

Aus der Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und internistische
Intensivmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. N. Frey)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die Rolle der Prolyl-Hydroxylase 3 (PHD3) beim stretch-abhängigen Zelltod von Kardiomyozyten

Inauguraldissertation zur Erlangung der Würde einer Doktorin der
Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Kristin Elisabeth Kramer

aus Düsseldorf

2018

Referent: Prof. Dr. med. Derk Frank
Korreferent: Prof. Dr. med. Georg Lutter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2018

I. INHALTSVERZEICHNIS

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1 EINLEITUNG	9
1.1. Ursachen und klinische Bedeutung der kardialen Hypertrophie	9
1.1.1 Klassifikation der kardialen Hypertrophie.....	10
1.1.2 Molekulare Veränderungen bei kardialer Hypertrophie.....	11
1.1.3 Die funktionelle Dekompensation bei pathologischer kardialer Hypertrophie - Übergang in die linksventrikuläre Dilatation (DCM)	13
1.1.4 Trigger der kardialen Hypertrophie	15
1.1.4.1 Neuroendokrine Aktivierung	16
1.1.4.2 Biomechanischer Stress	16
1.2. Apoptose.....	17
1.3. microRNAs (miRs).....	19
1.3.1. Die Rolle der microRNAs im kardiovaskulären System	22
1.3.2. Anpassung der Herzmuskelzelle an eine biomechanische Belastung....	24
1.3.3. Die Rolle der bei biomechanischem Stress differentiell regulierten miRNAs	25
1.3.4. Die antiapoptotische Funktion der miR-20a.....	28
1.3.5. Target Screening potentieller Zielstrukturen von miR-20a.....	33
1.3.6. Die potentielle Bedeutung von PHD3 als Zielprotein von miR-20a.....	35
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	36
2 MATERIAL UND METHODEN	37
2.1. Materialien.....	37
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	37

2.1.2.Chemikalien.....	39
2.1.3.Medien.....	40
2.1.4.Puffer und Stammlösungen	42
2.1.5.Antikörper	45
2.1.6.Oligonukleotide.....	45
2.1.7.Vektoren/ Plasmide	46
2.1.8.Kits	46
2.1.9. Enzyme	47
2.1.10. Ziellinien	47
2.1.11. Versuchstiere.....	47
2.2. Methoden	48
2.2.1.Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	48
2.2.2.Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit DNA.....	49
2.2.3.Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit RNA.....	53
2.2.4.Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit Proteinen.....	57
2.2.5.Adenoviraler Gentransfer	62
2.2.6.Kultur von Säugetierzellen.....	67
2.2.7.Stretch von NRVCMS	71
2.2.8.Evaluation der Apoptoserate mithilfe der TUNEL-Methode	72
2.2.9.Statistik.....	72
3 ERGEBNISSE	73
3.1. EglN3 ist eine Zielstruktur von miR-20a	73
3.1.1.Die Rolle von miR-20a und ihrer Zielstruktur EglN3 im Zelltod von Kardiomyozyten.....	73
3.1.2.„Knockdown“ (Herunterregulation) von miR-20a führt zu einer Überexpression von EglN3.....	74

3.2. Analyse der Expression von EglN3 in NRVCMs nach adenoviralem Gentransfer	76
3.2.1.Klonierung eines rekombinanten EglN3-Adenovirus	76
3.2.2.Überexpression von EglN3 durch adenoviralen Gentransfer	76
3.2.2.1 Nachweis der Überexpression von EglN3 in NRVCMs auf RNA-Ebene	76
3.2.2.2 Nachweis der Überexpression von EglN3 in NRVCMs auf Proteinebene	76
3.2.3.Herunterregulation von EglN3 durch adenoviralen Gentransfer.....	79
3.2.3.1 Klonierung eines antimiR-EglN3 Virus	79
3.2.3.2 Nachweis des Knockdowns von EglN3 auf RNA-Ebene	79
3.2.3.3 Nachweis des Knockdowns von EglN3 auf Proteinebene	80
3.3.Induktion von kardiomyozytärer Apoptose durch biomechanischen Stress und die Beeinflussung dieses Prozesses	81
3.3.1.Dynamischer biaxialer Stretch in vitro induziert Apoptose in NRVCMs ...	81
3.3.2.Beeinflussung der durch biomechanischen Stress induzierten Apoptose durch die miR-20a/EglN3-Achse	84
3.3.3.Knockdown von EglN3 führt zu verminderter Caspase-3-Aktivität	84
3.3.4.Knockdown von EglN3 führt zu verminderter Caspase-7-Aktivität	86
3.3.5. EglN3 Überexpression führt zu einer erhöhten Apoptoserate in NRVCMs	88
3.3.6.Überexpression von miR-20a führt zu verminderter Caspase-3 Aktivität	88
3.3.7.Überexpression von miR-20a führt zu verminderter Caspase-7 Aktivität	90
4 DISKUSSION.....	93
4.1. Die Signaltransduktion der miR-20a/EglN3 Achse und ihr Einfluss auf die kardiomyozytäre Apoptose - Voruntersuchungen und Einordnung der eigenen Ergebnisse.....	93
4.2. Bedeutung von Biodatenbanken für das Target-Screening potentieller Zielstrukturen von microRNAs	95
4.3. Allgemeine Bedeutung der PHDs.....	96

4.4. Die kardiovaskuläre Bedeutung von EglN3/PHD3.....	100
4.5. Biomechanischer Stress führt über den miR-20a/PHD3 Signalweg zur Induktion von Apoptose.....	104
4.6. Potentielle zukünftige klinische Anwendungen von EglN3/PHD3 Inhibitoren	107
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	110
6 LITERATURVERZEICHNIS	112
7 EIGENE PUBLIKATION.....	121
8 DANKSAGUNG	122

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AdmiR	Adenoviraler Vektor kodierend für miRNA
ANP	Atrial natriuretic peptide
AntimiR	Anti-microRNA
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCL	B-cell lymphoma
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovine Serum Albumine
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DCM	Dilated Cardiomyopathy, dilatative Kardiomyopathie
DISC	death inducing signalling complex
DMEM	Dulbeccos´ s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat
DOX	Doxorubicin
ds	Doppelsträngig (doublestranded)
ECL	Elektrochemilumineszenz
E. coli	Escherichia coli
Egln	egg laying nine
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET-1	Endothelin-1
FCS	Fetal Calf Serum
FHL1	Four and a half LIM domain protein 1
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HEK	Human Embryonic Kidney
HIF	Hypoxie-induzierender Faktor

HSP 70	Hitzeschockprotein 70
Ifu	Infectious Units
IHF	Integration Host Factor
lacZ	β -Galaktosidase
LAD	Left Anterior Descending coronary artery
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	myosin heavy chain
miR	MicroRNA
mRNA	Messenger RNA
MLP	Muscle-Limb-Protein
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NRVCM	neonatal rat ventricular cardiac myocytes
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDVF	Polyvinylidendifluorid
PE	Phenylephrin
PHD	Prolyl-Hydroxylase
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleic Acid
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
shRNA	Small hairpin RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TUNEL	TdT-mediated X-dUTP nick end labeling
UTR	untranslated region
VHL	von Hippel Lindau
v/v	Volumen/Volumen
w/v	weight/ volume

1 EINLEITUNG

1.1. Ursachen und klinische Bedeutung der kardialen Hypertrophie

Die Herzmuskulatur ist in der Lage, sich aufgrund verschiedener Stimuli an eine veränderte Beanspruchung anzupassen. Dies ist sowohl bei gesunden Individuen im Verlauf des Wachstumsprozesses, bei Sportlern durch körperliches Training und auch im Verlauf einer Schwangerschaft zu beobachten. Die Zunahme an Muskelmasse durch Hypertrophie der einzelnen Myokardzellen ist ein normaler adaptiver Prozess. Im Gegensatz dazu reagieren linker, aber auch rechter Ventrikel auf eine systemische oder pulmonale Hypertension mit einem pathologischen Hypertrophie-Prozess, der im Langzeitverlauf schwerwiegende negative Auswirkungen auf die Muskulatur hat. Dieser Prozess ist in der Regel und speziell im späten Verlauf als maladaptiv zu verstehen (Hill et al., 2008). Er begünstigt sowohl die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung als auch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Drazner et al., 2004).

Auf der anderen Seite kann es auch zu einer Abnahme von Herzmuskulatur im Sinne einer Atrophie kommen, wenn eine Entlastung beispielsweise durch langfristige Bettlägerigkeit vorliegt oder im Rahmen der Herzersatztherapie mechanische Unterstützungssysteme eingesetzt werden müssen.

Die Bedeutung der kardialen Hypertrophie im klinischen Alltag ist immens. Schon seit langem ist durch die Framingham-Studie eine Prävalenz der linksventrikulären Myokardhypertrophie von 16% bei Männern und 19% für Frauen bekannt (Levy et al., 1987). Eine kardiale Hypertrophie gilt nicht nur als starker Prädiktor kardiovaskulärer Mortalität - hier ist die häufigste Ursache die arterielle Hypertonie (Levy et al., 1996) -, sondern darüber hinaus auch der Sterblichkeit jeglicher anderen Ursache (Levy et al., 1990). Unabhängig von der Ursache besteht bei Patienten mit kardialer Hypertrophie ein erhöhtes Risiko eine chronische Herzinsuffizienz zu entwickeln.

Die Prognose von Patienten mit Herzinsuffizienz ist schlecht. So besteht eine Sterblichkeit von 50% nach 4 Jahren, bei hochgradiger Herzschwäche (NYHA IV) sogar innerhalb eines Jahres (Swedberg et al., 2005).

1.1.1 Klassifikation der kardialen Hypertrophie

Nach morphologischen Aspekten kann man eine kardiale Hypertrophie von einer konzentrischen und einer exzentrischen Hypertrophie unterscheiden (Berenji et al., 2005). Zahlreiche physiologische und pathologische Stimuli können die Ursache einer kardialen Hypertrophie sein (Abb.1-1). Das Herz ist in der Lage, auf eine Reihe interner oder externer Einflüsse in angemessener Weise zu reagieren, z.B. nimmt seine Masse im Verlauf des körperlichen Wachstums, infolge einer Schwangerschaft oder als Reaktion auf Ausdauertraining zu. Dies wird als physiologische kardiale Hypertrophie bezeichnet (Hill et al., 2008).

Die pathologische kardiale Hypertrophie kann sowohl durch intrinsische als auch extrinsische Stimuli ausgelöst werden. Intrinsische Stimuli der Hypertrophie sind z.B. familiäre, d.h. genetisch bedingte Kardiomyopathien. Zu den extrinsischen Stimuli zählen z.B. eine angeborene (z.B. Septumdefekte) oder erworbene (z.B. Klappeninsuffizienz) bedingte Volumenbelastung der Herzkammern, auch eine Druckbelastung des linken Ventrikels durch arterielle Hypertonie oder eine angeborene/erworbene Klappenstenose, z.B. die Aortenstenose. Durch den Hypertrophie Prozess versucht das Herz einer erhöhten Wandspannung entgegenzuwirken, die z.B. durch eine erhöhte Nachlast bei der gerade genannten Aortenstenose oder bei arterieller Hypertonie hervorgerufen wird. Auch infolge eines Verlustes von kontraktilen Gewebe im Rahmen eines Myokardinfarktes kann sich eine Hypertrophie des verbliebenen Myokards entwickeln. Als Spätfolgen einer pathologischen Hypertrophie können eine ventrikuläre Dilatation mit systolischer Dysfunktion sowie maligne ventrikuläre Arrhythmien auftreten.

Mittlerweile ist bekannt, dass die Art des Stimulus erheblichen Einfluss auf den Ablauf des kardialen Umbaus, auf die Beteiligung bestimmter intrazellulärer Signalwege und letztendlich auch auf die Prognose hat (Frey and Olson, 2003).

Die obigen Darlegungen verdeutlichen, wie bedeutsam das Problem der kardialen Hypertrophie im klinischen Alltag ist. Um für die betroffenen Patienten bessere therapeutische Strategien zu erarbeiten, ist die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen unabdingbar.

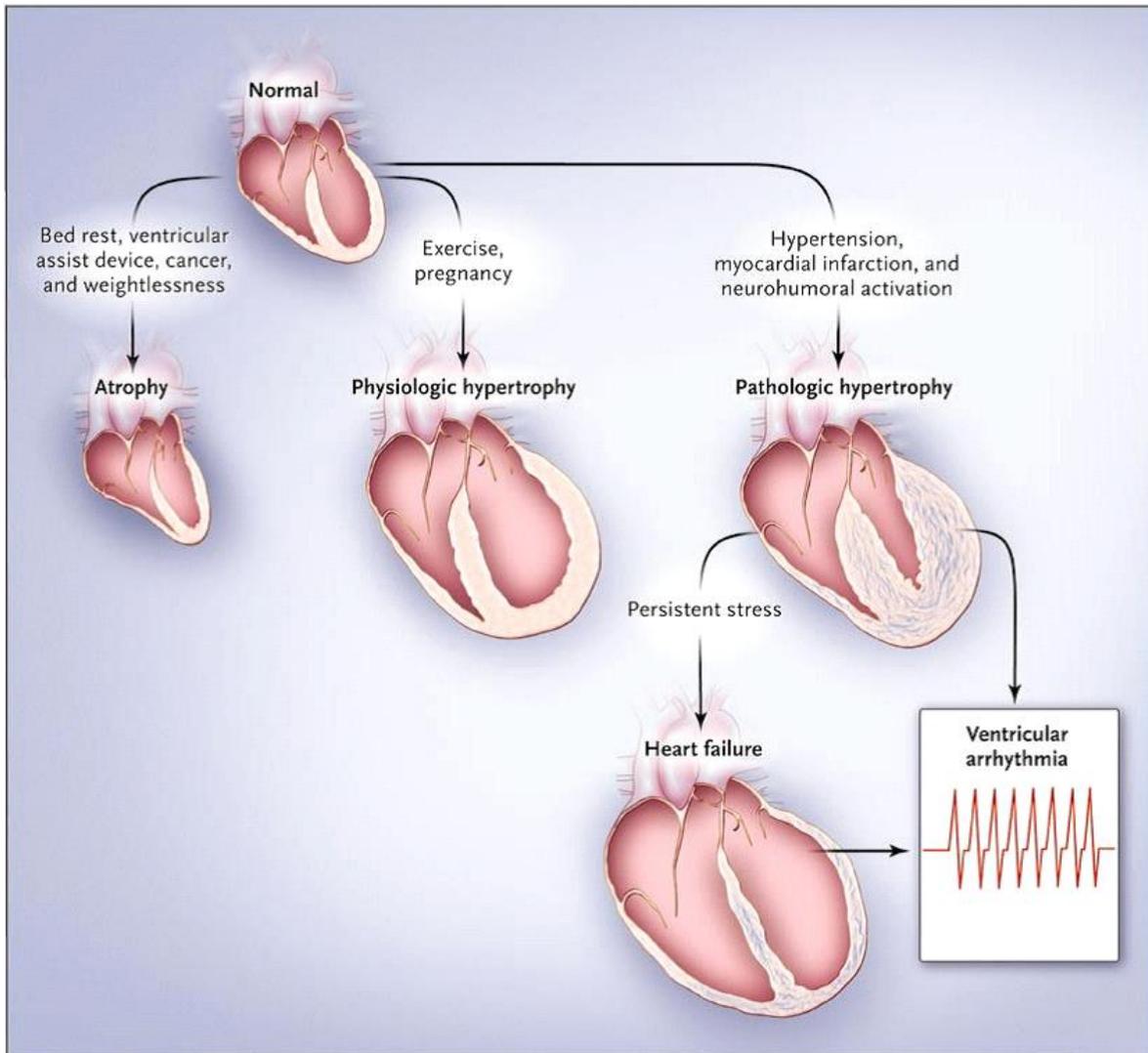


Abbildung 1-1: Ursachen des kardialen „Remodelling“. Je nach Art der Fehlbelastung kann sich entweder eine Atrophie, eine physiologische oder pathologische Hypertrophie entwickeln. Entnommen aus Hill et al., 2008.

1.1.2 Molekulare Veränderungen bei kardialer Hypertrophie

Auf zellulärer Ebene führt die Hypertrophie zu einer Zunahme der Kardiomyozytengröße, welche von einer Zunahme der Zahl der sarkomeren Einheiten und der Produktion der Peptide ANP und BNP begleitet ist (Dorn et al., 2003). Die kardiale Hypertrophie wird als zelluläre Antwort auf die o.g. extrinsischen oder intrinsischen Stimuli verstanden. In Abb. 1-2 sind die an der kardialen Hypertrophie beteiligten Signalwege zur Übersicht dargestellt (Frey et al., 2003; Mac Lellan et al., 2000; Molkentin et al., 2001).

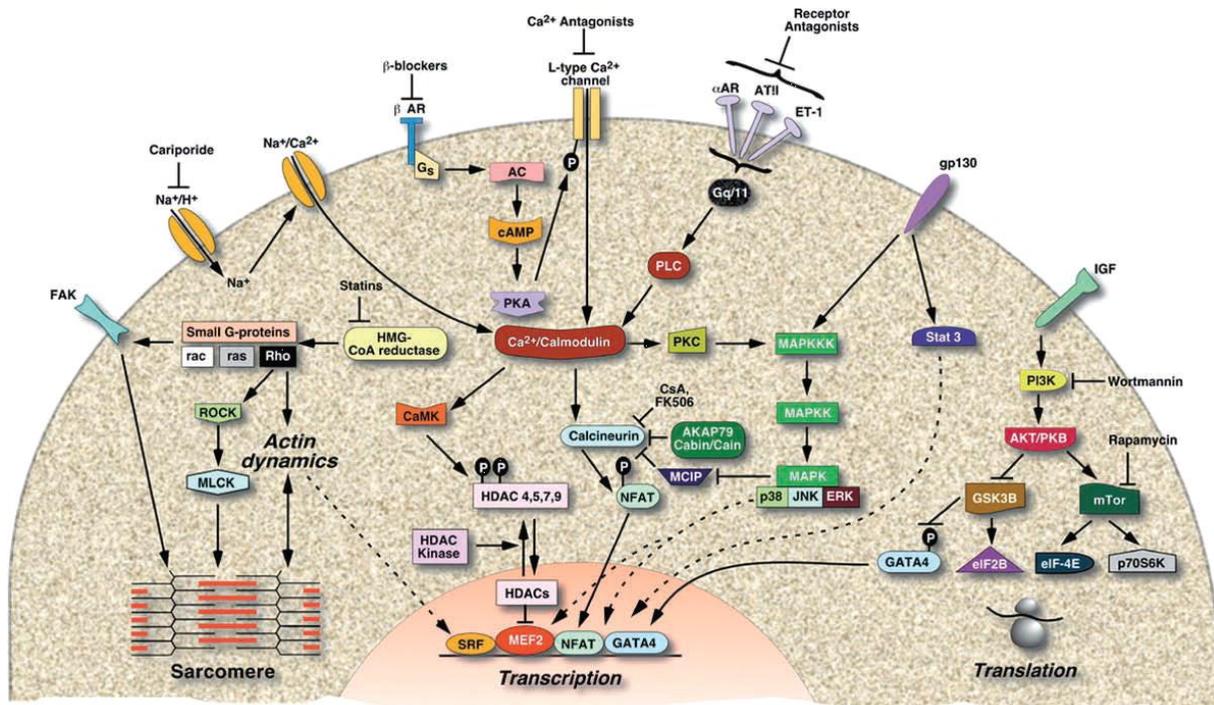


Abbildung 1-2: Übersicht der an der kardialen Hypertrophie beteiligten Signalkaskaden. Entnommen aus Frey et al., 2003.

Die molekularen Veränderungen unterscheiden sich speziell auch im Hinblick auf die Signaltransduktion bei physiologischer und pathologischer Hypertrophie.

Während bei pathologischer Hypertrophie der Anteil der β-Isoform der MHCs zulasten der α-Isoform zunimmt, ist dies bei physiologischer Hypertrophie exakt umgekehrt (Kinugawa et al., 2001). Die physiologische Hypertrophie wird vor allem durch den PI3-Kinase/Akt-Signalweg gesteuert (Mc Mullen et al., 2003), wohingegen es bei der pathologischen kardialen Hypertrophie zur sog. Reaktivierung des fetalen Genprogramms kommt (Frey et al., 2003). Hierbei handelt es sich um die Aktivierung von Genen, welche bereits während der Entwicklung des Herzens exprimiert sind. Typische Vertreter sind die natriuretischen Peptide ANP und BNP, α-skeletal Actin, SERCA sowie β-MHC. Jedoch kommt es nicht in allen Tiermodellen für Hypertrophie zu einer gleichartigen Expressionsänderung aller dieser Gene, so dass diese nicht als ein einheitliches hypertrophes Programm betrachtet werden sollten (Dorn et al., 2003). In ausgewachsenen Nagetieren liegt im Myokard vor allem die α-Isoform von MHC vor. Während des hypertrophen Umbaus kommt es zu einer verstärkten Expression von β-

MHC bei einer Verminderung von α -MHC. Die unterschiedliche enzymatische Aktivität der MHC-Isoformen hat funktionelle Auswirkungen und führt bei Überwiegen von β -MHC bei Nagetieren zu einer reduzierten Verkürzung isolierter Myokardzellen (Dorn et al., 2003). Bei Menschen hingegen wird in gesundem Myokard zu 90% β -MHC exprimiert, so dass eine direkte Übertragung dieser Erkenntnisse nicht möglich ist. ANP hat neben seinen diuretischen, natriuretischen, vasodilatatorischen und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beeinflussenden Wirkungen auch einen von ihren systemischen Wirkungen unabhängigen lokalen antihypertrophen Effekt.

ANP-knockout-Mäuse zeigen unter Volumenbelastung eine stärkere Hypertrophie als Wildtyp-Tiere (Mori et al., 2004). Diese und andere Studien zeigen auch, dass die antihypertrophe Wirkung von ANP unabhängig von seinem blutdrucksenkenden Effekt ist (Feng et al., 2003). Knockout-Mäuse für das mit ANP verwandte, aus den Ventrikeln stammende BNP zeigen nach Druckbelastung hingegen keine verstärkte Hypertrophie, jedoch eine vermehrte Fibrose (Tamura et al., 2000). Obwohl die ANP-Bildung somit einen Gegenregulationsmechanismus gegen Hypertrophie darstellt, ist die ANP-Wirkung nicht ausreichend, um den hypertrophen Umbau dauerhaft zu verhindern (Barry et al., 2008).

1.1.3 Die funktionelle Dekompensation bei pathologischer kardialer Hypertrophie - Übergang in die linksventrikuläre Dilatation (DCM)

Die Mechanismen, wie und warum eine lange bestehende Hypertrophie zu einer Dilatation des Herzens mit Verdünnung der Kammerwand mit konsekutiver systolischer Dysfunktion infolge eines Anstiegs der Wandspannung führt, sind bisher kaum verstanden. Dies gilt im Besonderen für die molekularen Mechanismen dieser Transition.

Eine klassische Erklärung besteht darin, dass die Sauerstoffversorgung infolge unzureichender Durchblutung des hypertrophierten Myokards unzureichend ist, d.h. eine chronische Myokardischämie vorliegt. Pathologische Hypertrophie korreliert mit einer reduzierten Kapillardichte, die zu einer zellulären Ischämie und zu einer Progression der Erkrankung führen kann. Nach Aortenligatur bei Mäusen fand sich diese Rarefizierung

der Gefäße erst im dekompensierten Stadium. Man fand eine intrazelluläre Akkumulation von p53, was zur Hemmung des Angiogenese-induzierenden Faktors HIF-1 α führt. Durch Einbringung von HIF-1 α während der Aortenligatur kann die Gefäßdichte gesteigert werden und die kardiale Hypertrophie verweilt im kompensierten Stadium (Sano et al., 2007). Diese Befunde legen nahe, dass eine gestörte Angiogenese an der Transition zur Herzinsuffizienz beteiligt ist.

Ein weiterer wesentlicher Faktor ist die im hypertrophen Herzen fortschreitende Störung des Calciumstoffwechsels. Die Funktionsstörung der Calcium-ATPase SERCA reduziert die Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (Lehnart et al., 2009). SERCA2-knockout Mäuse zeigen nach Aortenligatur im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen ausgeprägteren Übergang in den exzentrischen Phänotyp der Hypertrophie und eine reduzierte systolische und diastolische Funktion (Schultz Jel et al., 2004). Eine Schlüsselfunktion im Calciumstoffwechsel nimmt auch die Proteinkinase C α ein. Knockout-Studien bei Mäusen legen nahe, dass diese Kinase eine fundamentale Rolle bei der Regulation des Ca²⁺ Handling in den Kardiomyozyten einnimmt und somit wesentlich die kardiale Kontraktilität beeinflusst (Braz et al., 2004).

Mit zunehmender Dilatation des linken Ventrikels kommt es zu einem Umbau der Extrazellulärmatrix durch progredienten fibrotischen Umbau des Myokards, der eine diastolische Relaxationsstörung nach sich zieht. Insbesondere soll eine gestörte Regulation der Matrixmetalloproteinasen eine wesentliche Ursache für den Verlust der ursprünglichen Gewebearchitektur und die Dilatation des linken Ventrikels darstellen (Opie et al., 2006).

Kennzeichnend für den Übergang von der kompensierten Hypertrophie in die Herzinsuffizienz ist der zunehmende Untergang von Kardiomyozyten (van Empel et al., 2005). Dieser sog. programmierte Zelltod erfolgt vorwiegend durch Apoptose, als weitere Mechanismen des Zelluntergangs spielen aber auch Zellnekrose und Autophagie eine Rolle (Dorn et al., 2009). Des Weiteren sind auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und die Aktivierung des adrenergen Systems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems an der Transition zur Herzinsuffizienz entscheidend beteiligt (Opie et al., 2006).

Alle obigen Prozesse tragen schlussendlich zum programmierten Zelltod der Kardiomyozyten und Zunahme der Fibrose innerhalb der myokardialen Matrix bei. Sie führen zum sog. ventrikulären 'Remodelling' mit Abnahme der systolischen und diastolischen Funktion (Rothermel et al., 2001; Vega et al., 2003). Diese Vorgänge können als Antwort der Kardiomyozyten auf Stress verstanden werden. Bei lang andauerndem Stress führen die sog. „late phase remodelling events“ zu einer irreversiblen myokardialen Dekompensation, deren morphologisches Korrelat die gesteigerte Apoptose und Fibrose sind. Dieser Prozess der Entwicklung von Fibrose ist demnach abhängig von der Art des zu einer kardialen Hypertrophie führenden Stimulus, denn bei physiologischer kardialer Hypertrophie durch z.B. Schwangerschaft oder Ausdauertraining bleibt eine myokardiale Fibrosierung aus und es besteht kein erhöhtes Risiko für Arrhythmien, kardiale Dysfunktion oder die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Kehat et al., 2010; Lorell et al., 2000). In einer aktuellen Untersuchung an Ratten führte jedoch intensives Ausdauertraining zu kardialer Fibrose und einer erhöhten Anfälligkeit für ventrikuläre Tachykardien, weshalb das Ausbleiben unerwünschter Folgen möglicherweise nicht für exzessives Training gilt (Benito et al., 2011).

1.1.4 Trigger der kardialen Hypertrophie

Es gibt zwei bedeutsame Trigger der kardialen Hypertrophie: *neuroendokrine Aktivierung und biomechanischer Stress*. Sie induzieren intrazelluläre Signalkaskaden, die die Proteinsynthese und -stabilität beeinflussen.

1.1.4.1 Neuroendokrine Aktivierung

Als Reaktion auf eine verminderte Pumpleistung des Herzens mit konsekutiver Mangel durchblutung lebenswichtiger Organe erfolgt eine systemische neuroendokrine Aktivierung: hierbei wird infolge des verminderten renalen Perfusionsdrucks das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert. Das erhöhte Angiotensin-II wirkt vasokonstriktiv und steigert die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Infolge vermehrter Natrium-Rückresorption kommt es zur Flüssigkeitsretention und

damit zur Vergrößerung des Plasmavolumens. Des Weiteren bewirkt ein erhöhter Sympathikotonus über kardiale β_1 -adrenerge Rezeptoren eine gesteigerte Kontraktilität der Herzmuskulatur. Das vermehrt freigesetzte Noradrenalin führt durch eine Steigerung der Kontraktionskraft und Frequenz kurzfristig zu einer Verbesserung der eingeschränkten Auswurfsleistung des Herzens. Bei Fortbestehen der insuffizienten Pumpleistung wirkt sich jedoch langfristig die dauerhafte Stimulation des Sympathikus negativ auf die Herzfunktion aus. Die chronische α_1 -Adrenozeptorstimulation des Herzens führt zu einer hypertrophen Antwort, die sich in der Größenzunahme des einzelnen Myozyten, der Neubildung von kontraktilen Einheiten, sowie einer veränderten Genexpression im Sinne der Reaktivierung des fetalen Genprogramms ausdrückt (Molkentin et al., 2001). Die als Folge der neurohumoralen Aktivierung erhöhten Plasmaspiegel u.a. von Angiotensin II, Endothelin-1 und Noradrenalin ziehen eine Herzmuskelhypertrophie mit Größenzunahme der Kardiomyozyten nach sich (Dorn et al., 1999). Spätere Folgen sind vermehrte Fibrose und Arrhythmien.

1.1.4.2 Biomechanischer Stress

Liegt bei kardialer Belastung ein biomechanischer Stress mit Überdehnung der Kardiomyozyten vor, führt dies zu einer signifikanten Zunahme der Zellgröße und pathologischen Veränderung der Sarkomer-Struktur. Die Prozesse, mit deren Hilfe biomechanische Signale in die Zelle gelangen, d.h. wie die Zelle ein physikalisches in ein chemisches Signal umwandelt, sind noch nicht völlig aufgeklärt. Während ein Modell die Lokalisation des Mechanosensors, der die lokale Messung der mechanischen Belastung bewerkstelligt, an der Plasmamembran postuliert, wird in einem anderen Modell davon ausgegangen, dass eine Übertragung der Kräfte über das Zytoskelett ins Innere der Zelle stattfindet, so dass der Mechanosensor im Inneren der Zelle lokalisiert sein könnte (Knoll et al., 2003). Als Kandidaten für einen zellulären Mechanosensor sind dehnungsaktivierte Ionenkanäle zu nennen, die - induziert durch Dehnung - zu einem einwärts gerichteten Natrium-, Calcium- oder Kalium-Ionenstrom in die Zelle führen (Lammerding et al., 2004), außerdem die Costamer-Proteine, welche zirkulär die gesamte Muskelzelle im Bereich der Z-Scheibe umfassen und mit den Integrinen interagieren. Diese Membranproteine stellen eine Verbindung zwischen dem kardialen

Zytoskelett und der extrazellulären Matrix her (Brancaccio et al., 2003; Ross et al., 2001). Außerdem sind Proteine im Bereich der Z-Scheiben der Sarkomere, wie etwa das Muscle-Limb-Protein (MLP), an der intrazellulären Mechanozeption beteiligt (Knoll et al., 2002). Fehlt dieses Protein in MLP-defizienten Kardiomyozyten, kommt es zu einer Störung der Funktion der Titine, welche wesentlich am Aufbau von Spannung bei passiver Dehnung von Muskelzellen beteiligt sind (Granzier et al., 1995).

Wegen der Bedeutung für die Thematik der in der Dissertation vorgenommenen Untersuchungen sollen einige Aspekte der Apoptose im folgenden Abschnitt im Zusammenhang beschrieben werden.

1.2. Apoptose

Apoptose hat für die Kardiomyozyten des adulten Herzens keine bekannte physiologische Rolle, ist aber essentiell bei der Ausbildung der Herzklappen und der Formierung des Ausflusstrakts während der embryonalen Herzentwicklung (Fisher et al., 2000). In vielen adulten Geweben anderer Organe wirkt Apoptose der Proliferation abnormaler Zellen entgegen, die anderenfalls potentiell einer neoplastischen Transformation unterliegen würden. Dementsprechend können Mutationen in Apoptose-regulierenden Genen krebserregend sein (Wyllie et al., 1993).

Apoptose stellt jedoch einen wichtigen Baustein im Prozess des negativen Remodelling dar (Dorn et al., 2009). Ein bedeutsamer zellulärer Prozess bei der Transition von der Hypertrophie im Stadium der Kompensation zu einer dilatativen Kardiomyopathie ist der sog „programmierte Zelltod“ von Kardiomyozyten durch Apoptose, programmierte Nekrose und Autophagie. So induzieren bei chronisch erhöhtem biomechanischen Stress Dehnungsreize die Apoptose von Kardiomyozyten (Anversa et al., 1996). Dies konnte sowohl *in vitro* (Choudhary et al., 2008; Pimentel et al., 2001) als auch *in vivo* Studien festgestellt werden (Ding et al., 2000; Teiger et al., 1996; Hirota et al., 1999). Bei der Apoptose kommt es zum Schrumpfen der Zelle, ohne dass eine Schädigung von benachbarten Zellen erfolgt. Sie kann über zwei verschiedene Signalwege erfolgen (Abb. 1-3): Beim ersten sog. extrinsischen Signalweg wird die Apoptose von der

betreffenden Zelle selbst mittels proteolytischer Enzyme, sog. Caspasen durchgeführt. Eignet sich intrazellulär ein Schaden oder eine Überlastung, kommt es nach Freisetzung von Cytokinen zur Bildung des sog. Multiprotein Komplexes DISC (*death inducing signaling complex*), was zur Aktivierung von Procaspase-8 führt. Die aktivierte Caspase-8 induziert die proteolytische Spaltung der Procaspase-3, die anschließend als Caspase-3 den Zelltod einleitet. Hierbei findet ein Abbau von DNA in definierte Stücke statt, was mittels der sog. TUNEL-Methode nachweisbar ist. Während im gesunden menschlichen Herzen nur etwa einer von 10.000 Kardiomyozyten ein sog. TUNEL-positives Färbeverhalten als Hinweis auf Apoptose zeigt (Soonpaa et al., 1998), ist die Prävalenz apoptotischer Kardiomyozyten bei schwerer Herzinsuffizienz um mehr als das Hundertfache gesteigert (Olivette et al., 1997; Narula et al., 1996).

Der zweite (intrinsische) Signalweg erfolgt über die differentielle Expression pro- und antiapoptotischer Gene oder ihre posttranslationale Modifikation. So kommt es z.B. bei experimenteller chronischer kardialer Druckbelastung oder auch Herzinsuffizienz in den Kardiomyozyten zu einer differentiellen Genexpression u.a. von Mitgliedern der Bcl-2-Familie mit verringerter Expression von Bcl-2, das antiapoptotisch wirkt, und vermehrter Bax Expression, welches proapoptotisch wirkt. Die veränderte Genexpression führt zur Steigerung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran und ermöglicht so die Aktivierung der Caspase Kaskade, sodass Cytochrom c ins Zytoplasma gelangt und die Bildung des Apoptosom-Komplexes katalysiert, welcher die Caspase-9 enthält (Crow et al., 2004). Zusammenfassend ist die Apoptose als ein wichtiger Baustein im Prozess des negativen Remodelling anzusehen (Dorn et al., 2009).

Ein dritter Prozess, der zum Zelltod beiträgt, ist auf der rechten Seite der Abb. 1-3 dargestellt: Als Antwort auf zellulären Stress kommt es nämlich auch zum Anstieg der Konzentration von freiem Calcium im Zytoplasma der Kardiomyozyten. Hierdurch werden calcium-sensitive mitochondriale Matrix Dehydrogenasen stimuliert, die zu einer Zunahme der Permeabilität innerer mitochondrialer Membranen für Ionen und andere kleine Moleküle führen und so der elektrochemische Gradient verloren geht (sog. „mitochondrial permeability transition, MPT“). Aus dem sarkoplasmatischen Retikulum gelangt eine große Menge von Calcium in die Mitochondrien, deren Calciumüberladung *in vitro* und *in vivo* zum Zelltod beiträgt (Chen et al., 2005; Nakayama et al., 2007).

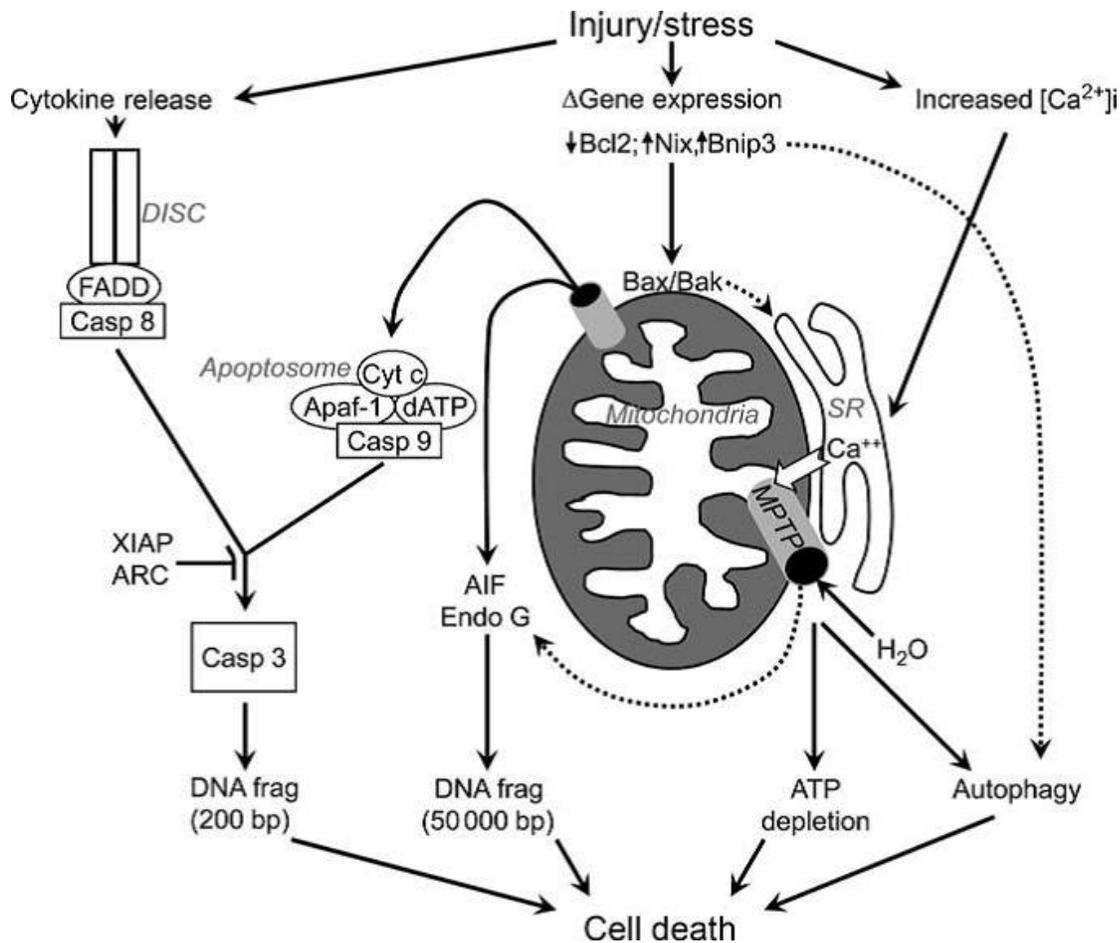


Abbildung 1-2: Schema der Pathways, die zum programmierten Zelltod von Kardiomyozyten führen. Hierzu zählen die Caspase-abhängige Apoptose (links), die Apoptose aufgrund Steigerung der Transkription pro-apoptotischer Gene oder ihre posttranslationale Modifikation (Mitte) sowie die programmierte Nekrose mit Ca^{2+} Überladung und Autophagie (rechts), entnommen aus Dorn et al., 2009.

1.3. microRNAs (miRs)

Die Erforschung der molekularen Signalwege, die zur Progression der Myokardhypertrophie in eine fortschreitende Dilatation des linken Ventrikels und klinische Herzinsuffizienz führen, ist wegen zuvor noch fehlender methodischer Ansätze erst in den letzten 2-3 Dekaden möglich gewesen und bei weitem nicht abgeschlossen. Die Erkenntnis, dass verschiedene an der Entstehung der kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz beteiligte Signalwege durch endogene microRNAs (miRs) reguliert werden, ist noch deutlich jünger. Sie gehören zur Gruppe der kleinen nicht kodierenden

RNAs mit sequenzspezifischen RNA-Bindungs- und Hemmungseigenschaften und bestehen aus nur 21-29 Nukleotiden (Barringhaus et al., 2009).

Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1993 ist die Funktion der miRNAs als negative Regulatoren der Genexpression umfassend untersucht worden (Wang et al., 2010; Kato et al., 2014). Dies erfolgt über eine posttranskriptionelle Regulierung der messenger RNAs infolge Inhibition der Translation oder Verstärkung ihrer Degradation (Abb. 1-4). miRNAs regulieren in einem komplexen Netzwerk die Expression von mehr als der Hälfte der Gene des humanen Genoms (Ohtani et al., 2011; Huntzinger et al., 2011). Es verwundert daher nicht, dass sehr früh entdeckt wurde, dass miRNAs bei diversen Prozessen der Tumorbilogie wie Proliferation, Apoptose, invasives Wachstum und Metastasierung sowie Angiogenese eine große Rolle spielen (Lee et al., 2009).

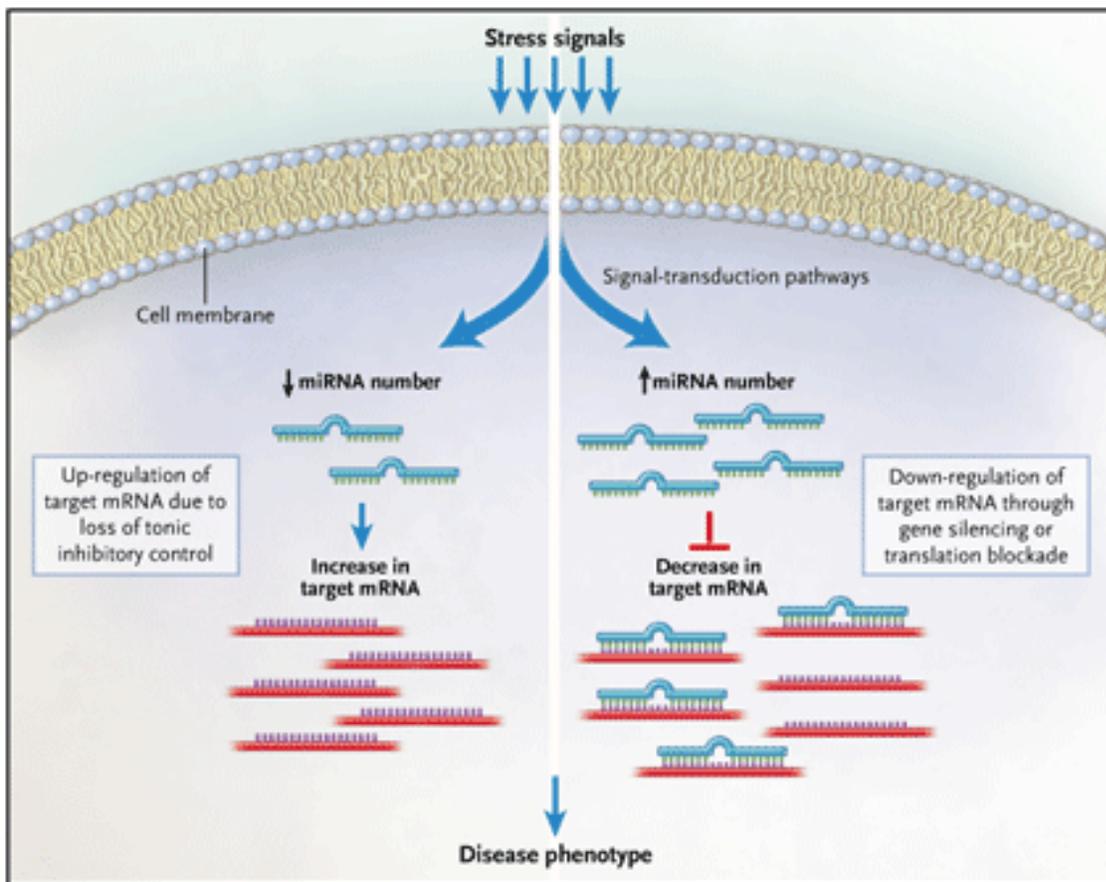


Abbildung 1-3: Übersicht über die Vermittlung von Stress-Signalen durch microRNAs. Entnommen aus Mann, 2007.

Die Biosynthese der miRNA erfolgt durch Transkription durch die RNA-Polymerase II und III unterschiedlicher genomischer Lokalisation, d.h. im Bereich der Introns oder Exons sowohl proteinkodierender Gene als auch nichtkodierender Gene (Rodriguez et al., 2004). Wie in Abb. 5 gezeigt, entsteht zunächst aus einem von der RNA-Polymerase II transkribierten Vorläufermolekül die sog. „primary“ oder pri-miRNA, welche ein großes Molekül ist (> 1Kbp). Es faltet sich in eine charakteristische sekundäre Struktur mit einer terminalen Schleife, da die RNA-Sequenzen durch die intramolekulare Basenpaarung Haarnadel (hairpin) Strukturen ausbilden, die aus ca. 33 Basenpaaren bestehen und flankierende Segmente einsträngiger RNA besitzen (Ambros et al., 2003). Im nächsten Schritt wird von den beiden RNase-III-Endonukleasen „Drosha“ und „Pasha“ noch im Zellkern der sog. „stem loop“ freigesetzt, wodurch die pre-miRNA entsteht. Nach dem Verlassen des Zellkerns durch Eskortierung mit dem Protein Exportin 5 wird die loop der pre-miRNA durch Dicer abgespalten, wodurch die reife aus 22 Nukleotiden bestehende doppelsträngige RNA entsteht. Diese werden dann als einsträngige (Teil eines Armes der Haarnadel) reife miRNAs (miRNA und miRNA*) in den sog. „miR silencing complex“ (miRS) inkorporiert. Hierbei kommt es zur Bindung an ein Argonaut-Protein und zur Zerstörung des miRNA*-Strangs einerseits oder zur Bildung der funktionalen miRNA andererseits, welche durch Paarung mit der komplementären 3'UTR Region der Ziel-RNA ein „genetic silencing“ herbeiführt, d.h. durch Translationsstop die Genexpression reduziert.

Für die funktionelle Auswirkung dieses Vorgangs ist das Ausmaß der Sequenz-homologie der miRNA zur 3'UTR Region der Ziel-mRNA von Bedeutung: bei Säugetieren wird die Basenpaarung durch eine kurze, im 5'-Bereich der miR gelegene Region, die sog. „seed“-Sequenz (meist Nukleotid 2-8), bestimmt. Die Kürze dieser seed Region macht verständlich, warum eine einzige miR imstande ist, hunderte verschiedener Gene zu regulieren (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Nach Angaben der aktuellen Version der miRNA database miRBase 20.0 sind heute über 2500 reife miRNAs im humanen Genom bekannt (Skommer et al., 2014).

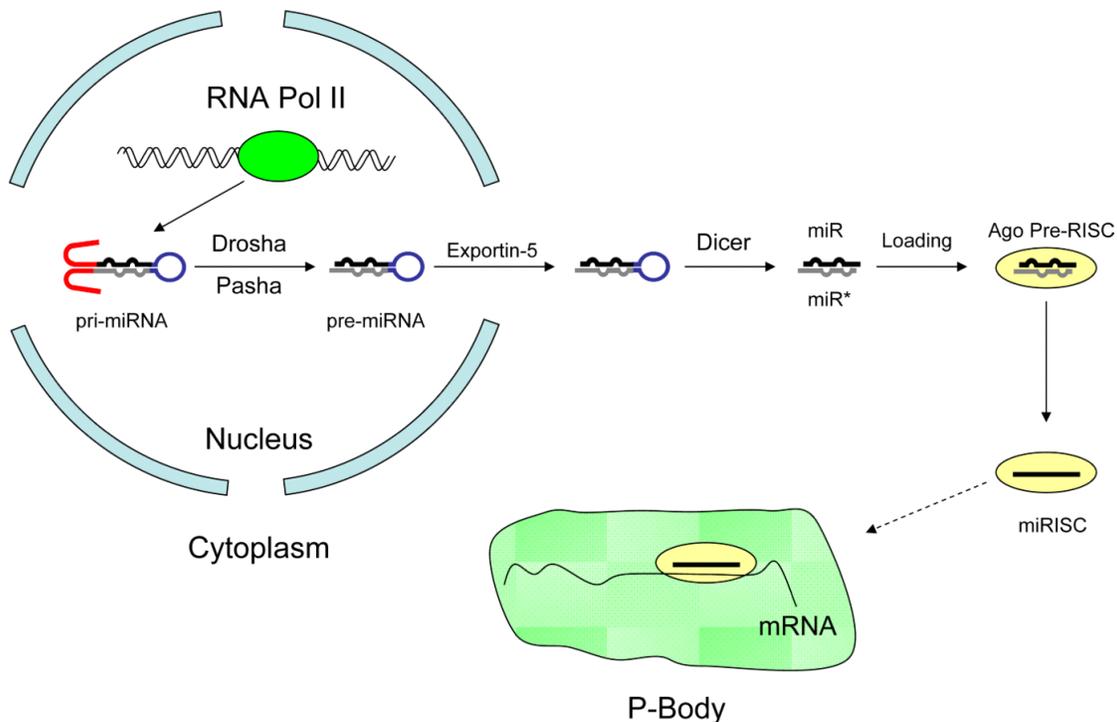


Abb. 1-4: Ablauf der miRNA -Biosynthese. Entnommen aus Barringhaus and Zamore, 2009.

1.3.1. Die Rolle der microRNAs im kardiovaskulären System

In den letzten Jahren wurde die Rolle der miRs sowohl für die Herzentwicklung als auch für die Herzfunktion intensiv untersucht. Die meisten miRs weisen kein gewebsspezifisches Expressionsmuster auf, nur wenige sind herz- oder muskelspezifisch. Hierzu gehört die miR-1 Familie, deren Mitglieder bicistronisch mit den der Familie der miR-133 zugehörigen Mitgliedern von einem gemeinsamen Vorläufertranskript exprimiert werden (Chen et al., 2006) sowie die Familie der miR-208 (Callies et al., 2009; van Rooij et al., 2007). Sie spielen bei der kardialen Entwicklung (Cordes et al., 2009) und der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (Barringhaus et al., 2009) eine wichtige Rolle.

Im Rahmen der Herzentwicklung steuert miR-1 die hoch bedeutsamen Transkriptionsfaktoren HAND1 und 2. So steuert miR-1 die Genaktivität von HAND2, dass schon in der Phase der Bildung des embryonalen Herzschlauchs und später besonders bei der Formierung des rechten Ventrikels und des Ventrikelseptums die spatiotemporale Kontrolle über die Proliferation der Kardiomyozyten ausübt. HAND1

nimmt eine vergleichbare Rolle bei der Entstehung des linken Ventrikels ein, wird aber über einen unterschiedlichen Zeitrahmen exprimiert und unabhängig von HAND2 reguliert.

In einer Studie von Zhao et al., 2007 starb die Hälfte der Mäuse mit einer miR-1 und 2 Deletion am Ende der Schwangerschaft oder kurz nach Geburt und weisen - konsistent mit erhöhter HAND2 Expression - große Ventrikelseptumdefekte auf. Im Gegensatz dazu weisen transgene Mäuse mit Überexpression von miR-1 und 2 und dadurch reduzierter HAND2 Expression eine herabgesetzte Kardiomyozyten Proliferation auf, die zu dilatierten dünnen Ventrikeln führt (Zhao et al., 2005).

Eine essentielle Rolle besitzen die kardialen microRNAs auch für den postnatalen Erhalt der Herzfunktion. In der bereits zitierten Publikation von Zhao et al., 2007 wurde beschrieben, dass die Kardiomyozyten von miR-1 und 2 defizienten Mäusen erhebliche Störungen des Zellzyklus aufweisen, was zu einer postnatal bekanntlich unüblichen Hyperplasie der Zellen infolge persistierender myozytärer Zellteilung führt. Ein anderes Beispiel für die Bedeutung der miRs ist, dass die Deletion der für miR-Reifung notwendigen RNase III „Dicer“ postnatal eine Kardiomyopathie zur Folge hat (Chen et al., 2008; da Costa et al., 2008).

Ein großer Teil der bisher gewonnenen Kenntnisse über die Rolle der microRNAs im adulten Herzen basiert auf Untersuchungen von Myokard nach stressinduziertem kardialen Remodelling, auf die sich die weiteren Ausführungen konzentrieren sollen. Als Modell dienten Mäuse nach aortalem Banding resp. mit Überexpression von herzspezifischem Calcineurin bzw. aktiviertem AKT, einem Onkogen, das den programmierten Zelltod hemmt. (Sayed et al., 2007; Carè et al., 2007; van Rooij et al., 2006). Auf zellulärer Ebene wurde die Myokardhypertrophie durch Endothelin-1 (ET-1), Phenylephrin (PE) oder Angiotensin-II (Ang-II) induziert (Carè et al., 2007; van Rooij et al., 2006; Cheng et al., 2007; Tatsuguchi et al., 2007). Des Weiteren wurde auch humanes myokardiales Gewebe bei unterschiedlichen Formen der Herzinsuffizienz auf die microRNA-Expressionsprofile untersucht. So beschrieben verschiedene Arbeitsgruppen eine hohe Übereinstimmung zwischen dem miR-Expressionsprofil im fötalen und insuffizienten Myokard (Thum et al., 2007; Ikeda et al., 2007; Naga et al.,

2009). Andere Gruppen beschäftigten sich mit der Beteiligung von miRNAs an der molekularen Pathogenese der kardialen Hypertrophie. Callis et al. wiesen nach, dass die transgene Überexpression von miR-208a zur Myokardhypertrophie führt, während miR-208a defiziente Mäuse Reizleitungsstörungen aufwiesen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass miR-208a für die ordnungsgemäße Reizleitung im Herzen erforderlich ist (Callis et al., 2009). Shyu et al. (2015) konnten in einem Infarktmodell der Ratte zeigen, dass im Infarktareal das Target Endoglin der miR-208a vermehrt exprimiert und auf diese Weise die Entstehung myokardialer Fibrose induziert wird.

1.3.2. Anpassung der Herzmuskelzelle an eine biomechanische Belastung

Die wissenschaftliche AG Frey/Frank beschäftigt sich seit vielen Jahren damit, welche Rolle die microRNAs bei der Anpassung der Herzmuskelzelle an eine biomechanische Belastung spielen und wie die Vermittlung der entsprechenden molekularen Konsequenzen erfolgt. Die Grundlagen der obigen Zusammenhänge wurden 2008 in der Zeitschrift Hypertension publiziert (Frank et al., 2008). Aus dem Bereich der onkologischen Grundlagenforschung gab es seinerzeit bereits Daten, die zeigten, dass Apoptose, die ja einen wichtigen Faktor in der Pathogenese der Herzinsuffizienz darstellt, in zentralen Punkten durch miRs reguliert wird (Lee et al., 2009). Daher ging die Arbeitsgruppe in den damaligen Studien der Frage nach, ob es auch kardiale miRNAs gibt, welche die Apoptose bei biomechanischem Stress regulieren.

Hierzu wurde ein Versuchsaufbau zur Applikation von biomechanischem Stress auf neonatale ventrikuläre Ratten-Kardiomyozyten (NRVCM) etabliert, welcher zu einer deutlichen zellulären Hypertrophie führte. Dabei wurde zunächst die dehnungsabhängige Signaltransduktion auf mRNA-Ebene untersucht, um mögliche neue Komponenten des kardialen „Stretch-Rezeptors“ zu identifizieren. Die Kardiomyozyten wurden auf Silikonmembranen biaxial gedehnt (112%/24h). Außerdem wurden NRVCMs mit Phenylephrin-(PE)-induzierter Hypertrophie im Vergleich zu Kardiomyozyten ohne Stimulation untersucht, um eine möglicherweise bestehende dehnungsspezifische Komponente zu identifizieren. Auf diesem Wege konnte ein

Stretch spezifisches Gen-Expressionsprofil in hypertrophierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden, welches nicht mit dem bei PE-Stimulation übereinstimmt.

Bei genomumfassenden Microarray Analysen (Affymetrix 230.2-) zeigten sich 185 Gene mit einer Wahrscheinlichkeit von >99% differentiell reguliert (164 Gene >2fach herauf-, 21 Gene <0,5-fach herunterreguliert). Zwanzig dieser Gene wurden mittels Real-Time PCR weiter untersucht. Dabei fanden sich Gene des Hypertrophie-assoziierten Genprogramms wie BNP (4,2-fach) oder FHL1 (8,0-fach) sowohl durch Dehnung als auch durch pharmakologische Stimulation heraufreguliert. Zudem wurden mehrere Gene identifiziert, die spezifisch durch Dehnung, nicht jedoch durch PE induziert wurden. Darunter war z.B. das PI3K/Akt-abhängig regulierte Gen Gdf15/Mic-1 (24,8-fach), das antioxidativ wirksame Metallothionein-1-Gen (17,7-fach) sowie das über eine Hemmung der Calcineurin/NFAT- und MAPK-Signalwege antihypertroph wirkende Hämoxygenase-1-Gen (10,8-fach). Interessanterweise ließen sich die beiden letztgenannten Gene nicht durch Phenylephrin, wohl aber durch Angiotensin-II induzieren und durch den Angiotensin-Rezeptorblocker Irbesartan supprimieren. Diese Daten legen nahe, dass ein dehnungsspezifisches Genexpressionsprogramm in Kardiomyozyten existieren könnte, welches – zumindest teilweise – durch die Angiotensin abhängige Signaltransduktion vermittelt wird (Frank et al., 2008). Außerdem konnte die vorbeschriebene biomechanische Induzierbarkeit von Genen wie HSP70 (20-fach) oder c-Myc (3,0-fach) bestätigt werden.

1.3.3. Die Rolle der bei biomechanischem Stress differentiell regulierten miRNAs

Mit Hilfe des beschriebenen „Stretch“-Modells wurde in späteren Untersuchungen ein genomweites Screening auf durch biomechanischen Stress differentiell regulierte microRNAs durchgeführt. Von 351 untersuchten miRs (diese Anzahl steht aktuell auf Microarrays der Fa. Febit für die Spezies *rattus norvegicus* zur Verfügung) zeigten sich acht durch „Stretch“ differentiell reguliert. Drei (miR-191, miR-130b, miR-109) waren herab- und fünf (miR-20a, miR-26b, miR-27a, miR-145, miR-221) heraufreguliert.

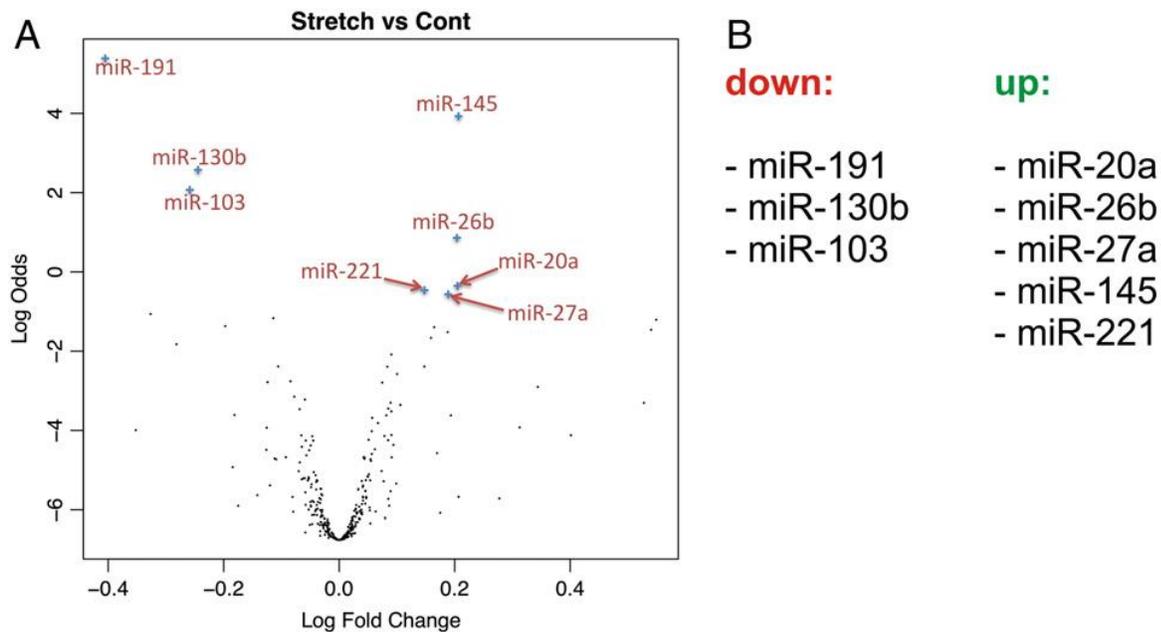


Abbildung 1-6: Darstellung der differentiellen Regulation von microRNAs durch Stretch. **A** Volcano-Plot, **B** tabellarische Auflistung. Entnommen aus Frank et al., 2012.

Besonders interessant erschien die miR-20a. Sie gehört zum miR-Cluster 17-92a, der neben der miR-20 auch die miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1 und miR-92-1 enthält. Diesem Cluster, das auf Chromosom 13q31.3 lokalisiert ist, wird eine Vielzahl von Funktionen zugesprochen, die wichtig für die Regulation des Zellzyklus sowie Proliferation und Apoptose sind. Obwohl anfänglich hauptsächlich mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht, spielt der 17-92a Cluster ebenso eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Herz, Lunge und Immunsystem, dem Alterungsprozess sowie bei neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen (Mogilyansky und Rigoutsos, 2013).

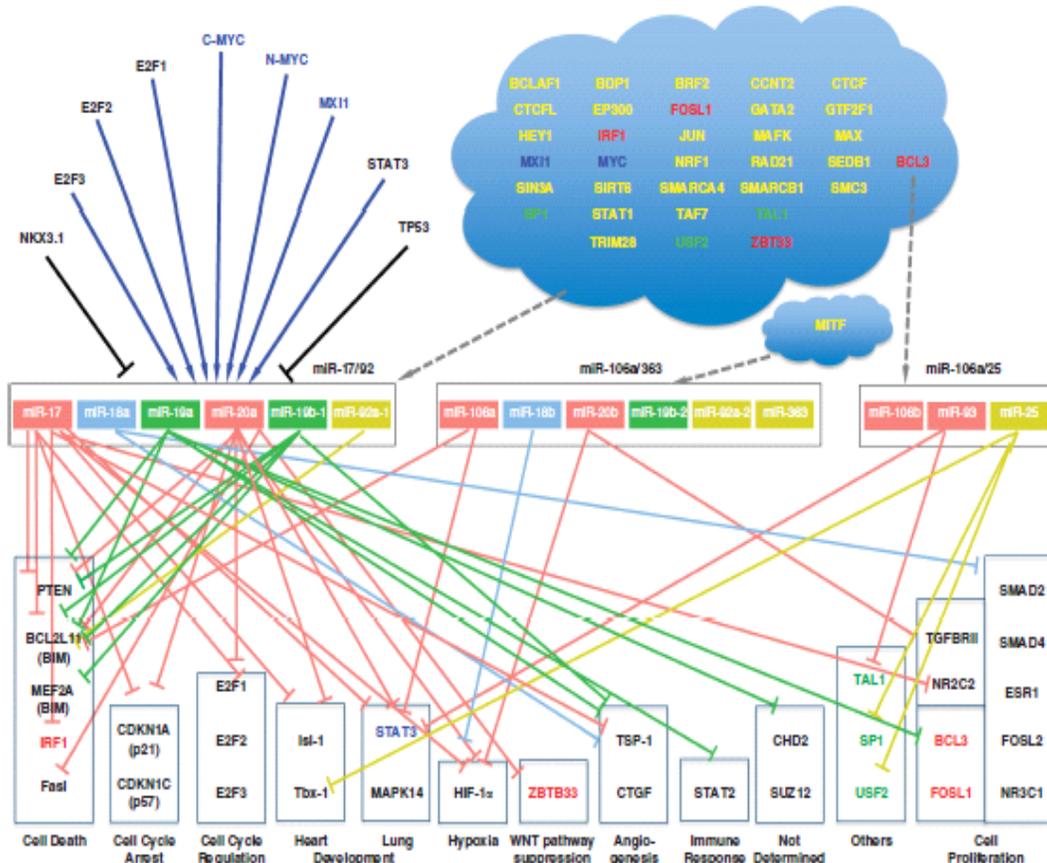


Abbildung 1-7: Darstellung der transkriptionellen Regulation und der wichtigsten Ziele des miR-17/92 Clusters und seiner Paraloge. Die Transkriptionsfaktoren (TFs; Kasten links oben) wurden bereits funktionell validiert; dunkelblaue Pfeile bedeuten Hochregulation, schwarze Linien Herunterregulation. Die Beziehung der TFs in der blauen Wolke zum miR-17/92 Cluster ist wahrscheinlich. Blaue TFs sind bereits validiert; rote TFs sind wahrscheinliche Regulatoren des miR-17/92 Clusters; grüne TFs regulieren vermutlich das miR-17/92 Cluster, sind aber gleichzeitig bekannt als Ziel des Paraloges miR-106a/25. Entnommen aus Mogilyansky und Rigoutsos, 2013.

Mittels TaqMan®-Real time-PCR konnte eine signifikante Heraufregulation der microRNA-20a durch biomechanisch induzierten „Stretch“ von Herzmuskulatur nachgewiesen werden (Abb.1- 8 A). Ein Northern blot in verschiedenen Geweben zeigte ein ubiquitäres Expressionsmuster der miR-20a mit deutlicher Expression in quergestreifter Muskulatur (Herz, langsame und schnelle Skelettmuskulatur) (Abb. 1-8 B).

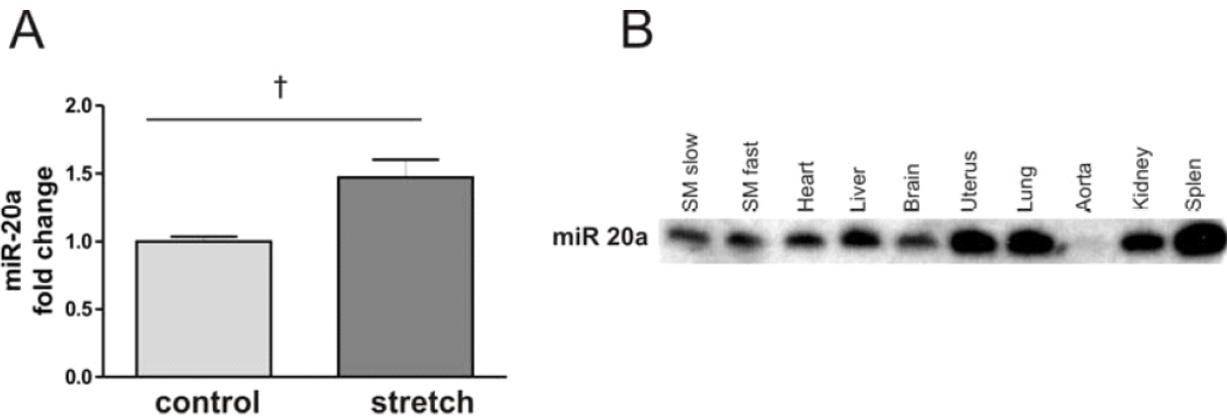


Abbildung 1-8: A Heraufregulation der miR-20a nach 24stündiger biomechanischer Belastung (TaqMan real time PCR, $p < 0.01$, $n = 8$). **B** Multi tissue“ Northern zur Nachweis der nahezu ubiquitären Expression der miR-20a. Entnommen aus Frank et al., 2012.

1.3.4. Die antiapoptotische Funktion der miR-20a

Um der Frage einer möglichen antiapoptotischen Funktion der miR-20a nachzugehen, wurden Mauserzen nach experimentellem Myokardinfarkt – hierbei ist die Apoptoserate im Bereich des ischämischen Myokardareals erhöht - auf eine mögliche differentielle Regulation der miR-20a untersucht. Dabei zeigte sich im Infarktgewebe nach 1 und 3 Tagen eine deutliche Heraufregulation der miR-20a, die nach 14 Tagen nicht mehr nachweisbar war (Abb.1- 9 C). Zur Prüfung einer potentiellen Mechanosensitivität der Regulation von miR-20a, wurde das Expressionsmuster der miR-20a in Mauserzen nach vier Wochen bestehendem „Aortic banding“ analysiert. Im Gegensatz zum Infarktmodell zeigte sich hier miR-20a signifikant herunterreguliert (Abb.9 D), so dass möglicherweise eine biphasische Regulation (Heraufregulation bei akutem und Herunterregulation bei chronischem kardialen Stress) besteht.

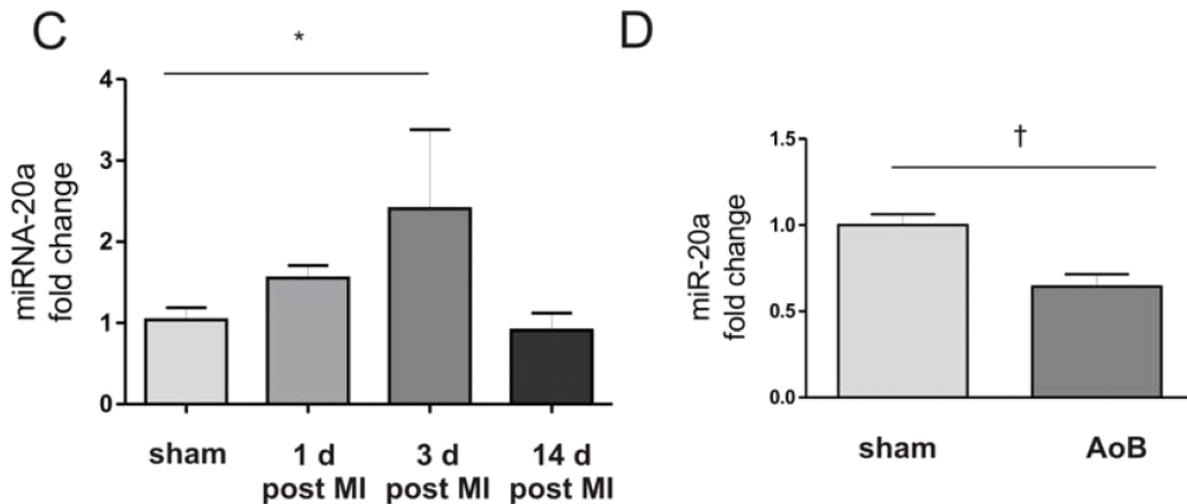


Abbildung 1-5: Expressionsmuster der microRNA-20a im Infarkt- und Aortic banding Modell. **C** TaqMan-real time PCR im Infarktbereich nach LAD-Ligatur. Nach 1 und 3 Tagen Heraufregulation der miR-20a, nach 14 Tagen kein Nachweis einer differentiellen Regulation. **D** signifikante Herunterregulation der miR-20a in Mausherzen nach chronischem aortalen Banding. Zur Verfügung gestellt von D. Frank.

Wie in Kap 1.2 dargestellt, führt biomechanischer Stress, aber auch eine sich entwickelnde Herzinsuffizienz zu einer gesteigerten Apoptoserate (Anversa et al., 1996, Hirota et al., 1999). Diese ist auch bei akuter ischämischer Minderversorgung des Myokards erhöht (Olivetti et al., 1997). Um eine denkbare kausale Rolle der antiapoptotischen miR-20a bei diesen Vorgängen näher zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Hypoxie-Apoptosemodell mit NRVCs etabliert, in denen durch adenoviralen Gentransfer die miR-20a überexprimiert wurde. In diesem Modell führte eine 12 Stunden andauernde schwere Hypoxie (~5 mmHg O₂) zu einer Verdopplung der Apoptoserate. Bei Überexpression der miR-20a kam es zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate (Abb. 1-10 A&B, TUNEL-Färbung und Quantifizierung).

Dieser Effekt der miR-20a Überexpression ließ sich mittels ELISA-basiertem Nachweis Histon-assoziiierter DNA-Fragmente bestätigen. Hierbei war eine Dosisabhängigkeit erkennbar (Abb. 1-10 C und D).

In den Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch miR-20a der proapoptotische Transkriptionsfaktor E2F1 negativ reguliert wird. Die miR-20a wird dabei in Abhängigkeit des Proto-Onkogens c-myc aktiviert (O'Donnell et al., 2005), welches durch biomechanischen Stress heraufreguliert wird.

Zur Prüfung der Frage, ob auch die Menge an endogen exprimierter miR-20a ausreicht, um Apoptose zu verhindern, wurden in NRVCs „knockdown“-Experimente unter Verwendung eines spezifischen miR-20a-Inhibitors (Ambion Antimir) gegen entsprechende Kontrollen durchgeführt. Die AntimiR ließen sich effektiv in die Kardiomyozyten transfizieren. Mittels Real time PCR war eine dosisabhängige Herunterregulation der miR-20a nachzuweisen (Abb. 1-10 E). Diese Herunterregulation war hinreichend, um die Apoptoserate in den Kardiomyozyten zu steigern (Abb. 1-10 F).

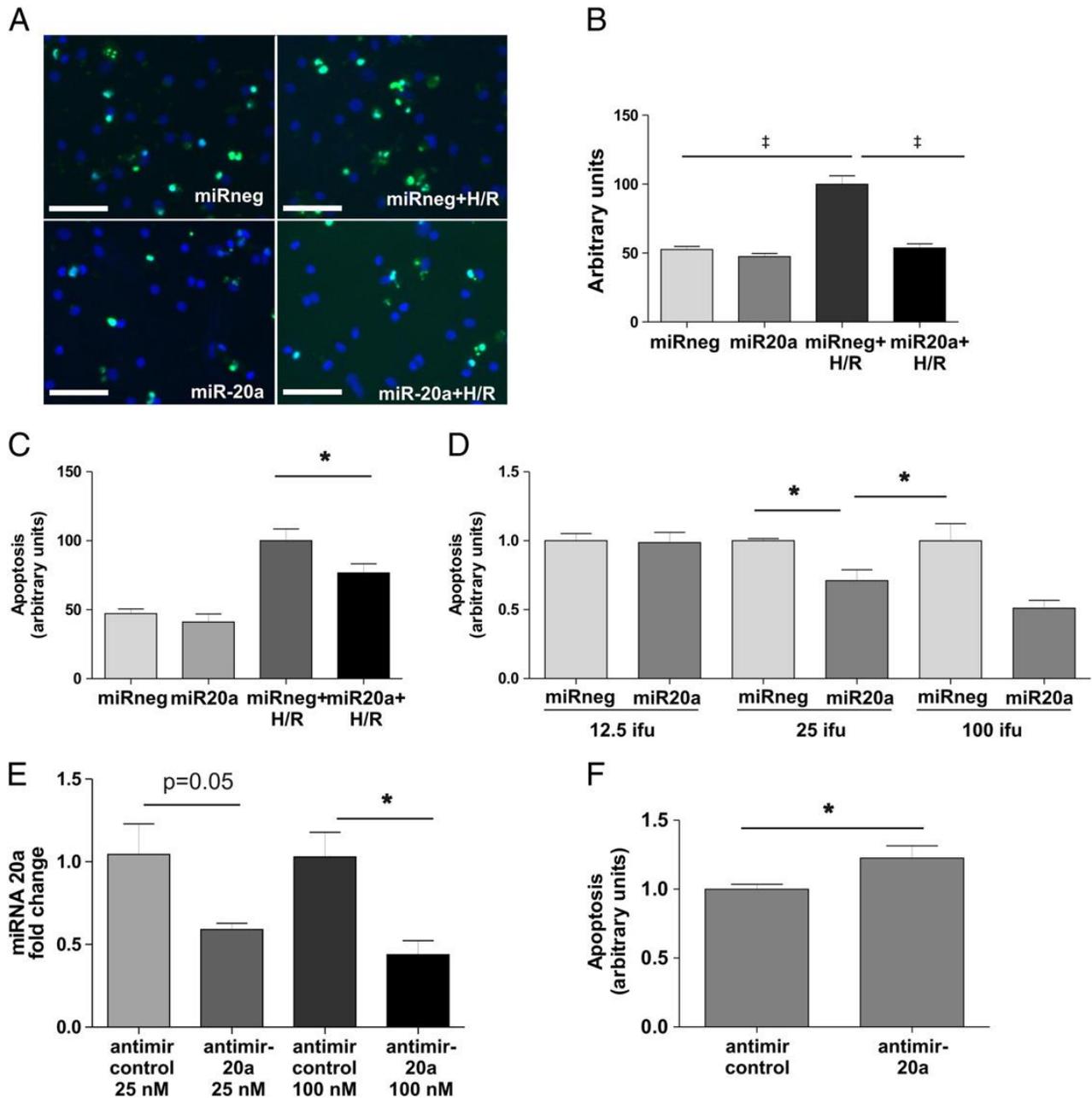


Abbildung 1-6: Die Überexpression von miR-20a reduziert die Hypoxie-induzierte Apoptose in neonatalen Kardiomyozyten. **A** Reduktion der Apoptoserate dargestellt in der TUNEL-Färbung; **B** Quantifizierung **C** ELISA-basierter Nachweis Histon-assoziiertes DNA-Buchstücken bestätigt den antiapoptotischen Effekt der miR-20a; **D** Dosisabhängigkeit der antiapoptotischen Eigenschaften von miR-20a. **E** Dosisabhängige Herunterregulation der miR-20a mittels eines spezifischen miR-20a Inhibitors. **F** Steigerung der Apoptoserate durch Knockdown der endogenen miR-20a. Entnommen aus Frank et al., 2012.

Andere Arbeitsgruppen hatten bereits in Experimenten mit nicht kardialen Zellen gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, welche im Rahmen der Steuerung des Zellzyklus die Apoptose befördern, Zielstrukturen der miR-20a sind (O'Donnell et al.,2005; Sylvestre et al., 2007). Insbesondere für E2F1 ist bekannt, den programmierten Zelltod in Kardiomyozyten auszulösen (Ebelt et al.,2005). In Übereinstimmung mit diesen Vordaten führte in den von unserer Gruppe durchgeführten Untersuchungen die adenovirale Überexpression der miR-20a zu einer signifikanten Reduktion der E2F1 Expression in NRVCMs, was einen potentiellen Mechanismus für die antiapoptotischen Eigenschaften der miR-20a darstellen könnte (Abb. 1-11). Zudem zeigte sich auch E2F2 durch die miR-20a herunterreguliert, während das Expressionsniveau von E2F4 und E2F5 unverändert blieb.

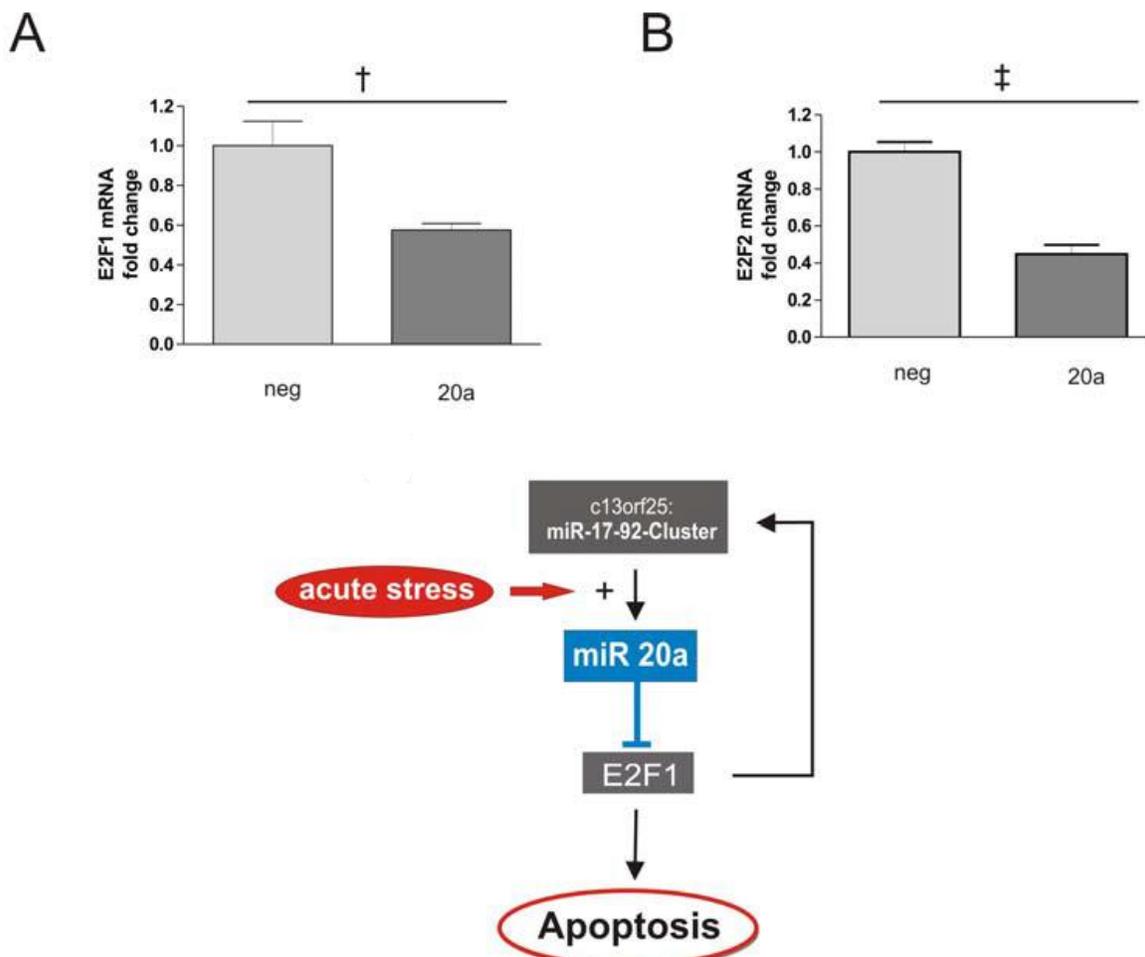


Abbildung 1-7: Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie als Zielstrukturen der miR-20a. Überexpression der miR-20a führt zu einer signifikanten Herunterregulation von E2F1 (A) und E2F2 (B). Entnommen aus DFG-Antrag.

Zusammenfassend konnten in den bisherigen Studien Hinweise dafür gefunden werden, dass die miRNA-20a nach biomechanischem Stress *in vitro* sowie im Infarktmodell *in vivo* differentiell exprimiert wird. Außerdem scheint die miRNA-20a eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose von Kardiomyozyten zu spielen und ist daher ein interessanter neuer Ansatzpunkt zur therapeutischen Beeinflussung der Progression der Herzinsuffizienz bzw. des Ischämie-/Reperfusionsschadens.

1.3.5. Target Screening potentieller Zielstrukturen von miR-20a

MicroRNAs beeinflussen die Genexpression in den meisten Fällen durch die Repression ihrer „Ziel“-mRNA. Für das Verständnis der spezifischen miRNA-Funktionen müssen daher ihre Zielstrukturen und Signalwege nach downstream eruiert werden.

Hierfür sind web-basierte Suchmaschinen verfügbar, die mittels biostatistischer Verfahren eine Target-Vorhersage erlauben. Folgende vier Suchmaschinen wurden benutzt:

1. *MicroCosm* (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/#>),
2. *microRNA.org* (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>),
3. *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>),
4. *microT* (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>).

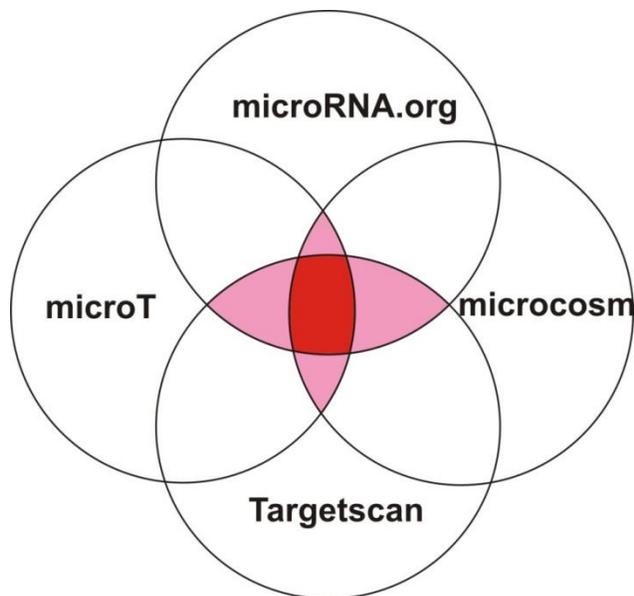


Abbildung 1-8: Venn-Diagramm zur schematischen Darstellung des genutzten Identifizierungsmechanismus von miR20a-Ziel-mRNAs.

Die Suchmaschinen unterscheiden sich durch die statistischen Algorithmen, die zur Vorhersage von microRNA-Bindungsstellen im Bereich des mRNA-Transkripts verwendet werden. Wie Abb. 12 zeigt, ergaben sich dabei Schnittmengen, deren Treffer bezüglich ihrer biologischen Relevanz in Kardiomyozyten sowie ihrer Spezifität analysiert wurden. Auf diese Weise konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, die potentiell durch miR-20a in Kardiomyozyten reguliert werden und somit für die Signaltransduktion bedeutsam sind.

Alle vier Suchmaschinen sagten die Prolylhydroxyase EglN3/PHD3 (Liu et al., 2010) als vielversprechendes Ziel-Gen voraus. EglN3 ist beim Menschen auf dem Chromosom 14q lokalisiert und soll aufgrund einer Reihe von Voruntersuchungen für die Regulation der Apoptose verantwortlich sein (Chen et al., 2011; Fong and Takeda, 2008; Lee et al., 2005). EglN3 könnte daher potentiell als interessante Zielstruktur der miR-20a zur Vermittlung ihres antiapoptotischen Effekts anzusehen sein.

1.3.6. Die potentielle Bedeutung von PHD3 als Zielprotein von miR-20a

EglN3/PHD3 ist wie seine beiden Isoformen PHD1 und 2 ein zellulärer Sauerstoff-Sensor, der die posttranslationale Umwandlung von 4-Hydroxyprolin in die hypoxia-inducible factor (HIF) α Proteine katalysiert (Fong et al., 2008). Prolyl-Hydroxylasen

sind Enzyme, welche die Sauerstoffabhängige Hydroxylierung bestimmter Prolin-Residuen katalysieren. Inzwischen ist bekannt, dass PHD1 bis 3 nicht nur als Sauerstoff-Sensoren fungieren, sondern auch auf eine Vielzahl anderer Signale, z.B. NO Veränderungen antworten.

Auf den funktionellen Zusammenhang von EglN3 mit Apoptose wiesen erstmals Lee et al., (2005) hin, als sie seine Bedeutung im Rahmen der normalen neuronalen Entwicklung, die mit einer physiologisch erhöhten Apoptose einhergeht, entdeckten. Ein Verlust von EglN3 führte dagegen zur Entwicklung von Phäochromozytomen aus neuronalen Vorläuferzellen.

Im Bereich der kardiovaskulären Forschung konnten *Cioffi et al.* danach im Jahr 2003 zeigen, dass Hypoxie eine Heraufregulation von EglN3 in Kardiomyozyten bewirkt. Aufgrund dieser Mitwirkung von EglN3 an der Steuerung des Zellzyklus gaben sie bereits der Hoffnung Ausdruck, dass eine Inhibition von EglN3 sich günstig auf das Überleben von Zellen auswirken könnte, und stellten somit einen Zusammenhang mit Vorgängen der Apoptose her. Dies konnten dann Liu et al. erstmals bei der Doxorubicin induzierten dilatativen Kardiomyopathie nachweisen (Liu et al., 2010). Sie konnten experimentell an H9c2 Zellen, einer aus dem embryonalen Rattenherz stammenden Zelllinie, feststellen, dass Doxorubicin-Behandlung der Zellen zur gesteigerten Apoptose mit erhöhter Caspase-3/7 Aktivität führt. Diese Apoptose ging mit einer Hochregulierung von EglN3 einher. Inhibition bzw. Silencing von EglN3 reduzierte substantiell die DOX-induzierte Apoptose. Demgegenüber reduzierte die EglN3 Hochregulation die Bildung des Bax-Bcl-2 Komplex und inhibierte so den antiapoptotischen Effekt von Bcl-2. EglN3 dürfte somit in Interaktion mit Bcl-2 für die DOX-induzierte kardiomyozytäre Apoptose verantwortlich sein. Ihre Inhibition könnte möglicherweise einen kardioprotektiven Effekt bei Herzerkrankungen haben, die mit verstärkter Apoptose einhergehen.

Aus einer Studie von Wencker et al. (2003) an transgenen Mäusen geht hervor, dass bereits ein sehr geringer Level von Apoptose in Kardiomyozyten ausreichend ist, um zu einer letalen Kardiomyopathie zu führen. Beim Menschen ist EglN3 sowohl bei schweren Kardiomyopathien, dem myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden als auch der Herzinsuffizienz hochreguliert, also bei Krankheitsbildern, die mit Apoptose assoziiert

sind (Xie et al., 2015). Mittelfristig erscheint es also möglich, die Progression bestimmter Kardiomyopathien mit Verschlechterung der Ventrikelfunktion durch die Inhibition der Apoptose zu beeinflussen. Unter Umständen ergäbe sich daraus sogar eventuell die Perspektive, dass die Egn3 Inhibition sich als günstig für die Behandlung der Herzinsuffizienz im Allgemeinen erweist.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Nachdem in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe die antiapoptotische Wirkung der miR-20a gezeigt werden konnte, war die Zielsetzung meiner Arbeit, die zugrundeliegenden molekularen Signalwege genauer zu charakterisieren.

Im ersten Schritt sollte dazu in *in vitro* Versuchen überprüft werden, welche Auswirkungen ein Knockdown von miR-20a auf die Expression von Egn3 hat.

Im zweiten Schritt sollte ein rekombinantes Egn3-Adenovirus kloniert werden, um nach seinem Zelltransfer die Überexpression von Egn3 auf RNA- und Protein-Ebene nachzuweisen. Andererseits sollte ein Egn3 antimir Virus kloniert werden, um nach seinem Zelltransfer den Knockdown von Egn3 auf RNA- und Protein-Ebene nachzuweisen.

Im dritten Teil sollte im dynamischen Stretch-Modell biomechanischer Stress simuliert und die Induktion von Apoptose in den NRVCs nachgewiesen werden und die Frage beantwortet werden, ob dieser Prozess durch Egn3 beeinflusst wird.

Im vierten Teil sollte nach Knockdown von Egn3 die Caspase-3/7 Aktivität als Parameter der Apoptose analysiert werden.

Im fünften Teil sollten die Auswirkungen einer Überexpression von miR-20a auf die Caspase-3/7 Aktivität untersucht werden.

Im sechsten Teil sollten die Auswirkungen einer Überexpression von Egn3 im Hinblick auf die Apoptoserate untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Adhesive clear qPCR seals, Sheets	Biozym Scientific GmbH
Agarplatten	Sarstedt
Axiovert 40 CFL mit HBO50	Zeiss
Branson 2200 Ultrasonic Cleaner	Polzin Laborbedarf
Culture Flasche 75cm ² ,175cm ²	Sarstedt
Culture Platte cellstar 24/12/6 well	greiner bio-one
Duomax 1030	Heidolph
Elektroporations-Küvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH
Fireboy	IBS Integra Biosciences
Galaxy Mini Star Centrifuge	VWR
Gefrierschrank -80° REVCO ULTIMA PLUS	Thermo Scientific
Heracell 240 i	Thermo Scientific
Heraus Multifuge X3R centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus PICO21 Centrifuge	Thermo Electron Corporation
Hera safe	Thermo Scientific
High Performance Ultraviolet Transilluminators	UVP
Infinite M200	PRO-TECAN
Inkubator 37°C	Heraeus Instruments
Inkubator steri cult 200	Labotect
MAX Q 8000	Thermo Scientific
Megafuge 16R	Thermo Scientific
Micro Pulser	Bio-Rad
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskop MZ 6	Leica
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories

Multipipette® plus	Eppendorf
My Cyclor	Bio-Rad
Neubauer Zählkammer	Carl Roth
Paramix (Vortexer)	inlabo
Parafilm „M“	Labaratory Film
Paramix Labortechnik II	Julabo Labortechnik
Pasteurpipetten 230mm	ROTH
PCR Platte 96 well, farblos	Biozym Scientific GmbH
Personal cyclor	Biometra®
Power Pack Basic/HC	Bio-Rad
Power PackP25	Biometra®
Pipette automatisch Research pro 5-100µl	Eppendorf
Pipetten, manuell	Eppendorf
Pipetten, manuell	GILSON
Pipette, serologische 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarsdtedt
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 200µl,1000µl	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
RCT basic safety control	IKA®
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5ml,2ml RNAse frei	Sarstedt
Röhrchen 14ml, 50ml	BD Falcon
Safe Seal microtube 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Spectrophotometer Nanodrop	peqLab Biotechnologie GmbH
Sterilm Gard Hood	The Baker Company
Stretcher Flexlink	Dunn Labortechnik
Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Sub Cell GT Wide Mini	Bio-Rad Laboratories
Systec VX-65 (Autoklav)	Systec
Systec DB-23 (Autoklav)	Systec
Tetramax 100	Heidolph
Thermal Cyclor C1000™	Bio-Rad Laboratories

Thermomixer comfort
Variomag Poly
Vacusafe comfort
Vortex-Genie2
Wasserbad GFL
Zentrifuge 5810
Zentrifuge Fresco 21
Zentrifuge Galaxy Mini star

Eppendorf
Thermo Scientific
IBS INTEGRA BIO SCIENCES
Scientific Industries
Polizin Laborbedarf
Eppendorf
Thermo scientific
VWR

2.1.2. Chemikalien

Agarose
Albumin fraction V
Ammonium persulfat (APS)
Bis-Tris
Collagenase Type 2
Collagen, Bovine, Type1
Collagen Solution
Chloramphenicol
Carbenicillin
DEPC
Dapi
DMEM-Medium
Endothelin1
Ethanol
Ethidiumbromid
Fetal Bovine Serum
Foetales Kälberserum
Glycerin
Isopropanol
Kanamycin
L-Glutamine

Biozym
Merck
Carl Roth
Carl Roth
Cell Systems Biotechnologie Vertrieb
BD BioScience
Sigma
Sigma
Carl Roth
Sigma-Aldrich
Invitrogen
Invitrogen (GIBCO)
Sigma
Carl Roth
Carl Roth
Biochrom
PAA-Laboratories
Carl Roth
Carl Roth
Sigma
Invitrogen gibco

Methanol ROTIPURAN	Roth
Milchpulver	Roth
MgSO ₄	Thermo Scientific
NatriumAcetat	Carl Roth
New born calf serum	Invitrogen
Pancreatin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Gibco
Percoll	GE Healthcare
30% PEG/MgCl ₂ Solution	Invitrogen
Phenylephrinehydrochloride	Sigma
Ponceau Solution	Sigma-Aldrich
Protein Assay	BioRad
Qiazol®Lysis Reagent	Qiagen
Roti® P/C/I	Carl Roth
Rotiphorese®Gel 30	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Spectinomycin	Sigma
N, N, N, N-tetramethylethylenediamine	Carl Roth
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Trizol-Reagenz	Invitrogen
Trypan blue solutuion (0,4%)	Sigma
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH

2.1.3. Medien

Medien zur Bakterienkultur

Medien zur Bakterienkultur wurden bei 4°C gelagert und vor ihrer Verwendung autoklaviert.

LB-Medium

1,0% (w/v) NaCl

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1,0% (w/v) Trypton

pH 7,0

2YT-Medium (Luria/Miller) von Carl Roth

0,5% (w/v) NaCl

1,6% (w/v) Trypton

1% (w/v) Hefeextrakt

pH 7,0

Medien zur Zellkultur

Medien zur Zellkultur wurden bei 4 °C gelagert und vor ihrer Verwendung in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Serumhaltiges Medium

DMEM mit 4,5g/l High Glucose und 110 mg/l Natriumpyruvat von PAA Laboratories

100 U/l Penicillin

100µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

10% FCS Gold (Fetal bovine Serum) von Biochrom

Serumfreies Medium

DMEM mit 4,5g/l High Glucose und 110 mg/l Natriumpyruvat von PAA Laboratories

100 U/l Penicillin

100µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

Transfektionsmedium

DMEM mit 4,5g/l High Glucose und 110 mg/l Natriumpyruvat von PAA Laboratories

2 mM L-Glutamin

2.1.4. Puffer und Stammlösungen

ADS-Puffer (10x konzentriert)

1,16 M NaCl

197 mM HEPES

94mM NaH₂PO₄·H₂O

55,5 mM Glukose

53,6 mM KCL

8,3 mM MgSO₄

pH 7,4

DreamTaq Green Buffer von Thermo Scientific

KCl

(NH₄)₂SO₄

MgCl₂

Kernlysepuffer

20mmol/l Tris ph 7,5

12,5% (v/v) Glycerol

10 mmol/l DTT

500 mmol/L Nacl

1% (v/v) NP-40

Vor Gebrauch Zugabe von: Phosphatase Inhibitor 1

Phosphatase Inhibitor 2

Proteinase Inhibitor 25x

1 M DTT

Ladepuffer für DNA (6x konzentriert) von Fermentas

10mM Tris

0,03% Bromphenolblau

60% Glycerol

60 mM EDTA

Ladepuffer für Protein nach Laemmli (4x konzentriert)

Tris Base

Glycerin

SDS

0,5 M EDTA

Bromphenol blue

pH 6,8

Laufpuffer für SDS-PAGE (10x konzentriert)

250mM TRIS

1,9 M Glycin

1% SDS

PBS (Dulbecco's PBS)

137 mM NaCl,

2,7 mM KCl,

4,3 mM Na₂HPO₄,

1,47 mM KH₂PO₄,

pH 7,4

RIPA-Puffer

1% (v/v) NP-40

1% (w/v) Natriumdesoxycholat

0,1% (w/v) SDS

150 mM NaCl

10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2

4% (v/v) Protease-Inhibitor

1 mM DTT (kurz vor Benutzung hinzufügen)

1 Tablette Proteinase-Inhibitor-Cocktail pro 50 ml Puffer

Ggf. Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1 und 2 hinzufügen

Sammelgelpuffer für Western-Blotting

500nM TRIS

0,4% SDS

pH 6,8

10x TBS

0,25 M Tris Base

1,5 M NaCl

25% HCl ; pH : 7,5

1x TBST

10x TBS

Tween 20 0,1%

Aqua dest

TE-Puffer

10mM Tris-Hcl

1mM EDTA

pH 8,0

Transferpuffer für Western Blotting

20% (v/v) Methanol

192 mM Glycin

0,037% (w/v) SDS

25mM Tris

Trenngelpuffer für SDS-Page

1,5M TRIS

0,4% SDS

pH 8,8

2.1.5. Antikörper

Anti alpha Actinin (mouse)	Sigma-Aldrich
Anti Hexon Antikörper (FITC-gekoppelt)	Sigma-Aldrich
Anti mouse GAPDH	Sigma-Aldrich
Anti-HIF Prolylhydroxylase 3 Polyclonal	Antibody Thermo Scientific
Anti-E2F1 rabbit polyclonal	Abcam
Anti-E2F2 mouse monoclonal	Abcam
Anti-Egln3, ab82886, mouse, monoclonal	Abcam
Anti-rabbit IgG HRP-konjugiert (donkey)	Santa Cruz Biotechnology
anti- α Tubulin (mouse, monoklonal)	Sigma-Aldrich
anti-cleaved-Caspase-3(rabbit monoklonal)	Cell Signaling Technology
anti-Caspase-3	Cell Signaling Technology
Anti-PARP	Cell Signaling Technology
Anti-Cleaved PARP rabbit	Cell Signaling Technology
Anti Caspase 9 (Human specific)	Cell Signaling Technology
Anti Cleaved Caspase 9 (Human specific)	Cell Signaling Technology
Anti Caspase-7 (Rabbit)	Cell Signaling Technology
Anti Cleaved Caspase-7 (Rabbit)	Cell Signaling Technology
Anti Hexon FITC-konjugiert, goat	Cell Signaling Technology
AntimiR-20a mouse, mouse monoclonal	Abcam

2.1.6. Oligonukleotide

Primer zur Real-Time PCR

qPCR_Rn18s_66_F	5'-GCA-CGG-CCG-GTA-CAG-TGA-AA-3'
qPCR_Rn18s_188_R	5'-GCG-CCC-GTC-GGC-ATG-TAT-TA-3'

RPL32mr_165_R	5'-CCG-CAC-CCT-GTT-GTC-AAT-GC-3'
RPL32mr_165_F	5'-GGT-GGC-TGC-CAT-GTG-TTT-TAC-G-3'
rE2f1_F	5'-GGA-AAG-TGC-AGA-GGG-GAT-TA-3'
rE2f1_R	5'-GAC-AAC-CGG-TCT-TCT-TCC-AT-3'
rE2f2_F	5'ACC-CAG-AGA-CCC-TGT-TTG-AC-3'
rE2f2_R	5'CAG-TAC-CCA-CTG-CTC-CTT-CA-3'
rEgln3_F	5'CTC-CTA- TGC-CAC-CAG-GTA-CGC-C-3'
rEgln3_R	5'GAA-TGC-GCC-CAG-CGG-ACT-TC-3'

Primer zur Gateway Klonierung:

Egln3miR673_top	5'TGC-TGT-AAT-GCA-GCT-GCT-TGA-CTC-GCG-TTT-TGG-CCA-CTG-ACT-GAC-GCG-AGT-CAA-AGC-TGC-ATT-A-3'
Egln3miR673_bot	5'CCT-GTA-ATG-CAG-CTG-TGA-CTC-GCG-TCA-GTC-AGT-GGC-CAA-AAC-GCG-AGT-CAA-GCA-GCT-GCA-TTA-C-3'
Egln3miR2003_top	5'TGC-TGT-AAA-TTA-CCA-GGA-CGC-TTC-CTG-TTT-TGG-CCA-CCTG-ACT-GAC-AGG-AAG-CGC-TGG-TAA-TTT-A-3'
Egln3miR2003_bot	5'CCT-GTA-AAT-TAC-CAG-CGC-TTC-CTG-TCA-GTC-AGT-GGC-CAA-AAC-AGG-AAG-CGT-CCT-GGT-AAT-TTA-C-3'

2.1.7. Vektoren/ Plasmide

pAd/CMV/V5-Dest	Invitrogen
pcDNA6.12 miRVektor	Invitrogen
pDONR 201	Invitrogen
pDONR 221	Invitrogen

2.1.8. Kits

Amersham ECL Plus Detektionssystem	GE Healthcare
IQ™ Multiplex Powermix	Bio Rad
Lipofectamin LTX and Plus™ Reagent	Invitrogen
NucleoSpin ^R Plasmid Kit	Machery-Nagel
Plasmid Maxi Kit	Qiagen

Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen
SYBR GreenER qPCR Supermix	Invitrogen
TaqMan® MICRO-RNA Reverse Transcription Kit	Invitrogen

2.1.9. Enzyme

Dream Taq DNA Polymerase	Fermentas
Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
MscI (Restriktionsenzym)	Fermentas
PacI (Restriktionsenzym)	NEB
ProteinKinase K	Invitrogen
TaqDNA Polymerase	Invitrogen

2.1.10 Ziellinien

HEK 293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die mit fragmentierter DNA von Adenovirus Typ 5 transformiert wurden. Es wird die Variante HEK T und HEK A unterschieden, ausschließlich HEK A wurde verwendet. Diese exprimieren konstitutiv adenovirale E1 Proteine und sind zur Produktion von rekombinanten Adenoviren geeignet

2.1.11. Versuchstiere

Neugeborene Ratten (*Rattus norvegicus*)

Ratten vom Wistar-Stamm wurden bei Charles River Laboratories bestellt. Die Tiere wurden verpaart und die neugeborenen Ratten wurden für die Gewinnung von Kardiomyozyten nach ein bis drei Tagen getötet.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Transformation elektrokompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Elektrokompetente E. coli Top 10 Bakterien wurden für die Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation verwendet. Die Bakterien wurden bei -80° gelagert und unmittelbar vor ihrer Anwendung vorsichtig auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurden die Elektroporationsküvetten auf Eis gekühlt. 3 μ l des Ligationsansatzes mit enthaltendem Vektor wurden mit ca. 80 μ l E. coli Bakterien vermischt. Dieser Transformationsansatz wurde vollständig in die Elektroporationsküvette überführt und einem Elektroschock für circa 3 ms mit 1,8 kv ausgesetzt. In diesem Moment war die Membran der Bakterien kurzfristig permeabel, so dass die gewünschte Plasmid-DNA eingeschleust werden konnte. Unmittelbar nach der Transformation wurde 1 ml LB-Medium in die Küvetten pipettiert und die Bakterien darin vorsichtig resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt und im Thermomixer bei 37°C für eine Stunde bei 750 rpm inkubiert.

Herstellung von Selektivnährböden

Für die Herstellung von Selektivnährböden wurde LB-Medium 1,5% (w/v) Agarpulver vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Nach dem Autoklavierprozess wurde gewartet, bis das Gemisch bis auf ca. 60°C abkühlte und erst dann wurde eine adäquate Menge eines Antibiotikums hinzugefügt, um ein selektives Bakterienwachstum zu ermöglichen. Das Medium wurde in Petrischalen gegossen und härtete bei Raumtemperatur aus. Dann wurden die Agarplatten umgedreht, damit das Kondenswasser abtropfen konnte. Bis zur Verwendung wurden die Nährböden bei 4°C gelagert.

Ausstreichen der Bakterien auf Agarplatten

Nach der einstündigen Inkubation wurden die transformierten Bakterien auf den Agarplatten in unterschiedlichen Mengen (10 μ l-300 μ l) ausgestrichen, um verschiedene Bakteriendichten auf den Agarplatten zu erhalten. Danach wurden die Platten über

Nacht in den Inkubator gestellt, um ein optimales Bakterienwachstum zu ermöglichen. Die Aussaat der Bakterien auf den Agarplatten dient der Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien, da diese ein Plasmid enthielten mit der passenden Antibiotikumresistenz.

Bakterienanzucht in Flüssigkulturen

Nach der nächtlichen Inkubation wurden am nächsten Morgen einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze geerntet. Die Pipettenspitzen wurden in vorbereitete Röhrchen gelegt, die je 5ml LB-Medium und je nach Resistenzkassette des zu amplifizierenden Plasmids 5 µl Antibiotikum enthielten. Diese wurden über Nacht in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag erfolgte eine Mini- oder Midi-Präparation für die Ernte der Plasmid-DNA.

2.2.2. Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit DNA

Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung der rekombinanten Plasmide wurde das Nucleo-Spin Plasmid Kit von Macherey-Nagel verwendet. 2ml Bakteriensuspension einer Übernachtskultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei 11.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 250µl RNase enthaltendem A1 Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurde als nächstes der Bakteriensuspension 250µl des alkalischen A2 Puffers hinzugefügt und durch sechs bis achtmaliges Invertieren gemischt. Auf diese Weise wurde die DNA denaturiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 300µl A3 Puffer dem Gemisch hinzugefügt und somit eine Neutralisation erreicht. Die genomische DNA fiel dabei aus, während die Plasmid-DNA renaturiert und gelöst blieb. Durch Zentrifugation für 10 Minuten konnten die Zellreste, denaturierten Proteine und denaturierte DNA von den Plasmiden getrennt werden. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und auf eine Säule gegeben. Das Pellet, welches Zellreste, denaturierten Proteine und denaturierte DNA enthielt, wurde verworfen. Es folgte eine Zentrifugation der Säulen für eine Minute bei 11.000 rpm. Dadurch konnte die Plasmid-

DNA an die Säulenmembran binden. Anschließend wurde 500µl vom Waschpuffer auf die Säulen gegeben und eine Minute bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Eine weitere Reinigung der Plasmid DNA erfolgte mit 600µl A4 Puffer, der ebenfalls auf die Säule pipettiert und bei höchster Drehzahl für eine Minute zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und, um die Säulenmembran zu trocknen und die Spuren des Waschpuffers zu entfernen, für 2 Minuten bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Die Zentrifugationssäule wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt. Zur Elution der Plasmid-DNA von der Säulenmembran wurde 50µl vom AE Puffer auf die Säule pipettiert, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 11000 rpm zentrifugiert. Die aufgefangene Flüssigkeit enthielt die Plasmid-DNA. Am Photometer konnte nun die Konzentration bestimmt werden.

Midipräparationen von DNA

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet. 5ml Bakteriensuspension einer Übernachtskultur wurde auf zwei 50ml Falcon Tubes verteilt und anschließend bei 4700g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Aus beiden Tubes wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets wurden mit je 2ml Buffer P1 resuspendiert. Jedem Tube wurde dann 2ml Buffer P2 hinzugegeben und einige Male zur Durchmischung hin- und hergeschwenkt und nachfolgend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde jedem Tube 4ml vom kalten (4°C) Buffer P3 hinzugefügt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde danach jeweils in ein Carbon-Röhrchen überführt und für 30 Minuten bei 14500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der das Plasmid enthielt, wurde in ein neues Carbon-Röhrchen pipettiert, direkt wieder bei 14500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand schließlich in ein Qiagen-tip 100 überführt. Das Qiagen-Tip wurde zuvor mit 4ml Buffer QBT äquilibriert. Der Überstand im Qiagen-Tip tropfte entlang der Schwerkraft in ein darunter gestelltes Glasrohr. Das Qiagen-Tip wurde zweimal mit jeweils 10ml Buffer QC gewaschen und danach auf ein neues Carbonröhrchen gestellt. Nun wurde 5 ml Buffer QC auf 65°C erwärmt und auf das Qiagen-Tip pipettiert. Dadurch wurden die Plasmid-Proben eluiert. Den Carbon-Röhrchen mit der eluierten Plasmid-DNA wurden nun 3,5ml Isopropanol (Raumtemperatur) hinzugefügt und sofort für 30 Minuten bei 14500 rpm und 4°C im Carbonrotator zentrifugiert. Dem Pellet wurde

2ml 70% Ethanol hinzugeführt und wieder für 10 Minuten bei 1500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Carbon-Röhrchen zum Trocknen umgedreht für 10 Minuten. Danach wurde das Pellet mit einer adäquaten Menge AE- bzw. TE –Buffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine Konzentrationsbestimmung am NanoDrop-Photometer.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde am Nanodrop Spektralphotometer ermittelt. 1 µl unverdünnte Probe wurde direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Durch Absorptionsmessung bei 260nm und 280nm konnte der Gehalt an Nukleinsäuren ermittelt werden. Des Weiteren konnte aus dem Quotienten 260/280 nm Rückschlüsse auf den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren gezogen werden. Bei einem Wert von 1,8 bis 2,0 kann eine ausreichende Reinheit der Nukleinsäure angenommen werden. Ist das Verhältnis jedoch deutlich niedriger, liegen Verunreinigungen der Probe mit Proteinen und/oder Phenol vor.

Amplifikationen von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktionen

Die Polymerase Kettenreaktion dient zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Es wurde ein Reaktionsansatz vorbereitet mit einem Volumen von insgesamt 25 µl und abhängig vom Template unterschiedlicher Mengenzusammensetzung (Tabelle 2-1). Damit der zu amplifizierende DNA-Abschnitt einsträngig vorlag, wurde dieser im ersten Schritt im Thermo Cycler durch Hitze denaturiert. Dann konnten sich die Primer anlagern, welche zu einem bestimmten DNA-Abschnitt des Templates komplementär waren. Im nächsten Schritt verlängerte eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der denaturierten DNA-Matrize in 5´3 Richtung (Elongation). So wurde der DNA Abschnitt zwischen den beiden Primern in einem Zyklus verdoppelt. Die dabei entstehenden DNA-Stränge standen als Matrize für den nächsten Zyklus zur Verfügung. Je nach Template Länge und Annealing Temperatur der Primer wurde für die Amplifikation das Standardprogramm des Thermo Cyclers variiert.

DNA-Template	1 µl
Primer forward	1-2 µl
Primer reverse	1-2 µl
dNTPS 10 Mm	0,2-0,5 µl
Taq Polymerase	2 µl
10x konzentrierter PCR-Puffer	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 2-1: Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	30x
Annealing	59°C	30 sec	30x
Elongation	72°C	30 sec	30x
Finale Elongation	72°C	7 min	1x
Kühlung und Aufbewahrung	4°	Unbegrenzt	1x

Tabelle 1-2: Programm für die Polymerase-Kettenreaktion mit dem Thermo Cycler

Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA

Die Agarose-Gel-Elektrophorese diente zur horizontalen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Molekülgröße in einem 1%igen Agarosegel. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde Agarose-Pulver mit TAE-Puffer vermischt und erhitzt, damit sich das Agarose-Pulver auflösen konnte. Anschließend wurde dem Gel nach einer kurzen Abkühlung 10 µl Ethiumbromid hinzugefügt und in eine Gelkammer gegossen. Entstandene Luftblasen wurden entfernt und ein Kamm für die Beladungstaschen platziert. Nach der Aushärtung wurden die Gele in eine Wanne gelegt, die mit TAE-Puffer gefüllt war. Der Taschenkamm wurde vorsichtig herausgezogen, damit die DNA-Proben, welche mit einem Ladepuffer versetzt wurden, in die vorgeformten Geltaschen

pipettiert werden konnten. Zusätzlich wurde als Größenstandard ein DNA-Marker in eine Tasche pipettiert. Danach wurde eine Spannung von 100mV für ca. eine halbe Stunde angelegt. Dadurch begannen die negativ geladenen DNA-Teile im elektrischen Feld zum Plus Pol zu wandern. Mithilfe des interkalierenden Farbstoffes Ethiumbromid konnte die DNA im Agarosegel im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit. Zunächst wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten, in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Zu dem Gelfragment wurde das dreifache Volumen an Bindungspuffer gegeben. Das Gel wurde unter Schütteln bei 55°C inkubiert bis die Agarose sich verflüssigte. Danach wurde pro 100 mg Gel 100µl Isopropanol hinzugegeben und die Lösung durch Vortexen gemischt. Eine Säule wurde auf ein Auffanggefäß gelegt und die Probe auf die Membran dieser Säule pipettiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 13000/U, um die DNA an die Säule zu binden. Es folgte ein Waschschriff mit 750µl Waschpuffer. Durch die Zugabe von 30µl Elutionspuffer und einer einminütigen Zentrifugation bei 13000/U wurde die DNA eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.3. Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit RNA

RNA-Isolierung aus NRVCM

Die RNA-Isolierung aus den ventrikulären Kardiomyozyten der neugeborenen Ratten (NRVCM) erfolgte mittels der Trizol-Methode. Diese waren auf 6-well-Platten mit 8×10^5 bis 1×10^6 / Well verteilt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und mit 2 ml PBS gewaschen. Dann wurde pro Well 1 ml Trizol hinzugefügt. Mithilfe des Trizols konnten die Zellen vom Plattenboden gespült werden. Die Zellsuspension wurde in RNase-freie 1,5 ml Cups überführt. Hier konnte alternativ die Zellsuspension optional bei -80°C zur weiteren Verarbeitung gelagert werden. Dementsprechend mussten dann zum nächsten Schritt die Proben wieder auftauen und bei Raumtemperatur inkubiert werden. Jeder

Probe wurde 200µl Chloroform hinzugefügt und vorsichtig hin- und hergeschwenkt. Anschließend wurden die Proben für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach zentrifugiert für 15 Minuten bei 12000g/4°C. Dadurch konnte eine Phasentrennung erzielt werden. Die oberste Schicht war eine farblose wässrige Phase, die die RNA enthielt, darunter lag die Interphase mit Protein und die unterste Schicht bildete eine rote Phase mit Phenol und Chloroform, in der DNA lag. Der Überstand wurde nun vorsichtig in ein RNase-freies 1,5 ml Cup pipettiert, die restliche Mischung wurde verworfen. Zur RNA-Fällung wurde nun in jedes Cup 500µl Isopropanol zugegeben, gut gemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte wieder eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000g/4°C. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml 75% Ethanol gewaschen und gevortext. Es folgte wieder eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 7500g/4°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, zurück blieb ein weißes Pellet, welches bei Raumtemperatur 5-10 Minuten luftgetrocknet wurde und dann in 30µl DEPC Wasser aufgenommen wurde. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei 55°C konnte die RNA nun bei -80° C gelagert werden oder weiter verwendet werden zur Bestimmung der RNA-Konzentration.

DNase-Verdau und RNA-Phenol-Chloroform Aufreinigung

Der DNase-Verdau und die Phenol-Chloroform Aufreinigung wurde durchgeführt, um die RNA von DNA-Verunreinigungen zu befreien. Dazu wurde zunächst 5 µg RNA in 40µl DEPC-H₂O aufgenommen, mit 5 µl DNase I und 5µl 10x DNASE I Reaction Puffer vermischt und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit einer gleichen Menge Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol versetzt und intensiv gemischt. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation über 10 Minuten mit 14.000rpm bei 4 °C. Die wässrige obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. In der wässrigen Phase befand sich die RNA, die zur Fällung mit 300µl Ethanol und 10µl 3 M Na-Acetat versetzt und für 30 Minuten bei -20° C inkubiert wurde. Danach wurde erneut zentrifugiert für 40 Minuten mit 14.000rpm bei 4°C, der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Pellet mit 500µl 75% Ethanol gewaschen und durch Vortexen gut gemischt. Schließlich wurde

wieder zentrifugiert für 5 Minuten mit 14.000rpm bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet getrocknet und mit einer adäquaten Menge DEP-H₂O (9-11µl) aufgenommen. Nun konnte die RNA-Konzentration am Nanodrop-Spectrophotometer ermittelt werden.

Reverse Transkription zur Synthese von cDNA

Bei der reversen Transkription wurde aus einem RNA-Strang ein komplementärer DNA-Strang hergestellt. Die sogenannte cDNA-Synthese wurde mit dem SuperScript III First Strand Synthesis System von Invitrogen durchgeführt. Zunächst wurde jeweils 1 µg RNA, 0,5 µl Random-Hexamer-Primer (50-250ng) und 1 µl Desoxynukleotid-Mix (10 mM für dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit DEP-H₂O auf 13,5 µl aufgefüllt und im Biometra Cycler für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Proben unverzüglich auf Eis für 2 Minuten gestellt und schließlich abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein zweiter Ansatz vorbereitet, der 4 µl 5x First-Strand-Buffer, 1µl 10mM DTT, 1µl RNaseOUT (40U/µl) sowie 0,5 µl SuperScript III (200units/µl) enthielt. Dieser Ansatz wurde der Probe hinzugefügt und durch langsames Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgten im Biometra Cycler mehrere Inkubationsschritte. Zunächst wurden die Proben für 10 Minuten bei 25°C inkubiert, dann für eine Stunde bei 50°C und schließlich für 15 Minuten bei 70°C. Im letzten Inkubationsschritt konnte die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 70°C inaktiviert werden. Im Anschluss wurden die Proben unverzüglich auf Eis gekühlt und schließlich die cDNA mit PCR-H₂O auf 100µl aufgefüllt. Die synthetisierte cDNA diente nun als Ausgangsmaterial für die Polymerase-Kettenreaktion.

Real-Time PCR

Die Real-Time-PCR ermöglicht eine Vervielfältigung der Nukleinsäuren und zusätzlich eine Quantifizierung der Genexpression auf RNA-Ebene. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green genutzt. Dieser bindet sequenzspezifisch in kleine Furchen doppelsträngiger DNA und kann dann in Gegenwart von blauem Licht (480nm) durch seine Emissionen detektiert werden. Der Anstieg des Farbstoffsignals war proportional zur Zunahme des

Amplifikationsproduktes. Es wurde ein Mastermix hergestellt, dessen Zusammensetzung aus der unten aufgeführten Tabelle entnommen werden kann. Diese Menge wurde in ein Well einer speziellen lichtdurchlässigen Real-Time-PCR-96 Loch-Platte überführt. Je nach Anzahl der Proben wurde entsprechend die Menge der Mastermixe vorbereitet. In jedes Well wurde zu dem Mastermix 2 µl des jeweiligen cDNA-Templates hinzugefügt. Jede Messung erfolgte im Triplett, d.h. pro Bedingung lagen drei Reaktionsansätze vor.

SYBR Green qPCR SuperMix	10 µl
ddH ₂ O	7,2µl
Primer forward 100µM	0,4µl
Primer reward 100µM	0,4 µl
	Summe: 18 µl

Tabelle 2-2: Mastermix für die Real-Time- PCR

Des Weiteren wurde 18S-rNA auf die eingesetzte cDNA-Menge als Referenzamplikon eingesetzt, so dass eine relative Quantifizierung der Transkripte vorgenommen werden konnte. Die PCR-Platte mit den Proben wurde in den ABI-PRISM 7000 Lightcycler gestellt, es erfolgte die Real-Time PCR nach einem Standardprogramm (Tab. 2-4).

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
UDG Inkubation	50	2 min	1x
Initiales Denaturieren	95	2 min	1x
Denaturierung	95	15 s	40x
Annealing	57	15 s	
Elongation	72	1 min	
Dissoziationsprotokoll	95	15 s	1x
	60	20 s	
	95	15 s	

Tabelle 2-3: Standardprogramm für die Real-Time PCR im ABI Prism 7000

Um die Probenkonzentration zu ermitteln, wurde der Ct-Wert (threshold of cycle) verwendet. Die amplifizierte doppelsträngige DNA denaturiert bei einer spezifischen Temperatur, der sogenannten Schmelztemperatur. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt mit der Folge, dass das Fluoreszenzsignal stark abfällt. Die Schmelztemperatur ist davon abhängig von der Basenlänge und der Produktmenge des Templates, so dass es dementsprechend zu einem früheren oder späteren Anstieg der

Floureszens-Emission kam. Jede Messung erfolgte in Duplikationen, so dass der Mittelwert der Ct-Werte bestimmt wurde. Dieser Mittelwert wurde in Relation zu dem Mittelwert des Housekeeping Gens gesetzt.

Zur Detektion von microRNAs wurde das TaqMan® MicroRNA Assay verwendet. Es wurde ein Master Mix vorbereitet wie unten in der Tabelle aufgeführt. Diesem wurden 3µl miR-spezifische Reverse-Transkriptions Primer (looped primer) hinzugefügt. Die Proben wurden auf eine spezielle 96 Well Platte verteilt und jeder das entsprechende Template hinzugefügt. Danach wurde die qPCR gestartet.

Komponenten	Master Mix
100 mM dNTPs	0,15 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase 50U/µl	1,00
10x Reverse Transcription Buffer	1,50 µl
RNase Inhibitor, 20 U/µl	0,19 µl
ddH ₂ O	4,16
Total	7,00µl

Tabelle2-4: Reaktionsansatz für die quantitative Taq Man Real Time PCR

2.2.4. Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit Proteinen

Proteinextraktion aus NRVCM

Zur Extraktion von Proteinen aus NRVCMs wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS auf Eis gewaschen. Danach wurde das PBS wieder abgenommen. Pro Well wurde 150µl RIPA-Puffer verteilt und die Zellen wurden mit einem Zellschaber mechanisch abgelöst. Die Suspension wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff auf -196°C schockgefroren, danach bei 37°C in einem Thermomixer erwärmt. Dieser sogenannte „freeze and thaw“-Zyklus wurde zweimal wiederholt. Zuletzt wurden die Proben für 20 Minuten bei 18000g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand mit den Zellproteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Nun konnte die Messung der Proteinkonzentration erfolgen.

Extraktion der Kernproteine aus NRVCM

Eine weitere Möglichkeit zur Proteingewinnung stellte die Kernextraktion dar. Nachdem die NRVCMs mit rekombinanten Adenoviren infiziert und dann geerntet wurden, erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis. Zunächst wurden die Zellpellets in 100µl Kernextraktionspuffer-Puffer A resuspendiert und für 30 Minuten inkubiert. Alle verwendeten Puffer wurden zuvor mit einem Protease-Inhibitor-mix hinzugefügt, um einen Proteinabbau durch Proteasen zu verhindern. Anschließend wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 16000x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets in dem Kernextraktionspuffer-Puffer B resuspendiert und wieder für 20 Minuten inkubiert. Es erfolgte wieder eine Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 16000xg. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, darin waren die Kernextrakte enthalten. Im Anschluss erfolgte die Konzentrationsmessung.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bradford-Test. Als erstes wurde eine Verdünnungsreihe mit einer BSA-Stocklösung angelegt.

Verdünnungsstufe		Protein (µl)	Puffer(µl)	mg/ml
1	Stock	100	-	2,56
2	Stock	50	50	1,28
3	Verd.2	50	50	0,64
4	Verd.3	50	50	0,32

Tabelle 2-5: Schema der Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.

Nach einem festgelegten Pipettierschema wurden 2µl der Proteinproben und 200µl Bio-Rad Protein Assay Reagenz in Triplikaten in eine Microtiterplatte pipettiert. Für einige Minuten wurde die Platte auf einen Schüttler gestellt. Danach folgte die Absorptionsmessung bei 595 nm mittels eines Spektrophotometers. Die Standardreihe wurde zur Kalibrierung genutzt, um die Konzentration der Proteinproben zu ermitteln.

Auftrennen von Proteinen durch SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der diskontinuierlichen Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, konnten die Proteine nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen

Feld bestimmt werden. Dieses Auftrennungsverfahren erfolgte in Gelen auf Polyacrylamidbasis. Je nach Größe der Proteine wurden unterschiedliche Konzentrationen an Acrylamid verwendet. Es wurden zwei Gele vorbereitet, ein Trenn- und ein Sammelgel. Diese unterscheiden sich hinsichtlich des pH-Wertes, Ionenstärke sowie Porengröße. Im Sammelgel wurden die Proben zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt wurden. Zur Vorbereitung wurden zunächst zwei Glasplatten mit 70%igem Ethanol gereinigt und in eine entsprechende Vorrichtung eingespannt. Dann wurde das Trenngel vorbereitet. (s. Tabelle 2-7) Durch die Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisation des Acrylamids eingeleitet. Nun wurde das Trenngel zwischen die beiden Gasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine Ausdunstung zu vermeiden. Das Gel musste mindestens 20 Minuten zur Aushärtung stehen gelassen werden.

	8%	10%	12,5%	15%	20%
30% Acrylamid/bis-Acrylamide (ml)	2,7	3,3	4,2	5,0	6,7
Trenngelpuffer(ml)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
ddH2O (ml)	4,5	3,9	3,0	2,2	0,5
APS 10% (w/v) [µl]	60µl	60µl	60µl	60µl	60µl
TEMED [µl]	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl

Tabelle 2-6: Herstellung eines Trenngels für SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt.

In der Zwischenzeit konnte das Sammelgel vorbereitet werden. (s. Tab.2-8)

Sammelgel-Puffer	1,4ml
30% Acrylamide/bisacrylamide	0,8ml
10% APS	30 µl

Tabelle 2-7: Herstellung eines Sammelgels für die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese.

Nach Aushärtung des Trenngels wurde das Isopropanol mit H₂O ausgewaschen und das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen. Unmittelbar danach wurde ein Gelkamm zur Ausbildung der Probestaschen in das Sammelgel gesteckt. Nach der Aushärtung des Sammelgels (15 Minuten) konnte der Kamm nun vorsichtig rausgezogen werden und das Gel wurde in seiner Apparatur in eine

Elektrophoresekammer eingesetzt, die mit Laufpuffer gefüllt wurde. Den proteinhaltigen Proben wurde nun das Detergens SDS im Überschuss hinzugefügt. SDS bindet sehr effizient an Proteine. Dadurch wird das Protein vor der Auftrennung im Gel denaturiert. Des Weiteren ist SDS negativ geladen und verleiht durch die Bindung an die Proteine eine negative Ladung, so dass die Eigenladung der Proteine zu vernachlässigen ist und auch keinen Einfluss bei der Auftrennung haben soll. Als nächstes wurden die Proteinproben mit einem vierfach konzentrierten Laemmli Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Es folgte eine kurze Zentrifugation mit der Tischzentrifuge. Dann konnten die Proben mit einer Pipette in die Taschen gefüllt werden. Parallel zu den Proben wurde ein vorgefärbter Proteinstandard zur Größenorientierung aufgetragen (Page Ruler Plus von Fermentas). Die Elektrophorese lief bei 100V für eine Stunde. Zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel erfolgte die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 100 V und zur Auftrennung im Trenngel bei konstanter Spannung von 200 V für circa eine Stunde.

Proteintransfer auf Nitrozellulose mittels Western Blot

Der Westernblot dient dazu, die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine spezielle Membran zu transferieren, um somit eine Detektion mit immunhistochemischen Methoden zu ermöglichen. Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen aus dem Glasrahmen entnommen. Dann wurde der Blot vorbereitet. Durch Eintauchen in 100%igem Methanol wurde die sogenannte PDVF-Membran aktiviert und unmittelbar danach mit Transfer-Puffer gewaschen. Als nächstes wurde der Blot mit folgenden Komponenten zusammengestellt: ein Schaumstoffkissen, 2x Filterpapier (Whatman-Papier), Gel (mit vorher abgetrenntem Sammelgel) und Membran (PDVF), 2x Filterpapier (Whatman-Papier) und wieder ein Schaumstoffkissen. Dieser sogenannte „Sandwich“ wurde in eine Transferkassette eingespannt und dann in ein Elektrodenmodul eingesetzt. Das Elektrodenmodul wurde in einen Tank eingesetzt. In den Tank wurde ein Kühlakku hineingelegt, um eine Überhitzung des Systems zu vermeiden. Danach wurde der Tank mit Transferpuffer befüllt. Der Deckel, die Anode, verschloss die Blot-Kammer. Mit einer Spannung von 100v konstant bei 350 mA für eine Stunde erfolgte der Elektrotransfer der Proteine. Der Gel-Sandwich wurde nach dem

Blot auseinandergenommen und die PVDF-Membran in einen Blockierungspuffer (5%Milchpulver in TBS-Tween) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen überführt. Mittels einer Ponceau-Färbung konnte die Membran reversibel rot gefärbt werden, um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen.

Detektion von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern

Nachdem die PVDF-Membran für mindestens zwei Stunden in dem Blockierungspuffer lag, wurde diese in 1xTBS-Tween zweimal gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dieser wurde zuvor entsprechend verdünnt in 5% Magermilchpulver und TBS-Tween und für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (alternativ über Nacht bei 4°C). Der Primärantikörper richtet sich gegen das gesuchte Protein. Die Membran wurde anschließend dreimal mit TBS-Tween gewaschen und der zweite Antikörper, der spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet war, wurde in entsprechender Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach einer dreimaligen Waschung der Membran mit TBS-Tween konnte die Auswertung erfolgen. Der Blot wurde mit der ECL Methode detektiert.

Nachweis der Peroxidaseaktivität mit dem ECL-System

Der Antigen-Nachweis erfolgte mittels ECL-Detektionssystem. An dem Sekundär-Antikörper ist eine Peroxidase gekoppelt, diese katalysiert eine Substratumwandlung, bei der Chemilumineszenz entsteht. Die PDVF-Membran wurde zunächst in einer Detektionslösung, Solution A und B, die in einem Verhältnis 1:1 gemischt wurde, geschwenkt. Danach wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt und mit dem Programm FlourChem Q fotografiert. Die Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm nach unterschiedlichen Expositionszeiten sichtbar gemacht. Zusätzlich wurde ein Marker mit einer anderen Emission (Cyc5) entwickelt. Die PDVF-Membran wurde im Anschluss getrocknet und im Dunkeln gelagert. Die entwickelten Western-Blot-Röntgenfilme wurden mit einem Densitometer ausgewertet.

2.2.5. Adenoviraler Gentransfer

Herstellung eines Adenovirus

Rekombinante Adenoviren wurden hergestellt, um diese als Vektor für einen Gentransfer zu nutzen. Adenoviren sind in der Lage, Herzmuskelzellen zu infizieren und die zelleigene episomale Transkriptions- und Translationfähigkeit zur Produktion eigener Proteine zu nutzen. Dafür wurde das Gateway-Blockit System verwendet, mit dem multiple DNA-Abschnitte in einen Vektor geschleust werden können. Zunächst wurden die jeweiligen Oligonukleotide, die bei Eurofins bestellt wurden, mit ddH₂O auf eine Konzentration von 200 pmol/μl verdünnt. Um doppelsträngige Oligonukleotide zu generieren, wurde die Annealing Reaktion durchgeführt. Dafür wurde ein Reaktionsansatz vorbereitet, der der Tabelle 2-9 zu entnehmen ist.

Topstrand DNA Oligo (200 μM)	5 μl
Bottomstrand DNA Oligo (200 μM)	5 μl
10x Oligo-Annealing Buffer	2 μl
ddH ₂ O	8μl
Gesamtvolumen	20μl

Tabelle 2-8: Reaktionsansatz für die Annealing-Reaktion.

Dieser Ansatz wurde vorsichtig hin- und hergeschwenkt, mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und in einem Thermomixer für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend kühlten die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur ab. Die ds-Oligos wurden nun auf eine Konzentration von 10nM verdünnt. Nun konnte als nächstes die Ligation erfolgen.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation dient dazu, passende DNA-Fragmente an ihren Enden mithilfe der Ligase miteinander kovalent zu verbinden und somit das DNA-Fragment in den Vektor einzufügen. Es wurde das Enzym T4-DNA-Ligase eingesetzt, welches ATP-abhängig die Bildung neuer Phosphodiesterbrücken zwischen einer 3'-Hydroxy- und einer 5'-Phosphat- Gruppe des DNA-Fragments und Vektors katalysiert. Die DNA-Fragmente und Vektoren müssen komplementäre „sticky ends“ oder „blunt ends“ besitzen. Für die

Ligation-Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet: siehe Tab. 2-10. Die Ligationsansätze wurden auf Eis pipettiert, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben bei 25°C im Thermomixer für 30 Minuten oder über Nacht inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Ligase durch Inkubation der Proben bei 65°C im Thermomixer für 10 Minuten deaktiviert.

pcDNA6.12miRVektor	1µl
10 nM dsOligos	2µl
T4 DNA-Ligase	0,5µl
10x Ligationsbuffer	1µl
ddH ₂ O	5,5µl
Gesamtvolumen	10µl

Tabelle 2-9: Reaktionsansatz für die Ligation

Nun konnte die Transformation und die entsprechende Mini-Präp erfolgen, wie in Kapitel 2.3 ausführlich beschrieben. Anschließend wurde eine PCR und Agaroseelektrophorese durchgeführt, um die Bakterien mit dem gewünschten Plasmid zu detektieren. Danach erfolgte eine Konzentrationsmessung am Nanodrop-Spectrophotometer und die Proben mit der höchsten Konzentration wurden zur Sequenzanalyse und den passenden Primern zu Eurofins GmbH geschickt. Bei übereinstimmendem Sequenzergebnis wurde ein Glycerolstock angelegt.

Herstellung von Glycerolstocks

Für die Langzeitaufbewahrung der Bakterienklone wurden Glycerolstocks angelegt. Dazu wurden 2 ml der Flüssigkultur in ein Kryo-TubeTM (Nunc) überführt, auf höchster Stufe eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500µl LB-Medium und 500µl 60%igem Glycerin aufgenommen und bei -80° C gelagert.

BP-Reaktion

In der BP-Reaktion wird das im Donor-Vektor pDONR201 enthaltene ccdB Gen gegen das DNA-Plasmid (pCDNA6.2), welches mit attB-Sequenzen versehen wurde, ausgetauscht. Das ccdB Gen kodiert für ein DNA-Gyrase-Inhibitor und wird von attP-Sequenzen umrahmt. Diese Attachment-Sequenzen werden nun von den Enzymen

Integrase und Integration Host Factor (IHF) genutzt, um das zwischen den attB-Sequenzen liegende DNA-Plasmid mit dem zwischen den attP-Sequenzen liegende ccdB-Gen auszutauschen. Es entsteht ein Entry-Klon mit dem gewünschten DNA-Fragment, flankiert durch die Attachment Sequenzen attL und ein „by-product“ (=Nebenprodukt), welches das ccdB-Gen enthält und durch die Attachment Sequenzen attR flankiert wird. Für die BP-Reaktion wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet: 150ng/µl pcDNA 6.2, 150ng/µl vom pDONR221-Vektor, 2µl BP-Clonase und 8 µl EB-Puffer. Zunächst wurden die pcDNA6.2, pDON201 und der EB-Buffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß entsprechend pipettiert, vorsichtig gevortext und zentrifugiert. Erst dann wurden 2µl der BP-Clonase, die unbedingt auf Eis gestellt werden muss, dem Ansatz hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde dann umgehend in den Thermomixer für 3 Stunden bei 25°C gestellt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1µl Proteinkinase K mit 10 Minuten bei 37°C gestoppt. Im Anschluss wurde 3µl des Reaktionsansatzes in 70µl E. coli DH10B elektrotransformiert. Anschließend erfolgte eine Selektion der Transformanten. Das Prinzip der Selektion beruht darauf, dass nur die Bakterien überlebensfähig sind, die kein Gyrase-Inhibitor translatieren und auf kanamycinhaltigem Nährboden wachsen, da die von Invitrogen erhältlichen Donor-Vektoren eine Antibiotika-Resistenz tragen. Die isolierten Plasmide wurden dann in der LR- Reaktion eingesetzt.

LR-Reaktion

In diesem Schritt erfolgt eine Reaktion zwischen Entry Clone und einem Destinationsvektor (pADCMMV5). Dabei wird das DNA-Fragment, welches von den Attachment-Sequenzen attL im Entry-Vektor umrahmt ist, in einen Destinationsvektor kloniert. Auch diese Vektoren enthalten das ccdB-Gen, welches von den Attachment-Sequenzen attR flankiert wird. Zunächst werden die DNA-Fragmente zwischen den Attachment Sequenzen des Entry-Clones und Destinationsvektors durch das Enzym Excisionase freigesetzt und von der Integrase und dem Integration Host Factor (IHF) ausgetauscht. Diese Reaktion entspricht somit einer umgekehrten BP-Reaktion. Aus dieser Reaktion entsteht nun ein Expressions-Klon, der das ursprüngliche DNA-Fragment des Entry-clones, zwischen Attachment-Sequenzen attB eingerahmt, enthält

und ein by-Produkt (Nebenprodukt), das ccdB-Gen, flankiert von den Attachment Sequenzen attP, enthält. Für den Reaktionsansatz wurde benötigt: 150ng/µl pCDNA; 150ng/µl pADCMMV5, 2 µl LR-Clonase und 8 µl EB-Puffer.

Wie auch bei der BP-Reaktion wird die Clonase erst hinzugefügt, nachdem die DNA, der Vektor und der Puffer in ein 1,5ml Reaktionsgefäß entsprechend pipettiert, gevortext und zentrifugiert wurde. Danach wurde die LR-Clonase hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 3 Stunden bei 25°C im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1 µl Proteinkinase K mit 10 min bei 37°C. Im folgenden Schritt wurde 3µl des Reaktionsansatzes in 70µl E. coli DH10B elektrotransformiert. Die Transformate, die nicht das ccdB-Gen enthalten und eine Ampicillin-Resistenz aufweisen, überleben und wachsen auf dem ampicillinhaltigen Nährboden. Es folgten die Ernte von Kolonien, die Anzucht in einer Flüssigkeitskultur, die Extraktion der Plasmid-DNA aus den Bakterien mittels Mini-Präp und die Sequenzierung zur Überprüfung der codierenden Sequenz.

Pacl-Verdau

Um den DANN-Abschnitt, der für den Adenovirus codiert, aus dem Plasmid herauszulösen, wurde ein Pacl-Verdau mit 0,13 U Pacl pro 1 µg Expressionsvektor über Nacht bei 37°C durchgeführt. Der Vorgang wurde am nächsten Tag durch eine Temperaturerhöhung auf 65°C für zehn Minuten gestoppt.

Transfektion von HEK293A-Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden HEK293A Zellen in 6-well Platten mit 7,5⁵ Zellen pro Well ausgesät. Für die Transfektion wurde ein Ansatz vorbereitet aus zum einen 500µl DMEM und 1µg Pacl-verdautem Plasmid sowie 500µl DMEM und 6 µl Lipofectamine 2000. Zunächst wurden diese Ansätze jeweils für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden die Ansätze vorsichtig in ein Reaktionsgefäß überführt und nochmals inkubiert für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Danach konnte 500µl Transfektionsansatz auf jedes Well mit den HEK 293A Zellen verteilt werden. Zwei Tage später wurden die Zellen aus je einem Well in eine T-75 Zellkulturflasche mit Complete Medium überführt. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die

Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop auf einen zytopathischen Effekt begutachtet. Dieser Effekt deutete darauf hin, dass die Zellen mit dem Adenovirus infiziert waren. Sobald circa 80% der Zellen von diesem zytopathischen Effekt betroffen waren, wurden die Zellen inklusive des Mediums in ein 15ml Falcon überführt und für 10 Minuten bei 1000xg zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde in vorbereitete Falcon Tubes überführt. Das entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml Überstand aufgenommen und einem dreimaligen Einfrier-Auftau-Zyklus bei -80°C bzw. 37°C unterzogen, um eine Lyse der verbliebenen Zellen zu erreichen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert für 15 Minuten bei 3000 U/min, so dass sich die Zelltrümmer am Boden des Falcons sammelten. Der virushaltige Überstand wurde abgenommen und mit dem gesamten Zellüberstand gemischt, aliquotiert und bis zur nächsten Infektion bei -80°C eingefroren.

Amplifikation von Adenoviren

Für die Amplifikation der Adenoviren wurden HEK293A Zellen in T175 Flaschen ausgesät und kultiviert, bis eine 80-90%ige Konfluenz sichtbar war. Dann konnte die Infektion mit 25 ml Complete Medium, das 1ml des hochkonzentrierten Viruslysats enthielt, erfolgen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, ca. zwei Tage später war die Virusvermehrung abgeschlossen, erkennbar an runden Zellen, die sich abgelöst hatten und im Kulturmedium frei flottierten. Das Medium samt der infizierten Zellen wurde in 50ml Falcon-Röhrchen übertragen, es folgten drei Einfrier- und Auftau-Zyklen bei -80°C bzw. 37°C. Schließlich wurden die Proben für 15 Minuten bei 3000U/min zentrifugiert, der virushaltige Überstand wurde abgenommen auf 50µl Aliquots verteilt und bei -80°C bis zur Titerbestimmung gelagert.

Adenovirus Titerbestimmung

Für die Titerbestimmung wurden HEK293A-Zellen verwendet, die auf eine 24-Well-Platte mit 300.000 Zellen pro Well im Complete Medium ausgesät wurden. Zeitgleich wurde eine Verdünnungsreihe der Adenoviren in Medium oder PBS von 10² bis 10⁷ angesetzt. 50 µl der Verdünnungen 10³ bis 10⁷ wurden zur 500µl Zellsuspension in Duplikaten tröpfchenweise hinzugefügt, die Verdünnung 10² ist zu vernachlässigen, da

diese Verdünnung nach Erfahrungen zytotoxisch und daher für die Titerbestimmung ungeeignet ist. Nach der Infektion wurde die Platte für 48h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen in der Sterilwerkbank kurz getrocknet. Danach wurden pro Well 500µl eiskaltes Methanol hinzugefügt und die 24-Well-Platte wurde für 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das Methanol wieder abgenommen und die Zellen 3x mit 1% (w/v) BSA in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden pro Well 100 µl eines FITC-konjugierten Hexon Antikörpers, in PBS und 1% (w/v) BSA 1:50 verdünnt, hinzugefügt und für 1h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss folgten drei Waschschrte mit 1% (w/v) BSA in PBS und schließlich wurden die Zellen mit PBS überschichtet. Das Auszählen der virusinfizierten und durch den Antikörper markierten Zellen erfolgte unter einem Floureszenzmikroskop. Mindestens 10 Gesichtsfelder wurden pro Well mit einem 20x Objektiv in beiden Duplikaten einer Verdünnung ausgezählt. Mittels folgender Formel ließ sich der Titer ermitteln:

$$\text{Titer ifu/ml} = \frac{\text{infizierte Zellen pro Gesichtsfeld} \times \text{Gesichtsfelder pro Well}}{\text{Virusvolumen (ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

2.2.6. Kultur von Säugetierzellen

Allgemeine Hinweise

Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Es wurden Kulturflaschen verschiedener Größen sowie Kulturplatten mit unterschiedlicher Anzahl von wells verwendet. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial durchgeführt.

Isolation von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten (NRVCM)

Zur Isolation von ventrikulären Kardiomyozyten aus 1-3 Tage alten Ratten vom Wistar-Stamm wurden pro Präparation 5-10 Würfe, was einer Anzahl von ca. 60-120 Ratten entsprach, verwendet. Die neonatalen Ratten wurden mit Kopf und Brust kurz in 80% Ethanol getaucht. Anschließend wurden die Tiere decapitiert und der Thorax durch

einen Längsschnitt entlang des Sternums eröffnet. Das Herz konnte nun mit einer Schere oder einer Pinzette entnommen werden und wurde sofort in einer Schale mit eiskaltem ADS-Puffer gesammelt. Vorhöfe, Gefäße und Reste der Lunge wurden entfernt und die Ventrikel in eine neue bereitgestellte Schale mit frischen, eiskalten ADS-Puffer überführt. Danach wurde der Puffer soweit abgenommen, dass die Ventrikel gerade noch bedeckt waren und wurden dann mit einer Schere gründlich zerkleinert. Das Gewebe wurde nun in einer Verdauung aufgenommen. Die Verdauung wurde unmittelbar vor der Präparation hergestellt mit Pankreatin 0,6mg/ml und Collagenase Type 2 0,5 mg/ml gelöst in 1xADS Puffer. Die Menge der Verdauung war abhängig von der Anzahl der Tiere, z.B. wurden bei 24 Tieren 18-20 ml, bei 36 Tieren 27-30ml und bei 48 Tieren 36-40 ml Verdauung verwendet. Ab ca. 40 Tiere wurde der Verdauungsansatz auf zwei 75cm² Kulturflaschen gesplittet. Die Flaschen wurden in einer Halterung im Schüttelwasserbad befestigt bei 37° C inkubiert. Nach 20 Minuten wurden die Flaschen aus dem Wasserbad genommen, die Verdauung wurde abgenommen, verworfen und frische Verdauung zum Gewebe gegeben und wieder für 20 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nun wurde der Überstand, in dem sich die Kardiomyozyten befanden, mit einer Pipette aufgenommen und durch einen Sterifilter in ein 50 ml Gefäß pipettiert. Der Filter wurde mit 10 ml NCS durchspült, um letzte Kardiomyozyten aus dem Filter zu waschen und um die Enzyme der Verdauung zu inaktivieren. Das Kardiomyozyten/NCS-Gemisch wurde nun 5 Minuten bei 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe mit 5-7ml NCS resuspendiert und mit leicht geöffnetem Deckel im CO₂-Brutschrank bis zum Ende des Verdauens gesammelt. Der Verdau des verbliebenen Gewebes wurde fortgesetzt und so häufig wiederholt, bis das Gewebe völlig aufgelöst ist, in der Regel waren das 4-5 Verdauungsschritte. Nachdem das Gewebe komplett verdaut wurde, wurden die bereits gesammelten Zellpellets gepoolt und nochmals für 5 Minuten bei 1000rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Anzahl der vorbereiteten Gradienten, pro Gradient in 2ml 1x ADS-Puffer, resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen nach ihrer Dichte mittels eines Percoll-Gradienten aufgereinigt, um die aus der Isolation aus Rattenmyokard gewonnenen Kardiomyozyten von den

ebenfalls isolierten Fibroblasten und Erythrozyten abzutrennen. Die Percollstammlösung wurde je nach Anzahl der Gradienten folgendermaßen hergestellt:

	Percoll	10 x ADS
4 Gradienten	27 ml	3 ml
6 Gradienten	36 ml	4 ml
8 Gradienten	45 ml	5 ml

Tabelle 2-10: Herstellung der Percollstammlösung

Aus dieser Percollstammlösung wurde eine Lösung mit niedrigerer und eine mit höherer Dichte hergestellt. Die Lösung mit niedrigerer Dichte setzte sich zusammen aus 9 ml Stock Solution und 11 ml 1x ADS-Puffer mit Phenolrot (Menge für 4 Gradienten), und die Lösung mit höherer Dichte wurde aus 13 ml Stock Solution und 7 ml 1x farblosen ADS Puffer hergestellt. (Menge für 4 Gradienten). 4 ml der Lösung mit der niedrigeren Dichte wurde in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 3 ml der Lösung mit höherer Dichte zugegeben, indem man die Pipette bis zum Boden des Gefäßes führte und vorsichtig die Lösung in das Gefäß pipettierte, ohne das sich die zwei Lösungen vermischten, so dass sich schließlich die Lösung mit höherer Dichte unter der Lösung mit niedriger Dichte befand. Die Kardiomyozyten-Suspension wurde dann langsam und vorsichtig auf die obere Phase gleichmäßig verteilt. Die Gefäße wurden danach in die vorgekühlte (4°C) Zentrifuge für 30 Minuten bei 2400rpm gelegt. Dadurch erfolgte eine Auftrennung der Zellen nach ihrer Dichte. Das Erythrozytenpellet sammelte sich am Boden des Gefäßes, zwischen der unteren und mittleren Phase befanden sich die Kardiomyozyten und die Fibroblasten am Übergang von der mittleren zur oberen Phase. Die obere Phase mit den Fibroblasten wurde abgesaugt und die Interphase mit den Kardiomyozyten in 2 x 50 ml Gefäße überführt. Diese wurden mit kaltem 1x (einfach konzentriertem) ADS aufgefüllt und für 5 Minuten bei 1000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets mit einfach konzentriertem ADS gewaschen und nochmals zentrifugiert für 5 Minuten bei 1000 rpm. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert, auf 40 ml aufgefüllt und nach der Methode von Neubauer ausgezählt. Dafür wurden von der Zellsuspension ca. 25 µl entnommen und mit 25 µl Trypan Blau in einer Eppendorf-Tube gemischt. Ca. 15 µl der gut resuspendierten Zell-Trypanblau-Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die ungefärbten Zellen ausgezählt. Die

Kardiomyozyten wurden in einer Dichte von 750.000 bis 1.000.000/Well ausgesät und je nach Versuchsplanung für 24, 48 oder 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Kollagenisierung der Kulturgefäße für NRVCMS

Alle Gefäße für die NRVCMS wurden mit Kollagen beschichtet, um ein adhärentes Wachstum der Kardiomyozyten zu ermöglichen. Dafür wurde eine Kollagen I-Stammlösung (1mg/ml) mit einer entsprechenden Menge 0,01M HCL gemischt und auf die Gefäße verteilt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und die Gefäße luftgetrocknet, danach waren diese sofort gebrauchsfähig und für eine Woche bei 2-8°C haltbar. Wurde mit den Kardiomyozyten gearbeitet, geschah dies ausschließlich unter sterilen Sicherheitsbänken.

Virusinfektion der Kardiomyozyten

Bevor die Kardiomyozyten mit dem Adenovirus infiziert wurden, wurde das Medium abgenommen. Danach wurde ein definiertes Virusvolumen mit frischem Medium vermischt und jeweils 2ml pro Well verteilt. Die Virusmenge für eine Infektion wird in ifu/Virus (infectious units) angegeben. Je nach Versuchsaufbau wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen gearbeitet. Nach 48 bis 72 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Kulturmedium von HEK293A Zellen

Die adhärent wachsenden HEK293A Zellen wurden in DMEM-Medium (DMEM High-Glucose (4,5g/l), 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 1% Glutamin) kultiviert.

Infektion der HEK293A mit Adenoviren

Bei einer Konfluenz von 80% konnten die HEK 293A Zellen mit den gewünschten rekombinanten Adenoviren infiziert werden. Die Ernte der Zellen erfolgte 48-72 Stunden nach der Infektion. Dafür wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und abzentrifugiert. Im Anschluss konnten die Proben aufgearbeitet werden und für weitere Versuche eingesetzt werden.

2.2.7. Stretch von NRVCMs

Zyklische mechanische Dehnung von Kardiomyozyten mit dem Flexcell System

Um den biomechanischen Einfluss auf die Apoptoserate isolierter NRVCMs zu untersuchen, wurde zur *in-vitro* Zelldehnung das Flexcell System verwendet. Dadurch werden Zellkulturen einem dynamischen Stress exponiert, was den *in vivo* Bedingungen sehr ähnlich ist. Diese Dehnungsapparatur besteht aus einem Rechner (Flexcontrol) und einer EDV-kontrollierten Vakuumeinheit (Flexlink), welche über luftgefüllte Silikonschläuche mit der Grundplatte verbunden ist.

Die Zellen wurden auf 6-well Kulturgefäßen mit flexiblen Kollagen I beschichteten Bio-Flex Membranen ausgesät, je nach Versuchsaufbau mit einem bestimmten Adenovirus infiziert und bis zum Stretch entsprechend inkubiert. Die Kulturplatten wurden mit einer Einfassung aus Gummi abgedichtet, in eine Grundplatte hineingelegt und in einen CO₂ Brutschrank gestellt. Über eine computergesteuerte Vakuumpumpe wurde ein Unterdruck unter den flexiblen Sillikonmembranen angelegt und somit zirkulär nach unten Richtung Grundplatte gezogen. Dadurch wurde eine zyklische mechanische Dehnung auf die NRVCMs ausgeübt. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ auf 115% bei 1 Hz über 24 Stunden (ggf. je nach Versuchsaufbau länger oder kürzer) gedehnt.



Abbildung 2-12: Flexcell @5000TMTension System. Mithilfe dieser Dehnungsapparatur kann eine mechanische zyklische Dehnung auf Zellen ausgeübt werden, welche dem biomechanischen Stress in „*in vivo*“ Bedingungen sehr ähnlich ist.

2.2.8. Evaluation der Apoptoserate mithilfe der TUNEL-Methode

Die TUNEL-Methode dient dem Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen speziell in apoptotischen Zellen. Die bei dem DNA-Strangbruch freigelegten Hydroxylgruppen können mithilfe der Terminalen Desoxynukleotid Transferase (TdT) markiert werden, indem das Enzym den Einbau fluoreszenzmarkierender Nukleotide (Desoxyuridintriphosphat, dUTP) katalysiert und diese dann in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (TUNEL= TdT-mediated X-dUTP nicking labeling).

Für den Versuch wurde das In Situ Cell Death Detection Kit gewählt und den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Nach Kultivierung und Infektion der NRVCs wurden diese in 12 well Platten in einer Dichte von 3×10^5 ausgesät. Das TUNEL Assay wurde 48h nach Infektion durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium abgenommen, nach zwei Waschgängen mit PBS bei Raumtemperatur erfolgte eine zweiminütige Inkubation mit einer Permeabilitätslösung auf Eis, anschließend das Entfernen der Permeabilisierungslösung durch zwei Waschschrte mit PBS. Zur Markierung der DNA-Fragmente wurde ein TUNEL-Reaktionsgemisch in einer Verdünnung von 1:10 vorbereitet (50µl TdT-Enzymlösung und 450µl Label Solution), jeweils 50µl auf die Proben pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur, Dunkelheit und in einer feuchten Kammer inkubiert. Es erfolgten erneut 3 Waschschrte mit PBS und die anschließende Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die gefärbten Zellen wurden mit 40-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.2.9. Statistik

Zur Auswertung aller Ergebnisse wurden Mittelwert, Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts errechnet und graphisch oder tabellarisch dargestellt. Für die Berechnung statistischer Signifikanzen wurde der T-Test bzw. bei mehreren Variablen der zweiseitige Student t Test Two Way ANOVA angewandt. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm Graph Pad Prism oder Sigma Plot. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant anerkannt.

3 ERGEBNISSE

3.1. Egn3 ist eine Zielstruktur von miR-20a

3.1.1. Die Rolle von miR-20a und ihrer Zielstruktur Egn3 im Zelltod von Kardiomyozyten

MicroRNAs (miRs) spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Genexpression. Nach neuesten Erkenntnissen spielen sie auch eine Rolle in der molekularen Pathogenese von Herzmuskelerkrankungen. Besonders hervorzuheben ist der Einfluss der miRs auf die Signalwege der Apoptose von Kardiomyozyten. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurde diesbezüglich ein umfangreiches Screening durchgeführt, welches zeigte, dass acht von gut 300 untersuchten miRs differentiell reguliert waren, unter anderem die miR-20a (s. Abb. 1.6).

Umfangreiche *in vitro* und *in vivo* Versuche ergaben, dass die microRNA-20a nach biomechanischem Stress *in vitro* sowie in einem Infarktmodell *in vivo* differentiell reguliert wird und eine antiapoptotische Wirkung entfaltet. Diese Versuche waren Gegenstand der Arbeiten zur Dissertation von Johanne Gantenberg.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun die weiteren zugrundeliegenden molekularen Signalwege untersucht, die zur Induktion der Apoptose führen könnten. Als weitere potentielle Zielstruktur der microRNA-20a stellte sich neben den bereits bekannten Mitgliedern der E2f-Familie (E2f1 und E2f2) aufgrund des Target-Screens diverser Datenbanken (s. Abb. 1.12) auch die Prolylhydroxylase PHD3/Egn3 heraus, die an der Steuerung des Zellzyklus mitwirkt und nach *in vitro* Untersuchungen von Liu et al. für die DOX-induzierte kardiomyozytäre Apoptose verantwortlich ist (Liu et al., 2010).

3.1.2. „Knockdown“ (Herunterregulation) von miR-20a führt zu einer Überexpression von EglN3

Der Nachweis, dass EglN3 eine Zielstruktur von miR-20a ist, wurde durch Versuche auf Proteinebene mittels Western-Blot Technik erbracht: Hierzu wurden neonatale Kardiomyozyten der Ratte (NRVCM) isoliert und nach einer 24-stündigen Inkubation im serumhaltigen Medium mit der antimicroRNA- 20a durch Lipofectamin-Transfektion behandelt. 48 Stunden nach der Stimulation wurden Kernextrakte präpariert und im Western Blot analysiert. Dazu wurden Antikörper gegen EglN3 verwendet.

Als Vergleichsgruppe dienten NRVCMs, die über AdmiR-neg mit einer nonsense miR infiziert wurden. Im Westernblot war zu sehen, dass ein AntimiR vermittelter Knockdown von miR-20a zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlichen Anstieg von EglN3 in NRVCMs führte. Die untere Darstellung zeigt die Ponceau-Färbung des Westernblots, die durch die identische Dichte nachweist, dass gleichmäßige Ladungsverhältnisse gewährleistet wurden (s. Abb.3-1).

Die densitometrische Analyse der EglN3 -Proteinexpression nach Knockdown von miR-20a zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine siebenfach verstärkte Expression von endogenem EglN3 (Experiment wurde zusammen mit Dr. Inka Boomgarden, UKSH Kiel, durchgeführt, Abb. 3-2).

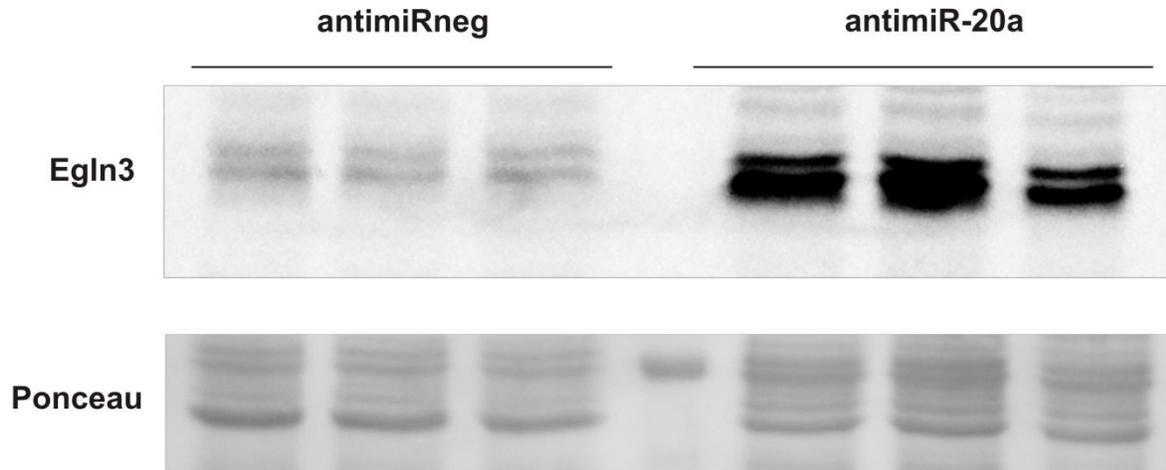


Abbildung 3-1 oben: Der Westernblot für Egn3 zeigt ihre signifikante Überexpression nach Knockdown von miR-20a in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten.
unten: Repräsentativer Schnitt der Ponceau-gefärbten Membran (für Normalisierung).

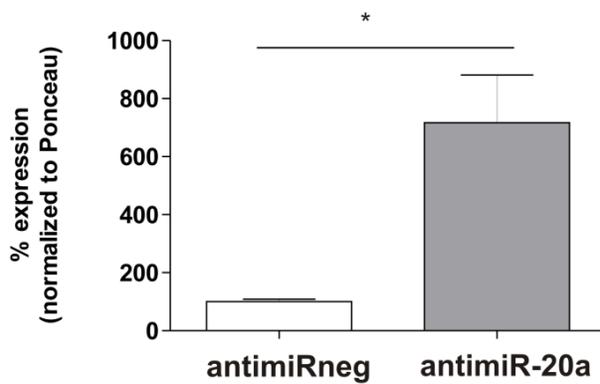


Abbildung 3-2: Normalisierte Densitometrie des Egn3 Westernblot: Knockdown von miR-20a führt zu einer 7,2-fachen Überexpression von endogenem Egn3 (n=3; p<0,05).

3.2. Analyse der Expression von EglN3 in NRVCs nach adenoviralem Gentransfer

3.2.1. Klonierung eines rekombinanten EglN3-Adenovirus

Nachdem gezeigt werden konnte, dass EglN3 eine Zielstruktur der miR-20a ist, planten wir im nächsten Experiment genauer zu untersuchen, ob auch auf zellulärer Ebene die Expression des Transkriptionsfaktors EglN3 beeinflusst werden kann. Dafür generierten wir zum einen Adenoviren, die EglN3 überexprimieren, zum anderen solche, bei denen mit einer anti-miR ein Knockdown von EglN3 hervorgerufen wurde.

3.2.2. Überexpression von EglN3 durch adenoviralen Gentransfer

Für die Generierung des Adenovirus zur Überexpression von EglN3 wurden cDNA Kassetten eingesetzt, die zuvor mittels PCR amplifiziert und dann der Gateway Klonierungstechnik unterzogen wurden. Dabei erfolgte die Klonierung in den Zielvektor in zwei Schritten: Die entsprechenden DNA-Abschnitte wurden im ersten Schritt in einen geeigneten ENTRY Vektor gebracht (p-DONR) und im zweiten Schritt nach dem Prinzip der lokalisationsspezifischen Rekombination mithilfe des Gateway Systems in den Destinationsvektor integriert. Die detaillierten Arbeitsschritte sind dem Material und Methoden Teil zu entnehmen.

3.2.2.1 Nachweis der Überexpression von EglN3 auf RNA-Ebene

Um die Effizienz der EglN3-Überexpression durch den generierten Adenovirus zu überprüfen, wurden NRVCs 24 Stunden nach Isolation mit AdmiR-EglN3 bzw. einem Kontrollvirus AdlacZ infiziert. AdlacZ ist ein Virus, welches das Enzym β -Galaktosidase überexprimiert und als Kontrolle dazu dient, alle Gruppen mit der gleichen Anzahl adenoviraler Partikel zu exponieren. Die Zellen wurden im Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 48 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und auf RNA-Ebene untersucht. Mittels Real-Time-PCR konnte in einem ersten Validierungsexperiment eine deutliche Heraufregulation von EglN3 durch den

generierten Adenovirus im Vergleich zu den mit dem Kontrollvirus infizierten Zellen nachgewiesen werden.

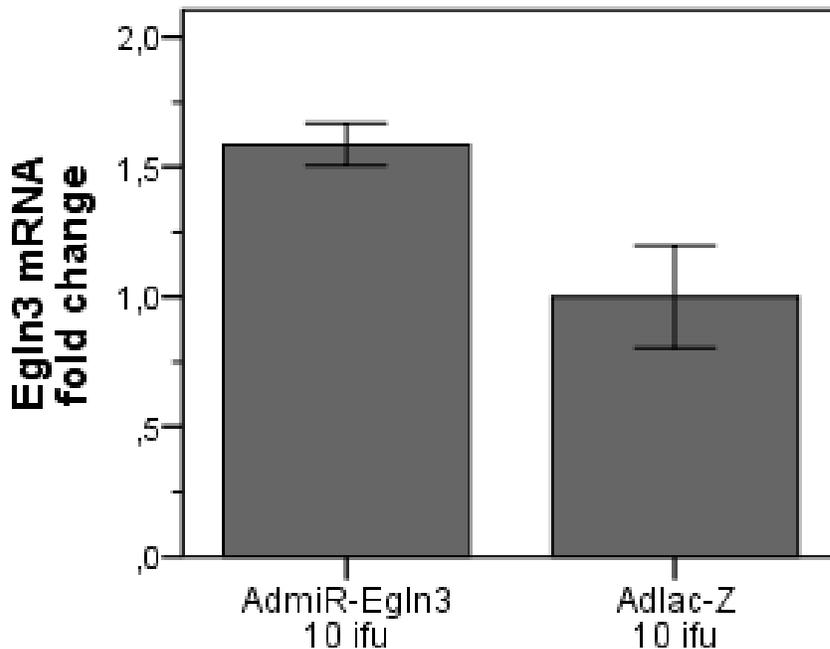


Abbildung 3-3: Nachweis adenoviraler Überexpression von Egn3 in NRVCMs mittels Real Time-PCR bei einer Viruskonzentration von 10 ifu.

3.2.2.2 Nachweis der Überexpression von Egn3 in NRVCMs auf Proteinebene

Im nächsten Schritt wurde die adenovirale Überexpression von Egn3 auf Proteinebene untersucht. Für dieses Experiment wurden die NRVCMs nach 24 Stunden Serumdeprivation mit dem AdmiR-Egn3 bzw. mit dem Kontrollvirus AdlacZ unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 15 ifu pro Zelle) ausgesetzt. Nach 48-stündiger Infektion erfolgte die Proteinextraktion und nachfolgend der Westernblot mit einem monoklonalen α -Egn3 Antikörper.

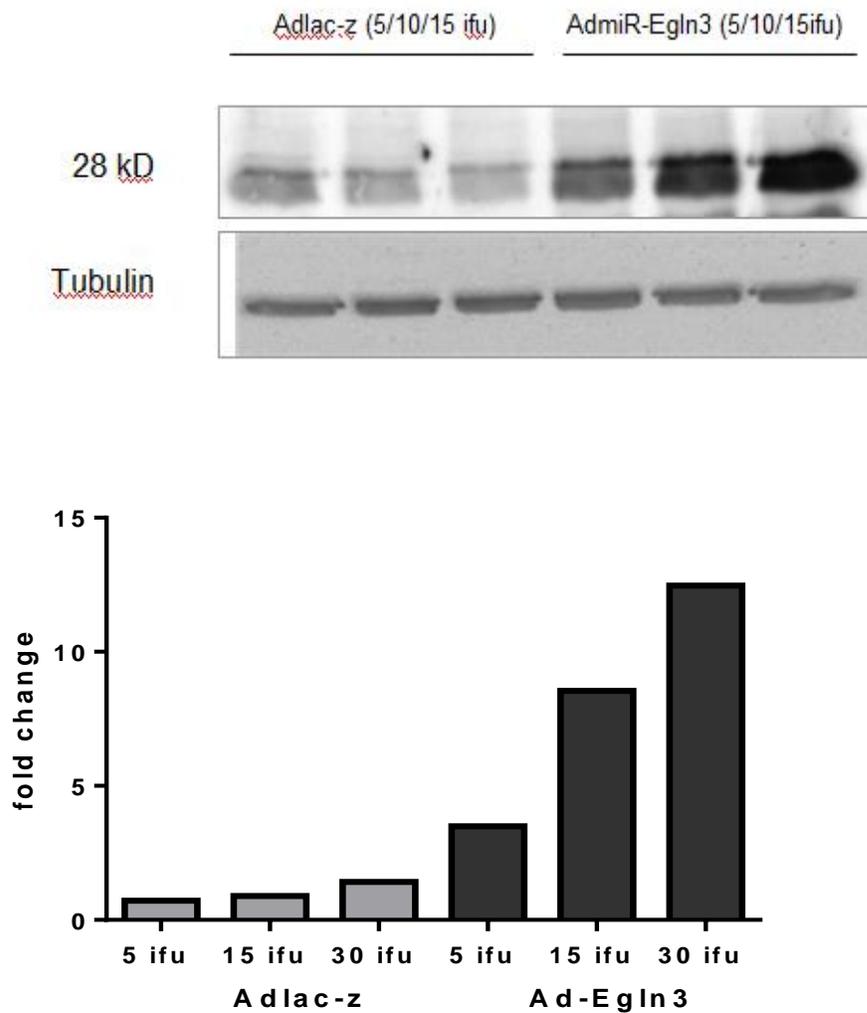


Abbildung3-4 oben: Western Blot Analyse zur Darstellung der Überexpression von Egn3 durch adenoviralen Gentransfer in neonatalen Kardiomyozyten. **unten:** Densitometrische Analyse des Western Blots. Die Auswertung ergab eine signifikante Überexpression des Egn3 Proteingehalts ($p < 0,05$).

Der Western Blot zeigte ein dosisabhängig verstärktes Expressionsniveau von Egn3 in den mit AdmiR-Egn3 infizierten Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um zu überprüfen, ob gleichmäßige Ladungsverhältnisse der Proteine vorliegen, wurde die Membran mit Tubulin angefärbt. Die densitometrische Analyse der Egn3 –Protein Überexpression zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant verstärkte Expression von Egn3. ($p < 0,05$)

3.2.3. Herunterregulation von EglN3 durch adenoviralen Gentransfer

3.2.3.1 Klonierung eines antimiR-EglN3 Virus

Für die Generierung des Adenovirus zum Knockdown von EglN 3 wurden synthetische einsträngige Oligonukleotide verwendet. Diese wurden mittels Hybridisierungstechnik zu einer doppelsträngigen shRNA zusammengefügt. Die Abkürzung „sh-RNAs“ steht für „small hairpin RNA“. sh-RNAs bilden eine Haarnadelstruktur, die genutzt werden kann, um Gene künstlich mithilfe der RNA-Interferenz stillzulegen. Diese wurden nach dem gleichen Verfahren wie bei der Überexpression in den Virus kloniert.

3.2.3.2 Nachweis des sog. „Knockdowns“ von EglN3 auf RNA-Ebene

Um den sog. „Knockdown“ durch den hergestellten antimiR-EglN3 Virus zu überprüfen, wurden NRVCs isoliert, für 24 Stunden einer Serumdeprivation ausgesetzt und schließlich mit dem Virus infiziert (30ifu) und für 48 Stunden bei 37° C sowie 5% CO₂ gelagert. Nach der Ernte wurde die RNA isoliert und zur cDNA verarbeitet, die für die quantitative Realtime-PCR eingesetzt wurde. Hier zeigte sich eine signifikant supprimierte mRNA-Expression von EglN3 im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit AdmiR-neg unter gleichen Bedingungen behandelt wurde (n=3, p<0,05).

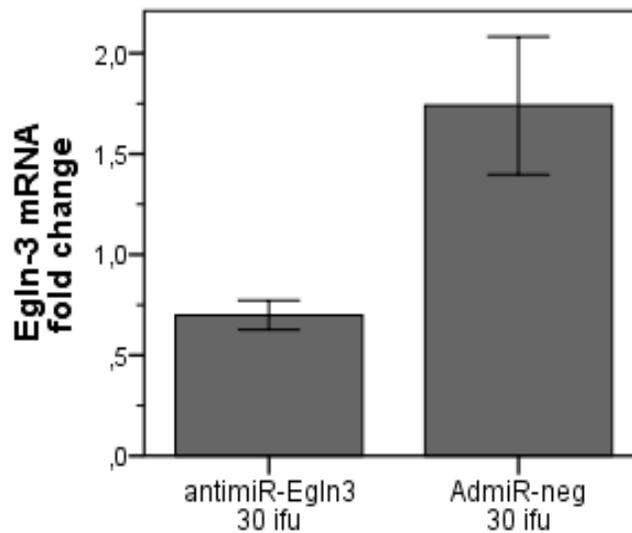


Abbildung3-5: Messung des endogenen EglN3 Gehalts auf RNA-Ebene nach Knockdown mit dem generierten Adenovirus gegen EglN3 und einem eingesetzten Virustiter von 30ifu: Signifikante Downregulation des Transkriptionsfaktors EglN3 (n=3; p=0,04,) Fehlerbalken: SEM.

3.2.3.3 Nachweis des Knockdowns von EglN3 auf Proteinebene

Zum Nachweis der reprimierten Proteinexpression von EglN3 in den Kernen der NRVCs wurden diese in sechs Schalen nach einer Serumdeprivation von 24 Stunden mit 15 ifu EglN3 antimir Virus infiziert. Als Kontrolle wurden NRVCs mit einem Kontrollvirus AdmiR-neg infiziert. 72h nach Infektion wurden die Zellen geerntet, die Kerne extrahiert, Proteine gemessen und schließlich einer Westernblot Analyse mit einem anti-EglN3 Antikörper unterzogen. Es konnte eine Bande bei 28kDa detektiert werden. Die Herunterregulation von EglN3 im Vergleich zur Kontrollgruppe war deutlich ersichtlich. Um zu überprüfen, ob gleichmäßige Ladungsverhältnisse der Proteine vorliegen, wurde die Membran mit Ponceau angefärbt. Bei der densitometrischen Auswertung des Western Blots zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant supprimierte Proteinexpression auf die Hälfte (n=3, p=0,045).

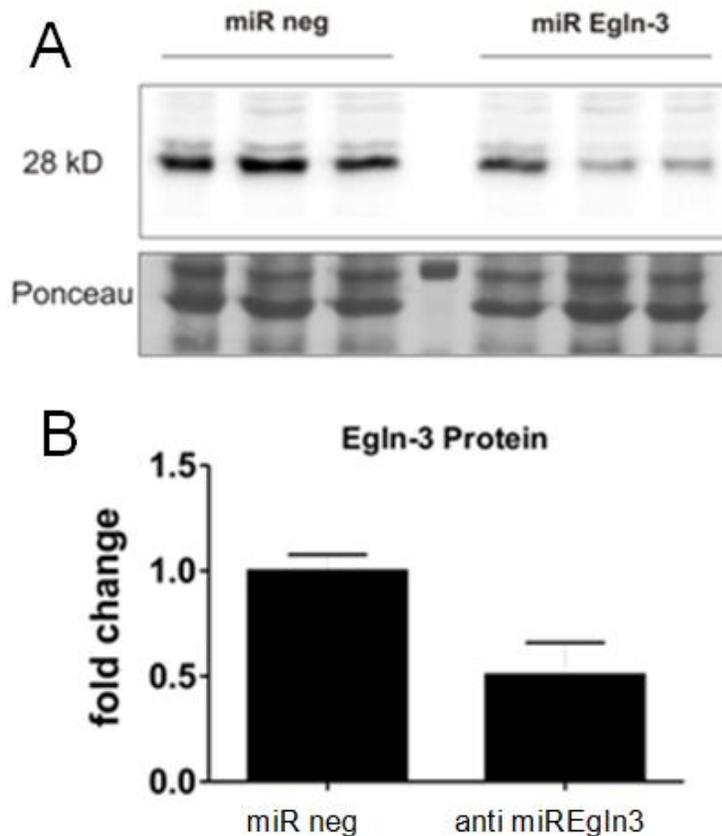


Abbildung 3-6 A: Westernblot Analyse zur Darstellung des Knockdowns von Egn3 durch adenoviralen Gentransfer in neonatalen Kardiomyozyten. **B:** Normalisierte Densitometrie des Egn3 Westernblot: Signifikante Down-Regulation des Transkriptionsfaktors Egn3 (n=3, p<0,05) Fehlerbalken: SEM.

3.3. Induktion von kardiomyozytärer Apoptose durch biomechanischen Stress und die Beeinflussung dieses Prozesses

3.3.1. Dynamischer biaxialer Stretch *in vitro* induziert Apoptose in NRVCMS

Biomechanischer Stress wie z.B. durch arterielle Hypertonie oder Klappenvitien ausgelöst führt zum pathologischen kardialen Remodelling und wird unter anderem durch Apoptose vermittelt. Mit dem Flexercell-System werde Zellkulturen einem dynamischen Stress *in vitro* exponiert, was den *in vivo* Bedingungen sehr ähnlich ist. Zur Ermittlung der Apoptoserate der Kardiomyozyten nach zyklischer Dehnung wurde eine TUNEL-Färbung vorgenommen. Durch diese Färbung wird die DNA-Fragmentierung sichtbar gemacht, die im Rahmen der apoptotischen Signalkaskade

entsteht.

Für diesen Versuch wurden zunächst NRVCs isoliert, gereinigt und auf vier Kulturgefäße mit einer Stretcher-Membran verteilt. Hier wurden sie in serumfreiem Medium einem zeitlich unterschiedlich langen dynamischen biaxialen Stretch von 6 bzw. 24 Stunden um 15% der Ausgangslänge ausgesetzt. Unmittelbar nach der Beendigung der Dehnung der Zellen wurden die Zellkerne apoptotischer Zellen mittels der TUNEL-Methode gefärbt. Als Negativkontrolle dienten Kardiomyozyten, die nicht gedehnt wurden, sondern nur dem serumfreien Medium ausgesetzt wurden. Wie in Abb. 20 zu sehen ist, kam es zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate der Kardiomyozyten. Nach sechs Stunden Stretch waren 24% der Kardiomyozyten apoptotisch, während die Kontrollzellen nur eine Apoptoserate von 13% aufwiesen. Biomechanischer Stress führt demnach zu einer 78%-igen Steigerung der Apoptoserate. Nach 24h Dehnung zeigte sich 25% der Kardiomyozyten apoptotisch. Im Vergleich zu den Kontrollzellen (18% TUNEL-positiv) kam es durch den biomechanischen Stress zu einer um 35% gesteigerten Apoptose.

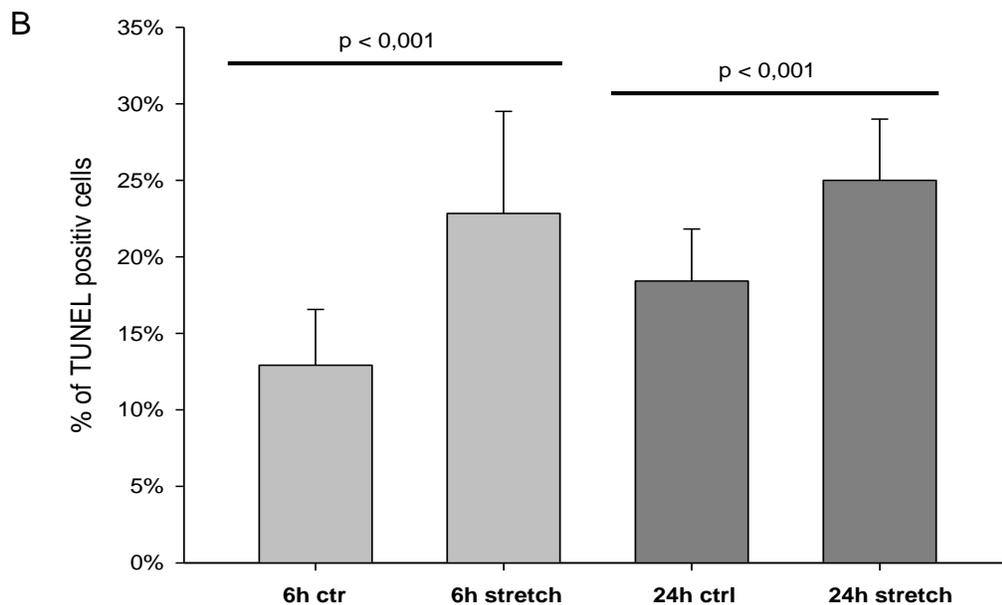
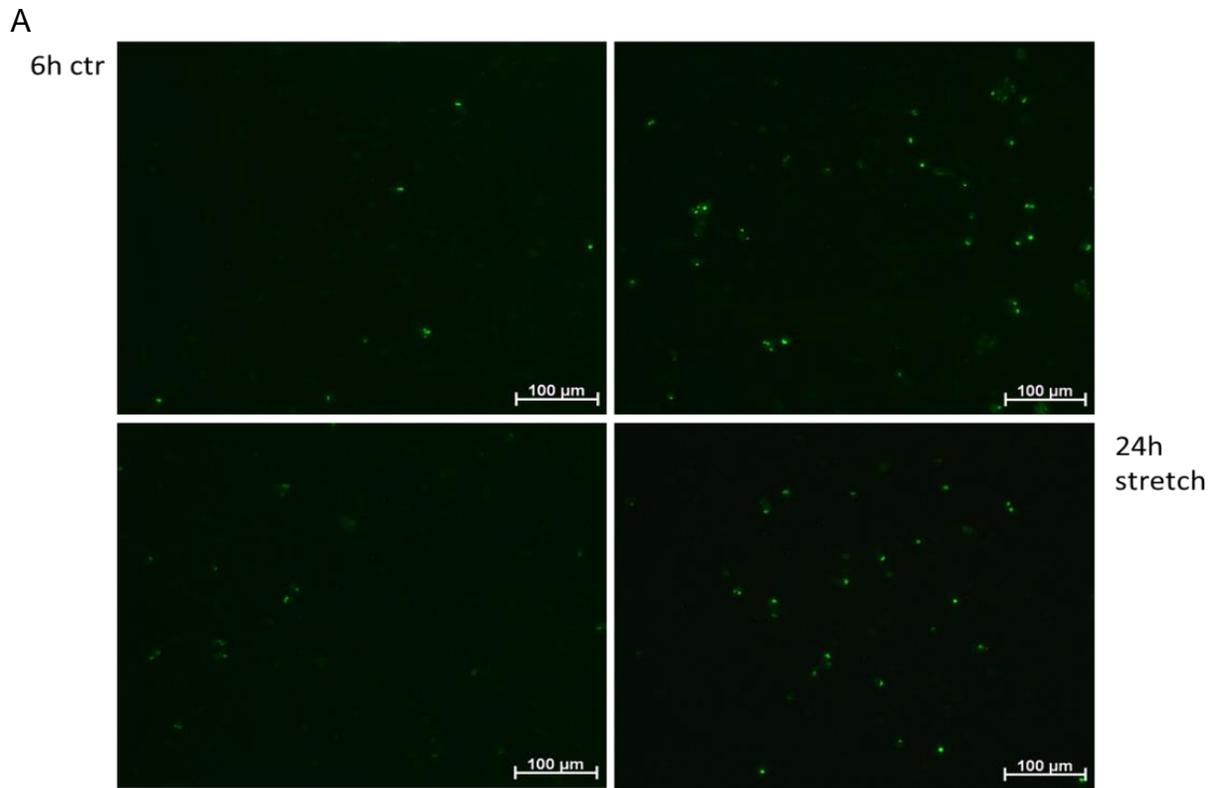


Abbildung 3-7 A: Nach 6 bzw. 24 Stunden Belastung durch Stretch (rechte Spalte) lassen sich deutlich mehr TUNEL positive, d.h. der Apoptose zugeführte Kardiomyozyten nachweisen als bei Kontrollen (linke Spalte). **B** Quantitative Auswertung von A (n=4 p<0,001) Fehlerbalken: SEM.

3.3.2. Beeinflussung der durch biomechanischen Stress induzierten Apoptose durch die miR-20a/Egln3-Achse

Um eine eventuelle Veränderung der Apoptoserate der NRVCMS, die biomechanischem Stress ausgesetzt waren, durch miR-20a bzw. Egln3 zu untersuchen, bestimmten wir die Aktivität der Caspasen 3 und 7 nach Herunterregulation von Egln3 bzw. Überexpression von miR-20a. Der Caspase-Nachweis ist neben der TUNEL-Färbung eine weitere Methode, die Apoptoserate darzustellen. Caspasen sind Enzyme, die während der Apoptose aus Vorläuferproteinen entstehen und für die Ausübung des Zelltodes essentielle Aufgaben erfüllen. Nach Induktion von Apoptose werden zunächst Initiator-Caspasen (z.B. 8 und 9) aktiviert, welche wiederum die Effektorcaspasen (z.B. 3 und 7) einschalten. Diese beginnen bereits mit dem Abbau von zelleigenen Bestandteilen, wie es auch schon dem Namen zu entnehmen ist: **Cysteinyl---Aspartat---Proteinasen**. Zudem aktivieren sie auch weitere Mechanismen, die den Abbau der Zelle unterstützen (Rufini und Melino, 2011). Die Analyse der aktiven Caspasen 3 und 7 („Cleaved Caspase“) kann als Nachweis der Caspase-3/7-vermittelten Apoptose dienen.

3.3.3. Knockdown von Egln3 führt zu verminderter Caspase-3-Aktivität

Um die Rolle von Egln3 in der stressinduzierten Apoptose durch Stretch zu analysieren, wurde zunächst ein Western Blot durchgeführt, der die Aktivität der Caspase-3 nach Applikation von dynamischen biaxialen Stretch darstellte.

Für dieses Experiment wurden NRVCMS auf zwei six-well-Platten mit serumhaltigem Medium ausgesät und 24 Stunden später mit dem von uns generierten Adenovirus zum „Knockdown“ von Egln3 und dem Kontrollvirus AdmiR-neg in serumfreien Medium infiziert. Dabei wurde die Plattenbelegung so gewählt, dass je eine Hälfte der six-Well Platte mit dem anti-miR-Egln3 Virus infiziert wurde und die andere mit AdmiR-neg. Weitere 24 Stunden später wurden nach einem Mediumwechsel eine Platte zur biphasischen Dehnung (1Hz, +15%, 24 h) in das Flexcell System gestellt. Die andere Platte ohne Dehnung diente als Kontrolle und blieb im Wärmeschrank. Nach Proteinisolation und Messung wurde dann ein Western Blot mit „Total Caspase-3“- und „Cleaved Caspase-3“-Antikörpern durchgeführt.

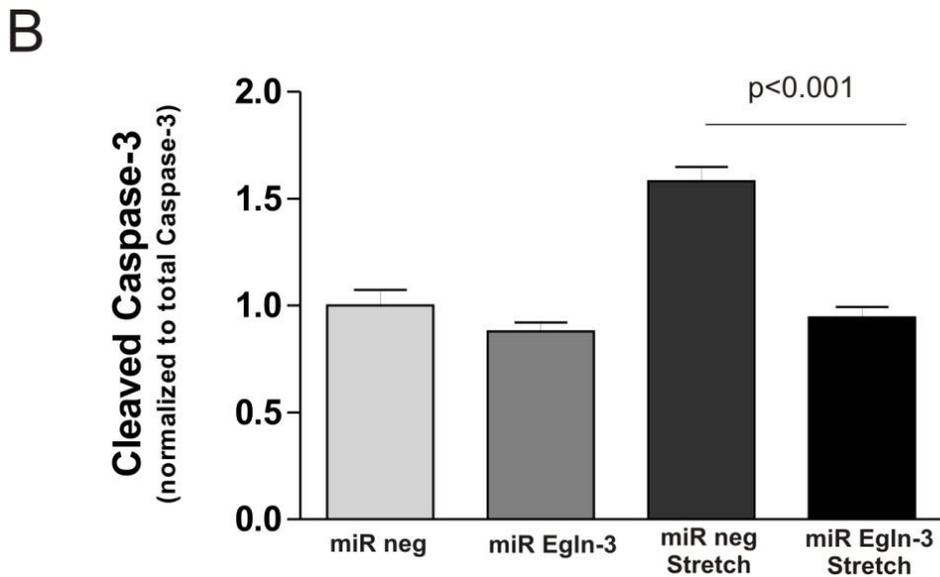
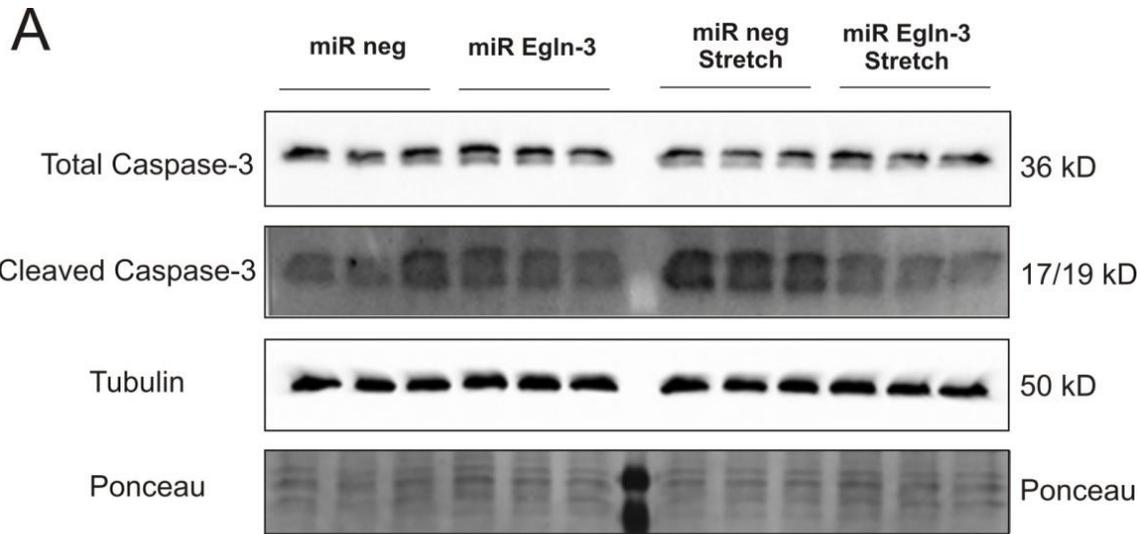


Abbildung 3-8 A Zunahme der gespaltenen, aktiven Caspase-3 (Cleaved Caspase-3) durch Stretch und signifikante Reduktion durch Knockdown von EglN3 ($n=3$, $p<0,001$) **B** entsprechende Densitometrie Fehlerbalken: SEM.

In Abb. 3-8 ist zu erkennen, dass durch dynamischen biaxialen Stretch (24h, 1 Hz, 15%) auf NRVCMs das Ausmaß der Apoptose - hier wiedergespiegelt durch die Caspase-3 - Aktivität - deutlich ansteigt (+53% „cleaved“ Caspase-3). Durch den direkten Knockdown von EglN3 konnte sowohl in den Zellen, die keinem biomechanischem Stress ausgesetzt wurden, als auch in den Zellen, die gestretcht wurden, im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe eine Suppression der Caspase-3 Aktivität nachgewiesen werden. In den gestretchten Zellen konnte nach Knockdown von

Egln3 eine im Vergleich zur Kontrollgruppe um über die Hälfte supprimierte Cleaved Caspase-3 (-57%) gemessen werden (n=3, p<0,001).

3.3.4. Knockdown von Egln3 führt zu verminderter Caspase-7-Aktivität

Zur weiteren Analyse der beeinflussenden Komponente von Egln3 auf die Apoptose wurde die Aktivität der Caspase-7 untersucht. Der Versuchsaufbau entsprach dem des Caspase-3 Versuchs, nur dass er im Westernblot mit „Total Caspase-7“- bzw. „Cleaved Caspase-7“-Antikörpern durchgeführt wurde.

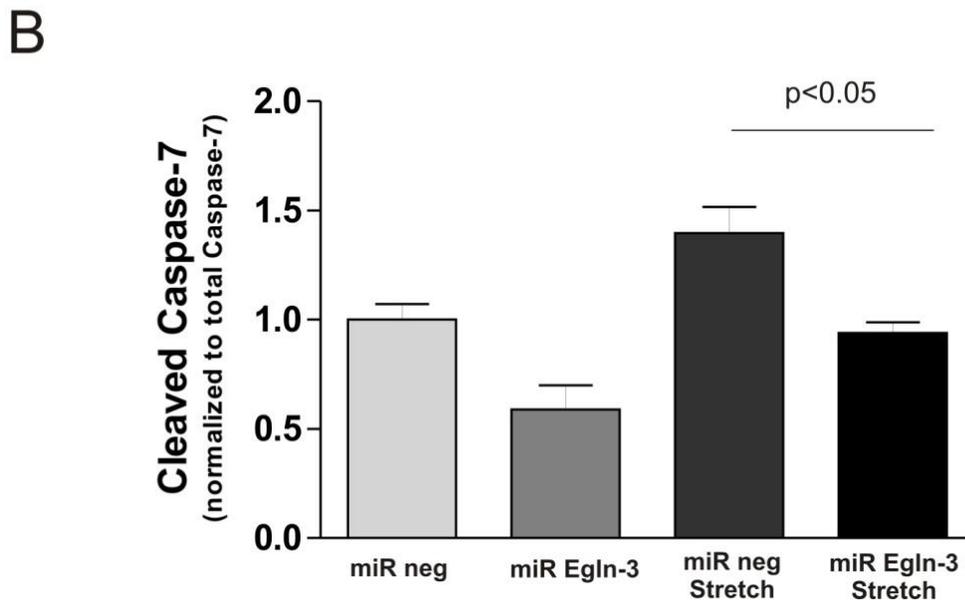
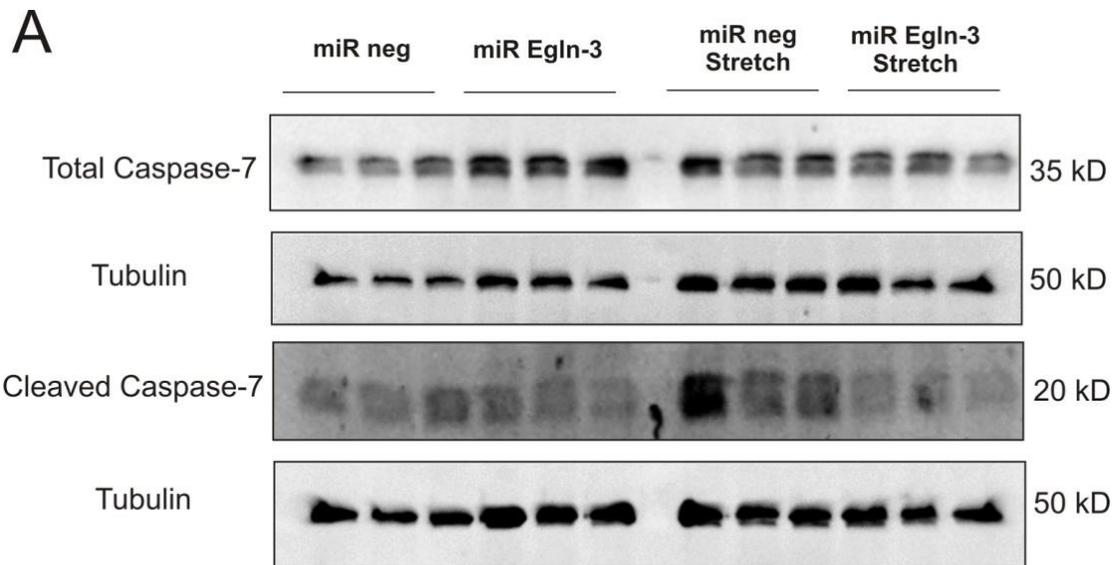


Abbildung 3-9 A Zunahme der gespaltenen, aktiven Form Caspase-7 (Cleaved Caspase-7) durch Stretch und signifikante Reduktion durch Knockdown von EglN3 ($n=3$, $p<0,05$)
B entsprechende Densitometrie Fehlerbalken: SEM.

Auch hier zeigten sich ähnliche Resultate wie beim Caspase-3 Experiment. Durch den dynamischen biaxialen Stress ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe in den NRVCs 40% mehr cleaved Caspase-7 messen. Durch den Knockdown von EglN3 konnte eine signifikant verminderte Caspase-7-Aktivität sowohl in den NRCVMs ohne Stretch (-40%) als auch in den Stretch ausgesetzten Zellen (-31%) gemessen werden ($n=3$, $p<0,05$). Diese Experimente sprechen für eine proapoptotische Rolle des EglN3 in der Signaltransduktion.

3.3.5. Egn3 Überexpression führt zu einer erhöhten Apoptoserate in NRVCMS

Zum Nachweis des proapoptotischen Effektes von Egn3 wurde des Weiteren nach einer adenoviralen Überexpression von Egn3 in NRVCMS mithilfe der TUNEL-Methode die Apoptoserate gemessen. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welche mit AdlacZ behandelt wurde (n=4, p<0,001).

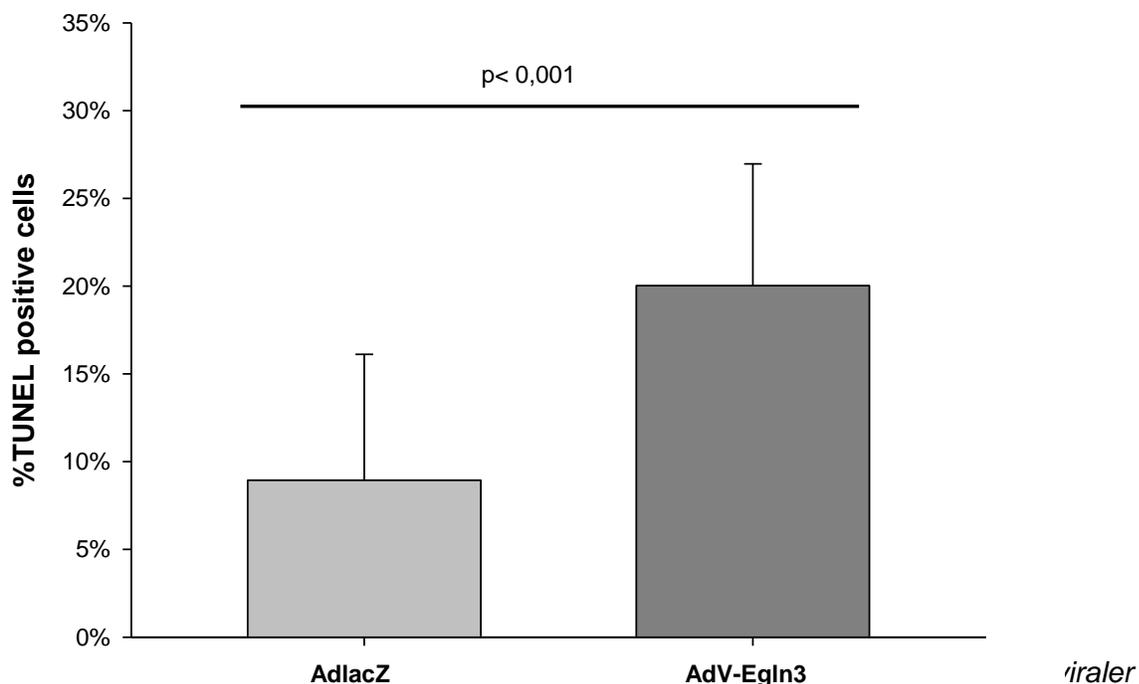


Abbildung 3-10: Überexpression von Egn3 zeigt sich ein signifikanter Anstieg der der Apoptoserate im Vergleich zu der mit AdlacZ behandelten Kontrollgruppe (n=4, p<0,001) Fehlerbalken: SEM.

3.3.6. Überexpression von miR-20a führt zu verminderter Caspase-3 Aktivität

Im nächsten Experiment wurde die Caspaseaktivität nach Überexpression von miR-20a in NRVCMS untersucht. Nach Isolation und 24-stündiger Inkubation wurden die NRVCMS mit AdmiR-20a bzw. mit AdmiR-neg infiziert. Die Zellen der Kontrollgruppe wurden im Wärmeschrank inkubiert, die Untersuchungsgruppe wurde dynamischen biaxialen Stretch ausgesetzt.

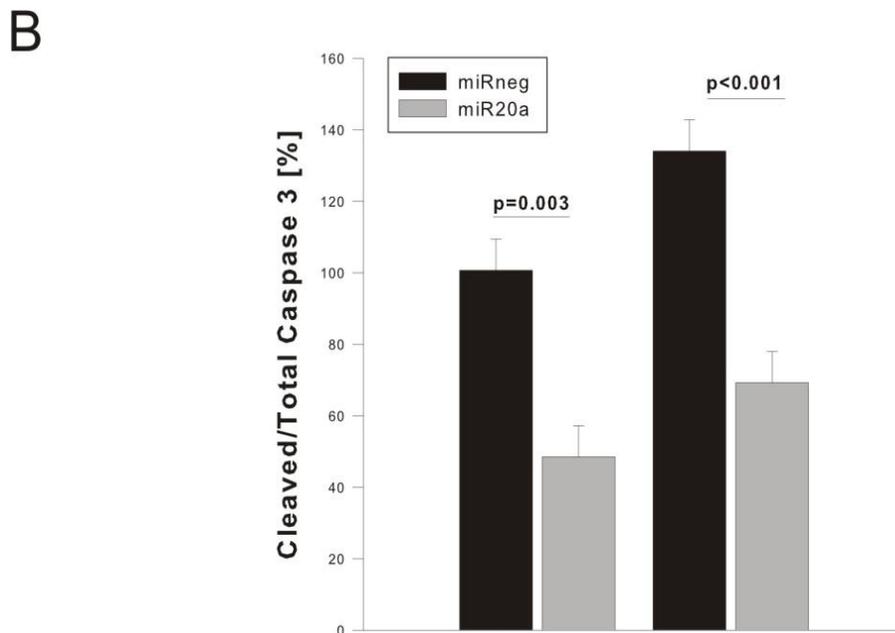
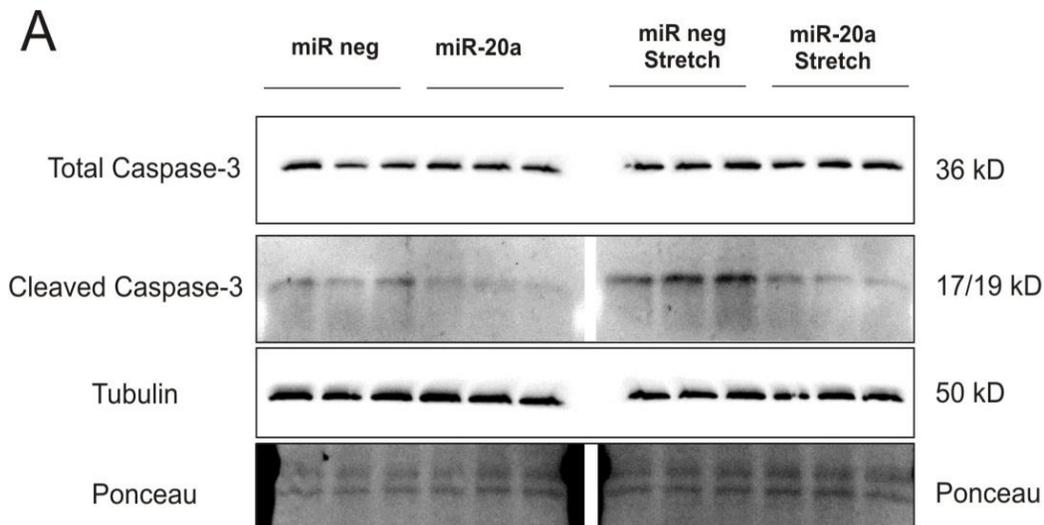


Abbildung 3-11: Stretch von Kardiomyozyten induziert Apoptose, welche durch miR-20a beeinflusst wird. **A** Stretch induziert Apoptose gemessen an der Caspase-3-Aktivität, adenovirale Überexpression von miR-20a inhibiert hypothesengerecht diesen Effekt. **B** entsprechende Densitometrie (n=3, p<0,05). Fehlerbalken: SEM.

Kongruent zu der aufgestellten miR-20a/Egln3-“Targethypothese“ zeigte sich eine deutliche Herunterregulation der Caspase-3-Aktivität unter dem Einfluss der miR-20a Überexpression. Nach Überexpression von miR-20a war mit 46% gemessener Cleaved Caspase-3 eine um mehr als die Hälfte verminderte Apoptoserate im Vergleich zu den mit miR-neg infizierten Zellen festzustellen (p=0,003). Nach Anwendung von biomechanischem Stress durch Stretch konnte miR-20a die Apoptoserate um ca. die

Hälfte reduzieren (Cleaved Caspase-3 = 51% des Ausgangswerts von miR-neg; n=3, p<0,001).

3.3.7. Überexpression von miR-20a führt zu verminderter Caspase-7 Aktivität

Analog zu dem Versuchsaufbau der Caspase-3 Aktivität bei Überexpression von miR-20a wurde auch die Caspase-7 Aktivität nach Überexpression von miR-20a untersucht.

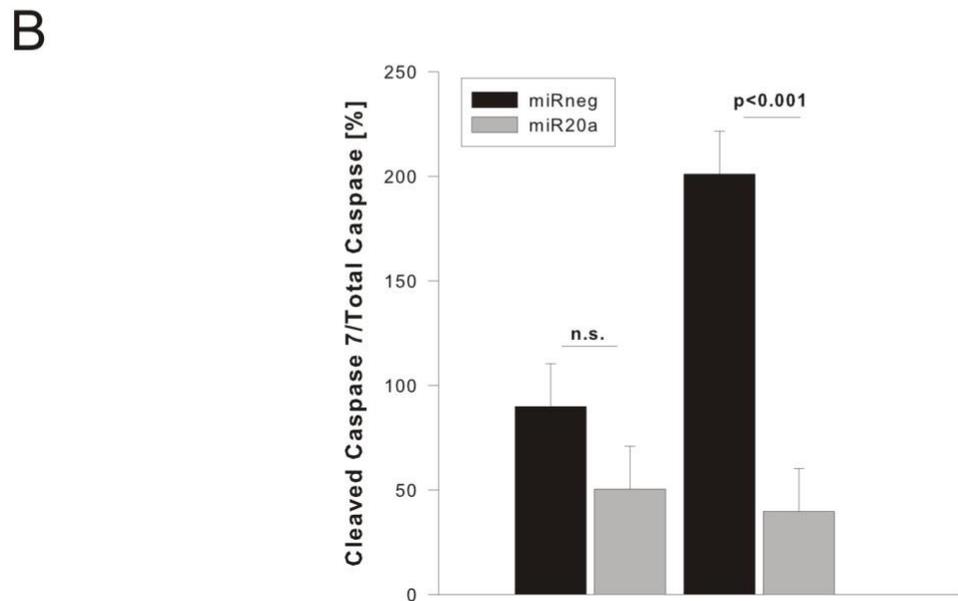
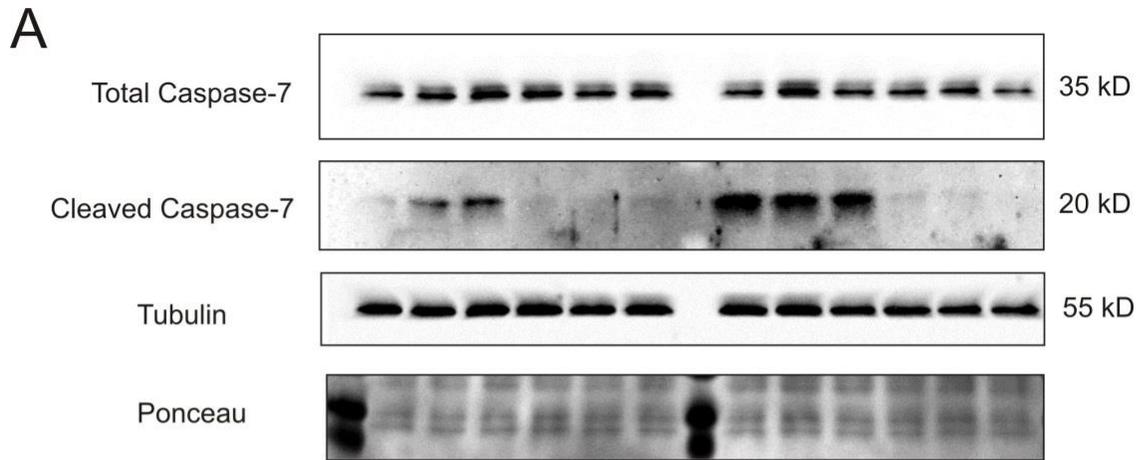


Abbildung 3-12: Stretch von Kardiomyozyten induziert Apoptose, welche durch miR-20a beeinflusst wird. **A** Stretch induziert Apoptose gemessen anhand der Caspase-7-Aktivität, adenovirale Überexpression von miR-20a inhibiert hypothesengerecht diesen Effekt. **B** entsprechende Densitometrie Fehlerbalken: SEM.

Auch hier bestätigte sich zum einen die durch Stretch induzierte Apoptose durch +113% Zunahme von cleaved Caspase in den mit dem Kontrollvirus infizierten Zellen. Zu übereinstimmenden Ergebnissen kam man auch bei der Analyse der Caspase-7-Aktivität. Im Kontrollversuch führte die miR-20a Überexpression zu einer Reduktion der Caspase-7-Aktivität auf 57% (jedoch nicht signifikant). Setzte man NRVCMs, in denen

miR-20a überexprimiert wurde, dem Stretch aus, wurde sogar eine Reduktion der Caspase-7-Aktivität um 81% im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen (n=3, p<0,001). Zusammenfassend liegen sowohl Caspase-3 als auch Caspase-7 nach Überexpression von miR-20a vermindert in gespaltener, aktiver Form vor, was den antiapoptotischen Effekt der miR-20a nachweist.

4 DISKUSSION

4.1. Die Signaltransduktion der miR-20a/Egln3 Achse und ihr Einfluss auf die kardiomyozytäre Apoptose - Voruntersuchungen und Einordnung der eigenen Ergebnisse

In Voruntersuchungen zu den in dieser Dissertationsschrift dargelegten Ergebnissen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass miR-20a in Kardiomyozyten neben sieben weiteren miRs durch akuten biomechanischen Stress differentiell reguliert wird (s. Abb. 1-6). Sie wurde für die weiteren Studien ausgewählt, weil sie zum miR17–92 Cluster gehört, welcher u.a. eine wichtige Rolle in der Steuerung des Zellzyklus einnimmt. Neben der miR-20a gehören zu dem Cluster die miRNAs 17-3p, 17-5p, 18a, 19a, 19b und miR-92a an. Obwohl es sich bei diesem Cluster um ein gemeinsames primäres Transkript handelt, zeigen seine individuellen miRs verschiedene Funktionen. Hierbei bildet die miR-20a mit der miR-17 eine funktionale Gruppe, da sie sich in ihrer seed-Region nur in 2 Nukleotiden unterscheiden. Aufgrund dieser im Vergleich zu anderen miRs des Clusters hohen Sequenzhomologie steuern miR-17 und miR-20a gemeinsam eine beträchtliche Anzahl von Schlüsselgenen, die für die Stimulation bzw. auch die Suppression des Zellzyklus zuständig sind. So ist der miR17–92 Cluster essentiell für die Entwicklung der B-Zellen während der Fetalzeit als auch für den postnatalen B-Zellzyklus (Mogilyansky und Rigoutsos, 2013). Yan et al. fanden in Krebszelllinien, dass die Herunterregulation von miR-20a bei Hypoxie durch den Transkriptionsfaktor p53 erfolgt (Yan et al., 2009). p53 ist ein wichtiges Tumorsuppressor-Gen und für seine Rolle bei der Hypoxie-induzierten Apoptose bekannt (s.u.). Als ursächlicher Mechanismus für diese Prozesse zeigte sich, dass Zielgene des Clusters diverse proapoptotische Gene sind, so auch E2F1 (O'Donnell et al., 2005; Novotny et al., 2007). Genmutationen, die zu einer Deregulation der E2F1-Aktivität führen, wurden in einer großen Zahl menschlicher Krebserkrankungen entdeckt. So führten Nagel et al. den tumorsuppressiven Effekt von miR-20a in Leukämie-Zellen auf eine Reduktion des E2F1 Level zurück (Nagel et al, 2009).

In frühen Studien auf kardiovaskulärem Sektor konnten Agah et al. an Kardiomyozyten nachweisen, dass die Überexpression von E2F1 die DNA-Replikation (S-phase entry) stimuliert, aber auch parallel den programmierten Zelltod, d.h. die Apoptose verstärkt (Agah et al., 1997). Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmalig zeigen, dass miR-20a in Kardiomyozyten sowohl durch akuten biomechanischen Stress als auch durch Ischämie/Reperfusion heraufreguliert wird. Angesichts der bereits beschriebenen proapoptotischen Wirkung von Hypoxie (Bishopric et al., 2009) und biomechanischem Stress *in vitro* (Choudhary et al., 2008; Pimentel et al. 2001) und *in vivo* (Ding et al., 2000; Teiger et al., 1996; Hirota et al., 1999; Bishopric et al., 2001) waren die von unserer Arbeitsgruppe im Ischämie/Reperusions-Modell *in vitro* festgestellte dosisabhängige Inhibition der Apoptose in Kardiomyozyten durch miR-20a wie auch *vice versa* die Steigerung die Apoptose durch „knockdown“ von miR-20a wichtige Bausteine zur Klärung der Signaltransduktion.

Um potentielle für die Transkription relevante Zielstrukturen der miR-20a vorherzusagen, wurden verschiedene web-basierte Suchmaschinen genutzt. Unter den in den Schnittmengen anzutreffenden Genen konnte unter den Aspekten von Spezifität und biologischer Relevanz in Kardiomyozyten nicht nur der proapoptotische Transkriptionsfaktors E2F1 (der in der Dissertation von J. Gantenberg untersucht wurde), sondern auch die Prolylhydroxylase Egn3/PHD3 als neue, zuvor nicht bekannte Targets von miR-20a identifiziert werden. In Vorarbeiten zu meiner Studie konnte durch unsere Arbeitsgruppe mittels 3'UTR-Luciferase Assays nicht nur das Targeting von E2F1 durch miR-20a nachgewiesen werden, sondern auch gezeigt werden, dass die adenovirale Überexpression von miR-20a zur Herunterregulation von E2F1 führt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es nun, die der antiapoptotischen Wirkung von miR-20a zugrundeliegenden molekularen Signalwege genauer zu charakterisieren.

Im ersten Schritt konnte in neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte (NRVCM) auf Proteinebene mittels Western Blot gezeigt werden, dass der „Knockdown“ von miR-20a die Menge von endogenem Egn3 versiebenfachte, also eine signifikante Überexpression von Egn3 herbeiführt. Weiterhin konnte die Überexpression bzw. der Knockdown von Egn3 mittels selbst generierter Adenoviren sowohl auf RNA- als auch

auf Protein-Ebene in der Zelle nachgewiesen werden.

Für die folgenden Experimente zur Klärung der biologischen Bedeutung der miR-20a/Egln3-Achse war es zunächst erforderlich zu klären, welche Auswirkungen biomechanischer Stress auf die Apoptose hat. Die Applikation von dynamischem biaxialem Stretch auf NRVCM führte zu signifikant mehr TUNEL-positiven, d.h. der Apoptose zugeführten Kardiomyozyten, als bei den Kontrollen. Die gesteigerte Apoptose ließ sich auch durch den erhöhten Nachweis der gespaltenen, aktiven Form von Caspase -3 und -7 zeigen. Der adenovirale „Knockdown“ von Egln3 führte zu einer signifikanten Suppression von aktiver, gespalteener Caspase-3 und -7, d.h. einer deutlichen Verminderung der Apoptoserate. Nach Überexpression von Egln3 in NRVCMs konnte mittels TUNEL-Färbung eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Apoptoserate gemessen werden.

In Übereinstimmung mit unserer miR-20a/Egln3 „Targethypothese“ konnte abschließend auch eine Überexpression von miR-20a in den mit Kontrollvirus infizierten Zellen eine verminderte Apoptoserate hervorrufen. Exponierte man die NRVCMs biaxialem Stretch, wurde die durch Stretch induzierte Apoptose durch miR-20a ausgeprägt inhibiert. Die erhobenen Daten zeigen, dass der antiapoptotische Effekt von miR-20a transkriptionell nicht nur über E2F1, sondern ebenso über das Prolyl-Hydroxylase Domain (PHD) Protein Egln3/PHD3 vermittelt wird. Die Achse miR-20a/Egln3 ist demnach wesentlich am „programmierten Zelltod“ von Kardiomyozyten durch Apoptose beteiligt.

4.2. Bedeutung von Biodatenbanken für das Target-Screening potentieller Zielstrukturen von microRNAs

Zur Identifikation der Ziel-mRNAs, die durch miR-20a reguliert werden, wurden die webbasierte Biodatenbanken *Microcosm*, *microRNA.org*, *Targetscan* und *microT* genutzt. Alle vier Datenbanken ermittelten dabei für die Prolylhydroxylase Egln3/PHD3. Sie verwenden eigens entwickelte Algorithmen, welche die Komplementarität zwischen der miRNA mit dem mRNA-Transkriptom vergleichen und hierbei insbesondere einen Schwerpunkt bei der Übereinstimmung der Seed-Sequenz setzen. Aus den jeweils vorhergesagten Ziel-mRNAs wird dann die Schnittmenge der übereinstimmenden

Kandidaten ermittelt, welche dann anhand bestehender Publikationen auf eine potentielle Relevanz in Kardiomyozyten bewertet werden. Von diesem wurden danach die vielversprechendsten Kandidaten im Hinblick auf eine mögliche Modulation der Apoptosesignalkaskade für unsere Untersuchungen ausgewählt.

Die computerbasierte Ermittlung von Ziel-mRNAs gibt zwar einen Anhalt für eine mögliche Interaktion, ersetzt aber nicht deren Bestätigung *in vitro* bzw. *in vivo*. Trotz verbesserter Algorithmen werden durch die Datenbanken weitaus mehr Zielstrukturen der microRNAs - aufgrund von Sequenzkomplementarität zwischen mRNA-Transkriptom und Seed-Sequenz - ermittelt als es tatsächlich gibt. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man die Kürze der Seed-Sequenz von nur 3-5 Nukleotiden bedenkt.

4.3. Allgemeine Bedeutung der PHDs

Die Hauptaufgabe der Prolyl Hydroxylase Domain (PHD) Proteine besteht darin, durch Hydroxylierung den sog. Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) zu inaktivieren. Daher wurden sie früher auch als HIF-ProlylHydroxylasen (HPHs) bezeichnet. Sie stellen eine evolutionär hochkonservierte Untergruppe der Dioxygenasen dar, welche Sauerstoff und 2-Oxoglutarat als Co-Substrate sowie Eisen und Ascorbinsäure als Kofaktoren benötigen (Bruick and McKnight 2001, Epstein et al., 2001; Schofield and Ratcliffe 2005). Obwohl sie am intensivsten bei Tieren, besonders Säugetierzellen, untersucht worden sind, gibt es ähnliche Hydroxylasen auch im Pflanzenbereich (*Dictyostelium*), wo das SKP1 hydroxyliert wird, ein Homolog der FBOX-Komponente der E3 Ubiquitin Ligase. Auch bei Prokaryoten existieren ähnliche katalytische Zentren beispielsweise bekannt als dHPH bei *Drosophila* 6 und „egg laying nine“ (EGLN oder EGL-9) bei *C. elegans* (wegen seiner essentiellen Funktion für die Eiablage) (Epstein et al., 2001). Säugetiere haben dagegen vier zu dieser Untergruppe gehörende Mitglieder, nämlich PHD1/EGLN2/HPH3, PHD2/EGLN1/HPH2, PHD3/EGLN3/HPH1 sowie ein erst vor wenigen Jahren charakterisiertes Protein namens P4HTM (Bruick and McKnight 2001; Epstein et al., 2001; Koivunen et al. 2007). Die heute bevorzugte Bezeichnung 'PHD-Proteine' soll ihre Funktionalität als Hydroxylasen zum Ausdruck bringen, aber den

Eindruck vermeiden, dass sie HIF-spezifisch sind (sie katalysieren nämlich auch Nicht-HIF-Substrate, Cummins et al; 2006).

Als Reaktion auf Hypoxie steigern alle o.g. Spezies ihre Glykolyse, um den Energieverlust infolge reduzierter oxidativer Phosphorylierung zu kompensieren, und regulieren die Prozesse der Erythropoese und Angiogenese herauf, um eine bessere Sauerstoffutilisation zu erreichen. Bei dieser adaptiven Antwort ist der zentrale Mechanismus die erniedrigte Sauerstoff-Konzentration als Signal zu benutzen, um die Transkription der für diese Prozesse wichtigen Gene zu aktivieren. Der Schlüssel für diese Aktivierung ist die schnelle Akkumulation des Hypoxie-induzierten Faktors HIF (Wang et al., 1995; Kaelin 2005). Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der an der intrazellulären Balance zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffversorgung beteiligt ist. Er besteht aus einer labilen α -Untereinheit, die in drei Isoformen, HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α existiert, und einer stabilen β -Untereinheit. Er gilt als der „Master-Regulator“ aller Hypoxie-responsiven mRNAs. Bei Normoxie ist die α -Untereinheit an zwei spezifischen Prolyl-Resten durch die o.g. drei Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD1-3) hydroxyliert. Die Hydroxylierung bewirkt die Inaktivierung des sog. Hypoxie-induzierten Faktors (HIF). Bei Hypoxie wird diese PHD-vermittelte Hydroxylierung inhibiert, sodass HIF- α akkumuliert und vermehrt in den Zellkern transloziert. Dort bildet es ein Dimer mit der β -Untereinheit HIF-1 β , und aktiviert transkriptionell Gene, die sog. „hypoxia response elements (HRE)“ enthalten (Abb. 4-1) und für die Anpassung der Zelle an eine mangelnde Sauerstoffversorgung zuständig sind.

Viele dieser Gene regulieren Prozesse wie die Erythropoese (z.B. das Erythropoetin-Gen) und Angiogenese sowie den Energie-Metabolismus, der Sauerstoffangebot und -verbrauch steuert. Auf diese Weise wird das Überleben der Zelle bei einem Sauerstoff-Defizit begünstigt. In diesem Kontext ist es nicht verwunderlich, dass HIF auch die Expression von Wachstumsfaktoren aus der Gruppe der Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) induziert, also die Angiogenese fördert.

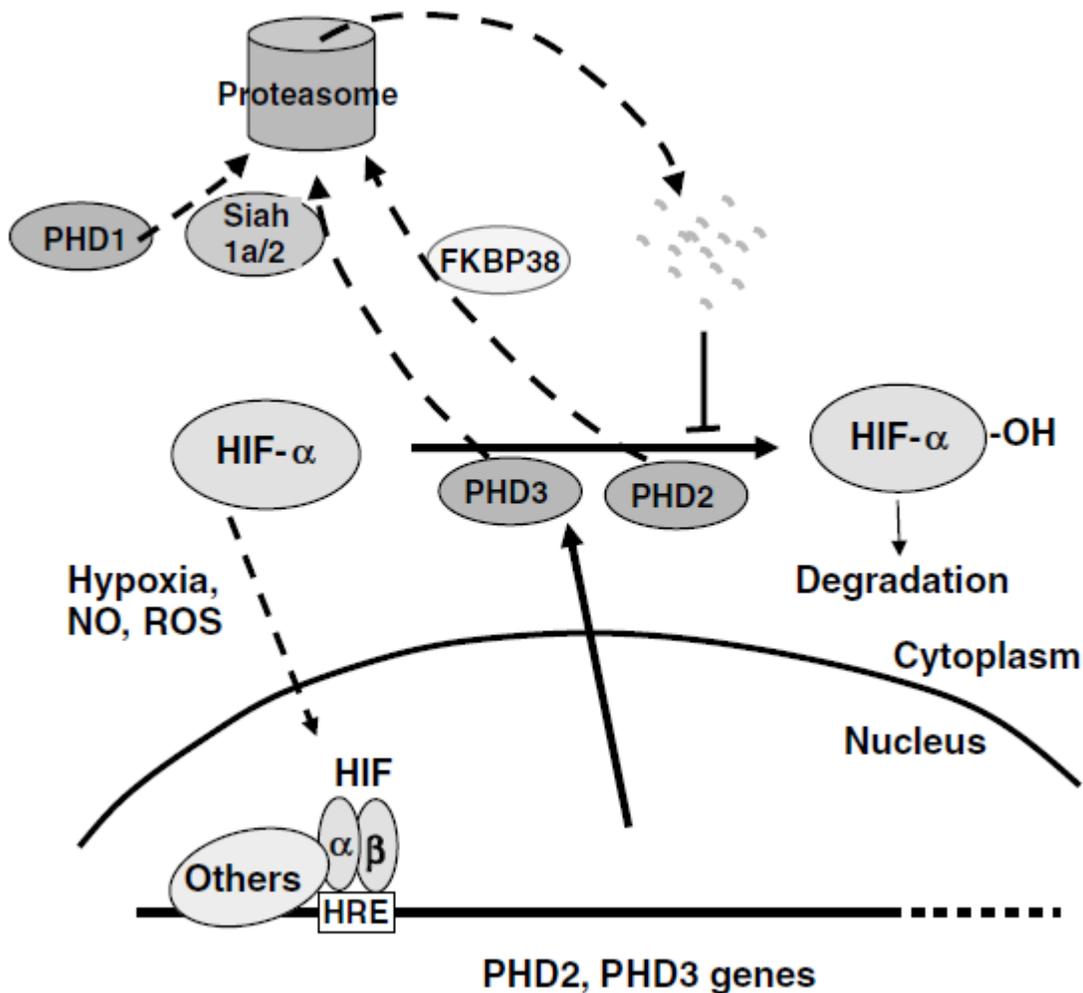


Abbildung 4-1: Regulation der PHD-Expression (Entnommen aus Fong und Takeda, 2008).

Zu den Genen, die „Hypoxia Response Elements“ (HRE) besitzen, gehören das PHD2- und das PHD3-Gen. Beide werden bei Hypoxie, wie oben geschildert, transkriptionell durch HIF hochreguliert. Durch diese „feedback“-Steuerung resultiert eine gesteigerte Verfügbarkeit von PHD2 und PHD3, die die weitere Akkumulation von HIF- α supprimiert (Fong und Takeda, 2008). Zusammengefasst besteht die Hauptfunktion von PHDs darin, die HIF- α Stabilität zu regulieren.

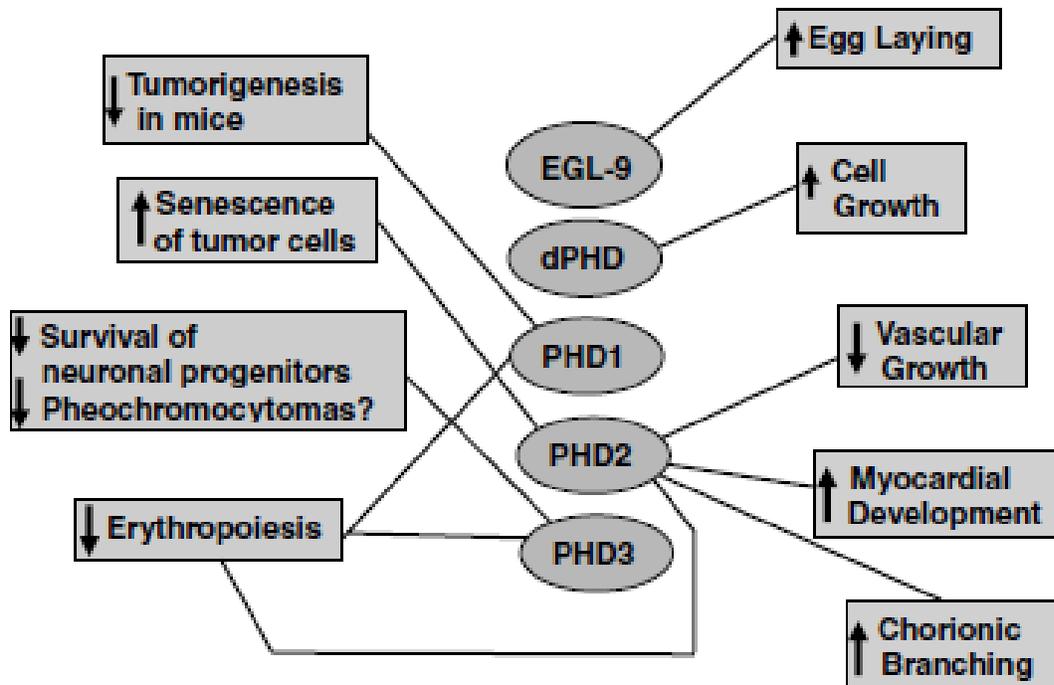


Abbildung 4-2: Biologische Funktionen der PHDs (Entnommen aus Fong und Takeda 2008).

Sowohl PHD2 als auch PHD3 werden zusätzlich der Protein-Degradation mit Hilfe von SiAh 1-2 zugeführt. Die SiAh 1-2 Enzyme werden durch Hypoxie stark induziert, was - gleichzeitig mit der durch Hypoxie induzierten Transkription - die Degradation der PHDs beschleunigt, besonders von PHD3 (Nakayama et al., 2004).

Obwohl die zelluläre O_2 -Konzentration („Schlüsselsubstrat der Hydroxylation“) der am weitesten verbreitete von den PHD-katalysierten Hydroxylierungs-Reaktionen überwachte Parameter ist, gibt es Anhaltspunkte dafür, dass noch verschiedene andere Parameter wie z.B. NO ebenso eine Rolle spielen. Unter den drei PHD Familienmitgliedern ist PHD2 unter normoxischen Bedingungen als die primäre und damit wichtigste HIF-Prolyl-Hydroxylase anzusehen. PHD1 und PHD2 bestehen beim Menschen aus 407 bzw. 426 Aminosäuren und besitzen beide eine hochkonservierte Hydroxylase-Domäne in ihrer C-terminalen Hälfte, wohingegen die N-terminale Hälfte sehr unterschiedlich aufgebaut und funktionell noch wenig charakterisiert ist (Epstein et al., 2001). PHD3 ist mit 239 Aminosäuren ein viel kürzeres Protein als PHD1 und 2, enthält in ihrer C-terminalen Hälfte eine Hydroxylase-Domäne, aber nur eine kurze N-terminale Sequenz.

Alle drei PHDs kommen auf RNA-Level in nahezu allen Organen vor, allerdings in unterschiedlicher Konzentrationen. So findet sich PHD1 am stärksten in den Hoden, PHD3 am stärksten im Herzen (William et al., 2006) exprimiert. Als Beispiel für eine extrakardiale Funktion von EglN3 sei hier nur ihre bedeutende Rolle bei Apoptose-Prozessen neuronaler Zellen während der ZNS-Entwicklung genannt, wo sie das Überleben neuronaler Progenitor-Zellen supprimiert (Lee et al., 2005). Ein „Loss of function“ von EglN3 ist demgegenüber an der Entstehung des Phäochromozytoms aus sympathischen neuronalen Vorläuferzellen beteiligt (Huang et al., 1998). Wie aus der Abb. 4-2 über die diversen Funktionen der PHD-Proteine zu entnehmen, ist PHD3 des Weiteren besonders auch an der Steuerung der Erythropoese beteiligt.

4.4. Die kardiovaskuläre Bedeutung von EglN3/PHD3

Nachdem im vorigen Kapitel die grundsätzliche Interaktion von EglN3/PHD3 vor allen Dingen im Zusammenspiel mit PHD2 dargestellt sowie Beispiele für ihre Bedeutung in nicht kardialen Geweben gegeben wurden, soll in den folgenden beiden Kapiteln unter Interpretation unserer Befunde ihre Bedeutung im kardiovaskulären System bei der Steuerung des Zellzyklus und der Apoptose beleuchtet werden.

In unserem ersten Experimentblock konnten wir in NRVCMs nachweisen, dass die Überexpression von miR-20a zu einer Herunterregulation von EglN3 führt. Die Funktion von EglN3 war von Cioffi et al. (2003) bereits in einer *in vitro*-Studie an humanen Kardiomyozyten untersucht worden. Hier verursachte Hypoxie einen signifikanten Anstieg von PHD3, der mit einem Anstieg der HIF-1 α Proteinexpression korrelierte. Dies traf jedoch nicht auf PHD1 oder PHD2 zu. Durch Überexpressions-Experimente konnte gezeigt werden, dass die PHD3 Konzentration sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen die HIF-1 α Stabilität beeinflusst, was nahelegt, dass PHD3 in einer Feedback-Schleife die HIF-1 α Aktivität kontrolliert.

Während Cioffi et al. (2003) auf mRNA-Ebene die Interaktion von EglN3/PHD3 mit der HIF-1 α Protein- Expression innerhalb des Zellzyklus aufklärte, konnten wir durch

unsere Caspase-3/-7 abhängigen Experimente die Beeinflussung des Zellzyklus durch EglN3/PHD3 und auch miR-20a in Richtung Apoptose nachweisen. Die in unseren Experimenten adressierte Steuerung dieses Prozesses erfolgt also über den von uns entdeckten miR-20a Signalweg und damit durch ein Mitglied des 17-92 Clusters, dem ja schon nach diversen anderen Experimenten eine umfassende Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus zukommt (O'Donnell et al., 2005). Dabei führte der miR-20a-„Knockdown“ zur Überexpression von EglN3/PHD3.

O'Donnell et al. wiesen in ihren Experimenten eine funktionelle Interaktion zwischen dem miR17~92-Cluster und der in der Dissertation von J. Gantenberg weiter untersuchten E2F-Familie nach (O'Donnell et al., 2005). Zum einen konnten sie zeigen, dass die Translation von E2F1 von den miR-17~92-Cluster-Mitgliedern miR-17-5p und miR-20a direkt gehemmt wird, zum anderen konnte eine positive Rückkopplungsschleife zwischen dem Transkriptionsfaktor c-Myc und dem miR17~92-Cluster nachgewiesen werden. Das Protoonkogen c-Myc aktiviert die Expression zahlreicher Gene und nimmt so Einfluss auf Zellproliferation, Apoptose und Zellwachstum. Es ist zudem ein in Tumorgewebe häufig mutiertes Gen. In Kardiomyozyten ist c-Myc u.a. assoziiert mit der Induktion von Hypertrophie via Aktivierung von NFκB und Phosphoinositol-3-phosphate Kinase (PI3K).

In Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass eine adenovirale Überexpression von miR-20a zu einer signifikanten Herunterregulation des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor E2F1 und des pro-proliferativen Transkriptionsfaktor E2F2 in Kardiomyozyten führt. Mittels eines 3'UTR-Luciferase-Assay konnte E2F1 und E2F2 als Ziel-mRNA von miR-20a bestätigt werden (Frank et al, 2012). Funktionell stellt die Hemmung von E2F1 durch miR-20a in Kardiomyozyten eine weitere synergistische Ebene der antiapoptotischen Wirkung von miR-20a dar. Durch die Hemmung von E2F1 sinkt u.a. die zelluläre Expression des proapoptotischen Proteins Bnip3, was wiederum zur verminderten Induktion von Apoptose führt (Yurkova et al., 2008).

In einer umfangreichen Studie von Moslehi et al. führte der simultane Verlust von EglN3/PHD3 in Zellen/Geweben, die einen Mangel an PHD2 aufweisen, zu verstärkter HIF Akkumulation und gesteigerter Aktivierung von HIF Zielgenen (Moslehi et al., 2010).

Der simultane PHD2 und PHD3 -„Verlust“ verstärkte die phänotypische Ausprägung von Befunden, die Mäuse mit alleinigem PHD2 Verlust aufweisen. So nahmen der Schweregrad einer dilatativen Kardiomyopathie sowie die vorzeitige Sterblichkeit signifikant zu. Dies zeigt die deletären Auswirkungen eines chronischen Mangels an PHD3. Es wurden größere phänotypische Übereinstimmungen mit Mäusen beobachtet, die einen Verlust des pVHL Gens (VHL= von Hippel Lindau) aufweisen, als mit Mäusen mit alleinigem PHD2 Defizit. Das Gen für die Hippel-Lindau Erkrankung wurde auf Chromosom 3 p25.26 lokalisiert und ist stark in die Steuerung des Zellzyklus und der Gefäßneubildung involviert. Die obigen Befunde lassen sich in dem Sinne interpretieren, dass PHD2 und PHD3 *in vivo* partiell redundante Funktion besitzen. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass ein alleiniger Mangel an PHD3 weder die HIF Akkumulation in den untersuchten Geweben beeinflusste noch zu den oben beschriebenen Phänotypen führte. Dieses untermauert, dass PHD2 unter normoxischen Bedingungen die dominierende HIF Prolylhydroxylase ist. PHD3 scheint jedoch in der Lage zu sein, den HIF Response zu modulieren, wenn die PHD2 Funktion kompromittiert ist, wie es z.B. bei prolongierter Hypoxie der Fall ist. Dies konnte durch Experimente, in denen eine PHD3 Überexpression vorgenommen wurde, gezeigt werden. Der Grad der Kompensation von PHD2/3 war allerdings von Gewebe zu Gewebe und für die verschiedenen HIF-responsiven Gene unterschiedlich, d.h. dass die Aktivierung verschiedener HIF Zielgene *in vivo* zu quantitativ und qualitativ differenten Veränderungen der PHD Aktivität führt.

In einer erst kürzlich publizierten Studie untersuchten Xie et al. (2015) in umfangreichen Experimenten, ob die Inhibition oder Depletion von PHD3 die kardiomyozytäre Apoptose inhibiert und die durch Ischämie-Reperfusion (I/R) verursachte Myokardschädigung abschwächt. Dazu wurde bei PHD3-„knockout“ Mäusen und Kontrolltieren aus dem gleichen Wurf eine 40-minütige operative Ligatur der LAD und anschließende Reperfusion durchgeführt. Die TUNEL-Färbung zeigte, dass danach bei PHD3-„knockout“ Mäusen die kardiomyozytäre Apoptose signifikant abgeschwächt war. Die „knockout“-Mäuse zeigten keine Veränderungen der HIF-1 α -Protein Konzentration, keine vermehrte Expression von HIF Zielgenen und auch die myokardiale Kapillardichte war unter physiologischen Bedingungen normal. Bei Hypoxie jedoch kam es bei den

PHD3-depletierten Mäusen zu einer starken Induktion des HIF-1 α -Proteins, was die Interpretation erlaubt, dass PHD3 unter hypoxischen Bedingungen die HIF-1 α Stabilität gewährleistet. Wie oben dargestellt, stimuliert der aktivierte HIF-1 α Signalweg eine große Zahl von Genen, die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind und via metabolischer Reprogrammierung zur Abwehr Hypoxie-induzierter Schäden beitragen.

In einer früheren Arbeit konnte die Arbeitsgruppe von Cam Patterson bereits zeigen, dass PHD3 eine wichtige Rolle in einem der p53 Signalwege spielt (Xie et al., 2012). Dieser Signalweg ist involviert in die sog. „DNA Damage Response (DDR)“, einen molekularen Mechanismus, den Zellen entwickelt haben, um DNA-Schäden wahrzunehmen und ihre Reparatur zu veranlassen. (Harper und Elledge, 2007). Xie et al. fanden, dass ein Protein des ATR/CHK1-Signalwegs essentiell durch PHD3 hydroxyliert werden muss, um aktiviert zu werden. Die Inhibition von PHD3 durch Hypoxie verhinderte die Aktivierung des ATR/CHK1/p53 Signalwegs und verringerte die durch die DNA Beschädigung induzierte Apoptose. Tamoxifen, ein Prolylhydroxylase Inhibitor inhibierte in den untersuchten Kardiomyozyten signifikant die Aktivität von Chk1 und p53 und auch die durch Doxorubicin induzierte Apoptose (Xie et al., 2015). Zusammenfassend legen diese Befunde nahe, dass die Depletion von PHD3 bedeutsam für die Stabilisation der HIF-1 α Konzentration sowie die Inhibition des „DNA Damage Response“ ist. Beide Mechanismen dürften für die kardioprotektive Wirkung einer erniedrigten PHD3 Aktivität bei akuter Hypoxie essentiell sein. Es erscheint nicht ausgeschlossen, dass auch die bei PHD3-„knockdown“ von uns festgestellte Attenuierung der durch biomechanischen Stress verursachten Apoptose auf ähnliche Weise abläuft.

Wie in der Einleitung meiner Arbeit bereits ausgeführt, konnten Liu et al. an der aus dem embryonalen Rattenherz stammenden Zelllinie H9c2 nachweisen, dass eine Doxorubicin-Behandlung dieser Zellen zu einer gesteigerten Apoptose mit erhöhter Caspase-3/7 Aktivität führt. Sie wird gefördert durch Mitglieder der Bcl2-Familie. PHD3 interagiert nun mit der BH4-Domäne von Bcl 2. Dies wiederum inhibiert die Verbindung mit Bax und steigert die Apoptoserate. Die Hochregulierung von EglN3/PHD3 führte zur Zunahme der Apoptose, umgekehrt reduzierte ihre Inhibition

bzw. ihr „Silencing“ substantiell die DOX-induzierte Apoptose. PHD3 ist somit in Interaktion mit der BH4 Domäne des Bcl2 Proteins als verantwortlich für die DOX-induzierte kardiomyozytäre Apoptose anzusehen.

4.5. Biomechanischer Stress führt über den miR-20a/PHD3 Signalweg zur Induktion von Apoptose

Apoptose ist ein streng regulierter, energieintensiver Prozess, bei dem der Zelltod Folge einer fest programmierten Sequenz von Ereignissen ist (Narula et al., 1996). Die Fragmentierung chromosomaler DNA ist das biologische Kernmerkmal der Apoptose. Mithilfe des dynamischen „Stretch“-Systems Flexercell FX-5000 konnten wir in unseren Studien die antiapoptotische Rolle der miR-20a via des von ihr regulierten Transkriptionsfaktors PHD3 in direktem Bezug auf biomechanische Belastung der Kardiomyozyten analysieren. Ebenso wie der direkte „Knockdown“ von PHD3 führte die Überexpression von miR-20a zu verminderter Apoptose (Caspase-3/-7 Aktivität), ihr eigener „Knockdown“ hatte die entgegengesetzte Wirkung mit einer Steigerung der PHD3-Expression.

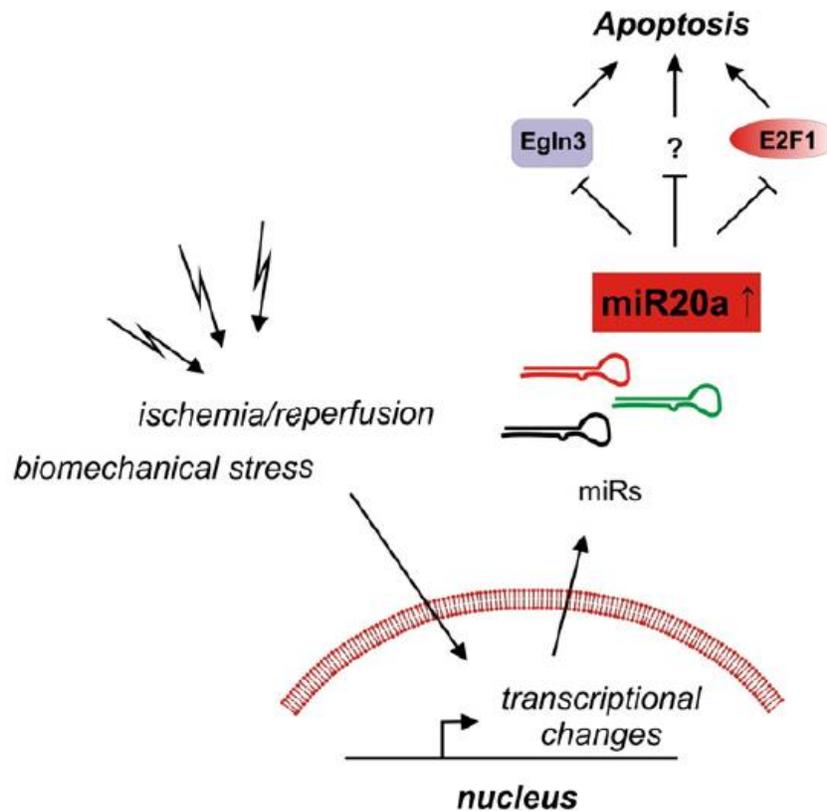


Abbildung 10: Die miR-20a wirkt antiapoptotisch durch Herunterregulation von proapoptotischen Zielstrukturen E2f1 und Egn3. Entnommen aus Frank et al., 2012.

Der proapoptotische Effekt von biomechanischem Stress als auch von Hypoxie ist in Kardiomyozyten sowohl *in vivo* (Ding et al., 2000; Teiger et al., 1999; Hirota et al., 1999) als auch *in vitro* (Choudhary et al., 2008; Pimentel et al., 2001) umfangreich nachgewiesen worden.

Hirota et al. (1999) untersuchten in einem Maus-Experiment, dass transgene Tiere mit einer Deletion des gp130 Zytokin-Rezeptors im Ventrikelmuskulatur zwar unter Basis-Bedingungen eine normale Ventrikelfunktion hatten, jedoch nach Druckbelastung durch Anlage einer aortalen Bandage schnell eine dilatative Kardiomyopathie infolge myozytärer Apoptose entwickelten, während die Kontrolltiere eine kompensatorische Hypertrophie aufbauten. Diese Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass die kardiomyozytäre Apoptose ein wesentlicher Schritt in der Transition von der kompensatorischen Hypertrophie zur dilatativen Kardiomyopathie sein dürfte.

Pimentel et al. (2001) untersuchten mit dem auch von uns verwendeten dynamischen Stretch-Verfahren die Auswirkungen zyklischer Dehnung auf den Zellzyklus und die Apoptose der Kardiomyozyten. Sie fanden, dass Stretch eine amplitudenabhängige Zunahme (nur Hochfrequenz) von Sauerstoffradikalen, präziser reaktive Sauerstoffspezies (ROS – reactive oxygen species) in den Kardiomyozyten herbeiführt und schlussfolgerten, dass hiervon das Ausmaß der Apoptose abhängen könnte.

Die von Pimentel et al. (2008) beobachteten proapoptotischen Effekte von hochamplitudigem Stretch befinden sich in guter Übereinstimmung mit Befunden von Cheng et al., wonach Stretch von Papillarmuskelpräparaten zu einem simultanen Anstieg der ROS-Bildung und Zunahme der myozytären Apoptose führte (Cheng et al., 1995).

Unsere eigenen Untersuchungen zur bei biomechanischer Belastung von Kardiomyozyten stattfindenden Signaltransduktion ergänzen in hervorragender Weise besonders die Befunde, die Xie et al. bzgl. des Zusammenhangs von PHD3 und Apoptose erst kürzlich publiziert haben (Xie et al., 2015).

Sie stellten fest, dass die Depletion von EglN3/PHD3 das Herz durch Inhibition der kardiomyozytären Apoptose vor Ischämie/Reperfusionsschaden schützt. Nach unseren Daten kann nun in analoger Weise die durch biomechanischen Stress verursachte Apoptose durch „knockdown“ von EglN3/PHD3 attenuiert werden. Ob die weitere Signaltransduktion ebenfalls über HIF-1 α erfolgt, ist zwar bislang noch nicht untersucht worden, jedoch durchaus vorstellbar. Wie aus Abbildung 4-1 über die Signaltransduktion von EglN3/PHD3 zu entnehmen, bewirken erhöhte ROS-Konzentrationen in ähnlicher Weise wie Hypoxie die zelluläre Akkumulation von HIF-1 α , was seinen gesteigerten Transfer in den Zellkern bewirkt und hier die PHD2/3-Kaskade in Gang setzt. Einen ähnlichen Effekt könnte direkt oder indirekt auch eine biomechanische Belastung von Kardiomyozyten in Form von Stretch ausüben.

Zu einer Steigerung der intrazellulären ROS-Bildung mit Auswirkungen auf die PHD2/3 Kaskade kommt es auch durch Verabreichung von Anthrazyklinen, die experimentell zu einer gesteigerten Apoptose der Kardiomyozyten und klinisch dosisabhängig zu einer

irreversiblen myokardialen Dysfunktion im Sinne einer Kardiomyopathie führen (Sawyer et al., 1999).

Zusammenfassend wird der antiapoptotische Effekt von miR-20a durch direktes „targeting“ und anschließende Herunterregulation des proapoptotischen Transkriptionsfaktors PHD3 hervorgerufen. Aus diesem Grunde ist miR-20a bei akutem biomechanischen Stress - wie auch bei Hypoxie - hochreguliert und inhibiert die Apoptose der Kardiomyozyten. Diese Eigenschaften machen miR-20a zu einer kardioprotektiven micro-RNA (s. Abb. 4-3).

4.6. Potentielle zukünftige klinische Anwendungen von EglN3/PHD3 Inhibitoren

Nach unseren Befunden sowie den Studien, auf die in der obigen Diskussion eingegangen wurde, könnte EglN3/PHD3 - und zwar seine Inhibition - eine potentielle therapeutische Zielstruktur zur Verbesserung des Überlebens von Kardiomyozyten bei bestimmten Herzerkrankungen sein. Die PHD3 Inhibition könnte sich zur Behandlung bei solchen kardiovaskulären Krankheitsbildern als strategisch wertvoll erweisen, bei denen die kardiomyozytäre Apoptose gesteigert ist. Hierzu müssen allerdings verschiedene Aspekte bedacht werden, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

Erste präklinische Modelle lassen vermuten, dass eine akute HIF-Stabilisation bei akuten ischämischen Insulten günstig sein könnte. So konnte z.B. in Untersuchungen an bzgl. des HIF-1 Gens transgenen Mäusen beim experimentellen Myokardinfarkt infolge der hohen HIF-Spiegel eine Reduktion seiner Größe gezeigt werden (Ivan et al., 2002; Philip et al., 2006). Ähnliche Beobachtungen wurden auch beim experimentellen Schlaganfall gemacht (Baranova et al., 2007; Siddiq et al., 2005). Solch eine akute HIF-Stabilisation konnte in der oben beschriebenen Studie von Minamishima et al. (2009) durch EglN3/PHD3-Inhibition erreicht werden. Man weiß allerdings noch nicht, ob eine für einen eventuellen langfristigen therapeutischen Einsatz erforderliche chronische HIF-1 α Stabilisation sich als nützlich oder eventuell auch schädlich erweist. Moslehi et al. (2010) fanden nämlich heraus, dass die chronische Inaktivierung von PHD2 in

Kardiomyozyten, besonders in Kombination mit einem Verlust von PHD3, womöglich infolge permanenter und damit überschießender Apoptose zu einer dilatativen Kardiomyopathie und vorzeitiger Sterblichkeit der Mäuse führt. Ihre Studie legt nahe, dass der chronische Verlust von PHD-Aktivität bei chronischer Ischämie dazu beiträgt, viele der typischen histologischen, ultrastrukturellen und funktionellen Merkmale einer ischämischen Kardiomyopathie hervorzurufen. Diese Befunde schließen in keiner Weise eine günstige Auswirkung der HIF-Induzierung bei *akuter* myokardialer Ischämie aus, da HIF viele Gene aktiviert, die dazu beitragen, energiereiche Substrate zu erhalten, um das Überleben der Zellen bei niedriger Sauerstoffverfügbarkeit zu unterstützen.

Die in obigen Mausmodellen gewonnenen Erkenntnisse mit akuter und chronischer EglN3/PHD3-Inhibition sind als außerordentlich wertvoll für die Analyse potentieller Vor- und Nachteile bei der pharmakologischen Beeinflussung der HIF Aktivität *in vivo* anzusehen. Die Ergebnisse unserer Experimente sind im Sinne einer akuten Beeinflussung von EglN3/PHD3 zu interpretieren. Nach Aussage von Minamishima et al. (2009) ist davon auszugehen, dass PHD-Inhibitoren auch bei dauerhafter klinischer Verwendung mit großer Wahrscheinlichkeit nur zu einem partiellen und intermittierenden Verlust der PHD-Funktion (d.h. nicht zu den o.g. Veränderungen wie bei einem kompletten PHD-Funktionsverlust) führen würden. Unklar ist auch noch, ob das zur Erzielung eines therapeutischen Effekts erforderliche Ausmaß einer PHD-Inhibition sich von der für die Induktion der Entwicklung einer kardialen Pathologie erforderlichen Intensität unterscheidet.

Ein prospektives mit dem Einsatz von EglN3/PHD3 Inhibitoren zu verfolgendes Ziel könnte auch die Förderung der Angiogenese in ischämischen Geweben sein. Hierfür konnte das „proof of principle“ der Inhibition der HIF- 1 α Hydroxylierung im Mausmodell bereits erbracht werden (Warnecke et al., 2003). Warnecke *et al.* gelang es, durch topische Verabreichung von drei verschiedenen Hydroxylase-Inhibitoren die Angiogenese zu stimulieren. Nach Untersuchungen von Doebele et al. üben die miRs-17 und 20a einen antiangiogenetischen Effekt in Endothelzellen aus (Doebele et al., 2010). Systemische Blockade von miR-17/20 durch Antagomirs löste eine starke Neovaskularisation *in vivo* aus. Hieraus könnte sich ein potentiell günstiger Effekt einer

miR-17/20a Inhibition bei myokardialer Ischämie ableiten lassen, speziell durch systemische Gabe von Antagomirs. Wegen der unterschiedlichen Ergebnisse der Studien von Warnecke bzw. Doebele wird vermutet, dass eine je nach Kontext unterschiedliche („context dependent“-) Regulation der Angiogenese durch miR-17/20 *in vivo* stattfindet. In diesem Zusammenhang wird es auch von hohem Interesse sein, wie die proangiogenetischen Effekte die proapoptotischen Effekte *in vivo* aufwiegen.

Hsie et al. zeigten, dass die Inhibition der HIF–Prolyl Hydroxylase mittels einem oral verabreichbarem PHD Inhibitor bei Rhesusaffen effektiv und reversibel die Erythropoese durch Induktion der EPO-Expression stimulierte (Hsie et al., 2007). Klinische Untersuchungen zum humanen Einsatz dieser Substanz zwecks Behandlung von (renalen) Anämien wurden auf den Weg gebracht (<http://www.fibrogen.com/trials/>).

Trotz all dieser inzwischen gewonnenen Erkenntnisse muss bedacht werden, dass PHDs grundsätzlich auch potentielle Tumor-Suppressoren sind und es daher noch unklar ist, ob eine Behandlung mit PHD-Inhibitoren kanzerogen ist. Die nicht selektive therapeutische Verwendung von miRNA-20a könnte pro-onkogene Wirkung in anderen Geweben entfalten. Es könnte aber möglicherweise gelingen, über differentielle Gewebeexpressionsprofile – hier spielt auch der von Gewebe zu Gewebe unterschiedliche Grad der Kompensation der PHD2-Aktivität durch PHD3 eine Rolle - und hohe HIF-1 α a Spezifität gewebespezifische Therapeutika zu generieren.

Es wird im Hinblick auf eine potentielle therapeutische Anwendung unerlässlich sein, den Transkriptionsfaktor PHD3 Zelltyp-spezifisch zu adressieren und zu modulieren, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Wenn dies gelingen sollte, wäre die selektive auf Kardiomyozyten beschränkte PHD3 Inhibition ein attraktiver Weg, um die durch Druckbelastung induzierte Apoptose zu reduzieren und ein ungünstiges kardiales „Remodeling“ durch biomechanischen Stress zu vermeiden oder auch den Reperfusionsschaden nach Ischämie abzuschwächen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Apoptose von Kardiomyozyten stellt einen wichtigen Baustein im Prozess des maladaptiven Remodellings bei myokardialer Hypertrophie dar. Verschiedene an diesen Prozessen beteiligte Signalwege werden durch endogene microRNAs (miRs) reguliert, welche als negative Regulatoren der Genexpression anzusehen sind. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in früheren Arbeiten die Rolle der microRNAs bei der Anpassung der Herzmuskelzelle an eine biomechanische Belastung und fand, dass verschiedene microRNAs durch biaxialen mechanischen Stretch differentiell reguliert werden.

In Studien unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Apoptose in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (NRVCM) durch miR-20a reguliert wird. So hemmte miR-20a in einem statischen Stretch-Modell *in vitro* die Apoptose, wirkte also antiapoptotisch, wohingegen der „knockdown“ von miR-20a durch AntimiRs zu vermehrter Apoptose führte.

Die Signaltransduktion im Regulationskreis des Zellzyklus, in denen die Apoptose-Prozesse gesteuert werden, war jedoch bisher unbekannt. Um potentielle Zielstrukturen der miR-20a vorherzusagen, wurden vier verschiedene web-basierte Suchmaschinen genutzt (Microcosm, microRNA.org, Targetscan, microT; Abb. 12) benutzt. Unter den in den Schnittmengen anzutreffenden Genen konnte unter den Aspekten von Spezifität und biologischer Relevanz in Kardiomyozyten E2F1, die in der Dissertation von J. Gantenberg untersucht wurde, sowie die Prolylhydroxylase EglN3/PHD3 als neue, zuvor nicht bekannte Targets von miR-20a identifiziert und in Vorarbeiten zu meiner Studie mittels eines 3'UTR-Luciferase Assay validiert werden.

In weiterführenden Untersuchungen konnte in NRVCMS auf Proteinebene mittels Western Blot gezeigt werden, dass der „knockdown“ von miR-20a die Menge von endogenem EglN3 versiebenfachte, also eine signifikante Heraufregulation von EglN3 herbeiführt.

Anschließend wurden zwei rekombinante EglN3-Adenoviren zwecks Gentransfers von EglN3 in die Zelle kloniert und die Überexpression bzw. der „Knockdown“ von EglN3 sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene auch in der Zelle nachgewiesen.

Der d3. Versuchsabschnitt diente dem Nachweis der Induktion von Apoptose durch biomechanischen Stress. Nach Applikation von dynamischem biaxialem Stretch (um +15% über 6 resp. 24 h) auf NRVCM ließen sich signifikant mehr TUNEL positive, d.h. der Apoptose zugeführte Kardiomyozyten nachweisen als bei den Kontrollen. Die Induktion von Apoptose durch Stretch ließ sich auch durch den erhöhten Nachweis der gespaltenen, aktiven Form von Caspase (sog. „cleaved“ Caspase) -3 und -7 um 53% bzw. 40% (jeweils $p < 0.05$) zeigen.

Im 4. Versuchsabschnitt wurde ein Knockdown von EglN3 herbeigeführt und die Auswirkungen auf die Apoptose anhand der Caspase-Aktivität untersucht. Ohne Stretch-Exposition wurde bei EglN3-„Knockdown“ die Caspase-7-Aktivität signifikant (-40%) reduziert, die Caspase-3 Aktivität wurde dagegen nicht signifikant beeinflusst. Nach Stretch-Exposition der Zellen wurde die Aktivität beider Caspasen durch den EglN3-„Knockdown“ signifikant reduziert („cleaved“ Caspase-3: -57 % und „cleaved“ Caspase-7: -31%). Bei Überexpression von EglN 3 in NRVCMs konnte dagegen mittels TUNEL-Färbung eine im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr als verdoppelte und damit signifikant gesteigerte Apoptoserate ($p < 0,001$) festgestellt werden.

In Übereinstimmung mit unserer miR-20a/EglN3-„Targethypothese“ führte im letzten Untersuchungsteil auch eine Überexpression von miR-20a im Vergleich zu den mit Kontrollvirus infizierten Zellen zu einer verminderten Apoptoserate (Abnahme von cleaved Caspase-3 und 7 auf 46% ($p = 0.003$) resp. 47% (n.s.)). Exponierte man die NRVCMs biaxialem Stretch, wurde die durch Stretch induzierte Apoptose durch miR-20a ausgeprägt inhibiert, da die Caspase-3-Aktivität auf 51% und die Caspase-7-Aktivität sogar auf nur 19% reduziert wurde (beide $p < 0.001$).

Zusammenfassend stellt der miR-20a/EglN3-Signalweg eine neue Regulationseinheit von Stress-induzierter Apoptose in Kardiomyozyten dar. Die durch EglN3-„Knockdown“ potentiell mögliche Einflussnahme auf das kardiale Remodelling stellt daher einen vielversprechenden Ansatzpunkt für eine zukünftige therapeutische Verwendung dar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Agah R., Kirshenbaum L.A., Abdellatif M., Truong L.D., Chakraborty S., Michael L.H., Schneider M.D.: *Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo*. 1997. *J Clin Invest*. 100:2722–2728.
- Ambros, V., Lee, R. C., Lavanway, A., Williams, P. T., and Jewell, D. : *MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in C. elegans*. 2003. *Curr. Biol*. 13, 807-818.
- Anversa P., Kajstura J., Olivetti G.: *Myocyte death in heart failure*. 1996. *Curr Opin Cardiol*.;11(3):245-51.
- Baek D., Villen J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P., Bartel D.P.: *The impact of microRNAs on protein output*. 2008. *Nature*; 455(7209):64-71.
- Baranova, O., L. F. Miranda, P. Pichiule, I. Dragatsis, R. S. Johnson, and J. C. Chavez. *Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia*. 2007. *J. Neurosci*. 27:6320–6332.
- Barrington K.G., Zamore P.D.: *MicroRNAs: regulating a change of heart*. 2009 *Circulation*. 119 (16): 2217-2224.
- Barry, S.P., S.M. Davidson, and P.A. Townsend: *Molecular regulation of cardiac hypertrophy*. 2008. *Int J Biochem Cell Biol*. 40(10): p. 2023-39.
- Berenji K., Drazner M.H., Rothermel B.A. and Hill J.A.: *Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?* 2005. *Am J Physiol Heart CircPhysiol*. 289(1): p. H8-H16.
- Benito, B., Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S, Mont L. : *Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training*. 2011. *Circulation*. 123(1): p. 13-22.
- Bishopric N.H., Andrecka P., Slepak T., Webster K.A.: *Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte*. 2001. *Curr Opin Pharmacol*.;1(2):141–50.
- Brancaccio M., Fratta L., Notte A., Hirsch E., Poulet R., Guazzone S., De Acetis M., Vecchione C., Marino G., Altruda F., Silengo L., Tarone G. and Lembo G., Melusin.: *A muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload*. 2003. *Nat Med*. 9(1): p. 68-75.
- Braz, J.C., Gregory K., Pathak A., Zhao W., Sahin B., Klevitsky R., Kimball T.F., Lorenz J.N., Nairn A.C., Liggett S.B., Bodi I., Wang S., Schwartz A., Lakatta E.G., DePaoli-Roach A.A., Robbins J., Hewett T.E., Bibb J.A., Westfall M.V., Kranias E.G., Molkentin J.D.: *PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure*. 2004. *Nat Med*. 10(3): p. 248-54.
- Bruick R.K., McKnight S.L.: *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*. 2001. *Science*. 294: 1337–1340.
- Carè A., Catalucci D., Felicetti F., Bonci D., Addario A., Gallo P., Bang M.L., Segnalini P., Gu Y., Dalton N.D., Elia L., Latronico M.V., Høydal M., Autore C., Russo M.A., Dorn G.W. 2nd, Ellingsen O., Ruiz-Lozano P., Peterson K.L., Croce C.M., Peschle C., Condorelli G.: *MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy*. 2007. *Nat Med*.;13(5):613-8.
- Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y., Tang R.H., Tatsuguchi M., Huang Z.P., Chen J.F., Deng Z., Gunn B., Shumate J., Willis M.S., Selzman C.H, Wang D.Z.: *MicroRNA-*

- 208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice.* 2009. *J Clin Invest.* 119(9):2772-86.
- Cheng Y., Ji R., Yue J., Yang J., Liu X., Chen H., Dean D.B., Zhang C.: *MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy?* 2007. *Am J Pathol.*; 170 (6): 1831-1840.
- Cheng W., Li B., Kajstura J., Li P., Wolin M.S., Sonnenblick E.H., Hintze T.H., Olivetti G., Anversa P.: *Stretch-induced programmed myocyte cell death.* 1995. *J Clin Invest.*; 96:2247–2259.
- Chen J.F., Mandel E.M., Thomson J.M., Wu Q., Callis T.E., Hammond S.M., Conlon F.L., Wang D.Z.: *The role of micro RNA-1 and micro RNA 133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.* 2006. *Nat Genet.*; 38(2):228-233.
- Chen J.F., Murchison E.P., Tang R., Callis T.E., Tatsuguchi M., Deng Z., Rojas M., Hammond S.M., Schneider M.D., Selzman C.H., Meissner G., Patterson C., Hannon G.J., Wang D.Z.: *Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure.* 2008. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(6):2111-6.
- Chen, N., Rinner, O., Czernik, D., Nytko, K. J., Zheng, D., Stiehl, D. P., Zamboni, N., Gstaiger, M., Frei, C.: *The oxygen sensor PHD3 limits glycolysis under hypoxia via direct binding to pyruvate kinase.* 2011. *Cell Res.*, 21: 983-986.
- Chen X, Zhang X, Kubo H, Harris DM, Mills GD, Moyer J et al.: *Ca2p influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca2p overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes.* 2005. *Circ Res.*, 97:1009–1017
- Choudhary R., Baker K.M., Pan J.: *All-trans retinoic acid prevents angiotensin II- and mechanical stretch-induced reactive oxygen species generation and cardiomyocyte apoptosis.* 2008. *J Cell Physiol.*, 215(1):172-81.
- Cioffi, C. L., Liu, X. Q., Kosinski, P. A., Garay, M., Bowen, B. R.: *Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells.* 2003; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303: 947-953.
- Cordes K.R., Srivastava D.: *MicroRNA regulation of cardiovascular development.* 2009. *Circ Res.*, 104(6):724-32.
- Cummins E.P., Berra E., Comerford K.M., Ginouves A., Fitzgerald K.T., Seeballuck F. et al.: *Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity.* 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 103: 18154–18159.
- Crow M.T., Mani K., Nam Y.J., Kitsis R.N.: *The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis.* 2004. *Circ. Res.*; 95(10):957-70.
- da Costa Martins P.A., Bourajaj M., Gladka M., Kortland M., van Oort R.J., Pinto Y.M., Molkentin J.D., De Windt L.J.: *Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling.* 2008. *Circulation.* 118(15):1567-76.
- Ding B., Price R.L., Goldsmith E.C., Borg T.K., Yan X., Douglas P.S., Weinberg E.O., Bartunek J., Thielen T., Didenko V.V., Lorell B.H: *Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anoikis and the progression to early failure.* 2000. *Circulation.* 101(24):2854-62.
- Doebele C., Bonauer A., Fischer A., Scholz A., Reiss Y., Urbich C., et al.: *Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell intrinsic anti-angiogenic function in*

endothelial cells. 2010. *Blood* Mar;115(23):4944–50.

Dorn GW 2nd¹, Brown JH., *Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation*. 1999. *Trends Cardiovasc Med.*; 9(1-2):26-34.

Dorn G.W., 2nd, Robbins J. and Sugden P.H.: *Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation*. 2003; *Circ Res*. 92(11): p. 1171-5.

Dorn GW 2nd. *Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling*. 2009; *Cardiovasc Res.*; 81(3):465-73.

Drazner M.H., Rame J.E., Marino E.K., Gottdiener J.S., Kitzman D.W., Gardin J.M., Manolio T.A., Dries D.L. and Siscovick D.S., *Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study*. 2004; *J Am Coll Cardiol*, 43(12): p. 2207-15.

Ebelt H., Hufnagel N., Neuhaus P., Neuhaus H., Gajawada P., Simm A., Müller-Werdan K., Braun T.: *Divergent siblings: E2F2 and E2F4 but not E2F1 and E2F3 induce DNA synthesis in cardiomyocytes without activation of apoptosis*. 2005; *Circ Res.*; 96(5):509-17.

Epstein A.C., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R.: *C.elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. 2001; *Cell*; 107: 43–54.

Feng, J.A., Perry G., Mori T., Hayashi T., Oparil S., Chen Y.F.: *Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in atrial natriuretic peptide-deficient mice*. 2003. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(5-6): p. 343-9

Fisher S.A., Langille B.L., Srivastava D.: *Apoptosis during cardiovascular development*. 2000; *Circ Res*;87:856–864.

Fong, G. H., Takeda, K.: *Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins*. 2008; *Cell Death Differ*, 15: 635-641.

Frank D., Gantenberg J., Boomgaarden I., Kuhn C., Will R., Jarr K.U., Eden M., Kramer K., Luedde M., Mairbäurl H., Katus H.A., Frey N.: *MicroRNA-20a inhibits stress-induced cardiomyocyte apoptosis involving its novel target EglN3/PHD3*. 2012; *J Mol Cell Cardiol*;52(3):711-7.

Frank D., Kuhn C., Brors B., Hanselmann C., Lüdde M., Katus H.A., Frey N.: *Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program*. 2008; *Hypertension*;51(2):309-18.

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

Granzier H.L. and Irving T.C.: *Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments*. 1995; *Biophys J*. 68(3): p.1027-44.

Harper J.W., Elledge S.J.: *The DNA damage response: ten years after*. 2007; *Moll-Cell*; 28(5): 739-45 Review

Hill J.A. and Olson E.N.: *Cardiac plasticity*. 2008; *N Engl J Med*, 358(13): p. 1370-80

Hirota H., Chen J., Betz U.A., Rajewsky K., Gu Y., Ross J. Jr, Müller W., Chien K.R.: *Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress*. 1999; *Cell.*;97(2):189-98.

Hsieh M.M., Linde N.S., Wynter A., Metzger M., Wong C., Langsetmo I. et al. : *HIF prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques*. 2007; *Blood*; 110: 2140–2147.

Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F.: *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin–proteasome pathway*. 1998; Proc Natl Acad Sci USA; 95: 7987–7992.

Huntzinger E., Izaurralde E.: *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. 2011; Nat Rev Genet.;12:99–110.

Ikeda S., Kong S.W., Lu J., Bisping E., Zhang H., Allen P.D., Golub T.R., Pieske B., Pu W.T.: *Altered microRNA expression in human heart disease*. 2007 Physiol Genomics.;31(3):367-73.

Ivan, M., T. Haberberger, D. C. Gervasi, K. S. Michelson, V. Gunzler, K. Kondo, H. Yang, I. Sorokina, R. C. Conaway, J. W. Conaway, and W. G. Kaelin, Jr.: *Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor*.2002; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:13459–13464.

Kaelin WG.: *Proline hydroxylation and gene expression*. 2005; Annu Rev Biochem;74: 15–128.

Katoh M.: *Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases*. 2014 Frontiers in Cell and Developmental Biology;2, article 61

Kehat, I. and J.D. Molkentin: *Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation*. 2010; Circulation, 122(25): p. 2727-35.

Kinugawa K., Yonekura K., Ribeiro R.C., Eto Y., Aoyagi T., Baxter J.D., Camacho S.A., Bristow M.R., Long C.S., Simpson P.C.: *Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy*. 2001; Circulation Res;89(7):591-8.

Knoll R., Hoshijima M., Hoffman H.M., Person V., Lorenzen-Schmidt I., Bang M.L., Hayashi T., Shiga N., Yasukawa H., Schaper W., McKenna W., Yokoyama M., Schork N.J., Omens J.H., McCulloch A.D., Kimura A., Gregorio C.C., Poller W., Schaper J., Schultheiss H.P. and Chien K.R.: *The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy*. 2002; Cell,. 111(7): p. 943-55.

Knoll R., Hoshijima M. and Chien K.: *Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease*. J Mol Med, 2003. **81**(12): p. 750-6.

Koivunen P., Tiainen P., Hyvarinen J., Williams K.E., Sormunen R., Klaus S.J.: *An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and actson hypoxia-inducible factor alpha*. 2007; J Biol Chem; 282: 30544–30552.

Lammerding J., Kamm R.D. and Lee R.T., *Mechanotransduction in cardiac myocytes*. 2004; Ann N Y Acad Sci,. 1015: p. 53-70.

Lee YS, Dutta A.: *MicroRNAs in cancer*. 2009; Annu Rev Pathol.;4:199-227.

Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M. S., Sajan, M. P., Farese, R. V., Freeman, R. S., Carter, B. D., Kaelin, W. G., Jr., Schlisio, S.: *Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer*. 2005.; Cancer Cell, 8: 155-167.

Lehnart, S.E., L.S. Maier, and G. Hasenfuss: *Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart*. 2009. Heart Fail Rev, 14(4): p. 213-24.

Levy D., Savage D.D., Garrison R.J., Anderson K.M., Kannel W.B. and Castelli W.P., *Echocardiographic criteria for left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart*

- Study. 1987; *Am J Cardiol.*, 59(9): p. 956-60.
- Levy D., Garrison R.J., Savage D.D., Kannel W.B. and Castelli W.P.: *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.* 1990; *N. Engl. J. Med.*, 322: p. 1561.
- Levy D., Larson M.G., Vasan R.S., Kannel W.B. and Ho K.K.: *The progression from hypertension to congestive heart failure.* 1996; *Jama*, 275(20): p. 1557-62.
- Liu, Y., Huo, Z., Yan, B., Lin, X., Zhou, Z. N., Liang, X., Zhu, W., Liang, D., Li, L., Zhao, H., Sun, Y., Chen, Y. H.: *Prolyl hydroxylase 3 interacts with Bcl-2 to regulated doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells.*, 2010; *Biochem Biophys Res Commun*, 401: 231-237
- Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis.* 2000; *Circulation*,102(4): p. 470-9.
- Mann D.L.: *MicroRNAs and the failing heart.* 2007; *N Engl J Med.* 356(25):2644-2645.
- McMullen, J.R., Shioi T., Zhang L., Tarnavski O., Sherwood M.C., Kang P.M., Izumo S.: *Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy.* 2003; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(21): p. 12355-60.
- MacLellan W.R. and Schneider M.D.: *Genetic dissection of cardiac growth control pathways.* 2000; *Annu. Rev. Physiol.*, 62: p. 289.
- Minamishima Y.A., Moslehi J., Padera R.F., Bronson R.T., Liao R., Kaelin Jr WG.: *A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo.* 2009; *Mol Cell Biol.*;29(21):5729–41.
- Mogilyansky E., Rigoutsos I.: *The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease.* 2013; *Cell Death Differ.*;20(12):1603-14.
- Molkentin J.D. and Dorn G.W.: *Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy.* 2001; *Annu. Rev. Physiol.*, 63: p. 391.
- Mori, T., Chen YF, Feng JA, Hayashi T, Oparil S, Perry GJ., *Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse.* 2004 *Cardiovasc Res.*, 61(4): p. 771-9.
- Moslehi J., Minamishima Y.A., Shi J., Neuberg D., Charytan D.M., Padera R.F., et al.: *Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy.* 2010; *Circulation*; 122(10):1004–16.
- Naga Prasad S.V., Duan Z.H., Gupta M.K., Surampudi V.S., Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Kotwal A., Moravec C.S, Starling R.C., Perez D.M., Sen S., Wu Q., Plow E.F., Croce C.M., Karnik S.: *Unique microRNA profile in end-stage heart failure i indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks.* 2009 *J Biol Chem.*
- Nagel S¹, Venturini L., Przybylski G.K., Grabarczyk P., Schmidt C.A., Meyer C., Drexler H.G., Macleod R.A., Scherr M. *Activation of miR-17-92 by NK-like homeodomain proteins suppresses apoptosis via reduction of E2F1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia.* 2009 ;*Leuk Lymphoma.* 50(1):101-8.
- Narula J., Haider N., Virmani R., DiSalvo T.G., Kolodgie F.D., Hajjar R.J., Schmidt U., Semigran M.J., Dec G.W., Khaw B.A.: *Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.* 1996; *N Engl J Med.*;335(16):1182-9.

Nakayama H., Chen X., Baines C.P., Klevitsky R., Zhang X., Zhang H. Jaleel N., Chua B B.H., Hewett T.E., Robbins J., Houser S.R., Molkentin J.D. : *Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure*. 2007; J Clin Invest; 117:2431–2444.

Nakayama K., Frew I.J., Hagensen M., Skals M., Habelhah H., Bhounik A. Kadoya T, Erdjument-Bromage H., Tempst P., Frappell P.B., Bowtell D.D., Ronai Z.: *Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia*. 2004; Cell; 117: 941–952.

Novotny G.W., Sonne S.B., Nielsen J.E., Jonstrup S.P., Hansen M.A., Skakkebaek N.E., Rajpert-De Meyts E., Kjems J., Leffers H.: *Translational repression of E2F1 mRNA in carcinoma in situ and normal testis correlates with expression of the miR-17–92 cluster*. 2007 Cell Death Differ;14: 879–82.

O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V., Mendell J.T.: *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. 2005; Nature;435(7043):839-43.

Olivetti G., Abbi R., Quaini F., Kajstura J., Cheng W., Nitahara J.A., Quaini E., Di Loreto C., Beltrami C.A., Krajewski S., Reed J.C., Anversa P.: *Apoptosis in the failing human heart*. 1997; N Engl J Med.;336(16):1131-41.

Opie, L.H., Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. *Controversies in ventricular remodelling*. 2006; Lancet. 367(9507): p. 356-67.

Ohtani K, Dimmeler S. *Control of cardiovascular differentiation by microRNAs*. 2011 Basic Res Cardiol.;106:5–11.

Pimentel D.R., Amin J.K., Xiao L., Miller T., Viereck J., Oliver-Krasinski J., Baliga R., Wang J., Siwik D.A., Singh K., Pagano P., Colucci W.S., Sawyer D.B.: *Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes*. 200, Circ Res.;89(5):453-60.

Philipp, S., J. S. Jurgensen, J. Fielitz, W. M. Bernhardt, A. Weidemann, A. Schiche, B. Pilz, R. Dietz, V. Regitz-Zagrosek, K. U. Eckardt, and R. Willenbrock.: *Stabilization of hypoxia inducible factor rather than modulation of collagen metabolism improves cardiac function after acute myocardial infarction in rats*. 2006; Eur. J. Heart Fail. 8:347–354.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley. A. *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*.2004; Genome Res 14, 1902-1910.

Rothermel, B.A., McKinsey T.A., Vega R.B., Nicol R.L.: Mammen P., Yang J., Antos C C.L., Shelton J.M., Bassel-Duby R., Olson E.N., Williams R.S.: *Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo*. 2001; Proc Natl Acad Sci U S A, 98(6): p. 3328-33.

Ross RS, Borg TK. *Integrins and the myocardium*. 2001; Circ Res.;88(11):1112-9.

Rufini A., Melino G.: *Cell death pathology: the war against cancer*. 2011; Biochem Biophys Res Commun.;414(3):445-50.

Sano, M., Minamino T., Toko H., Miyauchi H., Orimo M., Qin Y., Akazawa H., Tateno K., Kayama Y., Harada M., Shimizu I., Asahara T., Hamada H., Tomita S., Molkentin J.D., Zou Y., Komuro I.: *p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload*. 2007; Nature. 446(7134): p. 444-8.

Sawyer D.B., Fukazawa R., Arstall M.A., Kelly R.A.: *Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane*. 1999; Circ Res. 84:257–265.

- Sayed D., Hong C., Chen I.Y., Lypowy J., Abdellatif M.: *MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy*. 2007; *Circ Res.*;100(3):416-24.
- Schultz Jel, J., Glascock B.J., Witt S.A., Nieman M.L., Nattamai K.J., Liu L.H., Lorenz J.N., Shull G.E., Kimball T.R., Periasamy M.: *Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity*. 2004 *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 286(3): p. H1146-
- Schofield C.J., Ratcliffe P.J.: *Signalling hypoxia by HIF hydroxylases*. 2005; *Biochem Biophys Res Commun*; 338: 617–626.
- Selbach M., Schwanhauser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N.: *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. 2008 *Nature*;455(7209):58-63.
- Shyu K.G., Wang B.W., Cheng W.P., Lo H.M.: *MicroRNA-208a Increases Myocardial Endoglin Expression and Myocardial Fibrosis in Acute Myocardial Infarction*. 2015 *Can J Cardiol.* May;31(5):679-90.
- Siddiq, A., I. A. Ayoub, J. C. Chavez, L. Aminova, S. Shah, J. C. LaManna, S. M. Patton, J. R. Connor, R. A. Cherny, I. Volitakis, A. I. Bush, I. Langsetmo, T. Seeley, V. Gunzler, and R. R. Ratan. *Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system*. 2005; *J. Biol. Chem.* 280:41732–41743.
- Skommer J., Rana I., Marques F.Z., Zhu W., Du Z., Charchar F.J.: *Small molecules, big effects: the role of microRNAs in regulation of cardiomyocyte death*. 2014; *Cell Death Dis.*;5:e1325.
- Soonpaa M.H., Field L.J.: *Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis*. 1998; *Circ Res.*;83(1):15-26.
- Swedberg K., Cleland J., Dargie H., Drexler H., Follath F., Komajda M., Tavazzi L., Smiseth O.A., Gavazzi A., Haverich A., Hoes A., Jaarsma T., Korewicki J., Levy S., Linde C., Lopez-Sendon J.L., Nieminen M.S., Pierard L. and Remme W.J., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology*. 2005.*Eur Heart J*, 26(11): p. 1115-40.
- Sylvestre Y., De Guire V., Querido E., Mukhopadhyay U.K., Bourdeau V., Major F., Ferbeyre G., Chartrand P.: *An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop*. 2007; *J Biol Chem.* 2007;282(4):2135-43.
- Tamura, N., Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, K Katsuki M., *Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide*. 2000; *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(8): p. 4239-44.
- Tatsuguchi M., Seok H.Y., Callis T.E., Thomson J.M., Chen J.F., Newman M., Rojas M., Hammond S.M., Wang D.Z.: *Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy*. 2007; *J Mol Cell Cardiol.*;42(6):1137-41.
- Teiger E., Than V.D., Richard L., Wisnewsky C., Tea B.S., Gaboury L, Tremblay J., Schwartz K., Hamet P.: *Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat*. 1996; *J Clin Invest.* ;97(12):2891-7.
- Thum T., Galuppo P., Wolf C., Fiedler J., Kneitz S., van Laake L.W., Doevendans P.A., Mummery C.L., Borlak J., Haverich A., Gross C., Engelhardt S., Ertl G.,

- Bauersachs J.: *MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure*. 2007; *Circulation*;116(3):258-67.
- van Empel, V.P., Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ, *Myocyte apoptosis in heart failure*. 2005. *Cardiovasc Res*, 67(1): p. 21-9.
- van Rooij E., Sutherland L.B., Liu N., Williams A.H., McAnally J., Gerard R.D., Richardson J.A, Olson E.N: *A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure*. 2006.*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 103(48):18255-60.
- van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Hill J., Olson E.N.: *Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA*. 2007; *Science*;316(5824):575-9.
- Vega, R.B., Rothermel B.A., Weinheimer C.J., Kovacs A., Naseem R.H., Bassel-Duby R., Williams R.S., Olson E.N: *Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy*. 2003; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(2): p. 669-74.
- Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L.: *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. 1995; *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 5510–5514.
- Wang G. K., Zhu J. Q., Zhang J. T., Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. *Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans*. 2010; *European Heart Journal*;31(6):659–666.
- Warnecke C., Griethe W., Weidemann A., Jurgensen J.S., Willam C., Bachmann S. Ivashchenko Y., Wagner I., Frei U., Wiesener M., Eckardt K.U. : *Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors*. 2003; *FASEB J*; 17: 1186–1188.
- Wencker, D., Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. 2003; *J Clin Invest*, 111(10): p. 1497-504.
- Willam C., Maxwell P.H., Nichols L., Lygate C., Tian Y.M., Bernhardt W, Wiesener M., Ratcliffe P.J., Eckardt K.U, Pugh C.W. *HIF prolylhydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation*. 2006; *J Mol Cell Cardiol*; 41: 68–77.
- Wyllie AH: *Apoptosis* (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). 1993; *Br J Cancer*;67:205–208
- Xie L., Pi X., Mishra A., Fong G., Peng J., Patterson C.: *PHD3-dependent hydroxylation of HCLK2 promotes the DNA damage response*. 2012; *J Clin Invest.*;122(8):2827-36
- Xie L, Pi X, Wang Z, He J, Willis MS, Patterson C: Depletion of PHD3 protects heart from ischemia/reperfusion injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 80 (2015) 156–165
- Yan H.L., Xue G., Mei Q., Wang Y.Z., Ding F.X., Liu M.F., Tang Y., Yu H.Y., Sun S.H. *Repression of the miR-17 92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis*. 2009; *EMBO J*;28:1719–2732
- Yurkova, N., Shaw, J., Blackie, K., Weidman, D., Jayas, R., Flynn, B., Kirshenbaum, L. A.: *The cell cycle factor E2F-1 activates Bnip3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes*. 2008. *Circ Res*, 102: 472-479.
- Zhao Y. Ransom J.F., Li A., Vedantham V., von Drehle M., Muth A.N., Tsuchihashi T., McManus M.T., Schwartz R.J., Srivastava D. :*Dysregulation of cardiogenesis,*

cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. 2007; Cell.; 129(2):303-17.

Zhao Y., Samal E., Srivastava D.: *Serum response factor regulates a muscle-specific MicroRNA that targets Hand2 during cardiogenesis.* 2005; Nature; 436:214–220.

7 EIGENE PUBLIKATION

Frank D, Gantenberg J, Boomgaarden I, Kuhn C, Will R, Jarr KU, Eden M, Kramer K, Luedde M, Mairbäurl H, Katus HA, Frey N.

Micro RNA-20a inhibits stress-induced cardiomyocyte apoptosis involving its novel target EglN3/PHD3. *J Mol Cell Cardiol.* 52:711-7 (2012).

8 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Norbert Frey für die Möglichkeit, die Arbeiten für die vorliegende Dissertation an seiner Klinik durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Derk Frank, der mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und dank seiner hervorragenden Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, ganz besonders Frau Katharina Stiebeling für ihre Geduld und außerordentliche Einsatzbereitschaft bei der Durchführung der Experimente.

Meinen Mitdoktoranden Frau Elisa Zille und Herrn Reza Poyanmehr danke ich für die gegenseitige Unterstützung, Motivation und die vielen gemeinsamen Stunden im Labor.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung während meines gesamten beruflichen Werdegangs danken.