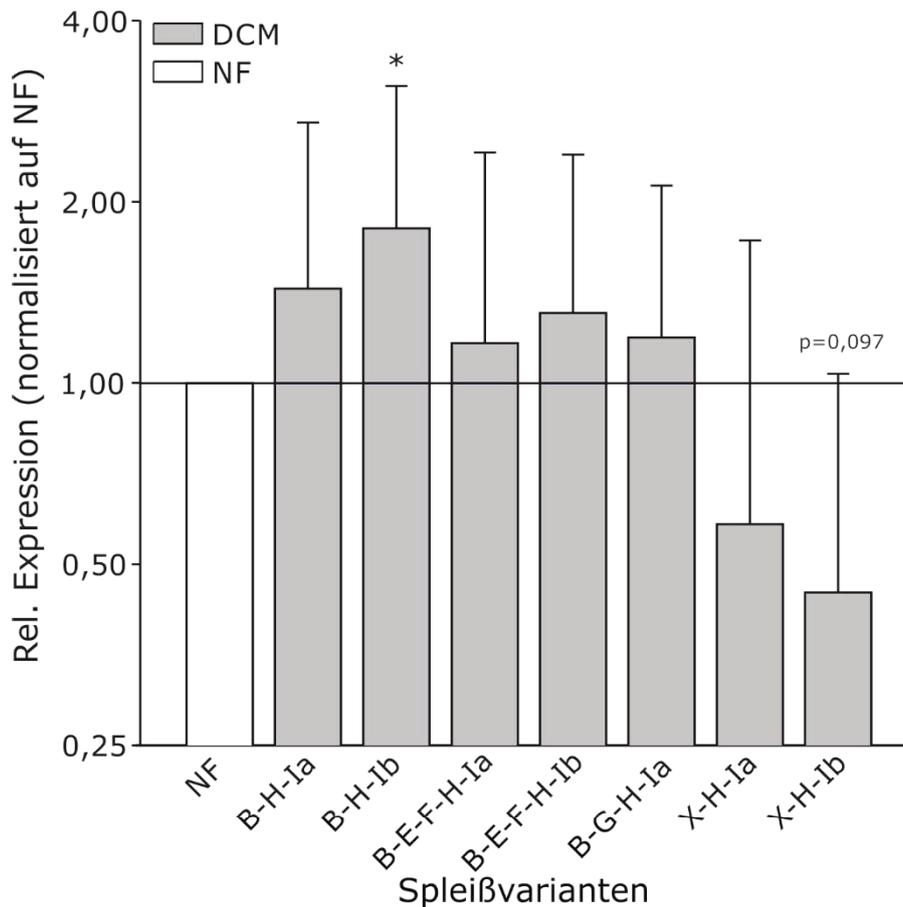


Abbildung 34: **Induktion der Spleißvariante B-H-Ib bei DCM;** Gesamt-RNA wurde aus non-failing Herzen und aus Herzen von an DCM erkrankten Patienten isoliert. qPCRs mit spezifischen Hydrolyse-Sonden wurden durchgeführt um die CREM-mRNA-Expression zu quantifizieren. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=4-9; \*=p<0,05 vs. NF).

### 4.3 LUZIFERASE-REPORTERGEN-ANALYSE VON CREM-ISOFORMEN

Konsistent mit den Ergebnissen von Müller et al. für die Proteine H1bI und H1bII aus humanem *CREM-IbΔC-X* (80), konnten die Proteine der murinen

Transkripte B-H-Ia (HIaI und HIaII) und B-H-Ib (HIbI und HIbII) ebenfalls als Repressoren der CRE-vermittelten Transkription charakterisiert werden (siehe Abbildung 35). Während die basale Transkription nicht signifikant inhibiert wurde, kam es bei Stimulation mit Forskolin zu einer signifikanten Repression der CRE-abhängigen Reporter-genvektoren. (Repression: B-H-Ia + FSK vs. Ctrl. + FSK = 0,33 und B-H-Ib + FSK vs. Ctrl. + FSK = 0,78).

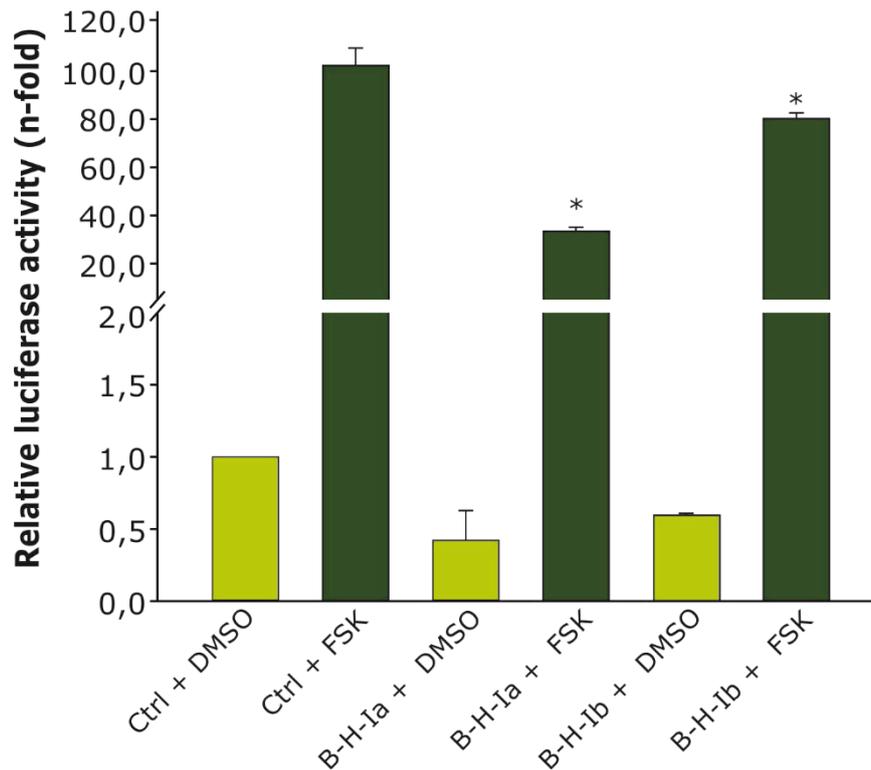


Abbildung 35: **Kleine CREM-Proteine vermitteln Repression der CRE-abhängigen Transkription;** HEK293-Zellen wurden mit dem CRE-kontrollierten Luziferase-Reporter-genkonstrukt pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] und einem Renilla-Luziferase-Kontrollvektor (TK-Luc Renilla) transfiziert. Eukaryotische Expressionsvektoren (pQE-TS 6) mit den Spleißvarianten B-H-Ia und B-H-Ib wurden kotransfiziert und die Assays entweder mit DMSO oder Forskolin behandelt. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=3; \*=p<0,05 vs. Ctrl+FSK).

## 5 DISKUSSION

---

Ziel dieser Arbeit war es, die Spleißvarianten des *CREM*-Gens im Herzen zu charakterisieren. Zunächst wurden die unter physiologischen Bedingungen vorhandenen *CREM*-Spleißvarianten in murinen und humanen Herzen identifiziert. Anschließend wurde die Frage erörtert, ob es zur Veränderung der mRNA-Spiegel dieser Spleißvarianten unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation beziehungsweise Stress kommt. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde virtuell analysiert, welche *CREM*-Isoformen aus den mRNA-Spleißvarianten synthetisiert werden könnten. Für zwei murine Spleißvarianten wurden die Translation in Proteine und eine nachfolgende funktionelle Charakterisierung mittels Luziferase-Reportergen-Analyse durchgeführt.

Im Herzen der Maus wurden insgesamt 17 Spleißvarianten identifiziert: Acht transkribiert vom P1/P5-, eine vom P4- und jeweils vier vom P2- und P6-Promotor. Im C57BL/6-Kardiomyozyten waren die Isoformen mit der zweiten DBD (ausgehend vom P1/P5-Promotor) weniger abundant als im C57BL/6-Ventrikelhomogenat. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass die Spleißvarianten mit der ersten DBD, die als abundante Formen in Kardiomyozyten identifiziert wurden, auch im Ventrikelhomogenat vorhanden sein müssen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Spleißvarianten mit der zweiten DBD hauptsächlich von anderen kardialen Zelltypen wie beispielsweise Fibroblasten oder Endothelzellen exprimiert werden.

Ob die gleichen Isoformen mit unterschiedlichen DBDs dabei eine unterschiedliche Funktion haben und somit verschiedenen Zwecken dienen können, wird kontrovers diskutiert. Fenaroli et al. konnten mittels Heterokaryon-Experimenten zeigen, dass *CREM*-Proteine einem aktiven, temperaturabhängigen Transport vom Nukleus in das Zytoplasma unterliegen. Dabei stellten sie fest, dass ein intrinsisches Exportsignal am C-Terminus den Transport reguliert. *CREM*-Isoformen mit der DBD II unterlagen in HeLA/3T3-Heterokaryons einem quantitativ wesentlich stärkeren Export als die entsprechenden Isoformen mit der DBD I. Eine zytosolische Modifikation des Transkriptionsfaktors, beispielsweise durch Chaperone, wird

vermutet (32). Die Ergebnisse von Misund et al. hingegen zeigen, dass in HEK293-Zellen mit Überexpression von entweder ICER-I oder ICER-II $\gamma$  gleichfalls eine starke Repression eines CRE-regulierten Reportergens stattfindet. Diese Repression ist durch beide Isoformen gleich effizient, was auf eine ähnliche Funktion schließen lässt. Anzumerken ist jedoch, dass sich ICER-I und ICER-II $\gamma$  nicht nur durch die unterschiedlichen DBDs, sondern auch die Anwesenheit von Exon  $\gamma$  unterscheiden (76). Ebenfalls ist eine Beeinflussung der Transkriptionsregulation durch distale Promotorelemente wie Enhancer und Silencer oder durch die Interaktion mit basalen Promotorelementen wie z.B. der TATA-Box denkbar. Diese Elemente könnten mit strukturell verschiedenen CREM-Isoformen in unterschiedlicher Art interagieren. Eine Abhängigkeit der CREM-Proteinfunktion vom lokalen Kontext der CRE-Sequenzen in der genomischen DNA ist möglich (20,54).

Im humanen Herzen gelang die Identifikation von insgesamt 12 Spleißvarianten. Acht Transkripte werden ausgehend vom P1/P5-Promotor transkribiert, zusätzlich konnten drei *ICER*-Spleißvarianten und eine *smICER*-Spleißvariante sequenziert werden. Während aus den Herzen von DCM-Patienten nur Isoformen, die ausgehend von P1/P5 transkribiert werden, isoliert werden konnten, fanden sich im Ventrikelhomogenat von humanen NF-Herzen auch *ICER*- und *smICER*-Spleißvarianten. Diese Unterschiede sind allerdings eher methodisch bedingt, da die Vorgehensweise zur Identifikation der Spleißvarianten nur qualitative Aussagen zulässt. Der Ansatz, durch die Klonierung einer großen Probenanzahl und die Sequenzierung vieler Klone falsch negative Ergebnisse zu minimieren, kann diese nicht ausschließen. Im Fall der humanen NF- und DCM-Proben wiesen die CREM-cDNAs in den Agarosegelelektrophoresen der PCRs ein korrespondierendes Migrationsverhalten auf. Deshalb kann man vermuten, dass die Transkripte, obwohl sie teilweise nicht in DCM- und NF-Proben sequenziert werden konnten, dennoch in beiden Ausgangsmaterialien vorhanden sein können.

Beim Vergleich der in murinen und humanen Geweben bzw. Zellen identifizierten Spleißvarianten fällt auf, dass in beiden Geweben jeweils acht Spleißvarianten ausgehend vom P1/P5-Promotor transkribiert werden. Ausschließlich im murinen Herzen sind von diesem Promotor ausgehend

transkribierte Spleißvarianten mit Exon  $\gamma$  vorhanden, im humanen Herzgewebe finden sich hingegen Transkripte mit trunkierter KID, der zweiten transaktivatorischen Domäne ohne KID und eine Spleißvariante mit Exon  $\psi$ . Konnten in humanem Herzgewebe drei ICER-Isoformen nachgewiesen werden, waren es vier im murinen Herzen. Im humanen Herzen konnte auch lediglich eine smICER-Spleißvariante gegenüber vier Varianten im murinen Herzen identifiziert werden. Weder im humanen, noch im murinen Herzen konnten aktivatorische CREM- $\tau$ -Spleißvarianten nachgewiesen werden, sondern neben der Spleißvariante  $\Theta$ 2-C-E-F-H-Ia deren Funktion fraglich ist, nur Repressoren. Die von Lewin et al. aufgestellte Hypothese, die Hochregulation von CREM-Zielgenen im murinen CREM-Knock-Out deute auf eine repressorische Funktion von CREM im Herzen der Maus hin (66), kann somit gestützt werden.

Interessanterweise entspricht die Expressionskinetik der quantifizierten Transkripte im murinen Herzen unter Stimulation mit Isoprenalin einer Early-Response-Kinetik, wie sie von Molina et al. für ICER-Spleißvarianten beschrieben wurde (77). Nach einem kurzfristigen, signifikanten Anstieg der Gentranskription kam es unter chronischer Isoprenalinstimulation bei allen untersuchten Spleißvarianten, zu einer abnehmenden CREM-Transkription. Diese fiel, mit Ausnahme der untersuchten ICER-Spleißvarianten (mRNA-Level nach 7 Tagen im Vergleich zum Ausgangswert immer noch signifikant erhöht), wieder auf ein basales Level ab.

In dieser Arbeit wurde die Induktion von Spleißvarianten nachgewiesen, die ausgehend von den CRE-unabhängigen Promotoren P1, P5 und P4 transkribiert werden. Als Erklärungsansatz für die Induktion der CRE-unabhängigen Transkription des P1-Promotors lassen sich die Ergebnisse von Rauen et al. anführen. Ein erhöhtes cAMP-Level kann zu einer erhöhten Expression der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) durch Bindung von phosphoryliertem CREB an deren Promotor führen. Dies wiederum ruft eine vermehrte Dephosphorylierung von SP-1 hervor. SP-1 kann den P1-Promotor über eine Konsensus-SP-1-Bindungssequenz induzieren (55,92,105). Ebenso könnte ein von Martianov et al. beschriebenes Binden von phosphoryliertem CREB an Non-CRE-Bindungsmotive oder unvollständige CREs in den

Promotoren P1, P5 und P4 für die Induktion der *CREM*-Transkription ursächlich sein (73).

## **5.1 BESCHREIBUNG DER SPLEIßVARIANTEN**

### **5.1.1 Spleißvarianten, die ausgehend von P1/P5 transkribiert werden**

2011 wurden der P1- und der P5-Promotor von Juang et al. und Rauen et al. genauer charakterisiert. Während P1 (wie im vorherigen Abschnitt beschrieben) eine Konsensus-SP-1-Bindungssequenz besitzt, die durch von der PP2A dephosphoryliertes SP-1 aktiviert wird, unterliegt P5 einem anderen Regulationsmechanismus (55). Der P5-Promotor besitzt eine Konsensus-AP1-Bindungssequenz, an die der AP1-Proteinkomplex aus c-Fos/c-Jun-Proteinen bindet (55).

#### **5.1.1.1 Spleißvarianten, die eine Kinase Inducible Domain enthalten**

##### **B-E-F-H-Ia und B-E-F-H-Ib**

Das Transkript B-E-F-H-Ia wurde von Gellersen et al. als *CREM- $\alpha$*  in humanen endometrialen Stromazellen beschrieben (41). In dieser hier vorliegenden Arbeit wurde es in Ventrikelhomogenaten und Kardiomyozyten von C57BL/6-Mäusen sowie humanen Ventrikelhomogenaten von Patienten mit DCM und NF-Herzen identifiziert. Es handelt sich um eine im Herzen abundant exprimierte und zwischen den Spezies konservierte Spleißvariante. Nach zehn Stunden  $\beta$ -adrenerger Stimulation kam es im Herzen der Maus zu einer signifikanten Induktion der Spleißvariante, die im Sinne einer Early-Response-Kinetik nach weiterer Stimulation auf ein basales Level abfiel. Das Fehlen von transaktivatorischen Domänen und die mögliche Translation zu den repressorischen Proteinen H1-Ia und H2-Ia legen eine repressorische Funktion nahe. Diese ist auch von Foulkes et al. für die verwandte Spleißvariante *CREM- $\gamma$*  (B-E-F-H-Ib) beschrieben (38). Behr und Weinbauer wiesen die Expression von *CREM- $\gamma$*  in humanen Hoden gesunder Männer nach (7). Die Isolation der Isoform aus Ventrikelhomogenaten von C57BL/6-

Mäusen und Ventrikelhomogenaten von Patienten mit DCM und NF-Herzen bestätigt die bereits genannte Southern-Blot-Analyse von Foulkes et al. aus dem Jahr 1992 (39). Auch hier kam es nach zehn Stunden  $\beta$ -adrenerger Stimulation des murinen Herzens zu einer signifikanten Induktion der Spleißvariante, die auch nach 24 Stunden noch signifikant induziert war und im Sinne einer Early-Response-Kinetik nach weiterer Stimulation auf ein basales Level abfiel.

#### **B-E-F- $\gamma$ -H-Ia und B-E-F- $\gamma$ -H-Ib**

Lediglich in C57BL/6-Kardiomyozyten konnte das Transkript B-E-F- $\gamma$ -H-Ia in dieser Arbeit identifiziert werden. Es wurde bereits 1991 von Foulkes et al. als Repressor *CREM- $\alpha$*  beschrieben (38). Eine Southern-Blot-Analyse, ebenfalls von Foulkes et al. durchgeführt, gab Hinweis auf eine Expression der Spleißvariante im murinen Herzen (39). Nach den Ergebnissen von Fenaroli et al. unterliegt *CREM- $\alpha$*  einem geringen zytoplasmatisch-nukleären Transport (32). *CREM- $\alpha$*  unterdrückt die Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos und verringert somit über einen Feedbackmechanismus seine eigene Transkription über den P5-Promotor (92). Die repressorische Spleißvariante B-E-F- $\gamma$ -H-Ib wurde von Foulkes et al. als *CREM- $\beta$*  bezeichnet (38). Sie konnte in dieser Arbeit nur aus C57BL/6-Ventrikelhomogenaten isoliert werden. Die oben genannte Southern-Blot-Analyse von Foulkes et al. wies Banden nach, die mit der Länge der hier isolierten Spleißvariante B-E-F- $\gamma$ -H-Ib vergleichbar waren (39).

#### **5.1.1.2 Spleißvarianten ohne (vollständige) KID**

##### **B-H-Ia, B-H-Ib und B-H-Ia-Ib**

Gellersen et al. und Inada et al. beschreiben die Spleißvariante B-H-Ia als *CREM- $\Delta 1,P,2$* , beziehungsweise *CREM-17*. Sie wird in humanen endometrialen Stromazellen und Inselzellen des Rattenpankreas exprimiert (41,50). Sie konnte in dieser Arbeit in C57BL/6-Ventrikelhomogenaten, C57BL/6-Kardiomyozyten und humanen Ventrikelhomogenaten von Patienten mit DCM nachgewiesen werden. In der Luziferase-Reporter-gen-

Analyse konnte eine repressorische Funktion nachgewiesen werden. Die von Müller et al. aus humanen Herzen isolierte Spleißvariante *CREM-Ib $\Delta$ C-X* (80) konnte aus allen untersuchten humanen und murinen Ausgangsmaterialien isoliert werden. Behr und Weinbauer isolierten sie aus humanen Hoden mit normaler Spermatogenese und benannten sie *CREM  $\Delta$ C-G, $\beta$*  (7). Bei Patienten mit Spermatogenese-Arrest auf dem Level der Spermatozyten war diese Spleißvariante im Hoden das einzig nachweisbare CREM-Transkript, wobei von Blöcher et al. nicht zwischen B-H-Ia und B-H-Ib unterschieden wurde (14). Nach zehnstündiger,  $\beta$ -adrenerger Stimulation waren die Transkripte B-H-Ia und B-H-Ib im murinen Herzen signifikant induziert. Die Frage von Isoda et al., ob *CREM-Ib $\Delta$ C-X* in Herzen von DCM-Patienten, nicht aber in NF-Heerden exprimiert werde (52), muss verneint werden, da der Nachweis in dieser Arbeit auch in NF-Proben gelang. Dennoch ist es das einzige Transkript, für welches im Vergleich zum NF-Heerden eine signifikante Induktion im DCM-Heerden festgestellt werden konnte. In der Luziferase-Reporteragen-Analyse ließ sich die Charakterisierung als Repressor durch Müller et al. bestätigen (80). Die heteronukleäre RNA B-H-Ia-Ib wurde auch von Behr und Weinbauer aus dem Hoden eines infertilen Patienten mit einem Reifungsarrest im Stadium der runden Spermatischen isoliert. Sie wurde als *CREM  $\Delta$ C-G, $\alpha$*  beschrieben (7). In dieser Arbeit konnte das Transkript in Ventrikelhomogenaten und Kardiomyozyten von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Walker et al. beschrieben *CREM  $\Delta$ C-G* mit der Exonzusammensetzung B-X-H-Ia, das sie aus Rattenspermatischen isoliert hatten (111). Interessant ist, dass der Leserahmen aufgrund eines zusätzlichen Guanosins nicht unterbrochen wurde, was zur Translation eines 17 kDa schweren Proteins führen würde. Die Untersuchungen von Müller et al. konnten diese Guanosinbase jedoch nicht nachweisen, sodass es zum Abbruch des Leserahmens kommt (80).

### **B- $\gamma$ -H-Ia und B- $\gamma$ -H-Ib**

Inada et al. beschrieben die Isoform B- $\gamma$ -H-Ia (CREM-17X) in pankreatischen Inselzellen von Ratten (50). In dieser Arbeit wurde sie in C57BL/6-Kardiomyozyten nachgewiesen. Analog zu den Ergebnissen für die Isoform B-

H-Ia liegt eine repressorische Funktion nahe. Die Spleißvariante B- $\gamma$ -H-Ib wurde in dieser Arbeit aus Ventrikelhomogenaten und Kardiomyozyten von C57BL/6-Mäusen isoliert. Bisher ist sie in der aktuell vorliegenden Literatur nicht beschrieben. Sie kodiert für die repressorischen Proteine  $\gamma$ -H-Ib und HIbI (siehe Abbildung 28).

### **B-F-H-Ia**

Das in der aktuell vorliegenden Literatur nicht beschriebene Transkript B-F-H-Ia wurde in Ventrikelhomogenaten von humanen NF-Herzen nachgewiesen. Es kann eine repressorische Funktion angenommen werden, da die KID nicht komplett ist und keine transaktivatorische Domänen vorhanden sind. Die Spleißvariante kann für die funktionellen Proteine F-H-Ia, H1-Ia und H2-Ia kodieren.

### **5.1.1.3 Spleißvarianten mit transaktivatorischer Domäne**

#### **B-G-H-Ia und B-G-H-Ib**

Gellersen et al. beschrieben die Spleißvariante B-G-H-Ia (*CREM- $\Delta 1, P$* ) 1997 in humanen, endometrialen Stromazellen (41). In dieser Arbeit wurde der Nachweis für eine Expression in Ventrikelhomogenaten von humanen DCM- und NF-Herzen erbracht. Eine repressorische Funktion auf die PKA-abhängige Gentranskription in der Luziferase-Reporter-Gen-Analyse in primären, undifferenzierten, endometrialen Stromazellen und der uterinen Sarkom-Zelllinie SKUT-1B ist bekannt (41). Das Transkript B-G-H-Ib wurde von Behr und Weinbauer im Jahr 2000, als *CREM  $\Delta C-F, \beta$*  beschrieben. Es handelt sich um eine inhibitorische Spleißvariante, die im humanen Hoden exprimiert wird. Eine Reporter-Gen-Analyse zur funktionalen Charakterisierung wurde jedoch von den Autoren nicht vorgenommen, weshalb es sich um eine Vermutung aufgrund der Zusammensetzung der Exons handelt (7). In dieser Arbeit wurde es aus Ventrikelhomogenaten humaner DCM-Herzen isoliert.

### **B-Ψ-G-H-Ia**

In der oben erwähnten Arbeit von Gellersen et al. wurde die Spleißvariante B-Ψ-G-H-Ia (*CREM-ΨΔ1,P*) ebenfalls aus humanen, endometrialen Stromazellen isoliert. Hier konnte sie aus Ventrikelhomogenaten von humanen NF-Herzen isoliert werden. Auch diese Spleißvariante hat eine inhibitorische Funktion, wie mit oben beschriebener Methodik untersucht wurde (siehe B-G-H-Ia und B-G-H-Ib). Sie kodiert für den kleinen Repressor G-H-Ia (*SS-CREM-τ2α*) (41).

### **5.1.2 Spleißvariante, die ausgehend von P4 transkribiert wird**

Spleißvarianten mit Exons Θ1 und Θ2, wie die Isoform Θ2-C-E-F-H-Ia, werden von Daniel et al. und Gellersen et al. als spezifisch für Hodengewebe beschrieben. Gellersen et al. entdeckten zwei CRE-ähnliche Elemente im P3- und P4-Promotor, konnten jedoch in nachfolgender Luziferase-Reporteranalyse von P3-/P4-Promotor-Konstrukten keine cAMP-abhängige Induktion nachweisen (23,42). Die Spleißvariante Θ2-C-E-F-H-Ia konnte hier in Kardiomyozyten von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Da die Spleißvariante sowohl für die Proteine Θ2-C-E-F-H-Ia und F-H-Ia, als auch für die kleinen Repressoren H1-Ia und H2-Ia kodiert, ist eine funktionale Einordnung nicht eindeutig möglich. Um eine entsprechende aktivatorische oder inhibierende Funktion zu belegen, sind weitere Experimente, wie z.B. eine Luziferase-Reporteranalyse, nötig.

### **5.1.3 ICER-Spleißvarianten**

Die stark repressorischen ICER-Isoformen X-γ-H-Ia (*ICER-I*), X-H-Ia (*ICER-Iγ*), X-γ-H-Ib (*ICER-II*) und X-H-Ib (*ICER-IIγ*), die von Molina et al. zuerst für die Rattenhypophyse identifiziert wurden, finden sich alle im murinen Herzen (77). Folco et al. konnten bereits 1997 beschreiben, dass die ICER-Genexpression auch in primären Kardiomyozyten über die Bindung von phosphoryliertem CREB an die CAREs im P2-Promotor cAMP-abhängig induzierbar ist. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ICER-Isoformen über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert werden (37). Sowohl beim Menschen, als auch im murinen Organismus gelang Ding et al. der Nachweis,

dass es bei Herzinsuffizienz durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation zu einer Reduktion des PDE3A-Protein-Levels kommt. Dies führt, wie auch Yan et al. beschreiben, zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Levels mit ansteigender Phosphorylierung von CREB. Über die Bindung von CREB an CAREs kommt es zu einer Induktion des P2-Promotors mit folgender Erhöhung des ICER-Protein-Levels (es wird durch die Autoren nicht zwischen den vier verschiedenen ICER-Isoformen unterschieden). Die reduzierten PDE3A-Protein-Level führen ebenfalls zu einer geringeren Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Es kommt aufgrund der hohen ICER-Protein-Level zu einer verstärkten Kardiomyozyten-Apoptose und einer Reduktion des SERCA2-Protein-Gehaltes (29,113). In der vorliegenden Arbeit konnten *ICER-I $\gamma$*  und *ICER-II $\gamma$*  aus Kardiomyozyten von C57BL/6-Mäusen isoliert und *ICER-I* und *ICER-II* in den Ventrikelhomogenaten isoprenalinstimulierter FVB/N-Mäuse nachgewiesen werden. In Ventrikelhomogenaten humaner NF-Herzen konnten alle *ICER*-Spleißvarianten bis auf *ICER-I* identifiziert werden. Die Expression der Transkripte X-H-Ia und X-H-Ib war im murinen Herzen unter Isoprenalinstimulation stark induziert und ging auch nach sieben Tagen trotz eines starken Abfalls nicht auf ein basales Level zurück. Seidl et al. quantifizierten die ICER-mRNA-Level unter chronischer Stimulation mit Isoprenalin im murinen Herzen unselektiv für alle ICER-Spleißvarianten. Der Peak der ICER-Expression lag bei einer signifikanten Erhöhung nach drei Stunden, trotz starken Abfalls der Expression war diese auch nach zehn und 24 Stunden noch signifikant erhöht und kehrte erst nach siebentägiger Stimulation auf ein basales Level im Vergleich zur Ausgangskonzentration zurück (98). Die Ergebnisse von Seidl et al. legen nahe, dass der Expressions-Peak der in dieser Arbeit untersuchten ICER-Isoformen ebenfalls wesentlich vor zehn Stunden liegen könnte. Die Expression der ICER-Spleißvarianten X-H-Ia und X-H-Ib war im Ventrikelhomogenat humaner DCM-Herzen im Vergleich zu NF-Herzen tendenziell erniedrigt. Dies kontrastiert mit den Ergebnissen von Ding et al., die (allerdings unselektiv für alle ICER-Isoformen) eine signifikante Erhöhung des ICER-Protein-Levels in den Herzen von DCM-Patienten feststellen konnten (29). Eventuell ergeben sich diese

Unterschiede durch den Ausschluss der Isoform ICER-I, die in dieser Arbeit nicht quantifiziert werden konnte. Möglicherweise ergibt sich diese Diskrepanz auch durch den unterschiedlichen methodischen Ansatz, da in dieser Arbeit die Transkription, in der Arbeit von Ding et al. jedoch die Translation von ICER analysiert wurde.

#### **5.1.4 smICER-Spleißvarianten**

Aus Ventrikelhomogenaten von isoprenalinstimulierten FVB/N-Mäusen wurden die *smICER*-Spleißvarianten  $\gamma$ -H-Ib, H-Ib,  $\gamma$ -H-Ia und H-Ia, aus Kardiomyozyten von C57BL/6-Mäusen die Transkripte  $\gamma$ -H-Ia und  $\gamma$ -H-Ib und aus Ventrikelhomogenaten humaner NF-Herzen lediglich die Isoform  $\gamma$ -H-Ia isoliert. Seidl et al. beschrieben die *smICER*-Isoformen  $\gamma$ -H-Ib und H-Ib im murinen Herzen, die ausgehend von dem cAMP-abhängig induzierbaren P6-Promotor transkribiert werden (98). Die in dieser Arbeit sequenzierten Spleißvarianten  $\gamma$ -H-Ia und H-Ia sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurden im murinen Herzen die Spleißvarianten  $\gamma$ -H-Ia und  $\gamma$ -H-Ib nach zehnstündiger Isoprenalinstimulation signifikant induziert und fielen bereits nach 24 Stunden auf ihr basales Expressionslevel ab. Die Quantifizierung von Seidl et al. zeigte einen signifikanten Anstieg der *smICER*-Transkription nach drei, zehn und 24 Stunden. Der Transkriptionspeak lag bei drei Stunden; anschließend fiel der mRNA-Level kontinuierlich ab, bis er nach sieben Tagen ein basales Niveau im Vergleich zu den Ausgangswerten erreichte. In der Luziferase-Reportergen-Analyse in HEK293- und 16HBE14o-Zellen erwies sich *smICER* als Inhibitor der CRE-abhängigen Transkription an den cAMP-induzierbaren P2- und P6-Promotoren sowie dem Somatostatin-Promotor (98).

## **5.2 AUSBLICK**

Mit dieser Arbeit konnte das Expressionsmuster der CREM-Spleißvarianten im murinen und humanen Herzen charakterisiert werden. Es gelang die Identifikation der bisher nicht beschriebenen Spleißvarianten B- $\gamma$ -H-Ib, B-F-H-Ia,  $\Theta$ 2-C-E-F-H-Ia,  $\gamma$ -H-Ia und H-Ia. Es fällt auf, dass das CREM-Gen sehr viele mRNA-Isoformen hervorbringt, aus denen dann vergleichsweise wenige

Proteine translatiert werden. Das ausschließliche Vorkommen von repressorischen Spleißvarianten, die allesamt die kleinen Inhibitoren H1bI, H1bII beziehungsweise H1aI und H1aII kodieren, wirft die Frage auf, weshalb die repressorische Modulation der Genexpression durch CREM in diesem Maße konserviert ist. Möglicherweise trägt die Vielfalt an Repressoren zur Feinregulation der Inhibierung der Expression von Zielgenen bei. Dies kann durch den von Fenaroli et al. beschriebenen, aufgrund der DBD unterschiedlichen, zytoplasmatisch-nukleären Transport der CREM-Proteine mit etwaiger zytoplasmatischer Modifikation oder Degradation der Isoformen geschehen (32). Die von Folco et al. nachgewiesene Degradation von ICER durch das Ubiquitin-Proteasom-System stellt eine weitere Regulationsmöglichkeit der Expression von Zielgenen dar (37). Es ist wahrscheinlich, dass auch andere Isoformen diesem Abbauweg unterliegen. Die Early-Response-Kinetik, der die Expression des *Crem*-Gens unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation unterliegt, deutet darauf hin, dass CREM wiederum in einem komplexen Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren Einfluss auf das kardiale Remodelling bei Herzinsuffizienz nehmen könnte. Ein direkter, langfristiger Regulationsmechanismus scheint wenig plausibel, da die induzierten CREM-Spleißvarianten unter chronischer Isoprenalinstimulation zu einem starken Abfall der Transkription bis hin zum Ausgangslevel neigten. Davon waren lediglich die Transkripte X-H-Ia und X-H-Ib ausgenommen, die auch nach sieben Tagen noch signifikant induziert waren (allerdings auch auf einem deutlich geringeren Level als zum Zeitpunkt zehn Stunden). Möglicherweise trägt eine immer wiederkehrende Induktion über Jahre zur Entstehung der Herzinsuffizienz bei. Vor dem Hintergrund einer gesteigerten Expression der SERCA2, des  $\beta_1$ -Adrenozeptors und erhöhter Aktivität der PP1, sowie Anzeichen der Herzinsuffizienz und verfrühtem Tod durch Arrhythmien bei herzspezifischer Expression von humanem *CREM-Ib $\Delta$ C-X* in der Maus (82) ist es bemerkenswert, dass die Spleißvariante *CREM-Ib $\Delta$ C-X* in Herzen von DCM-Patienten signifikant induziert war. Es stellt sich hier die Frage, ob diese Spleißvariante indirekt zu den molekularen Umbauvorgängen im insuffizienten Herzen beitragen könnte, beispielsweise durch Inhibition anderer transkriptioneller

Repressoren. So ist eine erhöhte Expression von *CREM-Ib $\Delta$ C-X* mit einer gesteigerten Expression der SERCA2 verbunden.

ICER und die PDE3A regulieren die Apoptose von Kardiomyozyten und das SERCA2-Protein-Level über eine Feedback-Schleife. Kommt es bei Herzinsuffizienz zur Reduktion der PDE3A, steigt die Apoptoserate der Kardiomyozyten an und eine Reduktion des SERCA2-Protein-Gehaltes wird beobachtet (29,113). Im murinen Herzen waren ICER-Spleißvarianten zwar unter chronischer Isoprenalinstimulation signifikant induziert; da ICER jedoch bei DCM-Herzen im Vergleich zu NF-Herzen auf einem niedrig-basalen Level exprimiert wird, ist fraglich, ob dieser Mechanismus im humanen Herzen langfristig zur Progression einer Herzinsuffizienz beiträgt. Es bleibt die Frage, welchen Anteil smICER an der durch ICER verursachten Kardiomyozyten-Apoptose bei Herzinsuffizienz hat.

Die weitere funktionelle Charakterisierung der identifizierten Isoformen und eine Betrachtung des Zusammenspiels dieser Transkriptionsfaktoren mit potentiell relevanten Zielgenen wie z.B. dHAND, RhoB, Ryr2, Tropomyosin 1 $\alpha$  und  $\alpha$ -Aktin (66) kann einen zukünftigen Ansatz zum weiteren Verständnis der Pathobiochemie der Herzinsuffizienz darstellen. Ein pharmakologisches oder gentherapeutisches Eingreifen in diese Genregulation des insuffizienten Herzens könnte einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen, der ohne die negativ inotrope Wirkung der heutigen Medikation mit  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten auskommt. Unter diesem Aspekt sind die Ergebnisse von Frau Beatrix Scholz interessant, die den Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf den Phänotyp von *CREM-Ib $\Delta$ C-X*-transgenen Mäusen untersucht hat. So kam es unter Behandlung mit Valproat zu einer Abschwächung des atrialen Remodellings. Eine Reduktion des Auftretens von Vorhofflimmern konnte beobachtet werden (2).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

---

In der Progression der Herzinsuffizienz spielen die  $\beta$ -adrenerge Stimulation und die folgende Aktivierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges eine wichtige Rolle. Transkriptionsfaktoren wie CREM (cAMP Responsive Element Modulator) und CREB (cAMP Response Element Binding Protein) regulieren die Transkription ihrer Zielgene in Abhängigkeit von der Steigerung des cAMP-Levels. Das CREM-Gen besitzt 14 Exons und kann durch sechs intronische Promotoren eine Vielzahl von Isoformen hervorbringen. Allerdings ist bisher wenig über das kardiale Expressionsmuster der CREM-Isoformen bekannt; es wurde daher in dieser Arbeit in humanen und murinen Herzen detailliert charakterisiert. Es konnten im murinen Herzen 17 und im humanen Herzen 12 CREM-Spleißvarianten identifiziert werden, von denen die Transkripte B- $\gamma$ -H-Ib, B-F-H-Ia,  $\Theta$ 2-C-E-F-H-Ia,  $\gamma$ -H-Ia und H-Ia bisher nicht beschrieben wurden. Eine repressorische Funktion der Spleißvarianten auf die Transkription liegt nahe, da in keinem nachgewiesenen Transkript eine vollständige Transaktivierungsdomäne vorhanden ist. Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation konnte eine charakteristische Kinetik mit einem Anstieg der Expression nach 10 h, gefolgt von einem starken Abfall sämtlicher untersuchter Spleißvarianten im murinen Herzen beobachtet werden. Ein Vergleich der Expression von CREM-Spleißvarianten in Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mit nicht insuffizienten Spenderherzen zeigte eine signifikante Induktion der Spleißvariante B-H-Ib. Die erhobenen Daten belegen, dass multiple CREM-Isoformen zur transkriptionellen Regulation der  $\beta$ -adrenergen Stimulation am Herzen beitragen. Somit kann CREM vor allem durch die inhibitorische Modulation der Genexpression an der Progression der Herzinsuffizienz beteiligt sein.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

- (1) HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (2014) *HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute*. Online im Internet: URL: <http://www.genenames.org/> [Abrufdatum: 30.07.2014]
- (2) Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. (2014 Feb.) Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 387 (Suppl 1): S. 1-113
- (3) Abderrahmani A, Cheviet S, Ferdaoussi M, Coppola T, Waeber G, Regazzi R (2006) ICER induced by hyperglycemia represses the expression of genes essential for insulin exocytosis. EMBO J. 25 (5): 977-986
- (4) Ahlmann M, Varga G, Sturm K, Lippe R, Benedyk K, Viemann D, et al. (2009) The cyclic AMP response element modulator {alpha} suppresses CD86 expression and APC function. J.Immunol. 182 (7): 4167-4174
- (5) Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, München, 10., überarbeitete Auflage. Aufl.
- (6) Behr R, Weinbauer GF (2000) CREM activator and repressor isoforms in human testis: sequence variations and inaccurate splicing during impaired spermatogenesis. Mol.Hum.Reprod. 6 (11): 967-972
- (7) Behr R, Weinbauer GF (2000) CREM activator and repressor isoforms in human testis: sequence variations and inaccurate splicing during impaired spermatogenesis. Mol.Hum.Reprod. 6 (11): 967-972
- (8) Behr R, Weinbauer GF (2001) cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? Int.J.Androl. 24 (3): 126-135
- (9) Bers DM, Guo T (2005) Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1047: 86-98
- (10) Biomatters Geneious version 6.1 created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>. Bd Version 6.1
- (11) Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7 (6): 1513-1523
- (12) Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schutz G (1996) Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. Nature 380 (6570): 162-165

- (13) Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC, Straus SM, Hofman A, Deckers JW, et al. (2004) Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur.Heart J.* 25 (18): 1614-1619
- (14) Blocher S, Behr R, Weinbauer GF, Bergmann M, Steger K (2003) Different CREM-isoform gene expression between equine and human normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology* 60 (7): 1357-1369
- (15) Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254
- (16) Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2013) Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 1. Auflage. Version 7. 2009, zuletzt geändert: August 2013. Available from: <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/herzinsuffizienz> [cited: 14.07.2014]; DOI: 10.6101/AZQ/000166AWMF).
- (17) Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162 (1): 156-159
- (18) Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15 (3): 532-4, 536-7
- (19) Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal.Biochem.* 151 (2): 369-374
- (20) Conkright MD, Guzman E, Flechner L, Su AI, Hogenesch JB, Montminy M (2003) Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol.Cell* 11 (4): 1101-1108
- (21) Cozzarelli NR, Kelly RB, Kornberg A (1969) Enzymic synthesis of DNA. 33. Hydrolysis of a 5'-triphosphate-terminated polynucleotide in the active center of DNA polymerase. *J.Mol.Biol.* 45 (3): 513-531
- (22) Daniel PB, Walker WH, Habener JF (1998) Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu.Rev.Nutr.* 18: 353-383
- (23) Daniel PB, Rohrbach L, Habener JF (2000) Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element modulator theta isoforms expressed by two newly identified cAMP-responsive promoters active in the testis. *Endocrinology* 141 (11): 3923-3930

- (24) de Groot RP, den Hertog J, Vandenheede JR, Goris J, Sassone-Corsi P (1993) Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J.* 12 (10): 3903-3911
- (25) Della Fazia MA, Servillo G, Sassone-Corsi P (1997) Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett.* 410 (1): 22-24
- (26) Della Fazia MA, Servillo G, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1998) Stress-induced expression of transcriptional repressor ICER in the adrenal gland. *FEBS Lett.* 434 (1-2): 33-36
- (27) Delmas V, Laoide BM, Masquillier D, Groot RP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1992) Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89 (10): 4226-4230
- (28) Delmas V (1993) Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Molecular Endocrinology* 7 (11): 1502-1514
- (29) Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, et al. (2005) Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 111 (19): 2469-2476
- (30) Distefano G, Sciacca P (2012) Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Ital J Pediatr* 38 (1): 41
- (31) Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84 (21): 7413-7417
- (32) Fenaroli A, Vujanac M, De Cesare D, Zimarino V (2004) A small-scale survey identifies selective and quantitative nucleo-cytoplasmic shuttling of a subset of CREM transcription factors. *Exp.Cell Res.* 299 (1): 209-226
- (33) Fenton MS, Marion KM, Hershman JM (2008) Identification of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator as an activator of the human sodium/iodide symporter upstream enhancer. *Endocrinology* 149 (5): 2592-2606
- (34) Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, et al. (2012) Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue): D84-90
- (35) Flicek P, Ahmed I, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, et al. (2013) Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res.* 41 (Database issue): D48-55

- (36) Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. (2014) Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* 42 (Database issue): D749-55
- (37) Folco EJ, Koren G (1997) Degradation of the inducible cAMP early repressor (ICER) by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem.J.* 328 ( Pt 1) (Pt 1): 37-43
- (38) Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64 (4): 739-749
- (39) Foulkes NS, Mellstrom B, Benusiglio E, Sassone-Corsi P (1992) Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature* 355 (6355): 80-84
- (40) Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1996) Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochim.Biophys.Acta* 1288 (3): F101-21
- (41) Gellersen B (1997) Human Endometrial Stromal Cells Express Novel Isoforms of the Transcriptional Modulator CREM and Up-Regulate ICER in the Course of Decidualization. *Molecular Endocrinology* 11 (1): 97-113
- (42) Gellersen B, Kempf R, Sandhowe R, Weinbauer GF, Behr R (2002) Novel leader exons of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator (CREM) gene, transcribed from promoters P3 and P4, are highly testis-specific in primates. *Mol.Hum.Reprod.* 8 (11): 965-976
- (43) Gellersen B, Kempf R, Sandhowe R, Weinbauer GF, Behr R (2002) Novel leader exons of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator (CREM) gene, transcribed from promoters P3 and P4, are highly testis-specific in primates. *Mol.Hum.Reprod.* 8 (11): 965-976
- (44) He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK (2001) Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch.Intern.Med.* 161 (7): 996-1002
- (45) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6 (10): 986-994
- (46) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y)* 10 (4): 413-417
- (47) Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993) The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J.Am.Coll.Cardiol.* 22 (4 Suppl A): 6A-13A
- (48) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'

exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 88 (16): 7276-7280

(49) Hoppe UC, Erdmann E, Kommission Klinische Kardiologie (2001) Guidelines for the treatment of chronic heart failure. Issued by the Executive Committee of the German Society of Cardiology--Heart and Circulation Research, compiled on behalf of the Commission of Clinical Cardiology in cooperation with Pharmaceutic Commission of the German Physicians' Association. Z.Kardiol. 90 (3): 218-237

(50) Inada A, Someya Y, Yamada Y, Ihara Y, Kubota A, Ban N, et al. (1999) The cyclic AMP response element modulator family regulates the insulin gene transcription by interacting with transcription factor IID. J.Biol.Chem. 274 (30): 21095-21103

(51) Invitrogen (2004) Instruction Manual; 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0; Catalog no. 18374-058; Version E.

(52) Isoda T, Paolocci N, Haghghi K, Wang C, Wang Y, Georgakopoulos D, et al. (2003) Novel regulation of cardiac force-frequency relation by CREM (cAMP response element modulator). FASEB J. 17 (2): 144-151

(53) Jaspers S, Gellersen B, Kempf R, Samalecos A, Bergmann M, Steger K (2007) Functional characterization of male germ cell-specific CREM isoforms. J.Androl. 28 (1): 59-66

(54) Johannessen M, Delghandi MP, Moens U (2004) What turns CREB on? Cell.Signal. 16 (11): 1211-1227

(55) Juang YT, Rauen T, Wang Y, Ichinose K, Benedyk K, Tenbrock K, et al. (2011) Transcriptional activation of the cAMP-responsive modulator promoter in human T cells is regulated by protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of SP-1 and reflects disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. J.Biol.Chem. 286 (3): 1795-1801

(56) Kemp CD, Conte JV (2012) The pathophysiology of heart failure. Cardiovasc.Pathol. 21 (5): 365-371

(57) Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucleic Acids Res. 35 (Web Server issue): W43-6

(58) Klein DC (2007) Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". J.Biol.Chem. 282 (7): 4233-4237

(59) Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics 23 (10): 1289-1291

(60) Kozak M (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J.Mol.Biol. 196 (4): 947-950

- (61) Kozak M (1990) Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87 (21): 8301-8305
- (62) Kozak M (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J.Biol.Chem.* 266 (30): 19867-19870
- (63) Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P (1993) The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J.* 12 (3): 1179-1191
- (64) Lederberg EM, Cohen SN (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J.Bacteriol.* 119 (3): 1072-1074
- (65) Lewin G, Matus M, Basu A, Frebel K, Rohsbach SP, Safronenko A, et al. (2009) Critical role of transcription factor cyclic AMP response element modulator in beta1-adrenoceptor-mediated cardiac dysfunction. *Circulation* 119 (1): 79-88
- (66) Lewin G, Matus M, Basu A, Frebel K, Rohsbach SP, Safronenko A, et al. (2009) Critical Role of Transcription Factor Cyclic AMP Response Element Modulator in 1-Adrenoceptor-Mediated Cardiac Dysfunction. *Circulation* 119 (1): 79-88
- (67) Liu F, Huang YF, Kream BE (2005) Identification of novel cAMP responsive element modulator (CREM) isoforms expressed by osteoblasts. *Calcif.Tissue Int.* 77 (2): 91-95
- (68) Livak KJ, Flood SJ, 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): 357-362
- (69) Lottspeich F (2012) *Bioanalytik*. Springer Spektrum, Berlin u.a., 3 Aufl. Aufl.
- (70) Lympelopoulos A, Rengo G, Koch WJ (2013) Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ.Res.* 113 (6): 739-753
- (71) Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD (2012) Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 14 (1): 38-48
- (72) Marks AR (2013) Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J.Clin.Invest.* 123 (1): 46-52

- (73) Martianov I, Choukrallah MA, Krebs A, Ye T, Legras S, Rijkers E, et al. (2010) Cell-specific occupancy of an extended repertoire of CREM and CREB binding loci in male germ cells. *BMC Genomics* 11: 530-2164-11-530
- (74) Masquillier D, Foulkes NS, Mattei MG, Sassone-Corsi P (1993) Human CREM gene: evolutionary conservation, chromosomal localization, and inducibility of the transcript. *Cell Growth Differ.* 4 (11): 931-937
- (75) Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2 (8): 599-609
- (76) Misund K, Steigedal TS, Laegreid A, Thommesen L (2007) Inducible cAMP early repressor splice variants ICER I and IIgamma both repress transcription of c-fos and chromogranin A. *J.Cell.Biochem.* 101 (6): 1532-1544
- (77) Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75 (5): 875-886
- (78) Monaco L, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1995) Pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) induces CREM gene expression in Sertoli cells: involvement in long-term desensitization of the FSH receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92 (23): 10673-10677
- (79) Montminy M (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu.Rev.Biochem.* 66: 807-822
- (80) Müller FU, Bokník P, Knapp J, Neumann J, Vahlensieck U, Oetjen E, et al. (1998) Identification and expression of a novel isoform of cAMP response element modulator in the human heart. *FASEB J.* 12 (12): 1191-1199
- (81) Muller FU, Lewin G, Matus M, Neumann J, Riemann B, Wistuba J, et al. (2003) Impaired cardiac contraction and relaxation and decreased expression of sarcoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPase in mice lacking the CREM gene. *FASEB J.* 17 (1): 103-105
- (82) Muller FU (2005) Heart-directed Expression of a Human Cardiac Isoform of cAMP-Response Element Modulator in Transgenic Mice. *J.Biol.Chem.* 280 (8): 6906-6914
- (83) Muller FU, Lewin G, Baba HA, Boknik P, Fabritz L, Kirchhefer U, et al. (2005) Heart-directed expression of a human cardiac isoform of cAMP-response element modulator in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 280 (8): 6906-6914

- (84) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1: 263-273
- (85) Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquillier D, LeMeur M, Henriksen K, et al. (1996) Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 380 (6570): 159-162
- (86) New England Biolabs (2013) Phusion® High Fidelity DNA Polymerase; M0530S; PCR Protocol.
- (87) Nigg EA, Hilz H, Eppenberger HM, Dutly F (1985) Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from the Golgi complex to the nucleus. *EMBO J.* 4 (11): 2801-2806
- (88) Passon N, Puppini C, Lavarone E, Bregant E, Franzoni A, Hershman JM, et al. (2012) Cyclic AMP-response element modulator inhibits the promoter activity of the sodium iodide symporter gene in thyroid cancer cells. *Thyroid* 22 (5): 487-493
- (89) Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, et al. (1999) Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J. Biol. Chem.* 274 (4): 2556-2562
- (90) Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30 (9): e36
- (91) Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30 (9): e36
- (92) Rauen T, Benedyk K, Juang Y-, Kerkhoff C, Kyttaris VC, Roth J, et al. (2011) A Novel Intronic cAMP Response Element Modulator (CREM) Promoter Is Regulated by Activator Protein-1 (AP-1) and Accounts for Altered Activation-induced CREM Expression in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Biol. Chem.* 286 (37): 32366-32372
- (93) Rauen T, Hedrich CM, Juang YT, Tenbrock K, Tsokos GC (2011) cAMP-responsive element modulator (CREM)alpha protein induces interleukin 17A expression and mediates epigenetic alterations at the interleukin-17A gene locus in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Biol. Chem.* 286 (50): 43437-43446
- (94) Rougeon F, Kourilsky P, Mach B (1975) Insertion of a rabbit beta-globin gene sequence into an E. coli plasmid. *Nucleic Acids Res.* 2 (12): 2365-2378

- (95) Salamov, AA., Nishikawa, T., Swindells, MB ATGpr - A program for identifying the initiation codons in cDNA sequences. Online im Internet: URL: <http://atgpr.dbcls.jp/> [Abrufdatum: 12.08.2014].
- (96) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74 (12): 5463-5467
- (97) Sassone-Corsi P (1998) Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. Int.J.Biochem.Cell Biol. 30 (1): 27-38
- (98) Seidl MD, Nunes F, Fels B, Hildebrandt I, Schmitz W, Schulze-Osthoff K, et al. (2014) A novel intronic promoter of the Crem gene induces small ICER (smICER) isoforms. FASEB J. 28 (1): 143-152
- (99) Servillo G, Penna L, Foulkes NS, Magni MV, Della Fazia MA, Sassone-Corsi P (1997) Cyclic AMP signalling pathway and cellular proliferation: induction of CREM during liver regeneration. Oncogene 14 (13): 1601-1606
- (100) Servillo G, Della Fazia MA, Sassone-Corsi P (1998) Transcription factor CREM coordinates the timing of hepatocyte proliferation in the regenerating liver. Genes Dev. 12 (23): 3639-3643
- (101) Shifera AS, Hardin JA (2010) Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. Anal.Biochem. 396 (2): 167-172
- (102) Solomou EE, Juang YT, Gourley MF, Kammer GM, Tsokos GC (2001) Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. J.Immunol. 166 (6): 4216-4222
- (103) Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Behr R, Schaller V, Drabent B, et al. (1999) Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round-spermatid maturation arrest. J.Androl. 20 (6): 747-754
- (104) Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pevet P, Sassone-Corsi P (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. Nature 365 (6444): 314-320
- (105) Sunahori K, Juang YT, Tsokos GC (2009) Methylation status of CpG islands flanking a cAMP response element motif on the protein phosphatase 2Ac alpha promoter determines CREB binding and activity. J.Immunol. 182 (3): 1500-1508
- (106) Tenbrock K, Kyttaris VC, Ahlmann M, Ehrchen JM, Tolnay M, Melkonyan H, et al. (2005) The cyclic AMP response element modulator regulates transcription of the TCR zeta-chain. J.Immunol. 175 (9): 5975-5980

- (107) Thermo Scientific (2013) Product Information; Thermo Scientific; TurboFect Transfection Reagent; #R0531; 1 mL.
- (108) Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76 (9): 4350-4354
- (109) Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40 (15): e115
- (110) Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76 (2): 615-619
- (111) Walker WH, Sanborn BM, Habener JF (1994) An isoform of transcription factor CREM expressed during spermatogenesis lacks the phosphorylation domain and represses cAMP-induced transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91 (26): 12423-12427
- (112) Walker WH, Habener JF (1996) Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends Endocrinol.Metab.* 7 (4): 133-138
- (113) Yan C, Miller CL, Abe J (2007) Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ.Res.* 100 (4): 489-501

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

<b>Abbildung 1: <i>Circulus vitiosus</i> bei verminderter kardialer Auswurfleistung</b> .....	9
<b>Abbildung 2: Darstellung des Adenylylcyclase-Signalwegs mit Modulation der CREM-Expression durch CREB</b> .....	11
<b>Abbildung 3: Gegenüberstellung der genomischen Organisation der cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB, CREM und ATF-1</b> .....	13
<b>Abbildung 4: Das humane CREM-Gen</b> .....	14
<b>Abbildung 5: Arbeitsflussdiagramm der angewandten Methodik</b> .....	24
<b>Abbildung 6: Schema der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion und ihrer Priming-Optionen</b> .....	26
<b>Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerasekettenreaktion</b> .....	29
<b>Abbildung 8: Übersicht über die Arbeitsschritte der 5'-RACE-PCR mit dem 5' RACE System for Rapid Amplifikation of cDNA Ends, Version 2.0</b> .....	32
<b>Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese zur Darstellung der 5'-RACE-PCR-Produkte mit einem GSP für Exon Ia</b> .....	36
<b>Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese zur Darstellung der 5'-RACE-PCR-Produkte mit einem GSP für Exon Ib</b> .....	37
<b>Abbildung 11: Nachweis der Transfektion von HEK293-Zellen mit pQE-TriSystem-6 und pEGFP-C1</b> .....	53
<b>Abbildung 12: Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P1/P5 in Gesamt-RNA von Mäuseherzen</b> .....	66
<b>Abbildung 13: Übersicht der identifizierten CREM-Spleißvarianten in C57BL/6-Ventrikelhomogenaten</b> .....	67
<b>Abbildung 14: Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P1/P5 in Kardiomyozyten-RNA von Mäuseherzen</b> .....	68
<b>Abbildung 15: Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P4 in Kardiomyozyten-RNA von Mäuseherzen</b> .....	69
<b>Abbildung 16: Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P2 in Kardiomyozyten-RNA von Mäuseherzen</b> .....	70
<b>Abbildung 17: Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P6 in Kardiomyozyten-RNA von Mäuseherzen</b> .....	71
<b>Abbildung 18: Übersicht der Identifizierten CREM-Spleißvarianten in C57BL/6-Kardiomyozyten</b> .....	72
<b>Abbildung 19: Übersicht der durch 5'-RACE identifizierten CREM-Spleißvarianten in FVB/N-Ventrikelhomogenaten</b> .....	73
<b>Abbildung 20: Übersicht der sequenzierten CREM-Spleißvarianten in Ventrikelhomogenaten von Patienten ohne Herzinsuffizienz (Non-Failing)</b> .....	74
<b>Abbildung 21: Übersicht der sequenzierten CREM-Spleißvarianten in Ventrikelhomogenaten von Patienten mit DCM</b> .....	75
<b>Abbildung 22: Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P1 in Gesamt-RNA von humanen Herzen</b> .....	76
<b>Abbildung 23: Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P1 in Gesamt-RNA von humanen Herzen</b> .....	77

Abbildung 24: <b>Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P2 in Gesamt-RNA von humanen Herzen</b> .....	78
Abbildung 25: <b>Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P2 in Gesamt-RNA von humanen Herzen</b> .....	79
Abbildung 26: <b>Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P6 in Gesamt-RNA von humanen Herzen</b> .....	80
Abbildung 27: <b>Nachweis von CREM-Spleißvarianten ab P6 in Gesamt-RNA von humanen Herzen</b> .....	81
Abbildung 28: <b>Western-Blot-Analyse der in HEK293-Zellen translatierten Proteine der CREM-Spleißvarianten B-H-Ia, B-H-Ib und B-<math>\gamma</math>-H-Ib</b> .....	84
Abbildung 29: <b>Induktion der CREM-Expression in FVB/N-Ventrikeln nach 10 h Isoprenalininstimulation</b> .....	86
Abbildung 30: <b>Induktion der Isoformen B-H-Ia und B-H-Ib durch Isoprenalininstimulation</b> .....	87
Abbildung 31: <b>Induktion der Isoformen B-E-F-H-Ia und B-E-F-H-Ib durch Isoprenalininstimulation</b> .....	88
Abbildung 32: <b>Induktion von ICER durch Isoprenalininstimulation</b> .....	89
Abbildung 33: <b>Induktion von smICER durch Isoprenalininstimulation</b> ..	90
Abbildung 34: <b>Induktion der Spleißvariante B-H-Ib bei DCM</b> .....	91
Abbildung 35: <b>Kleine CREM-Proteine vermitteln Repression der CRE-abhängigen Transkription</b> .....	92

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1: <b>Auswahl aktivatorischer und repressorischer Isoformen des murinen Crem-Gens</b> .....	16
Tabelle 2: <b>Übersicht der in der PCR verwendeten Primer</b> .....	28
Tabelle 3: <b>Übersicht der in der 5'-RACE-PCR verwendeten Primer</b> .....	33
<i>Tabelle 4: <b>Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration</b></i> .....	38
Tabelle 5: <b>Übersicht der in der qPCR mit Hydrolyse-Sonden verwendeten Primer</b> ) .....	61
Tabelle 6: <b>Übersicht der in der qPCR verwendeten Hydrolyse-Sonden</b> .....	62
Tabelle 7: <b>Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren B-Ia und B-Ib amplifiziert werden konnten</b> .....	66
Tabelle 8: <b>Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren B-Iag und B-Ibg amplifiziert werden konnten</b> .....	68
<i>Tabelle 9: <b>Übersicht der Spleißvariante, die mit dem Primerpaar 02-Iag amplifiziert werden konnte</b></i> .....	69
Tabelle 10: <b>Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren X2-Iag und X2-Ibg amplifiziert werden konnten</b> .....	70
Tabelle 11: <b>Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren P6-Iag und P6-Ibg amplifiziert werden konnten</b> .....	71
Tabelle 12: <b>Übersicht der Spleißvarianten, die mit dem Primerpaar hB-Ia amplifiziert werden konnten</b> .....	76
Tabelle 13: <b>Übersicht der Spleißvarianten, die mit dem Primerpaar hB-Ib amplifiziert werden konnten</b> .....	77
Tabelle 14: <b>Übersicht der Spleißvariante, die mit dem Primerpaar hX-Ia amplifiziert werden konnte</b> .....	78
Tabelle 15: <b>Übersicht der Spleißvariante, die mit dem Primerpaar hX-Ib im NF-Herzen amplifiziert werden konnte</b> . .....	79
Tabelle 16: <b>Übersicht der Spleißvarianten, die mit den Primerpaaren hP6-Ia und hP6-Ib in NF-Herzen amplifiziert werden konnten</b> .....	80
Tabelle 17: <b>Translation der identifizierten Spleißvarianten anhand putativer Kozaksequenzen (Sequenzanalyse erfolgte mit den Programmen ATGpr (95) und Geneious (10))</b> .....	83

## **10 DANKSAGUNG**

---

## **11 LEBENSLAUF**

---





Landesamt für Natur,  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn  
Univ.-Prof. Dr. med. Frank U. Müller  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Westfälische Wilhelms - Universität Münster  
Domagkstr. 12  
48149 Münster

Tierschutz

Durchführung von Tierversuchen; Genehmigung gem. § 8 Tierschutzgesetz  
Ihr Antrag vom 27.11.2008; Ihr Schreiben vom 09.06.2009

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Müller,

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

**„Bedeutung der cAMP-abhängigen transkriptionellen Regulierung für die kardiale Kontraktilität“,**

Ihrem Genehmigungsantrag entsprechend obliegt die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden Personen:

**Verantwortlicher Leiter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Frank U. Müller**  
**Stellvertretender Leiter: Herr Dr. rer. nat. Matthias D. Seidl**

Diese Genehmigung ist für die Dauer von 36 Monaten ab dem 22.06.2009 befristet bis zum

**30.06.2012.**

Die Genehmigung wird unter den folgenden Bedingungen erteilt und mit folgenden Auflagen verbunden:

Auskunft erteilt:

Herr Salert

Direktwahl 02361/305-3709

Fax 02361/305-3439

poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

8.87-50.10.36.09.009

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 22.06.2009

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 oder 237 bis

Haltestelle "LANUV" und 5 Min.

Fußweg oder mit Buslinie SB 20

bis Haltestelle "Hohenhorster

Weg" und 15 Min. Fußweg in

Richtung Trabrennbahn bis

Leibnizstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED3

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn  
Univ.-Prof. Dr. med. Frank U. Müller  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Westfälische Wilhelms - Universität Münster  
Domagkstr. 12  
48149 Münster

Auskunft erteilt:

Herr Salert

Direktwahl 02361/305-3709

Fax 02361/305-3439

Fachbereich84@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

8.87-50.10.36.09.009

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

**Tierschutz;**

Genehmigung zur Verwendung von Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 25.05.2012; eingegangen am 08.06.2012

**„Bedeutung der cAMP-abhängigen transkriptionellen Regulierung für die  
kardiale Kontraktilität“**

Datum: 12.06.2012

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Müller,

antragsgemäß verlängere ich die Laufzeit des o. g. Versuchsvorhabens um  
ein Jahr bis zum 30.06.2013.

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Dieses Schreiben ist Bestandteil meines Genehmigungsbescheides vom  
22.06.2009.

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 oder 237 bis

Haltestelle "LANUV" und 5 Min.

Fußweg oder mit Buslinie SB 20

bis Haltestelle "Hohenhorster

Weg" und 15 Min. Fußweg in

Richtung Trabrennbahn bis

Leibnizstraße

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

*Dr. Hieronymus*  
(Dr. Hieronymus)

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12