Molekulare Kardiologie der Inneren Medizin III Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel Direktor: Prof. Dr. Norbert Frey

# Untersuchung des Calcineurin-NFAT Signalweges mittels eines "miRNA-Hochdurchsatz-Screens" in einer murinen Myoblastenvorläuferzelllinie

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

# Violetta Harazin

Kiel, 2016

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Norbert Frey
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Roeder
Tag der mündlichen Prüfung:	04.04.2016
Zum Druck genehmigt:	04.04.2016

gez.:

Der Dekan

# Inhaltsverzeichnis

Abbi	ildung	sverzeichnis	VII
Tabe	ellenve	rzeichnis	IX
Abki	ürzung	sverzeichnis	XI
1	Finlei	tung	. 1
1.1	Kardia	ale Hypertrophie und Herzinsuffizienz	. 1
1.2	Molek	ulare Wege zur Herzhvpertrophie und Herzinsuffizienz	3
1.2	.1 Ca	lcineurin-NFAT Signalweg	. 5
	1.2.1.1	Calcineurin	7
	1.2.1.2	Rolle und Struktur der NFAT-Faktoren (Nuclear Factor of Activated T-cells)	. 9
1.3	Die R	olle von miRNAs in der zellulären Signaltransduktion	10
1.4	Eigen	schaften synthetisierter miRNAs und Analysen mithilfe von	
	"Hoch	durchsatz-Screens"	11
1.5	RNA-	Interferenz	13
1.6	Die R	olle von miRNAs in der kardialen Hypertrophie	16
1.7	Zielse	tzung der Arbeit	18
2	Mater	ial und Methoden	19
2.1	Mater	ial	19
2.1	.1 Ge	eräte und Verbrauchsmaterial	19
2.1	.2 Ch	emikalien	20
2.1	.3 En	zyme	22
2.1	.4 Kit	S	22
2.1	.5 Oli	gonukleotide	23
	2.1.5.1	Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren	23
	2.1.5.2	Primer für diverse PCRs und Sequenzierungen	24
	2.1.5.3	qRT-PCR Primer für vorhergesagte potentielle Zielgene der miRNA-142-5p	24
	2.1.5.4	Endogene qRT-PCR Primer Kontrolle	25
	2.1.5.5	qRT-PCR Primer der Hypertrophie-assoziierten Gene	25
	2.1.5.6	miScript Primer Assay für qRT-PCR	25
	2.1.5.7	miRVana™ miRNA Mimic	26
2.1	.6 Ve	ktoren und Plasmide	26
2.1	.7 Ad	enovirale Konstrukte	26
2.1	.8 An	tikörper	26
2.1	.9 Pu	ffer und Lösungen	27
2.1	.10 Me	edien	28

2.2	Ze	llkulturmethoden	. 29
2.2	.1	Zelllinien und Kultivierung	. 30
2.2	.2	Zellzahlbestimmung	. 30
2.2	.3	Auftauen von Zellen	. 30
2.2	.4	Einfrieren von Zellen	. 31
2.2	.5	Aussaat und Ernte	. 31
2.2	.6	Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	. 31
2.2	.7	Transfektion von kleinen nicht-kodierenden RNAs	. 32
2.2	.8	Stabile Zelllinien	. 32
	2.2.	8.1 C2C12-NFAT stabile Zelllinie	. 33
2.2	.9	Isolation von primären Kardiomyozyten	. 33
2.3	Mil	krobiologische Methoden	. 35
2.3	.1	Herstellung von elektrokompetenten Bakterienzellen	. 35
2.3	.2	Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen durch Elektroporation	. 35
2.3	.3	Herstellung von Selektivnährböden	. 36
2.3	.4	Anzucht von Bakterien in Selektivmedium	. 36
2.4	Мо	ekularbiologische und biochemische Methoden	. 36
2.4	.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	. 36
2.4	.2	Agarose-Gelelektrophorese	. 37
2.4	.3	Restriktion von DNA	. 38
2.4	.4	Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse	. 38
2.4	.5	Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel	. 38
2.4	.6	Ligation von DNA-Fragmenten	. 39
2.4	.7	Plasmid-Mini-Präparation über Säulen	. 39
2.4	.8	Plasmid-Midi/Maxi-Präparation über Säulen	. 40
2.4	.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	. 40
2.4	.10	Klonierung mit dem Gateway®-System	. 40
2.4	.11	Generierung eines Adenovirus	. 41
2.4	.12	Titerbestimmung eines Adenovirus	. 42
2.4	.13	Herstellung von adenoviralen miRNA-Konstrukten mit dem Block-iT™ System	. 43
2.4	.14	Zielgenvorhersage-Programme und Auswertung mit einem Venn-Diagramm	. 44
2.4	.15	pmirGLO-Klonierung der 3`UTR-Zielgensequenz	. 44
2.4	.16	RNA-Isolierung aus NRVCM mit Qiazol	. 45
	2.4.	16.1 cDNA-Synthese mit dem Superscript® III First Strand Kit	. 46
	2.4.	16.2 cDNA-Synthese mit dem miScript II RT Kit	. 46
2.4	.17	Quantitative Real-Time PCR	. 47
2.4	.18	Protein-Extraktion aus NRVCM und C2C12 Zellen	. 50
2.4	.19	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	. 50

2.4.21       Westem-Blot und Immunodetektion       51         2.4.22       Immunhistochemie       52         2.5.       Neugeborene Ratten und Haltung der Tiere       52         2.5.1       Klonierung der transgenen miRNA-142 Mauslinie       53         2.5.2       Genotypisierung mittels Mausschwanzspitzen-Biopsien       55         2.5.3       Gewebeentnahme       56         2.5.4       Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung       56         2.5.5       RNA-Extraktion aus Herzgewebe       56         2.5.6       Statistische Auswertung       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Aufbau und Ablauf des "miRNA-142-5	2.4.	.20	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.4.22       Immunhistochemie       52         2.5       Neugeborene Ratten und Haltung der Tiere       52         2.5.1       Klonierung der transgenen miRNA-142 Mauslinie       53         2.5.2       Genotypisierung mittels Mausschwanzspitzen-Biopsien       55         2.5.3       Gewebeentnahme       56         2.5.4       Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung       56         2.5.5       RNA-Extraktion aus Herzgewebe       57         2.6.6       Statistische Auswertung       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA-Hochdurchsatz-Screen* in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Erge	2.4.	.21	Western-Blot und Immunodetektion	51
2.5       Neugeborene Ratten und Haltung der Tiere       52         2.5.1       Klonierung der transgenen miRNA-142 Mauslinie       53         2.5.2       Genotypisierung mittels Mausschwanzspitzen-Biopsien       55         2.5.3       Gewebeentnahme       56         2.5.4       Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung       56         2.5.5       RNA-Extraktion aus Herzgewebe       56         2.5.6       Statistische Auswertung       57         2.6       "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse des amiRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67 <td< td=""><td>2.4.</td><td>.22</td><td>Immunhistochemie</td><td>52</td></td<>	2.4.	.22	Immunhistochemie	52
2.5.1       Klonierung der transgenen miRNA-142 Mauslinie       53         2.5.2       Genotypisierung mittels Mausschwanzspitzen-Biopsien       55         2.5.3       Gewebeentnahme       56         2.5.4       Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung       56         2.5.5       RNA-Extraktion aus Herzgewebe       56         2.5.6       Statistische Auswertung       57         2.6       "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse des adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgew	2.5	Ne	ugeborene Ratten und Haltung der Tiere	52
2.5.2       Genotypisierung mittels Mausschwanzspitzen-Biopsien       55         2.5.3       Gewebeentnahme       56         2.5.4       Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung       56         2.5.5       RNA-Extraktion aus Herzgewebe       56         2.5.6       Statistische Auswertung       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         <	2.5.	.1	Klonierung der transgenen miRNA-142 Mauslinie	53
2.5.3       Gewebeentnahme       56         2.5.4       Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung       56         2.5.5       RNA-Extraktion aus Herzgewebe       56         2.5.6       Statistische Auswertung       57         2.6       miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p	2.5.	.2	Genotypisierung mittels Mausschwanzspitzen-Biopsien	55
2.5.4       Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung       56         2.5.5       RNA-Extraktion aus Herzgewebe       56         2.5.6       Statistische Auswertung       57         2.6       miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heb	2.5.	.3	Gewebeentnahme	. 56
2.5.5       RNA-Extraktion aus Herzgewebe       56         2.5.6       Statistische Auswertung       57         2.6       "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie.       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.3       Ergebnisse des adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf.       81         3.8       miRNA-142-	2.5.	.4	Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung	56
2.5.6       Statistische Auswertung       57         2.6       "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie.       57         2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.3       Ergebnisse des adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf.       8	2.5.	.5	RNA-Extraktion aus Herzgewebe	56
2.6       "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie	2.5.	.6	Statistische Auswertung	. 57
2.6.1       Dual-Luziferase Reporter Assay System       57         2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf       81         3.8       miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten       82         3.9       Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte	2.6	"mi	RNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie	57
2.6.2       miRNA Bibliotheken       58         2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.       74         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf       81         3.8       miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypert	2.6.	.1	Dual-Luziferase Reporter Assay System	57
2.6.3       Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen       59         2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.       74         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf.       81         3.8       miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten       82         3.9 <td>2.6.</td> <td>.2</td> <td>miRNA Bibliotheken</td> <td>58</td>	2.6.	.2	miRNA Bibliotheken	58
2.6.4       Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay       59         2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.4       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.       74         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf.       81         3.8       miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten       82         <	2.6.	.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	59
2.6.5       Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       60         2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.       74         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf.       81         3.8       miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten.       82         3.9       Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie       85         3.10       Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse<	2.6.	.4	Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay	59
2.6.6       Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte.       61         3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.4       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.       74         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf       81         3.8       miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten       82         3.9       Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie       85         3.10       Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse       89         4       Diskussion       93 <td>2.6.</td> <td>5</td> <td>Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"</td> <td>60</td>	2.6.	5	Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"	60
3       Ergebnisse       62         3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.       74         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf       81         3.8       miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten       82         3.9       Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie       85         3.10       Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse       89         4       Diskussion       93	2.6.	.6	Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte	61
3.1       Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       62         3.2       Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       66         3.3       Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"       67         3.4       Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten       70         3.5       Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen       72         3.6       Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.       74         3.6.1       qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p       77         3.7       Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf.       81         3.8       miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten.       82         3.9       Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie       85         3.10       Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse       89         4       Diskussion       93	3	Erg	jebnisse	62
<ul> <li>3.2 Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"</li></ul>	3.1	Eta	Iblierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"	62
<ul> <li>3.3 Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"</li></ul>	3.2	Aut	fbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"	. 66
<ul> <li>3.4 Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten</li></ul>	3.3	Erg	gebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"	. 67
<ul> <li>3.5 Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen</li></ul>	3.4	Erg	, gebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten	.70
und verschiedenen Mausmodellen723.6Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p.743.6.1qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p773.7Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf813.8miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten823.9Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie853.10Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse894Diskussion93	3.5	Re	lative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben	
<ul> <li>3.6 Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p</li></ul>		und	d verschiedenen Mausmodellen	.72
miRNA-142-5p.743.6.1 qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p773.7 Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf813.8 miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten823.9 Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie853.10 Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse894 Diskussion93	3.6	Exp	perimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die	
<ul> <li>3.6.1 qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p</li></ul>		miF	RNA-142-5p	.74
potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p773.7Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf813.8miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten823.9Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie853.10Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse894Diskussion93	3.6.	.1	qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der	
<ul> <li>3.7 Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf</li></ul>			potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p	. 77
<ul> <li>Calcineurin-NFAT Signalweg auf</li></ul>	3.7	Су	closporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im	
<ul> <li>3.8 miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten</li></ul>		Ca	lcineurin-NFAT Signalweg auf	. 81
Kardiomyozyten	3.8	miF	RNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in	
<ul> <li>3.9 Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie</li></ul>		Ka	rdiomyozyten	82
<ul> <li>3.10 Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse</li></ul>	3.9	Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie85		85
4 Diskussion	3.10	Мо	rphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse	. 89
	4	Dis	kussion	93
4.1 Vor- und Nachteile der verwendeten Versuchskonfigurationen	4.1	Vo	r- und Nachteile der verwendeten Versuchskonfigurationen	. 94
4.2 Bewertung der Ergebnisse des "miRNA-Screens"	4.2	Bev	wertung der Ergebnisse des "miRNA-Screens"	96

4.2.1	1 Identifizierung und Bedeutung der miRNA Modulatoren	97
4.3	Die funktionelle Bedeutung der miRNA-1421	00
4.3.1	1 Aufklärung der miRNA-142-3p und der miRNA-142-5p 1	00
4.3.2	2 Diskussion von potentiellen Zielgenen der miRNA-142-5p 1	03
4.3.3	3 Einfluss der miRNA-142-5p auf die NFAT-Aktivierung in Abhängigkeit von	
	Cyclosporin A und Tacrolimus in C2C12-NFAT Zellen und in Kardiomyozyten 1	08
4.3.4	4 Einfluss der miRNA-142-5p auf die PE-induzierte Hypertrophie in	
	Kardiomyozyten1	10
4.3.5	5 Rolle der miRNA-142-5p in verschiedenen Mausmodellen 1	12
4.4	In vivo Mauslinien 1	15
4.4.1	1 Phänotyp der transgenen miRNA-142 Mauslinien1	15
4.4.2	2 Hypertrophie-Genmarker im <i>in vivo</i> Mausmodell1	17
4.5	Ausblick1	18
5	Zusammenfassung1	21
6	Abstract 1	22
7	Literatur 1	23
Erklä	rung1	45
Leber	nslauf1	46
Publi	kationen 1	47
Dank	sagung1	48

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1–1:	Beteiligte Signalkaskaden der kardialen Hypertrophie	4
Abbildung 1–2:	Calcineurin-NFAT Signalweg	6
Abbildung 1–3:	Aufbau der Calcineurin A Domäne	7
Abbildung 1–4:	Aufbau der Transkriptionsfaktoren NFATc1-NFATc4 Domäne	. 10
Abbildung 1–5:	Modell des miRNA-Biogeneseprozesses	. 15
Abbildung 3–1:	Vergleich der NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität nach	
	unterschiedlichen Integrationszeiten	. 64
Abbildung 3–2:	Messung der Zellviabilität nach Transfektion	. 65
Abbildung 3–3:	Graphische Darstellung des "miRNA-Screen" Ablaufs und der Aufbau	
	der Plasmide	. 66
Abbildung 3–4:	Schematische Darstellung der Auswertung des "miRNA-Screens"	. 67
Abbildung 3–5:	NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität nach Zugabe der zehn	
	ausgewählten miRNA Mimics in C2C12-NFAT Zellen	. 69
Abbildung 3–6:	NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität nach Zugabe der acht	
	ausgewählten miRNA Mimics in NRVCMs	. 71
Abbildung 3–7:	Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen	
	Mausgewebeproben	. 72
Abbildung 3–8:	Relative Expression der miRNA-142-5p in verschiedenen	
	Mausmodellen	. 73
Abbildung 3–9:	Überexpression der miRVana™ miRNA Mimic 142-5p in den C2C12	
	Zellen	. 75
Abbildung 3–10:	Untersuchung der Zielgenvalidierung mit den pmirGLO/3'UTR	
	Konstrukten	. 76
Abbildung 3–11:	Überexpression der AdmiRNA-142-5p und der miRVana™ miRNA	
	Mimic 142-5p in NRVCMs	. 78
Abbildung 3–12:	Western Blot Analysen der potentiellen Zielgene in NRVCMs	. 80
Abbildung 3–13:	Western Blot Analyse des direkten Zielgens p300 in NRVCMs	. 81
Abbildung 3–14:	NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität nach Überexpression der	
	miRNA-142-5p in Abhängigkeit von Cyclosporin A und FK506	. 82
Abbildung 3–15:	Messung des hypertrophen Genprogrammes und der Zellgröße	. 84
Abbildung 3–16:	Schematische Darstellung des miRNA-142 Konstruktes	. 85
Abbildung 3–17:	Nachweis der Integration der hGH-Poly-A-Tail-Kassette in den vier	
	Foundern	. 86
Abbildung 3–18:	Vergleich der miRNA-142 Founder Herzen mit Wildtyp Herzen	. 87
Abbildung 3–19:	Vergleich der miRNA-142 Herzen der F1-Generation mit Wildtyp	
	Herzen	. 88

Abbildung 3–20:	HE-Färbung der miRNA-142 Herzen im Vergleich zum Wildtyp Herz	88
Abbildung 3–21:	Überexpression der miRNA-142-5p in den transgenen Mauslinien	90
Abbildung 3–22:	Morphometrische Daten der transgenen miRNA-142 Mauslinien	91
Abbildung 3–23:	Expressionsniveau der kardialen hypertrophen Genmarker Nppa,	
	Nppb und Rcan1-4	92
Abbildung 4–1:	Wirkmechanismus der miRNA-142-5p auf den Calcineurin-NFAT	
	Signalweg	109
Abbildung 4–2:	Schematische Darstellung der Genregulation mittels	
	Tet-On/Off-System	119

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2–1:	Primer-Sequenzen für PCR und Sequenzierung	24
Tabelle 2–2:	Primer-Sequenzen für die Generierung der transgenen Mauslinie	24
Tabelle 2–3:	Primer-Sequenzen der potentiellen Zielgene	24
Tabelle 2–4:	Primer-Sequenzen der endogenen Kontrolle	25
Tabelle 2–5:	Primer-Sequenzen der Hypertrophie-assoziierten Gene und endogene	
	Kontrolle	25
Tabelle 2–6:	miScript Primer Assay	25
Tabelle 2–7:	miRVana™ miRNA Mimic	26
Tabelle 2–8:	Vektoren für diverse Klonierungen	26
Tabelle 2–9:	Plasmide für die stabile C2C12-NFAT Zelllinie	26
Tabelle 2–10:	Adenoviren für die Infektion der neonatalen Rattenkardiomyozyten	26
Tabelle 2–11:	Erstantikörper für Western Blot	26
Tabelle 2–12:	Zweitantikörper für Western Blot	27
Tabelle 2–13:	Verwendete Zelldichten für die durchgeführten Versuche	31
Tabelle 2–14:	Ansätze für die Transfektion mit Lipofectamin® 2000	32
Tabelle 2–15:	Aufbau des pHTS-NFAT Reportervektors	33
Tabelle 2–16:	Verwendete Zelldichten für die durchgeführten Versuche	34
Tabelle 2–17:	Anzucht der E. coli Stämme	35
Tabelle 2–18:	Verwendete Konzentration der Antibiotika	36
Tabelle 2–19:	Schema eines PCR-Ansatzes	37
Tabelle 2–20:	Standardprogramm eines Thermocyclers für eine PCR	37
Tabelle 2–21:	Schema für die pmirGLO-PCR	45
Tabelle 2–22:	Touchdown-PCR für die pmirGLO-Klonierung	45
Tabelle 2–23:	Standard-Reaktionsansatz für qRT-PCR	48
Tabelle 2–24:	Standardprogramm für die SYBR® Green qRT-PCR	48
Tabelle 2–25:	Standard-Reaktionsansatz für eine miScript qRT-PCR	49
Tabelle 2–26:	Standardprogramm für die miScript qRT-PCR	49
Tabelle 2–27:	Standard-Reaktionsansatz für die Multiplex qRT-PCR	49
Tabelle 2–28:	Standardprogramm für die Multiplex qRT-PCR	49
Tabelle 2–29:	Volumenangaben zur Herstellung eines Trenngeles	51
Tabelle 2–30:	Volumenangaben zur Herstellung eines Sammelgeles	51
Tabelle 2–31:	Schema für den PCR-Ansatz	53
Tabelle 2–32:	Touchdown-PCR für die miRNA-142 Überexpression	53
Tabelle 2–33:	Schema eines Genotypisierungs-PCR-Ansatzes	55
Tabelle 2–34:	Genotypisierungs-PCR für die transgenen miRNA-142 Mauslinien	55
Tabelle 2–35:	Verwendete Transfektionsreagenzien in einer 96-Well-Platte	59

Tabelle 3–1:	: Transfektionseffizienz der 8 verschiedenen Transfektionsmittel mit der	
	FITC markierten siRNA von Qiagen	. 63
Tabelle 3–2:	Transfektionseffizienz der 8 verschiedenen Transfektionsmittel mit der	
	FITC markierten siRNA von Exiqon	. 63
Tabelle 3–3:	Potentielle Zielgene der miRNA-142-5p	. 74
Tabelle 3–4:	Körpergewichte der miRNA-142 Mäuse und der entnommenen Organe	. 89

# Abkürzungsverzeichnis

$\Delta CnA$	konstitutives aktives Calcineurin A
A. dest	lat. Aqua destillata
Abb	Abbildung
AD	Adenovirus
ADS	Verdaupuffer mit Pankreatin und Kollagenase
AI	Autoinhibitorische Domäne
AK	Antikörper
AKAP79	A-Kinase Ankerprotein
Ang II	Angiotensin II
AP1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
CABIN1	Calcineurin Binding Protein 1
CaM	Calmodulin
СаМКІІ	Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II
cDNA	complementary DNA
CHP	Calcineurin-Like EF-Hand Protein 1
CK1	Casein Protein 1
CnB	Calcineurin B bindende Domäne
CRE	cAMP Response Element
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH20	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsRNA	Doppelstrang RNA
DTT	Dithiotreitol
DYRK	Dual specificity Tyrosine-Phosphorylation Regulated
	Kinase
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence

FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FOS	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
FS	Fractional Shortening
GATA4	GATA Binding Protein 4
GEF	Guanosine Triphosphate Exchange Factor
GSK	Glykogensynthase-Kinase 3
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
ICM	Ischemic Cardiomyopathy
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
JUN	Jun Proto Oncogene
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LAD	Left Artery Descending
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LNA	Locked Nucleic Acid
LVAD	Left Ventricular Assist Device
LVEF	Left Ventricular Ejection Fraction
МАРК	Mitogen Activated Protein Kinases
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
min	Minute
miRNA	micro-RNA
MLP	Muscle LIM Protein
mRNA	messenger-RNA
NCS	Newborn Calf Serum
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NIDCM	Non-Ischemic Dilated Cardiomyopathy
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
Nppa	natriuretisches Peptid Typ A
Nppb	natriuretisches Peptid Typ B
NRVCM	Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PE	. Phenylephrin
PFA	. Paraformaldehyd
РКА	. Proteinkinase A
PKC	. Protein Kinase C
PKD	. Protein Kinase D
PTGS	Posttranscriptional Gene Silencing
PVDF	. Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	. quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
Rcan	. Regulator von Calcineurin
RNA	. Ribonukleinsäure
RNAi	. RNA Interferenz
rpm	. Umdrehungen pro Minute
rRNA	. ribosomale RNA
RT	. Raumtemperatur
SDS	. Sodiumdodecylsulfat
sek	. Sekunde
siRNA	. small interfering RNA
SMAD3	. SMAD Family Member 3
snRNA	. small nuclear RNA
SRF-RE	. Serum Response Factor Response Element
SRR	. Serinreiche Regionen
Tab	. Tabelle
TAC	transversaler Aortenkonstruktion
TAD	. Transaktivierungs-Domäne
TAE	. Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBST	. Tris-Buffered Saline Tween 20
TE	. Tris-EDTA Puffer
TEMED	.N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	. Transgen
TGS	. Transcriptional Gene Silencing
Tris	. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton x-100	. Polyoxyethylen-(9,10)p-t-octyphenol
tRNA	. Transfer-RNA
Tween 20	. Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
v/v	. Volumen/Volumen
w/v	. Gewicht/Volumen
WT	. Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen weltweit ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. In Europa allein führen sie zu über vier Millionen Todesfällen pro Jahr, die somit rund 47 % aller Todesfälle laut der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie verursachen (2012). Die Herzinsuffizienz ist mit einer Prävalenz von 1-2 % eine der häufigsten Erkrankungen in der Erwachsenenbevölkerung in Europa (Mosterd&Hoes, 2007). Das Herz reagiert auf unterschiedliche physiologische und pathologische Belastungen, die zur Entwicklung einer Hypertrophie führen. Die Herzhypertrophie ist eine Herzvergrößerung mit Zunahme des Herzgewichtes durch das Volumen der Myofibrillen, ohne dass sich die Anzahl der Myozyten ändert (Wilkins&Molkentin, 2002). Sie wird durch chronische Mehrbelastung des Herzens hervorgerufen. Es werden drei Arten von Herzhypertrophie definiert: Die "entwicklungsbedingte", "physiologische" die und die "pathologische". Die "entwicklungsbedingte" Herzhypertrophie bezeichnet das normale Herzwachstum von der Geburt bis zum Erwachsenenalter. Die "physiologische" Hypertrophie, die durch regelmäßige sportliche Betätigung oder Schwangerschaft entsteht, ist anatomisch eine adaptive physiologische exzentrische Hypertrophie (Dickhuth et al., 2004; Ekholm et al., 1997; Maron&Pelliccia, 2006), wobei die Wanddicke der Ventrikel und des Septums in gleichem Maße wie der Innendurchmesser der Ventrikel zunimmt (Heineke&Molkentin, 2006). Die Entwicklung vom gesunden Herzen zur "physiologischen" Hypertrophie ist reversibel. Bei der pathologischen Herzhypertrophie kommt es zur ventrikulären Dilatation (ventrikuläres Remodeling), das sich negativ auf die Herzfunktion auswirkt (Deschamps&Spinale, 2006; Patten et al., 1998; Paul, 2003). Durch chemische oder mechanische schädigende Reize wird vermehrt Bindegewebe (Kollagenfasern) zwischen den Muskelzellen abgelagert, was zum Umbau des vorhandenen Bindegewebegerüstes des Herzmuskels führt (Herzfibrose). Dabei kommt es zur Veränderungen der extrazellulären Matrix mit erhöhter Steifigkeit des Myokards und vermehrtem Zelltod durch Apoptose und Nekrose (Kang&lzumo, 2003; Wencker et al., 2003). Die pathologische Hypertrophie ist zu Beginn eine konzentrische Hypertrophie, wobei die Herzmuskelwände verdickt und das Volumen der Herzkammern verkleinert ist. Wird das Herz anhaltend mehr belastet, geht die anfänglich reversible kompensierte Hypertrophie zur dekompensierten Herzinsuffizienz mit Dilatation über (Frey&Olson, 2003; Holtz, 1992; Katus et al., 2003). Die kardiale Hypertrophie geht mit charakteristischen zellulären Veränderungen einher. die zur Aktivierung eines Genprogramms führen und letztendlich einen Umbauprozess des Herzmuskels beinhalten. Zahlreiche klinische Studien haben gezeigt, dass die kardiale Hypertrophie im

Langzeitverlauf einen unabhängigen Risikofaktor für ungünstige Folgeerscheinungen, wie Herzinsuffizienz und Arrhythmien darstellt und die Mortalität erhöht. Unter dem Begriff Herzinsuffizienz versteht man das akute oder chronische Pumpversagen des Herzmuskels. Dabei ist das Herz nicht mehr in der Lage, die Gewebe mit genügend Blut und damit Sauerstoff zu versorgen, um den Gewebestoffwechsel in Ruhe oder unter Belastung sicherzustellen. Die Folge ist eine Kaskade von Veränderungen, die unter Belastung aber auch in Ruhe zu rascher Ermüdbarkeit, Dyspnoe, Ödemen und zum Tod führen können (Mudd&Kass, 2008). Mitverantwortlich für die steigende Prävalenz der Herzinsuffizienz sind das Alterwerden unserer Bevölkerung und die steigende Lebenserwartung (Ho et al., 1993; Kannel, 2000). Hinsichtlich der Altersabhängigkeit liegt die Prävalenz der Herzinsuffizienz bei den 20- bis 40-Jährigen unter 0,5 % und steigt bei den über 60-Jährigen deutlich an (> 10 % der Männer und > 8 % der Frauen) (Braunwald, 2013; Neumann et al., 2009). Klinisch unterscheidet man zwischen der akuten Herzinsuffizienz, deren Auslöser ein akut eintretendes, lebensbedrohliches Ereignis ist (Ischämie, Myokardinfarkt, Myokarditis, Lungenembolie, Bluthochdruckkrise, akute Klappeninsuffizienz, Perikardtamponade, Hypovolämie, Intoxikationen, thyreotoxische Krise oder Herzrhythmusstörungen) und der chronischen Herzinsuffizienz, die schleichend progredient verläuft. Des Weiteren unterscheidet man die Linksherzinsuffizienz und die Rechtsherzinsuffizienz. Bei der Linksherzinsuffizienz arbeitet die linke Herzkammer unzureichend und das Blut staut sich in der Lunge, was eine Wasseransammlung (Ödem) zur Folge haben kann (Stauungslunge oder Lungenödem). Bei der Rechtsherzinsuffizienz staut sich das Blut in den Organen (Leber, Darm, Haut etc.), was zu Ödemen in beiden Beinen, dem Lungenzwischenraum oder den Lebervenen führen kann. Auch kann man die Herzinsuffizienz nach der Art der Funktionsstörung der Herzkammern in eine diastolische oder systolische Dysfunktion trennen. Die systolische Ventrikelfunktionsstörung ist durch eine verminderte Kontraktilität des Myokards gekennzeichnet, die in den meisten Fällen aus einer koronaren Herzkrankheit oder einer Kardiomyopathie entsteht. Bei der diastolischen Ventrikelfunktionsstörung ist die systolische Pumpfunktion erhalten, allerdings ist hierbei die Einschränkung des Schlagvolumens durch eine verschlechterte diastolische Füllung des Ventrikels bedingt. Der häufigste Risikofaktor für die Herzinsuffizienz ist die arterielle Hypertonie (Levy et al., 1996). Nach einer neuen Klassifikation der "American Heart Association" werden Kardiomyopathien heute in primäre und sekundäre Formen unterschieden (Maron et al., 2006). Als Kardiomyopathie werden alle Herzmuskelerkrankungen bezeichnet. welche eine Beeinträchtigung der kardialen Funktion zeigen. Dabei unterscheidet man die Hypertrophe (HCM) und die Dilatative (DCM) Kardiomyopathie. Die HCM ist eine primäre myokardiale Erkrankung, die sich durch einen deutlich hypertrophierten linken Ventrikel auszeichnet (Richardson et al., 1996). Es kommt zu einer Zunahme des Herzgewichtes verursacht durch

eine asymmetrische Verdickung des linken Ventrikels bei gleichzeitiger Volumenabnahme. Die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine krankhafte Erweiterung (Dilatation) des Herzmuskels, die zur Einschränkung der Kontraktilität des linken oder beider Ventrikels führt. Durch eine Abnahme der systolischen Pumpkraft kommt es zum fortschreitenden Verlust der Auswurfleistung des Herzens. Mit einem Anteil von 18 % - 28 % ist die DCM eine der Hauptursachen der Herzinsuffizienz (Andersson et al., 1995; Cowie et al., 1997).

### 1.2 Molekulare Wege zur Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz

Eine Hypertrophie-Induktion findet durch eine Vielzahl von Signalwegen statt. Durch mechanischen Stimulus oder Bindung von Liganden an der Zelloberfläche kommt es zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasen und Phosphatasen. Signalwege, wie die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase D (PKD), Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPKs), Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Phosphatase Calcineurin, spielen eine zentrale Rolle bei der kardialen Hypertrophie (Frey et al., 2004b; Heineke&Molkentin, 2006; Molkentin et al., 1998). Dabei kommt es auf zellulärer Ebene zur Vergrößerung des Herzens durch eine Volumenzunahme der Kardiomyozyten bei gleichbleibender Zellzahl, zur Erhöhung der RNA- und Proteinsynthese und zur Veränderung in der Genexpression (Sugden&Clerk, 1998). Eine entscheidene Relevanz bei der kardialen Hypertrophie hat der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Anstieg (Frey et al., 2000a; Olson&Molkentin, 1999). Dieser wird durch die Aktivierung von anderen Signalwegen als auch durch Stimulatoren wie Angiotensin II (Ang II), Phenylephrin (PE) und Endothelin-1 induziert (Eble et al., 1998; Sadoshima&Izumo, 1993; Yue et al., 2000).

In Abbildung 1–1 sind die wichtigsten an der kardialen Hypertrophie beteiligten Signalwege dargestellt. Diese umfassen die G-Protein gekoppelten Rezeptoren Gs-, Gq/G<sub>11</sub>- und Gi-Signalkaskaden, den MAPK-Signalweg, den PIK3K-AKT/GSK-3 Signalweg, den MEF2/HDAC Signalweg, den Proteinkinase C Signalweg, den Calcineurin-NFAT Signalweg und den Gp130/STAT Signalweg als auch kleine GTP-Bindeproteine (Frey&Olson, 2003).



#### Abbildung 1–1: Beteiligte Signalkaskaden der kardialen Hypertrophie

Zusammenfassung aller beteiligten Signalwege, die zur kardialen Hypertrophie führen: Calcineurin-NFAT Signalweg, PIK3K-AKT/GSK-3 Signalweg, G-Protein gekoppelten Rezeptoren Gq/G<sub>11</sub>-, Gs- und Gi-Signalkaskaden, MEF2/HDAC Signalweg, MAPK-Signalweg, Proteinkinase C Signalweg und der Gp130/STAT Signalweg. (Frey&Olson, 2003).

Auch weitere Signalwege, wie der SRF-RE (Serum Response Factor-Response Element) und der CRE (cAMP Response Element) Signalweg spielen eine bedeutende Rolle im Herzen und in der Zelldifferenzierung (Gauthier-Rouviere et al., 1996; Kuwahara&Nakao, 2011; Muller et al., 2000; Rangrez et al., 2013; Seeger et al., 2010; Vandecasteele et al., 2006). Die beiden Signalwege können über Signalkaskaden induziert werden und somit die SRF-RE Genexpression beeinflussen. Die Aktivierung von kann über die Signaltransduktionskaskade Rho A und die Aktivierung von CRE kann über die zyklische Signaltransduktionskaskade AMP abhängige-Proteinkinase A (PKA) aktiviert werden. Der CRE Signalweg und der SRF-RE Signalweg werden über die G-Protein gekoppelte Rezeptoren gesteuert. Beim CRE Signalweg wird das Enzym Adenylatzyklase aktiviert und die entstandene ATP - cAMP Veränderung katalysiert. Das führt zur Bindung an die Proteinkinase A und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CRE. Beim SRF-RE Signalweg wird die kleine Rho A GTPase durch sogenannte GEF-Proteine aktiviert, wobei es zum Austausch von GDP zu GTP kommt. Dieses führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF-RE und zur Veränderung der Genexpression.

Um diese Signalwege und deren mögliche Relevanz in der Hypertrophie zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei stabile Zelllinien hergestellt und etabliert. Für die Herstellung der stabilen CRE Zelllinie kam der pGL4.29 [Luc2P/CRE/Hygro] Vektor und für die Herstellung der stabilen SRF-RE Zelllinie kam der pGL4.34 [Luc2P/SRF-RE/Hygro] Vektor von Promega

zum Einsatz. Die beiden Vektoren beinhalten ein "Luc2P" Reportergen, das durch Stimulation aktiviert werden konnte. Die Luziferase Reportergen-Aktivität der beiden stabilen Zelllinien konnte durch Stimulation mit fetalem Kälberserum (SRF-RE Zelllinie) bzw. mit Isoprenalin (CRE Zelllinie) mittels des Dual-Luziferase Assays ermittelt werden. Nach erfolgreicher Etablierung der beiden Zelllinien besteht letztendlich die Möglichkeit "Hochdurchsatz-Screens" durchzuführen, um die Rolle und Funktion von Genen in diesen Signalwegen besser zu analysieren.

### 1.2.1 Calcineurin-NFAT Signalweg

Eine gut beschriebene Signalkette, die zur Hypertrophie-Induktion führt, ist der Calcineurin-NFAT Signalweg. Calcineurin ist eine Serin-Threonin-Phosphatase, die durch einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel aktiviert wird. Durch den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> in das Zytoplasma kommt es zur Bindung an das Protein Calmodulin, was zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin führt (Liu, 2009; Wilkins&Molkentin, 2004). Die Interaktion von Calmodulin und Calcineurin führt zur Dephosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells). Dieser ist im phosphorylierten Zustand im Zytoplasma lokalisiert und wird durch Dephosphorylierung in den Zellkern transferiert. Dort bindet NFAT an Transkriptionsfaktoren wie GATA4 (GATA Binding Protein 4) oder MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) und aktiviert eine Reihe von pro-hypertrophen Genen (Hogan et al., 2003; Wilkins et al., 2004; Wilkins&Molkentin, 2004). Zu den Hypertrophie-assoziierten Genen zählen unter anderem die natriuretischen Peptide Typ A (Nppa) und Typ B (Nppb) als auch Rcan1-4 (Regulator of Calcineurin), deren Expression mit zunehmender Herzinsuffizienz ansteigt. In Abbildung 1-2 ist ein schematischer Überblick des Calcineurin-NFAT Signalweges dargestellt.



#### Abbildung 1–2: Calcineurin-NFAT Signalweg

Durch verschiedene Faktoren, Stress und diverse Signalwege entsteht ein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytoplasma, welches an Calmodulin bindet und die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Dieser dephosphoryliert NFAT, das in den Zellkern weiter transferiert wird und dort ein pro-hypertrophes Genprogramm induziert (Luedde et al., 2006).

Der Calcineurin-NFAT Signalweg wird durch zahlreiche Kinasen reguliert, die direkt NFAT phosphorylieren können. Dazu zählen die MAP-Kinasen, GSK3ß (Glycogen Synthase Kinase-3 β), Proteinkinase А und Kinasen der **DYRK-Familie** (Dual-Specifity Tyrosine-Phosphorylation Regulated Kinases) (Beals et al., 1997; Kuhn et al., 2009; Yang et al., 2002). Auch Proteine, welche die NFAT-Phosphorylierung induzieren können, wie z.B. p38 und JNK (c-Jun N-terminal Kinases) (Braz et al., 2003; Liang et al., 2003) sind am Calcineurin-NFAT Signalweg beteiligt. Die NFAT-Aktivierung kann durch die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) inhibiert werden, da diese die Aktivität der Phosphatase Calcineurin blockieren (Heineke&Molkentin, 2006). Weitere Inhibitoren für Calcineurin sind das Calcineurin-Binding-Protein1 (CABIN1), das A-Kinase Ankerprotein (AKAP79), das Calcineurin-like-EF-Hand-Protein (CHP) sowie Calcipressin (MCIP) (Aramburu et al., 2004; Lai et al., 1998; Lin et al., 1999).

#### 1.2.1.1 Calcineurin

Calcineurin ist eine Proteinphosphatase, welche in der Regulation der Immunantwort eine Schlüsselrolle spielt. Dieses Protein ist ein Heterodimer, bestehend aus der katalytischen Untereinheit Calcineurin A (59 kDa) und der regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (19 kDa) (Guerini et al., 1992). Die regulatorische Untereinheit trägt die Kalzium-Bindestellen, wobei die katalytische Untereinheit sowohl die Calcineurin В als die auch Calmodulin-Bindestellen trägt. Das Protein Calcineurin oder PPP3CA (auch bekannt unter PP2B) gehört zu der PPP-Familie (Barford et al., 1998). Bei Säugetieren kodieren drei unabhängige Isoformen für die katalytische Untereinheit CnAα, CnAβ und CnAγ, wobei CnAα und CnAβ im Herzen exprimiert werden (Bueno et al., 2002; Taigen et al., 2000). Die regulatorische Untereinheit kodiert für die Isoformen Calcineurin B 1 und 2, wobei nur Calcineurin B 1 im Herzen exprimiert ist (Ueki et al., 1992). Zudem unterscheidet man zwei Klassen der Serin-Threonin-Proteinphosphatasen, die in Klasse 1 (PP1) oder Klasse 2 (PP2) unterteilt sind. Die zur zweiten Klasse gehörenden Phosphatasen, die sich in ihrer Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen unterscheiden, sind die Proteinphosphatasen 2A (PP2A), 2B (PP2B oder Calcineurin) und 2C (PP2C). Sie sind alle essentiell für verschiedene Signaltransduktionswege in eukaryoten Zellen. Trotz der genannten Unterschiede gehören PP1, PP2A und PP2B mit zu den am höchsten konservierten bekannten Enzymfamilien (Rusnak&Mertz, 2000). Neben der N-terminalen katalytischen Domäne (auch Phosphatase-Domäne) besitzt Calcineurin A eine regulatorische Domäne. In dieser Domäne kodiert die Calcineurin-B-bindende Domäne (CNB), die Calmodulin-bindende Domäne (CaM) und die autoinhibitorische Domäne (AI). Die autoinhibitorische Domäne am C-Terminus blockiert im inaktiven Zustand die katalytische Domäne (Burkard et al., 2005; Rusnak&Mertz, 2000). Die Nummerierung entspricht der Anzahl an Aminosäuren (100-500). Der Aufbau der Calcineurin A Domäne ist schematisch in Abbildung 1–3 dargestellt.









Die Calcineurin-Untereinheit A besitzt neben der katalytischen Domäne auch eine regulatorische Domäne, die eine Calcineurin-B-bindende Domäne (CNB), eine Calmodulin-bindende Domäne (CaM) und die autoinhibitorische Domäne (AI) kodiert. Modifiziert nach (Rusnak&Mertz, 2000).

Ist genügend Kalzium im Zytoplasma vorhanden, bindet dieses an Calmodulin, welches seinerseits an die CaM Domäne des Calcineurins bindet, was zu einer Interaktion von Calmodulin und Calcineurin führt. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung der

autoinhibitorischen Domäne, so dass diese nicht mehr das Phosphatasezentrum blockiert, was eine Aktivierung von Calcineurin zur Folge hat (Kincaid, 1993). Calcineurin dephosphoryliert Transkriptionsfaktoren, was die nukleäre Translokation bzw. die DNA-Bindung dieser ermöglicht. In dieser Arbeit wurde konstitutiv aktives Calcineurin verwendet, das durch eine Mutation keine Calmodulin-Bindestelle und keine autoinhibitorische Domäne enthält, was dazu führt, dass die katalytische Domäne ständig aktiv ist.

Calcineurin spielt eine zentrale Rolle in der Hypertrophie-Induktion, aber auch in anderen Signalwegen. Es konnte bei Patienten mit Herzerkrankungen ein hoher Level vom aktivierten Calcineurin beobachtet werden, was zur Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz führte (Haq et al., 2001; Lim&Molkentin, 1999; Ritter et al., 2002). Weitere Funktionen von Calcineurin konnten in der Zelle beschrieben werden, wie bei der Muskelkontraktion, beim Stoffwechsel, bei der synaptischen Übertragung, beim RNA-Spleißen und beim Zellzyklus (Beullens et al., 1992; Cohen, 1989; Shenolikar&Nairn, 1991; Wera&Hemmings, 1995). Des Weiteren spielt Calcineurin eine bedeutende Rolle bei der Signalübertragung über den T-Zell-Rezeptor und hat damit Einfluss auf die Funktion von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (T-Zell-Aktivierung).

Um einer Hypertrophie über den Calcineurin-NFAT Signalweg entgegen zu wirken, suchte man Inhibitoren gegen Calcineurin. Die Substrate Cyclosporin A und Tacrolimus (FK506) inhibieren die Aktivität von Calcineurin (Bueno et al., 2002) und werden als effektives Immunsuppressiva in der Klinik eingesetzt, insbesondere zur Vorbeugung einer Transplantatabstoßung (Taylor et al., 2005). Cyclosporin A ist ein zyklisches Peptid, das aus den Schlauchpilzen isoliert wurde (Borel et al., 1976). FK506 gehört zur Klasse der bakteriellen Makrolide (Kino et al., 1987), dessen Wirkmechanismus dem von Cyclosporin A ähnlich ist, obwohl sie zu verschiedenen Stoffklassen gehören. Cyclosporin A und FK506 bilden einen Komplex zusammen mit den Immunophilinen Cyclophilin und FKBP, die an Calcineurin binden und zur Inaktivierung von Calcineurin führen. Es konnte in Experimenten gezeigt werden, dass die beiden Substrate an sich keine aktiven Calcineurin Inhibitoren sind, sondern erst an ihre endogenen Partner, den Immunophilinen binden müssen, um ihre Funktionalität zu erlangen (Schreiber&Crabtree, 1992). Ein weiterer wichtiger endogener Modulator des Calcineurin-NFAT Signalweges ist Rcan1-4, der als Inhibitor von Calcineurin fungiert. Die Expression von Rcan1-4 ist induktionsabhängig, der basal nur schwach exprimiert wird. Zudem ist die Expression von Rcan1-4 NFAT und Calcineurin abhängig, da Rcan1-4 nach in silico-Analysen eine Anhäufung von 15 Bindestellen für NFAT beinhaltet. Es wird angenommen, dass Rcan1-4 so einen negativen Rückkopplungsmechanismus für den Calcineurin-NFAT Signalweg darstellt (Yang et al., 2000). Als Antwort auf die Aktivierung des Calcineurin-NFAT Signalweges bei Druckbelastung oder vermehrter Beanspruchung wird

Rcan1-4 im Herzen heraufreguliert (Yang et al., 2000). Gleichzeitig wirkt Rcan1-4 negativ regulierend auf Calcineurin und blockt dessen Aktivität durch Bindung an die katalytische Untereinheit (Chan et al., 2005; Vega et al., 2002). Dieser Mechanismus verhindert das Überschießen der NFAT-Aktivierung während die basale Calcineurin-Aktivität moduliert wird. Shin et al. zeigten in einer Studie einen dosisabhängigen-Effekt von Rcan1-4. Dieser wirkte beim niedrigen Expressions-Level als Inhibitor und beim höheren Expressions-Level als Vermittler, welches die Komplexität der Calcineurin Regulation hervorhebt (Shin et al., 2011).

#### 1.2.1.2 Rolle und Struktur der NFAT-Faktoren (Nuclear Factor of Activated T-cells)

NFAT sind Transkriptionsfaktoren, unter anderem in T-Lymphozyten von Wirbeltieren, die bei Aktivierung an einen Promotor im Zellkern binden und so die Genexpression aktivieren. Ursprünglich war NFAT als Transkriptionsfaktor beschrieben, der an den humanen Interleukin 2 (IL-2) Promotor bindet und diesen transaktiviert (Shaw et al., 1988). Eine zentrale Rolle spielt NFAT in der T-Zell-Aktivierung. Innerhalb des Immunsystems sind die NFAT Proteine in den T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen und in den Killerzellen exprimiert (Lyakh et al., 1997). Mittlerweile zählt man zur NFAT-Familie fünf Mitglieder, welche mit NFATc1-4 und NFAT5 bezeichnet werden (Hogan et al., 2003). Dabei unterteilt man folgende NFAT-Isoformen: NFATc1 (NFAT2, NFATc); NFATc2 (NFAT1, NFATp); NFATc3 (NFAT4, NFATx) und NFATc4 (NFAT3). Sie sind zytosolisch und bilden nach Translokation in den Zellkern einen Komplex, der für die Transkriptionsfunktion notwendig ist (van Rooij et al., 2002). Der Transkriptionsfaktor NFAT5 dagegen ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Alle Isoformen scheinen spezifische Funktionen zu regulieren, wobei NFATc3 eine besonders wichtige Funktion bei der Regulation myokardialer Hypertrophie zu spielen scheint. In NFATc3 Knockout Mäusen konnten Wilkins et al. zeigen, dass diese unter verschiedenen Stimulationen eine signifikant reduzierte Hypertrophie ausbilden im Vergleich zu den Wildtyp Kontrollen (Wilkins et al., 2002).

Die Transkriptionsfaktoren NFATc1-NFATc4, besitzen eine stark konservierte DNA-bindende Domäne, die als Rel Homologie-Region (RHR) bezeichnet wird. Eine weitere Gemeinsamkeit der NFAT-Faktoren ist der N-terminale Bereich (NHR), der die amino-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), die Calcineurin-Bindungsstelle, die Kernlokalisierungssequenz (NLS) und die regulatorische Domäne, die durch Serinreiche Regionen (SRR) und mehrere Serin-Prolin-Wiederholungen (SP1-3) charakterisiert sind, beinhaltet (Hogan et al., 2003; Park et al., 2000; Zhu&McKeon, 1999). Diese Serin-Bereiche sind sowohl Ziel von Calcineurin als auch der Kinasen CK1 (Casein Kinase 1), GSK3 oder DYRK, die NFAT phosphorylieren können. (Antos et al., 2002; Kuhn et al., 2009; Wu et al., 2007). Eine starke Phosphorylierung dieser Serin-Reste maskiert das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) von NFAT, wodurch es im Zytosol inaktiv vorliegt. Das NLS sorgt für die Translokation von NFAT in den Zellkern. Die regulatorische Domäne besitzt zwei unterschiedliche Calcineurin-Bindestellen für die Aktivierung durch Calcineurin und die Regulation der NFAT-Aktivität (Garcia-Cozar et al., 1998). Die DNA-Bindedomäne verfügt über Kennungsmotive für die Kofaktoren FOS (FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog) und JUN (Jun Proto Oncogene). In Abbildung 1–4 ist die Domäne der Transkriptionsfaktoren NFATc1-4 dargestellt. Unterschieden werden diese Transkriptionsfaktoren durch die Spleißvarianten NFAT1 (Isoformen A, B und C), NFAT2 (Isoformen A, B und C), NFAT3 (keine Isoformen) und NFAT4 (Isoformen 1, 2, 3 und 4), welche sich in der Länge des C-Terminus differenzieren. Der Transkriptionsfaktor NFAT5 enthält einen reduzierten NHR-Bereich und besitzt keine Calcineurin-Bindestelle.



Abbildung 1–4: Aufbau der Transkriptionsfaktoren NFATc1-NFATc4 Domäne Die NFAT Struktur zeigt die N-terminale Domäne (Aktivierungs-Domäne), die regulatorische Domäne, die DNA-Bindedomäne und die C-terminale Domäne. Eine besondere Rolle spielt die regulatorische Domäne, da sich dort die Calcineurin-Bindestellen CnBP-A und CnBP-B befinden. Rote Kreise zeigen Phosphatgruppen, die durch Calcineurin abgespalten werden können. Modifiziert nach (Hogan et al., 2003).

NFAT ist im Zytoplasma lokalisiert und liegt im phosphorylierten Zustand vor, bis Calcineurin durch einen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg aktiviert wird und an die beiden Bindestellen der regulatorischen Domäne von NFAT bindet. Durch die Bindung an das Calcineurin-Bindepeptid-A (CnBP-A) und das Calcineurin-Bindepeptid-B (CnBP-B) werden die Serinreste durch Calcineurin dephosphoryliert, was zur Folge hat, dass die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) das NFAT-Protein freilegt (Park et al., 2000). So transferiert das dephosphorylierte NFAT-Protein in den Zellkern und bewirkt mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren wie AP1 (Activator Protein 1), GATA4 und MEF2 eine Umprogrammierung der Genexpression mit einem deutlichen Anstieg der Hypertrophie-assoziierten Gene (Hogan et al., 2003; Wilkins et al., 2004; Wilkins&Molkentin, 2004).

## 1.3 Die Rolle von miRNAs in der zellulären Signaltransduktion

Zu den bemerkenswertesten wissenschaftlichen Durchbrüchen der letzten Jahrzehnte gehören die Fortschritte der RNA Forschung. Die ersten beschriebenen kleinen

regulatorischen RNAs lin-4 und let-7 in Caenorhabditis elegans (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000) eröffneten aufgrund der Funktion in der zielspezifischen Hemmung der Translation einen posttranskriptionellen Mechanismus der Genregulation. Eine große Klasse von nicht codierenden RNAs sind die micro-RNAs (miRNAs), die erstmals 2001 beschrieben wurden (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee&Ambros, 2001). MiRNAs sind kleine, nicht-codierende, einzelsträngige RNAs mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden. Sie stellen eine Klasse von negativen Genregulatoren dar, die alle wichtigen biologischen Prozesse der Zelle, wie z.B. Apoptose, Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Proliferation und Entwicklung steuern. Dies geschieht durch die sequenzspezifische Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA, was zur Inhibition der Translation oder zum Abbau der mRNA führt. Dabei entscheidet der Grad der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, auf welche Art die Expression reguliert wird. Kommt es zu einer Bindung über die komplette Länge der miRNA, wird die mRNA degradiert; bindet die miRNA nur partiell an die mRNA, so wird die mRNA destabilisiert oder die Translation inhibiert. Mithilfe der sogenannten "Seed" Region der miRNA (Basen 2-7), die essentiell für die Erkennung der miRNA-Bindungsstelle und die folgende Herunterregulation der Ziel-mRNA ist, lässt sich die Zahl potentieller Ziel-mRNAs eingrenzen (Brennecke et al., 2005). MiRNAs sind in einer Vielzahl von Metazoen, Pflanzen und Viren verbreitet und werden dort zell- und zeitgesteuert exprimiert (Lagos-Quintana et al., 2001). Basierend auf Computerberechnungen, haben miRNAs im Menschen einen direkten Einfluss auf mindestens 30 % der Gene im ganzen Genom (Zhang, 2008). Derzeit sind beim Menschen 1881 pre-miRNAs und 2588 miRNAs identifiziert. Bei der Maus konnten 1193 pre-miRNAs und 1915 miRNAs, und in der Ratte konnten 495 pre-miRNAs und 765 miRNAs nachgewiesen werden, die in Sammlungen, sogenannten Bibliotheken wie "miRBase" vorliegen (Stand 07/2014).

# 1.4 Eigenschaften synthetisierter miRNAs und Analysen mithilfe von "Hochdurchsatz-Screens"

In dieser Arbeit wurde die murine "miScript miRNA Mimic V16.0 Bibliothek" von Qiagen mit 1050 verschiedenen miRNAs Mimics und die murine "miRCURY LNA™ miRNA Inhibitor V12.0 Bibliothek" von Exiqon mit 624 verschiedenen miRNA Inhibitoren verwendet (Stand 2011). MiScript miRNA Mimics sind chemisch synthetisierte doppelsträngige RNAs, die reife endogene miRNAs nach der Transfektion in Zellen nachahmen. Sie verursachen eine Abnahme der Genexpression ähnlich wie es für endogene miRNAs beobachtet wird. Die Genexpression mit den miScript miRNA Mimics kann bis zu 72 h nach der Transfektion effizient inhibiert werden. Die vorgefertigten miScript miRNA Mimic 96-Well Platten eignen sich besonders gut für "Hochdurchsatz-Screens". Analysen und Versuche sollen die Ziele

und Aufgaben der miRNAs aufklären und die Wirkung der Fehlregulation sowie die Bestätigung bestimmter Gene untersuchen. Eine reduzierte Genexpression nach der Transfektion der miRNA Mimics liefert den Beweis, dass miRNAs an der Regulierung bestimmter Gene beteiligt sind. Bei den miRCURY LNA™ miRNA Inhibitoren handelt es sich spezifische einzelsträngige Antisense-Oligonukleotid Sequenzen, um die an die entsprechende prozessierte und funktionsreife miRNA komplementär binden. Die Repression der jeweiligen Ziel-mRNA wird dadurch unterbunden und die miRNA bedingte Translationsinhibierung aufgehoben. LNA-Moleküle (Locked Nucleic Acid) stabilisieren dabei das Rückgrat der einzelsträngigen miRNA Inhibitoren, um so deren endogenen Abbau zu verhindern. Im Gegenteil zu den miRNA Inhibitoren werden miRNA Mimics endogen in funktionsfähige miRNAs prozessiert, erhöhen damit den Gehalt an physiologisch aktiver miRNA und verstärken SO die Translationsinhibierung von Ziel-mRNAs. Die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch miRNAs ist essentiell für die Herzentwicklung und -funktion, was in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden konnte (Fechner et al., 2008; Suckau et al., 2009). MiRNA Inhibitoren konnten bereits in verschiedenen Tiermodellen erfolgreich angewendet werden (Care et al., 2007; da Costa Martins et al., 2010) und stellen eine neue Generation von möglichen RNA-basierten Therapiemolekülen für das kardiovaskuläre System dar (Poller et al., 2010; van Rooij et al., 2008).

In den letzten Jahren fanden sogenannte "Hochdurchsatz-Screens" eine besondere Bedeutung in der zellbiologischen Forschung. Der Begriff des zellulären "Hochdurchsatz-Screens" wird vor allem in der Pharmaforschung angewendet, welche mithilfe von Robotersystemen, automatisierten Pipettiervorrichtungen und effizienten Detektionssystemen den Einfluss von Zehntausenden bis Millionen verschiedenen Substanzen auf einen spezifischen Signalweg, einen zellulären Prozess oder auch auf intakte Zellen und Gewebe überprüfen können. Bei zellbiologischen Untersuchungen wird von "Hochdurchsatz-Screens" gesprochen, wenn eine Fragestellung genomweit oder zumindest anhand einiger tausend Gene bzw. Proteine überprüft wird (Mohr et al., 2010). Ein bedeutendes neues molekularbiologisches Werkzeug ist die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi). Diese RNA-basierte Technologien der RNA-Interferenz oder der Eingriff in endogene regulatorische RNA-Systeme bildet ein weiteres bedeutendes Feld für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Durch in vitro Versuche in Drosophila melanogaster konnten die entscheidenden enzymatischen Komponenten und der funktionelle Ablauf der RNAi-Prozedur aufgeklärt werden (Bernstein et al., 2001; Hammond et al., 2000). Für die "Hochdurchsatz-Screens" werden meist etablierte Zelllinien verwendet, da sie einfach zu kultivieren und genetisch modifizierbar sind. Daher eignen sie sich ideal für die Entwicklung

und Durchführung von "Hochdurchsatz-Screen" Verfahren, die ein einzelnes Gen oder einen Signalweg untersuchen.

## 1.5 RNA-Interferenz

Neuere Daten zeigen, dass miRNAs an der Entstehung menschlicher Krankheiten wie diverser Krebsarten, Muskulatur- und Herzerkrankungen oder an Stoffwechselstörungen beteiligt sind. Somit bieten sie einen neuen Ansatzpunkt für Therapien, um die Behandlung von Krankheiten voranzutreiben. Damit die Rolle der miRNAs bei der Krankheitsentstehung entschlüsselt und neue, zielgerichtete Behandlungsstrategien entwickelt werden können, müssen jedoch die Genexpressions-Mechanismen der miRNA aufgeklärt werden.

RNA Interferenz (RNAi) beschreibt einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus der Genexpression bei Pflanzen, Tieren und Menschen, der zum Abschalten von Genen in Zellen führt (Bartel, 2004). Dieses Phänomen wurde 1998 durch Andrew Fire und Craig Mello entdeckt, nachdem sie im Fadenwurm Caenorhabditis elegans beobachten konnten, dass es durch Injektion von kleinen doppelsträngigen RNAs (dsRNA) zur Degradation der dazu komplementären mRNA kam und somit die Genexpression unterdrückt wurde (Fire et al., 1998). Auch in der Pflanze Arabidopsis thaliana konnte dieses Phänomen nachgewiesen werden. Durch das Einbringen eines Transgens in eine Pflanze konnte ein veränderter Phänotyp beobachtet werden, welches in weiteren Studien als "Posttranscriptional Gene Silencing" (PTGS) bezeichnet und als ein antiviraler Abwehrmechanismus postuliert wurde (Hamilton&Baulcombe, 1999; Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990). Neben dem PTGS gibt es auch den Weg des "Transcriptional Gene Silencing" (TGS), welches ebenfalls in Pflanzen beschrieben wurde. Beim TGS findet keine Transkription des betroffenen Gens statt. Auslöser des TGS sind unter anderem die Interaktionen zwischen homologen Sequenzen, die eine Methylierung und eine Veränderungen in der Chromatinstruktur bewirken (Meng et al., 2003; Park et al., 1996; Wassenegger et al., 1994). Auch in Escherichia coli konnte 1984 festgestellt werden, dass kurze RNA-Moleküle die Translation von Genen hemmen können (Mizuno et al., 1984). RNAi wird in der Zelle über verschiedene RNA Subspezies vermittelt, die sich sowohl in der Herkunft als auch in der Prozessierung unterscheiden. Innerhalb der Zelle erfolgt die Genregulation durch miRNAs, die durch die genomische DNA codiert sind. MiRNA-Gene liegen entweder als eigenständige Gene mit Promotor vor oder sind intron- oder exon-ständig innerhalb anderer Gene kodiert und werden gemeinsam mit diesen kotranskribiert. Die Reifung der miRNAs erfolgt in mehreren Schritten und in verschiedenen Kompartimenten. Die miRNA-Gene werden von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert (Lee et al., 2004), wodurch zunächst ein pri-miRNA (primary-miRNA) Transkript entsteht. Dieses hat eine Länge von 500 bis 3000 nt und ist mit einer 5'-terminalen 7-Methylguanosin Kappe und einem 3'-terminalen Poly-A Schwanz versehen. Noch im Zellkern faltet sich die pri-miRNA in eine Haarnadelstruktur und enthält die spätere miRNA in Form von Stamm-Schleifen (stem-loop) Strukturen. Durch die Prozessierung durch die RNAse III Drosha und dem Co-Faktor DGCR8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8, Microprocessor Complex Subunit) entsteht ein 60-80 nt langes pre-miRNA (precursor-miRNA) Molekül (Bushati&Cohen, 2007; Chen&Meister, 2005; Denli et al., 2004). Die pre-miRNA wird anschließend durch den Ran-GTP (Guanin Triphosphatase) abhängigen Nuklear-Export-Faktor Exportin-5 aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert (Bohnsack et al., 2004; Wang et al., 2011). Durch das RNAse III Enzym Dicer wird die Schleife der Stem-loop-Struktur der pre-miRNA in 17-24 nt lange dsmiRNA geschnitten und durch das Enzym Helikase aufgewunden. Der Strang, dessen 5'-Terminus am thermodynamisch instabileren Ende des RNA Doppelstranges liegt, bleibt als reife miRNA erhalten, während der Gegenstrang degradiert wird. Die reife miRNA wird in einen als RISC (RNA Induced Silencing Complex) bezeichneten Enzymkomplex inkorporiert, dessen Hauptkomponenten Proteine der Argonaut-(AGO) Familie sind. Diese sind in der Lage, die endonukleolytische Spaltung oder die Hemmung der Translation der mRNA zu vermitteln. Eine komplette Sequenzhomologie zur Ziel-mRNA führt zur Degradation und eine teilweise Homologie durch Bindung an die mRNA führt zur Blockierung der Translation (Kim et al., 2009; Perron&Provost, 2008; Winter et al., 2009). In Abbildung 1-5 ist schematisch der miRNA-Biogeneseprozess dargestellt.



mRNA target cleavage Translational repression mRNA deadenylation

#### Abbildung 1–5: Modell des miRNA-Biogeneseprozesses

Der miRNA-Biogeneseprozess ist in mehrere Schritte aufgeteilt: Als erstes erfolgt die Synthese des pri-miRNA Transkripts, das mittels der RNAse III Drosha und dem Co-Faktor DGCR8 zu einem 60-80 nt pre-miRNA Transkript prozessiert wird. Der Export der pre-miRNA aus dem Zellkern findet mithilfe des Ran-GTP abhängigen Exportin-5 statt. Es erfolgt die Prozessierung der pre-miRNA zu einer 17-24 nt reifen miRNA und die Einbindung der reifen miRNA in den RISC Komplex. Der stabile Strang, der die reife miRNA enthält, bleibt erhalten und der Gegenstrang wird degradiert. Die miRNA-Bindung an den 3'UTR der Ziel-mRNA führt zur Degradierung der Ziel-mRNA, zur Inhibierung der Translation oder zur mRNA-Deadenylierung (Winter et al., 2009).

RNAi entstand ursprünglich als Schutzsystem gegen fremdartige RNA-Moleküle. Bei Pflanzen, Pilzen, Fadenwürmern und Insekten spielt sie bei der Verteidigung gegen RNA-Viren eine wichtige Rolle. Diese Aufgabe kann bei Säugetieren von spezieller zelleigener miRNA mit einer direkten hemmenden Wirkung auf die Replikation von Viren wahrgenommen werden.

Um den Effekt von RNAi zu quantifizieren, bietet sich die Verwendung von Reportergenen an. Reportergene sind Gene oder Gen-Fragmente, die mit anderen Genen gekoppelt werden, um deren Aktivitäten nachweisbar zu machen. Die Vorteile der Reportergene liegen darin, dass ihre Expression einfach, schnell und spezifisch quantifiziert werden kann.

Die ersten RNAi-basierten Studien erfolgten in einer Reihe von Zellen und Geweben aus verschiedenen Organismen (Aikin et al., 2012; DasGupta&Gonsalves, 2008; Newmark, 2005; Parry et al., 2007). Zellen besitzen eine Vielzahl von nicht codierenden RNAs. Dazu gehören die tRNAs (Transfer RNAs), mRNA (messenger/Boten RNAs), rRNAs (Ribosomale RNAs) und die regulatorischen RNAs, wie die siRNAs (short interfering RNAs), miRNAs (micro-RNAs), snRNAs (small nuclear RNAs) und die smRNAs (small modulating RNAs) (Cao et al., 2006; Kim, 2005). Die Mehrheit der Studien wurde in D. melanogaster und C. elegans durchgeführt aufgrund der einfachen und kostengünstigen Handhabung. Auch fand die RNAi in Zellkulturmodellen und in humanen Zellsystemen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung, die verschiedene Arten von Erkrankungen mindern sollen (MacKeigan et al., 2005; Tyner et al., 2009; Verrier et al., 2015; Xie et al., 2012). Die RNAi bietet sich besonders gut zur Aufklärung der noch unbekannten Funktion eines zu untersuchenden Gens und dessen kodierten Proteins an. Hierfür werden sogenannte RNA-Interferenzbibliotheken mit interferierenden RNAs gegen jedes einzelne Gen eingesetzt, die mithilfe eines "Hochdurchsatz-Screens" genutzt werden. Angewendet werden insbesondere synthetische siRNAs oder shRNA Moleküle. Für jede der Molekülgruppen sind verschiedene RNAi-Bibliotheken verfügbar, die alle proteinkodierenden Gene abdecken. Auch für alle bekannten miRNAs sind die miRNA Sequenzen in der "miRBase" Datenbank zu finden. Firmen bieten für Untersuchungen von miRNA Funktionen und Genregulationen synthetische miRNA Mimics und Inhibitoren an, die die endogene miRNA nachahmen oder inhibieren. In dieser Arbeit werden solche miRNA Bibliotheken für einen "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" eingesetzt, um den Calcineurin-NFAT Signalweg zu untersuchen. Als Zellkulturlinie werden murine Myoblastenvorläuferzellen (C2C12) verwendet, die einen NFAT Reporter tragen (Frey et al., 2008). Die Quantifizierung der Effekte erfolgt mit der Verwendung von Reportergenen. Bisherige RNAi-Studien führten zu neuen Erkenntnissen über den JNK- (Bakal et al., 2008), ERK-MAPK (Friedman&Perrimon, 2006), TGF-β- (Xu et al., 2007), Wnt- (Brown, 2005) und weitere Signalwege. Für den Calcineurin-NFAT Signalweg wurden einige RNAi-Screens durchgeführt. Gwack et al. entdeckten mithilfe des RNAi-Screens in Drosophila, dass DYRK1 ein neuer Regulator von NFAT ist. DYRK1 konnte als ein Antagonist des Calcineurin-NFAT Signalweg identifiziert werden (Arron et al., 2006; Gwack et al., 2006). Des Weiteren fanden Gwack et al. heraus, dass das menschliche ORAI1 eine Poren-Untereinheit des CRAC Kanals ist und bei Mutation einen Immundefekt auslöst, welches durch die Kalzium-Menge und NFAT-Aktivierung ermittelt werden konnte (Gwack et al., 2007). MiRNA Analysen zur Entschlüsselung des Calcineurin-NFAT Signalweges wurden noch nicht durchgeführt.

## 1.6 Die Rolle von miRNAs in der kardialen Hypertrophie

MiRNAs sind sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen des Kardiovaskularsystems beteiligt. Es konnte anhand einer herzspezifischen Dicer-Deletion in der miRNA-Biogenese bei einer Maus gezeigt werden, dass miRNAs essentiell für die Kardiogenese sind. Ein herzspezifischer Knockout von Dicer in adulten Mäusen führte zu einer Ventrikelvergrößerung, zu einem hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten, zur Induktion fetaler Gene und zu weiteren funktionellen Defekten. Auch eine herzspezifische DGCR8-Deletion führte zur Dilatation des linken Ventrikels und zu frühzeitigem Herzversagen (Chen et al., 2008; da Costa Martins et al., 2008; Zhao et al., 2007). Zu den am häufigsten vorkommenden miRNAs in den Herzmuskeln zählen miRNA-1, let-7, miRNA-26a, miRNA-30c, miRNA-126-3p und miRNA-133 (Lagos-Quintana et al., 2002; Wang et al., 2008). Die miRNA-1 und die miRNA-133 sind nicht nur herzspezifisch, sondern auch muskelspezifisch (Luo et al., 2008). Studien von Care et al. zeigen, dass die Expression der miRNA-1 und miRNA-133 eine Reduktion der kardialen Hypertrophie in Maus- und Menschmodellen verursacht (Care et al., 2007). Eine in vitro Überexpression der beiden miRNAs dagegen inhibiert die Myozytenhypertrophie und eine in vivo Inhibition verursacht eine starke Hypertrophie (Care et al., 2007; Dong et al., 2010). Des Weiteren konnten Zhao et al. zeigen, dass eine miRNA-1 Knockout-Maus verschiedene Fehlfunktionen im Herzen aufweist, wie zum Beispiel in der Kardiomorphogenese, in der Regulation der Zellzykluskontrolle und der elektrischen Weiterleitung (Zhao et al., 2007). Eine weitere herzspezifische miRNA ist die miRNA-208. Die miRNA-208 ist in einem Intron vom a-MHC Gen kodiert und reguliert die Expression von β-MHC. Durch die Inhibierung der miRNA-208 kann die Herzhypertrophie und die Fibrose verhindert werden (van Rooij et al., 2007). Auch andere miRNAs, wie die miRNA-18b, miRNA-21 und miRNA-195, sind in der Lage die Entwicklung oder das Fortschreiten einer Herzhypertrophie zu beeinflussen. Durch die Überexpression der miRNA-195 in Herzen von Mäusen konnte veranschaulicht werden, dass dieses zum krankhaften Herzwachstum und Herzversagen führt. Für die miRNA-21 konnten profibrotische und anti-apoptotische Funktionen im Herzen nachgewiesen werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die miRNA-21 hauptsächlich in den kardialen Fibroblasten exprimiert wird und bei Hypertrophie stark induziert wird (Thum et al., 2007). Auch die Uberexpression von speziellen miRNAs in kultivierten Kardiomyozyten führte zur Aktivierung von fetalen Genen und zu zellulärer Hypertrophie (Thum et al., 2007; van Rooij et al., 2006; Wang et al., 2008).

Bekannte Transkriptionsfaktoren von miRNAs im Herzen sind unter anderen SRF, MYOD, MEF2, und MYOCD als auch GATA4, NFAT, STAT3, SMAD3 und AP1. Die Transkription von miRNAs wird im Herzen von einem Netzwerk myogener Faktoren kontrolliert (Bauersachs&Thum, 2011; Chen et al., 2006; Niu et al., 2007; Rao et al., 2006).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Der Calcineurin-NFAT Signalweg spielt eine wesentliche Rolle in der Induktion der pathologischen Herzhypertrophie (Frey et al., 2000b; Molkentin et al., 1998; Taigen et al., 2000) und ist in Tiermodellen als eine entscheidende Kaskade für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und des Remodelings identifiziert worden. Die Schlüsselrolle der kardialen Hypertrophie in der Pathogenese der Herzkrankheit unterstreicht den Nutzen der Identifizierung der zellulären und molekularen Mechanismen, die für die kardiale Hypertrophie und das Voranschreiten zur Herzinsuffizienz verantwortlich sind. Modulierende Faktoren des Signalweges sind durch eine Vielzahl von Studien aufgeklärt worden. Durch die Etablierung Versuchsaufbaus der Durchführung eines und eines "miRNA-Hochdurchsatz-Screens" sollen im Rahmen dieser Arbeit neue Modulatoren des Calcineurin-NFAT-Signalweges in einer murinen Myoblastenvorläuferzelllinie, die eine Luziferase Expressionskassette unter der transkriptionellen Kontrolle von vier NFAT-Enhancer-Elementen enthält, identifiziert und untersucht werden. MiRNAs sind in der Lage die Entwicklung oder das Fortschreiten von Herzhypertrophie zu beeinflussen und sind ein bedeutendes Feld für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Mit dem "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" soll zum einen der Einfluss von miRNAs auf den Calcineurin-NFAT Signalweg untersucht werden und zum anderen der Wirkmechanismus der miRNAs besser verstanden werden. Interessante miRNAs, die die NFAT-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg hoch- bzw. runterregulieren, sollen weiter charakterisiert und ihre Funktion in Kardiomyozyten in vitro und in vivo untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

## 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Amersham Hybond-P PVDF Membran Amersham Nitrocellulose Membran Axiovert 40 C Mikroskop Bruker DRX 9.4 Tesla NMR Spektrometer Cell Scraper 16 cm 2-position blade Cellstar Zellkulturplatten 6-,12-, 24-Well Centrifuge 5810 CFX96<sup>™</sup> Real-Time PCR Detection System Chromatographie-Papier Deckgläser 18 mm Durchmesser Duomax 1030 Plattformschüttler ECX-F26.M UV-Transilluminator Elektroporationsküvette FACSCalibur Flow Cytometer Faltenfilter 110 mm Durchmesser FluorChem<sup>™</sup> Q Kamera (Western Blot) Galaxy Ministar Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 21 Zentrifuge Heraeus Pico 21 Zentrifuge Horizon 11-14 Gel-Elektrophorese Infinite® M200Pro Mikroplattenleser Leica Bond-Max Immunhistochemie Mikrotiterplatten 96-Well Mikroskop BZ-9000 Mini PROTEAN Tetra System Multiply-µStrip 8er Kette Gefäße MyCycler<sup>™</sup> Thermal Cycler NanoDrop<sup>™</sup> 2000 Spektrophotometer Neubauer-Zählkammer Objektträger 76 x 26 x 1 mm

**GE** Healthcare **GE** Healthcare Carl Zeiss **Bruker Corporation** Sarstedt Greiner Bio One Eppendorf **Bio-Rad Laboratories** Whatman Th. Geyer Heidolph Peqlab Biotechnologie Peqlab Biotechnologie **BD** Biosciences Schleicher & Schuell Alpha Innotech VWR Thermo Scientific **Thermo Scientific** Life Technologies Tecan Leica Microsystems Nunc Keyence **Bio-Rad Laboratories** Sarstedt **Bio-Rad Laboratories** Peqlab Biotechnologie Assistent Marienfeld

Olympus BX53 Mikroskop
Olympus DP72 Kamera
Parafilm
Pasteurpipetten ohne Stopfen
Petrischale 35 x 10 mm
Pipette Eppendorf-Reference
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip
Pipettenspitzen, gestopft
Pipetus
Power Pac <sup>™</sup> HC
Power Pac <sup>™</sup> P25 Stromversorgung
PP-Mikroplatte 96-Well
Precellys® 24
RCT Basic Magnetrührer
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml
Röhrchen, luftdurchlässig, 14 ml
Röhrchen 15 ml, 50 ml
Scanlaf Titan Hood
Serologische Pipetten
SevenEasy <sup>™</sup> pH-Messgerät
Stemi 2000-C Stereomikroskop
Steril-Cult <sup>™</sup> 200 Inkubator
Sterilfilter 0,2 µm Porengröße
SterilGARD® Hood
TE1502S Präzisionswaage
Thermomixer® Comfort
Titan PCR-Arbeitsstation
Titramax 100 Plattfomschüttler
Vacusafe Absaugsystem
Variomag Poly Magnetrührer
Vortex-Genie® 2
Zellkulturflaschen 75 cm², 175 cm²

# 2.1.2 Chemikalien

Agarose Albumin Fraktion V (aus Rinderserum)

Olympus Olympus **Bemis** Carl Roth Sarstedt Eppendorf Research Sarstedt Sarstedt Hirschmann Laborgeräte **Bio-Rad Laboratories Biometra** Greiner Bio One Peqlab Biotechnologie IKA Sarstedt Sarstedt Sarstedt **Fisher Scientific** Sarstedt Mettler-Toledo Zeiss Labotect Nalgene Labware Baker Company Sartorius Eppendorf Scanlaf Heidolph Integra Biosciences **Thermo Scientific Scientific Industries** Sarstedt

Biozym Scientific GmbH Merck Millipore

Carbenicillin	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA Loading Dye 6x	Fermentas
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Scientific
EDTA	Serva Electrophoresis
Elution Buffer	Qiagen
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS (Fetal Calf Serum)	PAA Laboratories
GeneRuler <sup>™</sup> 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Hygromycin B	Invitrogen
iQ <sup>™</sup> Multiplex 2000 Reagent	Bio-Rad Laboratories
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kollagen I - Lösung (aus Rinderhaut)	<b>BD</b> Biosciences
Lipofectamin® 2000 Reagent	Invitrogen
Lipofectamin® RNAiMAX Reagent	Invitrogen
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
NCS (Newborn Calf Serum)	PAA Laboratories
PageRuler <sup>™</sup> Plus Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/Gibco
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Phenylephrin	Sigma-Aldrich
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories
QIAzol Lysis Reagenz	Qiagen
SDS	Serva Electrophoresis
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
TEMED 99 % p.a. Elektrophorese	Carl Roth
Tris-HCI	Carl Roth
Triton <sup>™</sup> X	Serva Electrophoresis
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Yeast-Extract	<b>BD</b> Biosciences

# 2.1.3 Enzyme

BP-Clonase™ II	Invitrogen
Collagenase Typ 2	Worthington/Cellsystems
Complete™ Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Thermo Scientific
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Hind III	Fermentas
LR-Clonase™ II	Invitrogen
Not I-HF	Thermo Scientific
Pac I	Biolabs
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
Sal I	Fermentas
Sda I	Fermentas
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen/Gibco
Xho I	Fermentas

# 2.1.4 Kits

Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vektor Kit	Invitrogen
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Life Science
ECL-Detektionssystem	GE Healthcare
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
Superscript® III First Strand Kit	Invitrogen
SYBR® GreenEr qPCR SuperMix	Invitrogen
miScript II RT Kit (50)	Qiagen
miScript SYBR® Green PCR Kit	Qiagen

## 2.1.5 Oligonukleotide

### 2.1.5.1 Primer zur Generierung rekombinanter Adenoviren

Die Sequenzen diverser miRNAs stammen aus der Bibliothek "miRBase". Sie wurden verwendet, um mittels des BLOCK-iT<sup>™</sup> Pol II miR RNAi Expressionsvektor-Kits Adenoviren zu erstellen.

Top und Bottom Sequenz von  $5' \rightarrow 3'$ 

#### miR-133b\_mmu+rno\_top

TGCTGTTTGGTCCCCTTCAACCAGCTAGTTTTGGCCACTGACTAGCTGGTAAGGGGACCAAA miR-133b\_mmu+rno\_bottom CCTGTTTGGTCCCCTTACCAGCTAGTCAGTGGCCAAAACTAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAC

miR-142-5p\_mmu+rno\_top TGCTGCATAAAGTAGAAAGCACTACTGTTTTGGCCACTGACAGTAGTGCTCTACTTTATG miR-142-5p\_mmu+rno\_bottom CCTGCATAAAGTAGAGCACTACTGTCAGTGGCCAAAACAGTAGTGCTTTCTACTTTATGC

miR-432\_mmu\_top TGCTGTCTTGGAGTAGATCAGTGGGCAGGTTTTGGCCACTGACCTGCCCACATCTACTCCAAGA miR-432\_mmu\_bottom CCTGTCTTGGAGTAGATGTGGGCAGGTCAGTGGCCAAAACCTGCCCACTGATCTACTCCAAGAC

miR-3105-5p\_rno\_top TGCTGAGAGCAAGCCAGTAAACAGTATGTTTTGGCCACTGACATACTGTTCTGGCTTGCTCT miR-3105-5p\_rno\_bottom CCTGAGAGCAAGCCAGAACAGTATGTCAGTGGCCAAAACATACTGTTTACTGGCTTGCTCTC

miR-3067\*\_rno\_top TGCTGCCATCCGGCTGCCCTGGAAGAGGGTTTTGGCCACTGACCCTCTTCCGGCAGCCGGATGG miR-3067\*\_rno\_bottom CCTGCCATCCGGCTGCCGGAAGAGGGTCAGTGGCCAAAACCCTCTTCCAGGGCAGCCGGATGGC

miR-3070a\*/b-5p\_mmu+rno\_top TGCTGAGCCCCTGACCTTGAACCTGGGAGTTTTGGCCACTGACTCCCAGGTAAGGTCAGGGGCT miR-3070a\*/b-5p\_mmu+rno\_bottom CCTGAGCCCCTGACCTTACCTGGGAGTCAGTGGCCAAAACTCCCAGGTTCAAGGTCAGGGGCTC

####
#### miR-196a-1\*\_rno\_top

TGCTGCAACAACACCAAACCACCTGATGTTTTGGCCACTGACATCAGGTGTTGGTGTTGTTG miR-196a-1\*\_rno\_bottom

CCTGCAACAACACCAACACCTGATGTCAGTGGCCAAAACATCAGGTGGTTTGGTGTTGTTGC

#### miR-883b-5p\_rno\_top

 $\label{eq:constraint} TGCTGTACTGAGGAGGGTGTAACAGTTAGTTTTGGCCACTGACTAACTGTTACCTCCTCAGTA \\ mi R-883 b-5 p\_rno\_bottom$ 

## 2.1.5.2 Primer für diverse PCRs und Sequenzierungen

#### Tabelle 2–1: Primer-Sequenzen für PCR und Sequenzierung

Primer	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')
pcDNA/GW-miR_F	TCCCAAGCTGGCTAGTTAAG
pcDNA/GW-miR_R	CTCTAGATCAACCACTTTGT
pAd/CMV/V5_F (T7)	TAATACGACTCACTATAGGG
pAd/CMV/V5_R	ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT
M13 uni (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13 R (-29)	CAGGAAACAGCTATGAC
pmirGLO_F	GTTACAACCGCCAAGAAGC
pmirGLO_R (T7 term)	CTAGTTATTGCTCAGCGGT
hGHpolyA 3'	ACAGGCATCTACTGAGTGGACCCAAC
hGHpolyA 5'	GTCTATTCGGGAACCAAGCTGGAGTG
18S_F	GCACGGCCGGTACAGTGAAA
18S_R	GCGCCCGTCGGCATGTATTA

#### Tabelle 2–2: Primer-Sequenzen für die Generierung der transgenen Mauslinie

Primer	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')
miR142+attB1-site_F	GCTGGCACCTACCTGAGTGTCCCCGAGAA
miR142+attB2-site_R	GCTGGGTCGCCGTGACCCTTACCCATCCATC
attB1-Adapter_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCTGGCACC
attB2-Adapter_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCC
142_Sal I_F	GAGAGTCGACTACCTGAGTGTCCCCGAGAA
142_Hind III_R	GAGAAAGCTTGTGACCCTTACCCATCCATC
hGH1 pA/GT_R	CAACTTCCAGGGCCAGGAGAGG
hGHpolyA 3'	ACAGGCATCTACTGAGTGGACCCAAC
hGHpolyA 5'	GTCTATTCGGGAACCAAGCTGGAGTG

## 2.1.5.3 qRT-PCR Primer für vorhergesagte potentielle Zielgene der miRNA-142-5p

Primer	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')
Actc1_mmu_F_2	TGTCACCACTGCTGAACGTG
Actc1_mmu_R_2	GGCATACAGGTCTTTGCGGA
Actc1_rno_F_1	CCCAAAGCACGCCTACAG
Actc1_rno_R_1	GCCCCATACCTACCATGACA
Atp1b1_mmu+rno_F_1	AGGACCGGTGGTAGTTGGT
Atp1b1_mmu+rno_R_1	AATCTGTGTCAATCCTGGCGG
Camta1_rno_F_2	CGGAACTAGCACCTACTGTG
Camta1_rno_R_2	AGCCGCAATTTCCTCGTTAG
Cask_rno_F_3	TCGGAAAATCCATGAGCAGG
Cask_rno_R_3	CTCTGCAAGACATCGGACTC
lgf1_mmu_F_1	CAGTTCGTGTGTGGACCGAG
lgf1_mmu_R_1	GTCGATAGGGACGGGGACTTC
lgf1_rno_F_1	GGCTATGGCTCCAGCATTCG
lgf1_rno_R_1	GCTGGGACTTCTGAGTCTTGG

#### Tabelle 2-3: Primer-Sequenzen der potentiellen Zielgene

Jarid2 mmu F 2	AGCGCCGCCATATAGCTAAG
Jarid2_mmu_R_2	CGCAGCTCTGTATCCCTGAG
Jarid2_rno_F_2	GAGAGTCGTTCGGAAAGTCC
Jarid2_rno_R_2	CTCTGACTGCTCTGAAGCTG
Lhx9_rno_F_3	CAGTCTACCATCTGAGCTGC
Lhx9_rno_R_3	TGCAAGAGGGTCTCAAAGTG
Lmx1a_mmu+rno_F_1	AAGTGCGATTGAGACCTCGG
Lmx1a_mmu+rno_R_1	CTTGTCCCGGTAGAAGCAGG
Sox5_mmu+rno_F_1	AATCAGCTGACCAGTCTACGG
Sox5_mmu+rno_R_1	CCTTGAACCTGGATCTGTTGCTG
Tgfbr2_mmu _F_1	CGCTTCTCCCAAGTGTGTCA
Tgfbr2_mmu _R_1	GCTGGTGGTGTATTCTTCCG
Tgfbr2_rno_F_1	AGCCCTACTCTGTCTGTGGAT
Tgfbr2_rno_R_1	AATCTTTCACTTCTCCCACAGC
Zfpm2_mmu_F_2	AAATCTGAGCTGCGAAGACG
Zfpm2_mmu_R_2	ACACTTCTAGCTCTCCTGGT
Zfpm2_rno_F_1	GACAACCCAGGGAACGGTAG
Zfpm2_rno_R_1	AGTCTCCTTTCGCGATGACG

## 2.1.5.4 Endogene qRT-PCR Primer Kontrolle

Primer	Sequenzen (5' $ ightarrow$ 3')
Rpl32_mmu+rno_165_F	GGTGGCTGCCATCTGTTTTAC
Rpl32_mmu+rno_165_R	CCGCACCCTGTTGTCAATGC

## 2.1.5.5 qRT-PCR Primer der Hypertrophie-assoziierten Gene

Primer	Sequenzen (5' $\rightarrow$ 3')
Nppa_mmu+rno_F	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG
Nppa_mmu+rno_R	ACCTCATCTTCTACCGGCAT
Nppa_mmu+rno_PRB	FAM-TGATGGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA-BHQ1
Nppb_mmu_F	ACAAGATAGACCGGATCGGA
Nppb_mmu_R	AGCCAGGAGGTCTTCCTACA
Nppb_mmu_PRB	HEX-TCAGTGCGTTACAGCCCAAACGA-BHQ1
Nppb_rno_F	AGAAGATAGACCGGATCGGC
Nppb_rno_R	AGCCACGCAG GTCTTCCTAAA
Nppb_rno_PRB	HEX-TCAGCCCGTCACAGCCCAAGCGA-BHQ1
Rcan1_mmu+rno_F	TAGCTCCCTGATTGCTTGTG
Rcan1_mmu+rno_R	GGATTCAAATTTGGCCCTGG
Rcan1_rno_PRB	Cy5.5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-Eclipse
Rcan1_mmu_PRB2	Cy5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-BHQ2
Rpl32_mmu+rno_F	CTGCTGATGTGCAACAAATCT
Rpl32_mmu+rno_R	GCTGTGCTGCTCTTTCTACAAT
Rpl32_mmu+rno_PRB	Texas Red-ACTGTGCTGAGATTGCTCACAATGTGT-BHQ2

#### 2.1.5.6 miScript Primer Assay für qRT-PCR

Tabelle 2–6: miScript Primer Assay	
Primer-Assay	Katalog-Nr.
Hs_RNU6-2_11	MS00033740
Rn_miRNA-142-5p_1	MS00005649

## 2.1.5.7 miRVana™ miRNA Mimic

## Tabelle 2–7: miRVana™ miRNA Mimic

miRNA Mimic	Katalog-Nr.
miRNA Mimic Negative Control_1	4464058
Hsa_miRNA Mimic 142-5p	4464066

# 2.1.6 Vektoren und Plasmide

Name	Hersteller	Verwendungszweck
pcDNA™6.2-GW/miR	Invitrogen	Gateway-Expressionsvektor mit CMV Promotor,
		enthält attB-Stellen
pDONR™221	Invitrogen	Gateway-Donorvektor mit attP1- und attP2-Stellen
pDNA 3.1 (+)	Invitrogen	Expressionsvektor mit Zytomegalievirus (CMV) Promotor
pAD/CMV/V5-Dest™	Invitrogen	Gateway-Zielvektor mit CMV Promotor
		und C-terminalen V5-Epitop
pmirGLO	Promega	Expressionvektor mit Firefly Luziferase (luc2)
		und Renilla Luziferase (hRluc-neo)
pDEST-40	Invitrogen	Expressionsvektor mit 6 x His und V5-Fusionstag

#### Tabelle 2-8: Vektoren für diverse Klonierungen

#### Tabelle 2–9: Plasmide für die stabile C2C12-NFAT Zelllinie

Name	Beschreibung
pcDNA 3.1_NFATc4	Expressionskonstrukt
pcDNA 3.1_∆CnA	Expressionskonstrukt, konstitutiv aktiv
pcDNA 3.1_pRT-LK (Renilla)	Expressionskonstrukt, endogene Kontrolle

# 2.1.7 Adenovirale Konstrukte

#### Tabelle 2–10: Adenoviren für die Infektion der neonatalen Rattenkardiomyozyten

Name	Beschreibung
AdNFAT-RE-Luc	NFAT-Viruskonstrukt mit Firefly Luziferase (luc2)
AdRenilla-Luc	Viruskonstrukt mit Renilla-Luziferase, endogene Kontrolle
Ad∆CnA	Viruskonstrukt, konstitutiv aktiv
AdNFAT4ms	Viruskonstrukt mit Stop-Sequenz

# 2.1.8 Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller		
anti-α-Actinin	Maus	Sigma-Aldrich		
anti-Atp1b1	Ziege	Acris		
anti-Camta1	Ziege	Santa Cruz		
anti-p300	Kaninchen	Santa Cruz		
anti-lgf1	Ziege	R&D Systems		
anti-Jarid2	Kaninchen	Santa Cuz		
anti-Lhx9	Kaninchen	Biozol		
anti-Lmx1a	Kaninchen	Acris		
Anti-Myh1/2	Maus	Sigma		
anti-Tgfbr2	Kaninchen	Novus Biologicals		
anti-Zfpm2	Kaninchen	Santa Cruz		
anti-α-Tubulin	Maus	Sigma		

Tabelle 2–11: Erstantikörper für Western Blot

Antikörper-Bezeichnung	Hersteller			
anti-Kaninchen-HRP	Santa Cruz			
anti-Maus-Alexa Fluor 546	Life Technologies			
anti-Maus-Cy3	Dianova			
anti-Maus-FITC	Dianova			
anti-Ziege-HRP	Santa Cruz			

Tabelle 2–12: Zweitantikörper für Western Blot

## 2.1.9 Puffer und Lösungen

## ADS-Puffer (zehnfach konzentrierte Stammlösung)

1,16 M	NaCl
197 mM	HEPES
94 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
55,5 mM	Glukose
53,6 mM	KCI
8,3 mM	MgSO <sub>4</sub> , pH 7,4, steril filtriert

## Kern Lyse Puffer für Proteinextraktion

20 mM	Tris pH 8
12,5 % (v/v)	Glycerol
10 mM	DTT
1 % (v/v)	NP-40
500 mM	NaCl

zu 1 ml Kern Lyse Puffer wurden kurz vor Verwendung folgende Enzyme hinzugegeben:

- 40 µl 25 x Proteinase-Inhibitor-Cocktail
- 10 µl Phosphatase-Inhibitor 2
- 10 µl Phosphatase-Inhibitor 3

1 µl 1 M DTT

## • Ladepuffer für DNA (sechsfach konzentriert)

15 % (w/v) Ficoll 400, type 400 0,005 % (w/v) Bromphenolblau 0,005 % (w/v) Xylen

## • Laufpuffer für SDS-PAGE (zehnfach konzentriert)

250 mM	Tris
1,9 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

## • PBS (einfach konzentrierte Gebrauchslösung)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCI
4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,47 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4, autoklaviert

## • Proben-Puffer nach Laemmli (vierfach konzentriert)

 250 mM
 Tris pH 6,8

 5 % (w/v)
 SDS

 40 % (v/v)
 Glycerin

 0,005 % (w/v)
 Bromphenolblau

 10 % (v/v)
 2-Mercaptoethanol

## Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

0,5 M Tris-Cl, pH 6,8

## • TAE-Puffer (50-fach konzentriert)

3 M	Tris-Acetat	
0,05 M	EDTA, pH 8,3	

## • TBS-Lösung

100 mM Tris-Cl, pH 7,5 0,9 % (w/v) NaCl

## • Transferpuffer für Western-Blot

20 % (v/v) Methanol 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS

• Trenngelpuffer für SDS-PAGE 1,5 M Tris, pH 8,8

## 2.1.10 Medien

## Medium zur Bakterienkultur: 2 YT-Medium

Menge ansetzen für 1 Liter 10 g Trypton 10 g Yeast Extrakt 5 g NaCl

## Medium zur Bakterienkultur: LB-Flüssigkeitsmedium

Menge ansetzen für 1 Liter 1 % (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl pH 7.0 mit NaOH

# • Medium zur Bakterienkultur: LB-Festmedium

Menge ansetzen für 1 Liter 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar pH 7.0 mit NaOH

# • Medium zur Kultivierung von Säugetierzellen

Medien für die Zellkultur wurden bei 4°C gelagert und kurz vor dem Einsatz in der Zellkultur in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

# Medium zum Anwachsen von Kardiomyozyten aus neugeborenen Ratten

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)

10 % (w/v)FCS100 U/IPenicillin G100 μg/mlStreptomycin2 mML-Glutamin

# Medium zur Kultur von HEK293-A Zellen

DMEM Advanced mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)

4 % (w/v) FCS 100 U/I Penicillin G 100 μg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin

# Medium zur Kultur von C2C12 Zellen

DMEM mit 4,5 g/l Glukose ohne Natriumpyruvat (Fertigmedium)10 % (w/v)FCS100 U/lPenicillin G100 μg/mlStreptomycin2 mML-Glutamin

# Medium zur Kultur von stabilen C2C12 Zellen

DMEM mit 4,5 g/l Glukose ohne Natriumpyruvat (Fertigmedium)10 % (w/v)FCS100 U/lPenicillin G100 µg/mlStreptomycin2 mML-Glutamin200 µg/mlHygromycin B

# 2.2 Zellkulturmethoden

Das zellbiologische Arbeiten erfolgte unter einer Sterilbank (Sterilgard Hood Baker Company, Sanford), wo ausschließlich sterile Materialien, Puffer und Medien verwendet wurden.

#### 2.2.1 Zelllinien und Kultivierung

Die HEK293-A Zelllinie ist eine humane, embryonale Nierenzelllinie, die häufig für die rekombinante Proteinexpression und zur Vermehrung von Adenoviren verwendet wird. Für die Kultivierung dieser Zelllinie wurde das Advanced DMEM Medium mit Zusatz von 4 % (w/v) fetalem Kälberserum (FCS) verwendet.

C2C12 Zellen sind murine prämyoblastische Skelettmuskelvorläuferzelllinien (Myoblasten), die von der Firma ATCC bezogen wurden. Diese Zelllinie stellt ein etabliertes Zellmodellsystem zur Untersuchung der Myogenese dar. Unter serumhaltigen Kulturbedingungen des DMEM Mediums mit Zusatz von 10 % (w/v) FCS proliferieren die C2C12 Zellen und weisen die Morphologie von undifferenzierten myogenen Vorläuferzellen auf. Wird der Serumanteil begrenzt, beginnen diese sich zu Myotuben zu differenzieren und verschmelzen letztendlich zu funktionellen Muskelfasern.

Die verwendeten Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von 70 % - 90 % alle 3-4 Tage passagiert. Zuerst erfolgte das Waschen der Zellen mit 37 °C warmen PBS und das darauffolgende Beschichten mit einer 1 x Trypsin/EDTA-Lösung. Die Enzymbehandlung wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium beendet, die Zellsuspensionen in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die entsprechende Zellenmenge (Verdünnung HEK293-A Zellen 1:6 und C2C12 Zellen 1:12) kam in eine neue T175 Zellkulturflaschen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

## 2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer, wobei mit Färbung von Trypanblau der Anteil der abgestorbenen Zellen ermittelt wurde. Die Zellsuspension wurde mit 0,4 % (w/v) Trypanblaulösung versetzt, in die Neubauer-Zählkammer eingebracht und unter dem Lichtmikroskop untersucht. Nach Auszählen von vier Großquadraten á 16 Teilguadrate konnte die Zellzahl pro ml mithilfe folgender Formel berechnet werden:

Zellzahl/ml =  $\frac{gezählte Zellzahl x Verdünnungsfaktor x Volumen x 10^4}{Anzahl gezählter Großquadrate [4]}$ 

## 2.2.3 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte im 37 °C warmen Wasserbad. Die Zellen wurden tropfenweise in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit 10 ml Wachstumsmedium befüllt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit jeweils 6 ml frischem

Medium versetzt, resuspendiert und auf 3 T75 Zellkulturflaschen verteilt. Die Lagerung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

## 2.2.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, im Wachstumsmedium aufgenommen und zentrifugiert. Zum Einfrieren der Zellen sollte eine Lösung aus 9 ml FCS + 1 ml DMSO hergestellt und anschließend filtriert werden. Das Zellpellet wurde in der gefilterten Lösung resuspendiert und in Kryokonservierungsgefäße verteilt. Die Lagerung erfolgte zunächst bei -80 °C in einer Kryobox mit Isopropanol und nach 24 h im flüssigen Stickstoff.

## 2.2.5 Aussaat und Ernte

In dieser Arbeit kamen die C2C12-Muskelvorläuferzellen zum Einsatz. Aufgrund unterschiedlicher Experimente wurden verschiedene Zellkulturfomate, Zelldichten und Mediumvolumina benötigt. In Tabelle 2–13 ist eine Zusammenfassung von verschiedenen Experimenten und den dafür verwendeten Zelldichten und Mediumvolumina dargestellt.

Experimente	Zellkulturformate	Zellzahl/Well	Mediumvolumen [ml]
RNA-Isolierung	6-Well-Platte	2 x 10 <sup>6</sup>	2
Protein-Isolierung	6-Well-Platte	2 x 10 <sup>6</sup>	2
Fluoreszenzmikroskop	96-Well-Platte	3,5 x 10⁴	0,1
Dual-Luziferase	96-Well-Platte	3,5 x 10⁴	0,1
Reportergen System			
MTT-Assay	96-Well-Platte	3,5 x 10⁴	0,1

Tabelle 2–13: Verwendete Zelldichten für die durchgeführten Versuche

Für alle durchgeführten Experimente wurden die Zellen zunächst mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Die Ernte der Zellen für die RNA-Isolierung erfolgte mit je 1 ml/Well Qiazol und die Protein-Isolierung mit je 150 µl/Well Kern Lyse Puffer (KLP). Bis zur Aufarbeitung der behandelten Zellen lagerten diese bei -80 °C. Für die Experimente, die in der 96-Well-Platte stattfanden (siehe Tabelle 2–13), wurden die Zellen mit den entsprechenden Puffern und Reagenzien vermischt. Die folgenden Abschnitte 2.6.1, 2.6.3 und 2.6.4 beschreiben ausführlich die unterschiedlichen Versuchsabläufe.

## 2.2.6 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Mit dem Begriff Transfektion bezeichnet man das Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen. Sie wird eingesetzt, um z.B. Plasmide, Antisense-Oligos oder siRNA einzuschleusen. In dieser Arbeit wurde das Verfahren der Lipofektion verwendet. Dabei binden anionische DNA-Fragmente an die Oberfläche von kationischen Lipidvesikeln, die mit der Zellmembran der Zielzellen fusionieren können und somit den Eintritt der DNA-Fragmente in das Zellinnere ermöglichen. Als Lipofektionsreagenz kam das Lipofectamin® 2000 zum Einsatz. Für die Transfektion sollte ein Ansatz mit den entsprechenden Plasmiden und ein weiterer Ansatz mit dem Lipofektionsreagenz vorbereitet werden, die in FCS- und Antibiotikum-freiem Medium angesetzt wurden. Die Zugabe des Lipofectamin® 2000 Ansatzes erfolgte nach 5 min Inkubation zu dem Plasmidansatz. Die Menge der eingesetzten DNA und des Transfektionsreagenz richtete sich nach den Zellkulturformaten (siehe Tabelle 2–14). Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde der DNA-Lipofectamin-Mix zu den Muskelvorläuferzellen pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zellkulturformate	Hersteller	Medium [µl]	DNA [µg]	Lipofectamin® 2000 [µl]
10-cm-Schale	Sarstedt	1000	16	40
6-Well-Platte	Greiner Bio One	125	1,5	6
12-Well-Platte	Greiner Bio One	75	0,8	4
24-Well-Platte	Greiner Bio One	50	0,4	2

 Tabelle 2–14: Ansätze für die Transfektion mit Lipofectamin® 2000

## 2.2.7 Transfektion von kleinen nicht-kodierenden RNAs

Kleine nicht-kodierende RNAs sind an Prozessen wie mRNA-Prozessierung oder Protein-Synthese beteiligt. Zu den kleinen nicht-kodierenden RNAs zählt die small interfering RNA (siRNA) und die micro-RNA (miRNA), welche die Stabilität von mRNAs als auch deren Translation beeinflussen. Der Unterschied liegt in der Herkunft der beiden kleinen RNAs. So wird die miRNA in der Zelle auf eigenen pri-miRNA-Genen codiert, die siRNA hingegen entsteht aus längerer freier dsRNA. Mithilfe der RNA-Interferenz (RNAi, auch RNA-Silencing), einem molekularbiologischem Verfahren, kann die Genexpression von einzelnen Genen inhibiert werden. Um diesen Prozess zu nutzen, wurden siRNA- und miRNA-Moleküle in eukaryotische Zellen transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie es im Abschnitt 2.2.6 beschrieben ist.

## 2.2.8 Stabile Zelllinien

Um stabil transfizierte Zellen zu erhalten, wurde ein Vektor mit einem Antibiotikaresistenzgen eingesetzt. Die C2C12 Zellen wurden auf 10 cm Schalen ausgesät und nach 24 h mit dem entsprechenden linearisierten Plasmid transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des Antibiotikums Hygromycin B, einem Selektionsdruck, zu den Zellen. Unter regelmäßiger

Erneuerung des Selektionsmediums konnten nur die Zellen mit stabil integriertem Plasmid überleben. Einzelne Klone wurden mit einem Plastikzylinder und Agarose (Mathupala&Sloan, 2009) isoliert und passagiert. Die separate Kultivierung der Zellklone erfolgte in 24-Well-Platten unter weiter anhaltendem Selektionsdruck.

## 2.2.8.1 C2C12-NFAT stabile Zelllinie

Die C2C12 Zelllinie wurde mithilfe des "pHTS-NFAT" (Biomyx Technology) Reportervektors, der eine Luziferase Expressionskassette unter Kontrolle von vier NFAT Enhancer Elementen und einen Hygromycin Selektionsmarker enthält, stabil transfiziert (Frey et al., 2008). Das Selektionsmedium entspricht dem DMEM Kulturmedium der C2C12 Zellen mit Zusatz des Antibiotikum Hygromycin B (200 µg/ml). In Tabelle 2–15 sind die Eigenschaften des pHTS-NFAT-Vektors dargestellt.

Eigenschaften	Start	Ende
Ampicillin Resistenz Gen	137	997
CoIEI Replikation Origin	1012	1930
HSV-TK Promotor	2167	2416
Hygromycin Resistenz Gen	2430	3467
TK Polyadenylation Signal	3445	3957
Luziferase Gen	4888	6540
4 x NFAT Enhancer Element	4688	4821

 Tabelle 2–15: Aufbau des pHTS-NFAT Reportervektors

Um die NFAT-Reportergen Luziferase-Aktivität in der stabilen C2C12-NFAT Zelllinie zu aktivieren, wurden die Zellen mit den Plasmiden NFATc4, ∆CnA und pRT-LK (Renilla) transfiziert (siehe Tabelle 2–9). Nach weiteren 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 x Passiv-Lyse-Puffer (PLP) geerntet. Anschließend erfolgte die Messung mittels des Dual-Luziferase-Assays.

# 2.2.9 Isolation von primären Kardiomyozyten

Für die Herstellung einer Primärzellkultur von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten wurden Ratten vom Wistar-Stamm im Alter von ein bis drei Tagen verwendet. Die Tiere wurden dekapitiert, der Thorax geöffnet, das Herz durch leichtes Drücken auf Thorax und Bauch entnommen und direkt in einfach konzentrierten, eiskalten ADS-Puffer überführt. Die verbliebenen Gefäße und Vorhöfe wurden entfernt, die Ventrikel zerkleinert und in 30-35 ml einer 37 °C warmen Verdaulösung in einer T75-Kulturflasche zum Vorverdau aufgenommen, welche anschließend in einem 37 °C warmen Wasserbad befestigt und geschüttelt wurden. Nach 20 min erfolgte der erste Verdauschritt, wobei zunächst die Verdaulösung abgenommen und verworfen wurde. Es folgte eine erneute Zugabe vom

30-35 ml einer 37 °C warmen Verdaulösung zu den Zellen. Nach weiteren 20 min wurde die erhaltene Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen und durch ein Zellsieb in ein 50 ml Gefäß filtriert. Um die Enzyme der Verdaulösung zu blockieren, wurden 10 ml NCS ebenfalls durch das Zellsieb zu der Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml NCS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO2 gelagert. Insgesamt waren drei bis vier Verdauschritte vonnöten, um das Myokardgewebe vollständig zu verdauen. Nach dem letzten Verdauschritt wurden die in NCS resuspendierten Zellen bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das verbliebene Pellet konnte anschließend in 2 ml einfach konzentriertem ADS-Puffer resuspendiert werden. Um die bei Isolation aus Rattenmyokard gewonnenen Kardiomyozyten von den ebenfalls isolierten Fibroblasten und Erythrozyten abzutrennen, wurden die Zellen nach ihrer Dichte mittels eines Percoll-Gradienten aufgereinigt. Dazu folgte die Herstellung einer Percollstammlösung aus Percoll und zehnfach konzentriertem ADS-Puffer, wobei eine Lösung mit niedriger und hoher Dichte entstand. Je 2 ml Kardiomyozytensuspension wurden vorsichtig auf den Percoll-Gradienten gegeben, so dass diese die oberste der drei Phasen bildete. Die Röhrchen wurden nun bei 2400 rpm für 30 min ohne Bremse auf 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren die Zellen in dem Gradienten gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Die Fibroblasten sammelten sich am Übergang der oberen einfachen ADS-Phase zur mittleren Phase, die Kardiomyozyten am Übergang der mittleren zur unteren Phase. Die Erythrozyten bildeten ein Pellet am Boden der Gefäße. Die Fibroblasten wurden abgenommen und verworfen. Die Kardiomyozyten wurden entnommen, auf 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt, mit einfach konzentriertem ADS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend abgenommen und verworfen werden. Das Pellet wurde in 50 ml einfach konzentriertem ADS-Puffer resuspendiert und erneut bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das verbliebene Pellet konnte nun mit dem 37 °C warmen Kardiomyozyten Medium resuspendiert werden. Aus der Zellsuspension wurden 100 µl entnommen und 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung gemischt. Danach wurde ein adäquates Volumen in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die ungefärbten Kardiomyozyten ausgezählt. Die Kardiomyozyten wurden je nach Zellkulturgefäßen und Versuchen mit der entsprechenden Dichte ausgesät (siehe Tabelle 2–16).

Experimente	Zellkulturformate	Zellzahl/Well	Mediumvolumen [ml]
RNA-Isolierung	6-Well-Platte	0,75 x 10 <sup>6</sup>	2
Protein-Isolierung	6-Well-Platte	1 x 10 <sup>6</sup>	2
Dual-Luziferase-Assay	12-Well-Platte	0,4 x 10 <sup>5</sup>	1
Immunhistochemie	12-Well-Platte + cs	0,18 x 10 <sup>5</sup>	1

Tabelle 2–16: Verwendete Zelldichten für die durchgeführten Versuche

cs= coverslips; Deckgläser

Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Kardiomyozyten mit Adenoviren bzw. mit den miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimics behandelt (siehe Tabelle 2–7 und Tabelle 2–10). Die Stimulation der Zellen nach Zugabe von Phenylephrin erfolgte für 48 h.

# 2.3 Mikrobiologische Methoden

## 2.3.1 Herstellung von elektrokompetenten Bakterienzellen

Die Anzucht der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme erfolgte im Luria-Bertani (LB) Flüssigmedium mit dem nötigen Antibiotikum (Tabelle 2–18). Dazu wurde zunächst eine 50 ml Übernachtkultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und nach 24 h in das 2 YT-Medium überführt. Dort erfolgte die Anzüchtung der Bakterienzellen bei 250 rpm und 37 °C, bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,8 erreicht wurde. Anschließend wurde die Bakterienkultur in Zentrifugenbecher umgefüllt, 10 min auf Eis inkubiert und 15 min lang bei 4000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde zum Waschen zweimal mit eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Ein letzter Waschschritt mit 10 % Glycerin schloss sich an. Abschließend konnte der *E. coli*-Stamm auf Eis in 1,5 ml 10 % Glycerin aufgenommen und zu je 50 µl aliquotiert werden. Das Einfrieren erfolgte im flüssigen Stickstoff mit anschließender Lagerung bei -80 °C. In Tabelle 2–17 sind die verwendeten *E. coli*-Stämme dargestellt.

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller	Genotyp
DH10B	Invitrogen	F <sup>-</sup> endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) $\lambda^-$
TOP10	Invitrogen	F- <i>mcr</i> A ( <i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) Φ80 <i>lac</i> ZM15 <i>lac</i> X74 recA1 araD139 (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Tabelle 2–17: Anzucht der E. coli Stämme

# 2.3.2 Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen durch Elektroporation

Für die Elektroporation wurden die, wie im Abschnitt 2.3.1 erläutert, präparierten elektrokompetenten Bakterienzellen eingesetzt. Dabei wurden jeweils 2  $\mu$ l Plasmid-DNA in die 50  $\mu$ l aufgetauten elektrokompetenten Zellen pipettiert. Das Gemisch wurde luftblasenfrei in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporations-Küvette der Spaltbreite 1 mm überführt. Die Küvette kam in einem Elektroporator zum Einsatz, dessen Kondensator von 25  $\mu$ F Kapazität bei einem Ladewiderstand von 200  $\Omega$  mit einer Spannung von 2,0 kV aufgeladen und anschließend in einem Puls über die Küvette wieder entladen wurde. Im nächsten Schritt

wurden die Bakterienzellen direkt mit 1000 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend konnten die Ansätze auf geeignetem selektivem LB-Agar-Medium ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert werden. Am nächsten Morgen konnten einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und eine LB-Flüssigkultur hochgezogen werden. Um längerfristige Lagerung zu ermöglichen, wurden die *E. coli* Kulturen mit LB-Medium im Verhältnis 1:1 mit 60 %-igem Glycerin in einem Kryoröhrchen gemischt und bei -80 °C gelagert.

# 2.3.3 Herstellung von Selektivnährböden

Zu dem LB-Medium wurde zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt und autoklaviert. Zur Herstellung der Selektivnährböden wurde eine adäquate Menge eines Antibiotikums zugefügt, welche in Tabelle 2–18 dargestellt sind. Die Petrischalen wurden mit dem gewünschten Volumen befüllt und in einer Sterilbank für 30 min bei RT bis zur Trocknung ruhen gelassen. Anschließend folgte die Lagerung der Agarplatten im Kühlschrank.

Tabelle 2–16: Verwendete Konzentration der Antibiotika			
Antibiotikum verwendete Konzentration			
Carbenicillin	100 µg/ml		
Spectinomycin	50 μg/ml		
Kanamycin	50 μg/ml		

Tabelle 2–18: Verwendete Konzentration der Antibiotika

## 2.3.4 Anzucht von Bakterien in Selektivmedium

Ein gewünschtes LB-Medium Volumen wurde je nach Resistenzkassette des zu amplifizierenden Plasmids mit einem Antibiotikum versetzt (Konzentration des Antibiotikums siehe Tabelle 2–18). Die Flüssigkultur wurde entweder mit einem kleinen Volumen einer Bakteriensuspension oder mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit einer Umdrehung von 200 rpm geschüttelt.

# 2.4 Molekularbiologische und biochemische Methoden

# 2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) werden durchgeführt, um definierte DNA-Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren. Bei der PCR werden als Startermoleküle synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an der Template-DNA hybridisieren. Von deren 3' Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang.

Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Durch zyklische Wiederholung werden die Matrizen exponentiell amplifiziert. Zur Amplifikation der DNA-Abschnitte wurde hier die Dream-Taq DNA-Polymerase der Firma Fermentas verwendet und ein Standardprogramm benutzt, dass je nach Template-Länge und Annealing-Temperatur der Primer variiert wurde. Tabelle 2–19 zeigt ein Schema eines PCR-Ansatzes, Tabelle 2–20 ein allgemeines Standardprogramm für eine PCR.

Reagenzien	Volumen [µl]		
10 x Dream Taq Green Puffer	2,5		
dNTPs (10 mM)	1,25		
Primer Vorwärts (10 µM)	0,75		
Primer Rückwärts (10 µM)	0,75		
Dream-Taq DNA-Polymerase	0,3		
ddH <sub>2</sub> O	19,25		
Σ	25		

Tabelle 2–19: Schema eines PCR-Ansatzes

Zu dem Ansatz kam jeweils ein Klon (Kolonie-PCR), welcher mit der Pipettenspitze gepickt wurde, hinzu. Die Aufbewahrung der Pipettenspitze erfolgte anschließend im 2 ml Gefäß.

Reaktion	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiales Denaturieren	5 min	95 °C	1 x
Denaturieren	30 sek	95 °C	
Annealing	30 sek	XX °C	30 x
Elongation	60 sek	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	1 x
Kühlen	∞		4 °C

Tabelle 2–20: Standardprogramm eines Thermocyclers für eine PCR

XX= Temperatur variabel

Alle verwendeten Primer für diverse PCR-Ansätze und anschließende Sequenzierung sind in Abschnitt 2.1.5.2, Tabelle 2–1 zu finden.

Nach der PCR wurden die Aliquots in einem 1 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.4.2). Anhand des Markers Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder von Fermentas konnte die Größe des PCR-Produktes ermittelt werden.

## 2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

In diesem Verfahren werden Molekülgemische einem elektrischen Spannungsfeld ausgesetzt, die ein typisches Bandenmuster liefern. Die einzelnen Moleküle bewegen sich in diesem Feld aufgrund ihrer elektrischen Ladung und ihrer Größe unterschiedlich schnell und werden dadurch getrennt. Zur Überprüfung und Reinigung eines PCR- oder Restriktions-Ansatzes wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1 %-igen horizontalen Agarosegel verwendet. Es wurden 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer gelöst.

Die Lösung wurde in der Mikrowelle erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte und die Lösung klar erschien. Anschließend wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml in das gelöste Agarosegel hinzugefügt. Nach Polymerisation des Gels wurde nach Zugabe von 1 x TAE-Puffer die Kammer bedeckt und die DNA-Proben mit dem DNA-Probenpuffer in die ausgesparten Taschen pipettiert. Als Standard DNA-Marker diente der Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, welcher für die Identifikation der Bandengröße verwendet wird. Eine angelegte Spannung von 100 V lies die Proben durch das Gel zur Anode wandern. Unter UV-Licht konnte die Lage der DNA-Banden sichtbar gemacht werden.

## 2.4.3 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen gehören der Gruppe der Endonukleasen an und spalten Doppelstrang Desoxyribonukleinsäuren durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Die Effizienz einer Reaktionsspaltung ist abhängig von den Reaktionsbedingungen. Für jede Restriktionsendonuklease gibt es optimale Inkubationstemperaturen und Reaktionspuffer. Dabei können sowohl stumpfe (blunt ends) als auch rezessive Enden (sticky ends) erzeugt werden. Zu beachten war es bei Doppelrestriktionen den richtigen Puffer zu verwenden, der für beide Enzyme kompatibel war. Diese waren den Herstellerangaben der jeweiligen Firma zu entnehmen. Der Restriktionsansatz wurde mit dem geeigneten Restriktionsenzym und dem zugehörigen Puffer für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert.

## 2.4.4 Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung der Klonierung wurden die DNA-Fragmente mit geeigneten Restriktionsenzymen restringiert. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur inkubiert und bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Anschließend wurden die Ansätze im 1 %-igen Agarosegel analysiert und fotografiert. Entstand bei den Restriktionsansätzen das richtige Restriktionsmuster wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Zur Aufreinigung der DNA-Fragmente wurde der QIAquick Gelextraktionskit von Qiagen verwendet werden, wie es im Abschnitt 2.4.5 beschrieben ist.

## 2.4.5 Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel

Der zu isolierende Gel-Abschnitt wurde gewogen und die Milligrammzahl mit 3 multipliziert. Aus der daraus berechneten Menge wurde nun das entsprechende Volumen des QG-Puffers zu dem Gel-Abschnitt hinzugefügt, was für 10 min bei 50 °C und 700 rpm zur Auflösung des Gels führte. Die entstandene Lösung wurde anschließend in 750 µl Schritten auf eine sterile QIAquick Silikamembran-Säule pipettiert und für 1 min bei RT und 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die an die Säule gebundene DNA durch Zugabe von 750 µl PE-Puffer für 1 min bei 13000 rpm gewaschen. Danach wurden die Silikamembran-Säulen durch Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm getrocknet, in ein neues 1,5 ml Gefäße überführt und die DNA mit 25 µl EB-Puffer eluiert. Mithilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop® 2000, Peqlab Biotechnologie) konnte nun die DNA-Konzentration bestimmt und zum Sequenzieren mit den entsprechenden Primern (siehe Tabelle 2–1) zur GATC Firma versandt werden.

#### 2.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verbindung von DNA-Fragmenten wie Vektor- und Insert-DNA kam die Ligation zum Einsatz. Für den Ansatz wurde eine geeignete Ligase, die die Fragmente zusammenfügen soll, und Ligationspuffer, der das notwendige ATP enthält, verwendet. Die T4-DNA-Ligase ist für die Ligation von DNA-Fragmenten besonders geeignet, da sowohl die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen komplementären stumpfen als auch rezessiven Enden katalysiert wird. Bei der Ligation eines Vektors mit einem Insert wurden die Komponenten in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Der Ligationsansatz, der die T4 DNA-Ligase, den 10 x T4 DNA-Ligase Puffers, 150 ng Vektor und die jeweils berechneten Insert-DNA Menge beinhaltet, wurde über Nacht bei RT ligiert und nach 24 h für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Dieser Ansatz konnte nun weiter zur Transformation von Bakterienzellen verwendet werden (siehe Abschnitt 2.3.2).

#### 2.4.7 Plasmid-Mini-Präparation über Säulen

Für die Mini-Präparationen wurde das Nucleo Spin Plasmid Kit nach den Angaben des Herstellers von Macherey-Nagel benutzt. Dazu wurde zunächst die 5 ml LB-Flüssigkeitskultur zentrifugiert und das Zellpellet mit 500 µl A1-Puffer, welcher RNase A enthält, resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 500 µl A2-Puffer mit anschließender Neutralisierung durch Einsatz von 600 µl A3-Puffer. Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA konnte die Silikamembran-Säule benutzt werden. Dabei wurde der klare Überstand in 750 µl Schritten auf die Silikamembran pipettiert und 1 min bei 11000 g abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA verblieb in der Silikamembran und wurde mit je 500 µl AW-Waschpuffer und anschließend mit 600 µl A4-Ethanolpuffer durch Zentrifugation für 1 min bei 11000 g von Zell- und Proteinresten befreit. Eine erneute Zentrifugation führte zur Trocknung der

Membran. Die verbliebene Plasmid-DNA auf der Membran wurde zuletzt mit 50 µl AE-Puffer eluiert und in einem sterilen 1,5 ml Gefäß aufgefangen. Die Konzentration konnte mithilfe eines Spektrophotometers bestimmt werden.

# 2.4.8 Plasmid-Midi/Maxi-Präparation über Säulen

Die Präparation von mittleren und größeren DNA-Mengen wurde mithilfe des Plasmid Plus Midi Kits und des Plasmid Plus Maxi Kits nach Vorschrift des Herstellers Qiagen durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde zunächst bei hoher Umdrehung abzentrifugiert und das verbliebene Pellet mit P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe des P2-Puffers wurde die Bakteriensuspension kurz geschwenkt und dann für 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurde das Lysat mit 4 °C kaltem P3-Puffer für 15 min auf Eis neutralisiert. Um den Bakterienzellrest von der Plasmid-DNA zu trennen, wurde die Bakteriensuspension in einem Carbonrotator für 30 min bei 4 °C und 14500 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene klare Uberstand enthielt Plasmid-DNA, welche nun in eine mit QBT-Puffer equilibrierte Qiagen-tip die Silikamembran-Säule überführt werden konnte. Die klare Lösung tropfte in einen Auffangbehälter, wobei die Plasmid-DNA in der Silikamembran verblieb. Die Silikamembran wurde zweimal mit dem QC-Waschpuffer gewaschen. Anschließend konnte die Plasmid-DNA mithilfe von 65 °C warmen QF-Puffer eluiert, mit Isopropanol gefällt und zuletzt mit 70 %-igen Ethanol gewaschen und getrocknet werden. Um die Konzentration der Plasmid-DNA im Spektrophotometer zu bestimmen, musste diese vorab in einer geeigneten EB-Puffer Menge eluiert werden.

# 2.4.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit der RNA und DNA wurde über eine Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm mithilfe des Spektrophotometers NanoDrop<sup>™</sup> 2000 durchgeführt. Das Verhältnis dieser Absorption wurde herangezogen, um Proteinverunreinigungen auszuschließen. Nur Proben mit einem A260/A280-Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 konnten verwendet werden.

# 2.4.10 Klonierung mit dem Gateway®-System

Das Gateway®-System von Invitrogen stellt eine universale Klonierungsmethode, basierend auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda dar. Dadurch ist ein schnelles und hocheffizientes Überführen von DNA in multiple Vektorsysteme möglich. In der sogenannten "BP-Reaktion" wird ein PCR-Produkt in den Donor-Vektor (pDONR221) integriert. Dadurch entsteht ein Entry-Vektor, ein Zwischenvektor. Durch Rekombination wird das Genfragment in der sogenannten "LR-Reaktion" in den gewünschten Expressionsvektor kloniert. Der Austausch findet zwischen dem Entry-Vektor und einem Destination-Vektor statt. Die Zielvektoren, d.h. Donor- und Destination-Vektor, enthalten ein toxisches Gen (ccdB). Während der Reaktion kommt es zu einem Austausch des DNA-Fragments gegen das toxische Gen. Die eigentliche Rekombination findet zwischen spezifischen Anlagerungssequenzen ("attenuation Sites", att-Sites) statt, die sowohl das DNA-Fragment, als auch das toxische Gen flankieren. Die Anlagerungssequenzen des DNA-Fragments werden während der PCR in zwei Schritten angefügt. Nach erfolgreicher Integration des Fragments in den Destination-Vektor liegt ein fertiger Expressionsvektor vor, der zur Vervielfältigung in Bakterien transformiert werden kann. Das toxische Gen dient indirekt als Selektionsmittel. Für die BP-Reaktion wurden 150 ng des pDONR221-Vektors, 50 ng des Gens sowie 2 µl BP-Clonase™ II in einem Eluierungspuffer (ad 8 µl) über Nacht bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die BP-Clonase™ II mithilfe von 1 µl Proteinase K für 10 min bei 37 °C inaktiviert und in die DH10B E.coli Zellen transformiert. Einzelne Klone wurden mithilfe einer Kolonie-PCR überprüft und sequenziert. Nach erfolgreicher Sequenzierung eines Entry-Klones wurde durch die LR-Clonase™ II das im Entry-Klon eingebaute Zielgen in einen Zielvektor namens pAd/CMV/V5-Destination-Vektor übertragen. Für die LR-Reaktion wurden 300 ng Zielvektor, 150 ng Entry-Klon sowie 2 µl LR-Clonase™ II in Elutionspuffer (ad 8 µl) über Nacht bei 25 °C inkubiert und am nächsten Tag mit 1 µl Proteinase K wie oben beschrieben inaktiviert und in die DH10B E.coli Zellen transformiert. Nach einer erfolgreichen Sequenzierung wurde der jeweilige pAd/CMV/V5-Destination-Vektor in den DH10B E.coli Zellen vermehrt und die Plasmid-DNA mit Hilfe einer Maxi-Präparation (Qiagen) isoliert und die für die Generierung eines Adenovirus verwendet.

## 2.4.11 Generierung eines Adenovirus

Mithilfe des Gateway®-Systems konnte das Zielgen zuerst in den Donor-Vektor (pDONR221) und anschließend in den adenoviralen pAd/CMV/V5-Destination-Vektor integriert werden. Durch das im Zielgen fehlende Stopp-Codon erhielt das adenoviral überexprimierte Gen einen C-terminalen V5-Tag. Nach Verdau der gereinigten, rekombinanten adenoviralen DNA mit Pac I erfolgte die Transfektion von je 2 µg/Well der adenoviralen DNA in die HEK293-A Zellen. Mithilfe der HEK293-A Zellen konnte sich das Adenovirus in ausreichender Menge vermehren, denn diese Zelllinie enthält gezielte regulatorische Gensequenzen, die den deletierten Adenoviren zum Replizieren fehlen. Nach einer 48 h Inkubationszeit kamen die transfizierten HEK-Zellen in eine sterile T75-Flasche inklusive DMEM Medium. Alle 3-4 Tage

wurde das alte Medium aus der T75-Flasche gegen neues DMEM Vollmedium ausgetauscht und die Replikation des Virus anhand morphologischer Veränderungen der Zellen überprüft. Nach 7-14 Tagen waren die Zellen zu fast 100 % infiziert und lösten sich teilweise vom Boden ab. Durch mechanisches Abklopfen wurden die HEK-Zellen inklusive Medium geerntet und in einem 15 ml-Falcon-Tube für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Lysat-Uberstand enthielt das Virus, welches in ein neues 15 ml Gefäß überführt werden konnte. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Viren mithilfe von Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 30 °C freigesetzt. Es folgte die Eliminierung der Zellreste durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C. Der Viren enthaltende Überstand wurde zu dem zuvor gewonnenen Lysat-Überstand gegeben. Um einen höheren Titer zu erreichen, wurden HEK293-A Zellen in T175-Flaschen ausgesät. Für jedes Virus-Konstrukt wurden zwei T175-Flaschen mit je 5 ml Viruslysat angeimpft. Nach ungefähr 2-3 Tagen waren fast 100 % der Zellen infiziert und beide T175-Flaschen konnten durch mechanisches Ablösen geerntet und in einem neuen 50 ml-Falcon-Tube gesammelt werden. Das 50 ml Gefäß wurde bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml PBS resuspendiert. Durch dreimaliges Gefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 30 °C wurden die HEK-Zellen lysiert und anschließend das Virus von den zellulären Bestandteilen durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C getrennt. Der hochkonzentrierte Virus-Überstand wurde aliquotiert und bis zur Titerbestimmung bei -80 °C gelagert.

## 2.4.12 Titerbestimmung eines Adenovirus

Um die Infektiosität des erstellten Adenoviruses zu bestimmen, wurden HEK293-A Zellen in einer 24-Well-Platte ausgesät und mit dem Virus infiziert. Für ein Virus-Aliquot wurde eine sechsstellige Verdünnungsreihe im DMEM Vollmedium (10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-7</sup>) hergestellt. Pro Virus-Konstrukt waren 12 Wells à 0,3 x 10<sup>5</sup> HEK-Zellen nötig, wobei das erste Well für die Negativ-Kontrolle, das zweite Well für die 10<sup>-2</sup> Verdünnung reserviert war und alle weiteren Verdünnungen in Duplikaten mit je 50 µl/Well infiziert wurden. Diese infizierten HEK-Zellen wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte unter einem Lichtmikroskop diejenige Verdünnungsstufe festgestellt werden, bei der noch genügend adhärente HEK-Zellen vorhanden waren, um infizierte Zellen auszuzählen (üblicherweise zwischen 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-6</sup>). Dann wurde das Medium abgenommen, die Zellen für 5 min getrocknet und vorsichtig mit eiskaltem Methanol in der 24-Well-Platte bei -20 °C für 10 min fixiert. Im nächsten Schritt wurde das Methanol entfernt und die fixierten Zellen dreimal mit 1 % BSA in PBS gewaschen. Anschließend wurde ein FITC-gekoppelter Anti-Hexon-Antikörper 1:50 in 1 % BSA in PBS verdünnt und je 100 µl davon in die zuvor ausgewählten Wells pipettiert. Nach einer Stunde wurde der Anti-Hexon-Antikörper abgesaugt und die Zellen dreimal mit

1% BSA in PBS gewaschen sowie mit PBS überschichtet. Nun konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop infizierte (grün leuchtende) Zellen aus 10 Gesichtsfeldern eines Wells bei einem 20 x Objektiv gezählt, addiert und das arithmetische Mittel gebildet werden. Mit folgender Formel konnte der Virustiter bestimmt werden:

ifu/ml = 
$$\frac{Infizierte Zellen/Gesichtsfeld x Gesichtsfelder/Well}{Virusvolumen [ml] x Verdünnungsfaktor}$$

Der Mittelwert (Infizierte Zellen/Gesichtsfeld) wurde mit dem Faktor 313 (Gesichtsfelder/Well) multipliziert und durch das Produkt aus dem Verdünnungsfaktor (10<sup>-4</sup> und 10<sup>-6</sup>), sowie Virusvolumen (0,05 ml) dividiert. Das Ergebnis gab die sogenannten "infectious units" pro ml (ifu/ml) an, das heißt die Anzahl der infektiösen Viruspartikel.

# 2.4.13 Herstellung von adenoviralen miRNA-Konstrukten mit dem Block-iT™ System

Zur Herstellung adenoviralen miRNA-Konstrukten wurde das Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vektor Kit von Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden zunächst die Einzelstrang miRNA-Sequenzen mit dem Block-iT™ RNAi Designer von Invitrogen hergestellt (siehe Abschnitt 2.1.5.1). Die erhaltenen lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit DNase/RNase freiem H<sub>2</sub>O auf eine Ausgangskonzentration von 200 µM gelöst. Anschließend wurden die beiden Oligonukleotide mithilfe einer Annealing-Reaktion, die aus jeweils 5 µl der Einzelstrang-Oligonukleotide, 2 µl des 10 x Oligo-Annealing-Puffers und DNase/RNase freiem H<sub>2</sub>O bestand, für 4 min bei 95 °C inkubiert und anschließend für 5-10 min bei RT abgekühlt, so dass sich die Einzelstrang-Oligonukleotide aneinander lagern konnten. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wurde dieser zuerst 1:100 und dann 1:5000 verdünnt und für die Ligation in den linearisierten pcDNA™ 6.2-GW/-miR Vektor eingesetzt. Für die Ligation kam die T4 DNA Ligase (1 U/µI) zum Einsatz. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend in One Shot TOP10 kompetente E. coli Zellen transformiert. Es folgte das Ausplattieren der transformierten Bakterien auf Spectinomycin selektiven Agarplatten. Am folgenden Tag wurden einzelne Bakterienkolonien durch eine Kolonie-PCR überprüft. Die positiven Kolonien konnten nun im LB-Medium hochgezogen und zur Sequenzierung gegeben werden. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde im weiteren Verlauf zur Herstellung von adenoviralen miRNA-Konstrukten das Gateway®-System verwendet. Mittels der BP-Clonase™ II wurde das pcDNA™ 6.2-GW/-miR-Konstrukt zuerst in einen Donorvektor pDONR221 integriert und anschließend durch die LR-Clonase™ II in einen Zielvektor namens pAd/CMV/V5-Destination-Vektor übertragen wie es im Abschnitt 2.4.10 beschrieben ist.

# 2.4.14 Zielgenvorhersage-Programme und Auswertung mit einem Venn-Diagramm

Um potentielle Zielgene zu finden, wurden verschiedene Genvorhersage-Programme herangezogen. Dazu zählten unter anderem Targetscan, Dianalab, Microcosm, miRanda und miRbd. Die vorhergesagten Zielgene wurden mithilfe eines Venn-Diagramms untereinander verglichen und die überlappenden Zielgene notiert. Aus diesen wurden aufgrund von Literaturrecherchen und ihrer Expression im Herzen Kandidaten für eine weitere Untersuchung ausgewählt.

## 2.4.15 pmirGLO-Klonierung der 3`UTR-Zielgensequenz

Der Dual-Luziferase miRNA Target Expression Vektor pmirGLO von Promega wurde für eine Quantifizierung der miRNA-Wirkung auf den 3'UTR der potentiellen Zielgene verwendet. Hierfür wurde die 3'UTR-Targetsequenz hinter das Firefly-Luziferase-Gen (luc2) kloniert und in C2C12 Zelllinie transfiziert. Zur Normalisierung der Firefly-Aktivität codiert der Vektor gleichzeitig für ein Renilla-Luziferase/Neomycin-Resistenz-Fusionsgen (hRluc-neo). Das SV40 poly(A) Signal hinter der multiplen Klonierungsstelle (MCS) vermittelt den Transkriptionsstopp inklusive mRNA-Polyadenylierung. Das Renilla-Luziferase-Gen steht unter der Kontrolle des konstitutiven SV40 Promotor.

Mithilfe der Genvorhersage-Programme konnte die potentielle 3`UTR-Bindungsstelle der ausgewählten Gene ermittelt werden. Die Oligonukleotid Vorwärts-Zielsequenz wurde mit einem 5' Xho I + 3' Sda I Überhang versehen. Für die Generierung der Oligonukleotide (Oligos) wurden 10 Nukleotide vor und hinter die 3'UTR-Bindungssequenz hinzugefügt. Für die Klonierung wurde zunächst 1 µg des pmirGLO Vektors mit den Enzymen Xho I und Sda I für 1 h bei 37 °C geschnitten und anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Es folgte die Zugabe von 1 µI SAP zu dem Ansatz mit erneuter Inkubation von 1 h bei 37 °C und 10-minütiger Inaktivierung bei 65 °C. Mittels elektrophoretischer Trennung wurde der nun geschnittene Vektor aufgereinigt. Die einzelsträngigen Oligos (100 µM) wurden mit einem 1 x Annealing-Puffer auf eine 4 µM Konzentration verdünnt, 3 min bei 90 °C erhitzt und 15 min bei RT abgekühlt, so dass sich die Oligos aneinander lagern konnten. Anschließend erfolgte die Phoshorylierung mit je 1 µl vom dsOligo, 2 µl 10 x Puffer A, 2 µl ATP (100 mM) und 1 µl T4 PNK (10 U/µl) bei 37 °C für 20 min mit darauffolgender Inaktivierung bei 70 °C für 10 min. Dieser Ansatz musste erneut 1:10 verdünnt werden. In einem 1,5 ml Gefäß wurde für die Ligation ein Mix aus den verdünnten dsOligos, dem 10 x Ligase Puffer, dem pmirGLO Vektor (50 ng/µl), der T4-Ligase (1 U/µl) und ddH<sub>2</sub>O angesetzt und 1 h bei RT gelagert. Nach 10-minütiger Inaktivierung bei 65 °C wurden je 2 µl der Ligationsreaktion für die Transformation in die elektrokompetenten DH10B E. coli Zellen eingesetzt. Am

darauffolgenden Tag wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, welche in Tabelle 2–21 dargestellt ist. Die verwendeten Primer-Sequenzen für den pmirGLO Vektor sind im Abschnitt 2.1.5.2 der Tabelle 2–1 zu entnehmen. Zur korrekten Einschätzung von positiven Klonen wurde eine Positiv-Kontrolle mit dem pmirGLO Vektor (unverdaut) als Template eingesetzt.

Reagenzien	Volumen [µl]
10 x Dream Taq Green Puffer	2,5
dNTPs (10 mM)	1,0
pmirGLO_Vorwärts (10 µM)	0,5
pmirGLO_Rückwärts (10 µM)	0,5
Dream-Taq DNA-Polymerase	0,25
ddH <sub>2</sub> O	20,25
Σ	25

Tabelle	2-21:	Schema	für die	pmirGL	O-PCR
Tubene	~ ~ .	Concina	i'ui uic		

Tabelle 2–22	: Touchdown	-PCR für die	pmirGLO	-Klonierung
--------------	-------------	--------------	---------	-------------

		V	
Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiales Denaturieren	95 °C	5 min	1 x
Denaturieren	95 °C	30 sek	
Touchdown-Annealing	56-50 °C	30 sek	6 x 1°C↓/Zyklus
Elongation	72 °C	1,15 min	30 x
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 x
Kühlen	∞		4 °C

Dazu wurde je ein Klon mit der Pipettenspitze gepickt und in den Ansatz gemischt.

Bei der pmirGLO Klonierung wurde die Methode der Touchdown-PCR (siehe Tabelle 2–22) verwendet. Die Touchdown-PCR vermeidet eine Amplifizierung unspezifischer DNA-Sequenzen. In den ersten Synthese-Zyklen wird die Annealing-Temperatur nur knapp unterhalb der Denaturierungstemperatur gewählt. Damit ist die Primerbindung und somit auch das Amplifikat höchst spezifisch. In den weiteren Zyklen wird die Annealing-Temperatur herabgesetzt. Die Primer können jetzt zwar unspezifische Bindungen eingehen, allerdings verhindern die spezifischen Replikate der frühen Reaktion eine übermäßige Amplifikation der unspezifischen Sequenzen. Ein weiterer Vorteil ist eine enorme Steigerung der Amplifikatmenge. Diese abgewandelte PCR erlaubt somit eine starke und sehr spezifische DNA-Amplifikation.

Die positiven Klone wurden mithilfe des Agarosegels überprüft, anschließend im LB-Flüssigmedium hochgezogen und zum Sequenzieren versandt. Nach erfolgreicher Sequenzierung konnten die Konstrukte für den Dual-Luziferase-Assay verwendet werden.

## 2.4.16 RNA-Isolierung aus NRVCM mit Qiazol

Die RNA-Isolierung mit dem Virus behandelten Kardiomyozyten und C2C12 Zellen erfolgte mit einem Qiazol-Reagenz von Qiagen. Die Zellen wurden zuerst 1 x mit PBS gewaschen und dann mit jeweils 1 ml Qiazol pro Well beschichtet. Durch mehrmaliges Spülen mit der

Pipette wurde die Suspension in ein neues 1,5 ml Tube überführt. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung, indem je 200 µl Chloroform hinzu pipettiert wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12000 g für 15 min wurde die obere Phase abgenommen und mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 gefällt. Nach einer Inkubation von 30 min bei -20 °C konnte die Suspension zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 75 % (w/v) Ethanol gewaschen und für 5 min bei RT im 1,5 ml Gefäß getrocknet werden. Zur Konzentrationsbestimmung mit dem Spektrophotometer wurde das Pellet in 40 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die isolierte RNA wurde mittels DNase I von DNA befreit, indem 5 µg der zu untersuchenden RNA mit 5 µl DNase I und 5 µl 10-fachem Reaktionspuffer für 15 min bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit DNase/RNase-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt sowie mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol durch Vortexen vermischt. Die RNA-Extraktion wurde mithilfe einer Trennung der Phasen für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C erreicht. Die RNA-haltige obere Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Es folgte die Fällung der RNA mit 300 µl Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat in DNase/RNase freiem Wasser über Nacht bei -20 °C. Nach 16 h wurde der Reaktionsansatz für 60 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen und wiederum bei 14000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im Gefäß für 5 min bei RT getrocknet und in 12 µl DNase/RNase freiem Wasser aufgenommen.

## 2.4.16.1 cDNA-Synthese mit dem Superscript® III First Strand Kit

Die cDNA Umschreibung erfolgte mit dem Superscript® III First Strand Kit. Die Konzentration der RNA konnte nun im Spektrophotometer gemessen werden. Je 1000 ng RNA wurden auf mit DNase/RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht. Zu dem Ansatz wurden je 1 µl dNTPs (10 mM) und je 0,5 µl Random Hexamer Primer (250 ng/µl) hinzugefügt, für 5 min bei 65 °C denaturiert und sofort auf Eis gelagert. Folgende Reagenzien wurden hinzugesetzt: 4 µl 5 x First Strand konzentrierter Reaktionspuffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT und 0,5 µl SuperScript™ III RT (200 units/µl). Der Reaktionsansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt, kurz abzentrifugiert und im ersten Schritt bei 25 °C für 10 min und im nächsten Schritt bei 50 °C für 60 min inkubiert. Der letzte Schritt der Inkubation erfolgte bei 70 °C für 15 min. Die synthetisierte cDNA konnte anschließend für die qRT-PCR (siehe Abschnitt 2.4.17) verwendet werden.

## 2.4.16.2 cDNA-Synthese mit dem miScript II RT Kit

Um bei der Reversen Transkription eine miRNA in cDNA umzuschreiben, wurde das miScript II RT Kit von Qiagen verwendet. Entscheidend bei diesem Vorgang ist, dass hier in einem Schritt, d.h. "universell", sämtliche reife miRNA Sequenzen in eine cDNA umgeschrieben werden. Dies steht im Gegensatz zu anderen kommerziellen Systemen, bei denen die Umschreibung in eine cDNA sequenzspezifisch abläuft. Durch eine RNA-Ribose-Polymerase Reaktion wird in einem ersten Schritt eine Poly-A-Sequenz an alle, in dem Ansatz vorhandenen RNA Moleküle, angefügt (Polyadenylierung). Anschließend dockt ein Oligo-dT-Primer an die zuvor generierte Poly-A-Sequenz an und vermittelt die Synthese eines komplementären cDNA Gegenstranges, der als DNA-Template für die nachfolgende PCR-Amplifikation genutzt werden kann. Dafür wurde je 500 ng RNA auf ein Gesamtvolumen von 6 µl mit DNase/RNase freiem Wasser gebracht. Zu dem Ansatz wurden je 2 µl 5 x miScript HiFlex Buffer, 1 µl 10 x Nucleics Mix und 1 µl miScript Reverse Transcriptase Mix in das Reaktionsgefäß pipettiert. Die RT-Reaktion startete mit 60 min bei 37 °C und endete mit 5 min bei 95 °C, was zur Inaktivierung der miScript Reverse Transkriptase führte. Nach Ablauf des Programms wurde die cDNA auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt und für die PCR (qRT-PCR) verwendet.

#### 2.4.17 Quantitative Real-Time PCR

Für die Quantifizierung der Transkripte von Genen wurde der Express SYBR® GreenEr qPCR SuperMix Universal Master Mix verwendet. Der Nachweis der Amplifikate wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green erbracht. Nach Denaturierung der cDNA liegen die DNA-Stränge als Einzelstränge vor. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet nicht an die Einzelstrang-DNA, diesem SO dass zu Zeitpunkt lediglich eine geringe Hintergrundfluoreszenz besteht. Nach Anlagerung der Primer kommt es zur Bildung von doppelsträngiger DNA. SYBR® Green bindet an dieser neu synthetisierten dsDNA. Wenn SYBR® Green die dsDNA gebunden hat, erfolgt eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals. In der Elongationsphase wird zunehmend dsDNA gebildet, was zu einer weiteren Erhöhung der SYBR® Green Fluoreszenz führt. Am Ende der Elongationsphase hat die maximale Menge an SYBR® Green die dsDNA gebunden und somit die maximale Fluoreszenz erreicht. Als interner Standard zur relativen Quantifizierung wurde eine Primerkombination für RPL32 (Ribosomal Protein L32) eingesetzt. Die Messung wurde mit dem CFX96™ Real Time PCR Detection System von Bio-Rad Laboratories durchgeführt und die Daten anschließend mit der Software analysiert. In Tabelle 2–23 und Tabelle 2–24 sind jeweils der Reagenzansatz und das Standardprogramm für die SYBR® Green gRT-PCR dargestellt.

Reagenzien	Volumen [µl]
SYBR® Green Mastermix	10
ddH <sub>2</sub> O	7,2
Primer Vorwärts 10 µM	0,4
Primer Rückwärts 10 µM	0,4
cDNA	2
Σ	20

Tabelle 2–23:	Standard-Reaktionsansatz für q	RT-PCR
---------------	--------------------------------	--------

#### Tabelle 2–24: Standardprogramm für die SYBR® Green qRT-PCR

Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
UDG Inkubation	50 °C	2 min	1 x
initiales Denaturieren	95 °C	30 sek	1 x
Denaturieren	95 °C	5 sek	
Annealing/Elongation	60 °C	30 sek	40 x
Schmelzkuve	95 °C	10 sek	Zunahme von
Messung der Platte	60-95 °C	5 sek	0,5 °C/Zyklus

Im Rahmen dieser Messungen sollten die relativen Fluoreszenzeinheiten pro Zyklus der qPCR und Reaktionsansatz ermittelt werden. Für die Quantifizierung wurde das Konzept des Threshold Cycle (Ct) herangezogen. Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Hierbei wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (RPL32) bezogen und aus den  $\Delta$ -Ct-Werten beider Gruppen anschließend der  $\Delta\Delta$ -Ct-Wert gebildet. Um den Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zu ermitteln wird dieser Wert anschließend in die Formel 2^- $\Delta\Delta$ Ct eingesetzt. Der Schwellen-Zyklus stellt denjenigen Zyklus in der PCR dar, in dem die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Alle verwendeten Primer für die qRT-PCR sind im Abschnitt 2.1.5 in Tabelle 2–3 und Tabelle 2–4 dargestellt.

Die synthetisierte cDNA diente als Template für die nachfolgende miRNA Amplifikation. Der im Rahmen einer reversen Transkription verwendete Oligo-dT Primer enthält zusätzlich eine artifizielle Sequenz, den sogenannten "Universal Taq". Dieser stellt ein zentrales Element für die nachfolgende Amplifikation dar. In dem Reaktionsgemisch ist ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer enthalten. Der Vorwärts-Primer bindet spezifisch an die zu amplifizierende miRNA Sequenz, der Rückwärts-Primer (Universal-Primer) bindet an den Universal Taq. Als Vorwärts-Primer wurden miScript Primer Assays (siehe Tabelle 2–6) von Qiagen verwendet. Für die miScript qRT-PCR wurde jeweils ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt, wie es in der Tabelle 2–25 abgebildet ist. Die Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte wurde über eine Fluoreszenzmessung in Echtzeit verfolgt. Das Programm wurde mit dem CFX96™ Real Time PCR Detection System von Bio-Rad Laboratories durchgeführt, wie es in Tabelle 2–26 dargestellt ist.

Reagenzien	Volumen [µl]
2 x QuantiTect-SYBR® Green-PCR-Mastermix	10
10 x miScript Universal-Primer	2
10 x miScript Spezifischer-Primer	2
ddH <sub>2</sub> O	4
cDNA	2
Σ	20

Tabelle 2–25: Standard-Reaktionsansatz für eine miScript qRT-PCR

Tabelle 2–26:	Standardprogramm	für die	miScript	<b>qRT-PCF</b>
				-

Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen	
Initiales denaturieren	95 °C	15 min	1 x	
Denaturieren	94 °C	15 sek		
Annealing	55 °C	30 sek	40 x	
Elongation	70 °C	30 sek		
Schmelzkurve	65-95 °C	5 sek	Zunahme von	
Messung der Platte	-	-	0,5 °C/Zyklus	

Mithilfe einer Fluoreszenzkurve wurde ein entsprechender Cycle-Threshold Wert (Ct) ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode.

Die Analyse des sogenannten hypertrophen Genprogrammes (Dorn et al., 2003; Molkentin et al., 1998; Sadoshima&Izumo, 1993) wurde mithilfe der Mutliplex qRT-PCR durchgeführt. In einer Multiplex-PCR werden die einzelnen PCR-Verfahren nicht mehr in getrennten PCR-Reaktionen verwirklicht, sondern alle zusammen in einer PCR-Reaktion, so dass gleichzeitig mehrere Gene gemessen werden können. Zu den Hypertrophie-assoziierten Genen zählt unter anderen Nppa, Nppb und Rcan1-4, die sich jeweils durch verschiedene Farbstoffe unterscheiden. In Tabelle 2–27 und Tabelle 2–28 sind jeweils der Reagenzansatz und das Standardprogramm für die Multiplex qRT-PCR dargestellt.

Reagenzien	Volumen [µl]	
iQ Powermix	10	
RPL32 Mix (Texas Red)	0,5	
Nppa Mix (FAM)	0,5	
Nppb Mix (HEX)	0,5	
Rcan1-4 Mix (Cy5-Maus) (Cy5.5-Ratte)	0,5	
ddH <sub>2</sub> O	6	
cDNA	2	
Σ	20	

rabelle 2 20. Otaliaarapiografili far ale matuplex qrti i ort				
Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen	
Initiales denaturieren	95 °C	2 min	1 x	
Denaturieren	95 °C	15 sek		
Annealing/Elongation	60 °C	45 sek	40 x	

Die Messung wurde mit dem CFX96<sup>™</sup> Real Time PCR Detection System von Bio-Rad Laboratories durchgeführt, wo darauf zu achten war, dass alle Kanäle ermittelt wurden. Die jeweiligen Sequenzen für die Hypertrophie-assoziierten Gene sind in Tabelle 2–5 dargestellt.

## 2.4.18 Protein-Extraktion aus NRVCM und C2C12 Zellen

Zur Gewinnung von Proteinen wurden die NRVCM bzw. C2C12 Zellen zunächst 1 x mit PBS-Lösung gewaschen, mit je 100-150 µl/Well einer 6-Well-Platte Kern Lyse Puffer versetzt und mithilfe eines sterilen Zellschabers vom Untergrund abgeschabt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein steriles 1,5 ml Gefäß überführt. Zum endgültigen Aufbrechen der Zellen wurden die Gefäße in drei Durchläufen für 15 min in flüssigem Stickstoff gelagert und anschließend für 15 min im Thermomixer auf maximal 30 °C aufgewärmt. Die Proteine wurden mittels Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C von der genomischen DNA- und den Zellmembranresten separiert. Der Proteinüberstand konnte in 1,5 ml Gefäßen gesammelt und bis zur Konzentrationsmessung bei -80 °C gelagert oder direkt für die Bradfordbestimmung verwendet werden, wie es im Abschnitt 2.4.19 beschrieben ist.

#### 2.4.19 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte durch die Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurde zuerst eine Standardreihe mit BSA erstellt. Die BSA-Standards waren in folgenden Konzentrationen angelegt: 2,56, 1,28, 0,64 und 0,32 mg/ml. Als Blank wurde  $ddH_2O$  verwendet. Es wurden jeweils 2 µl der Standardreihe bzw. jeweils 2 µl der zu messenden Probe auf eine 96-Well-Platte mit jeweils 200 µl Protein Assay-Reagenz beschichtet und gemischt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm in einem Photometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim). Anhand der Standardreihe konnte nun die Konzentration der Proben ermittelt werden.

## 2.4.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dabei durchwandern die Proteingemische zwei Zonen verschiedener Polyacrylamid-Gele. Im oberen, geringer vernetzten Sammelgel werden die Proteine zu einer scharfen Bande fokussiert, die sich bei Eintritt in das stärker vernetzte Trenngel in seine verschiedenen Komponenten trennt. Große Proteine wandern langsamer, kleine Proteine schneller durch die Gelmatrix. Das im Puffer enthaltene SDS dient zur Denaturierung der Proteine und schirmt gleichzeitig die intrinsische Ladung der Proteine ab. Durch Anlagerung an die Moleküle verleiht es den linearisierten Proteinen eine effektive, zur Größe der Polypeptidketten proportionale negative Ladung, so dass alle Komponenten ausschließlich in Richtung Anode wanden. In Tabelle 2–29 und Tabelle 2–30 sind die Volumenangaben für ein Trenngel und ein Sammelgel angegeben.

Lösungen	8 % Gel	10 % Gel	12 % Gel
30 % (w/v) Acrylamid [ml]	2,7	3,3	4,0
Trenngel-Puffer [ml]	2,6	2,6	2,6
ddH <sub>2</sub> O [ml]	5,4	3,9	3.2
TEMED [µl]	30	30	30
10 % (w/v) APS [µl]	60	60	60

 Tabelle 2–29: Volumenangaben zur Herstellung eines Trenngeles

Tabelle 2–30: Volumena	ingaben zur Herst	ellung eines Sammelgeles	
		chang childe canningered	e

Lösungen	Volumen
30 % (w/v) Acrylamid	0,8 ml
Sammelgel-Puffer	1,4 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,9 ml
TEMED	15 µl
10 % (w/v) APS	30 µl

Für die Elektrophorese wurde das Mini-Protean-Tetra-Elektrophorese-System eingesetzt. Nach Reinigung der Glasplatte mit Wasser und 70 % (w/v) Ethanol wurde diese in die dafür vorgesehenen Rahmen eingespannt. Nach Zugabe von 60 µl 10 % APS und 30 µl TEMED zur Trenngel-Lösung wurde diese blasenfrei bis ca. 1 cm unterhalb des Glasrandes in die Apparatur gegossen und vorsichtig mit Isopropanol zur Glättung der Phasengrenze überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und die letzten Alkohol-Reste entfernt. Anschließend wurde zu der Sammelgel-Lösung 30 µl 10 % APS und 15 µl TEMED hinzugefügt und die Glasplatte bis zur oberen Kante vollständig überschichtet. In das noch flüssige Gel wurde sofort ein passender Kamm gesteckt, der die Taschen für die Proteinlösung formte. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer gespannt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V im 1 x SDS Laufpuffer. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit 4 x Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente sowohl der Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder als auch der Marker Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder der Firma Fermentas.

## 2.4.21 Western-Blot und Immunodetektion

Western-Blot ist ein Verfahren, bei dem die Proteine elektrophoretisch aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulosemembran oder eine PVDF-Membran transferiert werden. Hierbei wurde ein Tank-Transfer-System benutzt. Mit einer "Sandwich-Technik" erfolgte der Transfer der Proteine auf die entsprechende Membran für 1,5 h unter Eiskühlung bei einer Stromstärke von 0,35 mA/cm<sup>2</sup>. Die geblottete Membran wurde für 1-3 h bei RT in einer TBST-Lösung mit 5 % (w/v) Milchpulver oder 5 % (w/v) BSA geblockt. Anschließend konnte der Primärantikörper angesetzt und über Nacht auf der Membran bei 4 °C inkubiert werden. Nach 16 h wurde die Membran 3 x jeweils 5 min mit TBST-Lösung gewaschen und

mit einem HRP gekoppelten speziesspezifischen Sekundärantikörper für 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der nicht gebundene Antikörper durch erneutes Waschen entfernt. Der Nachweis erfolgte mittels eines Enhanced-Chemiluminescence (ECL) Systems von GE Healthcare. Für die Detektion sollten die ECL-Detektionslösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt und 2 min auf der Membran inkubiert werden. Mit der Dokumentationsanlage Alpha Innotech Multilmage III und der AlphaView Software konnten die jeweiligen Lichtemissionen auf Höhe der zu untersuchenden Proteinbanden detektiert und mittels Densitometrie quantifiziert werden. Alle verwendeten Erst- und Zweitantikörper sind in Abschnitt 2.1.8 in Tabelle 2–11 und Tabelle 2–12 dargestellt, die jeweils nach Herstellerangaben eingesetzt wurden.

## 2.4.22 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie wurden Kardiomyozyten (NRVCM) in einer 12-Well-Platte mit einer Dichte von 0,18 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Deckglas ausgesät und nach 24 h mit Viren oder den miRNA Mimics behandelt. Nach weiteren 48 h Inkubation bei 37 °C in einer 5 %-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre folgte die Fixierung der Zellen mit einer 4 % (w/v) Formaldehydlösung für 5 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, unspezifische Bindestellen mit 2,5 % BSA in PBS inklusive 0,1 % Triton X-100 für 1 h bei RT geblockt und der Erstantikörper Anti-Maus-alpha-Actinin im Verhältnis 1:200 über Nacht bei 4 °C auf den Zellen inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte der Cy3-Maus-konjugierte Zweitantikörper im Verhältnis 1:400 + 1 µl DAPI. Die Antikörper wurden vorab in 2,5 % BSA in PBS angesetzt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen 3 x mit PBS, 2 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Mounting Medium versehen. Unter dem Keyence BZ-9000 Mikroskop konnten die Zellen untersucht und die Zellgröße der NRVCM analysiert werden.

## 2.5 Neugeborene Ratten und Haltung der Tiere

Um neugeborene Ratten vom Wistar-Stamm zu erhalten, wurden bei Charles-River Laboratories Wistar-Ratten bestellt und in der Zentralen Tierhaltung am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel verpaart. Untergebracht waren alle Tiere in der Tierhaltung am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu einem standardisierten Trockenfutter und zu Trinkwasser. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug jeweils 12 Stunden. Die Raumtemperatur wurde konstant bei 24 °C  $\pm$  1 °C gehalten.

## 2.5.1 Klonierung der transgenen miRNA-142 Mauslinie

Transgene Mäuse sind durch gezielte Manipulation des Erbguts erzeugte Mausmodelle. Der Einbau der fremden DNA, des Transgens, kann ungerichtet an nicht voraussehbaren Stellen des Genoms erfolgen. Die DNA wird in den parentalen Pronukleus einer befruchteten Eizelle injiziert, die anschließend in eine scheinschwangere Ammenmutter implantiert wird. Das injizierte DNA-Fragment besteht aus einer regulatorischen Promotorsequenz, dem eigentlichen Transgen und einer Polyadenylierungssequenz. Die transgenen miRNA-142 Mauslinien wurden zur Untersuchung von kardiovaskulären Signalwegen generiert. Die Expression der miRNA-142 wird hierbei durch den kardialen  $\alpha$ -Myosin ( $\alpha$ -MHC) Promotor gesteuert. Dieser Promotor ist dazu geeignet die Expression spezifisch in Herzgewebe hochzuregulieren.

Bevor die transgenen miRNA-142 Mauslinien generiert werden konnte, wurde zunächst zur Überprüfung der Funktionalität des injizierten DNA-Fragments die Überexpression der miRNA-142 in Mausmuskelvorläuferzellen untersucht. Hierzu wurde die Technik der attB-Stellen des Gateway®-Systems (siehe Abschnitt 2.4.10) zur Hilfe genommen. Aus der pre-miRNA-142 Maus Gensequenz wurden Primer designt, die zusätzlich eine attB1-Vorwärts- beziehungsweise eine attB2-Rückwärts-Sequenz enthielten. Als Template wurde genomische DNA aus einer Mausschwanzspitze verwendet. In Tabelle 2–31 ist der PCR-Ansatz, in Tabelle 2–32 das PCR-Touchdown Programm dargestellt.

Reagenzien	Volumen [µl]
gDNA Maus (100 ng/µl)	1
dNTPs (10 mM)	1,5
10 x Pfu Buffer+MgS0 <sub>4</sub>	2,5
miR-142+attB1-site_F (10 μM)	1,5
miR-142+attB2-site_R (10 μM)	1,5
Pfu-Polymerase	1
enhancer solution	2,5
ddH <sub>2</sub> O	13,5
Σ	25

Tabelle 2–31: Schema für den PCR-Ansatz

Tabelle 2-32:	Touchdown-PCR fi	ir die miRNA-142	Überexpression
			000100001011

Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiales Denaturieren	95 °C	5 min	1 x
Denaturieren	95 °C	30 sek	
Touchdown-Annealing	58-52 °C	30 sek	6 x 1°C↓/Zyklus
Elongation	72 °C	1 min	34
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 x
Kühlen	8		4 °C

Nach erfolgreicher DNA-Amplifikation wurde das PCR-Produkt mit dem Macherey&Nagel Plasmid-Minipräp-Kit aufgereinigt. Anschließend wurden die beiden vollständigen attB1/attB2-Adapter-Primer mit einem neuen PCR-Ansatz an das aufgereinigte PCR-Produkt angefügt. Bei der Touchdown-PCR war die Touchdown-Annealing Temperatur aufgrund der attB1/attB2-Adapter Primer 10 °C höher. Nach erneuter erfolgreicher DNA-Amplifikation und Aufreinigung erfolgte die Klonierung mithilfe der BP-Clonase™ II zuerst in den pDONR221-Vektor und dann mittels der LR-Clonase™ II in den pDEST40-Vektor. Die Überexpression wurde mit einer Konzentration von 400 ng und 800 ng Plasmid in den Mausmuskelvorläuferzellen getestet.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Überexpression der miRNA-142-5p in den C2C12 Zellen funktioniert, erfolgte die Klonierung der transgenen miRNA-142 Mauslinien. Dafür wurde ein Vorwärts-Primer mit einer Sal I und ein Rückwärts-Primer mit einer Hind III Schnittstelle designt. Der PCR-Ansatz konnte wie in Tabelle 2-31 durchgeführt werden. Als Template wurde das Überexpressionskonstrukt miRNA-142\_pDEST40 verwendet. Die Touchdown-PCR wurde, wie es in Tabelle 2–32 zu sehen ist, durchgeführt. Alle verwendeten Primer für die Generierung der miRNA-142 Mauslinien sind im Abschnitt 2.1.5.2 der Tabelle 2-2 zu entnehmen. Nach erfolgreicher DNA-Amplifikation und Aufreinigung mit dem Macherey&Nagel Plasmid-Minipräp-Kit erfolgte der Verdau des Inserts (PCR-Produkt) mit den Enzymen Sal I und Hind III und der Verdau des pBS SKII+-Flag-hGH1 Vektors, der einen αMHC-Promotor trägt. Es wurden je 1,5 μg des PCR-Produktes bzw. Vektors verdaut und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 16 h folgte eine 20-minütige Inaktivierung bei 80 °C der Ansätze mit anschließender Gelelektrophorese, wobei die entsprechenden Banden ausgeschnitten und über das QIAqick Gel Extraktion Kit (siehe Abschnitt 2.4.5) aufgereinigt wurden. Danach erfolgte die Ligation im Verhältnis 1:3 und die Transformation in die elektrokompetenten DH10B *E.coli*-Zellen. Positive Klone wurden gepickt. im LB-Kulturmedium hochgezogen und zum Sequenzieren mit dem Primer hGH1 pA/GT R versandt. Das entstandene Konstrukt wurde anschließend in einem großen Volumen mit dem Enzym Not I-HF geschnitten, damit es linearisiert wird. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C und die Inaktivierung am darauffolgenden Tag bei 65 °C für 20 min. Der PCR-Ansatz wurde erneut aufs Agarosegel aufgetragen und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Durch die niedrige Ausbeute der Aufreinigung des geschnittenen Konstruktes wurden insgesamt 12 Ansätze aufs Agarosegel aufgetragen. Es erfolgte zuerst die Aufreinigung über das QIAqick Gel Extraktion Kit. Dazu sollten zunächst die Ansätze mit 50 µl RNase/DNase freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert werden. Anschließend erfolgte der nächste Aufreinigungsschritt über die Silikamembran wie es im Abschnitt 2.4.7 beschrieben ist. Nach Zugabe von Puffer A3, AW, und A4 wurden die Ansätze mit je 80 µl TE-Puffer eluiert und gepoolt. Zum Schluss fand eine 15-minütige Zentrifugation der Ansätze statt. 95 % des Überstandes konnten nun in ein neues 1,5 ml Tube überführt und erneut zentrifugiert werden, wobei nun 90 % des Überstandes in ein neues 1,5 ml Tube überführt werden konnte. Um eine erfolgreiche Mikroinjektion zu erhalten, musste der aufgereinigte Ansatz eine Konzentration von 30 ng/µl in einem Volumen von 200 µl TE-Puffer beinhalten. Die Generierung der transgenen

miRNA-142 Mauslinien wurde in Heidelberg (Universität Heidelberg-IBF/Biotechnologie Labor) durchgeführt. Nach der Mikroinjektion der DNA in die Eizellen überlebten 50 Mäuse. Aus den Mausschwanzspitzen sollte genomische DNA isoliert werden, die auf die Integration des miRNA-142-Konstruktes überprüft wurde. Mittels PCR wurde die hGH-Poly-A-3' hGH-Poly-A-Tail-Kassette mit den Primern hGH-Poly-A-5' sowie nachgewiesen, wobei bei den transgenen Tieren eine Bande bei ca. 400 bp entstand.

## 2.5.2 Genotypisierung mittels Mausschwanzspitzen-Biopsien

Die DNA-Extraktion aus Mausschwanzspitzen wurde mit dem Quick Extrakt DNA Solution 1.0 von Biozym durchgeführt. Hierzu wurden je 25 µl vom Quick Extrakt DNA Solution zu dem im Tube enthaltenen Tail pipettiert. Die Tails wurden 15 sek lang gevortext und anschließend für 30 min bei 65 °C und 750 rpm inkubiert. Nach 30 min erfolgte erneut ein 15-sekündiges vortexen und eine 5-minütige Inkubation bei 98 °C. Um zu überprüfen, ob es sich um eine transgene Maus mit einer hGH-Poly-A-Tail Kassette handelte, wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt wie es in Tabelle 2–33 und Tabelle 2–34 dargestellt ist. Mithilfe der 18S Primern, welche als Kontrolle dienten, konnte festgestellt werden, ob die PCR funktioniert hat.

Reagenzien	Volumen [µl]		
10 x Dream Taq Green Puffer	5		
dNTPs (10 mM)	1,25		
Primer hGHpolyA 3' (10 μM)	0,5		
Primer hGHpolyA 5' (10 μM)	0,5		
Primer 18S Vorwärts (10 µM)	0,5		
Primer 18S Rückwärts (10 µM)	0,5		
Dream-Taq DNA-Polymerase	0,25		
ddH <sub>2</sub> O	41,5		
Σ	50		

Tabelle 2–33: Schema eines Genotypisierungs-PCR-Ansatzes

Je 2 µl der isolierten DNA-Extraktion wurden für die PCR eingesetzt.

Reaktion	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen		
Initiales Denaturieren	5 min	95 °C	1 x		
Denaturieren	30 sek	95 °C			
Annealing	30 sek	60 °C	30 x		
Elongation	45 sek	72 °C			
Finale Elongation	10 min	72 °C	1 x		
Kühlen	∞		4 °C		

Tabelle 2–34:	Genotypisierungs	-PCR für die trans	genen miRNA-142 Mauslinie	n

Die verwendeten Primersequenzen sind im Abschnitt 2.1.5.2 in Tabelle 2–2 dargestellt. Nach der PCR wurden die Proben in einem 1,2 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Mithilfe des

Markers Gene Ruler<sup>™</sup> 1 kb Plus DNA Ladder konnte die Größe des PCR-Produktes ermittelt werden.

## 2.5.3 Gewebeentnahme

Aus den Mäusen der miRNA-142 Linien wurden Lunge, Leber, Herz, Tibia und Milz zur weiteren Untersuchung entnommen. Dafür wurden die Tiere zuvor durch zervikale Dislokation getötet.

Für die kardiale Basischarakterisierung der Mauslinien wurde das Herz in zwei Hälften geteilt, von denen eine für die RNA-Isolierung, die andere für die Protein-Isolierung verwendet wurde. Alle Organe wurden umgehend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Außerdem wurden von einigen Herzen Kryostat-Schnitte angefertigt (siehe Abschnitt 2.5.4). Zudem wurde das Körpergewicht der Maus, das Gewicht aller entnommenen Organe und des linken Ventrikels (LV) des Herzens bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte wie im Abschnitt 2.5.6 beschrieben ist.

## 2.5.4 Anfertigung von Kryostat-Schnitten und HE-Färbung

Das Gewebe wurde entnommen, kurz in PBS gewaschen und mit feinen Papierhandtüchern getrocknet. In Tissue Tek von Miles Scientific, einem Medium zum Einbetten, wurde das Gewebe in einer Kunststoffform ausgerichtet und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Aufarbeitung der Herzen erfolgte an einem Mikrotom (Mikrom) für Kryoschnitte bei einer Arbeitstemperatur von -20 °C. Es wurden 5 µm dicke Schnitte der Herzen angefertigt, die auf Objektträger ("superFrost Plus", Menzel) aufgetragen und an der Luft getrocknet wurden. Die Lagerung der fertigen Kryoschnitte erfolgte bei -20 °C.

Diese wurden für die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) verwendet. Die HE-Färbung dient als Übersichtsfärbung, um die Morphologie eines Gewebes beurteilen zu können. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau, Eosin färbt eosinophile Strukturen rot. Die Durchführung der HE-Färbung erfolgte in der Dermatologie an der Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel.

## 2.5.5 RNA-Extraktion aus Herzgewebe

Die Herzen der Mauslinien miRNA-142 wurde in ein 2 ml Röhrchen, welches mit kleinen und großen Keramik-Kügelchen versehen war, mit je 1 ml TRIzol-Reagenz befüllt. Mittels des

Gewebehomogenisators Precellys 24 von Peqlab Biotechnologie wurde das Röhrchen 2 x 20 sek mit je 6500 rpm geschüttelt, bis das Herz sich vollständig aufgelöst hatte. Die RNA-Isolierung erfolgte wie es im Abschnitt 2.4.16 beschrieben ist.

#### 2.5.6 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert sowie dazugehörige Standardfehler (SE) angegeben. Um die Ergebnisse aller Experimente auf signifikante Unterschiede zu überprüfen, wurde die One Way Varianzanalyse (ANOVA-Student-Newman-Keuls Methode) und der t-Test herangezogen. Zur Errechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler und One Way Varianzanalyse diente die Software Microsoft Office Excel 2007 und SigmaPlot 11.0. Ein p-Wert von ≤ 0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

# 2.6 "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in der murinen C2C12-NFAT Zelllinie

#### 2.6.1 Dual-Luziferase Reporter Assay System

Mit dem Dual-Luziferase-Reportergen System von Promega konnte die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität in den C2C12-Mausmuskelvorläuferzellen quantifiziert werden. Das System basiert auf zwei Plasmiden, die für verschiedene Luziferasen kodieren. Durch Verwendung der Luziferase des Leuchtkäfers Photinus pyralis (Firefly-Luziferase) und der Luziferase der Seestiefmütterchen Renilla reniformis (Renilla-Luziferase) ermöglicht dieses System eine Analyse der Reportergenexpression in eukaryotischen Zellen und eine Quantifizierung beider Reportergene in einem Ansatz. Luziferasen sind Enzyme, die Licht produzieren. Dieser Vorgang wird als Biolumineszenz bezeichnet. Die Firefly-Luziferase katalysiert die Oxidation von Luziferin mit molekularem Sauerstoff zu Oxyluziferin und die Renilla-Luziferase katalysiert die Oxidation von Coelenterazin mit molekularem Sauerstoff zu Coelenteramid, wobei ein nicht-stabiler, angeregter Übergangszustand erzeugt wird, der unter Abgabe von Licht in einen stabilen Zustand übergeht. In der Gentechnik werden Luziferasen gern als Reportergene verwendet, um die Aktivität eines Promotors zu überprüfen oder die Anwesenheit eines mit der Luziferase gekoppelten Gens nachzuweisen. In diesem Versuch wurde die stabile C2C12-NFAT Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie besitzt einen pHTS-NFAT Reporter Vektor und eine Luziferase Expressionskassette unter der transkriptionellen Kontrolle von vier NFAT-Enhancer-Elementen. Mithilfe der Expressionsplasmide NFATc4 und dem konstitutiven aktiven Calcineurin ( $\Delta$ CnA) wurde der

NFAT Luziferase Reporter in der stabilen Zelllinie induziert. In Zellextrakten bestimmt die Menge der exprimierten Firefly-Luziferase (LAR II) die Umsatzgeschwindigkeit von Luziferin zu Oxiluziferin und die Intensität der Lumineszenz. Somit kann durch die Messung der Firefly-Lumineszenz auf die Intensität der NFAT-Aktivität geschlossen werden. Die kodierende Sequenz der Renilla-Luziferase befindet sich in dem Plasmid pRL-TK unter der transkriptionellen Kontrolle des Thymidinkinase-Promotors aus dem Herpes Simplex Virus. Der Promotor bietet eine konstitutive, geringe bis moderate Expression der Renilla-Luziferase in entsprechend transfizierten Zellen. Die Messung der Renilla-Luziferase Reporter Assay von Promega wurde nur mit der Hälfte der angegebenen Substratmengen durchgeführt.

## 2.6.2 miRNA Bibliotheken

Die "Maus miScript miRNA Mimic V16.0 Bibliothek" von Qiagen umfasst 1050 verschiedene miRNAs Mimics. Die miRNAs waren mit einer Konzentration von 0,25 nmol in 12,5 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, was einer Endkonzentration von 20 µM entspricht. Die insgesamt 1050 miRNA Mimics waren auf 12 x 96-Well-Platten verteilt. Eine "AllStar siRNA" Negativ-Kontrolle befand sich auf jeder 96-Well-Platte. Als Positiv-Kontrolle wurde die Firefly Luziferase "GL2 siRNA" verwendet, die die Luziferase Aktivität inhibieren soll. MiScript miRNA Mimics sind chemisch synthetisierte doppelsträngige RNAs, die reife endogene miRNAs nach der Transfektion in einer Zelllinie imitieren. Besonders bevorzugt werden diese vordefinierten oder kundenspezifischen miRNAs im 96-Well-Platten Format für "Hochdurchsatz-Screens" eingesetzt.

Die "miRCURY LNA™ Maus miRNA Inhibitor V12.0 Bibliothek" von Exigon umfasst 624 verschiedene miRNA Inhibitoren. Je 0,25 nmol der Inhibitoren wurden lyophilisiert geliefert und mussten auf eine angemessene Stockkonzentration gebracht werden. Die insgesamt 624 miRNA-Inhibitoren waren auf 8 x 96-Well-Platten verteilt. Als Negativ-Kontrolle wurde der miRCURY LNA™ miRNA-Inhibitor von Exigon verwendet und als Positiv-Kontrolle die Firefly-Luziferase "GL2 siRNA". Bei den hierfür eingesetzten miRNA Inhibitoren handelt es sich um LNA (locked nucleic acid) modifizierte Oligonukleotide. Die LNA Inhibitoren vermittelte Stilllegung von miRNAs beruht darauf, dass das Inhibitor Oligonukleotid komplementär zu der miRNA ist. Die Basenpaare des Inhibitors stehen somit mit den zellulären Ziel-mRNAs im Wettbewerb um die miRNA. Die nun doppelsträngigen miRNAs können nicht mehr in den RISC-Komplex eingebaut werden und sind somit nicht mehr funktionell. Die beiden miRNA Bibliotheken wurden mit RNase/DNase freiem Wasser auf eine Stockkonzentration von 5 µM gebracht. Anschließend wurde für einen "miRNA-Screen" eine Arbeitskonzentration von 250 nM für die Qiagen "Maus

miScript miRNA Mimic Bibliothek" und eine Arbeitskonzentration von 125 nM für die Exiqon "miRCURY LNA™ Maus miRNA Inhibitor Bibliothek" erstellt.

# 2.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

In diesem Experiment sind verschiedene Transfektionsreagenzien überprüft worden, um die beste Transfektionseffizienz von kleinen RNAs zu erhalten. Dazu wurden C2C12 Zellen in einer 96-Well-Platte mit einer Zelldichte von 3,5 x  $10^4$ /ml ausgesät und nach 24 h Inkubation mit einer FITC-gelabelten siRNA von Qiagen und Exiqon transfiziert. In Tabelle 2–35 sind die entsprechend getesteten Transfektionsreagenzien dargestellt. Nach weiteren 48 h Inkubation bei 37 °C in einer 5 %-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre folgte die Fixierung und Behandlung der Zellen wie es im Abschnitt 2.4.22 beschrieben ist. Der Erstantikörper Anti-Maus-alpha-Actinin wurde im Verhältnis 1:200 für 1 h bei RT inkubiert und anschließend mit dem Anti-Maus-FITC konjugierten Zweitantikörper im Verhältnis 1:1000 und 1 µl DAPI für 1 h bei RT gefärbt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit Mounting Medium versehen. Unter dem Mikroskop konnten nun die transfizierten Zellen, welche die siRNA aufgenommen haben, ausgezählt und die Effizienz bestimmt werden.

Reagenzien Hersteller Menge in µl pro Well Lipofectamin® 2000 Invitrogen 0.3 TurboFect Fermentas 0,5 HiPerFect Qiagen 1 Interferin Peglab Biotechnologie 0,75 Nanofectin siRNA PAA 0,5 GeneSilencer Biocat 1 Novagen (Merck) RiboJuice 0,75 DharmaFect Dharmacon 0,5

Tabelle 2–35: Verwendete Transfektionsreagenzien in einer 96-Well-Platte

# 2.6.4 Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay

Um die Zellviabilität der Zellen nach der Transfektion zu testen, wurde ein Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium (MTT) Assay (Roche Life Science, Mannheim) durchgeführt. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. In einer 96-Well-Platte von Nunc wurden die C2C12-NFAT Zellen mit einer Zelldichte von 3,5 x 10<sup>4</sup>/ml ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen unterschiedlichen Bedingungen behandelt. Als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und als Positiv-Kontrolle Zellen mit Zusatz von 20 % DMSO. Parallel dazu erfolgte eine Scheintransfektion und eine siRNA Transfektion. Nach weiteren 24 h wurde zu den Zellen jeweils 10 µl/Well vom MTT-Reagenz dazugegeben, welche für 4 h bei 37 °C inkubieren musste. Anschließend kam 100 µl/Well
vom Solvenz-Reagenz zum Ansatz hinzu, was über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Die Absorptionsmessung erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm.

#### 2.6.5 Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"

Der "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" wurde zu Beginn im Duplikat gemessen. Insgesamt wurden Messwerte von 3348 verschiedene miRNAs, verteilt auf 35 x 96-Well-Zellkulturplatten, erhoben. Selektierte miRNAs konnten weiter in Triplikaten und zum Schluss in acht Replikaten gemessen werden. Die kompletten Messungen waren auf einen Zeitraum von mehreren Wochen verteilt. Im ersten Schritt des "miRNA-Screen" Ablaufs wurden die Zellen der stabilen C2C12-NFAT Zelllinie in 96-Well-Zellkulturplatten mit einer Dichte von je 3,5 x 10<sup>4</sup>/Well ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, wobei Antibiotikum-freies Medium verwendet wurde. Für die Transfektion sollte eine Lösung, bestehend aus FCS- und Antibiotikum-freiem Medium, mit den Expressionsplasmiden NFATc4, ∆CnA mit je 40 ng/Well und pRT-LK mit je 5 ng/Well hergestellt werden. Mit einem Multidrop von Thermo Fisher wurde der Transfektionsmix in eine 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Je 5 µl der 125 nM bzw. 250 nM miRNA-Arbeitskonzentration wurden mit einem 96-er Pipettierkopf eines Tecan Pipettierroboters (Freedom Evo 200, Tecan, Männedorf, Schweiz) in die 96-Well-Zellkulturplatten mit dem Transfektionsansatz übertragen. Die jeweiligen positiven und negativen Kontrollen konnten manuell in die 96-Well-Zellkulturplatte mit dem Transfektionsansatz hinzugefügt werden. Zudem wurde eine Nanofectin siRNA Transfektionsreagenz-Lösung von 0,5 µl/Well in FCS- und Antibiotikum-freiem DMEM Medium hergestellt. Mittels Multidrop wurde der Transfektionsreagenz-Ansatz in eine neue 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation konnte nun mithilfe des 96-er Pipettierkopfs eines Tecan Pipettierroboters die Nanofectin siRNA Transfektionsreagenz-Lösung zu dem Kotransfektionsansatz hinzugefügt werden. Es fand eine Inkubation des Transfektionsansatzes von 20 min bei RT statt mit anschließender Überschichtung der C2C12-NFAT Zelllinien. Nach einer weiteren Inkubation für 48 h bei 37 °C wurden die behandelten C2C12-NFAT Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 x Passiv Lyse Puffer geerntet. Jeweils 20 µl/Well vom Zelllysat wurde in eine weiße 96-Well-Lumineszenzplatte überführt und im Tecan gemessen. Die Zugabe der beiden Luziferase-Substrat-Lösungen (LAR II und Stop&Glo) mit jeweils 50 µl/Well erfolgte automatisch nacheinander mit je einer anschließenden Messzeit von 2500 ms. Die relative Luziferase-Aktivität wurde als Quotient aus den Lumineszenzmesswerten der Firefly- und der Renilla-Luziferase berechnet.

#### 2.6.6 Normalisierung und Quantifizierung der Messwerte

Für die gemessene miRNAs standen zwei Messwerte zur Verfügung: Der Firefly-Luziferase-Wert als relatives Maß der NFAT-Aktivierung und der Renilla-Luziferase-Wert als relatives Maß der Zellzahl. Aus dem Quotienten der Firefly- und der Renilla-Luziferase konnte die relative Luziferase-Aktivität berechnet werden. Die Messwerte der relativen Luziferase-Aktivität der einzelnen miRNAs wurden auf den Mittelwert der Messwerte der Negativ-Kontrolle einer 96-Well-Zellkulturplatte bezogen. Die statistische Auswertung der Quantifizierung der Messwerte erfolgte wie es im Abschnitt 2.5.6 beschrieben ist. Um die Ergebnisse aller Experimente zudem auf signifikante Unterschiede zu überprüfen, wurde die One Way Varianzanalyse (ANOVA), der Median und die Perzentilen von 10 % - 90 % der Software SigmaPlot 11.0 herangezogen.

## 3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, neue miRNA Modulatoren im Calcineurin-NFAT Signalweg zu identifizieren. Dazu wurden stabile murine Myoblastenvorläuferzellen (C2C12-NFAT) verwendet. Hierfür wurde ein "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" etabliert und durchgeführt. Neben der Planung des Versuchsaufbaus wird im Folgenden die Durchführung des "miRNA-Screens", die weiterführende Datenanalyse der Messpunkte und die nähere Charakterisierung der selektierten miRNAs beschrieben. Deren Funktion konnte anschließend in Kardiomyozyten *in vitro* und *in vivo* untersucht und weiter charakterisiert werden.

### 3.1 Etablierung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"

Damit der "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" mit allen Messpunkten vergleichbar war, sollten die gleichen Bedingungen gewährleistet sein. Vor Beginn des "miRNA-Screens" mussten einige Entscheidungen getroffen und Vorversuche durchgeführt werden. Dazu zählte die Wahl der Zellkulturplattenformate, die Wahl des Transfektionsmittels, die Konzentration der miRNAs der jeweiligen Bibliotheken, die Plasmidmenge für die Kotransfektion und die Wahl der Negativ- und Positiv-Kontrolle.

Die Wahl der Zellkulturplattenformate fiel auf die 96-Well-Mikrotiterplatten, da dieses Format ein ausreichendes Maß an Miniaturisierung, eine einfache Handhabung und eine stabile Messung zulässt. Des Weiteren wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten des Herstellers Nunc gewählt, da die murinen Muskelvorläuferzellen sich gleichmäßig auf den 96-Well-Platten verteilten und gut anwuchsen.

Insgesamt erfolgte die Überprüfung von 8 verschiedenen Transfektionsmitteln auf ihre Eignung für den "miRNA-Screen". Um die Transfektionseffizienz zu testen, wurden fluoreszenzmarkierte siRNAs (FITC) von Qiagen und Exiqon in die Muskelvorläuferzellen transfiziert und anschließend die FITC-positiven Zellkerne unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Mengen der Transfektionsreagenzien richteten sich nach den empfohlenen Angaben der Hersteller. In Tabelle 3–1 und Tabelle 3–2 sind die Vergleiche der ausgezählten fluoreszenzmarkierten Zellkerne bei 20-facher Vergrößerung in Abhängigkeit von den verwendeten Transfektionsreagenzien zusammengefasst.

Es konnte durch erneutes Wiederholen gezeigt werden, dass das Transfektionsreagenz Nanofectin siRNA eine Transfektionseffizienz von nahezu 100 % erreicht. Dieses Reagenz ist sowohl für kleine RNAs als auch für Kotransfektion geeignet, was für diese Arbeit von großer Bedeutung war. Die Endkonzentrationsmenge der fluoreszenzmarkierten siRNAs von 10 nmol/Well (Qiagen) bzw. 5 nmol/Well (Exiqon) wurde für die jeweiligen Bibliotheken beibehalten und verwendet.

Reagenz	gezählte Zellkerne	FITC markierte Zellkerne	Effizienz %
Lipofectamin® 2000	19	14	74
HiPerFect	22	5	23
TurboFect	23	8	35
RiboJuice	13	12	92
Interferin	25	3	12
Nanofectin siRNA	13	13	100
GeneSilencer	16	15	94
DharmaFect3	12	0	0

Tabelle 3–1: Transfektionseffizienz der 8 verschiedenen Transfektionsmittel mit der FITC markierten siRNA von Qiagen

Tabelle 3–2: Transfektionseffizienz der 8 verschiede	enen Transfektionsmittel mit der FITC
markierten siRNA von Exiqon	

Reagenz	gezählte Zellkerne	FITC markierte Zellkerne	Effizienz %	
Lipofectamin® 2000	29	25	86	
HiPerFect	21	4	19	
TurboFect	29	14	48	
RiboJuice	15	14	93	
Interferin	23	4	17	
Nanofectin siRNA	10	10	100	
GeneSilencer	19	19	100	
DharmaFect3	0	0	0	

Die beiden miRNA Bibliotheken wurden mit RNase/DNase-freiem Wasser auf eine Stockkonzentration von 5 µM gebracht. Anschließend konnte für den "miRNA-Screen" eine Arbeitskonzentration von 250 nM für die Qiagen "Maus miScript miRNA Mimic Bibliothek" und eine Arbeitskonzentration von 125 nM für die Exiqon "miRCURY LNA™ Maus miRNA Inhibitor Bibliothek" erstellt werden.

Des Weiteren erfolgten die Überprüfungen der Negativ- und der Positiv-Kontrolle und die Etablierung der Plasmidkonzentrationen für den "miRNA-Hochdurchsatz-Screen". Die Firefly-Luziferase "GL2 siRNA", welche gegen das Luziferase-Gen gerichtet war, wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Die "AllStar siRNA" von Qiagen und der "miRCURY LNA™ miRNA Inhibitor" von Exiqon wurden als Negativ-Kontrolle verwendet. Nanofectin siRNA konnte als effektives Transfektionsreagenz bestätigt werden und war laut Hersteller für Kotransfektionen geeignet. In Abbildung 3–1 ist die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität der Kotransfektion mit den Kontrollen nach unterschiedlichen Intergrationszeiten des Dual-Luziferase Assays dargestellt.



Abbildung 3–1: Vergleich der NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität nach unterschiedlichen Integrationszeiten

C2C12-NFAT Zellen wurden mit den Plasmiden NFATc4,  $\Delta$ CnA (40 ng/Well) und pRT-LK (5 ng/Well) transfiziert. Zudem kam je 5 nmol/Well der Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle hinzu. 48 h nach der Kotransfektion mit Nanofectin siRNA erfolgte die Ernte der Zellen mit 1 x Passiv Lyse Puffer. Die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität wurde mithilfe des Tecan Photometers bestimmt. Die relative NFAT-Aktivierung mit der Kontroll siRNA wurde als 1 definiert. Der Quotient der Luziferase-Messwerte ist als relative NFAT-Aktivierung angegeben. RLE, relative Luziferaseeinheiten. (Mittelwert ± SE; n=6); \*\*: p<0,001.

Die NFAT-Aktivierung erfolgte mit den Expressionsplasmiden NFATc4 und dem konstitutiv aktiven Calcineurin (△CnA). Als endogene Kontrolle wurde pRT-LK (Renilla) verwendet. Für die Negativ- und Positiv-Kontrolle kam eine Endkonzentration von 5 nmol/Well zum Einsatz. Bei der Kotransfektion mit der Firefly-Luziferase GL2 siRNA zeigte sich eine deutliche Reduktion (> 80 %) der gemessenen NFAT-Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Kontroll siRNA. Die Integrationszeit von 5000 ms und 2500 ms der Dual-Luziferase Messung zeigte die gleiche NFAT-Aktivierung, so dass für den "miRNA-Screen" eine Integrationszeit von 2500 ms gewählt wurde. Basierend auf den Versuchsergebnissen konnte geschlossen werden, dass sowohl die Kotransfektion als auch der Knockdown in ausreichendem Maße stattfand. Die getesteten Bedingungen wurden somit als geeignet für die Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens" befunden. Darüber hinaus konnte die Firefly-Luziferase GL2 siRNA als interne Kontrolle für jede 96-Well-Zellkulturplatte benutzt werden.

Um die Zellviabilität der Zellen nach der Transfektion zu testen, erfolgte ein MTT-Assay (Mosmann, 1983). Dazu wurden die stabilen C2C12-NFAT Zellen nach 24 h Wachstum in einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Bedingungen behandelt. Für die Zellviabilität-Messung kamen unbehandelte Zellen, eine Scheintransfektion mit Nanofectin

siRNA-Transfektionsreagenz, eine Transfektion mit der Kontroll siRNA und der Firefly-Luziferase GL2 siRNA zum Einsatz. Als Negativ-Kontrolle erfolgte die Behandlung der Zellen mit 20 % DMSO. In Abbildung 3–2 ist die Zellviabilität mit den unterschiedlichen Bedingungen dargestellt.



#### Abbildung 3–2: Messung der Zellviabilität nach Transfektion

C2C12-NFAT Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen von Transfektionsbedingungen behandelt. 24 h nach der Transfektion inkubierten die Zellen zuerst für 4 h mit dem MTT-Reagenz und anschließend über Nacht mit dem Solvenz-Reagenz. Die Absorptionsmessung erfolgte an einem Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm. Unbeh. Zellen, unbehandelte Zellen; Scheintrans, Scheintransfektion; Kontr. siRNA, Kontroll siRNA; RAE, relative Absorptionseinheiten. (Mittelwert  $\pm$  SE; n=6); \*\*: p<0,001. Die Signifikanzen beziehen sich auf die unbehandelten Zellen, die als 1 definiert wurden.

Die Zellviabilität zeigt das Maß der Aufnahme von verschiedenen Transfektionsbedingungen. Wurden die Zellen mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin siRNA sowohl bei der Scheintransfektion als auch bei der Transfektion mit der Kontroll siRNA und der Firefly-Luziferase GL2 siRNA behandelt, starben einige Zellen und die Zellviabilität sank um 15 % - 20 %. Die mit 20 % DMSO behandelten Zellen starben zu 95 %.

## 3.2 Aufbau und Ablauf des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"

Auf der Grundlage der Ergebnisse aller Vorversuche entstand die Versuchskonfiguration des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens". In Abbildung 3–3 ist graphisch der Ablauf des "miRNA-Screens" und die Strukturen der transfizierten Plasmide gezeigt.



# Abbildung 3–3: Graphische Darstellung des "miRNA-Screen" Ablaufs und der Aufbau der Plasmide

Die murinen C2C12-NFAT Zellen wurden in der 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Plasmide und der miRNA Mimics bzw. miRNA Inhibitoren mithilfe des Transfektionsmittels Nanofectin siRNA. Nach 48 h Transfektion konnten die Zellen mit 1 x Passiv Lyse Puffer (PLP) geerntet und die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität im Photometer bestimmt werden. Das Dual-Luziferase Reportergen System basiert auf der Aktivierungsmessung zweier Luziferasen (Firefly- und Renilla-Luziferase).

An Tag 0 erfolgte die Aussaat der murinen C2C12-NFAT Zellen in der 96-Well-Mikrotiterplatte. Am nächsten Tag wurden die Plasmide und die miRNA Mimics bzw. die miRNA Inhibitoren kotransfiziert. Die Endkonzentration der miRNAs Mimics betrug 10 nmol/Well und der miRCURY LNA™ miRNA Inhibitoren 5 nmol/Well. Eine Plasmidmenge von 40 ng/Well der NFATc4 und  $\Delta$ CnA Plasmide und jeweils 5 ng/Well des pRT-LK (Renilla) Plasmides konnte erfolgreich etabliert und eingesetzt werden. Die Endkonzentration der Negativ- und der Positiv-Kontrolle betrug 5 nmol/Well. Als Transfektionsreagenz kam Nanofectin siRNA mit einem Volumen von 0,5 µl/Well zum Einsatz. Die internen Kontrollen wurden jeweils manuell auf jeder 96-Well-Platte hinzugefügt. 48 h nach der Transfektion (Tag 3) erfolgte die Lyse der Zellen mit je 20 µl/Well 1 x Passiv Lyse Puffer und die anschließende Messung der NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität mithilfe des Dual-Luziferase Assays im Photometer.

# 3.3 Ergebnisse des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens"

Für die erste Messung des "miRNA-Screens" wurden die insgesamt 1674 miRNAs Mimics und Inhibitoren in Duplikaten gemessen, die auf 35 x 96-Well-Zellkulturplatten aufgeteilt waren. In den ersten elf Spalten jeder 96-Well-Mikrotiterplatte befanden sich jeweils die miRNA Mimics und die miRCURY LNA™ miRNA-Inhibitoren. In der zwölften Spalte waren die internen Kontrollen platziert. Die Firefly-Luziferase GL2 siRNA und die Kontroll siRNA wurden als Kontrolle für die Effizienz der Transfektion und des Knockdowns benutzt. In Abbildung 3–4 ist eine schematische Darstellung der Auswertung des "miRNA-Screens" dargestellt.



#### Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Auswertung des "miRNA-Screens"

Die C2C12-NFAT Zellen wurden mit den jeweiligen miRNAs und den beschriebenen Plasmiden behandelt. Aus insgesamt 1050 miRNA Mimics und 624 miRNA Inhibitoren konnten 136 miRNAs ausgewählt werden, die die Bedingungen der statistischen Auswertung erfüllten. Durch erneute Luziferase-Messungen wurden zuerst 30 miRNAs und dann weitere 16 miRNAs selektiert. Zum Schluss verblieben nur noch zehn miRNA Mimics, die die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg hoch- bzw. runterregulierten.

Die Durchführung des "miRNA-Screens" erfolgte mit dem Multidrop und einem Pipettierkopf eines Tecan Pipettierroboters, die die Versuchsdurchführung vereinfachten (siehe Abschnitt 2.6.5). Nach der Messung der NFAT-Aktivität mit dem Dual-Luziferase Assay erfolgte eine Analyse der Daten. Zunächst wurde für jede miRNA die individuelle relative NFAT-Aktivität bestimmt, indem der Quotient aus der gemessenen Firefly- und Renilla-Luziferase-Aktivität gebildet wurde. War die NFAT-Aktivierung der Firefly-Luziferase GL2 siRNA um > 80 % reduziert im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, so konnte geschlossen werden, dass sowohl die Transfektion als auch der Knockdown in ausreichendem Maße stattfand und die Durchführung des "miRNA-Hochdurchsatz-Screens" funktioniert hatte. Bei einer zu geringen Knockdown-Effizienz (< 80 %) durch die Firefly-Luziferase GL2 siRNA erfolgte die Wiederholung der Messung der entsprechenden 96-Well-Mikrotiterplatte.

Aus den gesamten 1674 miRNA Mimics und miRNA Inhibitoren blieben nach der ersten Luziferase-Messung des "miRNA-Screens", die in Duplikaten durchgeführt wurde, insgesamt 136 identifizierte differentiell regulierte miRNAs Mimics und miRNA Inhibitoren übrig. Zur statistischen Auswertung der Luziferase-Messung wurde der Median und die Perzentile von 10 % - 90 % herangezogen. Durch eine erneute zweite Luziferase-Messung der 136 miRNAs in Triplikaten konnten weitere miRNA Mimics und miRNA Inhibitoren selektiert werden. Nach der statistischen Auswertung mit der One Way Varianzanalyse und der Wahl der Perzentile von 10 % - 90 % wurden 30 miRNAs ausgewählt, die einen statistischen p-Wert von < 0,05 zeigten. Es erfolgte eine erneute dritte Luziferase-Messung der 28 miRNA Mimics und zwei miRNA Inhibitoren in acht Replikaten. Es wurden die miRNAs selektiert, die einen p-Wert von < 0,01 zeigten, so dass nach der statistischen Auswertung 16 miRNA Mimics diese Anforderung erfüllten. Nach einer erneuten vierten Luziferase-Messung verblieben zur Bestätigung zehn miRNA Mimics, die einen signifikanten p-Wert von < 0,001 aufwiesen. In Abbildung 3-5 sind die miRNA Mimics gezeigt, die die statistischen Bedingungen des "miRNA-Screens" erfüllten den Calcineurin-NFAT Signalweg hochund bzw. runterregulierten.



Abbildung 3–5: NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität nach Zugabe der zehn ausgewählten miRNA Mimics in C2C12-NFAT Zellen

Die Luziferase-Messung der beiden miRNA Bibliotheken in den C2C12-NFAT Zellen zeigte nach vierfacher Messung des "miRNA-Screens", dass zehn miRNA Mimics die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität in dem Calcineurin-NFAT Signalweg hoch- bzw. runterregulieren. Die Messung erfolgte mit dem Dual-Luziferase Reporter Assay an einem Photometer. A) Sechs miRNAs, die die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität hochregulierten. B) Vier miRNAs, die die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität runterregulierten. Der Quotient der Luziferase-Messwerte ist als relative NFAT-Aktivierung angegeben. Die relative NFAT-Aktivierung mit der Kontroll siRNA wurde als 1 definiert. RLE, relative Luziferaseeinheiten. (Mittelwert ± SE; n=21); \*\*: p<0,001. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Kontroll siRNA.

Aus den insgesamt 1050 miRNA Mimics und den 624 miRCURY LNA™ miRNA Inhibitoren, die die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität hoch- bzw. runterregulierten, wurden letztendlich zehn miRNAs zur weiteren Analyse ausgewählt. Unter den zehn miRNA Mimics waren sechs miRNA Mimics, die die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität in dem Calcineurin-NFAT Signalweg hochregulierten und vier miRNA Mimics, die die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität runterregulierten. Unter den zehn miRNAs befand sich kein miCURY LNA™ miRNA-Inhibitor, da diese die Anforderungen der statistischen Auswertung nicht erfüllten. Um die Funktion der ausgewählten zehn miRNA Mimics in Kardiomyozyten in vitro zu untersuchen, wurden mithilfe des Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vektor Kit adenovirale miRNA-Konstrukte hergestellt (siehe Abschnitt 2.4.13).

# 3.4 Ergebnisse der adenoviralen Überexpression der miRNAs in Kardiomyozyten

Die Versuchsbedingungen des "miRNA-Screens" wurden auf die Primärkultur von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten übertragen. Der Wechsel auf die Primärkultur sollte zeigen, ob die ausgewählten miRNAs auch in primären Kardiomyozyten als Modulatoren des Calcineurin-NFAT Signalweges fungieren. Um dies zu überprüfen, erfolgte die Herstellung der adenoviralen miRNAs wie es in Abschnitt 2.4.13 beschrieben ist. Nach erfolgreicher Klonierung und Bestimmung der Infektiosität der adenoviralen miRNA Konstrukte, konnte die Überexpression auf molekularer Ebene gemessen werden. Für die miRNA-3067\* und miRNA-883b-3p konnten keine Adenoviren-Konstrukte hergestellt werden, so dass diese außer Betracht gelassen wurden. Für alle anderen acht adenoviralen miRNAs eine ausreichende Uberexpression in den Kardiomyozyten messbar. Die war Luziferase-Messung erfolgte in einer 12-Well-Platte. Die Kardiomyozyten wurden am nächsten Tag mit den Adenoviren AdNFAT-luc, Ad∆CnA, AdNFATc4, AdRenilla (siehe Tabelle 2–10) und den jeweiligen adenoviralen miRNAs infiziert. Als Negativ-Kontrolle kam das Adenovirus miRNA negativ (AdmiR neg) zum Einsatz, da dieser keine Übereinstimmung zu anderen miRNA-Sequenzen zeigt. Eine geeignete Positiv-Kontrolle für einen Knockdown konnte nicht gefunden werden. In Abbildung 3-6 sind die Ergebnisse der behandelten Kardiomyozyten mit den jeweiligen adenoviralen miRNAs gezeigt, die den Calcineurin-NFAT Signalweg hoch- oder runterregulieren.



Abbildung 3–6: NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität nach Zugabe der acht ausgewählten miRNA Mimics in NRVCMs

Kardiomyozyten zeigte vierfacher Die Luziferase-Messung in den nach Messung des miRNAs "miRNA-Screens", dass zwei adenovirale signifikant die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität hochregulierten und drei adenovirale miRNAs signifikant die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität in dem Calcineurin-NFAT Signalweg runterregulierten. A) Fünf miRNAs, die die NFAT-Aktivität in den C2C12-NFAT Zelllinien hochregulierten, B) Drei miRNAs, die die NFAT-Aktivität in den C2C12-NFAT Zellen runterregulierten. Die Messung erfolgte mit dem Dual-Luziferase Reporter Assay an einem Photometer. Der Quotient der Luziferase-Messwerte ist als relative NFAT-Aktivierung angegeben. RLE, relative Luziferaseeinheiten. (Mittelwert ± SE; n=16); \*\*: p<0,001; \*: p<0,05. Die Signifikanzen beziehen sich auf den AdmiR neg, welcher als 1 definiert wurde.

Die Adenoviren miRNA-142-5p und miRNA-432 erhöhten signifikant die NFAT-Luziferase Die Adenoviren miRNA-3070a\*/b-5p, miRNA-669-3-3p Reportergen-Aktivität. und miRNA-3059 erniedrigten signifikant die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität in dem Calcineurin-NFAT Signalweg. Die drei Adenoviren miRNAs-196-1\*, -133b und -3105-5p zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die NFAT-Aktivierung. Der Vergleich des "miRNA-Screens" in den C2C12-NFAT Zellen und in den neonatalen Kardiomyozyten zeigte, dass die miRNAs-142-5p, -669-3-3p und -3059 den gleichen Einfluss auf den Calcineurin-NFAT Signalweg aufweisen. Für weitere Charakterisierungen und ein in vivo Modell fiel bei dieser Arbeit die Wahl auf die miRNA-142-5p. Diese war die einzige signifikante hochregulierende miRNA im Calcineurin-NFAT Signalweg, welche in beiden Zellsystemen beobachtet werden konnte. Auf Literatur-Ebene konnte schon für die miRNA-142-3p gezeigt werden, dass die miRNA eine entscheidene Rolle im Herzen spielt (Jeong et al., 2012; Nishiyama et al., 2012; Voellenkle et al., 2010), was die miRNA-142-5p zu einem interessanten Modulator macht. Obwohl die miRNA-669a-3-3p und die

miRNA-3059 in beiden Zellsystemen die NFAT-Aktivität runterregulierten, fiel die Wahl zunächst nicht auf die weitere Charakterisierung dieser miRNAs. Auf Literatur-Ebene waren zu diesem Zeitpunkt keine kardialen Funktionen bekannt. Interessante Ergebnisse waren bei der miRNA-3070a\*/b-5p und miRNA-432 zu beobachten, da diese genau das Gegenteil der NFAT-Aktivität im Vergleich zu dem "miRNA-Screen" in den C2C12-NFAT Zellen zeigten. Diese Befunde könnten durch weitere Analysen besser untersucht und charakterisiert werden.

# 3.5 Relative Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben und verschiedenen Mausmodellen

Um sich ein genaues Bild von der Funktion der miRNA-142-5p zu machen, wurde als erstes die relative Expression in unterschiedlichen Mausgewebeproben (Gehirn, Herz, Niere, Leber, Skelettmuskulatur, Milz und Uterus) untersucht (siehe Abbildung 3–7).



Abbildung 3–7: Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben Die RNA aus Mausgewebeproben wurde aufgearbeitet, mit dem miScript RT Kit umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. U6 wurde als endogene Kontrolle verwendet. Das Gehirn wurde auf 1 gesetzt. Mausgewebeproben; N= 9.

Die höchste relative Expression der miRNA-142-5p in den unterschiedlichen Mausgewebeproben war in der Milz zu sehen. Das Herz zeigte eine höhere Expression als die Skelettmuskulatur. Im Gehirn, in der Niere und im Uterus war die niedrigste Expression zu beobachten.

Um eine pathophysiologische Relevanz der miRNA-142-5p zu untersuchen, wurden verschiedene Mausmodelle für Kardiomyopathien herangezogen. Dazu zählen sowohl die Calsarcin1-KO (Frey et al., 2004a) und MLP-KO Mauslinien (Arber et al., 1997), die Calcineurin-TG Mauslinie (Molkentin et al., 1998) als auch Wildtyp Mäuse, die einer transversalen Aortenkonstruktion (TAC) oder einer LAD-Ligatur (Myokardinfarkt) unterzogen wurden. Alle diese Mausmodelle zeigen eine ausgeprägte hypertrophe bzw. dilatative Kardiomyopathie die letztendlich zur Herzinsuffizienz führen. In Abbildung 3–8 ist die Expression der miRNA-142-5p in verschiedenen Mausmodellen dargestellt.



Abbildung 3–8: Relative Expression der miRNA-142-5p in verschiedenen Mausmodellen Die RNA aus den Herzproben der verschiedenen Mausmodelle wurde aufgearbeitet, mit dem miScript RT Kit umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. U6 wurde als endogene Kontrolle verwendet. A) Expression der miRNA-142-5p in TAC Tieren; N=11 Sham, N=11 TAC; B) Expression der miRNA-142-5p in Infarkt Tieren; N=6 Sham, N=8 Infarkt; C) Expression der miRNA-142-5p in Calcarcin1-KO Tieren; N=5 WT, N=6 Calcarcin1-KO; D) Expression der miRNA-142-5p in MLP-KO Tieren; N=6 WT, N=6 MLP-KO; E) Expression der miRNA-142-5p in Calcineurin-TG Tieren; N=5 WT, N=6 Calcineurin-TG; n.s.; nicht signifikant; \* : p<0,05.

In den Mausmodellen Calsarcin1-KO, MLP-KO und Calcineurin-TG war keine Änderung der relative Expression von miRNA-142-5p im Vergleich zu den Wildtypen (WT) zu beobachten.

In den TAC (P=0,071) Mäusen konnte eine Erhöhung der Expression der miRNA-142-5p im Vergleich zu Wildtyp Tieren gezeigt werden, welche jedoch nicht signifikant waren. In den Infarkt Mäusen war eine signifikante Erhöhung der Expression der miRNA-142-5p im Vergleich zu den Wildtyp Tieren nachweisbar.

# 3.6 Experimentelle Zielgenvalidierung und Analysen der Zielgene für die miRNA-142-5p

Um die miRNA-142-5p weiter zu charakterisieren, wurden mithilfe verschiedener Zielgenvorhersage-Programme wie z.B. Targetscan, Dianalab, Microcosm, miRanda und miRbd potentielle Zielgene *in silico* gesucht. Die vorhergesagten Gene konnten mit dem Venn-Diagramm (Kestler et al., 2005) untereinander verglichen und die überlappenden Zielgene notiert werden. Hieraus wurden basierend auf Expressionsdaten im Herzen bzw. Muskel und mithilfe einer ausführlichen Literaturrecherche interessante Kandidatenzielgene für die experimentelle Validierung ausgewählt. In Tabelle 3–3 sind 13 potentielle Zielgene dargestellt, die für die miRNA-142-5p vorausgesagt wurden. Die Anzahl der Pluszeichen zeigt die Stärke der Expression im Herzen bzw. Muskel an.

Zielgene	Zielgen-Name	Expression
		nerz/wuskei
ACTC1	Actin, Alpha, Cardiac Muscle 1	+++ / ++
ADAMTS1	A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin	+/++
	Motifs 1	
ATP1B1	ATPase, Na+/K+ Transporting, Beta 1 Polypeptide	++ / ++
CAMTA1	Calmodulin Binding Transcription Activator 1	++ / ++
CASK	Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase	+/+
IGF1	Insulin-Like Growth Factor 1	+ /
JARID2	Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2	+/+
LHX9	LIM Homeobox 9	+/+
LMX1A	LIM Homeobox Transcription Factor 1, Alpha	+/+
NFAT5	Nuclear Factor Of Activated T-Cells 5, Tonicity-Responsive	+/+
SOX5	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 5	+/+
TGFBR2	Transforming Growth Factor, Beta Receptor II	+/++
ZFPM2	Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2	+/++

 Tabelle 3–3: Potentielle Zielgene der miRNA-142-5p

+++; stark, ++; mittel, +; schwach

Die experimentelle Zielgenvalidierung beruht auf die Quantifizierung der miRNA Wirkung auf den 3'UTR Bereich des Zielgens, wobei der Dual-Luziferase miRNA Target Expression Vektor pmirGLO zum Einsatz kam. Mithilfe der Zielgenvorhersage-Programme konnte ein 3`UTR-Fragment der ausgewählten Gene (siehe Tabelle 3–3) ermittelt werden, das mindestens eine potentielle Bindestelle für die miRNA-142-5p aufwies und welches anschließend in den pmirGLO Vektor kloniert wurde. Hierfür wurde die 3'UTR-Targetsequenz hinter das Firefly-Luziferase-Gen (luc2) kloniert und in C2C12 Zelllinie transfiziert. Zur

#### Ergebnisse

Normalisierung Firefly-Aktivität codiert Vektor gleichzeitig für der der ein Renilla-Luziferase/Neomycin-Resistenz-Fusionsgen (hRluc-neo) (siehe Abschnitt 2.4.15). Bindet das miRNA-3`UTR Konstrukt, kommt es zur Abnahme der Firefly-Luziferase Aktivität, was ein Maß für eine Interaktion darstellt. Aufgrund der geringen Uberexpression des pcDNA 6.2-GW/-miR-142-5p Konstruktes in den C2C12 Zellen kamen die miRVana™ miRNA Mimics von Ambion zum Einsatz. Bei dem "miRNA-Screen" in den C2C12-NFAT Zellen wurden ebenfalls miRNA Mimics verwendet, so dass die Versuche aufgrund der Expression gut miteinander vergleichbar waren. Die Anwendung von miRNA Mimics, die effizient transfizierbar und chemisch modifizierte doppelsträngige RNA-Moleküle sind, vermeiden die umständliche Klonierung und funktionale Überprüfung von Expressionskonstrukten. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin® RNAiMAX verwendet, das speziell für Transfektionen von kleinen RNAs geeignet war. Die Überexpression der miRVana™ miRNA Mimic 142-5p in den C2C12 Zellen konnte mithilfe der miScript gRT-PCR überprüft werden, welcher in Abbildung 3-9 dargestellt ist. Als Kontrolle wurde die miRVana™ miRNA Mimic negativ (miR Mimic neg) verwendet.



#### Abbildung 3–9: Überexpression der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p in den C2C12 Zellen In einer 6-Well-Platte wurden C2C12 Zellen mit einer Dichte von 0,2 x 10<sup>6</sup> Zellen/Well ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit den miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimics (125 nmol/Well). Nach 48 h wurden die behandelten Zellen mit Trizol geerntet und die RNA isoliert. Die cDNA Synthese erfolgte mit dem miScript II RT Kit. Mithilfe der miScript qRT-PCR konnte die relative Expression der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p ermittelt werden. Dabei ist die relative Expression mit der miRVana<sup>™</sup> miR Mimic neg als 1 definiert. Als endogene Kontrolle wurde U6 verwendet. (Mittelwert ± SE; n=3); \*\*: p<0,001.

Die miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p konnte 658-fach in den C2C12 Zellen überexprimiert werden.

Nach erfolgreicher Klonierung der relevanten 3'UTR-Fragmente an das 3'Ende der Firefly-Luziferase in den pmirGLO-Vektor und ausreichender Überexpression der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p in den C2C12 Zellen wurden die pmirGLO/3'UTR Konstrukte (400 ng/Well) mit der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic (20 nmol/Well) kotransfiziert. Dabei erfolgte paarweise die Kotransfektion vom pmirGLO/3'UTR Konstrukt + miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic negativ und die Kotransfektion vom pmirGLO/3'UTR Konstrukt + miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p. Dieses erlaubt die Analyse des Einflusses der miRNA-142-5p auf die 3'UTR Bindestelle. Um zu überprüfen, ob die Luziferase-Messung funktioniert, wurde ein pmirGLO/miRNA-142-5p match Konstrukt hergestellt, welches durch Bindung der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p die relative Firefly-Luziferase Aktivität reduzieren sollte. In Abbildung 3–10 ist die relative Luziferase-Aktivität der 13 pmirGLO/3'UTR Zielgenkonstrukte in Abhängigkeit der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p dargestellt.



Abbildung 3–10: Untersuchung der Zielgenvalidierung mit den pmirGLO/3'UTR Konstrukten Die Dual-Luziferase Messung wurde in 24-Well-Platten bei einer Zelldichte von 0,25 x 10<sup>5</sup> Zellen/Well durchgeführt. Die Kotransfektion erfolgte jeweils mit den Konstrukten pmirGLO/3'UTR + miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic negativ und pmirGLO/3'UTR + miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p. Lipofectamin® 2000 kam als Transfektionsreagenz zum Einsatz. 48 h nach der Transfektion wurden die C2C12 Zellen mit je 100 µl/Well 1 x PLP geerntet und mithilfe des Photometers die Luziferase-Aktivierung ermittelt. Der Quotient der Luziferase-Messwerte ist als relative Luziferase-Aktivierung angegeben. RLE, relative Luziferaseeinheiten. (Mittelwert ± SE; n=12); \*\*: p<0,001. Die Signifikanzen beziehen sich auf die miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic negativ, die als 1 definiert wurden.

Bei dem pmirGLO/miRNA-142-5p match Konstrukt war die relative Luziferase-Aktivität um 70 % reduziert, was die vollständige Sequenzkomplementarität zwischen der miRNA Mimic und der Ziel-3'UTR wiederspiegelt. Die Reduktion stellt ein Maß für die miRNA-3'UTR Interaktion dar. Des Weiteren konnte bei der Kotransfektion mit der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p eine leichte Erniedrigung der relativen Luziferase-Aktivierung bei den Zielgenen ACTC1, ADAMTS1, CASK, JARID2 und ZFPM2 beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war. Alle anderen Zielgenkonstrukte zeigten keine Bindung der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p an die 3'UTR Bindestelle, da die relative Luziferase-Aktivität nicht reduziert war.

Um die potentiellen Zielgene weiter zu analysieren, wurde sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene die Expression dieser Gene nach Überexpression der miRNA-142-5p untersucht.

Für die miRNA-3070a\*/b-5p und miRNA-432 konnten ebenfalls potentielle Zielgene mithilfe des Venn-Diagramm analysiert werden. Interessante Zielgene für die miRNA-3070a\*/b-5p waren unter anderem NEO1, EP300, NRXN1, CAMK2G und PIK3R1. Für die miRNA-432 kamen die Zielgene ADAM12, CAMK2B, FOXK1, ITPR3 und PKD1 in Betracht. Alle diese Zielgene waren im Herzen und im Muskel exprimiert und daher für weitere Charakterisierungen vielversprechend.

## 3.6.1 qRT-PCR und Western Blot Analysen zeigen keine Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p

Nachdem keines der potentiellen Zielgene der miRNA-142-5p mithilfe der pmirGLO Messmethode als direktes Zielgen validiert werden konnten, wurden andere Messmethoden in Betracht gezogen. Die pmirGLO Messmethode beruht auf der Anwesenheit von Bindestellen. Ist ein Fragment falsch ausgewählt oder findet die Bindung im 3'UTR Bereich gar nicht statt, so kann kein potentielles Zielgen nachgewiesen werden. Demnach erfolgten weitere Untersuchungen der Zielgene auf molekularer Ebene. Getestet wurden die Zielgene ACTC1, ATP1B1, CAMTA1, CASK, IGF1, JARID2, LHX9, LMX1A, SOX5, TGFBR2 und ZFPM2. Zu diesem Zweck wurden für alle Zielgene Primerpaare für die Spezien Maus und Ratte designt (Tabelle 2–3). Dabei sollte nicht nur das Zellsystem der Mausmuskelvorläuferzellen geprüft werden, sondern auch die mRNA Expression in den neonatalen Kardiomyozyten. Eine erfolgreiche Überexpression der miRVana™ miRNA Mimic 142-5p in den C2C12 Zellen konnte schon im Abschnitt 3.5 gezeigt werden. Für die Kardiomyozyten wurde ein Vergleich zwischen der durch Adenoviren und der durch miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p erzeugten Überexpression der miRNA-142-5p angestellt.



In Abbildung 3–11 ist die Überexpression der adenoviralen miRNA-142-5p (AdmiR) und der miRVana™ miRNA Mimic 142-5p in den Kardiomyozyten dargestellt.

Abbildung 3–11: Überexpression der AdmiRNA-142-5p und der miRVana™ miRNA Mimic 142-5p in NRVCMs

In einer 6-Well-Platte wurden NRVCM mit einer Dichte von 0,75 x 10<sup>6</sup> Zellen/Well ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit den miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimics (125 nmol/Well) und das Infizieren der adenoviralen miRNAs (50 ifu/Well). Nach 48 h wurden die behandelten Zellen mit Trizol geerntet und die RNA isoliert. Die cDNA Synthese erfolgte mit dem miScript II RT Kit. U6 wurde als endogene Kontrolle verwendet. A) Überexpression der adenoviralen miRNA-142-5p B) Überexpression der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p. Die relative Expression der AdmiR neg bzw. der miR Mimic neg wurde als 1 definiert. (Mittelwert ± SE; n=3); \*\*: p<0,001.

Es konnte eine deutlich höhere Überexpression (2640-fach) mit der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p als mit der adenoviralen miRNA-142-5p (38-fach) beobachtet werden, so dass sowohl für die Untersuchungen auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene die miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimics zum Einsatz kamen. Die Zielgene ACTC1 und CASK, welche bei der pmirGLO Messmethode eine Tendenz als potentielles Zielgen für die miRNA-142-5p zeigten, konnten weder in den C2C12 Zellen noch in den Kardiomyozyten auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Auch alle anderen potentiellen Zielgene der miRNA-142-5p zeigten keine Regulation auf molekularer Ebene. Die relative Expression der Zielgene ATP1B1, CAMTA1, IGF1, JARID2, LHX9, LMX1A, TGFBR2 und ZFPM2 nach Überexpression der miRNA-142-5p wurde weiter auf Protein-Ebene in Kardiomyozyten untersucht, die in Abbildung 3–12 dargestellt sind.





#### Abbildung 3–12: Western Blot Analysen der potentiellen Zielgene in NRVCMs

Die NRVCM wurden mit der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p behandelt. Für die Protein-Isolierung wurden je 2 Wells einer 6-Well-Platte gepoolt. Die Ernte in der 6-Well-Platte erfolgte nach 72 h mit dem Kern Lyse Puffer. Anschließend wurden die Proben aufgearbeitet und die Proteinkonzentration bestimmt. A) ATP1B1 Proteinexpression B) CAMTA1 Proteinexpression C) IGF1 Proteinexpression D) JARID2 Proteinexpression E) LHX9 Proteinexpression F) LMX1A Proteinexpression G) TGFBR2 Proteinexpression H) ZFPM2 Proteinexpression. Für alle Western Blot Analysen wurde als endogene Ladekontrolle α-Tubulin verwendet. Die relative Expression wurde mittels Densitometrie ermittelt. (Mittelwert ± SE; n=3); n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanzen beziehen sich auf die miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic neg, die als 1 definiert wurden.

Es konnte kein potentielles Zielgene mittels Western Blot Analyse für die miRNA-142-5p bestätigt werden. Alle untersuchten Zielgene zeigten keine signifikante Regulation. Auch nach mehrfachem Wiederholen und Verbessern der Western Blot Bedingungen konnte für die miRNA-142-5p in Kardiomyozyten kein Zielgen bestätigt werden. Auch in den C2C12 Zellen konnte keine signifikante Regulation der potentiellen Zielgene für die miRNA-142-5p beobachtet werden. Zur Kontrolle wurde das direkte Zielgen p300 der miRNA-142-5p in Kardiomyozyten auf Protein-Ebene untersucht, welches von Sharma et al. identifiziert wurde (Sharma et al., 2012) (siehe Abbildung 3–13).



Abbildung 3–13: Western Blot Analyse des direkten Zielgens p300 in NRVCMs Die NRVCM wurden mit der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p behandelt und nach 72 h mit dem Kern Lyse Puffer geerntet. Anschließend wurden die Proben aufgearbeitet und die Proteinkonzentration bestimmt. A) Western Blot zur p300 Proteinexpression B) relative p300 Expression mittels Densitometrie. Als endogene Ladekontrolle wurde α-Tubulin verwendet. (Mittelwert ± SE; n=2/3); \*: p<0,05. Die Signifikanz bezieht sich auf die miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic neg, die als 1 definiert wurde.

Das direkte Zielgen p300 der miRNA-142-5p in NRVCMs konnte in dieser Arbeit mittels Western Blot Analyse bestätigt werden. Es konnte eine signifikante Runterregulation der relativen Expression von p300 durch die miRNA-142-5p beobachtet werden.

# 3.7 Cyclosporin A und Tacrolimus heben die NFAT-Aktivierung der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg auf

Es konnte in den C2C12-NFAT Zellen und in den Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die miRNA-142-5p eine wesentliche Rolle im Calcineurin-NFAT Signalweg spielt, da sie die NFAT-Aktivität signifikant hochreguliert. Cyclosporin A und Tacrolimus (FK506) sind Calcineurin-Hemmer, die zusammen mit den Immunophilinen Cyclophilin und FKBP binden. Dieser Komplex bindet und hemmt die Kalzium-abhängige Phosphatase Calcineurin, so dass die Bindung an NFAT blockiert ist. Der Einfluss der miRNA-142-5p auf den Calcineurin-NFAT untersucht werden durch die Signalweg sollte weiter Stimulation der beiden Calcineurin-Inhibitoren. In Abbildung 3–14 die NFAT-Aktivierung ist in Mausmuskelvorläuferzellen und Kardiomyozyten in Abhängigkeit von Cyclosporin A und FK506 dargestellt.



Abbildung 3–14: NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität nach Überexpression der miRNA-142-5p in Abhängigkeit von Cyclosporin A und FK506

Die C2C12-NFAT-Zellen wurden mit den ∆CnA, NFATc4 und Renilla Plasmiden und die NRVCMs wurden mit den Adenoviren Ad∆CnA, AdNFAT-luc, AdNFATc4 und AdRenilla inklusiv der miRVana™ miRNA Mimics behandelt. Die Stimulation erfolgte für 24 h mit Cyclosporin A (1,5 µM) und FK506 (1 µM). Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit 1 x Passiv Lyse Puffer geerntet und die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität im Photometer gemessen. A) NFAT-Aktivität in den C2C12-NFAT Zellen B) NFAT-Aktivität in den Kardiomyozyten. Der Quotient der Luziferase-Messwerte ist als relative NFAT-Aktivierung angegeben. RLE, relative Luziferaseeinheiten. Cyclo. A = Cyclosporin A; (Mittelwert ± SE; n=12); \*\*: p<0,001. Die Signifikanzen beziehen sich auf miR neg, die als 1 definiert wurden.

Die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität mit der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p zeigte in den C2C12-NFAT Zellen und in den Kardiomyozyten ohne die Calcineurin Inhibitoren einen signifikanten Anstieg. Durch die Zugabe von Cyclosporin A und FK506 für 24 h zu den Zellen, die mit der miRNA Mimic negativ als auch mit der miRNA Mimic 142-5p behandelt wurden, konnte eine deutliche Reduktion (< 60 - 80 %) der NFAT-Aktivierung beobachtet werden.

# 3.8 miRNA-142-5p verringert die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten

Der Calcineurin-NFAT Signalweg spielt eine wesentliche Rolle in der Induktion der pathologischen Herzhypertrophie (Frey et al., 2000b; Molkentin et al., 1998; Taigen et al., 2000). Die myokardiale Hypertrophie stellt zunächst einen Kompensationsmechanismus dar, der die gesteigerte Druckbelastung der Ventrikelwand normalisiert. Eine anhaltende

Herzhypertrophie korreliert jedoch mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und dem plötzlichen Herztod. Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert NFAT, das in den Zellkern transferiert und dort ein pro-hypertrophes Genprogramm initiiert. Substanzen, wie Phenylephrin (PE), bewirken einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und somit die Induktion einer Hypertrophie. PE ist ein Sympathomimetikum und wirkt als Agonist am a1-Adrenozeptor. Es ist bekannt, dass PE im Herzen den Calcineurin-NFAT-Signalweg aktiviert (Taigen et al., 2000). Das hypertrophe Genprogramm kann mithilfe einer Multiplex qRT-PCR gemessen werden. Zu den Hypertrophie-assoziierten Genen zählen unter anderem Nppa, Nppb und Rcan1-4. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die miRVana™ miRNA Mimic 142-5p die NFAT-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg hochreguliert, sollte nun ihr Einfluss auf die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten mithilfe der Expression der Hypertrophie-assoziierten Gene und der Zellgröße untersucht werden. Zu beachten war bei der Zellgrößenbestimmung, dass die Kardiomyozyten einen Zellkern besaßen und keinen Zell-Zell Kontakt hatten. Es wurden die Zellen ausgewählt, die größer als 100 µm<sup>2</sup> und kleiner als 3000 µm<sup>2</sup> waren. In Abbildung 3–15 ist die Expression der hypertrophen Genmarker Nppa, Nppb und Rcan1-4 und das Ergebnis der Zellgröße mit und ohne PE bzw. Überexpression der miRNA-142-5p dargestellt.



#### Abbildung 3–15: Messung des hypertrophen Genprogrammes und der Zellgröße

Die NRVCM wurden mit der miRVana<sup>™</sup> miRNA Mimic 142-5p behandelt. Für die Hypertrophie-Messung war eine 6-Well-Platte und für die Zellgrößenbestimmung war eine 12-Well-Platte, welche mit Deckgläschen bedeckt waren, verwendet worden. Die Stimulation von Phenylephrin erfolgte 24 h nach Transfektion mit je 100 µmol/Well bzw. 150 µmol/Well für weitere 48 h. Die Ernte in der 6-Well-Platte erfolgte mit Trizol, die anschließend aufgearbeitet und mithilfe der Multiplex qRT-PCR gemessen werden konnte. Die NRVCM auf den 12-Well-Platten wurden fixiert, mit dem anti-Maus-α-Actinin und dem anti-Maus-Cy3 gekoppelten Antikörper behandelt und unter Mikroskop fotographiert und analysiert. A), B), C) Expression der Genmarker Nppa, Nppb und Rcan1-4 mit und ohne PE bzw. Überexpression der miRNA-142-5p (Mittelwert ± SE; n=12; Hypertrophes Genprogramm); D) Zellgröße mit und ohne PE bzw. Überexpression der miRNA-142-5p (Mittelwert ± SE; n=2128; Zellgrößenmessung); \*\*: p<0,001; \*: p<0,05. Die Signifikanzen beziehen sich auf miR neg, der als 1 definiert wurde.

Es konnte eine signifikante Induktion der relativen Expression mit PE für Nppa, Nppb und Rcan1-4 gezeigt werden. Diese Induktion der Expression durch PE war für alle drei

untersuchten Hypertrophie-assoziierten Gene signifikant verringert bei Überexpression der miRNA-142-5p. Das Resultat konnte ebenfalls bei der Bestimmung der Zellgröße beobachtet werden. Die NRVCM Zellen mit Überexpression der miRNA-142-5p waren mit und ohne PE Stimulation signifikant kleiner im Vergleich zu Zellen ohne miRNA-142-5p Überexpression.

# 3.9 Transgene miRNA-142 Mauslinien zeigen eine ausgeprägte Kardiomyopathie

Die transgenen miRNA-142 Mauslinien wurden zur Untersuchung von kardiovaskulären Signalwegen generiert. Zur Klonierung der kardialen Überexpression wurde der pBS SKII+ $\alpha$ -MHC Flag hGH1 Vektor eingesetzt, der ein Fragment des  $\beta$ -MHC Promotors sowie einen  $\alpha$ -MHC-Promotor enthält (Gulick et al., 1991; Subramaniam et al., 1991). Zudem enthält der Vektor einen Flag-Taq und eine Multiple Cloning Site (MCS). Eine weitere Modifikation stellt eine Kassette mit der Sequenz für einen Poly-A-Tail aus dem "human Growth Hormone" (hGH) dar. Die miRNA-142 Primer wurden mit einer Sal I und einer Hind III Schnittstelle designt und über diese Schnittstellen in den modifizierte pBS SKII +  $\alpha$ -MHC Flag hGH1 Vektor eingebracht (siehe Abbildung 3–16). Das entstandene Konstrukt wurde anschließend mit dem Enzym Not I-HF geschnitten.



#### Abbildung 3–16: Schematische Darstellung des miRNA-142 Konstruktes

Dargestellt ist der schematische Aufbau des miRNA-142 Konstruktes, welches für die Mikroinjektion eingesetzt wurde. Dieses beinhaltet ein Fragment des  $\beta$ -MHC Promotors, den  $\alpha$ -MHC-Promotor, das miRNA-142 Konstrukt, einen Flag-Taq und eine Kassette mit der Sequenz für einen Poly-A-Tail aus dem "human Growth Hormone" (hGH).

Das geschnittene aufgereinigte DNA Konstrukt mit der miRNA-142, das ein 400 bp großes Fragment im Agarosegel zeigte, wurde an die Biomedizinische Forschungseinrichtung nach Heidelberg geschickt. Dort erfolgte die Mikroinjektion der DNA in die befruchteten Eizellen. Nach der Mikroinjektion der DNA in einzellige Embryonen überlebten 50 Mäuse. Aus der Schwanzbiopsie konnte die genomische DNA isoliert werden, die auf die Integration der miRNA-142 überprüft wurde. Mittels PCR wurde die hGH-Poly-A-Tail-Kassette mit den Primern hGH-Poly-A-5' sowie hGH-Poly-A-3' kontrolliert. Insgesamt wiesen vier Tiere die Integration der miRNA-142 auf, welche in Abbildung 3–17 im Agarosegel dargestellt sind.



1.	Founder 801.1
2.	Founder 802.1
3.	Founder 809.5
4.	Founder 810.1

Abbildung 3–17: Nachweis der Integration der hGH-Poly-A-Tail-Kassette in den vier Foundern Aus den 50 Mausschwanzbiopsien wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR überprüft. Es konnten vier Founder (801.1, 802.1, 809.5 und 810.1), die die hGH-Poly-A-Tail-Kassette beinhalteten, generiert werden. Diese zeigten auf dem Agarosegel eine Fragmentgröße bei 400 bp. Als endogene Kontrolle wurde 18S rRNA verwendet, die eine Fragmentgröße bei 120 bp zeigte.

Untergebracht wurden die transgenen miRNA-142 Mauslinien in der Zentralen Tierhaltung (ZTH) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel in individuell belüfteten Käfigen (IVC). Zwei weibliche und zwei männliche Founder konnten generiert werden und wurden in der ZTH mit den C57BL6/N Wildtyp-Mäusen (WT) verpaart.

Im Alter von 29 Wochen verstarb der Founder 802.1, der keine transgenen Nachkommen zur Welt brachte. Der Founder 810.1 verstarb im Alter von 37 Wochen, der drei positive F1-Generationen bekam. Diese waren auffällig klein im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp Jungtieren und verstarben im Alter von 6-8 Wochen, so dass eine Weiterzucht nicht möglich war. Der Founder 809.5 verstarb nach einem Jahr, der ebenfalls keine transgene Nachkommen zeugte. Der Founder 801.1 zeugte zwei positive F1-Generationen, die im Alter von 13 und 17 Wochen verstarben, so dass auch hier keine Weiterzucht der Mauslinie möglich war. In Abbildung 3–18 sind die Herzen von zwei Foundern und in Abbildung 3–19 sind die Herzen von zwei transgenen Tieren der F1-Generation zu sehen, die zum Zeitpunkt der Organentnahme bereits seit einigen Tagen tot waren. Diese wurden entnommen, fotographiert und durchgeschnitten. Zum Vergleich und als Kontrolle wurden gleichaltrige C57BL6/N Wildtyp Mäuse verwendet.



Abbildung 3–18: Vergleich der miRNA-142 Founder Herzen mit Wildtyp Herzen Die Herzen der beiden Founders wurden entnommen, fotographiert und quer durchgeschnitten. Um die Größe und Struktur der Herzen zu vergleichen wurden Wildtyp Mäuse im gleichaltrigen Alter getötet und die Herzen untersucht. A) und C) zeigen Wildtyp Herzen B) Founder Herz 810.1 und D) Founder Herz 809.5. (Maßstabsbalken 1 mm)

Zu erkennen war, dass die Herzen der transgenen miRNA-142 Founder deutlich größer und schwerer waren als die Herzen der Wildtyp Mäuse. Der Querschnitt vom Founder Herz 810.1 (B) zeigte eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), welches jedoch im Querschnitt vom Founder Herz 809.5 (D) nicht zu erkennen war. Hier entwickelte sich das Herz zu einer dilatative Kardiomyopathie (DCM). Bei der HCM ist der Herzmuskel nicht ausgeweitet, sondern die Dicke der Herzmuskulatur, genauer gesagt der linken Herzkammerwand, nimmt zu. Bei der DCM sind die Herzkammern (Ventrikel) erweitert (dilatiert), gleichzeitig ist der Herzmuskel zu schwach, um das Blut mit ausreichendem Druck in die Hauptschlagader zu pumpen. Der Effekt ähnelt dem einer Herzschwäche (Herzinsuffizienz). Irgendwann reicht die Pumpleistung des Herzens nicht mehr zur Versorgung der Körperorgane aus.



Abbildung 3–19: Vergleich der miRNA-142 Herzen der F1-Generation mit Wildtyp Herzen Die Herzen der transgenen Nachkommen wurden entnommen, fotographiert und quer durchgeschnitten. Um die Größe und Struktur der Herzen zu vergleichen wurden Wildtyp Mäuse im gleichaltrigen Alter getötet und die Herzen untersucht. E) zeigt ein Wildtyp Herz F) und G) zeigen die miRNA-142 Herzen der F1-Generation. (Maßstabsbalken 1 mm)

Die transgenen Nachkommen vom Founder 801.1 zeigten deutlich größere Herzen im Vergleich zum Wildtyp Herz. Zudem entwickelten die F1-Generationen schon im frühen Alter eine ausgeprägte dilatative Kardiomyopathie (DCM). Die rechte Herzwand war sehr dünn und fiel in sich zusammen und die linke Herzkammer zeigte eine vergrößerte Herzhöhle. In Abbildung 3–20 ist zudem eine HE-Färbung der transgenen miRNA-142 Herzen dargestellt im Vergleich zu einem Wildtyp Herz.



Abbildung 3–20: HE-Färbung der miRNA-142 Herzen im Vergleich zum Wildtyp Herz Das Herz eines Founders und eines transgenen Tiers der F1-Generation wurden entnommen und fotographiert. Als Kontrolle wurde ein C57BL6/N Wildtyp Maus Herz herangezogen. Für diese Herzen erfolgte eine HE-Färbung. A) Wildtyp Herz B) Founder Herz 809.5 C) F1-Generation Herz vom Founder 801.1 (Maßstabsbalken 100 µM)

Mit der HE-Färbung können verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden, wie zum Beispiel Zellkerne, endoplasmatisches Retikulum, Zellplasmaproteine, Mitochondrien und Kollagen. Bei den Herzen in Abbildung 3–20 können jedoch keine Aussagen über die Zellbestandteile der Schnitte gemacht werden, da diese transgenen Tiere zum Zeitpunkt der Organentnahme schon mehrere Tage tot und eingefroren waren. Letztendlich konnte mit der HE-Färbung die Histologie der Herzen besser betrachtet werden, die die Herzhöhlen und die Herzkammerwand deutlich sichtbar machen.

# 3.10 Morphometrie und Expressionsanalysen der transgenen miRNA-142 Mäuse

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die transgenen miRNA-142 Mäuse einen ausgeprägten Phänotyp im Herzen aufweisen. Sowohl die Founder als auch die Tiere der F1-Generation starben innerhalb kurzer Zeit mutmaßlich an einem plötzlichen Herztod. Zudem konnte beobachtet werden, dass alle Founder kaum transgene Nachkommen zeugten bzw. die miRNA-142 an die Keimbahn weitergaben, da hauptsächlich nur Wildtyp Geschwistermäuse entstanden. Eine Weiterzucht war in diesem Fall nicht möglich. Der Founder 801.1 wurde weiter im Verhältnis 1:3 mit C57BL6/N Wildtyp Mäusen verpaart. Es konnten erneut zwei transgene F1-Generationen und vier Wildtyp Geschwistermäuse genotypisiert werden. Im Alter von sechs Wochen wurden die insgesamt sechs Mäuse getötet, um die Expression der miRNA-142-5p zu untersuchen. Zudem wurde das Körpergewicht der Mäuse und die Organe Herz, linker Ventrikel, Tibia, Lunge, Leber und Milz entnommen und gewogen. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 3–4 dargestellt.

GT	KG [g]	HG [mg]	LV [mg]	Tibia [mm]	Lunge [mg]	Leber [mg]	Milz [mg]
WT 1	17,4	73,7	67,8	14,99	131,7	966,3	63,3
WT 2	17,2	74,0	63,8	14,89	141,4	673,3	66,1
WT 3	17,7	75,2	65,8	14,88	105,2	782,7	67,0
WT 4	18,0	81,2	66,4	15,01	122,0	812,2	56,1
TG 1	16,5	82,3	69,3	14,45	131,5	682,6	64,6
TG 2	16.7	89.2	75.8	14.72	118.2	765.3	69.0

Tabelle 3-4: Körpergewichte der miRNA-142 Mäuse und der entnommenen Organe

WT; Wildtyp, TG; Transgen, GT; Genotyp, KG; Körpergewicht, HG; Herzgewicht, LV; Linke Ventrikel

Das Körpergewicht der beiden transgenen Mäuse war leichter als bei den Wildtyp Geschwistermäusen. Die Herzen und der linke Ventrikel dagegen waren deutlich größer und schwerer im Gegensatz zu den Wildtyp Mäusen. Zudem konnte beobachtet werden, dass die transgenen miRNA-142 Mäuse kleiner waren, was sich durch die Messung der Tibialänge bestätigen ließ. Die Lunge, die Leber und die Milz zeigten keine auffälligen Unterschiede im Gewicht zu den Wildtyp Mäusen. Die Überexpression der miRNA-142-5p der transgenen Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Geschwistermäusen wurde mittels qRT-PCR quantifiziert, die in Abbildung 3–21 dargestellt ist.



Abbildung 3–21: Überexpression der miRNA-142-5p in den transgenen Mauslinien Die zwei transgenen Nachkommen und die vier Wildtyp Geschwistermäuse wurden getötet und die Organe entnommen. Aus den Herzen wurde die RNA isoliert und mittels qRT-PCR quantifiziert. Als endogene Kontrolle wurde der U6 miScript Primer Assay verwendet. Die relative Expression der Wildtyp Mäuse wurde als 1 definiert; \*\*: p<0,001.

Bei der transgenen Maus 1 (TG1) war eine 62-fache und bei der transgenen Maus 2 (TG2) war eine 86-fache Überexpression (p<0,001) gegenüber den Wildtyp Mäusen zu beobachten. Um die biologischen Effekte der Überexpression der miRNA-142-5p zu evaluieren, wurden morphometrische Daten der transgenen Mäuse mit ihren Wildtyp Geschwistertieren hinsichtlich des Körpergewichts und Herzgewichts und den Quotienten aus Herzgewicht bzw. Gewicht des linken Ventrikels versus Körpergewicht und Herzgewicht versus Tibialänge verglichen (siehe Abbildung 3–22).



Abbildung 3–22: Morphometrische Daten der transgenen miRNA-142 Mauslinien Die Körpergewichte und Herzgewichte der beiden transgenen Mäuse wurden mit den Wildtyp Mäusen verglichen. Des Weiteren erfolgte die Analyse der Ratio von Herzgewicht bzw. Gewicht des linken Ventrikels versus Körpergewicht und der Ratio vom Herzgewicht versus Tibialänge. A) Körpergewicht B) Herzgewicht C) Ratio aus Herz- und Körpergewicht F) Ratio aus Linksventrikel- und Körpergewicht und E) Ratio aus Herzgewicht und Tibialänge der transgenen miRNA-142 Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Geschwistermäusen; \*: p<0,05. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Wildtyp (WT).

Im Hinblick auf das Körpergewicht war der Unterschied zwischen den transgenen miRNA-142 Mäuse und ihren Wildtyp Geschwistertieren signifikant, da diese leichter waren. Das Herzgewicht unterschied sich ebenfalls signifikant von den Wildtyp Geschwistermäusen, da die Herzen der transgenen Tiere schwerer waren. Auch der Quotient aus Herzgewicht bzw. Gewicht des linken Ventrikels versus Körpergewicht der transgenen Mäuse als auch der Quotient aus Herzgewicht und Tibialänge zeigte einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen.

Um einen Einfluss der kardialen Überexpression der miRNA-142 auf molekularer Ebene nachzuweisen, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Dazu wurde das Expressionsniveau von Vertretern des hypertrophen Genprogramms in den beiden transgenen Nachkommen und ihren vier Wildtyp Geschwistertieren untersucht. Die Daten sind in Abbildung 3–23 dargestellt.



Abbildung 3–23: Expressionsniveau der kardialen hypertrophen Genmarker Nppa, Nppb und Rcan1-4

Aus den Herzen der sechs Mäuse wurde RNA isoliert. Die Expression der kardialen hypertrophen Genmarker Nppa, Nppb und Rcan1-4 konnte mittels der Multiplex qRT-PCR gemessen werden. Als endogene Kontrolle wurde Rpl32 verwendet. Die relative Expression der Wildtyp Geschwistermäuse wurde als 1 definiert. Expression der Genmarker A) Nppa B) Nppb und C) Rcan1-4 in den transgenen miRNA-142 Nachkommen (TG1 und TG2); \*\*: p<0,001; \*: p<0,05. Die Signifikanzen beziehen sich auf WT.

Die relative Expression von Nppa in den transgenen Mäusen 1 und 2 (TG1 und TG2) zeigte eine 23-fache und von Nppb eine 3-fache signifikante Induktion im Vergleich zu den Wildtyp Geschwistermäusen. Auch bei dem Genmarker Rcan1-4 konnte eine 1,5-2-fach erhöhte Induktion ermittelt werden. Um weitere Analysen durchzuführen und die Ergebnisse zu bestätigen, wäre es nötig gewesen mehr transgene Nachkommen der miRNA-142 Mauslinien zu untersuchen, die jedoch leider nicht zur Verfügung standen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die transgenen miRNA-142 Mäuse klein und leicht waren, die Herzen dagegen groß und schwer im Vergleich zu den Wildtyp Geschwistermäusen. Aufgefallen ist zudem, dass die transgenen F1-Generationen innerhalb kurzer Zeit starben. Aufgrund der schnellen Sterberate der Tiere, insbesondere der positiven Nachkommen, war eine Weiterzucht nicht möglich. Demzufolge würde als Alternative ein anderes Mausmodell in Frage kommen, wie das Tet-On/Off System. Hierbei kann das Gen in Anwesenheit von Tetrazyklin an- bzw. ausgeschaltet werden. Damit könnten weitere Analysen *in vivo* durchgeführt werden und die Funktion der miRNA-142 besser verstanden werden.

## 4 Diskussion

Eine Hypertrophie des Herzens kann durch eine Vielzahl von Signalwegen induziert werden, welche durch mechanischen Stimulus oder Bindung von Liganden an der Zelloberfläche zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasen und Phosphatasen, wie der zyklischen AMP-abhängigen Proteinkinase A, der Proteinkinase C, der Proteinkinase D, der Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen, der Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin abhängigen Proteinkinase II und der Kalzium-abhängigen Phosphatase Calcineurin führen (Frey et al., 2004b; Heineke&Molkentin, 2006; Molkentin et al., 1998). Unter anderem erhöhen diese aktivierten Signalwege die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, der eine entscheidende Relevanz bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie zugesprochen wird (Frey et al., 2000a). Dabei kommt es auf zellulärer Ebene zur Vergrößerung des Herzens durch eine Volumenzunahme der Kardiomyozyten bei gleichbleibender Zellzahl, zur Erhöhung der RNA- und Proteinsynthese und zur Veränderung in der Genexpression (Sugden&Clerk, 1998).

Der Calcineurin-NFAT Signalweg ist eine gut beschriebene Signalkette, die nach biochemischen Stress zur Hypertrophie-Induktion führt (Frey et al., 2004b; Frey&Olson, 2003; Molkentin et al., 1998; van Berlo et al., 2013). Calcineurin ist eine Kalzium-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase, die als ein pro-hypertropher Signalmodulator fungiert (Molkentin et al., 1998). Diese wird durch einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel und Calmodulin aktiviert (Liu, 2009; Wilkins&Molkentin, 2004) und führt zur Dephosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells). Durch transferiert NFAT in den Zellkern die Dephosphorylierung und bindet an Transkriptionsfaktoren. Es kommt zur Aktivierung einer Reihe von pro-hypertrophen Genen und zur Veränderung der Genexpression (Hogan et al., 2003; Wilkins et al., 2004; Wilkins&Molkentin, 2004).

In den letzten Jahrzehnten brachte der Fortschritt auf dem Gebiet der micro-RNAs (miRNAs) einen bemerkenswerten wissenschaftlichen Durchbruch. MiRNAs sind sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen des Kardiovaskularsystems beteiligt und spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der kardialen Hypertrophie (siehe Abschnitt 1.6). Zu den bekanntesten miRNAs, die in die Herzhypertrophie involviert sind, zählen die miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133, miRNA-195 und die miRNA-208. Diese konnten durch verschiedene Tiermodelle bestätigt werden, welche im Abschnitt 1.6 zusammengefasst sind (Care et al., 2007; Dong et al., 2010; Thum et al., 2007; van Rooij&Olson, 2007; van Rooij et al., 2007; Zhao et al., 2007). Weitere miRNAs, die im Herzmuskel vorkommen sind let-7, miRNA-26a, miRNA-30c und die miRNA-126-3p (Lagos-Quintana et al., 2002; Wang et al., 2008). Zudem führt die Überexpression von speziellen miRNAs in kultivierten Kardiomyozyten zur Aktivierung von fetalen Genen und zu zellulärer Hypertrophie (Thum et al., 2007; van Rooij et al., 2006; Wang et al., 2008). Diese

Ergebnisse geben eine Vorahnung von der Abundanz der miRNA-gesteuerten Regulationswege im Herzen und der Vielfalt ihrer Effekte. Durch eine weitere intensive Forschung auf diesem Gebiet können diese Zusammenhänge mit großer Wahrscheinlichkeit in Zukunft therapeutisch nutzbar gemacht werden.

Um weitere miRNAs in der kardialen Hypertrophie zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit nach alternativen miRNA Modulatoren des Calcineurin-NFAT Signalweges gesucht und deren Einfluss weiter analysiert. Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe "miRNA-Hochdurchsatz-Screens" ein genaueres Bild des Calcineurin-NFAT eines Signalweges und der resultierenden NFAT-Aktivierung zu schaffen. Hierbei sollten miRNAs gefunden werden, die eine Rolle bei der Regulation dieses Signalweges spielen. Dazu wurde eine murine stabile C2C12-NFAT Zelllinie (Myoblastenvorläuferzellen) verwandt, welche mit den Expressionsplasmiden NFATc4, dem konstitutiv aktiven Calcineurin ( $\Delta$ CnA) und pRL-TK (Renilla) als auch mit den jeweiligen miRNA Mimics und den miRNA LNA™ Inhibitoren in einer 96-Well-Zellkulturplatte transfiziert wurde. Mithilfe des Dual-Luziferase Assays konnte im Calcineurin-NFAT Signalweg die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität ermittelt und die Ergebnisse zusammengefasst werden (siehe Abschnitt 3.3 und 3.4). Durch die mehrfachen Luziferase-Messungen und der statistischen Analysen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zehn miRNAs in den Muskelvorläuferzellen identifiziert werden, die die NFAT-Aktivierung signifikant hoch- bzw. runterregulierten. Für diese zehn miRNAs wurden adenovirale miRNA Überexpressions-Konstrukte erstellt. So konnte der Einfluss der miRNA Modulatoren auf die NFAT-Aktivierung in den Kardiomyozyten überprüft und vergleichen werden. Letztendlich wurde die miRNA-142-5p für die weitere in vitro und in vivo Charakterisierung ausgewählt.

#### 4.1 Vor- und Nachteile der verwendeten Versuchskonfigurationen

Auf Grund der großen Anzahl an verschiedenen miRNAs, deren Einfluss auf den Calcineurin-NFAT Signalweg untersucht werden sollte, mussten die Versuchsparameter so gewählt werden, dass sowohl die Handhabung der insgesamt 1050 miRNA Mimics von Qiagen und 624 miRNA Inhibitoren von Exigon möglich war als auch die Qualität der Messdaten gegeben war. Die 96-Well-Zellkulturplatten waren besonders gut geeignet für "Hochdurchsatz-Screens", da diverse Firmen die vorgefertigten miRNAs ebenfalls in diesem Format anboten und die Handhabung und Qualität bei der Umfangmenge von miRNAs Die Wahl des "miRNAs-Screens" in der C2C12 gegeben war. murinen Myoblastenvorläuferzelllinie eignete sich aufgrund der kostengünstigen und reproduzierbaren Arbeitsweise und der Aufnahme von Plasmiden und miRNAs in das Zellinnere, was es

ermöglichte, die NFAT-Aktivierung zu untersuchen. Das Besondere an den C2C12 Zelllinien war, dass diese einen stabil transfizierten NFAT Response Luziferase Reporter (NFAT-Luc) enthielten (Frey et al., 2008), welcher durch das konstitutiv aktive Calcineurin (∆CnA) und das NFATc4 Plasmid aktiviert werden konnte. C2C12 ist eine Mausmuskelvorläuferzelllinie, die ursprünglich durch eine Quetschverletzung aus dem Muskelschenkel einer Maus gewonnen wurde, und charakteristische Eigenschaften von Myoblasten besitzt (Blau et al., 1983; Yaffe&Saxel, 1977). Ein Vorteil der stabilen C2C12-NFAT Zelllinie im Vergleich zu den Kardiomyozyten war, dass die Zellmenge für den "miRNA-Screen" in ausreichendem Maße zur Verfügung stand und eine langfristige Kultivierung möglich war. Wichtig war es in den Experimenten, dass die stabilen C2C12-Zellen sich nicht ausdifferenzierten, sondern die Eigenschaften der Myoblasten behielten. Im Gegensatz zu den adulten Kardiomyozyten können sich die Skelettmuskelzellen teilen und regenerieren. Ein gemeinsames Merkmal beider Zelltypen ist ihr quergestreiftes Erscheinungsbild, das durch die regelmäßige Anordnung von dünnen und dicken Filamenten in den kontraktilen Elementen, den Myofibrillen, hervorgerufen wird.

Die Wahl des Transfektionsreagenz für den "miRNA-Screen" fiel auf das Nanofectin siRNA. Mit diesem Reagenz konnte eine Transfektionseffizienz von nahezu 100 % erreicht werden. Zudem war in dieser Arbeit von großer Bedeutung, dass Nanofectin siRNA sowohl für Transfektionen mit Plasmiden und kleinen RNAs als auch für Kotransfektionen geeignet war. Ein MTT-Assay zeigte (siehe Abbildung 3–2), dass die Zellviabilität nach Behandlung mit dem Transfektionsmittel um 15 - 20 % sank. Dieses war noch im vertretbaren Rahmen für den "miRNA-Hochdurchsatz-Screen", da die Zellen durch die Transfektion einem hohen Stressfaktor ausgeliefert waren. Die Untersuchung benötigten der Menge der Plasmidkonzentrationen ( $\Delta$ CnA, NFATc4, Renilla), der miRNA Bibliotheken (Maus miScript miRNA Mimic V16.0 Bibliothek von Qiagen und miRCURY LNA™ Maus miRNA Inhibitor V12.0 Bibliothek von Exigon) und der Kontrollen (AllStar siRNA, miRCURY LNA™ miRNA Inhibitor und Firefly-Luziferase GL2 siRNA) in einer 96-Well Zellkulturplatte erfolgte durch eine Kotransfektion mithilfe eines Knockdowns (siehe Abbildung 3-1). Daraus schloss sich, dass sowohl die Kotransfektion als auch der Knockdown (< 80 %) in ausreichendem Maße "Screen" durchgeführt stattfand, so dass der werden konnte. Der "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" war in Primärzellen der neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten (NRVCM) nicht möglich, da die Handhabung und auch das kostenaufwändige Verfahren ein limitierendes Problem darstellten. Zudem enthielten die NRVCMs keinen stabil transfizierten Luziferase-Reporter, was die Durchführung eines "miRNA-Screen" erschwert hätte. Durch die Verwendung der Adenoviren Ad∆CnA, AdNFAT-luc, AdNFATc4, AdRenilla und der adenoviralen miRNA Konstrukte konnte der Calcineurin-NFAT Signalweg auf die NFAT-Aktivierung in den NRVCMs untersucht werden
(siehe Abbildung 3–6). Zur Quantifizierung der NFAT-Aktivierung des Hypertrophie-induzierten Signalweges wurde das Dual-Luziferase Reporter Assay System benutzt. Hierbei handelt es sich um ein Detektionssystem, das in abgewandelter Form für verschiedene Untersuchungen und vieler Signalwege verwendet werden kann (Alvarez, 2014; McNabb et al., 2005; Sekar&Veldhuis, 2001; Shan et al., 2009). Die Detektion der Luziferase-Aktivitäten wurde automatisiert in einem Platten-Photometer (Tecan) bei einer Intergrationszeit von 2500 ms durchgeführt. Das Dual-Luziferase Reportergen System basiert auf der Aktivierungsmessung der Firefly- und Renilla-Luziferase. Die Normalisierung der Firefly-Luziferase-Aktivität auf die Renilla-Luziferase-Aktivität dient dem Ausgleich experimenteller Schwankungen wie der Zellviabilität und der Transfektionseffizienz. Anhand dieser Aktivität konnten Aussagen über die NFAT-Aktivität des regulierten Signalweges gemacht werden. Die abschließende Überprüfung der Versuchskonfiguration zeigte, dass die Kombination der verwendeten Komponenten geeignet war, um Unterschiede in der NFAT-Aktivierung zu detektieren.

#### 4.2 Bewertung der Ergebnisse des "miRNA-Screens"

Der Einsatz eines "Hochdurchsatz-Screens" ist in der zellbiologischen Forschung als auch in zellulären Prozessen zu einem elementaren Werkzeug geworden, da zum einem genomweit tausende Gene bzw. Proteine überprüft und zum anderen eine systematische Untersuchung der Funktion einzelner Gene ermittelt werden können. Dabei ist die Zuverlässigkeit der Auswertung eines "Hochdurchsatz-Screens" abhängig von der Beurteilung der Robustheit und der anschließenden Datenanalyse und Qualität der verwendeten Komponenten. Alle anfallenden Daten der Messungen wurden statistisch analysiert, um geeignete miRNA Modulatoren zu finden. Um systematische Fehler, die durch die Messmethode zum Beispiel bei der Lumineszenz-Reaktion entstehen, zu beseitigen, wird die Methode der Datennormalisierung angewendet. So sollte sichergestellt werden, dass die Expressionsunterschiede einen biologischen Ursprung haben und nicht durch systematische Effekte hervorgerufen wurden. Die normalisierten Messwerte ermöglichten es, die Qualität der Daten zu kontrollieren. Zur statistischen Auswertung der ersten Luziferase-Messung wurde der Median aller Messwerte der jeweiligen 96-Well-Platte (exklusive der Kontrollen) und die Wahl der Perzentile von 10 % - 90 % herangezogen. So kamen alle Messpunkte die in diesem Bereich der Perzentile lagen, als geeigneter Modulator in Frage. Um eine weitere Verminderung der Zahl an Modulatoren zu erzielen, wurde eine erneute Luziferase-Messung durchgeführt. Dieser wurde exakt durchgeführt wie die erste Luziferase-Messung, mit dem Unterschied, dass nur noch die selektierten Modulatoren von der ersten Messung in mehreren Replikaten eingesetzt wurden, wobei die statistische Auswertung dieselbe war.

Zudem kam noch der p-Wert (< 0,05) in Betracht, der durch einen t-Test berechnet wurde. Durch zwei weitere Luziferase-Messungen mit den nach und nach ausgewählten Modulatoren und den statistischen Analysen, die als signifikant bewertet waren (p<0,001), blieben bis am Schluss der Überprüfung noch zehn miRNA Mimics übrig.

#### 4.2.1 Identifizierung und Bedeutung der miRNA Modulatoren

Ziel des "miRNA-Screens" war es, neue Modulatoren des Calcineurin-NFAT-Signalweges in einer stabilen murinen Myoblastenvorläuferzelllinie zu identifizieren und zu analysieren. Der Calcineurin-NFAT Signalweg hat eine zentrale Bedeutung für die kardiale Hypertrophie-Reaktion (Frey et al., 2004b; Frey&Olson, 2003; Molkentin et al., 1998; van Berlo et al., 2013). Ziel ist es, ein besseres Verständnis der komplexen Regulation der Aktivierung und Inhibition dieses Signalweges zu entwickeln, um eine therapeutische Anwendung abzuleiten. MiRNAs spielen eine zentrale Rolle bei diversen Krebserkrankungen, bei der Zelldifferenzierung und Skelettmuskelentwicklung, beim Zellzyklus und Zelltod als auch bei der Herzentwicklung und Herzfunktion, die durch die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression gesteuert werden (Brennecke et al., 2003; Ge&Chen, 2011; lorio&Croce, 2012; Jeong et al., 2012; Vasudevan et al., 2008; Xu et al., 2003). In Abbildung 3–5 sind nach Durchführung der statistischen Analysen zehn miRNA Mimics als Modulatoren im Calcineurin-NFAT Signalweg dargestellt, wobei sechs miRNAs die NFAT-Aktivität hochregulierten und vier miRNAs die NFAT-Aktivität runterregulierten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende miRNAs als Modulatoren des Calcineurin-NFAT Signalweges in der stabilen murinen Myoblastenvorläuferzelllinie (C2C12-NFAT) identifiziert werden: Diese umfassen die miRNA-133b, miRNA-142-5p, miRNA-196a-1\*, miRNA-432, miRNA-669a-3-3p, miRNA-883b-5p, miRNA-3059, miRNA-3067\*, miRNA-3070a\*/b-5p und die miRNA-3105-5p. Darüber hinaus wurde überprüft, ob ähnliche Resultate in einem anderen Zellsystem beobachtet werden konnten. Die Wahl fiel auf die Primärkultur der neonatalen Rattenkardiomyozyten. Dafür wurden für die jeweiligen miRNAs Adenovirale-Konstrukte hergestellt. Fünf der acht miRNA Adenoviren wurden letztendlich als Modulatoren des Calcineurin-NFAT Signalweges abhängigen NFAT-Aktivierung erkannt (siehe Abbildung 3-6). Diese miRNA Modulatoren unterschieden sich im Vergleich zu den Luziferase-Messungen in der Myoblastenvorläuferzelllinie. Zwei miRNAs zeigten die entgegengesetzte Modulation der NFAT-Aktivierung und drei miRNA Modulatoren den gleichen Einfluss der NFAT-Aktivität auf den Calcineurin-NFAT Signalweg. Bei drei weiteren miRNA Modulatoren der insgesamt acht miRNAs konnte in NRVCMs kein Einfluss der NFAT-Reportergen-Aktivität nachgewiesen werden. Dies kann eine Reihe von Ursachen haben:

- Die Wahl des Zellsystems könnte eine Ursache für die unterschiedliche Modulation sein. Da miRNAs Auswirkungen auf hunderte Gentranskripte (Selbach et al., 2008) haben, die unterschiedlich in verschiedenen Zellsystemen exprimiert sind, kann die miRNA möglicherweise ganze Prozessveränderungen durch eine Regulation mehrerer Zielgene unterdrücken, was zu einer anderen Modulation führen kann.
- Adenoviren sind f
  ür den Gentransfer in den Kardiomyozyten gut geeignet, da sie eine hohe Expressionseffizienz im Zellkern aufweisen (Volpers&Kochanek, 2004). Findet jedoch keine ausreichende adenoviralen Überexpression statt, kann dies dazu f
  ühren, dass keine Genregulation in der Zelle nachgewiesen werden kann.
- 3. Datenanalysen und statistische Auswertungen von "Hochdurchsatz-Screens" spielen eine entscheidende Rolle (Pu et al., 2012), die durch viele Faktoren beeinflusst werden. Mittels Normalisierungen, basierend auf den Daten und der Gesamtverteilung (Median), durch Wiederholungsmessungen, der Daten Qualitätskontrollen und Qualitätsparameter, der Wahl der Streuung einer statistischen Verteilung (Perzentile) und der Wahl des Signifikanzwertes (p-Wert) kann die Funktionalität eines "Screens" bewertet werden. Durch eine Veränderung der statistischen Auswertung für die qualitative Bewertung zum Beispiel durch eine andere Wahl der Streuung einer statistischen Verteilung oder der Wahl des Signifikanzwertes, wäre es möglich, weitere miRNAs zu selektieren, die den Calcineurin-NFAT Signalweg modulieren und diese durch Wiederholungsmessungen zu bestätigen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die verschiedenen miRNA Modulatoren die NFAT-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg auf herz- und muskelspezifischer Ebene unterschiedlich beeinflussen.

Für die miRNA-133b konnte in der stabilen C2C12-NFAT Zelllinie gezeigt werden, dass die NFAT-Reportergen-Aktivität in dem Calcineurin-NFAT Signalweg signifikant erhöht wird. In den Kardiomyozyten war kein Einfluss der miRNA-133b auf die NFAT-Aktivität sichtbar. Man unterteilt die miRNA-133 in die miRNA-133a und die miRNA-133b, die sich um drei Nukleotide unterscheidet. Die miRNA-133a wird am Herzstärksten in und Skelettmuskelzellen exprimiert und die miRNA-133b wird ausschließlich in Skelettmuskelzellen exprimiert (Chen et al., 2006; Lagos-Quintana et al., 2002; Rao et al., 2006). Die miRNA-133 spielt eine bedeutende Rolle bei Krebserkrankungen, bei der kardialen Hypertrophie und bei der Skelettmuskelentwicklung (Bandres et al., 2006; Dong et al., 2010; Liu&Olson, 2010; Nohata et al., 2012; Rao et al., 2006; Townley-Tilson et al., 2010).

Für die miRNA-196a-1\* (auch miRNA-196a-1-3p genannt) konnte in der stabilen

C2C12-NFAT Zelllinie nachgewiesen werden, dass die NFAT-Reportergen-Aktivität in dem Calcineurin-NFAT Signalweg signifikant hochreguliert wird. In den Kardiomyozyten war kein signifikanter Einfluss der miR-196a-1\* auf die NFAT-Aktivität zu erkennen. Die miRNA-196a-1\* wird im Dickdarm und Niere exprimiert und spielt eine zentrale Rolle bei diversen Krebserkrankungen, unter anderem beim Bauchspeichelkrebs, Brustkrebs und Dickdarmkrebs (Bloomston et al., 2007; Hui et al., 2009; Schimanski et al., 2009; Wang et al., 2009). Für die miRNA-196a-1\* ist noch keine kardiale Funktion beschrieben worden, jedoch spielt die miRNA eine weitere wichtige Rolle in der mesenchymalen Stammzelldifferenzierung. Der Mechanismus der Zellproliferation und Differenzierung wurde erst vor kurzem aufgeklärt (Candini et al., 2015; Chen et al., 2011).

Die miRNA-432 zeigte nach der statistischen Auswertung, dass die NFAT-Reportergen-Aktivität in der stabilen C2C12-NFAT Zelllinie signifikant runterreguliert wird. In den Kardiomyozyten dagegen konnte beobachtet werden, dass die miRNA-432 die NFAT-Aktivität signifikant hochreguliert. Die miRNA-432 wird am stärksten im Herzen und im Skelettmuskel exprimiert. Es konnte in zwei Studien für die miRNA-432 nachgewiesen werden, dass diese eine bedeutende Rolle in Schweinemuskelzellen und in der myogenen Differenzierung spielt (Dmitriev et al., 2013; McDaneld et al., 2009).

Sowohl für die miRNA-669a-3-3p als auch für die miRNA-3059 konnte gezeigt werden, dass die NFAT-Reportergen-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg in der stabilen C2C12-NFAT Zelllinie als auch in den Kardiomyozyten signifikant runtermoduliert wird. Die miRNA-669 ist eine komplexe miRNA, die in Form von Zahlen in unterschiedliche Vorläufer-Sequenzen und genomische Loci kennzeichnet. Die miRNA-669a wird am stärksten im Gehirn, aber auch im Herz, Skelettmuskel als auch im Uterus stark exprimiert. Literaturrecherchen zeigen, dass die miRNA-669a eine entscheidende Rolle bei der Skelettmuskeldifferenzierung von kardialen Vorläuferzellen und bei der dilatativen Kardiomyopathie in dystrophen Mäusen spielt (Crippa et al., 2011; Quattrocelli et al., 2013).

Bisher sind für die miRNA-883b-5p, die miRNA-3059, die miRNA-3067\*, die miRNA-3070a\*/b-5p und für die miRNA-3105-5p keine kardialen Funktionen beschrieben, da sie zu den neuen miRNA Entdeckungen zählen und deren Funktion noch nicht untersucht wurde. Alle miRNA-Sequenzen und Gen-Nomenklaturen als auch die miRNA Annotationen sind in der Datenbank "miRBase" dargestellt, die durch "Deep-Sequencing" Technologie zu einem Anstieg neuer miRNA Entdeckungen führten (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara&Griffiths-Jones, 2011).

Die miRNA-883b-5p zeigte nach der statistischen Auswertung, dass die NFAT-Reportergen-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg signifikant runterreguliert wird. Für die Analyse der NFAT-Aktivität in den Kardiomyozyten konnte kein Adenovirus hergestellt werden, so dass diese außer Betracht gelassen wurden. Am stärksten wird die

miRNA-883b-5p im Herzen, im Skelettmuskel und im Gehirn exprimiert. Eine zentrale Rolle der miRNA konnte in Stoffwechsel- und in Entzündungsprozessen nachgewiesen werden (Ge et al., 2012).

Auch konnte für die miRNA-3067\* (ebenfalls miRNA-3067-3p genannt) kein Adenovirus hergestellt werden, so dass diese ebenfalls außer Betracht gelassen wurde. In der stabilen C2C12-NFAT Zelllinie war die NFAT-Reportergen-Aktivität der miRNA-3067\* signifikant hochreguliert.

Für die miRNA-3070a\*/b-5p (auch-3070a-5p/b-5p genannt) konnte gezeigt werden, dass die NFAT-Reportergen-Aktivität in den stabilen C2C12-NFAT Zellen signifikant hochreguliert wird, während in den Kardiomyozyten die NFAT-Aktivität signifikant runtermoduliert wird. Am stärksten wird die miRNA-3070a\*/b-5p im Gehirn, im Herzen, im Skelettmuskel und in der Niere exprimiert.

Die statistische Analyse der miRNA-3105-5p zeigte, dass die NFAT-Reportergen-Aktivität signifikant hochmoduliert wird, was in den Kardiomyozyten nicht bestätigt werden konnte. In den Kardiomyozyten war kein Einfluss der miRNA-3105-5p auf die NFAT-Aktivität sichtbar. Die miRNA-3105-5p ist am stärksten in der Niere und in der Leber exprimiert.

Für die miRNA-142-5p konnte nachgewiesen werden, dass die NFAT-Reportergen-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg sowohl in der stabilen C2C12-NFAT Zelllinie als auch in den Kardiomyozyten signifikant hochmoduliert wird. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese miRNA der einzige Modulator war, welcher den gleichen Einfluss der NFAT-Aktivität in beiden Zellsystemen aufwies. Dabei unterteilt man die miRNA-142 in die miRNA-142-3p (vom 3'Arm) und in die miRNA-142-5p (vom 5'Arm). In Studien konnte für die miRNA-142-3p eine entscheidende Rolle im Herzen nachgewiesen werden (Jeong et al., 2012; Nishiyama et al., 2012; Voellenkle et al., 2010), was die miRNA-142-5p zu einem interessanten Modulator macht. Die miRNA-142-5p wird am stärksten in der Milz und im Herzen exprimiert (siehe Abbildung 3–7). Aufgrund der beschriebenen Tatsachen fiel die Wahl für weitere Charakterisierungen und ein *in vivo* Modell auf die miRNA-142-5p.

### 4.3 Die funktionelle Bedeutung der miRNA-142

#### 4.3.1 Aufklärung der miRNA-142-3p und der miRNA-142-5p

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die miRNA-142-5p die NFAT-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg in den C2C12-NFAT Zellen und in den NRVCM signifikant hochreguliert. Das deutet daraufhin, dass diese miRNA eine wichtige Rolle in dem Calcineurin-NFAT Signalweg spielt, dem eine bedeutende Funktion bei der

Hypertrophie-Induktion zugeschrieben wird (Frey et al., 2004b; Frey&Olson, 2003; Molkentin et al., 1998; van Berlo et al., 2013). Die Familie der miRNA-142 besteht aus der miRNA-142-3p und der miRNA-142-5p. Im Unterschied zu den meisten anderen miRNAs können von der miRNA-142 beide Stränge der reifen miRNAs nachgewiesen werden (Kasashima et al., 2004). Das Gen der miRNA-142 liegt beim Menschen auf Chromosom 17, in der Maus auf Chromosom 11 und in der Ratte auf Chromosom 10. Die höchste Expression der miRNA-142-5p in unterschiedlichen Mausgewebeproben war in der Milz zu sehen. Das Herz zeigte eine höhere Expression als die Skelettmuskulatur und im Gehirn, in der Niere und im Uterus war die niedrigste Expression zu beobachten (siehe Abbildung 3-7). Chen et al. beschreiben die Expression der miRNA-142 hauptsächlich in hämatopoetischen Geweben (Thymus, Milz und Knochenmark). Innerhalb der Blutzellen zeigen B-Zellen und myeloische Zellen die höchste Expression (Chen et al., 2004). Diese Ergebnisse wurden von Landgraf et al. unterstützt, welche die miRNA-142 als eine von fünf miRNAs identifizierten, die spezifisch für hämatopoetische Zellen sind (Landgraf et al., 2007). Zudem hat die miRNA-142 weitere Funktionen bei der Regulation von T-Zell-Antworten und im B-Zell-Lymphom, und ist ein Regulator der murinen dendritischen Zell-Homöostase (Kwanhian et al., 2012; Mildner et al., 2013; Sun et al., 2015). Auch konnten Jin et al. zeigen, dass die miRNA-142-3p die hämatopoetischen Stammzellen aus dem peripherem Blut regulieren (Jin et al., 2008). Die miRNA-142-3p spielt eine entscheidende Rolle bei Krebserkrankungen. Ghanbari et al. zeigten mithilfe eines Microarrays, dass die miRNA-142-3p im Plasmablut von Darmkrebs-Patienten reguliert wird und als neue nicht-invasive Biomarker für die Diagnose von Darmkrebs dienen könnten (Ghanbari et al., 2015). Im Nasopharynxkarzinom konnten Qi et al. nachweisen, dass durch einen Knockdown der miRNA-142-3p die Zellproliferation und die Zellzyklusprogression in vitro signifikant inhibiert wird, und das Tumorwachstum in einem Mausmodell unterdrückt wird (Qi et al., 2015). Auch beim Gebärmutterhalskrebs, beim Ovarienkrebs und beim Leberkrebs konnte eine Regulation der miRNA-142-3p beobachtet werden (Chai et al., 2014; Deng et al., 2015; Wu et al., 2015). Des Weiteren spielt die miRNA-142-3p eine zentrale Rolle im Herzen. Jeong et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass durch eine Überexpression der miRNA-142-3p die PE-induzierte Hypertrophie in neonatalen Kardiomyozyten aufgehoben wird, welche durch die Messung der Zellgröße und der fetalen Genmarker bestimmt werden konnte. Demnach reguliert diese miRNA negativ die Herzhypertrophie, was als potentielle therapeutische Behandlung von Herzerkrankungen von Bedeutung sein könnte (Jeong et al., 2012). In einem Zebrafisch Modell beschreiben Nishiyama et al., dass ein Knockdown der miRNA-142-3p zu einem Verlust der Blutbildung während der Embryonalentwicklung führt und einen ungewöhnlichen Phänotyp im Herzen aufweisen. Im frühen Entwicklungsstadium konnte ein kleines Herz, kontraktile Dysfunktion in der Herzkammer, Herzrhythmusstörungen und Bradykardie beobachtet werden (Nishiyama

et al., 2012). Zudem konnten Voellenkle et al. in ihrer Studie mit peripheren mononukleären Blutzellen von chronisch herzkranken Patienten zeigen, dass die miRNA-142-3p signifikant bei NIDCM-Patienten (Non-Ischemic Dilated Cardiomyopathy) hochreguliert wird und signifikant bei ICM-Patienten (Ischemic Cardiomyopathy) runterreguliert wird, welches durch die quantitative Real-Time-PCR bestätigt werden konnte (Voellenkle et al., 2010). Mittlerweile konnten weitere Literaturdaten der miRNA-142-3p als Biomarker für Diagnosen von dilatativer Kardiomyopathie und Herzversagen bestätigt werden (Duong Van Huyen et al., 2014; Ellis et al., 2013; Nair et al., 2013).

Wie auch die miRNA-142-3p spielt die miRNA-142-5p eine entscheidende Rolle bei Krebserkrankungen. Liu et al. konnten nachweisen, dass die miRNA-142-5p signifikant Lungenkrebs-Zellenwachstum beim Menschen und Mäusen unterdrückt, welches Sempere et al. ebenfalls in Lungenkrebszelllinien zeigen konnten. Die Expression der miRNA-142-5p zeigte eine deutliche Verminderung der Proliferation beim Lungenkrebs (Liu et al., 2009; al., 2009). Sempere et Sowohl bei pädiatrischen Hirntumoren, beim Magenschleimhaut-Gewebe und Magenkrebs als auch beim Darmund Bauchspeicheldrüsenkrebs konnte eine Regulation der miRNA-142-5p beobachtet werden (Birks et al., 2011; Ohuchida et al., 2011; Saito et al., 2012; Xia et al., 2014; Zhang et al., 2011). Des Weiteren konnten Kee et al. nachweisen, dass BTG3 (B-cell Translocation Gene), ein direktes Zielgen der miRNA-142-5p, die Zellproliferation in vaskulären glatten Muskelzellen durch die Runterregulierung der Zellzyklusprogression inhibiert. Demnach fördert die miRNA-142-5p die Zellproliferation und die DNA-Synthese und reguliert die Expression der Zellzyklusgene in vaskulären glatten Muskelzellen (Kee et al., 2013). Auch konnte für die miRNA-142-5p eine Regulation in chronisch herzkranken Patienten beschrieben werden, wobei diese miRNA bei den NICDM- als auch bei den ICD-Patienten signifikant runterreguliert war (Voellenkle et al., 2010). Zudem konnten Slagsvold et al. durch einen Vergleich des linken und des rechten Vorhofmyokards bei Patienten mit Sinusrhythmus oder Herzflimmern zeigen, dass die miRNA-142-5p in die Regulation involviert ist, die durch die miRNA Expression mithilfe der quantitativen Real-Time-PCR und eines Microarrays analysiert werden konnte (Slagsvold et al., 2014). Neue Erkenntnisse beschreiben, dass die miRNA-142-3p und miRNA-142-5p im Herzgewebe bei LVAD-Patienten (Left Ventricular Assist Device) moduliert werden (Barsanti et al., 2015) und zudem eine weitere Rolle bei der zellulären Abstoßung des Immunsystems von Transplantation besitzen (Van Aelst et al., 2015).

Ein bedeutendes Paper für diese Arbeit ist von Sharma et al., die in ihren Experimenten die Regulation und die mechanistische Rolle der miRNA-142 durch p300 (E1A Binding Protein), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) und gp130 (Interleukin 6 Signal Transducer, auch IL6ST genannt) während der adaptiven Hypertrophie erläutern (Sharma et al., 2012). Diese Studie zeigte, dass die miRNA-142-3p und die miRNA-142-5p durch serumhaltige Wachstumsfaktoren in kultivierten Herzmuskelzellen, in vivo Herzhypertrophie Mausmodellen und in menschlichen Kardiomyopathie Herzen signifikant runterreguliert werden. Die miRNA-142-3p und -5p werden während der Herzhypertrophie in vitro durch den Mechanismus von p300 und der MAP-Kinase-Aktivität herunterreguliert. Die Unterdrückung der miRNA-142 durch p300 und MAPK ist für das Überlebens-Signal über gp130 erforderlich (Sharma et al., 2012). Zudem konnten Sharma et al. zeigen, dass die miRNA-142 als ein Inhibitor des myokardialen Zytokin-Signalweges durch die Hemmung der gp130 Expression fungiert. Die Verhinderung der physiologischen Herunterregulation von miRNA-142 führt zur Depletion des Zytokin-vermittelten Überlebens-Signalweges sowie der Induktion von Apoptose und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz während des postnatalen Wachstums des Herzens. Die miRNA-142 hemmt sowohl den Uberlebens- und Wachstums-Signalweg durch die direkte Bindung der direkten Zielgene p300 und gp130 (Sharma et al., 2012). Weitere Funktionen der miRNA-142, die Sharma et al. beschreiben, sind die Regulation des Myozyten-Zytoskeletts, die Unterdrückung mehrere Komponenten des NF-kB Signalweges, die Verhinderung Zytokin-vermittelter NO-Produktion und die Blockierung der Translation von α-Actinin (Sharma et al., 2012). Auch in *in vivo* Experimenten zeigten Sharma et al., dass die miRNA-142-5p eine wichtige Rolle bei der Herzfunktion in Wildtypen und in einer p300 transgene Mauslinie spielt, die in dieser Arbeit bei dem in vivo miRNA-142 transgenen Mausmodell noch näher erläutert wird (siehe Abschnitt 4.4).

#### 4.3.2 Diskussion von potentiellen Zielgenen der miRNA-142-5p

MiRNAs regulieren die Expression von Genen durch Inhibition der Translation oder Degradation der mRNA. Um Zielgene für die miRNA-142-5p zu identifizieren, werden verschiedene Zielgenvorhersage-Programme, wie Targetscan (Lewis et al., 2003), Dianalab (Maragkakis et al., 2009), Microcosm (Griffiths-Jones et al., 2006), miRanda (John et al., 2004) und miRbd (Wang, 2008) verwendet. Diese Programme durchsuchen die 3`-UTR nach mehreren konservierten Regionen mit einer Komplementarität zu der entsprechenden miRNA. Diese sogenannte "Seed"-Sequenz ist für die Zielgen/miRNA Interaktion ausschlaggebend (Bartel, 2004; Doench&Sharp, 2004; Lewis et al., 2003; Rajewsky&Socci, 2004). Die vorhergesagten Gene der unterschiedlichen Programme können mit einem Venn-Diagramm (Kestler et al., 2005) untereinander verglichen und die überlappenden Zielgene notiert werden. Basierend auf Expressionsdaten im Herzen bzw. Muskel und mithilfe einer ausführlichen Literaturrecherche und der DAVID-Plattform (http://david.abcc.ncifcrf.gov/) konnten für die miRNA-142-5p insgesamt 13 potentielle Kandidatenzielgene für die experimentelle Validierung klassifiziert werden. Für die

experimentellen Überprüfungen bioinformatisch vorhergesagter Zielgen/miRNA Interaktionen haben sich Luziferase-basierte Reportergen Assays bewährt. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pmirGLO hat den Vorteil, dass die Reportergene Firefly und Renilla auf einem Plasmid vorhanden sind. Zudem wurde in dieser Arbeit auf miRNA Mimics zurückgegriffen, die im ausreichenden Maße eine Überexpression gewährleisteten (siehe Abbildung 3–9). Als zelluläres System wurde die C2C12-Zelllinie verwendet. Um die Funktion des Assays zu prüfen, wurde ein pmirGLO/142-5p match Konstrukt als Positiv-Kontrolle verwendet, der durch die Bindung an die miRNA-142-5p die relative Firefly-Luziferase Aktivität reduzieren sollte. In Abbildung 3–10 sind die Ergebnisse der 13 durchgeführten Zielgenvalidierungen mit den pmirGLO/3'UTR Konstrukten zusammengefasst. Dabei sollte der Einfluss der miRNA-142-5p auf die 3'UTR Bindestelle der jeweiligen Zielgene analysiert werden. Es konnte letztendlich von den 13 im Folgenden beschriebenen potentiellen Zielgenen kein direktes Zielgen der miRNA-142-5p in den C2C12 Zellen bestätigt werden.

ACTC1 (Actin, Alpha, Cardiac Muscle 1) gehört zu der Genfamilie Actin, die globuläre multifunktionale Proteine sind und Mikrofilamente bilden. Neben der klassischen Rolle bei der Muskelkontraktion spielt Actin eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen (Fedorova&Zink, 2008; Gunning et al., 2008). Des Weiteren konnte durch Studien in Mausmodellen und im Menschen nachgewiesen werden, dass durch die Mutation von Actin Herzerkrankungen verursacht werden (Bookwalter&Trybus, 2006; Kumar et al., 1997; Mogensen et al., 1999; Olson et al., 2000; Olson et al., 1998; Vikstrom et al., 1996).

ADAMTS1 (A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs 1) ist eine sezernierte Metalloproteinase, die eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von normalen und pathologischen Bedingungen (Cal al., 2002). ADAMTS1 spielt et ist ein Entzündungs-induziertes Gen, das beim Myokardinfarkt in Kardiomyozyten und in Endothelzellen an der Infarktzone induziert wird (Kuno et al., 1997; Nakamura et al., 2004). Auch in einem Mausmodell mit chronischer Myokarditis konnten Shen et al. zeigen, dass ADAMTS1 eine wichtige Rolle spielt (Shen et al., 2007).

ATP1B1 (ATPase, Na+/K+ Transporting, Beta 1 Polypeptide) gehört zu der Familie der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- und H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Beta-Ketten-Proteinen und zur Unterfamilie der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen. Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ATP1B1 ist für den Aufbau des elektrochemischen Gradienten von Na- und K-Ionen an der Plasmamembran verantwortlich (Lingrel&Kuntzweiler, 1994). Eine weitere wichtige Rolle spielt die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Konzentration bei Herzpatienten (Ishino et al., 1999; Norgaard et al., 1988; Schwinger et al., 2003; Schwinger et al., 1999). Auch im Mausmodell zeigte die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase eine wesentliche Rolle bei der Regulation der kardialen Kontraktilität (Barwe et al., 2009).

CAMTA1 (Calmodulin Binding Transcription Activator 1) und CAMTA2 sind Transkriptionsfaktoren, die beim Menschen und in der Maus im Herzen und im Gehirn exprimiert werden (Schwartz&Schneider, 2006). CAMTA2 spielt eine entscheidende Rolle als Aktivator im Herzwachstum und ist an der Transkriptions-Umprogrammierung der kardialen Genexpression beteiligt (Finkler et al., 2007). Die Funktion der Calmodulin-Bindung an CAMTA1 ist zurzeit noch unbekannt, die im Zytosol und/oder im Zellkern stattfinden kann.

CASK (Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase) ist ein Mitglied der membranassoziierten Guanylatkinase (MAGUK) Proteinfamilie. MAGUKs sind Gerüstproteine mit verknüpften interzellulären Verbindungen, die eine Rolle in der synaptischen Transmembranprotein Verankerung und beim Ionenkanal-Targeting haben (Leonoudakis et al., 2004a; Olsen et al., 2002). Eine weitere Rolle spielt CASK im Skelettmuskel und an an einer Vielzahl von Signalproteinen binden kann (Gardner et al., 2006; Leonoudakis et al., 2004b; Marble et al., 2005; Maximov et al., 1999).

IGF1 (Insulin-Like Growth Factor 1) ist ein Polypeptid, der strukturell dem Insulin ähnlich ist und als Wachstumsfaktor wirkt. Das körpereigen wirkende IGF1 wird in der Leber gebildet und wurde als Proliferation-Regulator identifiziert (Pollak, 2008). IGF1 spielt zudem eine bedeutende Rolle im Rahmen kardiovaskulärer Prozesse (Ren et al., 1999). Aufgrund seiner beschriebenen hypertrophen Wirkung (Duerr et al., 1995; Grimm et al., 1998; Kim et al., 2008) ist IGF1 maßgeblich am Prozess der myokardialen Umstrukturierung beteiligt.

JARID2 (Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2) ist ein putativer Transkriptionsfaktor, der ein Mitglied der Jumonji Familie ist. JARID2 ist bei der Bildung des Neuralrohrs und der Entwicklung der Leber, Milz, Thymus und des Herz-Kreislauf Systems involviert (Motoyama et al., 1997). Eine wichtige Rolle spielt JARID2, das ebenfalls in Herzgewebe exprimiert wird, in der Entwicklung des embryonalen und erwachsenen Herzens (Jung et al., 2005). Ein Mutation-Modell der JARID2 Embryonen zeigte schwere Herzfehlbildungen, Ventrikelseptum-Defekte, Non-Compaction der Ventrikelwand und dilatative Arterien (Kim et al., 2003).

LHX9 (LIM Homeobox 9) gehört zur LIM Homeobox-Gen-Familie, der vorwiegend an Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert ist (Wilhelm et al., 2007). Eine Funktion des LHX9 wird in der Entwicklung des Nervensystems beschrieben (Liem et al., 1997; Retaux et al., 1999). Des Weiteren konnte LHX9 als ein direktes Zielgen des GATA4/FOG2 Komplexes identifiziert werden, der eine wichtige Rolle bei der Herzentwicklung spielt (Smagulova et al., 2008).

LMX1A (LIM Homeobox Transcription Factor 1, Alpha) ist ein Homöodomäne-Protein. Dieser ist erforderlich, um Dopamin-Zelldifferenzierung auszulösen und neuronale Differenzierung zu induzieren, die eine entscheidende Rolle bei Parkinson-Krankheiten haben (Andersson et al., 2006; Caiazzo et al., 2011). Auch im zentralen Nervensystem und bei Krebserkrankungen konnte eine Rolle von LMX1A nachgewiesen werden (Chao et al., 2013; Dong et al., 2011; Millonig et al., 2000).

NFAT5 (Nuclear Factor Of Activated T-Cells 5, Tonicity-Responsive) ist ein Transkriptionsfaktor, der im Thymus, im Gehirn und in der Leber exprimiert wird und bei Aktivierung von ruhenden T-Lymphozyten induziert wird (Trama et al., 2000; Zhang et al., 2003). In einer Studie konnten Ito et al. zeigen, dass NFAT5 ein wichtiger Mediator für das Kardiomyozyten-Überleben ist (Ito et al., 2007). Auch konnte eine Funktion von NFAT5 in vaskulären glatten Muskelzellen beobachtet werden (Scherer et al., 2014).

SOX5 (SRY (Sex Determining Region Y)-Box 5) kodiert für ein Mitglied der SOX-Familie von Transkriptionsfaktoren, welcher an der Regulation der embryonaler Entwicklung, der Knorpelbildung und der Neuronen-Entwicklung als auch an der Kontrolle der Zellproliferation, und der Modulation des Zellschicksals beteiligt ist (Martinez-Morales et al., 2010; Shim et al., 2012; Smits et al., 2001). Li et al. zeigten in seiner Studie, dass SOX5 eine funktionelle Rolle im Herzen hat (Li et al., 2013). Eine weitere Rolle von SOX5 ist die Regulierung der myogenen Vorläuferzellen, die zur Muskelbildung und Wachstum führen (Rescan&Ralliere, 2010).

TGFBR2 (Transforming Growth Factor, Beta Receptor II) gehört zur Serin/Thyrosin Proteinkinase Familie und zur TGFB-Rezeptor Unterfamilie. Der TGFβ-Signalweg ist erforderlich für die normale Herzentwicklung und spielt eine zentrale Rolle im Herzen und in der vaskulären Entwicklung (Robson et al., 2010; Chen et al., 2012; Jaffe et al., 2012; Langlois et al., 2010; Li et al., 2014). TGFβ kann zudem die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und andere Funktionen in einem weiten Spektrum verschiedener Zellen beeinflussen (Arthur&Bamforth, 2011).

ZFMP2 (Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2) auch FOG2 genannt, gehört zur FOG-Familie von Transkriptionsfaktoren. Dieser Transkriptionsregulator spielt eine zentrale Rolle in der Herzmorphogenese und in der Entwicklung von Koronargefäßen (Tevosian et al., 2000). FOG2 wird als Modulator der GATA4-Funktion während der Herzentwicklung postuliert (Svensson et al., 1999), die in Tiermodellen nachgewiesen werden konnten. Auch weitere Studien zeigen, dass FOG2 eine wichtige Rolle im Herzen spielt (Garnatz et al., 2014; Zhou et al., 2009).

Die vorhergesagten potentielle Zielgene ACTC1, ADAMTS1, CASK, JARID2 und ZFPM2 für die miRNA-142-5p zeigten eine leichte Reduktion der Luziferase-Aktivität, welche jedoch nicht signifikant war. Für die anderen Zielgenkonstrukte ATP1B1, CAMTA1, IGF1, LHX9, LMX1A, NFAT5, SOX5 und TGFBR2 konnte keine Bindung an die miRNA-142-5p beobachtet werden. Die Positiv-Kontrolle zeigte eine 70 %ige Reduktion der Luziferase-Aktivität, die eine Sequenzkomplementarität zwischen der miRNA und der Ziel-3'UTR wiederspiegelte und eine Interaktion darstellte. Aufgrund der Tatsache, dass die Positiv-Kontrolle das zu erwartende Ergebnis lieferte, konnte man davon ausgehen, dass die

pmirGLO Messmethode funktionierte. Berücksichtigt man die Vielzahl der auf die Regulation

einflussnehmenden Parameter wie Komplementarität innerhalb und außerhalb der "Seed"-Sequenz, thermodynamische Stabilität der Bindung, Anzahl der vorhandenen Bindestellen pro 3'UTR-Bereich oder sterische Zugänglichkeit der Bindestelle, so sind die Ergebnisse mit der messbaren Interaktion der Positiv-Kontrolle, der nicht messbaren Interaktionen und der schwach nicht signifikanten Interaktionen der miRNA auf ihre Zielsequenzen zum Teil verständlich. Erstaunlicherweise konnte keine signifikante Interaktion zwischen der miRNA-142-5p und einem potentiellen Zielgen bestätigt werden. Die pmirGLO Messmethode beruht auf der Anwesenheit von Bindestellen. Ein Grund dafür, dass keine Interaktion zu sehen war, könnte die Auswahl des 3'UTR-Fragments sein, da einige Zielgene mehrere Bindestellen besitzen. Wird dieser falsch ausgewählt, kommt es zur keiner Interaktion. Möglich ist auch, dass die miRNA nicht im 3'UTR Bereich des Zielgens bindet, sondern innerhalb des kodierenden Bereichs der mRNA. Die Lokalisation der Signale im 3'-UTR der mRNA ermöglicht die Entstehung von Transkriptvarianten mit unterschiedlicher 3'-UTR Länge, die sich in ihrer Stabilität und Translationseffizienz unterscheiden können (Di Giammartino et al., 2011; Edwalds-Gilbert et al., 1997). Weitere Gründe, für die schwachen nicht signifikanten Interaktionen bzw. für keine sichtbaren Interaktionen der miRNA und dem potentiellen Ziegen, kann die Wahl der miRNA Mimic Konzentration oder auch das Zellsystem sein. Durch eine Erhöhung oder Erniedrigung der miRNA Mimic Konzentration und einen Wechsel zu einem anderen Zellsystem, könnte es möglich sein, signifikante Interaktionen zwischen miRNA und Ziegen zu erhalten. Aufgrund der Tatsache, dass kein potentielles Zielgen als direktes Zielgen der miRNA-142-5p in dem C2C12 Zellsystem bestätigt werden konnte, erfolgten weitere Untersuchungen der Zielgene auf molekularer Ebene und Protein-Ebene in C2C12 Zellen und in Kardiomyozyten. Die Expression der mRNA-Ebene geschieht durch die seguenzspezifische Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA, was zur Degradierung der Ziel-mRNA, zur Inhibierung der Translation oder zur mRNA-Deadenylierung führt (Joshi et al., 2011; Spadaro&Bredy, 2012; Takahashi et al., 2014; Winter et al., 2009). Dabei entscheidet der Grad der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, auf welche Art die Expression reguliert wird. Es konnte weder in den C2C12 Zellen noch in den Kardiomyozyten auf molekularer Ebene ein signifikanter inhibitorischer Effekt der miRNA-142-5p auf die vorhergesagten potentiellen Zielgene bestätigt werden. RNA-analytische Methoden sind weniger geeignet, da der inhibitorische Effekt von miRNAs auf die Translation nicht zwangsläufig mit einer Veränderung des mRNA-Spiegels einhergeht. Zur experimentellen Validierung der vorhergesagten Zielgene wurden Western Blots durchgeführt, um die Proteinexpression der miRNA-142-5p in Abhängigkeit der diversen potentiellen Zielgene zu quantifizieren (siehe Abbildung 3-12). In beiden Zellsystemen konnte auf Protein-Ebene kein signifikanter inhibitorischer Effekt der

miRNA-142-5p auf die vorhergesagten potentiellen Zielgene nachgewiesen werden. Auch durch Veränderungen der Protein Menge und der Antikörper Konzentration konnte kein Zielgen der miRNA-142-5p bestätigt werden, wobei eine ausreichende Überexpression in den C2C12 Zellen und in Kardiomyozyten vorhanden war. Um sicher zu gehen, dass es nicht an der Western Blot Methode lag, wurde das Gen p300 untersucht, welches von Sharma et al. als ein direktes Zielgen der miRNA-142 in den Kardiomyozyten beschrieben wurde (Sharma et al., 2012). In dieser Arbeit konnte p300 in den Kardiomyozyten als direktes Zielgen der miRNA-142 bestätigt werden (siehe Abbildung 3–13) Demnach kann geschlossen werden, dass die Quantifizierung der miRNA-142-5p auf Protein-Ebene mit einem direkten Zielgen erfolgreich war. Die 13 potentiellen Zielgene konnten in den C2C12 Zellen und in den Kardiomyozyten nicht als direkte Zielgene der miRNA-142-5p bestätigt werden, jedoch wäre es möglich, das diese Zielgene in einem anderen Zellsystem mit einem anderen Mechanismus einen inhibitorischen Effekt zeigen und als direkte Zielgene wirken.

# 4.3.3 Einfluss der miRNA-142-5p auf die NFAT-Aktivierung in Abhängigkeit von Cyclosporin A und Tacrolimus in C2C12-NFAT Zellen und in Kardiomyozyten

Der Calcineurin-NFAT Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei der Hypertrophie-Induktion, die durch einen Ca<sup>2+</sup>Anstieg verursacht wird (Frey et al., 2004b; Frey&Olson, 2003; Molkentin et al., 1998; van Berlo et al., 2013). Mithilfe des Dual-Luziferase-Reportergen Systems konnte die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität in den C2C12-NFAT Zellen und in den Kardiomyozyten quantifiziert werden. Das System basiert auf zwei Plasmiden, die die Firefly- und die Renilla-Luziferasen kodieren (siehe Abschnitt 4.1). Anhand dieser Aktivität konnten Aussagen über die NFAT-Aktivität des regulierten Signalweges gemacht werden. Die NFAT-Aktivierung kann durch die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) inhibiert werden, da diese die Aktivität der Phosphatase Calcineurin blockieren (Bueno et al., 2002; Heineke&Molkentin, 2006). Sie werden als effektive Immunsuppressiva in der Klinik eingesetzt, insbesondere zur Vorbeugung einer Transplantatabstoßung (Taylor et al., 2005). Die Substrate Cyclosporin A und FK506 sind an sich keine aktiven Calcineurin Inhibitoren, denn sie müssen erst an ihre endogenen Partner den Immunophilinen binden, um ihre Funktionalität zu erlangen 1992). (Schreiber&Crabtree, In Abbildung 3–14 sind die Ergebnisse der NFAT-Reportergen-Aktivität in den C2C12-NFAT Zellen und in den Kardiomyozyten nach Überexpression der miRNA-142-5p in Abhängigkeit von CsA und FK506 zusammengefasst. Es konnte in beiden Zellsystemen ein signifikanter Anstieg der NFAT-Aktivität mit der miRNA-142-5p im Calcineurin-NFAT Signalweg nachgewiesen werden. Die Zugabe von CsA oder FK506 in beiden Zellsystemen mit und ohne der miRNA-142-5p führte zu einer

signifikanten Runterregulierung der NFAT-Aktivität. Auf welche Weise die miRNA-142-5p die NFAT-Reportergen-Aktivität reguliert, muss noch geklärt werden. Um diesen Mechanismus weiter auszuarbeiten und besser zu verstehen ist in Abbildung 4–1 eine schematische Übersicht des Calcineurin-NFAT Signalweges in Anwesenheit der miRNA-142-5p dargestellt.



#### Abbildung 4–1: Wirkmechanismus der miRNA-142-5p auf den Calcineurin-NFAT Signalweg

Durch einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytoplasma kommt es zur Calmodulin Bindung und zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin. Diese dephosphoryliert NFAT, das in den Zellkern weiter transferiert wird und dort ein pro-hypertrophes Genprogramm induziert. Durch Zugabe der miRNA-142-5p kommt es zur Erhöhung der NFAT-Aktivität, die zum Beispiel durch Calcineurin verursacht sein könnte. Zudem könnte die miRNA-142-5p einen inhibierenden Einfluss oder gar keinen Einfluss auf Cyclosporin A und FK506 haben, was zur Erniedrigung der NFAT-Aktivität führt. Die beiden Calcineurin-Inhibitoren blockieren die Aktivierung von Calcineurin und somit die NFAT-Aktivität. Mit Anwesenheit der miRNA-142-5p wird dieser Effekt nicht aufgehoben. Modifiziert nach (Luedde et al., 2006).

Ein Anstieg der NFAT-Aktivität entsteht durch die Aktivierung von Calcineurin durch Calmodulin, wobei es zu einer Konformationsänderung der autoinhibitorischen Domäne kommt, so dass das Phosphatasezentrum nicht mehr blockiert ist (Kincaid, 1993). Wie die miRNA-142-5p die NFAT-Aktivität erhöht muss weiterhin geklärt werden. Dieses könnte zum Beispiel durch Calcineurin oder auch durch andere Gene die weiter "upstream" wirken verursacht werden und zur Erhöhung oder Erniedrigung von NFAT führen. Die Inhibition von Calcineurin durch Cyclosporin A und Tacrolimus (FK506) blockiert die Aktivierung von NFAT.

Die miRNA-142-5p ist nicht in der Lage, die durch Cyclosporin A und FK506 hervorgerufene Hemmung zu revertieren, was zu einer Erniedrigung der NFAT-Aktivität führt.

Die miRNA-142-5p könnte entweder keinen Einfluss oder einen inhibierenden Einfluss auf die beiden Calcineurin-Inhibitoren haben. Allerdings scheint der miRNA-142-5p Effekt auf die NFAT-Aktivität aufgehoben zu sein, wenn Calcineurin blockiert ist, so dass die miRNA-142-5p direkt oder sogar indirekt über Calcineurin wirken könnte. Demnach kann in diesem Experiment geschlossen werden, dass die miRNA-142-5p eine wichtige Rolle in dem Calcineurin-NFAT Signalweg spielt.

# 4.3.4 Einfluss der miRNA-142-5p auf die PE-induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten

Eine entscheidende Relevanz bei der kardialen Hypertrophie hat ein intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Anstieg (Frey et al., 2000a; Olson&Molkentin, 1999), der unter anderem durch die Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen als auch durch Stimulatoren wie Angiotensin II (Ang II), Phenylephrin (PE) und Endothelin-1 induziert wird (Eble et al., 1998; Sadoshima&Izumo, 1993; Yue et al., 2000). Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert NFAT, das in den Zellkern transferiert und dort ein pro-hypertrophes Genprogramm initiiert. Zu den Hypertrophie-assoziierten Genen zählen unter anderem die natriuretischen Peptide Typ A (Nppa) und Typ B (Nppb) als auch Rcan1-4. Das hypertrophe oder fetale Genprogramm beschreibt eine Expressionssteigerung von verschiedenen Genen bei Herzhypertrophie, die auch während der frühen Herzentwicklung aktiviert sind. Phenylephrin ist ein Sympathomimetikum und wirkt als Agonist am  $\alpha$ 1-Adrenozeptor (Endoh et al., 1991), wobei ein langfristiger Effekt einer kardialen PE-Stimulation die Entwicklung eines hypertrophen Phänotyps bewirkt (Lee et al., 1988; Meidell et al., 1986; Waspe et al., 1990). Es steigert die Proteinsynthese und verändert die Expression myokardialer Genmarker durch Aktivierung der Proteinkinase C und des PI3-Kinase/Akt-Signalweges. Daneben kommt es durch eine Stimulation mitogen aktivierter Kinasen (p42-MAP-Kinase) zu phänotypischen Veränderungen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der miRNA-142-5p in Kardiomyozyten auf die Stimulation durch Phenylephrin untersucht. In Abbildung 3–15 sind die Ergebnisse des hypertrophen Genprogrammes und die Zellgröße nach Überexpression der miRNA-142-5p in Abhängigkeit von PE zusammengefasst. Es konnte eine signifikante Induktion der Expression mit PE für Nppa, Nppb und Rcan1-4 gezeigt werden. Diese Induktion der Expression durch PE war für alle drei untersuchten Hypertrophie-assoziierten Gene signifikant verringert bei der Überexpression der miRNA-142-5p. Dieses Resultat konnte ebenfalls bei der Bestimmung der Zellgröße beobachtet werden. Daraus könnte geschlossen werden, dass die

111

miRNA-142-5p die PE-induzierten hypertrophen Effekte in Kardiomyozyten verringert und demnach negativ die Hypertrophie reguliert. Jeong et al. konnte schon für die miRNA-142-3p in seiner Studie zeigen, dass durch die miRNA Überexpression die PE-induzierte Hypertrophie in neonatalen Kardiomyozyten aufgehoben wird. Demnach reguliert diese miRNA negativ die Herzhypertrophie, was als potentielle therapeutische Behandlung von Herzerkrankungen von großer Bedeutung sein könnte (Jeong et al., 2012). Auch konnten in Studien nachgewiesen werden, dass sowohl die miRNAs-101b, -181d, -24-2\* und die miRNA-450a als auch die miRNA-1 und miRNA-133 ebenfalls negativ die Herzhypertrophie regulieren (Gladka et al., 2012; Jeong et al., 2012). Um den molekularen Mechanismus des anti-hypertrophen Effektes der miRNAs aufzuklären, ist es entscheidend ihre Zielgene zu identifizieren. Sharma et al. zeigten in ihrem Experiment, dass eine Stimulation mit fetalem Kälberserum in den Herzmuskelzellen zu einer Induktion von p300 und einer Aktivierung von p42/p44 MAPK/ERK führte, die zur anschließenden Unterdrückung der miRNA-142-3p und -5p und zum hypertrophen Wachstum der Myozyten führte. Durch Inhibitoren der MAP-Kinasen konnte die Unterdrückung der beiden miRNAs behoben werden. Die Runterregulierung der miR-142-3p und -5p wird nicht nur durch die MAPK-Aktivierungen hervorgerufen, sondern auch durch das direkte Zielgen p300. Wird p300 in den Herzmuskelzellen induziert, so werden die beiden miRNAs 142-3p und -5p runterreguliert. Durch Induktion einer anti-p300 wird der Effekt auf die beiden miRNAs aufgehoben und die Expression hochreguliert (Sharma et al., 2012). In einer Studie von Gusterson et al. konnte bestätigt werden, dass die Aktivierung von p42/p44 MAPK in Herzmuskelzellen durch Phenylephrin zur Erhöhung der Transkriptionsaktivierung von CBP (CREB-Bindeprotein) und p300 führen. Die Aktivität von CBP und p300 in Herzmuskelzellen wird durch Phenylephrin stimuliert, das für die Aktivierung von Hypertrophie-Genen benötigt wird (Gusterson et al., 2002). Die Rolle des MAP-Kinase-Weges in der Herzhypertrophie ist komplex, da der Signalweg durch verschiedene Stimuli als auch durch den GPCRs-Signalweg, Proteinkinasen, den gp130 Rezeptor und Stress aktiviert wird. Im Calcineurin-NFAT Signalweg konnte für die miRNA-142-5p bestätigt werden, dass diese die NFAT-Luziferase Reportergen-Aktivität signifikant hochreguliert, welches im Widerspruch zu der negativen Regulation der PE-induzierten Hypertrophie steht. Es entsteht durch die Induktion von Calcineurin und Phenylephrin ein entgegengesetzter Hypertrophie-Effekt, der sich möglicherweise durch die Rolle unterschiedlicher Zielgene der beschriebene Signalwege erklären lässt. Fraglich ist jedoch, warum der Einfluss der miRNA-142-5p durch den Calcineurin-NFAT Signalweg und durch den MAPK-Signalweg unterschiedliche Hypertrophie-Effekte aufweist. In Studien wird beschrieben, dass ERK/MAPK und p38 MAPK p300 phosphoryliert und moduliert (Chen et al., 2007; Gusterson et al., 2002; Molkentin&Dorn, 2001; Poizat et al., 2005), was letztendlich zur Runterregulation der

miRNA-142-5p führt. Dieses würde den Effekt in dieser Arbeit erklären. Demnach spielt das Zielgen p300 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der miRNA142-5p, insbesondere bei der Hypertrophie.

### 4.3.5 Rolle der miRNA-142-5p in verschiedenen Mausmodellen

Um eine pathophysiologische Relevanz der miRNA-142-5p zu untersuchen, erfolgte die Messung der Expression in verschiedenen Mausmodellen für Kardiomyopathien. Diese umfassen die Calsarcin1-KO (Frey et al., 2004a) und MLP-KO (Arber et al., 1997) Mauslinien, die Calcineurin-TG Mauslinie (Molkentin et al., 1998) als auch Wildtyp Mäuse mit transversaler Aortenkonstruktion (TAC) bzw. LAD-Ligatur (Myokardinfarkt). Alle diese Mausmodelle weisen eine ausgeprägte hypertrophe bzw. dilatative Kardiomyopathie auf, die letztendlich zur Herzinsuffizienz führen.

In einem Yeast-two-Hybrid Screen fand man für Calcineurin Modulatoren, die im Herzen bzw. Skelettmuskel exprimiert waren und als Calsarcine bezeichnet werden. Calsarcin ist eine neue Familie von sarkomerischen Calcineurin-bindenden Proteinen. Diese Familie umfasst drei Mitglieder, die Z-Scheiben Proteine sind: Calsarcin-1, das als einzige Isoform im adulten Herzen exprimiert wird und in "Slow twitch" Muskelfasern, sowie Calsarcin-2 und Calsarcin-3, die im adulten Organismus ausschließlich in "Fast twitch" Muskelfasern exprimiert werden (Frey et al., 2004a; Frey et al., 2008; Frey&Olson, 2002; Frey et al., 2000b). Calsarcin-1 moduliert negativ die Funktion von Calcineurin. Frey et al. generierten ein Calsarcin-1 Knockout (KO) Mausmodell, das unter basalen Bedingungen keine Hypertrophie Entwicklung (gleichbleibendes Herzgewicht/Körpergewicht Verhältnis) oder Fibroseausbildung zeigt. In echokardiographischen Analysen konnte eine Abnahme in der fraktionellen Verkürzung in Calsarcin-1 KO-Mäusen gleichbleibendem linksventrikulärem enddiastolischem bei Durchmesser im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (WT Mäuse) beobachtet werden. Auf molekularer Ebene war im KO-Mausmodell eine verstärkte Expression der pro-hypertrophen Genmarker sichtbar, so dass daraus geschlossen werden kann, dass Calsarcin-1 eine wichtige Rolle als Modulator im Calcineurin Signalweg spielt (Frey et al., 2004a). Eine Regulation der miRNA-142-5p in Calsarcin-1 KO-Maus Herzen konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Das Muscle LIM Protein (MLP) gehört der Familie der cysteinreichen Proteine (CRP/CRP3) an, die zwei LIM-Domänen besitzen. CRP wird in drei Mitglieder unterteilt: CRP1, CRP2/SmLIM und CRP3/MLP, wobei CRP1 und CRP2 Isoformen der glatten Muskulatur und CRP3 die Isoform der quergestreiften Muskulatur sind. Mit MLP wurde ein weiteres Z-Scheiben-Protein gefunden, das die Calcineurin-Aktivität moduliert. Auch konnten Knoll et al. zeigen, dass MLP eine wichtige Funktion in der Mechanotransduktion über die

N-terminale Verknüpfung mit Telethonin/T-Cap hat. Eine Zerstörung dieser Interaktion oder Mutationen von T-Cap können zu dilatativer und hypertropher Kardiomyopathie beim Menschen führen (Hayashi et al., 2004; Knoll et al., 2002). MLP wurde zuerst von Arber et al. beschrieben, der das erste KO-Mausmodell für eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) generierte. MLP wird während der Entwicklung als auch im adulten Herzen exprimiert. Ein MLP-KO-Mausmodell führt zu histologischen Veränderungen in Form von ungeordneten Myofibrillen, zu echokardiographischen Veränderung in Form von linksventrikulärer Dilatation und zu vermindertem "Fractional Shortening", wie sie für eine humane dilatative Kardiomyopathie typisch sind (Arber et al., 1997). Es konnte keine Veränderung der miRNA-142-5p Expression in MLP-KO Maus Herzen beobachtet werden.

Calcineurin nimmt eine zentrale Stellung bei der pathologischen Hypertrophie des Herzens ein, wobei die Phosphatase ein attraktives Ziel zur Therapie der Herzinsuffizienz ist. Die transgenen Calcineurin Mäuse weisen eine massive Myokardhypertrophie auf, oftmals mit Ausbildung einer schweren dilatativen Kardiomyopathie, interstitiellen Fibrose, Herzinsuffizienz und dem Eintritt des plötzlichen Herztodes. Die Induktion fetaler Programme der Genexpression konnte mit einer Hochregulation der hypertrophen Genmarkern belegt werden. Die pharmakologische Behandlung der Calcineurin transgenen Mäuse mit dem Calcineurin Inhibitor CsA konnte die hypertrophe Reaktion unterdrücken (Molkentin et al., 1998). Der miRNA-142-5p konnte eine wichtige Rolle im Calcineurin-NFAT Signalweg zugeordnet werden. Es konnte jedoch kein Einfluss der miRNA-142-5p auf die transgenen Calcineurin Maus Herzen bestätigt werden.

Das LAD-Ligationsmodell (Left Artery Descending) an der Maus ist ein etabliertes Modell zur Induktion kardialer Ischämie und Nekrose. Myokardinfarkt-Modelle basieren auf einem Gefäßverschluss mittels LAD-Ligatur und Ischämie-Reperfusion-Schaden. Die LAD-Ligatur ist mit dem physiologischen Infarktgeschehen gut vergleichbar, zeigt allerdings eine deutliche Varianz der Infarktausdehnung und geht mit einer hohen intraexperimentellen Sterblichkeit der Tiere einher (Gardin et al., 1995; Kanno et al., 2002). Die hervorgerufenen Veränderungen im Myokard nach Koronararterienligation sind vergleichbar mit den kardialen Erscheinungen des akuten Koronarsyndroms nach thrombotischem Verschluss einer Koronararterie beim Menschen (Zolotareva&Kogan, 1978). Die LAD-Ligatur wurde in Wildtyp Mäusen durchgeführt, deren Herzen nach vier Tagen entnommen wurden. In den LAD-Ligatur Tieren konnte eine signifikant hochregulierte Expression der miRNA-142-5p im Vergleich zu den Wildtyp Kontroll Tieren nachgewiesen werden, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die miRNA-142-5p eine Rolle in diesem Tiermodell spielt.

Das am häufigsten angewandte Tiermodell zur Induktion einer linksventrikulären Hypertrophie und einer Myokardhypertrophie sind die sogenannten TAC Modelle (Transverse Aortic Constriction), die auf einer Druckbelastung des Herzens durch Verengung der Aorta beruhen und somit die humane Situation einer Aortenstenose imitieren. Die Nachlast erhöht sich massiv, es kommt zu Ausschüttung neurohumoraler Faktoren und zur kardialen Hypertrophie (Li et al., 2007; Toischer et al., 2010). In Wildtyp Mäusen wurde durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) eine chronische Drucküberlastung induziert. Diese wurden nach zwei Wochen getötet und die Herzen entnommen. Es zeigte sich eine erhöhte Expression der miRNA-142-5p in den Wildtyp TAC Tieren im Vergleich zu den Wildtyp Kontroll Tieren, die jedoch nicht signifikant war. Die miRNA-142-5p könnte möglicherweise ebenfalls eine bedeutende Rolle in diesem Tiermodell spielen. Da die experimentell verursachte Druckbelastung der arteriellen Hypertonie oder Aortenklappenstenosen gleicht, ist eine Modulation der Hypertrophie durch die untersuchte miRNA auch von klinischem Interesse. Diese Erkenntnisse können einen Ansatz zur Entwicklung von Behandlungsmethoden der Arteriellen Hypertonie, Koronaren Herzkrankheit, Kardiomyopathien und Herzinsuffizienz liefern.

Um den Mechanismus der miRNA-142-5p in den LAD-Ligatur Tieren und den TAC Tieren besser zu verstehen, ist es wichtig Zielgene zu identifizieren, die mit verschiedenen Signalwegen verknüpft sind. Interessanterweise beschreiben Sharma et al. eine Herrunterregulierung der miRNA-142-5p in einem TAC Mausmodell und eine Herrunterregulierung der miRNA-142-3p und der miRNA-142-5p in Kardiomyopathie Herzen von Patienten, welches in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte. Die Expression der miRNA-142-5p bei Sharma et al. wurde im linksventrikularen Myokard gemessen, wobei die TAC Tiere nach drei Tagen getötet wurden und die Kardiomyopathie Herzen vier Stunden nach dem Tod der Patienten entnommen wurden (Sharma et al., 2012). Die durchgeführten Expressionsmessungen auf molekularer Ebene in dieser Arbeit bei den TAC und Infarkt Tieren unterschieden sich zeitlich bei der Entnahme der Herzorgane und dem Herzgewebe von denen von Sharma et al. durchgeführten Versuchen. Wie schon im Abschnitt 4.3.4 beschrieben, kommt es auch durch Stress und Druckbelastung zur Aktivierung der MAP-Kinase und zur Induktion von p300, was letztendlich zur Herrunterregulierung der miRNA-142-5p führt und damit auch zu negativ regulierter Hypertrophie. Wei et al. zeigten jedoch, dass p300 altersabhängig von den Tieren und zeitabhängig nach Druckbelastung moduliert wird (Wei et al., 2008), was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären würde. Kommt es nach einer gewissen Zeit nicht mehr zur Induktion von p300, erhöht sich die miRNA-142-5p Expression signifikant, was in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Um potentielle Einflüsse der Überexpression der miRNA-142-5p auf die Physiologie des Herzens in vivo überprüfen zu können, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, dass die miRNA-142-5p herzspezifisch überexprimiert.

114

# 4.4 In vivo Mauslinien

#### 4.4.1 Phänotyp der transgenen miRNA-142 Mauslinien

Für in vivo Versuche wurden transgene miRNA-142 Mauslinien zur Untersuchung von kardiovaskulären Signalwegen generiert. Die Expression der miRNA-142 wird hierbei durch den kardialen α-Myosin (αMHC) Promotor gesteuert, der die Expression spezifisch in Herzgewebe hochreguliert. Es konnten zwei weibliche und zwei männliche Founder, die die hGH-Poly-A-Tail-Kassette beinhalten, generiert werden. Diese waren in der Zentralen Tierhaltung (ZTH) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel untergebracht. Im Alter von 29 Wochen und 37 Wochen verstarben die Founder 802.1 und 810.1, wobei der Founder 810.1 drei transgene Nachkommen bekam. Die Weiterzucht dieser Nachkommen war jedoch nicht möglich, da sie im Alter von 6-8 Wochen verstarben. Im Alter von einem Jahr verstarb der Founder 809.5, der keine positiven F1-Generationen zeugte. Der Founder 801.1 zeugte zwei positive Nachkommen der F1-Generation, die im Alter von 14 und 17 Wochen verstarben, so dass auch hier keine Weiterzucht mit der transgene Mauslinie möglich war. Auffällig war, dass alle transgenen Nachkommen im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtyp Jungtieren kleiner waren. Es konnte zudem festgestellt werden, dass die vier Founder überwiegend Wildtypen bekamen bzw. zeugten. Der hohe Anteil der Wildtypen könnte sich dadurch erklären, dass die transgenen miRNA-142 Mäuse schon im Uterus verstarben oder dass die miRNA-142 erst gar nicht in die Keimbahn gelangte. In Abbildung 3–18, Abbildung 3–19 und Abbildung 3–20 sind die Herzen von zwei Foundern und von zwei transgenen Tieren der F1-Generation als auch eine HE-Färbung im Vergleich zu Wildtyp Herzen dargestellt, die zum Zeitpunkt der Organentnahme bereits seit einigen Tagen tot waren. Die transgenen toten miRNA-142 Mäuse zeigten einen auffälligen Phänotyp im Herzen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen, da die Herzen deutlich größer und schwerer waren. Die Founder Herzen wiesen zu Beginn eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) auf, die sich in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse zur dilatativen Kardiomyopathie (DCM) entwickelte. Molkentin et al. beschrieben den gleichen Effekt in den transgenen Calcineurin Maus Herzen, die zuerst eine HCM und im späterem Alter eine DCM aufwiesen (Molkentin et al., 1998). In der F1-Generation der transgenen miRNA-142 Mäuse war schon im frühen Alter von 2-3 Monaten eine schwere dilatative Kardiomyopathie ausgebildet, was zu einer frühzeitigen Herzinsuffizienz führte. Da eine Weiterzucht mit den transgenen miRNA-142 Mauslinien aufgrund des auffälligen Phänotyps im Herzen nicht möglich war, wurden alle nachfolgenden Nachkommen vom Founder 801.1 für weitere Untersuchungen verwendet. Dieser zeugte zwei positive F1-Generationen und vier Wildtyp Geschwistertiere, die nach sechs Wochen getötet wurden. Somit konnte die Überexpression der miRNA-142-5p

überprüft und morphometrische Untersuchungen durchgeführt werden. Mittlerweile ist der Founder 801.1 im Alter von zwei Jahren verstorben.

Für die beiden transgenen miRNA-142 Nachkommen konnte eine signifikante Uberexpression der miRNA-142-5p gegenüber Wildtyp Geschwistermäusen den nachgewiesen werden. Die morphometrischen Daten der beiden transgenen miRNA-142 Mäuse zeigten hinsichtlich des Körpergewichts, dass diese leichter waren, das Herzgewicht jedoch schwerer im Vergleich zu den Wildtyp Geschwistertieren war. Die Lunge, die Leber und die Milz zeigten keine auffälligen Unterschiede im Gewicht zu den Wildtyp Mäusen. Die Ratio aus Herzgewicht bzw. Gewicht des linken Ventrikels versus Körpergewicht und das Herzgewicht versus Tibialänge zeigte einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Die Bildung der jeweiligen Quotienten ermöglicht eine adaptierte Aussage über eine mögliche Hypertrophie des Herzens (Van Kerckhoven et al., 2002), die für die transgenen miRNA-142 Mäuse bestätigt werden konnte. Diese Parameter gelten als indirekte Marker für eine Hypertrophie der Herzwände und wurden von vielen Autoren als Beweis für eine Hypertrophieentwicklung herangezogen (Choi et al., 1997; Rockman et al., 1991). Demnach kann geschlossen werden, dass die miRNA-142 eine wichtige Rolle bei der Herzhypertrophie und der Herzinsuffizienz spielt, welches schon in vitro im Calcineurin-NFAT Signalweg und in den TAC und Infarkt Mausmodellen gezeigt werden konnte. Um weitere Analysen durchzuführen und die Ergebnisse zu bestätigen, wäre es nötig gewesen mehr transgene Nachkommen der miRNA-142 Mauslinien zu untersuchen, die jedoch leider nicht zur Verfügung standen. Sharma et al. beschreiben in einem in vivo Experiment, dass die miRNA-142 eine "Gain and loss" Funktion ausübt, die einen entgegengesetzten Effekt der Herzfunktion in Wildtyp Mäusen und in p300 transgenen Mäusen zeigt. Ein Anstieg der miRNA-142 Expression hatte eine signifikante Auswirkung auf die Herzfunktion. Die beiden Mausmodelle zeigten eine reduzierte LVEF (Left Ventricular Ejection Fraction), ein reduziertes FS (Fractional Shortening) und einen erhöhten systolischen (LVIDs) und diastolischen Diameter (LVIDd). Bei einer anti-miRNA-142 Induktion konnte für die Wildtyp Mäuse keine Auswirkung auf die Herzfunktion beobachtet werden. Für die p300 transgenen Mäuse war jedoch ein entgegengesetzter Effekt auf LVEF, FS, LVIDs und LVIDd zu sehen 2012). In (Sharma et al., dieser Arbeit konnten keine echokardiographischen Untersuchungen durchgeführt werden, da die transgenen miRNA-142 Mäuse der F1-Generation innerhalb weniger Wochen mutmaßlich an einem plötzlichen Herztod starben und keine weiteren transgenen F1-Nachkommen zur Verfügung standen. Zudem beschreiben Sharma et al., dass makroskopisch die zwei Monate alten Wildtyp Mäuse mit der transduzierten lentiviralen miRNA-142-5p keinen Unterschied in der Herzmuskeldicke, im Herzgewicht und der Ratio Herzgewicht versus Tibialänge aufwiesen, jedoch eine signifikante Zunahme des Lungengewichts nachgewiesen werden konnte (Sharma et al.,

2012). Dieses konnte in dieser Arbeit für die transgenen miRNA-142 Mauslinien nicht bestätigt werden, welches sich durch eine starke Überexpression im Herzen erklären lässt. Die Phänotyp Veränderungen im Herzen waren schon mit sechs Wochen deutlich erkennbar und es konnte eine deutliche Überexpression nachgewiesen werden.

# 4.4.2 Hypertrophie-Genmarker im in vivo Mausmodell

Um die miRNA-142 Mauslinien auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Dazu wurde das Expressionsniveau von Vertretern des hypertrophen Genprogramms in den beiden transgenen Nachkommen und ihren vier Wildtyp Geschwistertieren analysiert. Das hypertrophe oder fetale Genprogramm beschreibt eine Expressionssteigerung von verschiedenen Genen bei Herzhypertrophie. Dazu gehören die Hypertrophie-assoziierten Gene Nppa, Nppb als auch Rcan1-4. Rcan1-4 ist ein wichtiger endogener Modulator des Calcineurin-NFAT Signalweges, der als Inhibitor von Calcineurin fungiert (Yang et al., 2000). Dieser ist ein Zielgen von NFAT, dessen genaue Funktion aufgrund der inhibitorischen und der aktivierenden Rollen, welche in unterschiedlichen Experimenten beobachtet werden konnte, noch diskutiert wird (Fox&Heitman, 2005; Vega et al., 2003a; Vega et al., 2003b). Die Isoform Rcan1-4 steht unter der Kontrolle eines alternativen Promotors, welcher 15 NFAT-Bindungsstellen besitzt (Yang et al., 2000) und als guter Indikator für die transkriptionelle NFAT-Aktivität bezeichnet wird. Deshalb kann durch dessen Regulation auf die Calcineurin-Aktivität geschlossen werden (Frey et al., 2004a; van Rooij 2004). Mittels quantitativer Real Time-PCR die et al., wurden Expressionsveränderungen des gesamten hypertrophen Genprogramms gemessen. Es konnte im Herzen der beiden positiven Nachkommen der F1-Generation eine signifikante Induktion der miRNA-142-5p Expression für Nppa, Nppb und Rcan1-4 beobachtet werden. Für Rcan1-4 konnte eine deutlich schwächere Expressionssteigerung durch die miRNA-142-5p im Vergleich zu der Expression von Nppa und Nppb gemessen werden, welches durch die inhibitorische und aktivierende Funktion von Rcan1-4 moduliert wird. Das Protein Rcan1-4 inhibiert die Calcineurin-Aktivität durch eine direkte Interaktion mit der katalytischen Untereinheit A. Dabei wird Rcan1-4 aufgrund seiner NFAT-Bindungsstellen in NFAT-abhängig seiner Promotorregion exprimiert, was zu einem negativen Feedback-Mechanismus führt (Yang et al., 2000). Eine signifikante Expressionsvermehrung aller Hypertrophie-assoziierten Genmarker hervorgerufen durch die Uberexpression der miRNA-142-5p spiegelte sich in dem in vitro Experiment der NFAT-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg wieder.

Insgesamt konnte durch die Experimente gezeigt werden, dass die miRNA-142-5p eine wichtige und zentrale Rolle im Herzen spielt, die *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden konnte.

In in vitro Experimenten konnte für die miRNA-142-5p eine bedeutende Rolle im Calcineurin-NFAT die die NFAT-Luziferase Signalweg nachgewiesen werden, Reportergen-Aktivität in Muskelvorläuferzellen und Kardiomyozyten erhöht. Auch konnte in den Kardiomyozyten eine signifikante Induktion der miRNA-142-5p Expression mit PE für Nppa, Nppb und Rcan1-4 gezeigt werden, wobei diese Induktion durch PE für die Hypertrophie-assoziierten Gene Nppa, Nppb und Rcan1-4 signifikant verringert war, was dem Ergebnis der NFAT-Aktivität im Calcineurin-NFAT Signalweg widersprach. Der Effekt mit Phenylephrin ist mit dem Zielgen p300 und der MAP-Kinase Aktivität verknüpft, die die miRNA-142-5p runterregulieren und negativ die Hypertrophie regulieren. Zudem konnte in vivo gezeigt werden, dass die miRNA-142-5p eine entscheidende Rolle bei Infarkt und TAC Tiermodellen spielt. Die transgenen miRNA-142 Mauslinien zeigten eine schwere dilatative Kardiomyopathie die letztendlich zur Herzinsuffizienz führte. Morphometrische Daten-Analysen der transgenen miRNA-142 Mäuse und die Hochregulierung des hypertrophen Genprogramms in den transgenen Nachkommen deuteten auf eine wichtige Funktion der miRNA-142-5p im Herzen. Weitere Experimente zur Klärung der Rolle der miRNA-142-5p in der Hypertrophie sind weiterhin *in vitro* und *in vivo* nötig.

### 4.5 Ausblick

Für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie stellt der Calcineurin-NFAT-Signalweg sowohl eine hinreichende wie auch notwendige Voraussetzung dar. Der vorliegende "miRNA-Hochdurchsatz-Screen" in einer murinen Myoblastenvorläuferzelllinie (C2C12-NFAT Zellen) identifizierte zehn miRNA Modulatoren im Calcineurin-NFAT Signalweg. Durch den Vergleich deren Funktion in Kardiomyozyten wurde die miRNA-142-5p für eine weitere Charakterisierung und ein in vivo Modell ausgewählt. Die miRNA-142-5p wird sowohl im Herzen als auch in Skelettmuskelzellen exprimiert. Eine vorhandene und ausreichende Überexpression der miRNA in murinen Myoblastenvorläuferzellen und in neonatalen ventrikularen Ratten Herzen (Kardiomyozyten) war gegeben. In Kardiomyozyten und in den C2C12-NFAT Zellen konnte in vitro ein Anstieg der NFAT-Aktivität festgestellt werden, die auch in vivo bei der detaillierten Analyse der transgenen miRNA-142 Mauslinien bestätigt werden konnte. Sowohl Infarkt und TAC Mausmodelle als auch die Hypertrophie-assoziierten Genmarker in vivo bestätigten die Ergebnisse des Calcineurin-NFAT Signalweges und unterstreichen die bedeutende Rolle der miRNA-142-5p in der kardialen Hypertrophie. Ein Widerspruch konnte bei der PE-induzierten Hypertrophie festgestellt werden, die an den Mechanismus der MAP-Kinase und des Zielgens p300 geknüpft ist, welcher zeitabhängig und altersabhängig reguliert wurde. Ein direktes Zielgen für die miRNA-142-5p konnte nicht identifiziert werden, so dass Microarrays in Frage kommen, um mögliche direkte Zielgene zu

finden und deren Mechanismen in verschiedenen Signalwegen in Abhängigkeit der miRNA-142-5p zu verstehen. Aufgrund der auffälligen hypertrophen Herzen der transgenen miRNA-142 Mäuse würde als Alternative ein anderes Mausmodell in Frage kommen, wie das Tet-On/Off System. Hierbei kann das Gen in Anwesenheit von Tetrazyklin an- bzw. ausgeschaltet werden (Gossen&Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). In Abbildung 4–2 ist eine schematische Übersicht des Tet-On/Off-Systems dargestellt. Damit könnten weitere Analysen *in vivo* durchgeführt werden und die Rolle der miRNA-142 besser verstanden und geklärt werden.



Abbildung 4–2: Schematische Darstellung der Genregulation mittels Tet-On/Off-System Tet-Off-System: In Abwesenheit von Tetrazyklin (tet) bindet der Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (tTA) an den Tet-op Promotor und initiiert die Expression des Zielgens. In Anwesenheit von Tetrazyklin dissoziiert tTA vom Tet-op Promotor und die Expression des Zielgens kommt zum Erliegen. Tet-On-System: In Abwesenheit von Tetrazyklin kann der reverse Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (rtTA) nicht an den Tet-op Promotor binden und demnach findet keine Expression des Zielgens statt. In Anwesenheit von Tetrazyklin bindet rtTA an den Tet-op Promotor und initiiert die Expression des Zielgens. Modifiziert nach (www.genoway.com).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern Erkenntnisse, dass die miRNA-142-5p sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen des Kardiovaskularsystems beteiligt ist. Diese ist in der Lage die Entwicklung oder das Fortschreiten von Herzhypertrophie zu beeinflussen, was ein bedeutendes Feld für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist, um Behandlungsmethoden von Kardiomyopathien und Herzinsuffizienz zu verbessern und neuartige Medikamente zu entwickeln.

Der miRNA-142-5p konnte im Calcineurin-NFAT Signalweg eine bedeutende Rolle zu gesprochen werden, die noch weiter analysiert werden muss. Es stellt sich zudem die Frage, wie die miRNA-142-5p andere Signalwege moduliert. Mit dem Ziel die Funktion der miRNA-142-5p näher zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit noch zwei weitere

stabile Zelllinien (C2C12-SRF-RE und C2C12-CRE Zelllinie) hergestellt und etabliert und stehen somit für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Auch die neun anderen interessanten gefundenen miRNA Modulatoren im Calcineurin-NFAT Signalweg bieten sich an, weiter untersucht zu werden und deren Funktion und Rolle in anderen Signalwegen zu analysieren.

# 5 Zusammenfassung

Der Calcineurin-NFAT Signalweg ist ein bereits ausführlich untersuchter Signalweg, der eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung einer pathologischen Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz spielt. Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert NFAT, das in den Zellkern transloziert und dort ein pro-hypertrophes Genprogramm iniziiert. Eine ebenfalls bedeutende Rolle wird den micro-RNAs (miRNAs) zugeschrieben, die sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen des Kardiovaskularsystems beteiligt sind. Diese sind ein potentiell bedeutendes Feld für die Entwicklung neuer Therapieansätze und bieten neue Ansatzpunkte, um die Behandlung von Herzerkrankungen voranzutreiben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, systematisch neue miRNA Modulatoren des Calcineurin-NFAT Signalweg zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde ein "miRNA-Screen" entwickelt und getestet. Die Durchführung des "Screens" erfolgte in einer murinen Myoblastenvorläuferzelllinie, die eine Luziferase Expressionskassette unter der transkriptionellen Kontrolle von vier NFAT-Enhancer-Elementen enthielt. Bei der Analyse des "miRNA-Screens" wurde der Einfluss von 1050 miRNA Mimics und 624 miRNA LNA™ Inhibitoren auf den Calcineurin-NFAT Signalweg untersucht. Es wurden zehn miRNA Mimics ausgewählt, die einen signifikanten Einfluss im Calcineurin-NFAT Signalweg aufwiesen. Der Einfluss dieser zehn miRNA Modulatoren auf die NFAT-Aktivität wurde weiter in der Primärkultur der neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten untersucht. In beiden Zellsystemen konnte der gleiche Einfluss der Hochregulation der NFAT-Aktivität mit der miRNA-142-5p ermittelt werden, die für weitere in vitro und in vivo Charakterisierungen ausgewählt wurde. Weiterführende Versuche zeigten, dass die miRNA-142-5p die Phenylephrin-induzierten hypertrophen Effekte in kultivierten Kardiomyozyten verringert. Die negative Regulation der Hypertrophie durch die miRNA-142-5p steht im Widerspruch zu der Modulation im Calcineurin-NFAT Signalweg und geht auf den Mechanismus der MAP-Kinase Aktivität und des Zielgens p300 zurück. Der miRNA-142-5p konnte eine bedeutende Rolle der Regulation in Mausmodellen durch transversale Aortenkonstruktion (TAC) und LAD-Ligatur (Myokardinfarkt) zugeschrieben werden. Um den Einfluss der miRNA-142-5p auf die kardiale Hypertrophie in vivo zu prüfen, wurde eine transgene Mauslinie generiert, die die miRNA-142-5p herzspezifisch überexprimiert. Die transgenen miRNA-142 Mäuse zeigten eine schwere dilatative Kardiomyopathie die letztendlich zu einer Herzinsuffizienz führt.

Schlussfolgend wurde die miRNA-142-5p als neuer Modulator des Calcineurin-NFAT Signalweges identifiziert. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und Erkenntnisse tragen dazu bei, das Verständnis der Funktion und Regulation der miRNA-142-5p zu vertiefen und könnten künftig neue Ansatzpunkte für Therapien von Herzerkrankungen liefern.

# 6 Abstract

The calcineurin-NFAT signaling pathway plays a critical role in pathological cardiac hypertrophy and heart failure. Activated calcineurin dephosphorylates NFAT, which translocates into the nucleus and activates a prohypertrophic gene program. Recently, an important role was also described for micro-RNAs (miRNAs), which regulate and finetune transcription in diverse physiological and pathological processes. This might also represent a potentially important field for the better understanding and the development of new therapies of heart diseases.

The aim of this study was thus to systematically identify new miRNA modulators of the calcineurin-NFAT signaling pathway. First, an experimental setup for a high-throughput miRNA-screen was designed and tested. The screen was performed in a murine myoblast cell line carrying a luciferase expression cassette under the transcriptional control of four NFAT enhancer sites. During the subsequent analyses of the screen the influence of 1050 miRNA Mimics and 624 miRNA LNA<sup>™</sup> inhibitors on the calcineurin-NFAT signaling pathway was tested. Ten miRNA Mimics were selected which showed a significant influence on calcineurin-NFAT signaling. The influence of these ten miRNA modulators on the NFAT activity was further studied in the primary culture of neonatal rat ventricular cardiomyocytes. Both cell systems show a consistent upregulation of NFAT activity by miRNA-142-5p. Therefore miRNA-142-5p was selected for further in vitro and in vivo characterization. Subsequent experiments showed that miRNA-142-5p attenuated the phenylephrine-induced hypertrophic effects in cultured cardiomyocytes. The negative regulation of hypertrophy by miRNA-142-5p is in contrast to the positive modulation in the calcineurin-NFAT pathway, which might be explained by an influence on the MAP kinase activity and the alternative miRNA-142-5p target gene p300. MiRNA-142-5p has been shown to play an important role in the transcriptional response of mouse models of cardiac disease such as transversal aortic constriction (TAC) and LAD ligation (myocardial infarct). To analyze the influence of the miRNA-142-5p on cardiac hypertrophy in vivo, a transgenic mouse line was now generated that overexpresses miRNA-142-5p in a heart-specific fashion. This transgenic mouse lines miRNA-142 show severe dilated cardiomyopathy, which finally leads to heart failure and early sudden death.

In summary miRNA-142-5p was identified as a new modulator of the calcineurin-NFAT signaling pathway. The obtained results and the findings contribute to the understanding of the function and regulation of miRNA-142-5p and could provide a starting point for the development of novel therapies of heart disease in the future.

# 7 Literatur

Aikin R, Cervantes A, D'Angelo G, Ruel L, Lacas-Gervais S, Schaub S, Therond P (2012) A genome-wide RNAi screen identifies regulators of cholesterol-modified hedgehog secretion in Drosophila. *PLoS One 7:* e33665

Alvarez ML (2014) Faster experimental validation of microRNA targets using cold fusion cloning and a dual firefly-Renilla luciferase reporter assay. *Methods Mol Biol 1182*: 227-243

Andersson B, Caidahl K, Waagstein F (1995) An echocardiographic evaluation of patients with idiopathic heart failure. *Chest 107:* 680-689

Andersson E, Tryggvason U, Deng Q, Friling S, Alekseenko Z, Robert B, Perlmann T, Ericson J (2006) Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell 124:* 393-405

Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, Richardson JA, Hill JA, Olson EN (2002) Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A 99:* 907-912

Aramburu J, Heitman J, Crabtree GR (2004) Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep 5:* 343-348

Arber S, Hunter JJ, Ross J, Jr., Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P (1997) MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 88: 393-403

Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature 441:* 595-600

Bakal C, Linding R, Llense F, Heffern E, Martin-Blanco E, Pawson T, Perrimon N (2008) Phosphorylation networks regulating JNK activity in diverse genetic backgrounds. *Science 322:* 453-456

Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzo M, Garcia-Foncillas J (2006) Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer 5:* 29

Barford D, Das AK, Egloff MP (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct 27:* 133-164

Barsanti C, Trivella MG, D'Aurizio R, El Baroudi M, Baumgart M, Groth M, Caruso R, Verde A, Botta L, Cozzi L, Pitto L (2015) Differential regulation of microRNAs in end-stage failing hearts is associated with left ventricular assist device unloading. *Biomed Res Int 2015:* 592512

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell 116:* 281-297

Barwe SP, Jordan MC, Skay A, Inge L, Rajasekaran SA, Wolle D, Johnson CL, Neco P, Fang K, Rozengurt N, Goldhaber JI, Roos KP, Rajasekaran AK (2009) Dysfunction of ouabain-induced cardiac contractility in mice with heart-specific ablation of Na,K-ATPase beta1-subunit. *J Mol Cell Cardiol 47:* 552-560

Bauersachs J, Thum T (2011) Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs. *Circ Res 109*: 334-347

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275: 1930-1934

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature 409:* 363-366

Beullens M, Van Eynde A, Stalmans W, Bollen M (1992) The isolation of novel inhibitory polypeptides of protein phosphatase 1 from bovine thymus nuclei. *J Biol Chem* 267: 16538-16544

Birks DK, Barton VN, Donson AM, Handler MH, Vibhakar R, Foreman NK (2011) Survey of MicroRNA expression in pediatric brain tumors. *Pediatr Blood Cancer* 56: 211-216

Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32: 1171-1180

Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM (2007) MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA 297:* 1901-1908

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA 10:* 185-191

Bookwalter CS, Trybus KM (2006) Functional consequences of a mutation in an expressed human alpha-cardiac actin at a site implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem 281:* 16777-16784

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions 6:* 468-475

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

Braunwald E (2013) Heart failure. JACC Heart Fail 1: 1-20

Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Braunwart J, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF, Hewett TE, Molkentin JD (2003) Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *Journal of Clinical Investigation 111:* 1475-1486

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell 113*: 25-36

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol 3:* e85

Brown AM (2005) Canonical Wnt signaling: high-throughput RNAi widens the path. *Genome Biol 6:* 231

Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD (2002) Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A 99:* 4586-4591 Burkard N, Becher J, Heindl C, Neyses L, Schuh K, Ritter O (2005) Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation 111:* 1045-1053

Bushati N, Cohen SM (2007) microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol 23: 175-205

Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretskova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, Sotnikova TD, Menegon A, Roncaglia P, Colciago G, Russo G, Carninci P, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Gustincich S, Dityatev A, Broccoli V (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476: 224-227

Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, Lopez-Otin C (2002) Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene 283:* 49-62

Candini O, Spano C, Murgia A, Grisendi G, Veronesi E, Piccinno MS, Ferracin M, Negrini M, Giacobbi F, Bambi F, Horwitz EM, Conte P, Paolucci P, Dominici M (2015) Mesenchymal progenitors aging highlights a miR-196 switch targeting HOXB7 as master regulator of proliferation and osteogenesis. *Stem Cells* 33: 939-950

Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH (2006) Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci 29:* 77-103

Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Hoydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW, 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med 13:* 613-618

Chai S, Tong M, Ng KY, Kwan PS, Chan YP, Fung TM, Lee TK, Wong N, Xie D, Yuan YF, Guan XY, Ma S (2014) Regulatory role of miR-142-3p on the functional hepatic cancer stem cell marker CD133. *Oncotarget 5:* 5725-5735

Chan B, Greenan G, McKeon F, Ellenberger T (2005) Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A 102:* 13075-13080

Chao TK, Yo YT, Liao YP, Wang YC, Su PH, Huang TS, Lai HC (2013) LIM-homeobox transcription factor 1, alpha (LMX1A) inhibits tumourigenesis, epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol 128:* 475-482

Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q (2011) MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *J Cell Mol Med 15:* 14-23

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science 303:* 83-86

Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet 38:* 228-233

Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, Rojas M, Hammond SM, Schneider MD, Selzman CH, Meissner G, Patterson C, Hannon GJ, Wang DZ (2008) Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A 105*: 2111-2116

Chen PY, Meister G (2005) microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biol Chem* 386: 1205-1218

Chen Y, Dawes PT, Packham JC, Mattey DL (2012) Interaction between smoking and functional polymorphism in the TGFB1 gene is associated with ischaemic heart disease and myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther 14:* R81

Chen YJ, Wang YN, Chang WC (2007) ERK2-mediated C-terminal serine phosphorylation of p300 is vital to the regulation of epidermal growth factor-induced keratin 16 gene expression. *J Biol Chem* 282: 27215-27228

Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA (1997) Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem 272:* 17223-17229

Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453-508

Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE (1997) The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J 18:* 208-225

Crippa S, Cassano M, Messina G, Galli D, Galvez BG, Curk T, Altomare C, Ronzoni F, Toelen J, Gijsbers R, Debyser Z, Janssens S, Zupan B, Zaza A, Cossu G, Sampaolesi M (2011) miR669a and miR669q prevent skeletal muscle differentiation in postnatal cardiac progenitors. *J Cell Biol* 193: 1197-1212

da Costa Martins PA, Bourajjaj M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, Molkentin JD, De Windt LJ (2008) Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation 118*: 1567-1576

da Costa Martins PA, Salic K, Gladka MM, Armand AS, Leptidis S, el Azzouzi H, Hansen A, Coenen-de Roo CJ, Bierhuizen MF, van der Nagel R, van Kuik J, de Weger R, de Bruin A, Condorelli G, Arbones ML, Eschenhagen T, De Windt LJ (2010) MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat Cell Biol 12:* 1220-1227

DasGupta R, Gonsalves FC (2008) High-throughput RNAi screen in Drosophila. *Methods Mol Biol 469:* 163-184

Deng B, Zhang Y, Zhang S, Wen F, Miao Y, Guo K (2015) MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation and invasion of cervical cancer cells by targeting FZD7. *Tumour Biol* 

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231-235

Deschamps AM, Spinale FG (2006) Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res 69:* 666-676

Di Giammartino DC, Nishida K, Manley JL (2011) Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Mol Cell* 43: 853-866

Dickhuth HH, Rocker K, Mayer F, Konig D, Korsten-Reck U (2004) [Endurance training and cardial adaptation (athlete's heart)]. *Herz* 29: 373-380

Dmitriev P, Barat A, Polesskaya A, O'Connell MJ, Robert T, Dessen P, Walsh TA, Lazar V, Turki A, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Lipinski M, Vassetzky YS (2013) Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC Genomics* 14: 265

Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev 18:* 504-511

Dong DL, Chen C, Huo R, Wang N, Li Z, Tu YJ, Hu JT, Chu X, Huang W, Yang BF (2010) Reciprocal repression between microRNA-133 and calcineurin regulates cardiac hypertrophy: a novel mechanism for progressive cardiac hypertrophy. *Hypertension 55:* 946-952

Dong W, Feng L, Xie Y, Zhang H, Wu Y (2011) Hypermethylation-mediated reduction of LMX1A expression in gastric cancer. *Cancer Sci 102:* 361-366

Dorn GW, 2nd, Robbins J, Sugden PH (2003) Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 92: 1171-1175

Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, Clark R, Chien KR, Ross J, Jr. (1995) Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *Journal of Clinical Investigation 95:* 619-627

Duong Van Huyen JP, Tible M, Gay A, Guillemain R, Aubert O, Varnous S, Iserin F, Rouvier P, Francois A, Vernerey D, Loyer X, Leprince P, Empana JP, Bruneval P, Loupy A, Jouven X (2014) MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. *Eur Heart J 35:* 3194-3202

Eble DM, Qi M, Waldschmidt S, Lucchesi PA, Byron KL, Samarel AM (1998) Contractile activity is required for sarcomeric assembly in phenylephrine-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Am J Physiol 274:* C1226-1237

Edwalds-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res 25:* 2547-2561

Ekholm EM, Tahvanainen KU, Metsala T (1997) Heart rate and blood pressure variabilities are increased in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 177: 1208-1212

Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM (2013) Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart Fail 15:* 1138-1147

Endoh M, Hiramoto T, Ishihata A, Takanashi M, Inui J (1991) Myocardial alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropic effect and changes in phosphatidylinositol metabolism. Species differences in receptor distribution and the intracellular coupling process in mammalian ventricular myocardium. *Circ Res 68:* 1179-1190

Fallahi A, Ravasi A, Farhud D (2011) Genetic doping and health damages. *Iran J Public Health 40:* 1-14

Fechner H, Sipo I, Westermann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, Kurreck J, Zeichhardt H, Muller O, Vetter R, Erdmann V, Tschope C, Poller W (2008) Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl)* 86: 987-997

Fedorova E, Zink D (2008) Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta 1783*: 2174-2184

Finkler A, Ashery-Padan R, Fromm H (2007) CAMTAs: calmodulin-binding transcription activators from plants to human. *FEBS Lett 581:* 3893-3898

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature 391:* 806-811

Fox DS, Heitman J (2005) Calcineurin-binding protein Cbp1 directs the specificity of calcineurin-dependent hyphal elongation during mating in Cryptococcus neoformans. *Eukaryot Cell 4:* 1526-1538

Frey N, Barrientos T, Shelton JM, Frank D, Rutten H, Gehring D, Kuhn C, Lutz M, Rothermel B, Bassel-Duby R, Richardson JA, Katus HA, Hill JA, Olson EN (2004a) Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med 10:* 1336-1343

Frey N, Frank D, Lippl S, Kuhn C, Kogler H, Barrientos T, Rohr C, Will R, Muller OJ, Weiler H, Bassel-Duby R, Katus HA, Olson EN (2008) Calsarcin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *Journal of Clinical Investigation 118:* 3598-3608

Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA (2004b) Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation 109:* 1580-1589

Frey N, McKinsey TA, Olson EN (2000a) Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med 6:* 1221-1227

Frey N, Olson EN (2002) Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem* 277: 13998-14004

Frey N, Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65: 45-79

Frey N, Richardson JA, Olson EN (2000b) Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A 97:* 14632-14637

Friedman A, Perrimon N (2006) A functional RNAi screen for regulators of receptor tyrosine kinase and ERK signalling. *Nature 444:* 230-234

Garcia-Cozar FJ, Okamura H, Aramburu JF, Shaw KT, Pelletier L, Showalter R, Villafranca E, Rao A (1998) Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. *J Biol Chem* 273: 23877-23883

Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA (1995) Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. *Circ Res 76:* 907-914

Gardner KL, Sanford JL, Mays TA, Rafael-Fortney JA (2006) CASK localizes to nuclei in developing skeletal muscle and motor neuron culture models and is agrin-independent. *J Cell Physiol 206:* 196-202

Garnatz AS, Gao Z, Broman M, Martens S, Earley JU, Svensson EC (2014) FOG-2 mediated recruitment of the NuRD complex regulates cardiomyocyte proliferation during heart development. *Dev Biol 395:* 50-61

Gauthier-Rouviere C, Vandromme M, Tuil D, Lautredou N, Morris M, Soulez M, Kahn A, Fernandez A, Lamb N (1996) Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts. *Mol Biol Cell* 7: 719-729

Ge Q, Gerard J, Noel L, Scroyen I, Brichard SM (2012) MicroRNAs regulated by adiponectin as novel targets for controlling adipose tissue inflammation. *Endocrinology* 153: 5285-5296

Ge Y, Chen J (2011) MicroRNAs in skeletal myogenesis. Cell Cycle 10: 441-448

Ghanbari R, Mosakhani N, Asadi J, Nouraee N, Mowla SJ, Yazdani Y, Mohamadkhani A, Poustchi H, Knuutila S, Malekzadeh R (2015) Downregulation of Plasma MiR-142-3p and MiR-26a-5p in Patients With Colorectal Carcinoma. *Iran J Cancer Prev 8:* e2329

Gladka MM, da Costa Martins PA, De Windt LJ (2012) Small changes can make a big difference - microRNA regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol 52:* 74-82

Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive Promotors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547-5551

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science 268:* 1766-1769

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res 34:* D140-144

Grimm D, Cameron D, Griese DP, Riegger GA, Kromer EP (1998) Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res 40:* 297-306

Guerini D, Montell C, Klee CB (1992) Molecular cloning and characterization of the genes encoding the two subunits of Drosophila melanogaster calcineurin. *J Biol Chem* 267: 22542-22549

Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266: 9180-9185

Gunning P, O'Neill G, Hardeman E (2008) Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev* 88: 1-35

Gusterson R, Brar B, Faulkes D, Giordano A, Chrivia J, Latchman D (2002) The transcriptional co-activators CBP and p300 are activated via phenylephrine through the p42/p44 MAPK cascade. *J Biol Chem* 277: 2517-2524

Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A (2007) Signalling to transcription: store-operated Ca2+ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42: 145-156

Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A (2006) A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441: 646-650

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science 286:* 950-952

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature 404:* 293-296

Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T, Molkentin JD (2001) Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation 103:* 670-677

Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H, Koga Y, Nakamura H, Matsuzaki M, Choi BY, Bae SW, You CW, Han KH, Park JE, Knoll R, Hoshijima M, Chien KR, Kimura A (2004) Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol 44:* 2192-2201

Heineke J, Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 589-600

Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993) The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol 22:* 6A-13A

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-2232

Holtz J (1992) [The significance of myocardial hypertrophy in heart failure]. Z Kardiol 81 Suppl 4: 41-48

Hui AB, Shi W, Boutros PC, Miller N, Pintilie M, Fyles T, McCready D, Wong D, Gerster K, Waldron L, Jurisica I, Penn LZ, Liu FF (2009) Robust global micro-RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Lab Invest 89:* 597-606

lorio MV, Croce CM (2012) MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med 4:* 143-159

Ishino K, Botker HE, Clausen T, Hetzer R, Sehested J (1999) Myocardial adenine nucleotides, glycogen, and Na, K-ATPase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy requiring mechanical circulatory support. *Am J Cardiol 83:* 396-399

Ito T, Fujio Y, Takahashi K, Azuma J (2007) Degradation of NFAT5, a transcriptional regulator of osmotic stress-related genes, is a critical event for doxorubicin-induced cytotoxicity in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 282: 1152-1160

Jaffe M, Sesti C, Washington IM, Du L, Dronadula N, Chin MT, Stolz DB, Davis EC, Dichek DA (2012) Transforming growth factor-beta signaling in myogenic cells regulates vascular morphogenesis, differentiation, and matrix synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:* e1-11

Jeong MH, Lee JS, Kim do H, Park WJ, Yang DK (2012) Identification of novel microRNAs negatively regulating cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 428: 191-196

Jin P, Wang E, Ren J, Childs R, Shin JW, Khuu H, Marincola FM, Stroncek DF (2008) Differentiation of two types of mobilized peripheral blood stem cells by microRNA and cDNA expression analysis. *J Transl Med 6:* 39

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol 2:* e363

Joshi SR, McLendon JM, Comer BS, Gerthoffer WT (2011) MicroRNAs-control of essential genes: Implications for pulmonary vascular disease. *Pulm Circ 1*: 357-364

Jung J, Kim TG, Lyons GE, Kim HR, Lee Y (2005) Jumonji regulates cardiomyocyte proliferation via interaction with retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 280: 30916-30923

Kang PM, Izumo S (2003) Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol Med* 9: 177-182

Kannel WB (2000) Incidence and epidemiology of heart failure. Heart Fail Rev 5: 167-173

Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB, Betsuyaku T, Yamada KA, Saffitz JE, Kovacs A (2002) Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr 15:* 601-609

Kasashima K, Nakamura Y, Kozu T (2004) Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 403-410

Katus HA, Kreuzer J, Schoels W (2003) [Evidence and advances in cardiology]. *Dtsch Med Wochenschr 128:* 2117

Kee HJ, Park S, Kwon JS, Choe N, Ahn Y, Kook H, Jeong MH (2013) B cell translocation gene, a direct target of miR-142-5p, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by down-regulating cell cycle progression. *FEBS Lett 587:* 2385-2392

Kestler HA, Muller A, Gress TM, Buchholz M (2005) Generalized Venn diagrams: a new method of visualizing complex genetic set relations. *Bioinformatics* 21: 1592-1595

Kim J, Wende AR, Sena S, Theobald HA, Soto J, Sloan C, Wayment BE, Litwin SE, Holzenberger M, LeRoith D, Abel ED (2008) Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol 22:* 2531-2543

Kim TG, Kraus JC, Chen J, Lee Y (2003) JUMONJI, a critical factor for cardiac development, functions as a transcriptional repressor. *J Biol Chem* 278: 42247-42255

Kim VN (2005) Small RNAs: classification, biogenesis, and function. Mol Cells 19: 1-15

Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol 10:* 126-139

Kincaid R (1993) Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man. A study in structural conservatism and biological diversity. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 27: 1-23

Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot* (*Tokyo*) 40: 1249-1255

Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR (2002) The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell 111*: 943-955

Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deepsequencing data. *Nucleic Acids Res 39:* D152-157
Kuhn C, Frank D, Will R, Jaschinski C, Frauen R, Katus HA, Frey N (2009) DYRK1A is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 284: 17320-17327

Kumar A, Crawford K, Close L, Madison M, Lorenz J, Doetschman T, Pawlowski S, Duffy J, Neumann J, Robbins J, Boivin GP, O'Toole BA, Lessard JL (1997) Rescue of cardiac alpha-actin-deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A 94:* 4406-4411

Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K (1997) Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 272: 556-562

Kuwahara K, Nakao K (2011) New molecular mechanisms for cardiovascular disease:transcriptional pathways and novel therapeutic targets in heart failure. *J Pharmacol Sci 116:* 337-342

Kwanhian W, Lenze D, Alles J, Motsch N, Barth S, Doll C, Imig J, Hummel M, Tinguely M, Trivedi P, Lulitanond V, Meister G, Renner C, Grasser FA (2012) MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med 1:* 141-155

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science 294:* 853-858

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol 12:* 735-739

Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH (1998) Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem* 273: 18325-18331

Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell 129:* 1401-1414

Langlois D, Hneino M, Bouazza L, Parlakian A, Sasaki T, Bricca G, Li JY (2010) Conditional inactivation of TGF-beta type II receptor in smooth muscle cells and epicardium causes lethal aortic and cardiac defects. *Transgenic Res 19:* 1069-1082

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science 294:* 858-862

Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunnmon P, Yuan D, Chien KR (1988) Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem* 263: 7352-7358

Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science 294:* 862-864

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75: 843-854

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J 23:* 4051-4060

Leonoudakis D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LM, Adams ME, Froehner SC, Yates JR, 3rd, Vandenberg CA (2004a) Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* 279: 22331-22346

Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA (2004b) A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem* 279: 19051-19063

Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK (1996) The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA 275:* 1557-1562

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell 115:* 787-798

Li A, Ahsen OO, Liu JJ, Du C, McKee ML, Yang Y, Wasco W, Newton-Cheh CH, O'Donnell CJ, Fujimoto JG, Zhou C, Tanzi RE (2013) Silencing of the Drosophila ortholog of SOX5 in heart leads to cardiac dysfunction as detected by optical coherence tomography. *Hum Mol Genet 22:* 3798-3806

Li HL, Yin R, Chen D, Liu D, Wang D, Yang Q, Dong YG (2007) Long-term activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biochem 100:* 1086-1099

Li W, Li Q, Jiao Y, Qin L, Ali R, Zhou J, Ferruzzi J, Kim RW, Geirsson A, Dietz HC, Offermanns S, Humphrey JD, Tellides G (2014) Tgfbr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *Journal of Clinical Investigation* 124: 755-767

Liang Q, Bueno OF, Wilkins BJ, Kuan CY, Xia Y, Molkentin JD (2003) c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J 22:* 5079-5089

Liem KF, Jr., Tremml G, Jessell TM (1997) A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91: 127-138

Lim HW, Molkentin JD (1999) Calcineurin and human heart failure. Nat Med 5: 246-247

Lin X, Sikkink RA, Rusnak F, Barber DL (1999) Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J Biol Chem* 274: 36125-36131

Lingrel JB, Kuntzweiler T (1994) Na+,K(+)-ATPase. J Biol Chem 269: 19659-19662

Liu JO (2009) Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. *Immunol Rev 228:* 184-198

Liu N, Olson EN (2010) MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell 18:* 510-525

Liu X, Sempere LF, Galimberti F, Freemantle SJ, Black C, Dragnev KH, Ma Y, Fiering S, Memoli V, Li H, DiRenzo J, Korc M, Cole CN, Bak M, Kauppinen S, Dmitrovsky E (2009) Uncovering growth-suppressive MicroRNAs in lung cancer. *Clin Cancer Res 15:* 1177-1183

Loomans HA, Andl CD (2014) Intertwining of Activin A and TGFbeta Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion. *Cancers (Basel)* 7:70-91

Luedde M, Katus HA, Frey N (2006) Novel molecular targets in the treatment of cardiac hypertrophy. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov 1:* 1-20

Luo X, Lin H, Pan Z, Xiao J, Zhang Y, Lu Y, Yang B, Wang Z (2008) Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem* 283: 20045-20052

Lyakh L, Ghosh P, Rice NR (1997) Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol Cell Biol* 17: 2475-2484

MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J (2005) Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 7: 591-600

Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Vergoulis T, Koziris N, Sellis T, Tsanakas P, Hatzigeorgiou AG (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res 37:* W273-276

Marble DD, Hegle AP, Snyder ED, 2nd, Dimitratos S, Bryant PJ, Wilson GF (2005) Camguk/CASK enhances Ether-a-go-go potassium current by a phosphorylation-dependent mechanism. *J Neurosci* 25: 4898-4907

Maron BJ, Pelliccia A (2006) The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation 114:* 1633-1644

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB (2006) Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation 113:* 1807-1816

Martinez-Morales PL, Quiroga AC, Barbas JA, Morales AV (2010) SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT-beta-catenin pathway. *EMBO Rep 11*: 466-472

Mathupala SP, Sloan AE (2009) An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones. *Biotechniques* 46: 305-307

Maximov A, Sudhof TC, Bezprozvanny I (1999) Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *J Biol Chem* 274: 24453-24456

McDaneld TG, Smith TP, Doumit ME, Miles JR, Coutinho LL, Sonstegard TS, Matukumalli LK, Nonneman DJ, Wiedmann RT (2009) MicroRNA transcriptome profiles during swine skeletal muscle development. *BMC Genomics* 10:77

McNabb DS, Reed R, Marciniak RA (2005) Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in Saccharomyces cerevisiae. *Eukaryot Cell 4:* 1539-1549

Meidell RS, Sen A, Henderson SA, Slahetka MF, Chien KR (1986) Alpha 1-adrenergic stimulation of rat myocardial cells increases protein synthesis. *Am J Physiol 251:* H1076-1084

Meng L, Bregitzer P, Zhang S, Lemaux PG (2003) Methylation of the exon/intron region in the Ubi1 Promotor complex correlates with transgene silencing in barley. *Plant Mol Biol 53:* 327-340

Mildner A, Chapnik E, Manor O, Yona S, Kim KW, Aychek T, Varol D, Beck G, Itzhaki ZB, Feldmesser E, Amit I, Hornstein E, Jung S (2013) Mononuclear phagocyte miRNome analysis identifies miR-142 as critical regulator of murine dendritic cell homeostasis. *Blood 121*: 1016-1027

Millonig JH, Millen KJ, Hatten ME (2000) The mouse Dreher gene Lmx1a controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature 403:* 764-769

Mizuno T, Chou MY, Inouye M (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A 81:* 1966-1970

Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baandrup U, Borglum AD (1999) Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation 103:* R39-43

Mohr S, Bakal C, Perrimon N (2010) Genomic screening with RNAi: results and challenges. *Annu Rev Biochem* 79: 37-64

Molkentin JD, Dorn GW, 2nd (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63: 391-426

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93: 215-228

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63

Mosterd A, Hoes AW (2007) Clinical epidemiology of heart failure. Heart 93: 1137-1146

Motoyama J, Kitajima K, Kojima M, Kondo S, Takeuchi T (1997) Organogenesis of the liver, thymus and spleen is affected in jumonji mutant mice. *Mech Dev 66:* 27-37

Mudd JO, Kass DA (2008) Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature 451:* 919-928

Muller FU, Neumann J, Schmitz W (2000) Transcriptional regulation by cAMP in the heart. *Mol Cell Biochem 212:* 11-17

Nair N, Kumar S, Gongora E, Gupta S (2013) Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol Cell Biochem* 376: 33-40

Nakamura K, Hirohata S, Murakami T, Miyoshi T, DemiRcan K, Oohashi T, Ogawa H, Koten K, Toeda K, Kusachi S, Ninomiya Y, Shiratori Y (2004) Dynamic induction of ADAMTS1 gene in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biochem* 136: 439-446

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289

Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R (2009) Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int 106:* 269-275

Newmark PA (2005) Opening a new can of worms: a large-scale RNAi screen in planarians. *Dev Cell 8:* 623-624

Nishiyama T, Kaneda R, Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Fukuda K (2012) miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun 425:* 755-761

Niu Z, Li A, Zhang SX, Schwartz RJ (2007) Serum response factor micromanaging cardiogenesis. *Curr Opin Cell Biol 19:* 618-627

Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N (2012) microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget 3:* 9-21

Norgaard A, Bagger JP, Bjerregaard P, Baandrup U, Kjeldsen K, Thomsen PE (1988) Relation of left ventricular function and Na,K-pump concentration in suspected idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol 61:* 1312-1315

Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Fujita H, Moriyama T, Ohtsuka T, Ueda J, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M (2011) MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol 18:* 2381-2387

Olsen O, Liu H, Wade JB, Merot J, Welling PA (2002) Basolateral membrane expression of the Kir 2.3 channel is coordinated by PDZ interaction with Lin-7/CASK complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C183-195

Olson EN, Molkentin JD (1999) Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition: hope or hype? *Circ Res* 84: 623-632

Olson TM, Doan TP, Kishimoto NY, Whitby FG, Ackerman MJ, Fananapazir L (2000) Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1687-1694

Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT (1998) Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science 280:* 750-752

Park S, Uesugi M, Verdine GL (2000) A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A 97:* 7130-7135

Park YD, Papp I, Moscone EA, Iglesias VA, Vaucheret H, Matzke AJ, Matzke MA (1996) Gene silencing mediated by Promotor homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J 9:* 183-194

Parry DH, Xu J, Ruvkun G (2007) A whole-genome RNAi Screen for C. elegans miRNA pathway genes. *Curr Biol 17:* 2013-2022

Patten RD, Udelson JE, Konstam MA (1998) Ventricular remodeling and its prevention in the treatment of heart failure. *Curr Opin Cardiol 13:* 162-167

Paul S (2003) Ventricular remodeling. Crit Care Nurs Clin North Am 15: 407-411

Perkins G, Laurent-Puig P (2015) [Colorectal cancer biology]. Rev Prat 65: 802-806

Perron MP, Provost P (2008) Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front Biosci* 13: 2537-2547

Poizat C, Puri PL, Bai Y, Kedes L (2005) Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells. *Mol Cell Biol 25:* 2673-2687

Pollak M (2008) Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 8: 915-928

Poller W, Hajjar R, Schultheiss HP, Fechner H (2010) Cardiac-targeted delivery of regulatory RNA molecules and genes for the treatment of heart failure. *Cardiovasc Res 86:* 353-364

Pu M, Hayashi T, Cottam H, Mulvaney J, Arkin M, Corr M, Carson D, Messer K (2012) Analysis of high-throughput screening assays using cluster enrichment. *Stat Med 31:* 4175-4189

Qi X, Li J, Zhou C, Lv C, Tian M (2015) MiR-142-3p Suppresses SOCS6 Expression and Promotes Cell Proliferation in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cell Physiol Biochem 36:* 1743-1752

Quattrocelli M, Crippa S, Montecchiani C, Camps J, Cornaglia AI, Boldrin L, Morgan J, Calligaro A, Casasco A, Orlacchio A, Gijsbers R, D'Hooge J, Toelen J, Janssens S, Sampaolesi M (2013) Long-term miR-669a therapy alleviates chronic dilated cardiomyopathy in dystrophic mice. *J Am Heart Assoc 2:* e000284

Rajewsky N, Socci ND (2004) Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol* 267: 529-535

Rangrez AY, Bernt A, Poyanmehr R, Harazin V, Boomgaarden I, Kuhn C, Rohrbeck A, Frank D, Frey N (2013) Dysbindin is a potent inducer of RhoA-SRF-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol 203:* 643-656

Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF (2006) Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A 103:* 8721-8726

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature 403:* 901-906

Ren J, Samson WK, Sowers JR (1999) Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol 31:* 2049-2061

Rescan PY, Ralliere C (2010) A Sox5 gene is expressed in the myogenic lineage during trout embryonic development. *Int J Dev Biol 54:* 913-918

Retaux S, Rogard M, Bach I, Failli V, Besson MJ (1999) Lhx9: a novel LIM-homeodomain gene expressed in the developing forebrain. *J Neurosci 19:* 783-793

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfas I, Martin I, Nordet P (1996) Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-842

Ritter O, Hack S, Schuh K, Rothlein N, Perrot A, Osterziel KJ, Schulte HD, Neyses L (2002) Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation 105:* 2265-2269

Robson A, Allinson KR, Anderson RH, Henderson DJ, Arthur HM (2010) The TGFbeta type II receptor plays a critical role in the endothelial cells during cardiac development. *Dev Dyn* 239: 2435-2442

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhelper ME, Field LJ, Ross J, Jr., Chien KR (1991) Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A 88*: 8277-8281

Rusnak F, Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev 80:* 1483-1521

Sadoshima J, Izumo S (1993) Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 73: 413-423

Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Hosoe N, Nakamura M, Mukai M, Saito H, Hibi T (2012) Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma resistant to Helicobacter pylori eradication. *PLoS One 7:* e47396

Scherer C, Pfisterer L, Wagner AH, Hodebeck M, Cattaruzza M, Hecker M, Korff T (2014) Arterial wall stress controls NFAT5 activity in vascular smooth muscle cells. *J Am Heart Assoc 3:* e000626

Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M, Gockel I (2009) High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol 15:* 2089-2096

Schreiber SL, Crabtree GR (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13: 136-142

Schwartz RJ, Schneider MD (2006) CAMTA in cardiac hypertrophy. Cell 125: 427-429

Schwinger RH, Bundgaard H, Muller-Ehmsen J, Kjeldsen K (2003) The Na, K-ATPase in the failing human heart. *Cardiovasc Res 57:* 913-920

Schwinger RH, Wang J, Frank K, Muller-Ehmsen J, Brixius K, McDonough AA, Erdmann E (1999) Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na+,K+-ATPase activity but unchanged Na+-Ca2+ exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation 99:* 2105-2112

Seeger TS, Frank D, Rohr C, Will R, Just S, Grund C, Lyon R, Luedde M, Koegl M, Sheikh F, Rottbauer W, Franke WW, Katus HA, Olson EN, Frey N (2010) Myozap, a novel intercalated disc protein, activates serum response factor-dependent signaling and is required to maintain cardiac function in vivo. *Circ Res 106:* 880-890

Sekar N, Veldhuis JD (2001) Concerted transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene by insulin and luteinizing hormone in cultured porcine granulosa-luteal cells: possible convergence of protein kinase a, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Endocrinology* 142: 2921-2928

Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature 455***:** 58-63

Sempere LF, Liu X, Dmitrovsky E (2009) Tumor-suppressive microRNAs in Lung cancer: diagnostic and therapeutic opportunities. *ScientificWorldJournal 9:* 626-628

Shan ZX, Lin QX, Tan HH, Deng CY, Liu XY, Xiao DZ, Yu XY (2009) [An efficient method for screening effective siRNAs using dual-luciferase reporter assay system]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 29:* 1577-1581

Sharma S, Liu J, Wei J, Yuan H, Zhang T, Bishopric NH (2012) Repression of miR-142 by p300 and MAPK is required for survival signalling via gp130 during adaptive hypertrophy. *EMBO Mol Med 4:* 617-632

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241: 202-205

Shen E, Chen RZ, Yang YZ, Guo Q, Yu Y, Zou YZ, Chen HZ (2007) [Association between myocardial ADAMTS-1 expression and myocardial fibrosis in a murine model of viral myocarditis]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi 35:* 854-858

Shenolikar S, Nairn AC (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 23: 1-121

Shim S, Kwan KY, Li M, Lefebvre V, Sestan N (2012) Cis-regulatory control of corticospinal system development and evolution. *Nature* 486: 74-79

Shin SY, Yang HW, Kim JR, Heo WD, Cho KH (2011) A hidden incoherent switch regulates RCAN1 in the calcineurin-NFAT signaling network. *J Cell Sci 124:* 82-90

Slagsvold KH, Johnsen AB, Rognmo O, Hoydal M, Wisloff U, Wahba A (2014) Comparison of left versus right atrial myocardium in patients with sinus rhythm or atrial fibrillation - an assessment of mitochondrial function and microRNA expression. *Physiol Rep 2* 

Smagulova FO, Manuylov NL, Leach LL, Tevosian SG (2008) GATA4/FOG2 transcriptional complex regulates Lhx9 gene expression in murine heart development. *BMC Dev Biol 8:* 67

Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugghe B, Lefebvre V (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell 1:* 277-290

Spadaro PA, Bredy TW (2012) Emerging role of non-coding RNA in neural plasticity, cognitive function, and neuropsychiatric disorders. *Front Genet 3:* 132

Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J (1991) Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene Promotor in transgenic mice. *J Biol Chem 266:* 24613-24620

Suckau L, Fechner H, Chemaly E, Krohn S, Hadri L, Kockskamper J, Westermann D, Bisping E, Ly H, Wang X, Kawase Y, Chen J, Liang L, Sipo I, Vetter R, Weger S, Kurreck J, Erdmann V, Tschope C, Pieske B, Lebeche D, Schultheiss HP, Hajjar RJ, Poller WC (2009) Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation 119:* 1241-1252

Sugden PH, Clerk A (1998) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. J Mol Med (Berl) 76: 725-746

Sun Y, Oravecz-Wilson K, Mathewson N, Wang Y, McEachin R, Liu C, Toubai T, Wu J, Rossi C, Braun T, Saunders T, Reddy P (2015) Mature T cell responses are controlled by microRNA-142. *Journal of Clinical Investigation* 125: 2825-2840

Svensson EC, Tufts RL, Polk CE, Leiden JM (1999) Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A 96:* 956-961

Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkentin JD (2000) Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 1196-1201

Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T (2014) The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front Genet 4:* 295

Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA (2005) Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol 56:* 23-46

Tevosian SG, Deconinck AE, Tanaka M, Schinke M, Litovsky SH, Izumo S, Fujiwara Y, Orkin SH (2000) FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell* 101: 729-739

Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J (2007) MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation 116:* 258-267

Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, Grebe C, Preuss L, Gupta SN, Schmidt K, Lehnart SE, Kruger M, Linke WA, Backs J, Regitz-Zagrosek V, Schafer K, Field LJ, Maier LS, Hasenfuss G (2010) Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation 122:* 993-1003

Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D (2010) MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol 42:* 1252-1255

Trama J, Lu Q, Hawley RG, Ho SN (2000) The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol 165:* 4884-4894

Tyner JW, Deininger MW, Loriaux MM, Chang BH, Gotlib JR, Willis SG, Erickson H, Kovacsovics T, O'Hare T, Heinrich MC, Druker BJ (2009) RNAi screen for rapid therapeutic target identification in leukemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A 106:* 8695-8700

Ueki K, Muramatsu T, Kincaid RL (1992) Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochem Biophys Res Commun 187:* 537-543

Van Aelst LN, Summer G, Li S, Gupta SK, Heggermont W, De Vusser K, Carai P, Naesens M, Van Cleemput J, Van de Werf F, Vanhaecke J, Thum T, Waer M, Papageorgiou AP, Schroen B, Heymans S (2015) RNA Profiling in Human and Murine Transplanted Hearts: Identification and Validation of Therapeutic Targets for Acute Cardiac and Renal Allograft Rejection. *Am J Transplant* 

van Berlo JH, Maillet M, Molkentin JD (2013) Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *Journal of Clinical Investigation 123:* 37-45

van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299

Van Kerckhoven R, Saxena PR, Schoemaker RG (2002) Restored capillary density in spared myocardium of infarcted rats improves ischemic tolerance. *J Cardiovasc Pharmacol 40:* 370-380

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

van Rooij E, Doevendans PA, de Theije CC, Babiker FA, Molkentin JD, de Windt LJ (2002) Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 277: 48617-48626

van Rooij E, Marshall WS, Olson EN (2008) Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res 103*: 919-928

van Rooij E, Olson EN (2007) MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *Journal of Clinical Investigation 117:* 2369-2376

van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN (2006) A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A 103*: 18255-18260

van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science 316:* 575-579

Vandecasteele G, Rochais F, Abi-Gerges A, Fischmeister R (2006) Functional localization of cAMP signalling in cardiac myocytes. *Biochem Soc Trans 34:* 484-488

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2008) Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle 7:* 1545-1549

Vega RB, Bassel-Duby R, Olson EN (2003a) Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem* 278: 36981-36984

Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, Kovacs A, Naseem RH, Bassel-Duby R, Williams RS, Olson EN (2003b) Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A 100:* 669-674

Vega RB, Yang J, Rothermel BA, Bassel-Duby R, Williams RS (2002) Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem* 277: 30401-30407

Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, Heydmann L, Weiss A, Renaud M, Durand SC, Habersetzer F, Durantel D, Abou-Jaoude G, Lopez Ledesma MM, Felmlee DJ, Soumillon M, Croonenborghs T, Pochet N, Nassal M, Schuster C, Brino L, Sureau C, Zeisel MB, Baumert TF (2015) A targeted functional RNAi screen uncovers Glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* 

Vikstrom KL, Factor SM, Leinwand LA (1996) Mice expressing mutant myosin heavy chains are a model for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Med 2:* 556-567

Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, Melillo G, Rigolini R, Costa E, Crea F, Capogrossi MC, Napolitano M, Martelli F (2010) MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics* 42: 420-426

Volpers C, Kochanek S (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 6 *Suppl 1:* S164-171

Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S (2009) MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2: 807-813

Wang X (2008) miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA 14:* 1012-1017

Wang X, Xu X, Ma Z, Huo Y, Xiao Z, Li Y, Wang Y (2011) Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. *RNA 17:* 1511-1528

Wang Z, Luo X, Lu Y, Yang B (2008) miRNAs at the heart of the matter. J Mol Med (Berl) 86: 771-783

Waspe LE, Ordahl CP, Simpson PC (1990) The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *Journal of Clinical Investigation 85:* 1206-1214

Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell 76:* 567-576

Wei JQ, Shehadeh LA, Mitrani JM, Pessanha M, Slepak TI, Webster KA, Bishopric NH (2008) Quantitative control of adaptive cardiac hypertrophy by acetyltransferase p300. *Circulation 118:* 934-946

Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003) A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *Journal of Clinical Investigation 111:* 1497-1504

Wera S, Hemmings BA (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J 311 (Pt 1):* 17-29

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev 87:* 1-28

Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkentin JD (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res 94:* 110-118

Wilkins BJ, De Windt LJ, Bueno OF, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, Molkentin JD (2002) Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol* 22: 7603-7613

Wilkins BJ, Molkentin JD (2002) Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going? *J Physiol 541:* 1-8

Wilkins BJ, Molkentin JD (2004) Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1178-1191

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol 11:* 228-234

Wu H, Peisley A, Graef IA, Crabtree GR (2007) NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends Cell Biol* 17: 251-260

Wu X, Zhi X, Liu M, Xie J, Zhao S (2015) [Elevated levels of dendritic cell-correlated miRNAs in ascites and sera of patients with ovarian cancer]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 31:* 383-386

Xia S, Guo J, Li J, Zhou L, Zhao Y (2014) [Application of miRNAs in the occurrence and early diagnosis of pancreatic cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi 52:* 198-201

Xie L, Gazin C, Park SM, Zhu LJ, Debily MA, Kittler EL, Zapp ML, Lapointe D, Gobeil S, Virbasius CM, Green MR (2012) A synthetic interaction screen identifies factors selectively required for proliferation and TERT transcription in p53-deficient human cancer cells. *PLoS Genet 8:* e1003151

Xu L, Yao X, Chen X, Lu P, Zhang B, Ip YT (2007) Msk is required for nuclear import of TGF-{beta}/BMP-activated Smads. *J Cell Biol* 178: 981-994

Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA (2003) The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol 13:* 790-795

Yaffe D, Saxel O (1977) A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation 7:* 159-166

Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS (2000) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res 87:* E61-68

Yang TT, Xiong Q, Enslen H, Davis RJ, Chow CW (2002) Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 22: 3892-3904

Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B, Parsons AA, Ohlstein EH (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 275: 37895-37901

Zhang C (2008) MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics* 33: 139-147

Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, Liu Y, Gao Z, Li J, Shen L, Lu Y (2011) Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Ann Oncol* 22: 2257-2266

Zhang Z, Ferraris JD, Brooks HL, Brisc I, Burg MB (2003) Expression of osmotic stress-related genes in tissues of normal and hyposmotic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F688-693

Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D (2007) Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell 129:* 303-317

Zhou B, Ma Q, Kong SW, Hu Y, Campbell PH, McGowan FX, Ackerman KG, Wu B, Tevosian SG, Pu WT (2009) Fog2 is critical for cardiac function and maintenance of coronary vasculature in the adult mouse heart. *Journal of Clinical Investigation 119:* 1462-1476

Zhu J, McKeon F (1999) NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature 398:* 256-260

Zolotareva AG, Kogan ME (1978) Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa 20:* 308-314

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung meiner Arbeitskollegen und durch meinen Betreuer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Abhandlung ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Diese Arbeit wurde bisher, weder in Teilen noch vollständig, an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Ort, Datum

Violetta Harazin

## Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Name:	Harazin	
Vorname:	Violetta Anna	
Geboren am:	02.06.1983	
Geburtsort:	Tychy, Polen	
Staatangehörigkeit:	deutsch	
Promotion		
Seit 07/2010	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH)	
	Klinik für Innere Medizin III	
	Kardiologie und Angiologie	
	Leitung: Prof. Dr. Norbert Frey	
	Arbeitsgruppe: Molekulare Kardiologie, Forschung	
Studium		
10/2005 – 09/2009	Ruhr-Universität Bochum	
	Studiengang Diplom-Biologie	
	Schwerpunkte: Pflanzenphysiologie, Botanik,	
	Medizinische Mikrobiologie, Zellbiologie	
	Abschluss: Diplom-Biologin	
10/2002 00/2005	Studion gong Diplom Disingeniourweeen	
10/2003 - 09/2005		
	Universität Dortmund	
<u>Schule</u>		
	Ourse a siture and Ostainer Deskurre	

08/2000 – 06/2003	Gymnasium am Ostring, Bochum
	Abschluss: Abitur

# Publikationen

Rangrez AY, Bernt A, Poyanmehr R, **Harazin V**, Boomgaarden I, Kuhn C, Rohrbeck A, Frank D, Frey N (2013) Dysbindin is a potent inducer of RhoA-SRF-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol 203:* 643-656

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Frey für seine Unterstützung, Anregungen und Ratschläge, die zum Gelingen dieses Vorhabens beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder für die Übernahme der Betreuung an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Kardiologie für die gute Arbeitsatmosphäre, die wertvollen Anregungen und Ratschläge, und die zahlreichen Diskussionen. In schwierigen Situationen ward ihr immer da, habt mich unterstützt und hattet immer ein offenes Ohr. Großen Dank an Alex, Ash, Christin, Franzi, Gabi, Kathi, Lynn, Simone, Susi und Vanessa und allen anderen unzähligen Mitarbeitern im Labor für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit.

Für das Korrekturlesen und die Überarbeitung meiner Arbeit danke ich herzlich Franzi und Simone.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt und mir den Rückhalt gegeben haben. Ich bedanke mich bei meiner Schwester Monika, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte und für die tatkräftige Unterstützung während der Promotion. Meinem Freund Tony danke ich herzlich, dass er an mich glaubt und mir in dieser Zeit mit Engelsgeduld zur Seite stand.