

Aus der Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und
Intensivmedizin

(Direktor: Prof. Dr. Norbert Frey)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Dynamischer biomechanischer *Stretch* führt zur Regulation von
microRNA-146a und microRNA-503 in Kardiomyozyten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Malte Kamrath

aus Berlin

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Derk Frank
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Laudes

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2019
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.01.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Abhandlung - abgesehen von der Beratung durch den Betreuer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist, soweit dies nicht explizit vermerkt ist. Ich erkläre weiterhin, dass Teile dieser Arbeit zur Publikation eingereicht wurden und dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Malte Kamrath. Kiel, den

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	9
1.1.1 Das hypertrophische Genprogramm.....	11
1.1.2 Kardiale Hypertrophie	12
1.2 MicroRNAs.....	19
1.2.1 Biogenese und Funktionsprinzipien.....	20
1.3 Die Rolle von miRNAs beim myokardialen Remodeling.....	23
1.3.1 MiRNAs in der Hypertrophie	25
1.3.2 MiRNAs in der Apoptose	27
1.3.3 Bedeutung der miRNAs für die Pathogenese von Fibrose	28
1.3.4 MiRNAs und Arrhythmogenität	29
1.4 MicroRNA-Microarray	30
1.5 Ziele dieser Arbeit.....	32
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	33
2.1.2 Chemikalien	34
2.1.3 Puffer und Lösungen	36
2.1.4 Medien	37
2.1.5 Kits.....	38
2.1.6 Enzyme	38
2.1.7 Plasmide	39

2.1.8	Antikörper	39
2.1.9	Bakterien.....	39
2.1.10	Oligonukleotide und Primer	39
2.1.11	Zelllinien.....	42
2.1.12	Versuchstiere.....	43
2.2	Methoden.....	44
2.2.1	Tierversuche	44
2.2.2	Zellkultur	45
2.2.3	Mikrobiologie.....	51
2.2.4	Molekularbiologie.....	52
2.2.5	Histologie	69
2.2.6	Statistik	71
3	Ergebnisse	72
3.1	Akuter biomechanischer Stress führt zur differentiellen Regulation von miRNAs ..	72
3.1.1	Analyse des miRNA-Expressionsprofils mittels Microarray	72
3.1.2	MiRNA-146a und miRNA-503 werden durch <i>Stretch</i> reguliert	75
3.2	Chronischer Stress <i>in vivo</i> verändert die miR-Expression.....	78
3.3	MiR-146a wird überwiegend im Herzen exprimiert.....	78
3.4	Kardiomyozyten und Fibroblasten haben eine ähnliche miR-Expression.....	80
3.5	Adenovirale Überexpression von miR-146a und miR-503.....	80
3.5.1	Validierung der Überexpression mittels <i>TaqMan</i> [®] Assay	81
3.6	<i>Stretch</i> führt zur Suppression der miR-146a-Expression	82
3.6.1	Adenovirale Überexpression und dynamischer <i>Stretch</i>	82
3.7	Die Überexpression von miR-146a führt zur Induktion des hypertrophischen Genprogramms <i>in vitro</i>	83
3.8	Biomechanischer Stress führt zur Regulation des Calcineurin-Signalwegs	84
3.9	<i>Knockdown</i> von miR-146a reduziert Hypertrophie <i>in vitro</i>	86
3.10	Target Scan	89
3.11	MiR-146a reguliert Stanniocalcin 1	91
3.12	Apelin ist eine Ziel-mRNA von miR-503	92
4	Diskussion.....	94
4.1	MiR-146a und miR-503 werden durch Stress reguliert.....	94

4.1.1	MicroRNA-146a beeinflusst das myokardiale Remodeling.....	94
4.1.2	Der Einfluss von miR-503 auf Herz-Kreislauf-erkrankungen	96
4.2	Induktion des hypertrophischen Genprogramms	97
4.3	MiR-146a hat eine hypertrophische Funktion in Kardiomyozyten	98
4.4	Regulierung der Hypertrophie durch miR-503	100
4.5	Therapiepotenzial von microRNAs	102
4.6	Ausblick	105
5	Zusammenfassung.....	106
6	Literaturverzeichnis	107
	Danksagung	120
	Lebenslauf.....	121
	Veröffentlichungen	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen des myokardialen Remodelings	10
Abbildung 2: Verschiedene Stimuli führen zu Hypertrophie oder Atrophie des Herzens	13
Abbildung 3: Darstellung der aktivierten Signalwege bei pathologischer kardialer Belastung	19
Abbildung 4: Biogenese und Funktionsprinzipien von microRNAs	23
Abbildung 5: Funktionelle Aufgaben von miRNAs im gesunden und kranken Herzen.....	25
Abbildung 6: Vereinfachtes Ablaufschema eines <i>Agilent</i> microRNA-Microarrays.....	31
Abbildung 7: Trennung der isolierten Zellen mittels eines Percoll-Gradienten.....	47
Abbildung 8: Schematische Darstellung der miRNA Inhibition.....	50
Abbildung 9: Volcano Plot zum Vergleich von 24 h Stretch vs. Kontrolle	74
Abbildung 10: MicroRNA-Expression nach 2, 6 und 24 h Stretch.....	76
Abbildung 11: Validierung der miRNA-Expression durch qRT-PCR nach 24 h Stretch	77
Abbildung 12: Regulation von miR-146a und miR-503 durch chronischen kardialen Stress <i>in vivo</i>	78
Abbildung 13: Multi-Gewebe qRT-PCR von adultem weiblichen Rattengewebe	79
Abbildung 14: Expression von miR-146a und miR-503 in Fibroblasten und Kardiomyozyten	80
Abbildung 15: <i>TaqMan</i> Assay zum Nachweis der adenoviralen Überexpression verschiedener Viruslasten von AdmiR-146a und AdmiR-503	81
Abbildung 16: Stretch über 24 h induziert eine Herunterregulation von miR-146a auch in adenoviral-überexprimierten Zellen	83
Abbildung 17: Induktion der pro-hypertrophen Gene ANF (<i>Nppa</i>) (A) und <i>Rcan1.4</i> (B) nach adenoviraler Überexpression und 24 h dynamischem, biomechanischen Stretch.....	84
Abbildung 18: Biomechanischer Stress und miR-503 Überexpression aktivieren gemeinsam das hypertrophische Genprogramm.....	85
Abbildung 19: <i>Knockdown</i> von miR-146a reduziert pro-hypertrophische Effekte	88
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Vorhersagemodelle mithilfe von Venn-Diagrammen	89
Abbildung 21: Apelin und Stanniocalcin 1 sind Zielstrukturen von miR-146a	92
Abbildung 22: Verifizierung der biostatistischen Zielgen-Vorhersage mithilfe von Luciferasekonstrukten	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Plasmide und Erklärung	39
Tabelle 2-2: Verwendete MicroRNA TaqMan® Assays zur qRT-PCR.....	39
Tabelle 2-3: MicroRNA-Sequenzen.....	40
Tabelle 2-4: Oligonukleotide für die Anlagerung und Ligation zur Generierung von pcDNA6.2-GW/miR Expressionsvektoren und der nachfolgenden Überexpression von microRNAs	40
Tabelle 2-5: Gewählte Primer und Sonden für die quantitative Realtime-PCR (Multiplex)	41
Tabelle 2-6: Sequenzen für die Klonierung potenzieller Zielstrukturen	42
Tabelle 2-7: Eingesetzte Zellzahlen in verschiedenen Kulturschalen.	47
Tabelle 2-8: Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA	57
Tabelle 2-9: Reaktionsansatz zur Denaturierung	58
Tabelle 2-10: Master-Mix für die reverse Transkription	58
Tabelle 2-11: Thermocycler-Protokoll:	58
Tabelle 2-12: Reaktionsansatz für RT-Master-Mix	59
Tabelle 2-13: Thermocycler-Protokoll	59
Tabelle 2-14: Reaktionsansatz für Polymerase-Kettenreaktion	60
Tabelle 2-15: Amplifizierungsprotokoll für Polymerase-Kettenreaktion	60
Tabelle 2-16: Reaktionsansatz für Multiplex quantitative Realtime-PCR	61
Tabelle 2-17: Amplifizierungsprotokoll für Multiplex qRT-PCR	61
Tabelle 2-19: PCR-Protokoll.....	62
Tabelle 2-20: Reaktionsansatz für CIP Master Mix	67
Tabelle 2-21: Reaktionsansatz für Ligation Master Mix	67
Tabelle 2-22: Reaktionsansatz für Hybridisierungs-Mix	68
Tabelle 2-23: Waschprotokoll für Microarray-Detektionsplatte.....	69
Tabelle 3-1: Differentielle Regulation von miRNAs nach 2 h Stretch	73
Tabelle 3-2: Differentielle Regulation von miRNAs nach 6 h Stretch	73
Tabelle 3-3: Differentielle Regulation von miRNAs nach 24 h Stretch	73
Tabelle 3-4: Vorhersage von microRNA-mRNA Interaktionen	91

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AdmiR	Adenoviraler Vektor codierend für miRNA
ADS	Puffer zur Isolation von ventrikulären Rattenkardiomyozyten
Ad	Adenovirus
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
AntimiR	Anti-microRNA
APJ	Apelin-Rezeptor
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CIP	Calf Intestine Phosphatase
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
Ctrl	Kontrolle
Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
Engl.	Englisch
FCS	Fötales Kälberserum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GATA4	GATA binding protein 4
h	Stunde(n)
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
ifu	infektiöse Einheiten
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Lysogeny broth
M	Molar
MEF2	Myocyte Enhancer Factor-2
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
miRNA	microRNA
MHC	Myosin Schwereketten
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NCS	Neugeborenes Kälberserum
NFAT	Nuclear factor of activated T-Cells
NFκB	Nuclear factor kappa-B
NRVCM	Neonatale ventrikuläre Rattenkardiomyozyten
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
Rcan1.4	Regulator of Calcineurin 1-4
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde(n)
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler
SHG	Second Harmonic Generation
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure
sog.	sogenannt
Taq	Thermus aquaticus
TAC	Transversale Aortale Konstriktion
TNF	Tumornekrosefaktor
TRBP	TAR-RNA-Bindeprotein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
vs	versus
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WHO	World Health Organisation
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Schlaganfall und Herzinsuffizienz sind, zusammengefasst als Herzkreislauferkrankungen, mit einem Anteil von 38,9% die häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2014). Infolge der alternden Population, Nikotin- und Alkoholabusus, Übergewicht und Bewegungsarmut sind kardiovaskuläre Erkrankungen auch weltweit ursächlich für die höchste Mortalität mit 17,5 Millionen Todesfällen im Jahr 2012 (World Health Organization, 2014).

Dabei spielt die Herzinsuffizienz, als gemeinsamer Endpunkt vieler, pathogenetisch verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen, eine prominente Rolle.

Das Syndrom „Herzinsuffizienz“ charakterisiert sich pathophysiologisch durch eine unzureichende Auswurfleistung des Herzens und einer dadurch verursachten Minderperfusion der Organe. Mit einer 5-Jahres-Mortalität von ~50% und einer weltweit steigenden Inzidenz und Prävalenz ist die Herzinsuffizienz im Fokus aktueller Forschung sowie neuer Therapieansätze (Conrad et al., 2017).

Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz können akute von chronischen Ursachen unterschieden werden. Akuter kardialer Stress, verursacht durch eine akute Ischämie z.B. im Rahmen eines Myokardinfarktes, geht mit einem unmittelbaren Verlust der Pumpkraft einher. Infolge des Infarktes entwickelt sich eine Myokardnarbe und je nach Größe kann es zu einer Beeinträchtigung des Herzens durch eine ischämische Kardiomyopathie (ICM) kommen. Die ICM ist durch eine systolische und diastolische Funktionseinschränkung gekennzeichnet, daraus resultiert eine Risikoerhöhung für den plötzlichen Herztod durch maligne ventrikuläre Arrhythmien.

Chronischer kardialer Stress wird durch mechanische Beanspruchung in Form von Druck- und/oder Volumenbelastung hervorgerufen. Druckbelastung entsteht u. a. durch arterielle Hypertonie oder Herzklappenstenosen (Sandler und Dodge, 1963). Eine Volumenbelastung hingegen kann u. a. durch eine Herzklappeninsuffizienz verursacht werden. Die chronische Druckbelastung führt in erster Linie zu ventrikulärer Wandverdickung und anschließender konzentrischer Hypertrophie, wobei dauerhafte Volumenbelastung zur Erhöhung des Kammervolumens, Ausdünnung der Ventrikelwand und daraus folgender exzentrischer Hypertrophie führt (Wakatsuki et al., 2004).

Der akut oder chronisch entstehende biomechanische Stress auf die Zellen fordert eine Anpassung an die veränderten Umgebungsfaktoren (Kultz, 2005). Die kardiale Plastizität

charakterisiert sich hier durch einen komplexen Adaptationsprozess (Abbildung 1, S. 10). Apoptose, Fibrose, Hypertrophie, verminderte Kapillardichte, veränderte elektromechanische Koppelung und Insulinresistenz sind maladaptive Prozesse des Herzens und werden als sog. myokardiales Remodeling bezeichnet (Hill und Olson, 2008, Frey et al., 2012, Cohn et al., 2000). Diese Antwort des Herzens bewirkt eine kurzfristige Aufrechterhaltung der Pumpkraft, insbesondere durch die Kompensation der erhöhten Wandspannung. Langfristig jedoch können diese maladaptiven Vorgänge zu kardialer Dysfunktion, Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod führen (Kehat und Molkenitin, 2010).

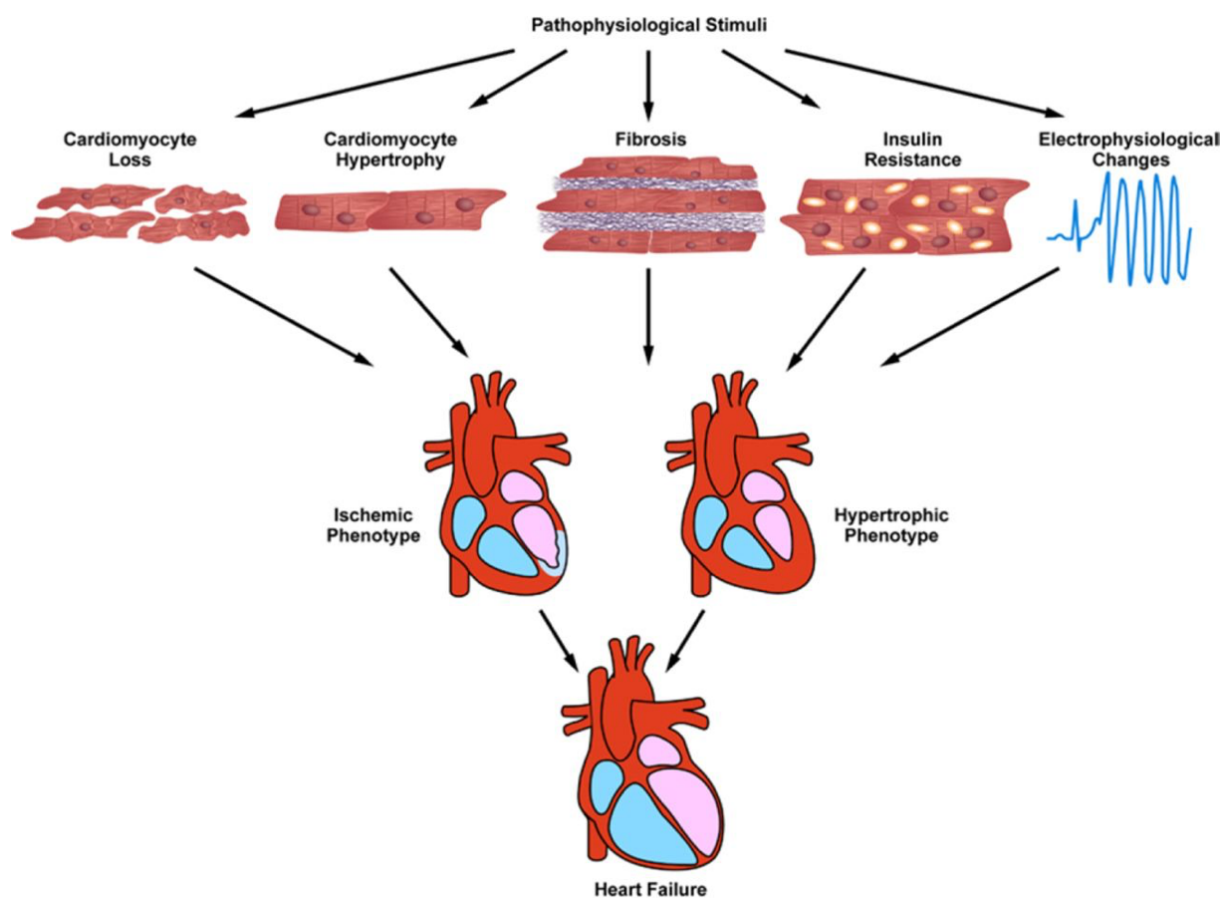


Abbildung 1: Mechanismen des myokardialen Remodelings

Pathophysiologische Stimuli wie Ischämie/Reperfusion oder biomechanischer Stress führen über verschiedene zelluläre und molekulare Prozesse zum myokardialen Remodeling. Durch Nekrose, Apoptose und Autophagie kommt es zu einem Verlust von Kardiomyozyten und neurohumorale und mechanische Auslöser lassen die Zellen hypertrophieren. Die Akkumulation von Extrazellulärmatrix führt zu einer irreversiblen Fibrose, zudem können metabolische Veränderungen sowie Insulinresistenzen auftreten. Veränderungen der elektromechanischen Transduktion kumulieren in einem proarrhythmischen Phänotyp. Abbildung entommen aus *Pathological Ventricular Remodeling* (Burchfield et al., 2013).

Dabei stellt die Hypertrophie eine der ersten und gravierendsten Veränderungen des Remodelings dar. Daraus resultierend kommt es zu einer Verminderung der Auswurfraction (EF, Ejektionsfraction) mit dem klinischen Bild der Herzinsuffizienz (Frey et al., 2004). Pathophysiologisch kommt es zur Größenzunahme der Kardiomyozyten, sowie zu Veränderungen des Zytoskeletts und der Genexpression (Frank et al., 2008, Hein et al., 2003).

Trotz umfangreicher Forschung und großen Erkenntnisfortschritten auf diesem Gebiet bleiben viele Bereiche der zugrundeliegenden Signaltransduktion unzureichend verstanden. Ein Fokus aktueller Forschung sind microRNAs (miRs) und ihre differentielle Genregulation im kranken Herzen (s. Abschnitt 1.2, S. 19). Sie scheinen einen großen regulatorischen Einfluss sowohl auf kardiale Signalwege im gesunden Herzen zu nehmen als auch bei der Modulation des kardialen Remodelings und der Entstehung einer Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle zu spielen (Small und Olson, 2011). Durch die Untersuchung der Auswirkungen von microRNAs auf molekulare Signalwege, könnten sich dabei neue Therapieoptionen ergeben, wie beispielsweise durch die Modulierung von miR-34 und damit verbesserter Regeneration nach Myokardinfarkt in neonatalen Rattenherzen kürzlich gezeigt werden konnte (Yang et al., 2015).

1.1.1 Das hypertrophische Genprogramm

Ein erster Schritt der kardialen Hypertrophie ist die wiederkehrende Expression von Genen, die während der Embryogenese von Bedeutung sind und im Erwachsenenalter überwiegend nicht- oder wenig exprimiert werden. Diese sog. Reinduktion von fetalen Genen spielt beim Progress des myokardialen Remodelings auf molekularer Ebene eine übergeordnete Rolle (Olson, 2004). Prominenteste Vertreter des hypertrophischen Genprogramms sind die natriuretischen Peptide ANF (Atrialer natriuretischer Faktor) und BNP (Natriuretisches Peptid Typ B), α -skeletal Actin sowie β -MHC (engl. *myosin heavy chain*) (Chien et al., 1991). Allerdings hängen diese Genexpressionsänderungen mit der Spezies und dessen Entwicklungsstadium zusammen, weshalb es nicht als ein einheitliches hypertrophisches Genogramm betrachtet werden kann (Dorn et al., 2003).

In ausgewachsenen Nagetieren wird beispielsweise überwiegend α -MHC (die schnell kontrahierende Isoform) exprimiert, obgleich β -MHC (die langsam kontrahierende Isoform) während der embryonalen Entwicklung ausgebildet wird. ANF ist ein Peptidhormon, dass durch erhöhte Dehnungsreize aus den Myozyten des Vorhofs freigesetzt wird und eine Steigerung der Harnausscheidung bewirkt. Zudem besitzt ANF potente natriuretische,

diuretische, vasodilatatorische und das Renin-Angiotensin-System supprimierende Eigenschaften (Nishikimi et al., 2006). ANF-defiziente Mäuse entwickeln durch erhöhte Volumenbelastung eine linksventrikuläre Hypertrophie (Mori et al., 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die anti-hypertrophische Wirkung von ANF unabhängig von seinem blutdrucksenkenden Effekt ist, indem das ANF-Gen in Mäusen abgeschaltet wurde (engl. *Knockout*) und mit dem Wildtyp verglichen wurde (Feng et al., 2003). ANF ist also ein Gegenregulator der pathologischen Hypertrophie, jedoch reicht die alleinige Wirkung nicht aus, um den hypertrophen Umbau zu verhindern (Barry et al., 2008).

BNP ist ein überwiegend in den Ventrikeln gebildetes Peptid, dessen Plasma-Konzentration sich bei Herzinsuffizienz und akutem Myokardinfarkt erhöht. BNP-*Knockout*-Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen starke fibrotische Veränderungen der Ventrikel nach erhöhter Druckbelastung, wobei eine Hypertrophie des Herzens ausblieb. Dies stellt BNP als Teil des hypertrophischen Genprogramms, anti-fibrotischen Einflussfaktor und möglichen Regulator des myokardialen Remodelings in das Interesse der Forschungsaktivitäten (Tamura et al., 2000).

Das hypertrophische Genprogramm ist mit seinen prominentesten Vertretern ANF und BNP, sowohl bei der Untersuchung der Konsequenzen von erhöhter Druck- und/oder Volumenbelastung als auch bei der Überprüfung von Therapiestrategien ein verlässlicher Marker für die Reinduktion des fetalen Genprogramm.

1.1.2 Kardiale Hypertrophie

Ein früher Schritt der kardialen Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen ist die Hypertrophie. Dabei ist grundsätzlich eine physiologische- von einer pathologischen Hypertrophie zu unterscheiden. So kann es infolge von körperlichem Training, Wachstum oder Schwangerschaft zu einer Zunahme der linksventrikulären Masse von bis zu 60% kommen. Diese Prozesse sind vollständig reversibel und nicht maladaptiv (Fagard, 2003). Konträr zur pathologischen Hypertrophie bleibt die Reaktivierung des hypertrophischen Genprogramms aus und die MHC-Isoformen werden gegensätzlich reguliert (Frey und Olson, 2003). In diesen Fällen entwickelt sich keine myokardiale Fibrose und es besteht kein erhöhtes Risiko für kardiale Arrhythmien, kardiale Dysfunktion oder die Entstehung einer Herzinsuffizienz (Kehat und Molkentin, 2010, Lorell und Carabello, 2000).

Pathologische Stimuli wie neurohumorale Aktivierung, gesteigerte hämodynamische Belastung oder Myokardischämien induzieren eine pathologische Hypertrophie, mit

Neuorganisation der Sarkomere, Fibrosierung und elektromechanischer Veränderung (Hill und Olson, 2008).

Atrophie wiederum ist die Abnahme der Herzmasse bei dauerhafter Bettruhe, anhaltender Schwerelosigkeit oder mechanischer Entlastung z.B. durch ein ventrikuläres Unterstützungssystem (engl. *left ventricular assist device*, LVAD) (Razeghi und Taegtmeier, 2006). Atrophische Herzen können ihre Masse bis zu 30% reduzieren, wodurch das Herz prinzipiell einen dynamischen Wachstumsbereich von annähernd 100% hat (Hill und Olson, 2008).

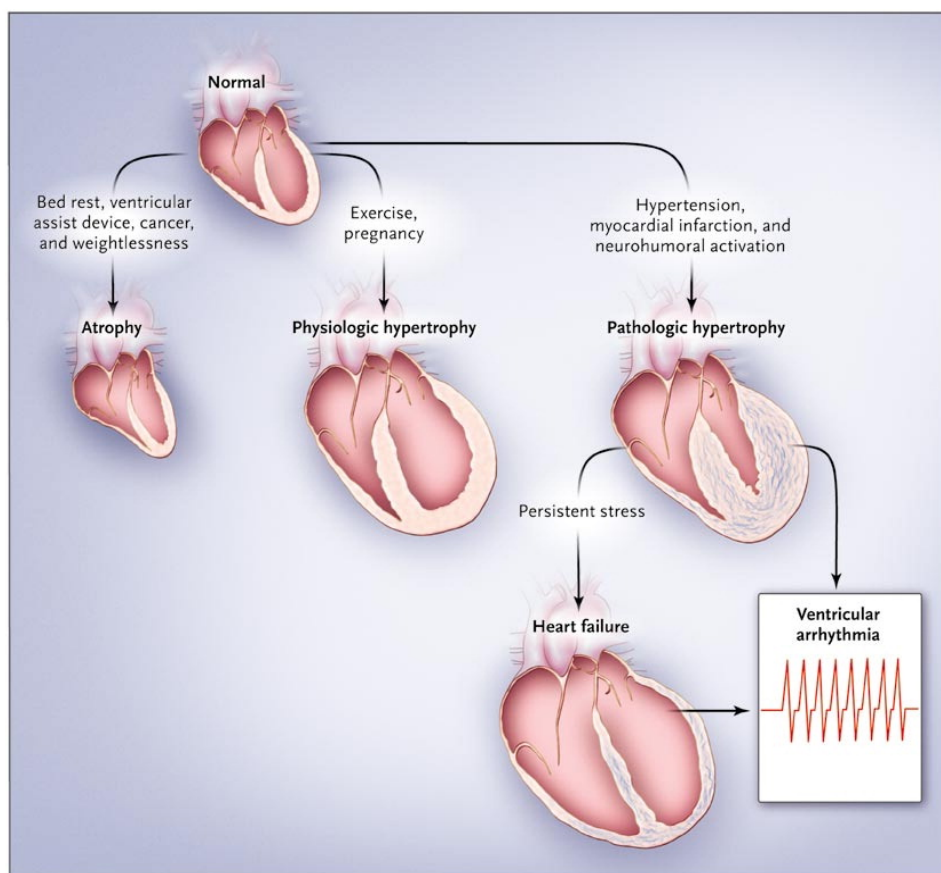


Abbildung 2: Verschiedene Stimuli führen zu Hypertrophie oder Atrophie des Herzens

Abhängig vom Stimulus entwickelt das Herz eine physiologische oder pathologische Hypertrophie oder Atrophie. Chronischer Stress, wie beispielsweise arterielle Hypertonie, führt in der Folge zu ventrikulärer Dilatation und/oder systolischer Dysfunktion. Damit einhergehend steigt das Risiko von Herzinsuffizienz und malignen ventrikulären Arrhythmien. Abbildung entnommen aus *Cardiac plasticity* (Hill und Olson, 2008).

1.1.2.1 Adaptive Hypertrophie

Die Größenzunahme des Herzens als Antwort auf physiologische Reize wie Wachstum, körperliches Training oder Schwangerschaft ist verbunden mit der Aufrechterhaltung einer normalen kardialen Funktion und wird als physiologische oder „adaptive“ Hypertrophie bezeichnet (Fagard, 2003). Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zunahme des Körpergewichtes und des Herzgewichtes. Interessanterweise ist die Gewichtszunahme beim physiologischen Wachstum auf die Vergrößerung der Kardiomyozyten zurückzuführen und es kommt zu einer bis zu 3-fachen Vergrößerung des Kardiomyozyten-Durchmessers vom Neugeborenen zum Erwachsenen (Dorn, 2007). Dabei unterscheidet sich die physiologische wesentlich von der pathologischen Hypertrophie, welche bei Patienten mit arterieller Hypertonie, Klappenvitien oder Kardiomyopathien entsteht. Die physiologische Hypertrophie entwickelt sich durch definierte Signalwege zwischen Wachstumshormonen und Mechanosensoren. Die physiologische Hypertrophie wird beispielsweise nicht von einer Akkumulation myokardialen Kollagens begleitet (Dorn, 2007). Abhängig vom Stimulus, wie zum Beispiel physiologisches Training oder pathologische Druckbelastung wird zudem die Expression der α - und β -MHC Isoformen gegensätzlich reguliert (Shiojima et al., 2005). Außerdem interagieren Wachstumshormone wie Insulin, IGF-1 (engl. *Insulin-like growth factor 1*) oder Schilddrüsenhormone mit Mechanosensoren und induzieren gemeinsam über den PI3K/Akt-Kinasen-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinasen) die physiologische kardiale Hypertrophie (Lyon et al., 2015, McMullen et al., 2004, Belke et al., 2002).

1.1.2.2 Maladaptive Hypertrophie

Obwohl es Anhaltspunkte gibt, dass ein kleiner Teil der Zellen im Ventrikel die Fähigkeit besitzt, wieder in den Zellzyklus einzutreten (Porrello et al., 2011), ist der Großteil der Kardiomyozyten postmitotisch. Somit können die Zellen überwiegend mit Hypertrophie, Atrophie oder Apoptose auf Stress antworten. Im Kontext vieler pathologischer Stimuli kommt es zu einer hypertrophischen Transformation der Herzmuskelzellen. Bedeutendste Ursachen der maladaptiven (pathologischen) Hypertrophie sind arterielle Hypertonie, Adipositas, Klappenvitien, Myokardischämien, hereditäre Mutationen in kardialen Proteinen und neurohumorale Aktivierung (Wakatsuki et al., 2004). Infolgedessen kommt es zu kardialen Anpassungsvorgängen wie Kontraktilitätsverminderungen, einer Reorganisation der Sarkomerstrukturen, Veränderungen im Calcium-Stoffwechsel, Verlust von Kardiomyozyten mit fibrotischem Umbau, systolischer oder diastolischer Dysfunktion und Veränderungen der elektromechanischen Transduktion (Kehat und Molkentin, 2010).

Dabei ist die hypertrophische Transformation der Kardiomyozyten nicht nur einfach ein Wachstum der Zellen, sondern vielmehr ein umfassender Umbauprozess der Zellarchitektur und -mechanismen. Ein Teil dieses Prozesses ist die Dedifferenzierung der Zelle und einer Reaktivierung von zahlreichen transkriptionellen, elektromechanischen und metabolischen Signalwegen, die während der Zellentwicklung eine Rolle spielten (Shimizu und Minamino, 2016). Die kardiale Hypertrophie kann als kompensiertes Stadium eines fortschreitenden Prozesses verstanden werden (kompensierte Hypertrophie), der letztendlich zur Herzinsuffizienz führt (Frey et al., 2004).

Weitere komplex miteinander verbundene inter- und intrazelluläre Signalkaskaden regulieren diese hypertrophen Umbauprozesse und werden nachfolgend dargestellt.

Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Adrenorezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die maßgeblich an der Vermittlung pathologischer kardialer Hypertrophie mitwirken. Über diese Rezeptoren haben Katecholamine, Endothelin-1 und Angiotensin II Einfluss auf die kardiale Funktion, aber auch auf den Stoffwechsel und den Gefäßtonus (Esposito et al., 2001). Es existieren α - und β -adrenerge Rezeptoren mit jeweils mehreren Subtypen, deren wichtigste intrazelluläre Signalvermittlung über Proteinkinase A ($G_{\alpha s}$ -gekoppelt) und Proteinkinase C ($G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -gekoppelt) stattfindet. Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt über die endogenen Liganden (Adrenalin, Noradrenalin, Endothelin-1 und Angiotensin II), wobei einige Agonisten an mehreren Rezeptorsubtypen binden können (Rockman et al., 2002). In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass adrenerge Signalwege einen zentralen Einfluss auf die kardiale Hypertrophie haben: Transgene, $\beta 1$ -Adrenorezeptor-überexprimierende Mäuse zeigten initial eine gesteigerte Kontraktilität in Zusammenhang mit einer kardiomyozytären Hypertrophie und entwickelten daraufhin eine schwere Herzinsuffizienz (Engelhardt et al., 1999). Die myokardiale Überexpression von $G_{\alpha s}$ in transgenen Mäusen führte zu einer erhöhten Wirksamkeit von Noradrenalin am Herzen und daraus resultierend zu einer dauerhaft gesteigerten Inotropie und Chronotropie. Dies führte konsekutiv zu kardialer Hypertrophie und Fibrose (Iwase et al., 1996). Transgene Mäuse, die ein $G_{\alpha q}$ -hemmendes Peptid exprimierten, zeigten nach Aortenligatur (Nachlasterhöhung durch operativ angelegte Aortenstenose, engl. *transverse aortic constriction*) eine bessere kardiale Funktion als Tiere der Wildtyp-Kontrollgruppe, obwohl bei den transgenen Mäusen die kardiale Hypertrophie unterbunden und die Wandspannung erhöht war (Esposito et al., 2002). Jedoch können auch diese Mäuse nach PE-, Ang II- oder Serotonin-Infusion eine kardiale Hypertrophie entwickeln. Diese kardiale Hypertrophie wird über die Aktivierung von

vaskulären $G_{\alpha q}$ -Rezeptoren vermittelt und nicht über die direkte Stimulation kardialer Rezeptoren (Keys et al., 2002). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion durch die Vermittlung von neurohumoralen Faktoren und der damit verbundenen Entwicklung kardialer Hypertrophie.

Mitogen-Activated Protein-Kinasen (MAPK)

Die MAPK-Kaskaden stellen ein komplexes Netzwerk aus sich hierarchisch aktivierenden Kinasen dar. Mittels dieser Signaltransduktionswege können die MAP-Kinasen sowohl Aktivator, Repressor als auch Modulator kardialer Hypertrophie sein. Es gibt drei Subfamilien: *Extracellular signal-regulated kinases* (ERK), *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) und p38-MAPK, die jeweils spezifische Ketten von Kinasen aktivieren. Die initiale Aktivierung erfolgt unter anderem durch G-Proteine, Tyrosinkinase-Rezeptoren und gp130-Rezeptoren (Heineke und Molkentin, 2006). Die spezifische Inhibition der MAPK-Kaskaden p38 und ERK1/2, sowie der JNK1/2 mithilfe einer Überexpression der MAPK-Phosphatase 1 (MKP-1) verhinderte die Progression von kardialer Hypertrophie nach Aortenligatur und Katecholamin-Infusion (Bueno et al., 2001). Weiterhin zeigte sich eine gesteigerte Aktivität von ERK1/2 und p38 nach chronischer Druckbelastung und akuter mechanischer Dehnung der Zellen (engl. *stretch*) (Takeishi et al., 2001). Der Stretch von Kardiomyozyten ist ein weit verbreitetes *in vivo* Modell zur Simulation einer erhöhten Druckbelastung und Stimulation von kardialem Remodeling durch biaxiale Dehnung der Zellen (Frank et al., 2008). In einem *in vivo* Modell wurde an Mäusen gezeigt, dass ERK1/2 hinreichend ist, um eine kardiale Hypertrophie auszulösen. Nach Überexpression von MEK1, einer MAPK-Kinase welche ausschließlich ERK1/2 aktiviert, entwickelten die Tiere eine konzentrische Hypertrophie, ohne Zeichen einer Kardiomyopathie. Überraschenderweise konnte eine verbesserte linksventrikuläre Funktion beobachtet werden, was nahelegt, dass ERK1/2 ein Mediator von kompensierter Hypertrophie ist (Bueno et al., 2000). *In vitro* Untersuchungen haben unterdessen gezeigt, dass der hypertrophe Umbau durch ein koordiniertes Zusammenwirken der Calcineurin-NFAT- und MEK1-ERK1/2-Signalwege reguliert wird (Sanna et al., 2005). JNK und p38 besitzen, gegensätzlich zu ERK1/2, eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung einer Hypertrophie. Dieser Effekt kann durch die antagonistische Wirkung auf den Calcineurin-NFAT-Signalweg erklärt werden, indem JNK und p38 imstande sind, spezifische NFAT-Transkriptionsfaktoren direkt zu phosphorylieren (Molkentin, 2004). Gesteigerte Druck- und Volumenbelastung führten zu einer differentiellen Regulation von JNK und p38. Chronische Druckbelastung durch Aortenligatur führte zu einer Induktion von JNK, wohingegen p38 nicht reguliert wurde (Molkentin, 2004). Erhöhte Volumenbelastung

wiederum erhöhte die p38-Aktivität ohne Beeinflussung von JNK und ERK. Das legt nahe, dass unterschiedliche hämodynamische Belastungen zu verschiedenen Genexpressions-Mustern führen (Sopontammarak et al., 2005). Die hier dargestellten Interaktionen der MAP-Kinasen im Rahmen der kardialen Hypertrophie beinhalten eine ausgedehnte Interaktion mit anderen Signalwegen, wobei die MAP-Kinasen eine hemmende als auch eine aktivierende Rolle einnehmen können.

Calcineurin-NFAT-Signalweg

Eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der pathologischen Myokardhypertrophie nimmt die Calcium/Calmodulin-abhängig regulierte Phosphatase Calcineurin ein. Diese Serin/Threonin-Phosphatase ist ein Heterodimer und besteht aus einer katalytischen Untereinheit Calcineurin A (CnA) und einer kleinen, regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (CnB) (Molkentin, 2000). Durch lokal erhöhte Calciumkonzentrationen wird Calmodulin teilaktiviert und bindet an der katalytischen Untereinheit CnA. Das hierdurch aktivierte Calcineurin dephosphoryliert Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie im Zytoplasma (*nuclear factor of activated T-cells*), wodurch deren nukleäres Importsignal freigelegt wird (Li et al., 2010). NFAT transloziert daraufhin in den Zellkern und aktiviert in Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie GATA4 oder MEF2 das hypertrophische Genprogramm (Hogan et al., 2003).

Die konstitutive Überexpression von Calcineurin in transgenen Mäusen führt zu einer ventrikulären Dilatation und daraus resultierender Herzinsuffizienz (Molkentin et al., 1998). Die pharmakologische Inhibition von Calcineurin durch subkutane Injektion von Cyclosporin A (CsA) wiederum hemmt die Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie *in vivo* (Molkentin et al., 1998). Neben Cyclosporin A wurde zudem beobachtet, dass Tacrolimus (FK506) die Calcineurin-Aktivität inhibiert. Diese beiden Substanzen werden als Immunsuppressivum nach Organtransplantation eingesetzt, wobei der Mechanismus der Inhibierung von Calcineurin lange unklar war. Später konnte gezeigt werden, dass sie Calcineurin nicht direkt inhibieren, sondern an endogenen Immunophilinen binden, Cyclophilin A und FKBP12 (Liu et al., 1991).

Im Gegensatz dazu ist die Calcineurin-Aktivität in Calcineurin A β -defizienten Mäusen um bis zu 80% herabgesetzt. Calcineurin A β (CnA β) stellt die am häufigsten exprimierte Isoform im Herzen dar. Nach Aortenligatur, Ang II- oder Isoproterenol-Infusion zeigten diese transgenen Tiere keine hypertrophe Antwort bei erhaltener linksventrikulärer Funktion. Dies legt nahe, dass Calcineurin ein notwendiger Regulator von myokardialer Hypertrophie *in vivo* ist (Bueno et al., 2002). Auch *in vitro* kommt es zu einer gesteigerten Calcineurin-Aktivität durch

neurohumorale Stimuli kardialer Hypertrophie wie Angiotensin II, Phenylephrin oder Endothelin-1 (Zhu et al., 2000, Taigen et al., 2000).

Hier scheint Calcineurin insbesondere bei der Vermittlung einer pathologischen Hypertrophie bedeutsam zu sein, wobei die Aktivität dieser Phosphatase bei der Entwicklung einer physiologischen Hypertrophie, durch z.B. sportliche Belastung oder Schwangerschaft, nicht erhöht ist (Wilkins et al., 2004).

Mittlerweile ist eine Vielzahl an Regulationsmechanismen bekannt, welche Einfluss auf den Calcineurin-Signalweg nehmen. Der *regulator of calcineurin (Rcan)* hemmt die Calcineurin-Aktivität und ist Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Dabei steht eines der Genprodukte, *Rcan1.4* (auch MCIP1.4), mit einer hohen Anzahl an NFAT-Bindungsstellen unter direkter Kontrolle durch Calcineurin und wird durch aktiviertes Calcineurin und anschließender NFAT-Dephosphorylierung vermehrt transkribiert (Yang et al., 2000). Bei transgenen Mäusen, welche *Rcan1* überexprimierten, wurde eine Hemmung des Calcineurin-Signalwegs sowie eine Attenuierung kardialer Hypertrophie *in vivo* beobachtet (Rothermel et al., 2001). Gegensätzlich zu dieser Beobachtung entwickelte sich beim kardialen *Knockout* von *Rcan1* keine Exazerbation, sondern eine paradoxe Verminderung der Hypertrophie nach Druckbelastung oder adrenerger Stimulation (Vega et al., 2003). *Rcan* hat somit keine ausschließlich inhibierende Funktion. Die Komplexität der Regulation lässt sich hier durch die NFAT-Konzentration im Zellkern erklären: Erst beim Überschreiten eines Schwellenwertes entfaltet *Rcan* seine inhibierende Wirkung (Shin et al., 2006). *Shin et al.* analysierten hierbei *in vivo* und *in vitro* Studien mittels Computersimulationen (*in silico*).

Unsere Arbeitsgruppe konnte mit *Lmcd1/Dyxin* ein neues Protein identifizieren, dass sowohl durch Stretch als auch Phenylephrin-Stimulation in Kardiomyozyten heraufreguliert wird. In weitergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *Lmcd1/Dyxin* über eine Aktivierung von *Rcan1.4* eine myokardiale Hypertrophie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* induziert. Der Knockdown wiederum verhindert die Entstehung einer myokardialen Hypertrophie (Frank et al., 2010). *Bernt et al.* konnten kürzlich zeigen, dass mit SUMO2 (engl. *Small ubiquitin-related modifier 2*) ein weiterer direkter Cn-NFAT Aktivator existiert. Die SUMO2-vermittelte Aktivierung des Cn-NFAT-Signalweges induziert einen hypertrophen Phänotyp in Kardiomyozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Zudem wurde eine erhöhte SUMO2-vermittelte Sumoylierung bei humanen Kardiomyopathie Patienten sowie in Kardiomyopathie Mausmodellen beobachtet (Bernt et al., 2016).

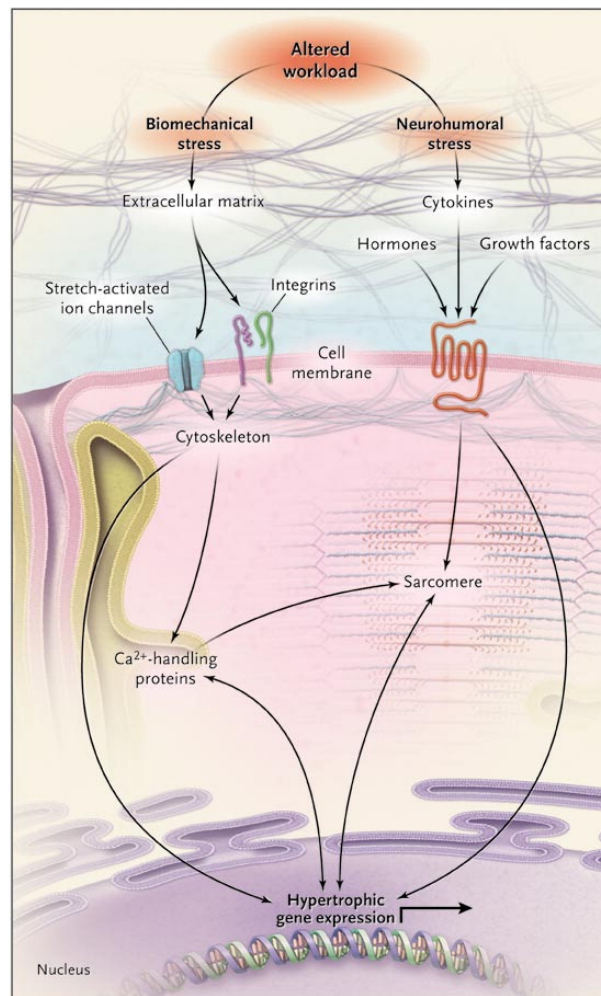


Abbildung 3: Darstellung der aktivierten Signalwege bei pathologischer kardialer Belastung

Die komplexe Interaktion der biomechanischen und neurohumoralen Antwort auf kardialen Stress führt letztendlich zur hypertrophischen Genexpression und zum Wachstum der Zelle. Abbildung entnommen aus *Cardiac plasticity* (Hill und Olson, 2008).

1.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nichtcodierende, einzelsträngige RNAs, welche sich an komplementäre mRNA-Sequenzen anlagern und dadurch die Proteinexpression hemmen (Bartel, 2004, Lee et al., 1993). Einzelne miRNAs können hunderte Ziel-mRNAs regulieren und damit Einfluss auf große Teile komplexer, intrazellulärer Netzwerke nehmen. Demnach können Veränderungen der miRNA-Expression oder -Funktion schwerwiegende Auswirkungen auf den zellulären Phänotyp haben. Abhängig von der Expression einer miRNA und seiner Zielstrukturen, als auch dem physiologischen Zustand einer Zelle, scheinen miRNAs die Feinabstimmung der Genexpression zu übernehmen (Liu und Olson, 2010). Bei pathophysiologischem Stress oder Erkrankungen sind die funktionellen Einflüsse

von miRNAs erhöht, was sie als potentielle Kandidaten für therapeutische Schlüsselagenzien attraktiv macht.

Gegenwärtige miRNA-Datenbanken, wie *miRBase*, weisen aktuell 1881 *precursor*-miRNAs und mehr als 2500 reife miRNAs aus (Kozomara und Griffiths-Jones, 2014). Es wird vermutet, dass miRNAs die Expression von bis zu 50% der humanen Gene regulieren (Ohtani und Dimmeler, 2011, Huntzinger und Izaurralde, 2011, Schmiedel et al., 2015).

Der erste humane Zusammenhang zwischen miRNAs und Herz-Kreislauf-erkrankungen wurde 2006 gestellt, indem gezeigt werden konnte, dass miRNA-Expressionsmuster mit der Entwicklung von Herzinsuffizienz und kardialer Hypertrophie korrelieren (van Rooij et al., 2006). Seitdem wurde evident, dass die differentielle Regulation von miRNAs auch bei embryonalen Entwicklungsdefekten (Carraro et al., 2009) und der Onkogenese (Lee und Dutta, 2009) eine entscheidende pathogenetische Rolle spielt.

Die Möglichkeit, die miRNA-Expression und -Funktion durch systemische oder lokale Bereitstellung von miRNA-Inhibitoren (*AntimiRs*, *AntagomiRs*) oder miRNA-Imitatoren (*Mimics*) therapeutisch zu modifizieren sowie die erste erfolgreiche miRNA-Therapie zur Suppression des Hepatitis-C-Virus, ermöglichen die Entwicklung einer neuen Klasse von Therapeutika auf miRNA-Basis (Lanford et al., 2010).

1.2.1 Biogenese und Funktionsprinzipien

Reife miRNAs sind hoch konservierte, ~22 Nukleotide lange RNAs, welche die posttranskriptionelle Genexpression regulieren.

Sie werden von der RNA-Polymerase II als lange Vorläufer-RNA, sog. *primary miRNAs* (pri-miRNAs), transkribiert. Diese bis zu 3000 Nukleotide lange pri-miRNA kann dabei für mehrere miRNAs codierend sein und wird sequenziell im Zellkern und Zytoplasma prozessiert. Im Zellkern wird mithilfe des Mikroprozessor-Komplexes, bestehend aus der RNase III *Drosha* und dem RNA bindenden Protein *DGCR8* (engl. *DiGeorge syndrome critical region 8*), die pri-miRNA zu einer *precursor miRNA* (pre-miRNA) geschnitten. Diese ~70 Nukleotide lange pre-miRNA formt dabei eine charakteristische Haarnadelstruktur (engl. *hairpin*), welche durch DNA-Duplexbildung eine Schleife bildet und somit zu Teilen doppelsträngig vorliegt. Die pre-miRNA wird aktiv in das Zytoplasma exportiert und dort durch die RNase III *Dicer* und dem dsRNA-Bindeprotein *TRBP* zu einer 17-24 nt langen doppelsträngigen miRNA (miRNA:miRNA*) geschnitten (Bartel, 2009). Diese miRNA-Duplex wird mithilfe von *Dicer* und *TRBP* entwunden und zum Einzelstrang prozessiert. Dabei wird die miRNA mit der geringeren Thermostabilität am 5'-Ende als erstes bearbeitet und somit

als Führungsstrang (engl. *guide strand*) bezeichnet. Die als Begleitstrang (engl. *passenger strand*) bezeichnete miRNA* wird häufig degradiert. Mittlerweile wurde jedoch bekannt, dass die miRNA* auch regulatorische Funktionen übernehmen kann, weshalb die Nomenklatur zunehmend zu miRNA-5p (vom 5'-Strang) und miRNA-3p (vom 3'-Strang) geändert wird (Ebelt et al., 2008).

Im Zytoplasma findet die Bindung der reifen miRNA mit der komplementären mRNA in einem Multiprotein-Komplex, dem *RNA-induced silencing complex (RISC)*, statt. Dabei wird die miRNA in den *RISC* aufgenommen und die Ziel-mRNA (engl. *target mRNA*) durch perfekte oder inkomplett perfekte Basenpaarung identifiziert (Ameres et al., 2007, Lai, 2004). Entscheidend für die mRNA-Identifikation ist die sog. „Saat“-Sequenz (engl. *seed sequence*), eine 6-8 Basen lange Sequenz am 5'-Ende der miR (Lewis et al., 2003). Diese Seed-Sequenz ist komplementär zu einem Abschnitt der mRNA, meistens innerhalb der 3'-UTR (engl. *untranslated region = nicht translatierte Region*) (Brennecke et al., 2005, Xie et al., 2005). Kommt es nun zu einer perfekt komplementären Basenpaarung, wird der *RISC* gebildet, der dann den miRNA-mRNA-Komplex zerschneidet und somit die mRNA degradiert. Bei nicht perfekt komplementärer Basenpaarung kommt es zu einer translationen Repression durch Hemmung der ribosomalen Aktivität (Martinez und Tuschl, 2004, Valencia-Sanchez et al., 2006). Nach aktuellem Stand der Wissenschaft wird durch die miRNA-mRNA-Interaktion überwiegend die Translation inhibiert (Cloonan, 2015).

Da die Seed-Sequenz - verglichen mit der 3'-UTR - sehr kurz ist, kann eine miRNA mit hunderten bis tausenden mRNAs interagieren (Lewis et al., 2005). Die meisten 3'-UTRs enthalten potentielle Bindungsstellen für eine Vielzahl verschiedener miRNAs, was die Redundanz und Interaktion zwischen offenbar nicht verwandten miRNAs ermöglicht (Ebert und Sharp, 2012). Durch transkriptionelle Regulation können außerdem Ziel-mRNAs die Expression von einzelnen miRNAs oder Gruppen von miRNAs modulieren und somit positive und negative Rückkopplungsschleifen bilden (Small et al., 2010).

Mittlerweile gibt es verschiedene online verfügbare Datenbanken, die für bestimmte miRNAs potentielle Ziel-mRNAs (*targets*) vorhersagen. Diese Vorhersage-Algorithmen nutzen ähnliche Modelle, um Zielstrukturen zu identifizieren und eine Rangliste zu erstellen (Yousef et al., 2009). Die Bewertung der Zielstrukturen erfolgt nach der Komplementarität zwischen miRNA und 3'-UTR sowie der Konservierung der Sequenzen über verschiedene Spezies hinweg. Einer einzelnen Zielstruktur wird dabei eine höhere Bedeutung beigemessen, wenn die Sequenz hochkonserviert ist. Jedoch gestaltet sich die Identifizierung und Validierung der Ziel-mRNAs mithilfe dieser Algorithmen schwierig, weil bei *in vitro* Untersuchungen oft nur eine schwache oder keine Regulation beobachtet wird. Das könnte zum Teil an einem relativ

geringen Effekt einer einzelnen miRNA auf die Translationsveränderung der Ziel-mRNA liegen. Zum anderen erweisen sich viele vorhergesagte miRNA-Bindungsstellen in einer mRNA nicht als tatsächliche Zielstrukturen. Viele miRNAs beeinflussen nur in geringen Maßen die Modulation der Proteinmenge und Reduktion der intrazellulären Konzentration (Baek et al., 2008).

Eine Vielzahl von miRNAs regulieren verschiedene funktionell verwandte mRNAs. Die Regulation eines komplexen physiologischen Prozesses wird dabei von einer einzelnen miRNA oder einer Gruppe von miRNAs gesteuert. Als therapeutische Option bedeutet dies einen entscheidenden Vorteil zur konventionellen Therapie, da prinzipiell mit einer einzelnen miRNA gleichzeitig verschiedene Ebenen (patho-)physiologischer Prozesse beeinflusst werden könnten (Small et al., 2010).

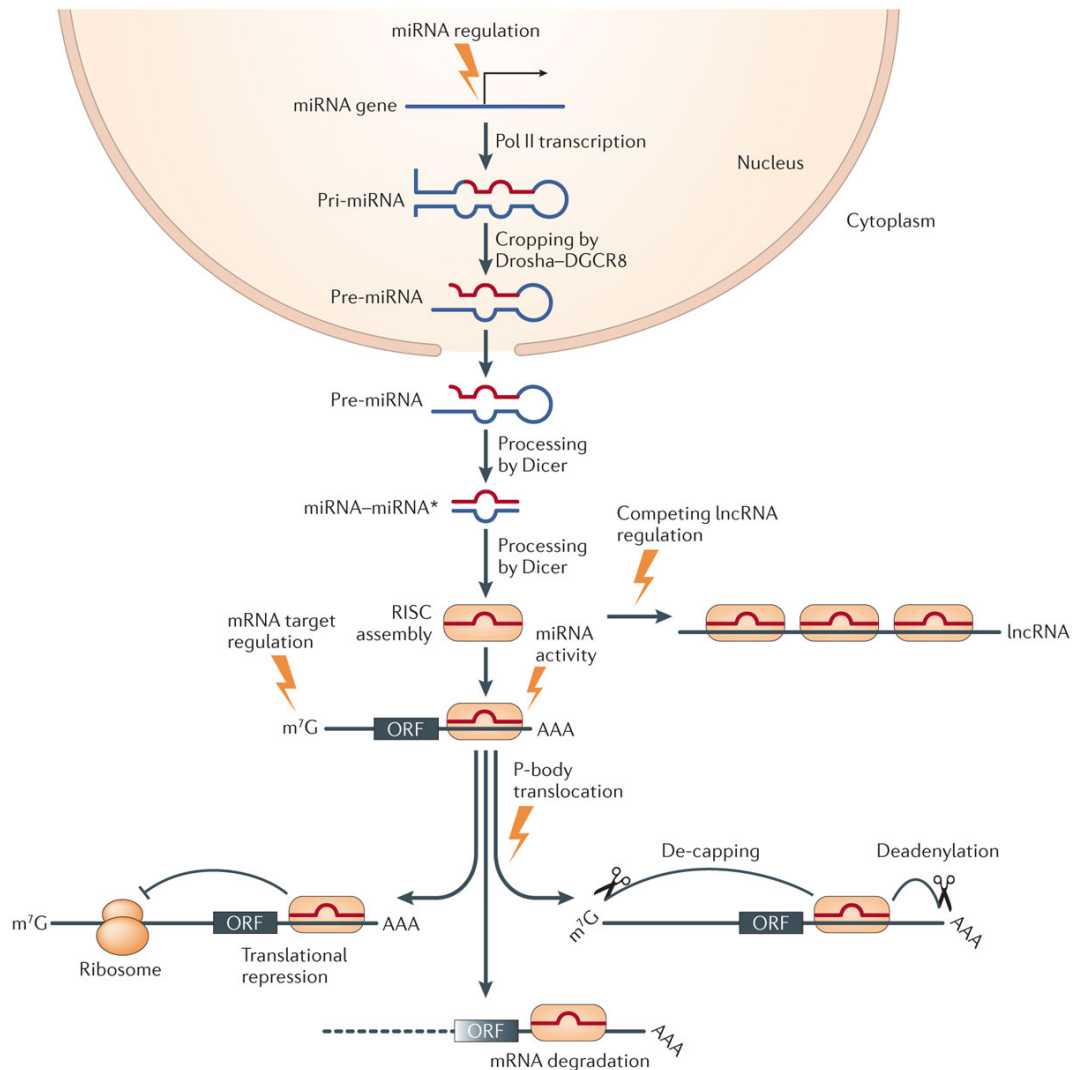


Abbildung 4: Biogenese und Funktionsprinzipien von microRNAs

Die Prozessierung von microRNAs findet sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma statt. Die post-transkriptionelle Genregulation wird dabei durch Inhibition der Translation, mRNA-Degradation oder Zerschneiden der mRNA modifiziert. Abbildung entnommen aus *MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease* (van Rooij und Olson, 2012).

1.3 Die Rolle von miRNAs beim myokardialen Remodeling

Biomechanischer Stress auf Kardiomyozyten, verursacht durch z. B. arterielle Hypertonie oder Klappenventien, führt zu sog. myokardialen „Remodeling“. Dieser komplexe Prozess besteht aus zellulärer Hypertrophie, einer erhöhten Apoptoserate, der Induktion von Fibrose und einer vermehrten Arrhythmogenität (Hill und Olson, 2008). Durch diese maladaptiven Vorgänge kann es zu Herzinsuffizienz, bösartigen Arrhythmien und plötzlichem Herztod

kommen (Hill und Olson, 2008). Trotz umfangreicher Forschung auf diesem Gebiet bleiben viele Teile der zugrundeliegenden Signaltransduktion unbekannt.

Die in den Fokus aktueller Untersuchungen gerückten miRNAs könnten dabei einen wichtigen, fehlenden Baustein bereitstellen. Verschiedene Publikationen zeigen, dass miRNAs im Rahmen des myokardialen Remodelings differentiell reguliert sind und Einfluss auf Hypertrophie, Apoptose, Fibrose und Arrhythmogenität nehmen (Bonauer et al., 2010). Außerdem scheinen sie eine entscheidende Rolle bei der Homöostase von Kardiomyozyten zu spielen. Demonstriert wurde dies unter anderem durch die Kardiomyozyten-spezifische Deletion von *Dicer* und *DGCR8*, zwei essentielle Komponenten zur Generierung von miRNAs (Abbildung 4, S. 23) (Rao et al., 2009, Thum, 2008). Die embryonische Deletion von *Dicer* in Kardiomyozyten resultierte in fetaler oder postnataler Letalität, je nach Zeitpunkt der Deletion (Chen et al., 2008, Zhao et al., 2007). Die frühe postnatale Deletion von *Dicer* in Mäusen führte zur Entwicklung von schweren Arrhythmien, wohingegen die Deletion von *Dicer* in adulten Mäusen zu einer schweren Herzinsuffizienz sowie einer signifikanten Induktion des hypertrophischen Genprogramms führte (da Costa Martins et al., 2008).

Die wichtigsten, bisher experimentell bestätigten miRNAs werden im Kontext des myokardialen Remodelings nachfolgend näher erläutert.

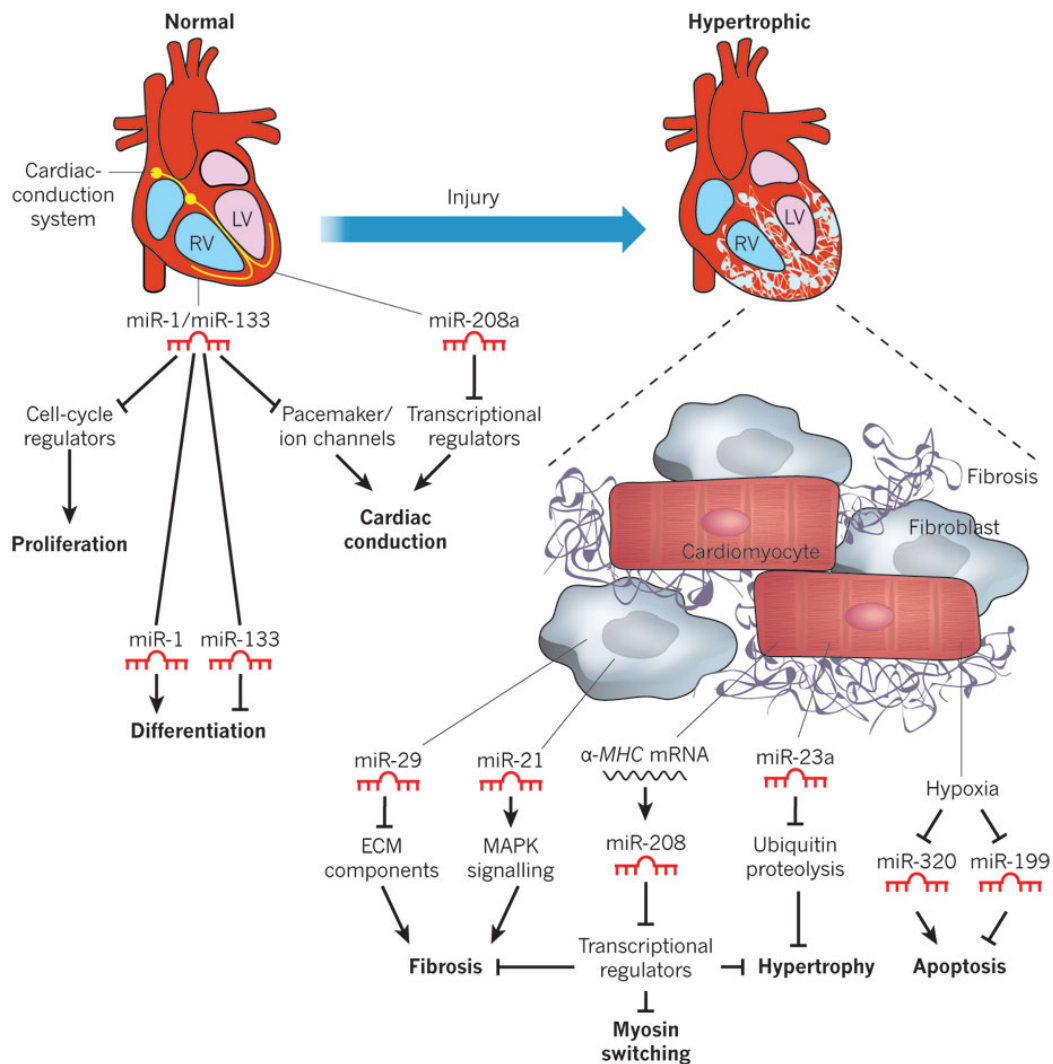


Abbildung 5: Funktionelle Aufgaben von miRNAs im gesunden und kranken Herzen

Schematische Darstellung von miRNAs, welche Einfluss auf die Erhaltung einer normalen Herzfunktion haben oder die Entwicklung des pathologischen myokardialen Remodelings induzieren. Abbildung entnommen aus *Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology* (Small und Olson, 2011).

1.3.1 MiRNAs in der Hypertrophie

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass miRNAs wesentlich an dem Prozess der pathologischen Hypertrophie im Rahmen des myokardialen Remodelings beteiligt sind. MiR-1, miR-21, miR-23, miR-133 und miR-208a spielen dabei zentrale regulatorische Rollen. Die vornehmlich in Herz- und Skelettmuskulatur exprimierte miR-1 wird durch die Transkriptionsfaktoren Serum-Response-Faktor beziehungsweise Myocyte Enhancer Factor-2 (MEF2) reguliert (Zhao et al., 2005). Es wird vermutet, dass miR-1 während der

Kardiogenese die Balance zwischen der Differenzierung und Proliferation von kardialen Vorläuferzellen durch die Regulation von *Hand2* modifiziert, ein Transkriptionsfaktor, der die Expansion von ventrikulären Kardiomyozyten fördert (Zhao et al., 2005). Die unter Kontrolle eines β -MHC-Promoters erfolgte miR-1-Überexpression in pränatalen Kardiomyozyten führte zur Ausdünnung der Ventrikelwand und zum Entwicklungsstillstand an Tag 13,5 nach Konzeption (Zhao et al., 2005). Neben dieser entscheidenden Rolle von miR-1 während der kardialen Organogenese, bleibt zunächst unklar, ob miR-1 auch positive Effekte auf das Remodeling bei fortschreitender Herzinsuffizienz zeigt. Einige Publikationen fanden miR-1 bei Herzinsuffizienz heraufreguliert (Thum et al., 2007, Matkovich et al., 2009), eine andere Publikation zeigte eine Herunterregulation von miR-1 (Ikeda et al., 2007). *Ikeda et al.* fanden außerdem miR-1 in Calcineurin-transgenen Mäuseherzen - einem etablierten murinen Modell für Herzinsuffizienz - herunterreguliert. Die adenovirale Überexpression von miR-1 im Herzen attenuiert die kardiomyozytäre Hypertrophie am wahrscheinlichsten durch die Herunterregulation von Calmodulin und MEF2a und GATA4 (Ikeda et al., 2009).

Die miR-21 ist eine der am bedeutendsten regulierten miRNAs bei kardialen Erkrankungen, obwohl sie unter basalen Bedingungen nur schwach exprimiert wird. MiR-21 wird zudem bei verschiedenen Tumorerkrankungen signifikant heraufreguliert und es wird angenommen, dass miR-21 als Protoonkogen die Apoptose inhibiert (Wang und Lee, 2009). Im Zusammenhang kardiovaskulärer Erkrankungen wird die Rolle der miR-21 kontrovers diskutiert. Verschiedene Publikationen weisen eine durch miR-21 verursachte Induktion kardialer Hypertrophie *in vitro* (Cheng et al., 2007) sowie verstärkte Fibrose *in vivo* nach (Thum et al., 2008). Im Gegensatz dazu zeigten andere Studienergebnisse anti-hypertrophische Effekte von miR-21 in isolierten Kardiomyozyten (Tatsuguchi et al., 2007), einer reduzierten Größe des Infarktareals (Yin et al., 2008) sowie einer Inhibition von H₂O₂-induzierter Apoptose in isolierten Kardiomyozyten (Cheng et al., 2009). Die Gründe für die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen bleiben unklar. Allerdings wird miR-21 überwiegend in kardialen Fibroblasten und weniger in Kardiomyozyten exprimiert (Thum et al., 2008). So ist es möglich, dass die Expressionsveränderung von miR-21 bei kardialen Erkrankungen durch eine Erhöhung der Fibroblasten-Zellzahl begründet ist, was eine geringere physiologische Relevanz von miR-21 in Kardiomyozyten implizieren könnte.

1.3.2 MiRNAs in der Apoptose

Nach dem heutigen Stand der Forschung spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des kardialen Remodelings und der daraus folgenden chronischen Herzinsuffizienz (Dorn, 2009). Akuter ischämischer Stress und chronischer Stress durch dauerhaft erhöhte ventrikuläre Wandspannung führen sowohl zum kardialen Remodeling als auch zur gesteigerten Apoptose (Ding et al., 2000, Hamacher-Brady et al., 2006, Hirota et al., 1999, Khojnejhad et al., 2007, Teiger et al., 1996). Über welche Signalwege dabei durch den kardialen Stress die Initiierung der Kardiomyozyten-Apoptose reguliert wird, ist bisher unzureichend verstanden und bedarf weiterer Abklärung.

Unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Apoptose von Kardiomyozyten während der neonatalen Entwicklung des Ausflusstraktes und der Herzklappen (Fisher et al., 2000). Im gesunden adulten Herzgewebe wiederum spielt die Apoptose nur eine untergeordnete Rolle. Mithilfe der sog. TUNEL-Färbung (engl. *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) konnte nur 1 von 10.000 Kardiomyozyten als apoptotisch identifiziert werden (Soonpaa und Field, 1998). Bedingt durch maladaptive Prozesse wie die ischämische (Narula et al., 1996, Olivetti et al., 1997) oder hypertrophe Kardiomyopathie (Teiger et al., 1996) kommt es auch im adulten Herzen zur gesteigerten Apoptose von Kardiomyozyten.

Bedingt durch die limitierten Regenerationsmöglichkeiten des adulten Herzens kann ein exzessiver Verlust von Kardiomyozyten durch Myokardischämie oder -infarkt eine signifikante Reduktion der kardialen Pumpkraft verursachen. Einige miRNAs scheinen dabei eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der Apoptose *in vivo* zu spielen. MiRNAs sind u. a. als einflussreiche Regulatoren des Zellzyklus und der Differenzierung von Stammzellen bekannt (Xu et al., 2009). Man kann zwischen pro- und antiapoptotisch wirksamen miRNAs unterscheiden, wobei deren Einfluss auf die Regeneration des adulten Herzens noch nicht gänzlich erfasst ist.

Erst kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass miR-20a die Apoptose von Kardiomyozyten bei hypoxischem Stress senkt. Dabei verursacht miR-20a eine Repression seiner Zielgene EglN3 und E2F1 (Frank et al., 2012).

MiR-195 gehört mit miR-15a, miR15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-424 und miR-497 zur miR-16-Familie, die bei Myokardischämie und Herzinsuffizienz signifikant heraufreguliert wird. Die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von miR-195 resultierte in kardialer Hypertrophie und einem rapiden Fortschreiten hin zur schweren dilatativen Kardiomyopathie (van Rooij et al., 2006). Der genaue Wirkmechanismus der miR-16-Familie bleibt zunächst unklar, jedoch wurde bei Untersuchungen in anderen Zelltypen beobachtet, dass die

Apoptose-Induktion durch Herunterregulation des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins verursacht wird (Wang und Lee, 2009). Somit könnte der AntimiR-vermittelte *Knockdown* der miR-16-Familie als wirksames Mittel zur Prävention von Ischämie-induzierter Apoptose in Kardiomyozyten dienen.

Allerdings kann die antiapoptotische Wirkung von miRNAs im Herzen auch mit einer potentiell onkogenen Wirkung im nicht-kardialen Gewebe einhergehen. MiR-21 beispielsweise hat einen antiapoptischen Effekt im Herzen bei akuter Ischämie (Sayed et al., 2010), jedoch führt in anderen Geweben, z.B. der Leber, eine Überexpression von miR-21 zu einer erhöhten Tumorpheriferation (Zhu et al., 2011).

Für zukünftige, antiapoptotische Therapieansätze bleibt daher das onkogene Potential bestehen und macht Myokardspezifische Therapeutika unentbehrlich. Denkbar sind hier das Ausschalten von Hypertrophie-induzierenden miRs, beziehungsweise das Anschalten von Hypertrophie-hemmenden miRs. Diese Modulation muss zudem spezifisch in Herzmuskelzellen erfolgen, um ungewollte Effekte auf andere Zellen und Organsysteme zu minimieren.

1.3.3 Bedeutung der miRNAs für die Pathogenese von Fibrose

Die Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten im Rahmen des myokardialen Remodelings führt zur inadäquaten Akkumulation von Extrazellulärmatrix und damit einhergehender interstitieller Fibrosierung (Weber, 1997). Die wiederum eine Beeinträchtigung der kardialen Kontraktilität verursacht und zur Veränderung der elektromechanischen Kopplung des Myokards führt (Kohl, 2003). Dadurch können sich maligne Arrhythmien entwickeln, eine häufige Mortalitätsursache bei kardialen Erkrankungen (de Jong et al., 2011). Verschiedene miRNAs weisen Expressionsveränderungen nach Myokardischämien oder fibrotischen Pathologien auf, wobei einige dieser miRNAs direkt oder indirekt Einfluss auf die Regulation der kardialen Fibrose haben (Bauersachs, 2010).

Adulte miR-133a-*Knockout*-Mäuse entwickelten eine schwere kardiale Fibrose mit konsekutiver Herzinsuffizienz (Liu et al., 2008b). Kongruent zu diesen Daten zeigten *Duisters et al.* eine Regulation des *Connective tissue growth factor* (CTGF) durch miR-133 (Duisters et al., 2009). Die Herunterregulation von miR-133 bei kardialen Erkrankungen scheint dadurch zur erhöhten Expression und Sekretion von CTGF in Kardiomyozyten zu führen, was konsekutiv die Synthese von Extrazellulärmatrix in Fibroblasten stimuliert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass miR-503 die Entwicklung einer kardialen Fibrose ebenfalls durch die Expressionserhöhung von CTGF begünstigt. Die Überexpression von

miR-503 in neonatalen kardialen Fibroblasten von Mäusen erhöhte die Zellproliferation und Kollagensynthese. Dabei wurde beobachtet, dass Apelin als Zielstruktur von miR-503 herunterreguliert wird und auf diesem Weg die CTGF-Expression erhöht (Zhou et al., 2016).

1.3.4 MiRNAs und Arrhythmogenität

Die Elektrophysiologie des Herzens ist ein sehr komplexes System. Während die meisten Kardiomyozyten die Aufgabe der koordinierten Kontraktion und Weiterleitung von Aktionspotentialen übernommen haben, gibt es spezielle Kardiomyozyten, die sich auf die Erzeugung (Sinusknoten) sowie die schnelle Weiterleitung (His-Purkinje-System) von Aktionspotentialen spezialisiert haben. Dabei lösen eine Vielzahl Spannungs- und Ligandengesteuerter Ionenkanäle koordiniert das Aktionspotential und die Kontraktion einzelner Kardiomyozyten aus. Die *Gap Junctions* ermöglichen dabei die Diffusion der Ionen in benachbarte Zellen und somit eine kontinuierliche Erregungsausbreitung. Herzgewebe kann also als anregbares Medium gesehen werden.

Speziell die Na⁺-, Ca²⁺- und K⁺-Kanäle sowie *Gap junction* Proteine wie Connexin 43 sind wichtige Regulatoren von Depolarisation und Repolarisation während der Kontraktion und Relaxation. Ein bedeutender maladaptiver Schritt beim myokardialen Remodeling ist die Veränderung der Ionenkanalexpression und -funktion (Nattel et al., 2007). Durch diesen auch als „arrhythmogenes Remodeling“ bezeichneten Prozess wird vor allem der Kalziumstoffwechsel beeinflusst, was die Entwicklung ventrikulärer Arrhythmien begünstigt (Sandmann et al., 2001).

Für einige miRNAs, wie miR-1 und miR-133, wurden Ionenkanäle als relevante Zielstrukturen vorhergesagt und sie scheinen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der myokardialen Erregungsausbreitung sowie der Entwicklung von malignen Arrhythmien im Rahmen kardialer Erkrankungen zu spielen (Yang et al., 2007). *Zhao et al.* beobachteten, dass erwachsene miR-1-2-*Knockout*-Mäuse erhebliche EKG-Veränderungen aufwiesen: Eine reduzierte Herzfrequenz, verkürzte PR-Intervalle und verbreiterte QRS-Komplexe führten zu kardialen Arrhythmien und plötzlichem Herztod. Diese EKG-Veränderungen waren - zumindest teilweise - auf die erhöhte Expression der miR-1-Zielstruktur *Irx5* zurückzuführen, ein Transkriptionsfaktor der die Expression von *Kcnd2* reguliert und damit einen für die kardiale Repolarisation bedeutenden Kaliumkanal beeinflusst (Zhao et al., 2007).

1.4 MicroRNA-Microarray

Von großem Interesse für diese Arbeit waren die Expressionsveränderungen bestimmter miRNAs in Kardiomyozyten, welche kardialen Stress in Form von Stretch ausgesetzt wurden.

Um neue molekulare Modulatoren zu identifizieren, werden genomweite Analysen des miRNA-Expressionsmusters benötigt. Diese aufwändige Untersuchung kann mittels eines miRNA-Microarrays durchgeführt werden. Nach der erfolgten Expressionsanalyse können vielversprechend regulierte miRNAs mit anderen Verfahren validiert werden. Northern Blots oder quantitative Realtime-PCRs als Validierungsverfahren sind jedoch deutlich aufwändiger und bei gleichzeitiger Untersuchung von bis zu zehn verschiedenen Proben in einem einzigen Microarray wird nur ca. 15% der Zeit benötigt (Git et al., 2010).

Die microRNA-Microarray Technologie stellt dabei eine leistungsfähige Hochdurchsatz-Methode zur zeitgleichen Expressionsanalyse von Tausenden microRNAs (Liu et al., 2008a). Die miRNA-Datenbank *miRBase* gibt in der aktuellen Veröffentlichung (*Release 21*) 765 reife miRNAs in Ratten (*Rattus norvegicus*) an, deren Expression mithilfe eines Microarrays untersucht werden kann (Kozomara und Griffiths-Jones, 2014).

Ein Microarray besteht prinzipiell aus drei verschiedenen Schichten. Es wird eine Basis benötigt, die mit einer Oberfläche beschichtet sein muss, auf der die Sonden gebunden werden. Für DNA-Microarrays beispielsweise wird in der Regel ein Glasobjektträger oder eine Silikonmembran als Basis genutzt. Mögliche Oberflächen stellen dann z.B. Aminogruppen, aktivierte Ester, Aldehyde oder Isocyanate dar, um Sonden aus Nucleinsäuren daran kovalent zu binden (Koehler und Begley, 2007). Anschließend werden die Sonden maschinell in einem fest definiertem Raster als Punkte (engl. *spots*) auf dem Objektträger verankert (sog. „spotted Micorarrays“). Die Zuordnung der Lokalisation zu den entsprechenden Sonden bzw. Bindungspartnern wird in einer Datei (sog. „gene array list“) gespeichert. Alternativ werden bei den sog. „Oligonukleotid-Microarrays“ die Sonden direkt auf den Objektträger synthetisiert. Das gesuchte Molekül wird an der Sonde durch komplementäre Basenpaarung gebunden. Es existieren einige verschiedene Sondentypen, auf die in dieser Arbeit verwendeten Sonden wird im Material- und Methodenteil genauer eingegangen (siehe Abschnitt 2.2.4.18, S. 66).

Mit diesen vorläufigen Expressionsdaten konnten anschließend zielgerichtete Validierungsuntersuchungen vorgenommen werden. Dazu wurden vielversprechend regulierte miRNAs durch quantitative Realtime-PCRs validiert, da die Varianz der Microarray-Daten typischerweise hoch ist.

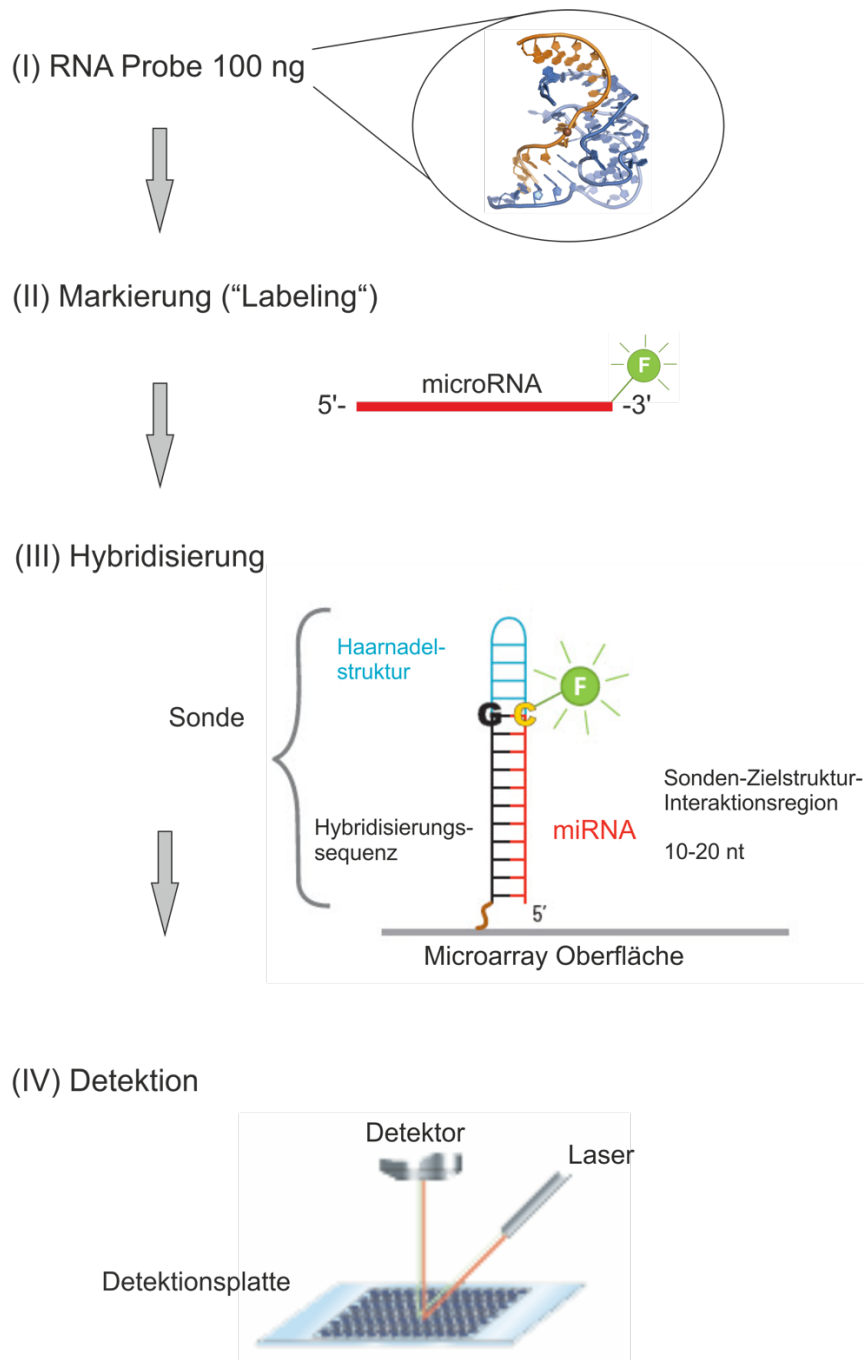


Abbildung 6: Vereinfachtes Ablaufschema eines Agilent microRNA-Microarrays

(I) Die RNA der verschiedenen Bedingungen wird gereinigt und die Qualität kontrolliert. (II) Die miRNAs werden mit einem Cyanine-3-Farbstoff fluoreszenzmarkiert. (III) Eine Microarray-Sonde ist ein an der Oberfläche verankertes Oligonukleotid, dass mit der miRNA im Hybridisierungsschritt eine Bindung eingeht. Die eingebundene Guanin-Base (G) am 5'-Ende der Hybridisierungssequenz geht mit der Cytosin-Base (C) am 3'-Ende der markierten miRNA eine komplementäre Basenpaarung ein und stabilisiert die Ziel-miRNA im Vergleich zur homologen RNA. (IV) Fluoreszenz-Detektion der markierten Proben mithilfe eines Photomultipliers.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Durch zahlreiche Untersuchungen der Signaltransduktion des myokardialen Remodelings konnten in den letzten zwei Jahrzehnten diverse Signalwege entschlüsselt werden. Jedoch bleiben viele Mechanismen der Entstehung verschiedener Herzerkrankungen weiterhin unbekannt. Die vor einigen Jahren bekannt gewordenen microRNAs besitzen einen regulatorischen Einfluss auf kardiale Signalwege sowohl im gesunden als auch im kranken Herzen und könnten deshalb zum weiteren Verständnis beitragen (Small und Olson, 2011).

Unsere Arbeitsgruppe hat ein ausgezeichnetes *in vitro* Modell zur Simulation des myokardialen Remodelings etabliert, indem Kardiomyozyten dynamisch biomechanisch gedehnt werden (Frank et al., 2008).

Ziel dieser Arbeit ist es nun, das Expressionsmuster von microRNAs nach dynamischem biomechanischen *Stretch* zu untersuchen, vielversprechende miRNAs zu validieren und deren Zielstrukturen zu identifizieren. Relevante Abläufe in der Signaltransduktion und Einflüsse auf Proteinebene könnten somit beleuchtet werden und mögliche Therapieoptionen offenlegen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

AlphaDigiDoc Pro Gel Documentation System	Alpha Innotech
Aufsicht-Mikroskop DC500	Leica
CFX96 RealTime PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
Chromatographie-Papier	Whatman
Deckgläser 18 mm Durchmesser	Karl Hecht KG
Durchsicht-Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss
Eppendorf Research Pro elektronische Pipette	Eppendorf
Elektroporationsküvette	Peqlab
Flexcell® FX-5000™ Tension System	Flexcell International Corp.
Gewebekulturflaschen	Greiner Bio-One
GS-6KR Zentrifuge	Beckmann
HD Rat miRNA Microarray, Release 16.0	Agilent
Hyper Processor Filmentwickler	Amersham Pharmacia Biotech
Imobilon Blotting Membrane	Millipore
Infinite® M200 Pro Luminometer	Tecan Trading
J2-HS Zentrifuge	Beckmann
Lucy 2	Anthos
Microarray Scanner GS2505_C	Agilent
Microfuge 18 Zentrifuge	Beckmann Coulter
Microfuge 22R Zentrifuge	Beckmann Coulter
MicroPulser	Bio-Rad Laboratories
Mini Protean 3 Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories
Mini Trans-Blot Zelle	Bio-Rad Laboratories
Multiwell-Platten	Costar
MyCycler Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
NanoDrop 2000 Spektralphotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	Assistent
Odyssey Infrared Imager	LI-COR Biosciences

Pasteur Pipetten, Glas	ROTH
Pipetten, manuell	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl, gestopft	Nerbe plus
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
PJ 3600 Delta Range Waage	Mettler-Toledo
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories
qRT-PCR Platten, 96-Well	Bio-Rad Laboratories
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml, RNase-frei	Sarstedt
Röhrchen 15 ml, 50 ml	BD Falcon
Seven Easy pH-Meter	Mettler-Toledo
Spectra Mini	Tecan
Sterilfilter, 0,2µm Porengröße	Nalgene Labware
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Thermofast 96 Detection Plates	Thermo Scientific
Tissue Tek	Sakura
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel 38
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH
Acrylamid	Carl Roth
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Carbenicillin	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA-Ladepuffer 6x	Fermentas

DreamTaq Grün-Puffer 10x	Thermo Scientific
EDTA	Serva Electrophoresis
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS Gold	PAA Laboratories
Formamid	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1kb Plus DNA-Leiter	Fermentas
HEPES	Carl Roth
iQ PowerMix Reagenz, Multiplex qRT	Bio-Rad Laboratories
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kollagen I-Lösung aus Rinderhaut	BD Biosciences
Lipofectamin 2000 Reagenz	Invitrogen
Lipofectamin LTX Reagenz	Invitrogen
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
NCS	PAA Laboratories
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen / GIBCO
Percoll	Amersham Biosciences
Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol	Carl Roth
Phenolrot	Sigma-Aldrich
Phenylephrin	Sigma-Aldrich
QIAzol Lyse Reagenz	Qiagen
SDS	Serva Electrophoresis
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
TRIS-Base	Carl Roth
TRIS-HCl	Carl Roth
Triton X 100	Serva Electrophoresis
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vectashield HardSet Mounting-Medium	Vecta-Labs

2.1.3 Puffer und Lösungen

ADS-Puffer

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

DNA-Ladepuffer (6x konzentriert)

0,005% (w/v)	Bromphenolblau
15% (w/v)	Ficoll Type 400 (Sigma)
50 mM	EDTA pH 8,0
0,5% (w/v)	SDS

ELB-Puffer

50 mM	HEPES, pH 7,0
250 mM	NaCl
5 mM	EDTA
0,1 % (v/v)	NP-40
1 mM	DTT (Dithiothreitol)
1 mM	PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
4% (v/v)	Protease-Inhibitor, unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt

PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	NaH ₂ PO ₄
1,47 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,4	

RIPA-Lyse-Puffer

50 mM	TRIS-HCl
150 mM	NaCl
0,5% (w/v)	Natriumdesoxycholat
1% (v/v)	NP-40
0,2%	SDS
pH 7,5	titriert mit 1 M NaOH

TAE-Puffer (50x konzentriert)

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

TE-Puffer

5 mM	TRIS
0,1 mM	EDTA
pH 7,4	

2.1.4 Medien**Medien zur Bakterienkultur**

Medien zur Bakterienkultur wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert.

LB-Medium

1% (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl
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.

Complete-Medium

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)	
10% (v/v)	FCS Gold
100 U/l	Penicillin G
100 µg/ml	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin

Serumfreies Medium

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)	
100 U/l	Penicillin G
100 µg/ml	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin

Transfektionsmedium

DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)	
10% (v/v)	FCS Gold
2 mM	L-Glutamin

2.1.5 Kits

BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit	Invitrogen
pmirGLO Dual-Luciferase Assay System	Promega
miRNA Complete Labeling and Hybridization Kit	Agilent
NucleoSpin® Plasmid Kit	Machery-Nagel
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System	Invitrogen
TaqMan® MicroRNA Transcription Kit	Applied Biosystems
TaqMan® MicroRNA Assay	Applied Biosystems

2.1.6 Enzyme

Collagenase Type 2	Worthington Biochemical Corp.
Complete-Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich
DreamTaq DNA-Polymerase (GreenTaq)	Thermo Scientific
LR Clonase™ II	Invitrogen

Pac I Restriktionsendonuklease	BD Biosciences Clontech
BP Clonase™ II	Invitrogen
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen/GIBCO

2.1.7 Plasmide

Tabelle 2-1: Verwendete Plasmide und Erklärung

Bezeichnung	Antibiotikaresistenz	Erklärung	Hersteller
pcDNA6.2-GW/miR	Spectinomycin	Expressionsvektor	Invitrogen
pDONR™ 221	Kanamycin	Donor-Vektor	Invitrogen
pAd/CMV/V5-DEST	Carbenicillin	Destinationsvektor	Invitrogen
pmirGLO	Ampicillin	Luciferase-Assay	Promega Corp.

2.1.8 Antikörper

anti- α -Actinin (Sarkomer, mouse, monoklonal)	Sigma-Aldrich
Alexa Fluor® 546 anti-Mouse IgG1 (donkey)	Thermo Scientific
anti-Hexon FITC-konjugiert (goat)	Sigma-Aldrich

2.1.9 Bakterien

OneShot® TOP10, elektrokompent	Life-Technologies
DH10B, elektrokompent	Life-Technologies

2.1.10 Oligonukleotide und Primer

2.1.10.1 MicroRNA TaqMan® Assay

Tabelle 2-2: Verwendete MicroRNA TaqMan® Assays zur qRT-PCR

Bezeichnung	Identifikationsmerkmal
mmu-miR-31*	ID 002495
hsa-miR-146a	ID 000468
hsa-miR-188	ID 002320

rno-miR-466b	ID 002066
mmu-miR-494	ID 001293
mmu-miR-503	ID 002456
RNU6B	ID 001093

2.1.10.2 MicroRNA-Sequenzen

Tabelle 2-3: MicroRNA-Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
miR-31*	UGC UAU GCC AAC AUA UUG CCA UC
miR-146a	UGA GAA CUG AAU UCC AUG GGU U
miR-188	CAU CCC UUG CAU GGU GGA GGG
miR-466b-1*	UAU GUG UGU GUG UAU GUC CAU G
miR-494	UGA AAC AUA CAC GGG AAA CCU
miR-503	UAG CAG CGG GAA CAG UAC UGC AG

2.1.10.3 Klonierung rekombinanter Adenoviren

Tabelle 2-4: Oligonukleotide für die Anlagerung und Ligation zur Generierung von pcDNA6.2-GW/miR Expressionsvektoren und der nachfolgenden Überexpression von microRNAs

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
rno-miR-503_Top	TGC TGT AGC AGC GGG AAC AGT ACT GCA GGT TTT GGC CAC TGA CTG ACC TGC AGT AGT TCC CGC TGC TA
rno-miR-503_Bot	CCT GTA GCA GCG GGA ACT ACT GCA GGT CAG TCA GTG GCC AAA ACC TGC AGT ACT GTT CCC GCT GCT AC
rno-miR-494_Top	TGC TGT GAA ACA TAC ACG GGA AAC CTC TGT TTT GGC CAC TGA CTG ACA GAG GTT TCG TGT ATG TTT CA
rno-miR-494_Bot	CCT GTG AAA CAT ACA CGA AAC CTC TGT CAG TCA GTG GCC AAA ACA GAG GTT TCC CGT GTA TGT TTC AC
rno-miR-466b-1*_Top	TGC TGA TAC ATA CAC ACA CAC ATA CAC GTT TTG GCC ACT GAC TGA CGT GTA TGT GTG TGT ATG TAT
rno-miR-466b-1*_Bot	CCT GAT ACA TAC ACA CAC ATA CAC GTC AGT CAG TGG CCA AAA CGT GTA TGT GTG TGT GTA TGT ATC
rno-miR-188_Top	TGC TGC ATC CCT TGC ATG GTG GAG GGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CCC TCC ACT GCA AGG GAT G
rno-miR-188_Bot	CCT GCA TCC CTT GCA GTG GAG GGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CCC TCC ACC ATG CAA GGG ATG C
rno-miR-146a_Top	TGC TGT GAG AAC TGAA TTC CAT GGG TTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC

	AAC CCA TGA TTC AGT TCT CA
rno-miR-146a_Bot	CCT GTG AGA ACT GAA TCA TGG GTT GTC AGT CAG TGG CCA AAA CAA CCC ATG GAA TTC AGT TCT CAC
rno-miR-31*_Top	TGC TGT GCT ATG CCA ACA TAT TGC CAT CGT TTT GGC CAC TGA CTG ACG ATG GCA ATG TTG GCA TAG CA
rno-miR-31*_Bot	CCT GTG CTA TGC CAA CAT TGC CAT CGT CAG TCA GTG GCC AAA ACG ATG GCA ATA TGT TGG CAT AGC AC
miR-Neg_Top	GAA ATG TAC TGC GCG TGG AGA CGT TTT GGC CAC TGA CTG ACG TCT CCA CGC AGT ACA TTT
miR-Neg_Bot	AAA TGT ACT GCG TGG AGA CGT CAG TCA GTG GCC AAA ACG TCT CCA CGC GCA GTA CAT TTC

2.1.10.4 Multiplex qRT-PCR

Tabelle 2-5: Gewählte Primer und Sonden für die quantitative Realtime-PCR (Multiplex)

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Erklärung
Nppa_F	GGA GCA AAT CCT GTG TAC AGT G	Multiplex Primer und Sonde konjugiert mit Farbstoff und „Löscher“ für <i>Nppa</i> (ANF)
Nppa_R	ACC TCA TCT TCT ACC GGC AT	
Nppa_Sonde	FAM - TGA TGG ATT TCA AGA ACC TGC TAG ACC A - BHQ1	
Nppb_F	ACA AGA TAG ACC GGA TCG GA	Multiplex Primer und Sonde konjugiert mit Farbstoff und „Löscher“ für <i>Nppb</i> (BNP)
Nppb_R	AGC CAG GAG GTC TTC CTA CA	
Nppb_Sonde	HEX - TCA GTG CGT TAC AGC CCA AAC GA - BHQ1	
Rpl32_F	CTG CTG ATG TGC AAC AAA TCT	Multiplex Primer und Sonde konjugiert mit Farbstoff und „Löscher“ für <i>Rpl32</i> (Kontrolle)
Rpl32_R	GCT GTG CTG CTC TTT CTA CAA T	
Rpl32_Sonde	Texas Red - ACT GTG CTG AGA TTG CTC ACA ATG TGT - BHQ2	
Rcan1_F	TAG CTC CCT GAT TGC TTG TG	Multiplex Primer und Sonde konjugiert mit Farbstoff und „Löscher“ für <i>Rcan1.4</i>
Rcan1_R	GGA TTC AAA TTT GGC CCT GG	
Rcan1_Sonde	Cy5.5 - ACG ATG ATG TCT TCA GCG AAA GTG AGA C - Eclipse	

2.1.10.5 Luciferase-Assay

Tabelle 2-6: Sequenzen für die Klonierung potenzieller Zielstrukturen

Bezeichnung	Sequenz 5' -> 3'	Erklärung
ApIn_3'UTR_F	GAT CTC TAG AAG CAG GAT TGA AGG GCT CTC	Sequenz der potentiellen Zielstruktur <i>Apelin</i> für die Quantifizierung im Assay
ApIn_3'UTR_R	ATG CCC TGC AGG GTA TTG AAC TCC TCG CAT TTT ATT TTC	
Ccnd2_3'UTR_F	GAT CTC TAG AGG AAG CCA TTC GGG CGG C	Sequenz der potentiellen Zielstruktur <i>Cyclin D2</i> für die Quantifizierung im Assay
Ccnd2_3'UTR_R	ATG CCC TGC AGG TAA ATG GTT CAG TCG TGT GGT TGG G	
Fzd1_3'UTR_F	GAT CTC TAG AAA CCC AGA ATC TTA CCT GCC C	Sequenz der potentiellen Zielstruktur <i>Frizzled 1</i> für die Quantifizierung im Assay
Fzd1_3'UTR_R	ATG CCC TGC AGG GTT ATA CTT TAA TGA CGA CAT TGT TTG G	
Stc1_3'UTR_F	GAT CTC TAG AGC AGG GAG AGG TAT TCA CAG	Sequenz der potentiellen Zielstruktur <i>Stanniocalcin 1</i> für die Quantifizierung im Assay
Stc1_3'UTR_R	ATG CCC TGC AGG GAT CCT ACA GAG ATG GTC CAG	

2.1.11 Zelllinien

C2C12-NFAT

Diese murine Myoblasten-Zelllinie besitzt die Fähigkeit in Zellkultur zu Skelettmuskelzellen zu differenzieren. Die Zellen wurden mit dem Reporter-Vektor *pHTS-NFAT* (Biomyx Technology) transfiziert. Dieser Vektor trug eine Luciferase-Expressionskassette, welche von vier *NFAT-Enhancer* Stellen kontrolliert wurde (Frey et al., 2008).

HEK-293A

Diese humane, embryonale Nierenzelllinie enthält - durch Transformation mit dem humanen Adenovirus Typ 5 - Anteile des viralen Genoms. HEK-293A exprimiert adenovirale E1- und E3-Proteine und eignet sich daher für die Herstellung und Amplifikation rekombinanter Adenoviren.

2.1.12 Versuchstiere

2.1.12.1 Mäuse (*Mus musculus*)

Die verwendeten Mäuse vom C57BL/6-Stamm wurden von der Firma *Charles River Laboratories* bezogen.

2.1.12.2 Ratten (*Rattus norvegicus*)

Die erwachsenen Wistar Ratten wurden ebenfalls von *Charles River Laboratories* bereitgestellt. Neugeborene Ratten wurden 1 bis 3 Tage postnatal für die Isolation von ventrikulären Kardiomyozyten getötet.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Die Tiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel artgerecht gehalten. Die Tiere hatten jederzeit Zugang zu Trockenfutter und Trinkwasser. Der Tag-Nacht-Rhythmus lag ganzjährig bei 12 Stunden und die Raumtemperatur betrug 24 ± 1 °C. Alle geschilderten Tierversuche wurden von der zuständigen Landesbehörde und der Tierschutzbehörde mit entsprechenden Tierschutzanträgen genehmigt.

2.2.1.1 Gewebeentnahme

Die Gewebeentnahme erfolgte ausschließlich an zuvor getöteten Tieren. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und anschließend das Fell durch einen medianen Schnitt eröffnet. Das Fell wurde mit den Fingern beiseitegeschoben und das Abdomen eröffnet. Hiernach wurde das Zwerchfell durchtrennt und die Organe vorsichtig frei präpariert. Von jedem zu untersuchenden Organ wurde ein Stück Gewebe sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff bei -196 °C tiefgefroren. Anschließend wurde das Gewebe auf eine Kulturschale gelegt und gewogen. Jeweils 100 mg Gewebe (Ausnahme: 50 mg Leber) wurden zur weiteren RNA-Extraktion verwendet.

2.2.1.2 Transversale aortale Konstriktion

Das Ziel dieser Methode war es, pathologische Myokardhypertrophie zu generieren, um damit Effekte eines Gens *in vivo* nachweisen zu können. Die erhöhten pathologischen Belastungszustände wurden durch thorakales aortales „*Banding*“ herbeigeführt. Sechs bis acht Wochen alte Mäuse wurden mit Ketamin und Xylazin narkotisiert, endotracheal intubiert und linkslateral thorakotomiert. In minimal-invasiver Methode wurde der Aortenbogen freipräpariert und gegen eine 27 G Kanüle ligiert. Die Kanüle wurde entfernt und somit eine Stenose von definiertem Durchmesser gebildet. Durch die Verengung der Aorta wurde die Nachlast erhöht und eine konstante Druckbelastung auf das Herz ausgeübt. Es entwickelte sich eine kardiale Hypertrophie und in der Folge eine Herzinsuffizienz. Bei scheinoperierten Kontrolltieren wurde der Aortenbogen ebenfalls freigelegt, jedoch ohne eine Stenose zu setzen. Nach zwei Wochen wurden die Tiere getötet und es wurde eine RNA-Extraktion nach genanntem Protokoll durchgeführt. *Operateur: Dr. med Christian Kuhn, Mitglied der AG Frey*

2.2.2 Zellkultur

Um Kontaminationen zu vermeiden wurde mit allen verwendeten Zellen ausschließlich unter einer sterilen Sicherheitswerkbank gearbeitet. Jede Zelllinie wurde separat bearbeitet. Alle Zelllinien und primäre Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.1 Kulturgefäße

Für die Kultur von Säugetierzellen wurden Kulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 und 175 cm², Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser sowie Kulturplatten mit 6, 12 oder 24 Wells verwendet. Alle Kulturflaschen, -schalen und -platten, die zur Kultivierung von NRVCM genutzt wurden, mussten zuvor mit Kollagen I beschichtet werden, damit Kardiomyozyten adhärent anwachsen konnten. Zur Beschichtung wurde eine Kollagen I Stammlösung (3,1 mg/ml) auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. Die Kulturgefäße wurden mit 5-10 µg/cm² Kollagen I Lösung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem ddH₂O wurden die Kulturgefäße luftgetrocknet und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Die beschichteten Kulturgefäße wurden nicht länger als 7 Tage gelagert.

2.2.2.2 Isolation von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten

Die Isolation von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten (NRVCM) wurde an 1 - 3 Tage alten Ratten durchgeführt. Exemplarisch wird hier die Isolation von 40 Herzen beschrieben. Die neugeborenen Ratten wurden kurz mit Kopf und Rumpf in 75% (v/v) Ethanol getaucht und anschließend mit einer Schere dekapitiert. Die Sternotomie erfolgte mit der Schere links parasternal durch eine Inzision von circa 2 cm Länge. Durch leichten Druck auf das Abdomen konnte das Herz mobilisiert und danach vom Körper abgetrennt werden. Das Herz wurde sofort in eine Petrischale mit auf Eis gekühlten ADS-Puffer gelegt. Unter der sterilen Werkbank wurden die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel in frischen ADS-Puffer überführt. Anschließend wurden die Ventrikel mit der Schere in der Petrischale zerkleinert, bis das Gewebe gleichmäßig verteilt war. Dieses Ventrikelgewebe wurde in 36 ml Verdauungslösung überführt, die 0,5 mg/µl Collagenase Type 2 sowie 0,6 mg/ml Pankreatin in ADS-Puffer enthält. Diese Verdauungslösung wurde vor der Verwendung steril filtriert und auf 37 °C erwärmt. Das Ventrikelgewebe in der Verdauungslösung wurde im Wasserbad bei 37 °C und 40 U/min für 20 min horizontal geschüttelt. Nach dem ersten Verdauungsschritt wurde der Überstand abgenommen und verworfen. 36 ml frische Verdauungslösung wurde hinzugegeben

und ein weiteres Mal für 20 min inkubiert. Der Überstand nach dem zweiten Verdauschritt, der schon freigesetzte Zellen enthielt, wurde durch einen Filter (engl. *cell strainer*) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses Reaktionsgefäß enthielt bereits 8 ml NCS (engl. *newborn calf serum*), um die Collagenase und das Pankreatin zu inaktivieren. Diese Zellsuspension wurde bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet in 5 ml NCS resuspendiert. Die nun vorhandene Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung im Inkubator bei 37 °C gelagert. Die oben genannten Verdauschritte wurden so oft durchgeführt, bis kein Gewebe mehr sichtbar war. Normalerweise reichten hierfür 5 - 6 Verdauschritte aus. Sobald das Gewebe vollständig verdaut war, wurden die „gepoolten“ und in NCS resuspendierten Zellen bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50 ml ADS-Puffer aufgenommen.

Diese Lösung enthielt jedoch Kardiomyozyten, Fibroblasten, Erythrozyten und andere Zellarten des Herzens und es war notwendig, diese aufzureinigen. Deshalb wurden die isolierten Zellen mittels eines Percoll-Gradienten ihrer Dichte nach aufgetrennt (Iwaki et al., 1990). Zuerst wurde eine Percoll-Stammlösung aus 27 ml Percoll und 3 ml 10x ADS-Puffer hergestellt. Anschließend wurde eine Lösung mit höherer und eine mit niedrigerer Dichte hergestellt. Die Lösung mit niedrigerer Dichte enthielt 9 ml Stammlösung und 11 ml ADS-Puffer sowie Phenolrot, zur besseren Darstellbarkeit der verschiedenen Phasen. Die Lösung mit der höheren Dichte bestand aus 13 ml Stammlösung und 7 ml ADS-Puffer. Für die Bildung des Dichtegradienten wurden 4 ml der Lösung mit niedriger Dichte in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde mit einer Pipette auf den Boden des Gefäßes 3 ml der Lösung mit höherer Dichte gegeben. Dabei war es essentiell, die Phasen nicht zu vermischen und keine Luftbläschen zu bilden. 500 µl der Zellsuspension wurde vorsichtig auf den Gradienten pipettiert, sie bildete somit die dritte Phase. Um die Zellen nach ihrer Dichte aufzutrennen, erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 U/min für 30 min bei 4 °C mit langsamer Be- und Entschleunigung ohne Pausen. Die Zellen trennten sich folgendermaßen auf: Zwischen der oberen und mittleren Phase befanden sich Fibroblasten und konnten abgesaugt werden. Die Erythrozyten sammelten sich als Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Die Kardiomyozyten wanderten bis zum Übergang zwischen mittlerer und unterer Phase, diese konnten mit einer Transferpipette in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die Zellsuspension wurde auf 50 ml mit ADS-Puffer aufgefüllt und bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und der Schritt noch einmal wiederholt. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Kardiomyozyten in 37 °C warmem Complete-Medium resuspendiert.

Im Anschluss erfolgte das Zählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurde 1 ml der Zellsuspension abgenommen und 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt. Dadurch konnten bereits tote Zellen bei der Zählung unberücksichtigt bleiben. Die NRVCN wurden in verschiedenen Konzentration auf verschiedenen Platten ausgesät, je nachdem welches Experiment durchgeführt werden sollte (siehe Tabelle 2-7).

Die Zellen wurden für die ersten 18 Stunden in Complete-Medium inkubiert. Für alle weiteren Experimente wurden die Kardiomyozyten nach 18 Stunden zwei Mal mit warmem PBS gewaschen und für die restliche Zeit in serumfreien Medium gehalten.

Tabelle 2-7: Eingesetzte Zellzahlen in verschiedenen Kulturschalen.

Kulturschale	Experiment	Zellen/Well	ml Medium/Well
6-Well Platte	Stretch	$1,5 * 10^6$	2
6-Well Platte	Infektion	$7,5 * 10^5$	2
6-Well Platte	Transfektion	$1 * 10^6$	2
12-Well Platte	Luciferase-Assay	$4 * 10^5$	1
12-Well-Platte mit <i>Deckgläsern</i>	Immunfluoreszenz	$1,8 * 10^5$	1

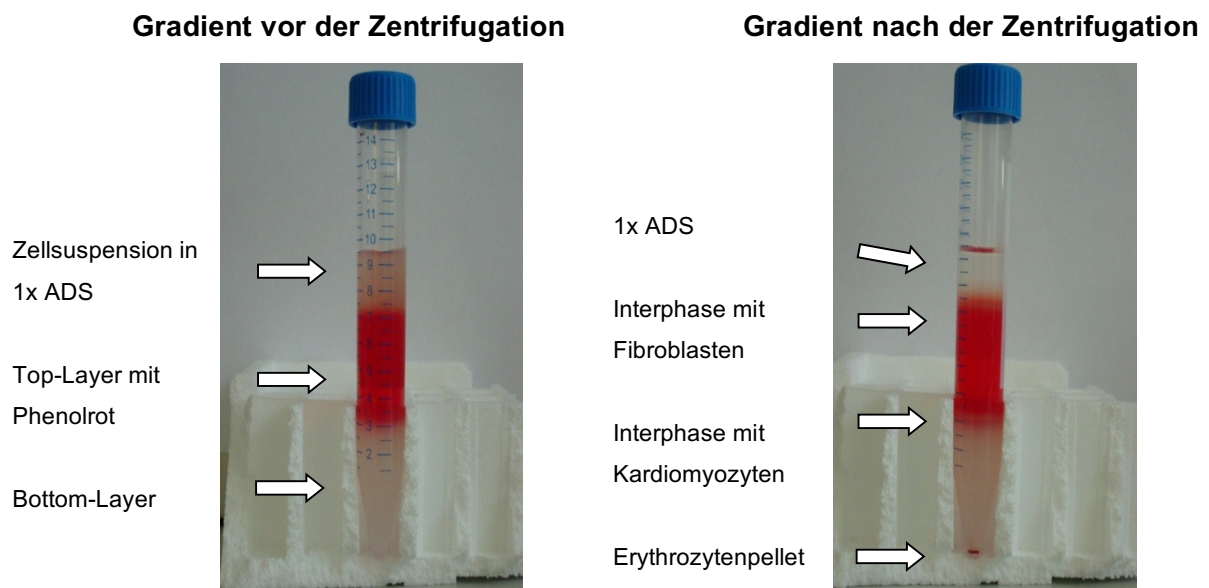


Abbildung 7: Trennung der isolierten Zellen mittels eines Percoll-Gradienten.

Die Zellsuspension wird auf den Percoll-Gradienten pipettiert und nach der Zentrifugation befinden sich die Kardiomyozyten im unteren Teil der Interphase.

2.2.2.3 Biomechanischer Stress durch *Stretch*

Die in der bereits beschriebenen Methode gewonnen ventrikulären Kardiomyozyten wurden in der Konzentration von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/Well mit 2 ml Complete-Medium je Well in Stretch-geeigneten 6-Well Platten kultiviert. Diese Platten unterschieden sich insofern, als dass der Boden der Platte aus einer mit Kollagen Typ 1 beschichteten Silikonmembran bestand, um hier mit Unterdruck eine Dehnung der Membran zu erzielen. Die Stretch-geeigneten Platten wurden bei 37 °C und 5% CO₂ für 18 Stunden inkubiert. Die Vitalität der Herzmuskelzellen wurde regelmäßig unter dem Mikroskop überprüft. 18 Stunden nach Aussaat der NRVCN wurden die Zellen zwei Mal mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde warmes, serumfreies Medium hinzugegeben und die Platten für weitere 24 Stunden im Inkubator gelagert. Nach einer weiteren Vitalitätsprüfung wurde das serumfreie Medium gewechselt und die Platten in den *Flexcell*[®] *FX-5000*[™] *Tension System* Stretch-Inkubator gelegt. Ziel des Stretch-Experimentes war es, vier Bedingungen zu schaffen: Kontrolle, 2 h Stretch, 6 h Stretch und 24 h Stretch. Dazu wurde die erste 6-Well Platte (24 h Stretch) in die Vorrichtung eingespannt, wo der Stretch-Inkubator einen Unterdruck ausüben konnte. Die verbliebenen drei freien Plätze wurden mit Dummies besetzt. Die anderen 6-Well Platten (2 h, 6 h und Kontrolle) wurden ebenfalls in den Stretch-Inkubator gelegt, jedoch ohne gedehnt zu werden. Im Stretch-Inkubator herrschten die folgenden Bedingungen: 37 °C und 5 % CO₂. Mithilfe des Stretch-Inkubators war es möglich, die Zellverbände dynamisch biomechanisch zu dehnen. Es wurde mit den entsprechenden Parametern gearbeitet: Frequenz = 1 Hz, Sinuskurve, biaxiale Dehnung = 116%. Nach 18 Stunden wurde das Experiment kurz gestoppt, um die „6 h Stretch Platte“ ebenfalls in die Stretch-Vorrichtung einzuspannen und das Experiment fortzuführen. Nach weiteren 4 Stunden, also 22 Stunden nach Beginn der Dehnung, wurde der Stretch angehalten, damit die „2 h Stretch Platte“ ebenfalls mitgedehnt werden konnte.

Nach 24 Stunden Dehnung bei oben genannten Bedingungen wurden die Platten aus dem Stretch-Inkubator genommen und mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Danach wurde die RNA-Extraktion nach dem erwähnten Protokoll durchgeführt. Dabei wurden von den 6-Well Platten jeweils zwei Wells der gleichen Bedingung zusammengeführt, um eine möglichst hohe RNA-Ausbeute zu erhalten. Somit entstanden aus den vier Bedingungen (Kontrolle, 2 h, 6 h und 24 h Stretch) jeweils n = 3 Proben.

2.2.2.4 Zellen splitten

Die Verdopplungszeit der in Kultur gehaltenen Zelllinien lag unter optimalen Bedingungen bei 20 Stunden. Bei einer Konfluenz von 70 - 80% wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 4 ml warmen PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurden 3 ml einer 0,25%igen Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und für 3 - 4 min bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche erleichtert. Sobald einzelne Zellen unter dem Mikroskop sichtbar wurden, erfolgte die Zugabe von 10 ml serumhaltigen Medium, um die Trypsin-Wirkung zu stoppen. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und das Zell-Pellet in 10 ml warmem Complete-Medium resuspendiert werden. Nun erfolgte die Bestimmung der Zellzahl: 100 µl der Zellsuspension und 100 µl Trypanblau wurden in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nachfolgend wurde entweder die gewünschte Zellzahl in neue Kulturgefäße ausgesät oder die Zellsuspension im Verhältnis von 1:10 mit Complete-Medium in T75-Kulturflaschen inkubiert.

2.2.2.5 Transfektion von NRVCN

Für verschiedene „*Knockdown*“-Strategien wurden NRVCN mit AntimiR-Oligonukleotiden transfiziert. Dieses Verfahren ermöglichte eine spezifische Herunterregulation von ausgewählten miRNAs *in vitro*. Für die Transfektion wurde das *Lipofectamine*[®] *RNAiMAX* Reagenz genutzt. Zum Zeitpunkt der Transfektion hatten die Zellen eine Konfluenz von 80 - 90%. Es wurde Transfektionsmedium ohne Antibiotika verwendet, da diese während der Transfektion toxisch wirken können.

Zu Beginn wurden die 6-Well Platten einmal mit warmem PBS gewaschen und anschließend 1,75 ml je Well Transfektionsmedium vorgelegt. Für jede Bedingung wurden zwei Ansätze gebildet: Im ersten Ansatz wurden 3 µl AntimiR-Oligonukleotid (10 µM) in 150 µl Medium aufgenommen, im zweiten Ansatz 9 µl RNAiMAX Reagenz in 150 µl Medium. Die beiden Ansätze wurden 1:1 vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt bildeten sich die Transfektionskomplexe aus AntimiR-Oligonukleotid und *RNAiMAX*. Abschließend wurden 250 µl des Transfektionsansatzes tropfenweise zu den Zellen pipettiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen und nach einem Waschschrift durch serumfreies Medium ersetzt.

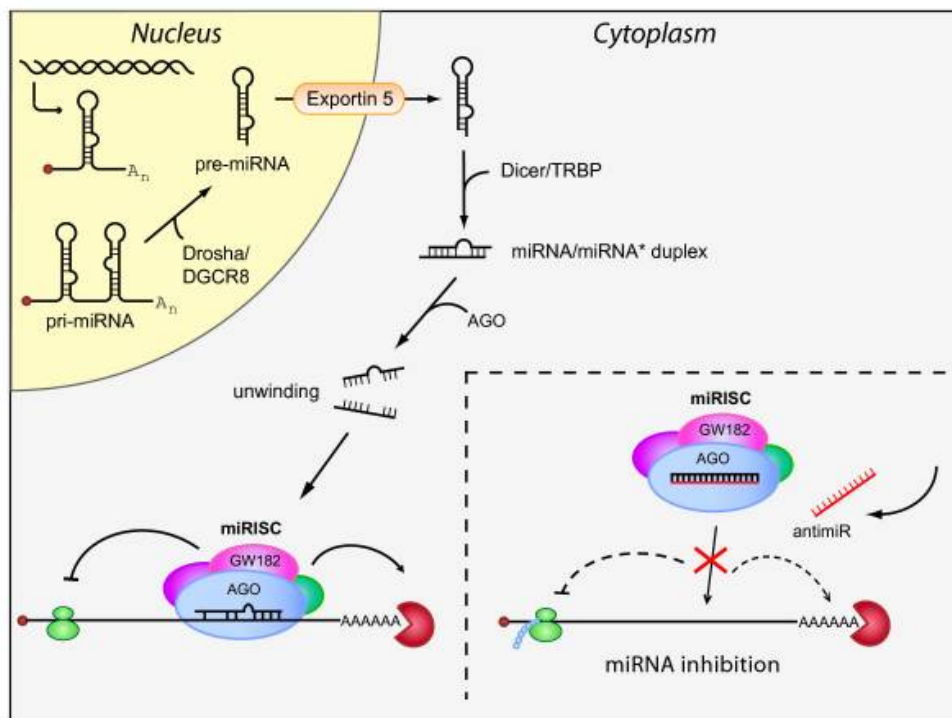


Abbildung 8: Schematische Darstellung der miRNA Inhibition.

Das Antagonistenmolekül (AntimiR) bindet irreversibel an seiner Ziel-miRNA und inhibiert so die Funktion. Durch das Fehlen der miRNA kann der RISC (engl. *RNA-induced silencing complex*) die komplementäre mRNA nicht mehr degradieren bzw. deren Translation hemmen.

Abbildung entnommen aus *Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides* (Stenvang et al., 2012).

2.2.2.6 Infektion von NRVCN

Die zuverlässige Überexpression von microRNAs in neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde durch die Infektion mit zuvor generierten adenoviralen Vektoren erreicht. Bei allen Experimenten wurde mit einer Viruslast von 50 ifu/Zelle gearbeitet. Dies galt ebenso für die adenovirale Überexpression der Kontroll-miRNA (AdmiR-neg). Für jedes Viruskonstrukt wurde zuvor ein Mastermix vorbereitet. Dazu wurde ein Viren-Aliquot von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei RT aufgetaut und durch kurzes Vortexen gemischt. Entsprechend der vorher untersuchten Virenzahl/ μl wurde mit serumfreiem Medium und der berechneten Menge des Viruskonstrukts ein Mastermix hergestellt. Die Zellen wurden 16 h nach Aussaat drei Mal mit warmem PBS gewaschen und anschließend konnte tropfenweise die definierte Menge des Mastermix auf die Zellen gegeben werden. Die Zellen wurden hiernach für 24 h im Inkubator ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) belassen, um eine suffiziente virale Infektion sicherzustellen. Nach der erfolgten

Infektion wurden die Zellen drei Mal mit warmem PBS gewaschen und frisches serumfreies Medium hinzugegeben.

2.2.3 Mikrobiologie

2.2.3.1 Herstellung von Selektivnährböden

Für die Herstellung von Selektivnährböden wurde LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar gemischt. Die Lösung wurde autoklaviert und im Wasserbad abgekühlt, bis 60 °C erreicht wurden. Die Herstellung der Agarplatten wurde unter der Sterilwerkbank vorgenommen. Das jeweilige Antibiotikum wurde in adäquater Menge mit der gleichen Temperatur zu der Lösung hinzugegeben. Statt Ampicillin wurde Carbenicillin genutzt (100 µg/ml). Kanamycin und Spectinomycin wurden in einer Konzentration von 50 µg/ml hinzugegeben, um ein selektives Bakterienwachstum zu ermöglichen. Das antibiotikahaltige Medium wurde in 10 cm Petrischalen gefüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden die Agarplatten kopfüber bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Transformation mittels Elektroporation

Für die Transformation mittels Elektroporation werden elektrokompetente Bakterien benötigt, die fähig sind, Plasmid-DNA aus dem Kulturmedium nach der Anwendung einer hohen elektrischen Spannung aufzunehmen. Es wurden elektrokompetente DH10B *E. coli* Bakterien genutzt, die bei -80 °C lagerten. Die Bakterien wurden kurz vor der Elektroporation auf Eis liegend aufgetaut. Es wurden 2 µl der Plasmid-DNA für die Transformation eingesetzt, was 5 ng DNA entsprachen. Die Plasmid-DNA wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in die 20 µl Bakteriensuspension gemischt. Die erhaltene Suspension konnte in die vorher tiefgekühlte Elektroporationsküvette überführt werden und wurde mit folgenden Parametern transformiert: 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Dabei sollte eine Dauer von 4 - 5 ms und eine Feldstärke von 12,5 kV/cm erreicht werden. Nach erfolgreicher Transformation wurde 1 ml LB-Medium zur Bakteriensuspension hinzugegeben, gemischt und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Vorinkubation im Thermomixer bei 37 °C und 700 U/min für 60 min. Anschließend wurden die Bakterien auf speziellen Selektivnährböden kultiviert, welche die Resistenz-spezifischen Antibiotika enthielten.

2.2.3.3 Aussäen von Bakterienkulturen

Erfolgreich transformierte Bakterien, die das Plasmid mit der jeweiligen Antibiotika-Resistenz enthielten, konnten auf den spezifischen Agarplatten ausgesät werden. Dazu wurden auf verschiedene Agarplatten 50 - 150 µl der Bakteriensuspension pipettiert und anschließend mit 4 - 6 sterilen Glaskugeln gleichmäßig verteilt. Die Agarplatten wurden über Kopf liegend für 14 - 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien konnten mit einer Pipettenspitze gepickt werden und zum weiteren Wachstum in eine Flüssigkultur überführt werden.

2.2.3.4 Bakterienanzucht in Flüssigkultur

Die Bakterienanzucht in Flüssigkultur erfolgte in 15 ml Röhrchen mit jeweils 6 ml LB-Medium und der oben genannten Konzentration des spezifischen Antibiotikums. Es wurde entweder eine gewachsene Kolonie mit einer Pipettenspitze von einem Selektivnährboden geerntet oder 100 µl einer Bakteriensuspension in das vorbereitete LB-Medium gegeben. Die Vermehrung erfolgte für 14 - 16 h in einem horizontalen Schüttler bei 37 °C und 200 U/min. Die Plasmid-DNA wurde am nächsten Tag mit einer Mini- oder Midi-Präp geerntet.

2.2.3.5 Herstellung von Glycerolstocks

Um eine Retransformation von Plasmiden in *E. coli* Bakterien zu vermeiden, wurden positive Klone in Glycerolstocks gelagert. Diese konnten bei Bedarf als Übernachtskultur angeimpft werden. Es wurden 100 µl Übernachtskultur mit 100 µl 40%igem (w/v) Glycerol gemischt und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Molekularbiologie

2.2.4.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Vor den hier beschriebenen Arbeiten mit RNA wurde grundsätzlich der Arbeitsplatz sowie alle benötigten Gebrauchsgegenstände mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt. Dies war notwendig, um die ubiquitär vorhandenen RNasen zu entfernen. Beim Pipettieren wurden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet, sowie RNase- und DNase-freie Reaktionsgefäße. Alle verwendeten Chemikalien wurden mit DEPC-behandelten ddH₂O angesetzt. Die Extraktion von RNA aus Zellen erfolgte mit QIAzol Lyse Reagenz. Dazu wurden die verwendeten 6-Well Platten zwei Mal mit warmem PBS gewaschen und der Puffer anschließend abgesaugt.

Je Well wurde 1 ml QIAzol Lyse Reagenz hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren konnten die Zellen von der Membran gelöst und lysiert werden. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden je zwei Wells der gleichen Versuchsbedingung zu einer Probe „gepoolt“. Die gelöste Zellsuspension wurde in RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Zu der Suspension wurden 200 µl Chloroform gegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig für 15 s invertiert und anschließend für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugation mit 14.000 U/min für 15 min bei 4 °C um die Phasen zu trennen. Es entstand eine obere farblose, wässrige Phase mit der enthaltenen RNA, eine Interphase mit Proteinen und eine untere rote Phenol-/Chloroformphase. Die farblose, wässrige Phase wurde vorsichtig - ohne Berührung der Interphase - in ein neues RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur RNA-Fällung wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Diese Lösung wurde für 10 min auf Eis inkubiert und nachfolgend bei 14.000 U/min für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Am Boden des Reaktionsgefäßes sammelte sich das RNA-Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Um das Pellet zu waschen wurde 1 ml 75% (v/v) Ethanol in das Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 14.000 U/min bei 4 °C für 5 min wurde der Überstand abgekippt und das RNA-Pellet bei Raumtemperatur für 10 min getrocknet. Das Pellet wurde in 30 µl DEPC-ddH₂O aufgenommen und die Konzentration im NanoDrop™ Spektralphotometer gemessen.

2.2.4.2 RNA-Extraktion aus Gewebe

Jeweils 100 mg (Ausnahme: Leber 50 mg) des zuvor in flüssigem Stickstoff bei -196 °C tiefgefrorenen Gewebes wurden in vorbereitete 15 ml Röhrchen gegeben, welche 1 ml QIAzol Lyse Reagenz enthielten. Das Gewebe wurde mit dem Ultra-Turrax 20 s lang homogenisiert. Das Reaktionsgefäß wurde während der Homogenisierung gekühlt, indem es auf Eis lagerte. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 4700 U/min für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der klare Überstand vorsichtig in ein frisches DNase- und RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die nachfolgenden Schritte der RNA-Extraktion aus Gewebe entsprechen denen der o.g. Extraktion aus Zellen.

2.2.4.3 Aufreinigung der RNA

Nach der Isolation von RNA enthielten die Proben oft noch Anteile genomischer DNA und andere Verunreinigungen. Diese sollten vor der weiteren Verarbeitung entfernt werden. Hierfür wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet. Es wurde explizit auf eine

Aufreinigung mittels DNase-Verdau verzichtet, weil die Konzentration der fragilen microRNAs durch diesen Verdauschritt oft stark sinkt.

Die in 30 µl DEPC-ddH₂O aufgenommene RNA wurde auf 100 µl verdünnt und mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol durch Vortexen vermischt. Die Lösung wurde für 10 min bei 14.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen: Die obere, wässrige Phase enthielt die gelöste RNA, die untere Phase enthielt Proteine, in der Interphase befanden sich DNA-Anteile.

Die oberste Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues RNase- und DNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch die Zugabe von 300 µl 99,99% (v/v) Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Es folgte eine Zentrifugation für eine Stunde bei 14.000 U/min und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 500 µl 75%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation an (5 min, 13.000 U/min, 4 °C). Nachdem der Überstand abgenommen wurde, folgte eine Lufttrocknung des RNA-Pellets bei Raumtemperatur für 5 - 10 Minuten. Das Pellet wurde in 12 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen und die Konzentration im NanoDrop™ Spektralphotometer gemessen.

2.2.4.4 Plasmid-DNA Extraktion „Mini-Präp“

Um Plasmid-DNA in kleinen Mengen aus Bakterienkulturen zu gewinnen, wurde das NucleoSpin® Mini-Preparation-Kit verwendet. Jeweils 2 ml Bakteriensuspension aus einer Flüssigkultur wurden in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 s bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Bakterien-Pellet in 500 µl auf 4 °C gekühlten A1 Resuspensionspuffer aufgenommen. Nachfolgend wurden 500 µl des A2 Lyse Puffers zu der Suspension gegeben und durch Invertieren gemischt. Es erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Die alkalische Lyse wurde durch Zugabe sowie Auf- und Abpipettieren von 600 µl A3 Neutralisierungspuffer beendet. Dabei fiel die chromosomale DNA aus. Bei der nächsten Zentrifugation (10 min bei 13.000 U/min) konnte die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA getrennt werden. Der Überstand wurde auf eine vorbereitete Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Während dieses Schrittes bindet die Plasmid-DNA an die Säulenmembran. Der Durchfluss wurde verworfen und ein Waschvorgang mit 500 µl des 50 °C warmen AW (Waschpuffer) für 1 min bei 13.000 U/min durchgeführt. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift mit 600 µl A4 Puffer und einer Zentrifugation von 1 min bei 13.000 U/min an. Um die Säulenmembran zu trocknen und alle Rückstände des ethanolhaltigen Puffers zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 13.000 U/min.

Die Säule wurde nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 40 µl des auf 70 °C erwärmten AE (Elutionspuffer) auf die Säule gegeben. Es schloss sich eine Inkubation von 2 min bei Raumtemperatur an. Zuletzt wurde für 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und die Konzentration des gewonnenen Eluats im NanoDrop™ Spektralphotometer gemessen.

2.2.4.5 Extraktion von Plasmid-DNA in großem Umfang „Midi-Präp“

Zur Extraktion großer Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das Qiagen® Plasmid *Plus* Midi Kit genutzt. Die Ausbeute lag bei dieser Methode in der Regel zwischen 100 und 200 µg. Einzelne Kolonien oder 100 µl einer Bakteriensuspension wurden in LB-Medium und dem spezifischen Antibiotikum über Nacht in 50 oder 100 ml Kulturflaschen amplifiziert, um das gewünschte Plasmid in *E. coli* Bakterien zu gewinnen. Jeweils 50 ml der Bakteriensuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 15 min bei 7000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das so entstandene Bakterien-Pellet konnte in 2 ml P1 Puffer (Resuspensionspuffer mit RNase A) aufgenommen werden. Zur alkalischen Lyse wurden 2 ml P2 Lyse Puffer zu der Suspension gegeben und durch Invertieren gemischt. Es folgte eine Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2 ml Neutralisierungspuffer (S3) hinzugegeben und durch Schütteln gemischt, um die alkalische Lyse zu beenden. Das Lysat wurde sofort in ein neues QIAFilter Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Einbringen eines Stempels in das Reaktionsgefäß, konnte das Lysat durch die Membran in neues Reaktionsgefäß filtriert werden. Dabei wurden überschüssige Zelltrümmer in der Membran gesammelt. Das Filtrat wurde auf eine Säule gegeben und an eine Unterdruckpumpe angeschlossen. Die Suspension wurde mit einem Unterdruck von ~300 mbar durch die Säule gesogen, wobei die Plasmid-DNA in der Säulenmembran gebunden wurde. Dem folgte ein erster Waschschrift: 700 µl ETR Puffer wurde auf die Säule gegeben und wiederholt ein Vakuum appliziert. Durch diesen Schritt konnten die Endotoxine entfernt werden. Nachfolgend wurden 700 µl des Ethanol-haltigen PE Waschpuffers auf die Säule gegeben und erneut mit Unterdruck durch die Membran gesogen. Um die vorhandenen Rückstände des Puffers zu entfernen, folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 U/min. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und zur Elution mit 200 µl EB-Puffer (55 °C) für 3 min bei 55 °C inkubiert. Es erfolgte eine letzte Zentrifugation für 1 min bei 13.000 U/min, um die Plasmid-DNA zu eluieren.

2.2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach der jeweiligen Größe und zur Überprüfung der Qualität des Degradierungsgrades der DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Es wurde zuerst ein Agarose-Gel gegossen, wobei entsprechend der nachzuweisenden Fragmente Agarose in TAE-Puffer gelöst wurde: Bei Nukleotidketten über 1000 Basenpaaren mit 1% (w/v) Agarose, bei kürzeren Fragmenten mit 1,5% (w/v) Agarose. Das Gemisch wurde solange in der Mikrowelle erhitzt und zwischendurch geschwenkt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Das Gemisch kühlte auf 60 °C ab und es wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben.

Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen und ein Kamm für die Beladungstaschen eingesetzt. Nach 30 - 60 Minuten war das Gel polymerisiert und konnte in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese Kammer gelegt und der Kamm entfernt werden. Die DNA-Proben wurden mit je 5 µl beschwerendem Ladepuffer versehen und danach konnten jeweils 20 µl der DNA-Proben in die Taschen pipettiert werden. Zusätzlich wurde in eine Tasche 12 µl von einem DNA-Größenmarker gegeben.

Je nach Größe der Kammer wurde eine Spannung von 100 - 140 V angelegt. Die negativ geladene DNA konnte nun im Agarose-Gel wandern: Kleine DNA-Fragmente wandern schneller als größere. Das Ethidiumbromid interkalierte in die DNA und die Fragmente konnten somit später bei einer Wellenlänge von 266 nm sichtbar gemacht werden. Nach der Auftrennung wurde das Gel aus dem Schlitten entnommen und auf einem UV-Transilluminator digital fotografiert.

2.2.4.7 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, welche während der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, konnten mit dieser Methode isoliert und dekontaminiert werden. Für die Extraktion wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit verwendet. Auf dem UV-Transilluminator konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht werden und die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gel-Fragment wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und auf einer Feinwaage gewogen. Je 100 mg Gel wurden 300 µl QG-Puffer zu dem Fragment gegeben. Das Gemisch wurde anschließend bei 50 °C für 10 min im Schüttler inkubiert, bis es sich vollständig gelöst hatte. 500 µl der Probe wurden auf eine Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Die DNA konnte bei diesem Schritt in der Silicium-Membran gebunden werden. Der Durchfluss wurde verworfen und dieser Schritt so lange wiederholt, bis das Gel-Puffer-Gemisch vollständig aufgebraucht war. Zum

Waschen wurden 750 µl des ethanolhaltigen PE-Puffers auf die Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 2 min, um die Säule zu trocknen. Um die DNA zu eluieren, wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 22 µl EB-Puffer hinzugegeben. Die Säule wurde für 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, um somit die membrangebundene DNA zu eluieren.

2.2.4.8 Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA

Die Vorbereitung von Plasmiden für die Ligation erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme erkennen und schneiden palindromische DNA-Sequenzen an bestimmten Positionen. Zum Verdau wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

Tabelle 2-8: Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA

0,1 - 10 µg Plasmid-DNA	max. 8 µl
Reaktionspuffer 2x	10 µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	0,25 µl
DEPC-ddH ₂ O	ad 20 µl

Die Restriktionsverdauung wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Restriktion mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Bei der Auftrennung wurde überprüft, ob das Bandenmuster mit dem gewünschten Fragment übereinstimmt.

2.2.4.9 Photometrische DNA- und RNA-Quantifizierung

Mittels NanoDrop™ Spektralphotometer wurde die Konzentration und Reinheit der verwendeten RNA- und DNA-Proben gemessen. Die optische Dichte wurde bei 260 und 280 nm bestimmt und die Konzentration je nach verwendeter Probenart automatisch berechnet. Die Reinheit konnte mittels 260/280-Verhältnis bestimmt werden. Normalerweise lag der Wert für reine Nukleinsäuren zwischen 1,8 und 2,0. Lag der Wert darunter, enthielt die Probe Verunreinigungen durch Proteine. Jede Messung wurde drei Mal durchgeführt und für den weiteren Versuchsablauf der Mittelwert bestimmt.

2.2.4.10 Reverse Transkription

2.2.4.10.1 SuperScript™ First-Strand Synthese

Die Umwandlung von RNA zur komplementären DNA (cDNA) wurde mit dem *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die unten genannte Reaktion angesetzt, für 5 min bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Dies ermöglichte eine Denaturierung von Sekundärstrukturen.

Tabelle 2-9: Reaktionsansatz zur Denaturierung

1 µg RNA	max. 12 µl
Random Hexamer Primer (50-250 ng)	0,5 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
DEPC-ddH ₂ O	ad 13,5 µl

Anschließend wurde der Master-Mix für die reverse Transkription angesetzt:

Tabelle 2-10: Master-Mix für die reverse Transkription

5x First-Strand Puffer	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
RNaseOUT RNA Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™ Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,5 µl
Gesamt	6,5 µl

Der erste Reaktionsansatz wurde vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren zu dem Master-Mix auf ein Gesamtvolumen von 20 µl hinzugefügt. Anschließend wurde folgendes Temperaturprotokoll in einem Thermocycler durchgeführt:

Tabelle 2-11: Thermocycler-Protokoll:

Anlagerung	10 min	25 °C
Reverse Transkription	60 min	50 °C
Inaktivierung	15 min	70 °C
Kühlen	∞	4 °C

Die Proben wurden danach sofort auf Eis gekühlt. Bei der reversen Transkription wurde ~1 µg cDNA synthetisiert, die anschließend auf 2 ng/µl verdünnt und danach mithilfe einer quantitativen Realtime-PCR weiter analysiert wurde.

2.2.4.10.2 TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transkription

Die Umwandlung von microRNA zur komplementären DNA (cDNA) wurde mit dem *TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit* durchgeführt. Bei dieser reversen Transkription (RT) wurden spezifische RT-Primer eingesetzt, welche sich an die nachzuweisenden microRNAs anlagerten. Die RT-Primer wiesen eine Haarnadelstruktur auf, damit trotz der geringen Länge der miRNAs von 22-26 Nukleotiden, nur einzelsträngige und reife miRNAs gebunden wurden.

Als erstes wurde ein RT-Master-Mix hergestellt:

Tabelle 2-12: Reaktionsansatz für RT-Master-Mix

100 mM dNTPs (mit dTTP)	0,15 µl
MultiScribe [™] Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,00 µl
10x Reverse Transkription Puffer	1,50 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
Nukleasefreies H ₂ O	4,16 µl
Gesamt	7,00 µl

Im nachfolgenden Schritt wurden jeweils 7 µl des RT-Master-Mix mit 5 µl RNA (2 ng/µl) zusammen pipettiert und kurz zentrifugiert. Für die abschließende Synthese wurde zu jedem Reaktionsansatz noch 3 µl des spezifischen RT-Primers hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Tabelle 2-13: Thermocycler-Protokoll

Anlagerung	30 min	16 °C
Reverse Transkription	30 min	42 °C
Inaktivierung	5 min	85 °C
Kühlen	∞	4 °C

Die cDNA-Proben wurden umgehend auf Eis gekühlt und anschließend in einer microRNA-spezifischen quantitativen Realtime-PCR (*TaqMan[®] MicroRNA Assay*) analysiert.

2.2.4.11 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist es möglich, ausgewählte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Spezifische Abschnitte genomischer DNA, Plasmid-DNA oder cDNA können durch den Einsatz einer hitzestabilen *Taq*-Polymerase beliebig vervielfältigt werden. Im ersten Schritt wurde die Doppelstrang-

DNA bei 94 °C denaturiert und lag demnach einzelsträngig vor. Es folgte die Anlagerung (engl. *annealing*) der revers komplementären Oligonukleotide (Primer), die bei ca. 55 °C mit den zu amplifizierenden DNA-Abschnitten hybridisierten. Anschließend synthetisierte die DNA-Polymerase, durch den Einbau von Nukleotiden, einen komplementären Doppelstrang. Diese Verlängerung (Elongation) erfolgte bei 72 °C, ausgehend von den hybridisierten Primern. Bei jedem Zyklus verdoppelte sich die DNA, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung erreicht werden konnte. Nachfolgend werden Reaktionsansatz und Amplifizierungsprotokoll beschrieben:

Tabelle 2-14: Reaktionsansatz für Polymerase-Kettenreaktion

dNTPs (10 mM)	1 µl
DreamTaq DNA-Polymerase	1 µl
10x konzentrierter DreamTaq-Puffer	2,5 µl
Primer vorwärts	0,5 µl
Primer rückwärts	0,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
DNA-Probe	1 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

In Abhängigkeit der Größe des gewünschten DNA-Abschnittes wurde die entsprechende Anzahl und Länge der Reaktionszyklen gewählt. Die Anlagerungstemperatur wurde für die gewählten Primer optimiert.

Tabelle 2-15: Amplifizierungsprotokoll für Polymerase-Kettenreaktion

Denaturierung	2 min	94 °C	} 30 – 35 Zyklen
Denaturierung	15 – 30 s	94 °C	
Anlagerung	30 – 60 s	53,5 – 58 °C	
Verlängerung	30 – 60 s	72 °C	
Finale Verlängerung	7 min	72 °C	
Kühlen	∞	4 °C	

2.2.4.12 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Untersuchung der Genexpression bestimmter mRNAs wurde mit der quantitativen Realtime-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde von ausgewählten mRNAs die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert und anschließend untersucht. Für die

qRT-PCR verwendeten wir den iQ™ Multiplex Powermix, mit dem es möglich ist, mehrere Transkripte in einer Reaktion quantitativ zu messen. Dazu wurde ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der bei der Amplifikation in den neu synthetisierten DNA-Strang eingefügt wird. Nach jedem Reaktionszyklus wurde die Emission detektiert und die Signalstärke entsprach der gebildeten cDNA-Menge. Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte dabei mit spezifischen Primern und Sonden für die Transkripte der zu untersuchenden Gene. Als interne Normalisierungs-Kontrolle wurde *Rpl32* (*housekeeping gene*) verwendet.

Zunächst wurde ein Master-Mix vorbereitet, von dem jeweils 18 µl pro Well in eine durchsichtige 96-Well Detektionsplatte vorgelegt wurden. Zu dem Master-Mix wurden jeweils 2 µl cDNA-Probe (4 ng) hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte mit einer durchsichtigen, selbstklebenden Folie verschlossen, vorsichtig manuell gemischt, kurz zentrifugiert und in den Realtime-PCR Detektor gelegt.

Tabelle 2-16: Reaktionsansatz für Multiplex quantitative Realtime-PCR

iQ Multiplex Powermix (2x)	10 µl
Primer vorwärts (10 µM)	0,5 µl
Primer rückwärts (10 µM)	0,5 µl
Sonde	1 µl
Nukleasefreies H ₂ O	6 µl
Gesamt	18 µl

Nach jedem Reaktionszyklus wurde die Fluoreszenz jedes Wells detektiert. So konnte auf einer Platte mit verschiedenen Primern und Sonden die Expression mehrerer Gene quantifiziert werden. Das folgende Amplifizierungsprogramm wurde für die Multiplex qPCR verwendet:

Tabelle 2-17: Amplifizierungsprotokoll für Multiplex qRT-PCR

Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	} 40 Zyklen
Denaturierung	15 s	95 °C	
Annealing und Elongation	60 s	60 °C	

Die Quantifizierung erfolgte nach dem Prinzip des „Cycle Threshold“. Dabei wurde ein Fluoreszenzsignal erst detektiert und gezählt, wenn es sich signifikant vom Hintergrund abhebt. Die cDNA-Proben wurden in Triplets verwendet und jede Messung erfolgte mit Duplikaten. Anschließend wurde der Mittelwert bestimmt und weiter analysiert.

2.2.4.13 TaqMan[®] microRNA Assay

Zur speziellen Quantifizierung von miRNAs wurde das *TaqMan[®] microRNA Assay* verwendet. Die RNA-Templates wurden wie bereits beschrieben in die komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Bei der *TaqMan[®] Realtime-PCR* gibt es spezielle Sonden, die sich an den gewünschten Abschnitt der cDNA anlagern (*Annealing*). Die Sonde enthält einen Reporter an dem ein Fluoreszenzfarbstoff und ein sog. *Quencher* („Löcher“) gebunden ist. Kommt es nun zu einer Hybridisierung der Sonde mit der cDNA, kann die DNA-Polymerase den DNA-Strang synthetisieren. Bei diesem Elongationsschritt schneidet die Polymerase den *Quencher* vom Reporter ab, der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt und kann somit detektiert werden. Nicht bindende Sonden emittieren kein Signal. Mit jedem Reaktionszyklus erfolgt - *Annealing* der Sonde vorausgesetzt - eine Vervielfältigung des DNA-Abschnittes und eine Fluoreszenzemission, die sichtbar gemacht werden kann. Als endogene Normalisierungskontrolle wurde die snRNA *RNU6B* verwendet. Diese ist eine „Housekeeping“-RNA und liegt konstitutiv exprimiert vor.

Folgender Reaktionsansatz wurde angesetzt und in eine 96-Well Detektionsplatte pipettiert:

Tabelle 2-18: Reaktionsansatz für TaqMan[®]

TaqMan MicroRNA Assay Sonde (2x)	1,00 µl
cDNA-Produkt (aus reverser Transkription)	1,33 µl
TaqMan 2x Universal PCR Master-Mix	10,00 µl
Nukleasefreies H ₂ O	7,67 µl
Gesamt	20,00 µl

Es wurde unter einer sterilen, verdunkelten Werkbank gearbeitet, um die lichtempfindlichen Sonden zu schützen. Anschließend wurde die Detektionsplatte mit durchsichtiger Folie zugeklebt, kurz zentrifugiert und auf Eis gekühlt in den Detektor gesetzt. Das folgende PCR-Protokoll wurde durchgeführt:

Tabelle 2-19: PCR-Protokoll

AmpliTaq Gold [®] Enzym-Aktivierung	10 min	95 °C	} 40 Zyklen
Denaturierung	15 s	95 °C	
Annealing und Elongation	60 s	60 °C	

Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip des Cycle Threshold. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *Sequence Detection Software* der Firma *Applied Biosystems*.

2.2.4.14 Luciferase-Assay zur Bestätigung der Zielstrukturen

Um die Aktivität des Firefly-Luciferase-Enzyms quantitativ zu bestimmen, wurde das *pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression System* der Firma *Promega* genutzt. Dazu wurde das Luciferase-Gen hinter einen Promoter kloniert. Dieses Luciferase-Gen wird auch als Reporter-Gen bezeichnet. Erfolgt die Luciferase-Expression in Abhängigkeit eines bestimmten Signalweges, kann der Assay die Aktivität in dem Signalweg indirekt messen.

Die Assays wurden mit NRVCM oder C2C12-Myoblasten in 12-Well Platten durchgeführt. 48 Stunden nach der Kultivierung der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit rekombinanten Adenoviren infiziert, welche die Expression der Firefly-Luciferase in Kardiomyozyten bewirkten. Die Renilla-Luciferase-Aktivität wurde zur Normalisierung der Messwerte genutzt. Nach 24 Stunden wurde das virushaltige Kulturmedium abgenommen und die Zellen zwei Mal mit gekühltem PBS gewaschen. Pro Well wurden 100 µl des Reporter-Lyse-Puffer dazugegeben, um die Zelllyse einzuleiten. Es folgten drei Einfrier-Auftau-Zyklen bei -80 °C bzw. 37 °C, um die Freisetzung intrazellulärer Proteine zu verstärken. Anschließend wurde die 12-Well Platte für 15 min bei Raumtemperatur auf einen horizontalen Schüttler gelegt. Nachfolgend wurden 20 µl des Zelllysats in ein Well einer Chemolumineszenz-kompatiblen 96-Well Platte überführt. Diese Platte wurde zur Aktivitätsmessung in einen *Infinite® M200 Pro* Luminator gesetzt. Die Chemolumineszenz-Lösungen wurden automatisch in die Wells injiziert. Zuerst wurde die Lösung A hinzugegeben, um die Aktivität der Firefly-Luciferase zu messen. Die im nächsten Schritt injizierte Lösung B dämpfte die Firefly-Lumineszenz. Dadurch konnte die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen und somit die Normalisierung der Chemolumineszenz bestimmt werden.

2.2.4.15 Generierung rekombinanter Adenoviren

Rekombinante Adenoviren wurden generiert, um miRNAs in NRVCM transient zu überexprimieren. Diese Klonierung erfolgte mithilfe des *BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits* von Invitrogen. Dieser Vektor ist kompatibel zum *Gateway®*-Klonierungssystem. Zur Generierung rekombinanter Adenoviren wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Generierung von Expressionsvektoren (pcDNA6.2-GW/miR)
2. Rekombinierung des Entry-Klons in den Donor-Vektor (pDONR™221)
3. Klonierung eines Destinations-Vektors (pAd/CMV/V5-DEST)

Generierung von Expressionsvektoren

Die zu überexprimierenden miRNA-Sequenzen wurden mithilfe von Oligonukleotiden synthetisiert. Diese pre-miRNA Oligonukleotide lagen einzelsträngig vor und wurden mit 10x Oligo-Annealing Puffer zu einem doppelsträngigen Oligonukleotid (ds Oligo) angelagert. Es folgte die Ligation in den linearisierten pcDNA6.2-GW/miR Expressionsvektor mit der T4 DNA Ligase (1 U/μl). Dabei konnte die zu amplifizierende Sequenz in die *attB*-Bindungsstelle inseriert werden. Der Vektor enthielt dementsprechend die gewünschte *attB*-Sequenz, einen CMV-Promoter und die Spectinomycin-Resistenzkassette.

Die so gebildeten Plasmide wurden in elektrokompente *OneShot*[®] *TOP10 E.coli*-Bakterien transformiert und auf speziellen Agarplatten mit Spectinomycin (50 μg/ml) kultiviert. Durch die im Vektor inserierte Resistenzkassette überlebten nur die erfolgreich transformierten Bakterien. Es folgte eine DNA-Extraktion und eine Sequenzierung, nach welcher nur positive DNA-Plasmide weitergenutzt wurden.

Rekombinierung des Entry-Klons in den Donor-Vektor

Mit dem nächsten Schritt wurde die *attB*-flankierte Sequenz in den pDONR[™]221 Donor-Vektor rekombiniert. Hier wurde die BP-Clonase-Reaktion genutzt: Dazu wurden 150 ng des linearisierten *attB*-Entry-Klons, 150 ng pDONR[™]221 Donor-Vektor und 1 μl BP Clonase[™] II Enzym in einer 10 μl Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die BP Clonase kann in dem zirkulären Donor-Vektor die *attP*-Bindungsstelle schneiden. Dadurch kann die *attB*-flankierte Sequenz an dieser Stelle eingesetzt werden. Mit diesem Schritt wird aus dem ursprünglichen *attP*-Vektor ein so genannter *attL*-Vektor rekombiniert, welcher die gewünschte Sequenz enthält. Die Plasmide werden durch Elektroporation in *OneShot*[®] *TOP10 E.coli*-Bakterien transformiert und auf Agarplatten mit Kanamycin (50 μg/ml) ausgesät. Der Donor-Vektor enthält eine Kanamycin-Resistenzkassette.

Klonierung eines Destinations-Vektors:

Der letzte Schritt gleicht der BP-Clonase-Reaktion. Hier wird der Sequenz tragende Entry-Klon des Donor-Vektors mithilfe der LR-Rekombinationsreaktion in den finalen Destinationsvektor (pAd/CMV/V5-DEST) transferiert. Dazu wurde 1 μl des Sequenz-tragenden Donor-Vektors (150 ng), 1 μl des Expressionsvektors (150 ng) sowie 6 μl TE-Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 2 μl LR Clonase[™] II durch Auf- und Abpipettieren dazu gemischt und für eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Um die LR Clonase abzubauen, wurde 1 μl Proteinase K hinzugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert.

Die entstandene Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation in elektrokompetente *E. Coli*-Bakterien transformiert und auf Selektivnährböden ausgesät. Die gewachsenen Kolonien wurden geerntet und in Flüssigkulturen angesetzt. Die DNA wurde mithilfe einer „Mini-Präp“ extrahiert und anschließend mithilfe einer Sequenzierung überprüft (GATC Biotech AG). Positive Klone des Expressionsvektors wurden in Bakterienkulturen angesetzt, um größere Mengen zu amplifizieren. Daran schloss sich eine „Midi-Präp“ an und 5 µg des extrahierten Expressionsvektors wurden mithilfe der Restriktionsendonuklease *PacI* verdaut. Mit diesem Schritt konnte der für den Adenovirus codierende DNA-Abschnitt aus dem Plasmid herausgelöst werden. Die Plasmid-Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, dargestellt und kontrolliert. Vor der Produktion des rekombinanten Adenovirus wurden HEK-293A-Zellen in 6-Well Platten kultiviert. 24 h später erfolgte die Transfektion von 1 bzw. 2 µg der Adenovirus-DNA in den HEK-293A-Zellen mit Transfektionsmedium. Das Transfektionsmedium wurde 24 h später durch Complete-Medium ersetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und in eine T75-Kulturflasche überführt, die 12 ml Complete-Medium enthielt. Die Zellen wurden im weiteren Verlauf zwei Mal am Tag unter dem Mikroskop untersucht. Nach 10 - 12 Tagen setzte die Lysierung der Zellen durch das Virus ein. Sobald ca. 80% der Zellen betroffen waren, erfolgte die Extraktion der Adenoviren. Die Zellen mitsamt dem virushaltigen Medium wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgten drei Einfrier-Auftau-Zyklen bei -80 °C bzw. 37 °C. Durch diesen Schritt wurden die restlichen Zellen lysiert und die Viren freigesetzt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 3000 U/min und 4 °C blieben am Boden des Röhrchens die Zelltrümmer zurück und der virushaltige Überstand wurde in ein frisches 15 ml Röhrchen überführt. Dieses Röhrchen wurde anschließend als „crude lysate“ bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.2.4.16 Amplifikation rekombinanter Adenoviren

Für die Amplifikation von Adenoviren wurden HEK-293A-Zellen in T175 cm²-Flaschen kultiviert. Sobald die Konfluenz der Zellen bei über 90% lag, wurde das Kulturmedium abgesaugt. Anschließend wurden 35 ml Complete-Medium mit 100 µl des hochkonzentrierten Viruslysats (*crude lysate*) vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit betrug 2 Tage bei 37 °C. Nachdem mehr als 90% der Zellen infiziert waren, bewegten sie sich frei und infektionsbedingt abgerundet im Medium. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgten drei Einfrier-Auftau-Zyklen bei -80 °C bzw. 37 °C. Die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 3000 U/min und 4 °C

brachte die Zelltrümmer an den Boden des Gefäßes. Als Überstand blieb das Viruslysats und wurde in 1 ml „Aliquots“ überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.17 Titerbestimmung von Adenoviren

Für die Bestimmung des Adenovirus-Titers wurden HEK-293A-Zellen mit einer Konzentration von 300.000 Zellen/Well auf 12-Well Platten ausgesät. Zunächst wurden mit Complete-Medium folgende Verdünnungen des Viruslysats hergestellt: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

Das Medium wurde anschließend von den Zellen abgenommen und je Well 900 µl Complete-Medium vorgelegt. Jeweils 100 µl der virushaltigen Verdünnung von 10^{-3} bis 10^{-7} wurden in Duplikaten zu den Zellen hinzu pipettiert. Die Konzentration von 10^{-2} wurde als Positiv-Kontrolle nur in ein Well gegeben. Es folgte eine Inkubation für 48 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und einmal mit warmem PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Methanol (-20 °C) je Well und einer Inkubation für 10 min bei -20 °C. Es folgten drei Waschschrte mit 1% (w/v) BSA in PBS. Nun wurden je Well 100 µl des FITC-konjugierten anti-Hexon-Antikörpers, 1:50 gelöst in 1% (w/v) BSA dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen abgedunkelt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden danach drei Mal mit 1% (w/v) BSA in PBS gewaschen. Die Titerbestimmung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die infizierten, durch den Antikörper markierten, Zellen leuchteten grün. Von jeder Verdünnung wurden 10 Gesichtsfelder in beiden Duplikaten gezählt. Die Titerbestimmung wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Titer [ifu/ml]} = \frac{\text{infizierte Zellen pro Gesichtsfeld} * \text{Gesichtsfelder pro Well}}{\text{Virusvolumen [ml]} * \text{Verdünnungsfaktor}}$$

2.2.4.18 MicroRNA-Microarray

Für die genomweite miRNA-Expressionsanalyse wurde ein Microarray durchgeführt. Mithilfe des *Agilent Ratten miRNA Microarray (Release 16.0: September 2010)* konnten die Expressionsprofile von 679 reifen microRNAs der Spezies *Rattus norvegicus* detektiert werden. Die Markierung, Hybridisierung und Detektion wurde von der *Comprehensive Biomarker Center GmbH* (Heidelberg) durchgeführt.

Vorbereitung und Markierung der Proben

Zunächst wurden neonatale ventrikuläre Rattenkardiomyozyten biomechanischem Stress in Form von dynamischer biaxialer Dehnung für 2, 6 oder 24 Stunden (116% Dehnung, 1 Hz) ausgesetzt. Es folgte eine RNA-Extraktion, sowie eine Qualitätskontrolle und eine

Konzentrationsmessung. Anschließend wurde die RNA mithilfe des *miRNA Complete Labeling and Hyb Kits* fluoreszenz-markiert. Dabei erfolgte die Ligation eines Cyanine 3-pCp Moleküls an das 3'-Ende eines RNA-Moleküls mit einer Effizienz > 90%.

Als Erstes wurden in vier Verdünnungsschritten (1:100) die Labeling- und Hyb-Spike-In Lösungen hergestellt. Dazu wurden in jedem Schritt jeweils 2 µl der Lösung mit 198 µl nukleasefreiem H₂O bzw. Dilutionspuffer durch Schütteln vermischt. Nachfolgend wurden die RNA-Proben dephosphoryliert. Dazu wurde ein CIP Master Mix vorbereitet:

Tabelle 2-20: Reaktionsansatz für CIP Master Mix

10x Calf Intestinal Phosphatase Puffer	0,40 µl
Labeling Spike-In Lösung (Verdünnung)	1,10 µl
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	0,50 µl
<hr/>	
Gesamt	2,00 µl

Danach wurden 2 µl (50 ng/µl) RNA-Probe und 2 µl CIP Master Mix in einem nukleasefreiem 1,5 ml Reaktionsgefäß durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Es folgte die Dephosphorylierung im Thermomixer bei 37 °C für 30 Minuten. Um die RNA zu denaturieren, wurde zu der oben genannten Lösung jeweils 2,8 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben, gemischt und für mindestens 5 und maximal 10 Minuten bei 100 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Denaturierung wurde das Reaktionsgefäß sofort auf Eis gekühlt, um eine Wiederanlagerung der RNA zu vermeiden.

Anschließend wurde die RNA mit dem Fluoreszenz-Farbstoff ligiert. In diesem Schritt wurde ein Cyanine 3-pCp Molekül an das 3'-Ende eines RNA Moleküls gebunden. Dazu wurde zunächst ein Ligation Master Mix hergestellt:

Tabelle 2-21: Reaktionsansatz für Ligation Master Mix

10x T4 RNA Ligase Puffer	1,00 µl
Cyanine 3-pCp	3,00 µl
T4 RNA Ligase	0,50 µl
<hr/>	
Gesamt	4,50 µl

4,5 µl des Ligation Master Mix wurden mit der RNA-Probe (6,8 µl) zu einem Gesamt-Reaktionsvolumen von 11,3 µl gemischt. Die Ligation erfolgte bei 16 °C für 2 Stunden im Kühlblock. Nach der Markierung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff wurde die Probe mithilfe der *Micro Bio-Spin P-6 Gel-Säule* gereinigt. Die Gel-Säule wurde in ein frisches nukleasefreies 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 38,7 µl nukleasefreies H₂O zu der

fluoreszenz-markierten Probe hinzugegeben, um ein Gesamtvolumen von 50 µl zu erhalten. Diese 50 µl wurden vorsichtig auf die Gel-Säule pipettiert, ohne das Gel zu berühren. Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 U/min für 4 min, um die aufgereinigte RNA zu eluieren. Die Säule wurde verworfen und das Eluat auf Eis gekühlt.

Nachfolgend wurden die Proben mithilfe eines Vakuumkonzentrators bei konstantem Unterdruck und einer Temperatur zwischen 45 °C und 55 °C getrocknet und konzentriert. Alle 30 Minuten wurden die Proben durch leichtes Beklopfen kontrolliert und in der Regel wurde nach 60 Minuten das RNA-Pellet sichtbar. Das Pellet wurde anschließend in 17 µl nukleasefreiem H₂O aufgenommen.

Hybridisierung und Waschen

Als erstes wurde der Hybridisierungs-Mix vorbereitet:

Tabelle 2-22: Reaktionsansatz für Hybridisierungs-Mix

Fluoreszenz-markierte RNA-Probe	17,00 µl
Hyb Spike-In Lösung (Verdünnung)	1,00 µl
10x Gene Expression Blocklösung	4,50 µl
2x Hi-RPM Hybridisierungspuffer	22,50 µl
Gesamt	45,00 µl

Der Hybridisierungs-Mix wurde für 5 min bei 100 °C inkubiert und danach sofort für 5 min in ein eisgekühltes Wasserbad überführt. Im Anschluss wurde ein sauberer Objektträger in eine mit einem Dichtungsring umrandete *Agilent SureHyb* Kammer gelegt und der Hybridisierungs-Mix vorsichtig von links nach rechts blasenfrei auf den Objektträger pipettiert. Eine Sonden-markierte Microarray-Platte wurde parallel, kopfüber auf den Objektträger gelegt, sodass der Barcode und die Sonden nach unten zeigten. Anschließend wurde die Kammer mit einer Abdeckplatte und einer Einspannklemme verschlossen. Diese Kammer wurde nun in einen Rotator im Hybridisierungssofen gespannt und für 20 h bei 20 U/min und 55 °C hybridisiert.

Zum Waschen nach der Hybridisierung wurden drei verschiedene Schalen vorbereitet: Die Schalen #1 und #2 enthielten *Gene Expression* Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur. Die Schale #3 enthielt *Gene Expression* Waschpuffer 2 bei 37 °C. Die Schalen #2 und #3 wurden auf eine magnetische Rührplatte gestellt und ein Rührfisch in die Schale gegeben. Nachfolgend wird das Waschprotokoll dargestellt:

Tabelle 2-23: Waschprotokoll für Microarray-Detektionsplatte

Schritt	Schale	Waschpuffer	Temperatur	Zeit
Demontieren	#1	<i>Gene Expression</i> Waschpuffer 1	RT	
1. Waschgang	#2	<i>Gene Expression</i> Waschpuffer 1	RT	5 min
2. Waschgang	#3	<i>Gene Expression</i> Waschpuffer 2	37 °C	5 min

Im ersten Schritt wurde der Objektträger von der Microarray-Platte getrennt, indem beide Platten gemeinsam in die Schale #1 getaucht und mit einer Zange vorsichtig voneinander gelöst wurden. Danach ließ man die Objektträger-Platte auf den Boden sinken und überführte die Microarray-Platte umgehend in ein Rahmengestell in der Schale #2. Mithilfe des Rührfisches wurde die Microarray-Platte für 5 min gewaschen und anschließend in die Schale #3 überführt. Es schloss sich der 2. Waschgang für 5 min an.

Scannen der Objektträger

Nach dem zweiten Waschgang wurde die Microarray-Platte vorsichtig aus dem Rahmengestell entnommen, in einen Plattenhalter gelegt und dieser mit einer ozongeschützten Abdeckplatte verschlossen. Der verschlossene Plattenhalter wurde in einer Scan-Kassette in den *Agilent Microarray Scanners GS2505_C* eingesetzt. Danach wurde das *AgilentG3_miRNA* Scan-Protokoll durchgeführt. Mithilfe eines SHG-YAG-Lasers (532 nm) konnten Cyanine 3-pCp markierte RNA-Moleküle angeregt, durch eine Scan-Linse detektiert und mithilfe eines Hochleistungs-PMT (Photovervielfacher) in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Die aufgenommenen Bilder wurden durch die Scan-Steuerungssoftware in einer Bild-Datei zusammengefasst. Die gesammelten Daten wurden bioinformatisch mithilfe der *Agilent Feature Extraction Software 10.7.3* analysiert und durch die *GeneSpring GX* Software normalisiert sowie die Korrelationen berechnet. Um Ausreißer zu identifizieren wurde die Hampel's Regel angewendet (Hampel, 1985).

2.2.5 Histologie

2.2.5.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Methode wurde genutzt, um spezielle Zellstrukturen (Antigene) mit spezifischen Antikörpern sichtbar zu machen. Dadurch war es möglich, die Zellgrößen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops exakt zu bestimmen.

Für die Immunfluoreszenz wurden ventrikuläre Kardiomyozyten auf Kollagen-beschichteten Deckgläsern (engl. *Coverslips*) kultiviert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die

Zellen einmal mit gekühltem PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung der Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS gelöst. Die fixierten Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend permeabilisiert. Die Permeabilisierung erfolgte mit Methanol für 10 min bei -20 °C. Die Zellen wurden danach zwei Mal mit PBS gewaschen, um restliches Methanol zu entfernen. Es wurde eine Blockier-Lösung hinzugegeben, die aus 2,5% BSA in PBS bestand. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die auf den Deckgläsern fixierten Zellen wurden dann mit dem primären Antikörper für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden die Deckgläser kopfüber auf einen Tropfen der Antikörper-Lösung gelegt. Der Antikörper war in 4% BSA in PBS gelöst. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser drei Mal für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. Der verwendete Sekundärantikörper richtet sich gegen die konstante Region des primären Antikörpers und ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Der Sekundärantikörper war in 4% BSA in PBS gelöst und wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur nach dem gleichen Prinzip auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen.

Die Deckgläser wurden danach auf einen Objektträger mit jeweils 14 µl Mounting-Medium gelegt. Die Zellen zeigten dabei in Richtung des Objektträgers und wurden über Nacht bei 4 °C trocknen gelassen.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Keyence BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop vorgenommen und die aufgezeichneten Bilder mit der BZ-II Analyzer Software ausgewertet.

2.2.5.2 Zellgrößenbestimmung

Die Zellgrößen wurden bestimmt, indem 5x5x5 (X-, Y-, Z-Ebene) Fotos aufgenommen wurden. Die Fotos wurden Seite-an-Seite, 20% überlappend mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen. Anschließend wurden die Einzelbilder mit der BZ-II Software zusammengefügt. So entstand eine Aufnahme der Z-Ebene in einem einzelnen zweidimensionalen Gesamtbild. Die Zellgröße wurde anschließend mit der *Keyence HybridCellCount* Software bestimmt. Zuerst wurden die Schwellenwerte an einer Referenzaufnahme festgelegt. Dazu wurde die α -Actinin Färbung als Marker für die Zelloberfläche gewählt. Die DAPI-gefärbten Zellkerne wurden dann durch die Software von der Zelloberfläche abgezogen. Dadurch war es möglich, die Anzahl der Zellkerne in einer gemessenen Zelle zu bestimmen. Es wurden nur die Zellen vermessen, die einen Zellkern enthielten. Damit wurde sichergestellt, dass nur Einzelzellen und keine Zell-Zell-Kontakte gezählt wurden.

2.2.6 Statistik

Alle statistischen Auswertungen dieser Arbeit wurden mit den Programmen *GraphPad Prism 7* und *SigmaPlot 13* durchgeführt. Insofern nicht anders aufgeführt, wurden jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler [SEM] angegeben. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus wurde entweder der zweiseitige Student'sche T-Test oder ANOVA mit Newman-Keuls post hoc Test zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen durchgeführt. Eine signifikante Abweichung lag bei einem Signifikanzwert von $p < 0,05$ vor. Hochsignifikant waren Ergebnisse bei $p < 0,01$ und höchstsignifikant bei $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Akuter biomechanischer Stress führt zur differentiellen Regulation von miRNAs

3.1.1 Analyse des miRNA-Expressionsprofils mittels Microarray

MiRNAs haben einen erheblichen Einfluss auf die post-transkriptionelle Regulation der Proteinexpression. Zudem werden physiologische und pathologische Prozesse in den Herzmuskelzellen durch miRNAs beeinflusst. Durch diese Beobachtungen sind die miRNAs in den Fokus aktueller Untersuchungen gelangt.

Zur *in vitro* Untersuchung der miR-Expressionsprofile nach biomechanischem Stress in Form von dynamischem Stretch wurde ein genomweites miRNA-Microarray-Screening Experiment durchgeführt. Dabei wurde in den Untersuchungen dieser Arbeit ein neues Modell zur biomechanischen Belastung von neonatalen Rattenkardiomyozyten verwendet. Im Gegensatz zu vorhergehenden Untersuchungen mittels statischem Stretch, wurden dabei die Kardiomyozyten dynamisch mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dehnung von 116 % gedehnt. Auf dem verwendeten Microarray waren alle in der *Sanger miRBase (Release 16.0)* Datenbank bekannten miRNA-5p und miRNA-3p-Sequenzen der Spezies *Rattus norvegicus* (n=679) abgebildet. Im dynamischen biomechanischem Stretch wurden vier Bedingungen gewählt: 2 h Stretch, 6 h Stretch, 24 h Stretch sowie eine Kontrolle mit jeweils n=3 Proben. Als Kontrolle dienten native, unstimulierte Kardiomyozyten, die ebenfalls in der Stretch-Vorrichtung auf einer Kollagen-beschichteten Silikonmembran, allerdings ohne Dehnung, kultiviert wurden.

Biomechanischer Stress führte zur differentiellen Regulation von 30 miRNAs, wobei sechs dieser regulierten miRs aufgrund ihrer hohen Expressionsveränderungen (*log fold change* - die logarithmische n-fache Expressionsveränderung) und einer hohen Wahrscheinlichkeit dieser miRNA differentiell reguliert zu sein (*log odds ratio*) als besonders vielversprechend angesehen wurden: miR-31*, miR-146a, miR-188, miR-466b-1*, miR-494, miR-503.

Nach 2 h Stretch waren zwei der oben genannten sechs miRs signifikant herunterreguliert. Die miR-494 war 0,89-fach und die miR-188 war 0,51-fach herunterreguliert (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Differentielle Regulation von miRNAs nach 2 h Stretch

miRNAs	korrigierter p-Wert	p-Wert	<i>log fold change</i> (2 h Stretch vs Control)	Regulation
rno-miR-494	0,042	0,034	-0,89	Herunter
rno-miR-188	0,050	0,016	-0,51	Herunter

Bei einer längeren Exposition von 6 h Stretch zeigten sich drei der sechs spezifisch untersuchten miRs zum Teil signifikant herunterreguliert: miR-494 (*log fold change* -0,71), miR-466-b-1* (*log fold change* -0,53) und miR-188 (*log fold change* -0,39) (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Differentielle Regulation von miRNAs nach 6 h Stretch

miRNAs	korrigierter p-Wert	p-Wert	<i>log fold change</i> (6 h Stretch vs Control)	Regulation
rno-miR-494	0,218	0,044	-0,71	Herunter
rno-miR-188	0,379	0,170	-0,39	Herunter
rno-miR-466b-1*	0,119	0,007	-0,53	Herunter

Nach 24 h Stretch konnten wir eine signifikante Expressionsveränderung von folgenden miRNAs feststellen: Heraufregulation von miR-503 (*log fold change* +0,77) und miR-31* (*log fold change* +0,54) sowie eine Herunterregulation von miR-494 (*log fold change* -1,05), miR-146a (*log fold change* -1,02), miR-188 (*log fold change* -0,74) und miR-466b-1* (*log fold change* -0,67) (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Differentielle Regulation von miRNAs nach 24 h Stretch

miRNAs	korrigierter p-Wert	p-Wert	<i>log fold change</i> (24 h Stretch vs Control)	Regulation
rno-miR-494	0,008	0,080	-1,05	Herunter
rno-miR-146a	0,031	0,000	-1,02	Herunter
rno-miR-503	0,040	0,001	+0,77	Herauf
rno-miR-188	0,217	0,084	-0,74	Herunter
rno-miR-466b-1*	0,202	0,071	-0,67	Herunter
rno-miR-31*	0,102	0,013	+0,54	Herauf

Zwei der am stärksten regulierten miRs wurden in einem Volcano Plot dargestellt: miR-503 (\log fold change +0,77; \log odds ratio 2,60) und miR-146a (\log fold change -1,02; \log odds ratio +6,58) (Abbildung 9).

Ein Volcano Plot ist eine besondere Variante eines Streudiagramms und somit eine graphische Darstellung der Expressionsveränderung (\log fold change) und der Wahrscheinlichkeit einer miRNA differentiell reguliert zu sein (\log odds ratio). Der Volcano Plot wird genutzt, um schnell und einfach Veränderungen in großen Datensätzen zu identifizieren (Cui und Churchill, 2003). Mithilfe des Volcano Plots kann hier graphisch gezeigt werden, dass miR-146a und miR-503 die am stärksten und am signifikantesten regulierten miRs des in dieser Arbeit verwendeten Microarrays sind.

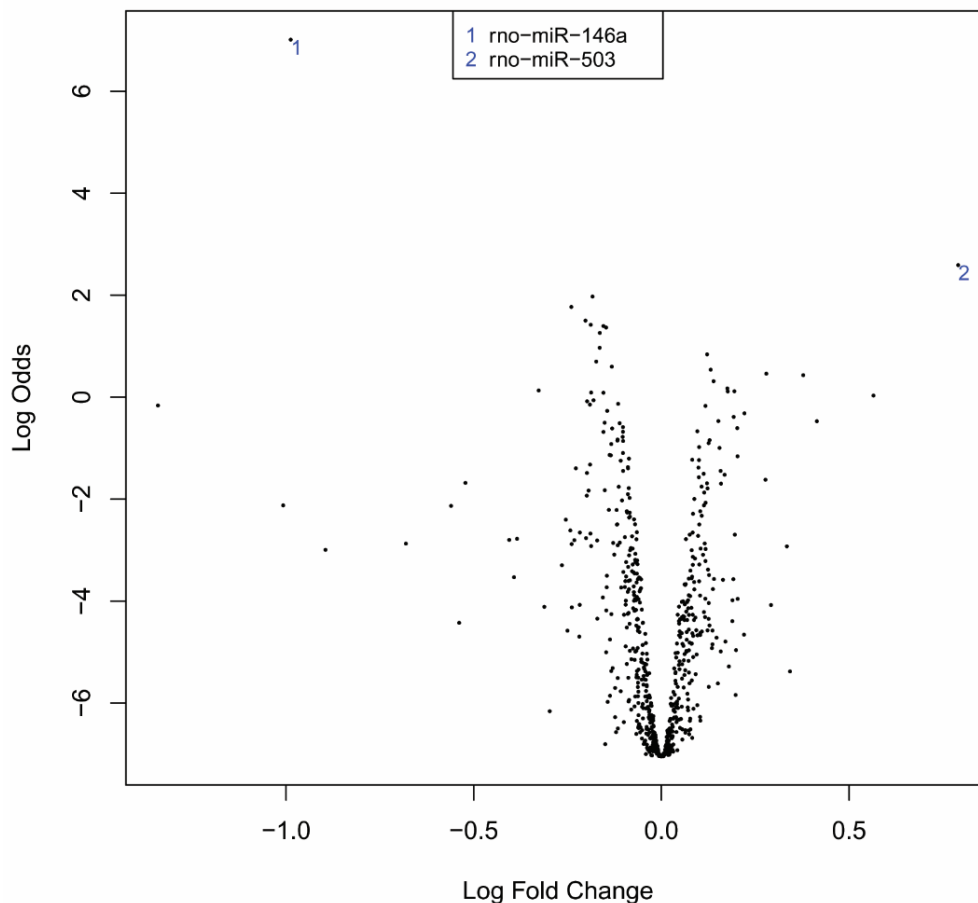


Abbildung 9: Volcano Plot zum Vergleich von 24 h Stretch vs. Kontrolle

Darstellung der Korrelation zwischen n-facher Induktion (engl. *fold change*) einer miRNA nach 24 h Stretch und der Wahrscheinlichkeit einer miRNA differentiell reguliert zu sein (*Darstellung als natürlicher Logarithmus*). Es wurden exemplarisch miR-146a und miR-503 dargestellt.

Dieses Screening-Experiment wurde bereits vorher in Zusammenarbeit mit Jost Pott (Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank durchgeführt. Die vorläufigen Ergebnisse wurden für diese Arbeit zu Beginn der Experimente zur Verfügung gestellt und werden daher als vorhergehende Leistungen angesehen.

3.1.2 MiRNA-146a und miRNA-503 werden durch *Stretch* reguliert

Um die Microarray-Ergebnisse zu validieren, wurde die Expression der sechs am stärksten regulierten miRNAs mittels qRT-PCR untersucht. Zur Überprüfung wurde ein *TaqMan Assay* verwendet, welcher auch bei geringer endogener Expression der miRNA eine hohe Sensitivität aufweist.

Wir konnten zeigen, dass miR-494 im Gegensatz zu den Microarray-Ergebnissen keine Expressionsveränderung durch *Stretch* in der *TaqMan*-Analyse aufwies (Abbildung 10 A).

Laut Microarray-Untersuchungen zeigte sich sowohl miR-146a als auch miR-503 nach 2 bzw. 6 h *Stretch* nicht signifikant reguliert.

Wir konnten jedoch auch nachweisen, dass miR-146a nach 2 h heraufreguliert wurde (1,79-fach, $\pm 0,29$, $p < 0,01$, Abbildung 10 B). Nach 6 h *Stretch* jedoch zeigte sich eine Herunterregulation um 45% ($\pm 0,24$, $p < 0,05$). Den Microarray-Ergebnissen entsprechend war miR-146a nach 24 h *Stretch* auf 31,5% ($\pm 0,05$, $p < 0,01$) herunterreguliert.

Die Ursache hierfür bleibt zunächst unklar, lässt jedoch vermuten, dass durch die kurzfristige Anpassung an biomechanischen Stress die miR-146a herauf- und nach längerem Stress herunterreguliert wird und dabei verschiedene Signalwege genutzt werden könnten.

In Abbildung 10 C erkennt man, dass bereits nach 2 h biomechanischem Stress eine 2,30-fache ($\pm 0,21$, $p < 0,01$) Induktion von miR-503 erfolgte. Nach 6 h *Stretch* wies miR-503 eine 2,00-fache ($\pm 0,34$, $p < 0,05$) Heraufregulation auf. Konkordant zu den Microarray-Ergebnissen zeigte sich miR-503 nach 24 h *Stretch* signifikant heraufreguliert (2,34-fach, $\pm 0,28$, $p < 0,01$).

MiR-188 sowie miR-466b-1* zeigten in der Validierungsuntersuchung eine signifikante Heraufregulation nach 2 h *Stretch*, jedoch wiesen die beiden miRs nach 6 bzw. 24 h keine signifikante Regulation auf (Abbildung 10 D, E).

Interessanterweise zeigte miR-31* in der qRT-PCR nach 24 h *Stretch* eine gegensätzliche Regulation zum Microarray, nämlich eine 0,11-fache ($\pm 0,19$) Herunterregulation, anstelle der erwarteten 0,54-fachen Heraufregulation (Abbildung 10 F). Dieses Ergebnis unterstreicht die

Notwendigkeit, Screening-Ergebnisse durch quantitative Realtime-PCRs zu validieren, da typischerweise eine Varianz der Microarray-Daten besteht.

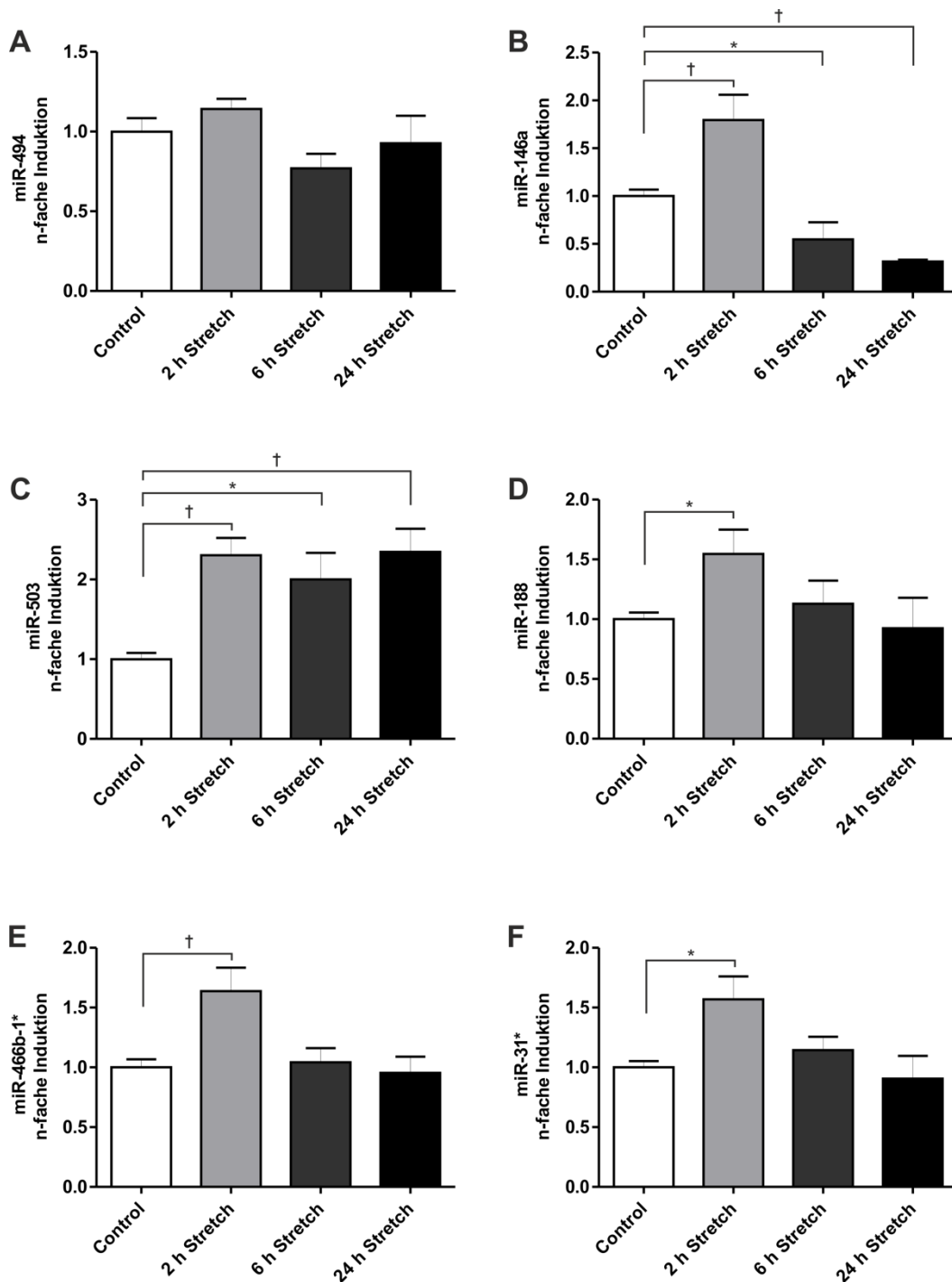


Abbildung 10: MicroRNA-Expression nach 2, 6 und 24 h Stretch

Validierung der miRNA-Expression mittels *TaqMan* Assay qRT-PCR.

N=3, * p<0,05, † p<0,01.

Wie in Abbildung 10, dargestellt, wiesen miR-146a und miR-503 nach 24 h Stretch in der Validierung mittels *TaqMan Assay* die ausgeprägteste differentielle Regulation auf. Diese Regulation stimmte mit den Microarray-Ergebnissen überein. MicroRNA-146a war nach 24 h Stretch sowohl im Microarray als auch im *TaqMan Assay* signifikant herunterreguliert, miR-503 zeigte nach 24 h eine signifikante Heraufregulation. Im Verlauf dieser Untersuchungen sind Forschungsergebnisse bekannt geworden, die miR-146a und miR-503 in Verbindung mit myokardialen Erkrankungen bringen (Zhou et al., 2016, Halkein et al., 2013, Wang et al., 2013b).

Aufgrund der ausgeprägten differentiellen, signifikanten Regulation und der bekannten myokardialen Spezifität wurden alle weitergehenden Untersuchungen mit miR-146a sowie miR-503 durchgeführt.

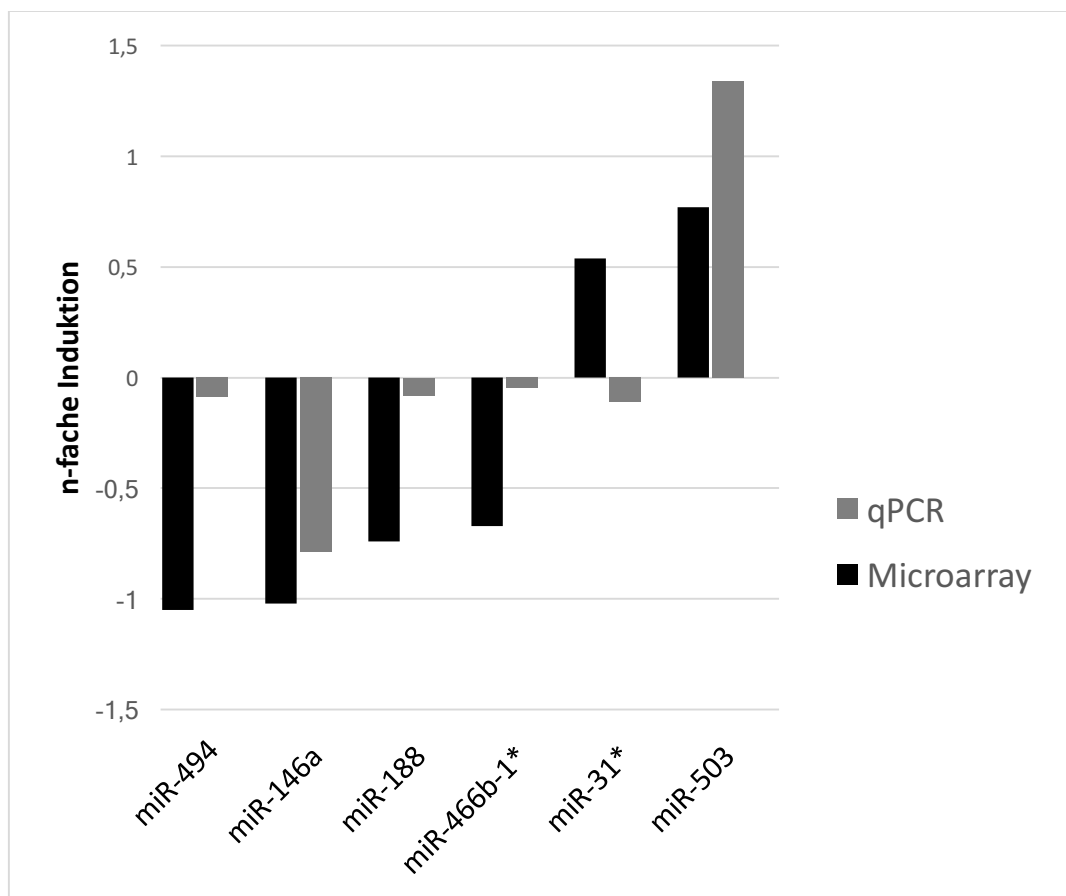


Abbildung 11: Validierung der miRNA-Expression durch qRT-PCR nach 24 h Stretch

Vergleich der sechs am stärksten regulierten miRNAs und deren Expression nach 24 h biomechanischem Stress (Stretch) im Microarray-Screening und im *TaqMan Assay*. Mehr als 80% der miRNA-Expressionsergebnisse im *TaqMan Assay* (grau) entsprechen den Beobachtungen im Microarray (schwarz). Als interne Normalisierungskontrolle wurde die konstitutiv exprimierte snRNA *RNU6B* gewählt.

3.2 Chronischer Stress *in vivo* verändert die miR-Expression

Zur Untersuchung der miR-Expression bei chronischem Stress wurde das etablierte „Transverse Aortic Constriction“ (TAC, *Aortic Banding*) Mausmodell angewandt.

Überraschenderweise zeigte sich miR-146a, gegensätzlich zum akuten Stress, nach zweiwöchigem *Aortic Banding* signifikant heraufreguliert (4,44-fach, $\pm 0,65$, $p < 0,01$, Abbildung 12 A). Die bei akutem Stress induzierte miR-503 ist auch nach 14 Tagen chronischem Stress 4,18-fach ($\pm 0,67$, $p < 0,05$) heraufreguliert (Abbildung 12 B). Dies deutet daraufhin, dass die Anpassungsvorgänge der Kardiomyozyten bei biomechanischem Stress chronologisch unterschiedlich ablaufen könnten. Des Weiteren wurde in vorherigen Arbeiten beobachtet, dass sich das myokardiale miR-Expressionsmuster bei Aortenstenose, ischämischer Kardiomyopathie und dilatativer Kardiomyopathie signifikant unterscheiden kann (Ikeda und Pu, 2010, Thum et al., 2007).

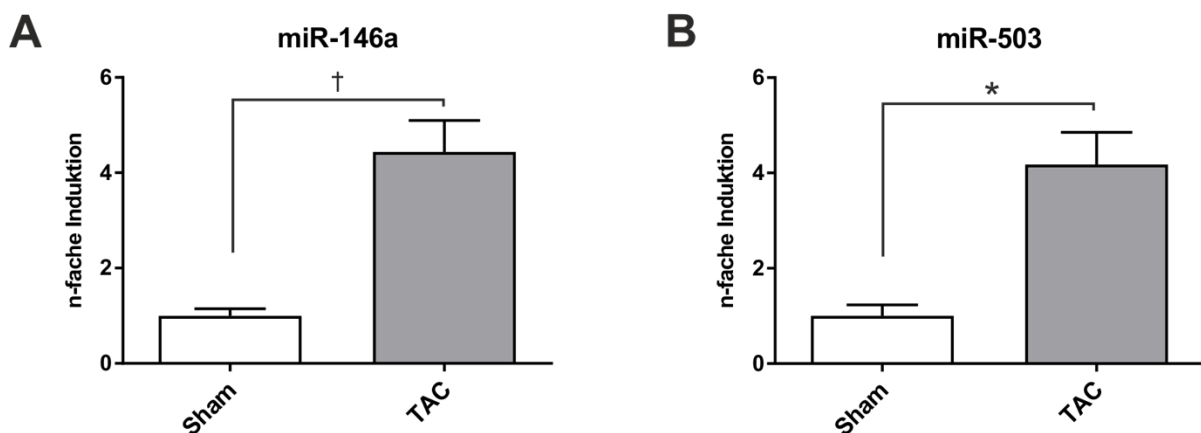


Abbildung 12: Regulation von miR-146a und miR-503 durch chronischen kardialen Stress *in vivo*

Chronische Druckbelastung von 14 Tagen Dauer (verursacht durch „*Transverse Aortic Constriction*“, TAC) führt zur Regulation von miR-146a und miR-503 im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren (Sham). (A) MiR-146a wird 4,44-fach heraufreguliert ($\pm 0,65$). (B) Chronischer Stress führt zu einer 4,18-fachen Induktion ($\pm 0,67$) von miR-503. N=3, * $p < 0,05$, † $p < 0,01$.

3.3 MiR-146a wird überwiegend im Herzen exprimiert

Für die Untersuchung des endogenen Expressionsmusters von miR-146a und miR-503 *in vivo* wurden verschiedene Gewebetypen von adulten weiblichen Ratten untersucht. Von jedem Gewebetyp wurden 3 Proben untersucht.

MicroRNA-146a wird ubiquitär in den untersuchten Gewebetypen exprimiert. Die höchste Expression zeigte die miR-146a im Herzen, schnell zuckenden Muskelfasern (M. vastus med.) sowie langsam zuckenden Muskelfasern (M. soleus) (Abbildung 13 A). Somit wird miR-146a überwiegend in quergestreifter Muskulatur ausgebildet. Repräsentativ für das arterielle Widerstandsgefäßsystem, wies die Aorta eine etwas geringere Expression als die quergestreifte Muskulatur auf. Ein ähnliches Expressionsniveau wie die Aorta zeigte die Lunge und die Ovarien (engl. *ovary*) (Abbildung 13 A).

Die miR-503 wies, analog zur miR-146a, ein hohes Expressionsniveau in der quergestreiften Muskulatur auf (Herz, M. vastus med., M. soleus) (Abbildung 13 B). Eine ähnliche Ausbildung zeigte die Lunge, geringer exprimiert wurde die miR-503 in der Aorta. Die höchste Expression wurde in den Ovarien festgestellt (Abbildung 13 B).

Mit den Nachweisen der stabilen Expression von miR-146a und miR-503 im kardiovaskulären Gewebe wird die potentielle Bedeutung der bereits dargestellten Regulation durch Stretch unterstrichen. Somit könnten Rückschlüsse aus den weiterführenden Untersuchungen *in vitro* über vorhandene Mechanismen *in vivo* gezogen werden.

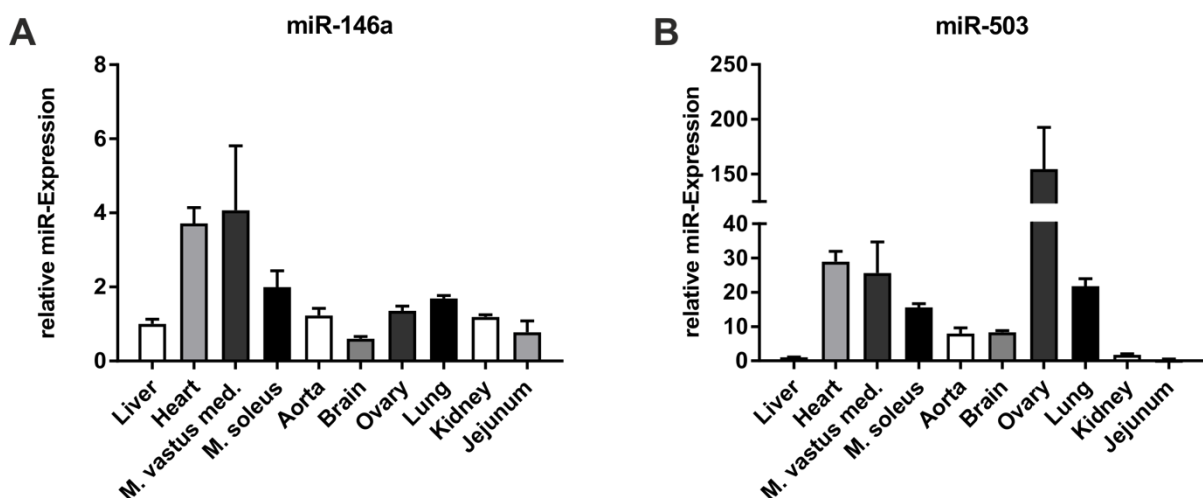


Abbildung 13: Multi-Gewebe qRT-PCR von adultem weiblichen Rattengewebe

(A) miR-146a wird überwiegend im Herzen und schnell zuckender Skelettmuskulatur (M. vastus med.) exprimiert. (B) miR-503 zeigt die höchste Expression im Ovar, ebenfalls stark exprimiert wird miR-503 im Herzen und Skelettmuskulatur (M. vastus med.). N=3.

3.4 Kardiomyozyten und Fibroblasten haben eine ähnliche miR-Expression

Die untersuchten miRNAs waren wie bereits beschrieben vor allem im Herzen, Gehirn und Ovarien exprimiert. Da bei der Isolation von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatelen Ratten sowohl Herzmuskelzellen als auch zu einem kleinen Teil Fibroblasten isoliert werden, war das Ziel dieses Versuchs die Expression der miRNAs in Kardiomyozyten und Fibroblasten gegenüberzustellen.

Die miR-146a ist in NRVCM 1,38-fach ($\pm 0,11$, $p < 0,05$) höher als in Fibroblasten exprimiert (Abbildung 14 A). Die miR-503 wird in Kardiomyozyten 0,79-fach ($\pm 0,13$, $p = \text{n.s.}$) geringer als in Fibroblasten ausgebildet (Abbildung 14 B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die miR-Expression der von uns untersuchten miRs sowohl in Herzmuskelzellen als auch in Fibroblasten annähernd gleich ist.

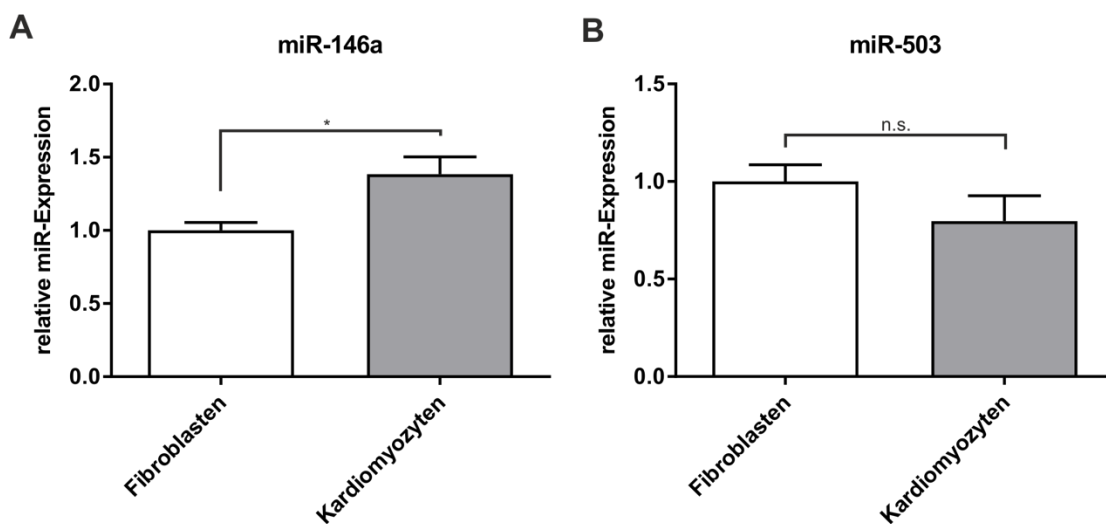


Abbildung 14: Expression von miR-146a und miR-503 in Fibroblasten und Kardiomyozyten

TaqMan Assay zur Untersuchung von miR-146a (A) und miR-503 (B) in Kardiomyozyten und Fibroblasten. Das Profil in beiden untersuchten Zelllinien ist annähernd gleich. $N=3$, * $p < 0,05$.

3.5 Adenovirale Überexpression von miR-146a und miR-503

MiR-146a und miR-503 waren im *in vitro* Stretch-Modell, zur Induktion von Hypertrophie, signifikant differentiell reguliert. Um die Fragestellung zu klären, ob diese beiden miRs die kardiomyozytäre Hypertrophie beeinflussen, überexprimierten wir miR-146a und miR-503 mittels von uns generierten adenoviralen Konstrukten. Diese sog. „AdmiRs“ führten nach Infektion der Zellen zu einer beständigen Überexpression in NRVCM.

3.5.1 Validierung der Überexpression mittels *TaqMan*[®] Assay

Wir wollten anschließend die suffiziente Überexpression von miR-146a und miR-503 nach adenoviraler Infektion von AdmiR-146a und AdmiR-503 in NRVCN sowie die optimale Virusdosierung überprüfen. Dazu wurden NRVCN mit verschiedenen Viruslasten infiziert und das miR-Expressionsmuster mithilfe eines *TaqMan* Assay quantifiziert.

Ab einer Viruslast von 50 ifu zeigte sich auf RNA-Ebene eine bedeutende und reproduzierbare Überexpression von beiden untersuchten miRs (146a und 503) im Vergleich zu den mit Kontrollvirus (neg) infizierten Zellen (Abbildung 15 A, B). Bei einer geringeren Dosierung zeigte sich nur eine schwache Überexpression von miR-146a und miR-503. Bei einer Viruslast von 100 ifu wurde zwar eine stärkere Überexpression erkennbar, jedoch war diese mit großen Schwankungen verbunden und wies somit eine geringere Reliabilität auf. Zudem stiegen die zytotoxischen Nebenwirkungen der Virusinfektion, erkennbar durch eine geringere Zellvitalität. Alle nachfolgenden Versuche mit adenoviraler Überexpression von miR-146a und miR-503 wurden daher mit einer Viruslast von 50 ifu durchgeführt.

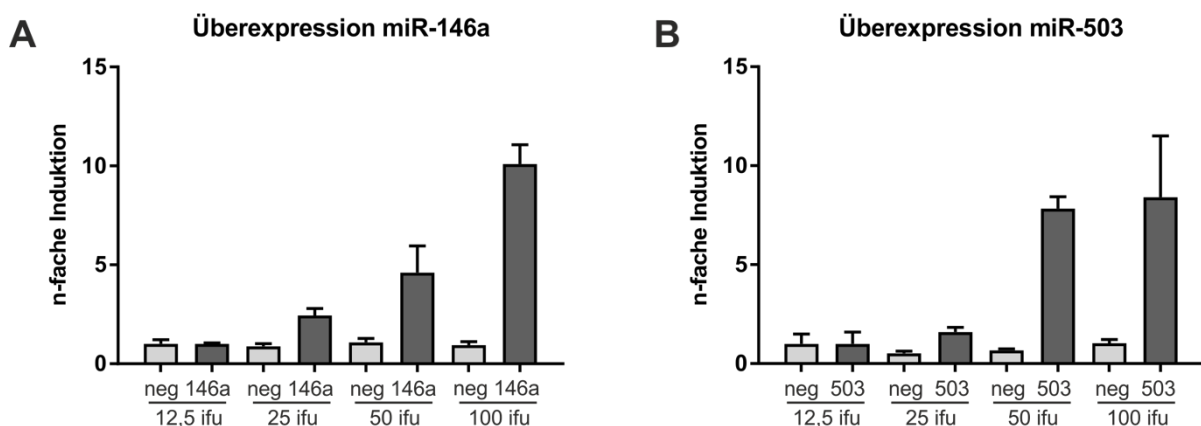


Abbildung 15: *TaqMan* Assay zum Nachweis der adenoviralen Überexpression verschiedener Viruslasten von AdmiR-146a und AdmiR-503

Nach adenoviraler Infektion mit 12,5, 25, 50 und 100 ifu wurde ab 50 ifu eine ausreichende adenovirale Überexpression von miR-146a (A) und miR-503 (B) in NRVCN erreicht.

3.6 *Stretch* führt zur Suppression der miR-146a-Expression

3.6.1 Adenovirale Überexpression und dynamischer *Stretch*

Um den Einfluss von biomechanischem Stress in Form von *Stretch* auf Kardiomyozyten und gleichzeitiger miR-Überexpression zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modell entwickelt, welches das miR-Profil nach 24 h dynamischen *Stretch* darstellt. Dazu wurden NRVCN mit adenoviralen Vektoren zur Überexpression von miR-146a und miR-503 infiziert und dynamisch biomechanisch für 24 Stunden gedehnt (116%, 1 Hz). Als Kontrollzellen dienten nicht gedehnte bzw. nicht infizierte NRVCN.

Die adenovirale Überexpression führte zu einer 29-fachen ($\pm 3,78$, $p < 0,001$) Induktion von miR-146a im Vergleich zu Kontrollzellen (miR-neg) (Abbildung 16 A). Dieses Ergebnis validiert nochmals die suffiziente Überexpression durch die rekombinanten Adenoviren. Nach 24 h dynamischem biomechanischen Stress wurde miR-146a um 49% herunterreguliert ($\pm 3,04$, $p < 0,01$). Dies zeigt, dass in miR-146a-überexprimierenden Zellen eine weitere Suppression durch *Stretch* induzierbar ist (Abbildung 16 A).

Nach adenoviraler Infektion zeigte sich miR-503 2,8-fach heraufreguliert ($\pm 0,24$, $p < 0,01$) (Abbildung 16 B). Durch *Stretch* stellte sich eine 4,7-fache Induktion von miR-503 heraus ($\pm 1,04$, $p < 0,05$) (Abbildung 16 B). Es ist also auch nach erfolgter Überexpression von miR-503 eine weitere Induktion durch *Stretch* möglich. Dies unterstreicht eine mögliche Relevanz von miR-503 für die *Stretch*-induzierte Signaltransduktion in Kardiomyozyten.

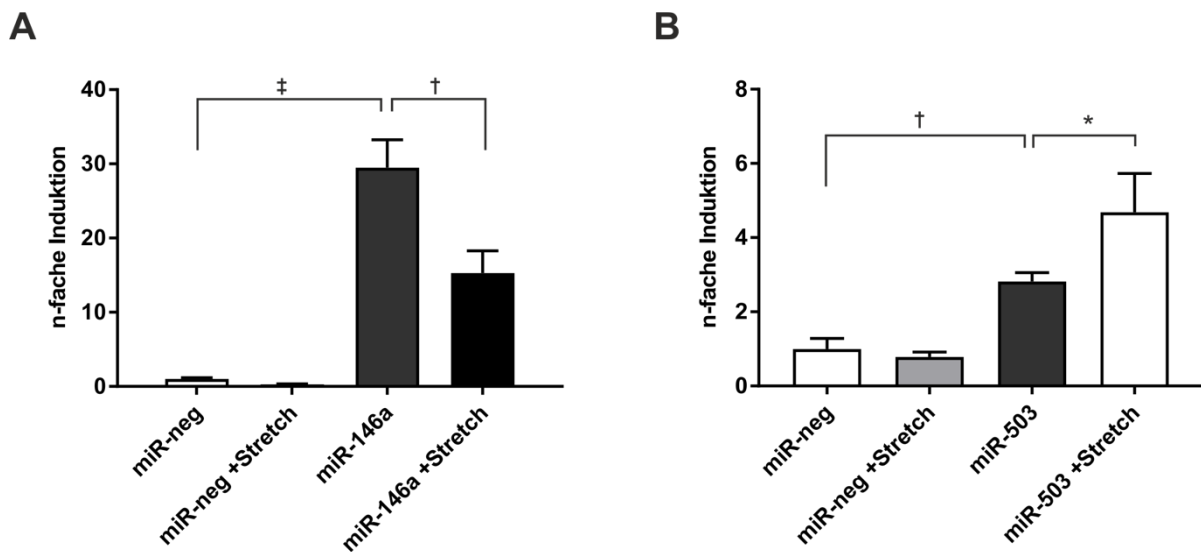


Abbildung 16: Stretch über 24 h induziert eine Herunterregulation von miR-146a auch in adenoviral-überexprimierten Zellen

TaqMan Assay nach adenoviraler Überexpression von miR-146a (A) und miR-503 (B) mit/ohne Stretch für 24 h. (A) Signifikante Suppression von miR-146a auf 51% ($\pm 3,04$, $p < 0,01$) nach biomechanischem Stress. (B) Suffiziente adenovirale Überexpression von miR-503 (2,8-fach, $\pm 0,24$, $p < 0,01$) und weitere Induktion durch Stretch (4,7-fach, $\pm 1,04$, $p < 0,05$). $N=3$, * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$.

3.7 Die Überexpression von miR-146a führt zur Induktion des hypertrophischen Genprogramms *in vitro*

Um den Einfluss von miR-146a auf die Expression von zwei typischen, stressabhängig kardial vermehrt exprimierten Genen (ANF und BNP) sowie des spezifischen Inhibitors von Calcineurin (*Rcan1.4*) zu untersuchen, wurden NRVCN mit einer Virulslast von 50 ifu infiziert.

Die Überexpression von miR-146a führte zu einer 2,4-fachen Heraufregulation von ANF (*Nppa*) ($\pm 0,27$, $p < 0,01$) und einer 3,2-fachen Induktion von *Rcan1.4* ($\pm 0,18$, $p < 0,001$) verglichen mit miR-neg-behandelten Kontrollzellen (Abbildung 17 A, B).

Bei miR-neg-behandelten NRVCN, die biomechanischem Stress ausgesetzt waren, führte der Stretch zu einem 2,1-fachen Anstieg von ANF ($\pm 0,43$, $p < 0,05$) im Vergleich zu nicht gedehnten Zellen (Abbildung 17 A). Die Überexpression von miR-146a induzierte eine weitere 1,9-fache Erhöhung von ANF ($\pm 0,36$, $p < 0,01$) (Abbildung 17 A).

Zudem wurde die Expression des Calcineurin-abhängigen Gens *Rcan1.4* durch Stretch bei Kontrollzellen 2,2-fach heraufreguliert ($\pm 0,19$, $p < 0,05$), während die miR-146a

Überexpression zu einer weiteren 2,4-fachen Induktion ($\pm 0,51$, $p < 0,01$) im Vergleich zu gedehnten miR-neg Zellen führte (Abbildung 17 B). Interessanterweise beeinflusst bereits die alleinige adenovirale Überexpression von miR-146a die Expression einiger durch Stretch induzierbarer fetaler Gene in Kardiomyozyten.

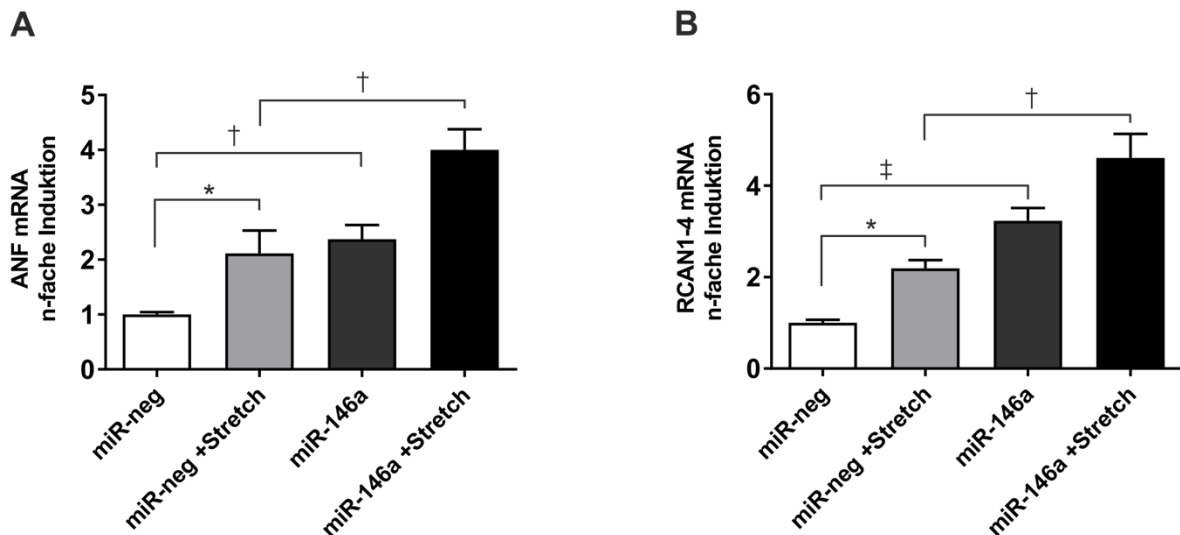


Abbildung 17: Induktion der pro-hypertrophen Gene ANF (*Nppa*) (A) und *Rcan1.4* (B) nach adenoviraler Überexpression und 24 h dynamischem, biomechanischen Stretch

(A) Die Überexpression von miR-146a führte zu einer 2,4-fachen ($\pm 0,27$) Steigerung der ANF (*Nppa*) Expression. Nach 24 h Stretch ist die ANF-Expression in miR-146a-überexprimierenden Zellen 1,9-fach ($\pm 0,36$) erhöht. (B) Die *Rcan1.4*-Expression wird durch die miR-146a-Überexpression 3,2-fach ($\pm 0,18$) gesteigert. Nach der Belastung durch Stretch erfolgte eine weitere 2,4-fache ($\pm 0,51$) Induktion verglichen mit gedehnten miR-neg-Kontrollzellen. N=6, * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$.

3.8 Biomechanischer Stress führt zur Regulation des Calcineurin-Signalwegs

Um weitere Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen von miR-503 zu gewinnen, wurde miR-503 in NRVCN adenoviral überexprimiert und eine Gruppe der Zellen anschließend dynamisch biomechanisch für 24 Stunden gedehnt. In miR-neg behandelten Kontrollzellen zeigte sich eine signifikante ANF-Expressionserhöhung nach biomechanischem Stress (1,7-fach, $\pm 0,16$, $p < 0,05$) (Abbildung 18 A). Dies weist die Stretch-vermittelte Aktivierung des hypertrophischen Genprogramms nach. Nach der alleinigen adenoviralen Überexpression von miR-503 zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung der ANF-Expression. Stretch und miR-503 Überexpression wiederum führten zu einer

signifikanten Erhöhung der ANF-Expression (+71%, $\pm 0,19$, $p < 0,01$) (Abbildung 18 A). Dieses Ergebnis zeigt, dass die miR-503 ohne pathologische Stimuli keine relevanten Einflüsse auf die Aktivierung des hypertrophischen Genprogramms ausübt, jedoch in biomechanisch gestreckten Kardiomyozyten hinreichend wie auch notwendig zur Aktivierung des hypertrophischen Genprogramms zu sein scheint (Abbildung 18 A). Analog zur ANF-Expression aktiviert miR-503 nach Überexpression und Stretch den Calcineurin-abhängigen Signalweg durch *Rcan1.4*. Nach 24-stündigem Stretch zeigte sich eine 3,6-fache Induktion von *Rcan1.4* in miR-neg gedehnten Zellen ($\pm 0,18$, $p < 0,05$) (Abbildung 18 B). In miR-503-überexprimierenden Zellen ließ sich nach biomechanischem Stress für 24 h eine 3,1-fache Erhöhung der *Rcan1.4*-Expression nachweisen, verglichen mit gedehnten miR-neg Zellen ($\pm 2,3$, $p < 0,01$) (Abbildung 18 B).

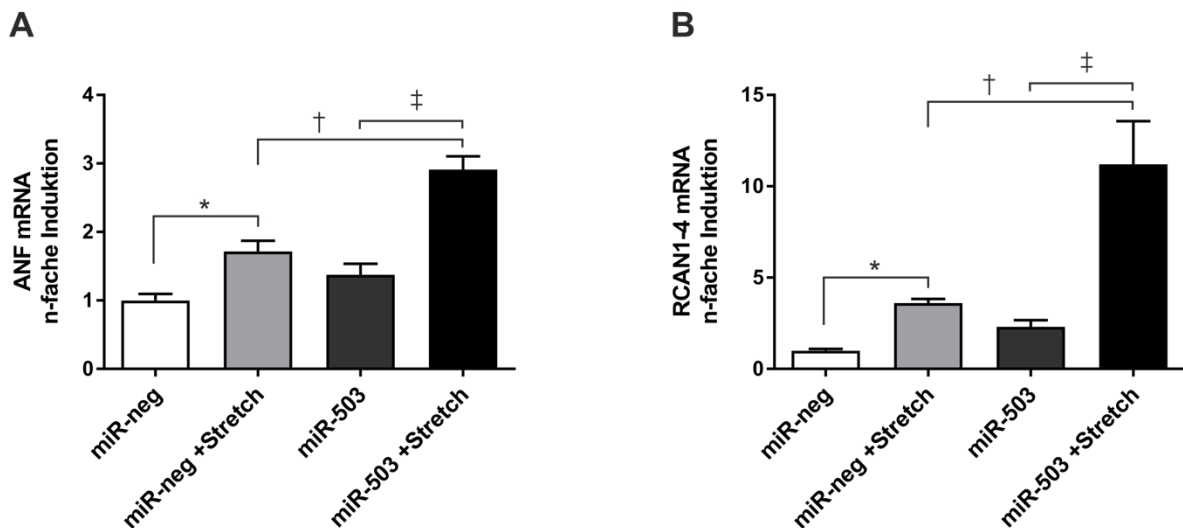


Abbildung 18: Biomechanischer Stress und miR-503 Überexpression aktivieren gemeinsam das hypertrophische Genprogramm

Multiplex qRT-PCR von ANF (*Nppa*) und *Rcan1.4* nach adenoviraler Überexpression und Stretch.

(A) Stretch führt zu einer 1,7-fachen Expressionssteigerung von *Rcan1.4* und zu einer weiteren 1,7-fachen Induktion durch miR-503 Überexpression. (B) 3,6-fache Erhöhung der *Rcan1.4*-Expression nach biomechanischem Stress und Verdreifachung der *Rcan1.4*-Expression infolge der miR-503 Überexpression. N=6, * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$.

3.9 *Knockdown* von miR-146a reduziert Hypertrophie *in vitro*

Zur Beurteilung des Einflusses von miR-146a und miR-503 auf die kardiomyozytäre Hypertrophie wurde die Zellgröße von NRVCM nach Überexpression und *Knockdown* bestimmt.

MiR-146a und miR-503 wurden dazu überexprimiert bzw. herunterreguliert und mit nicht behandelten Kontrollzellen verglichen. Zusätzlich wurde eine Gruppe von Zellen mit dem pro-hypertrophisch wirksamen α 1-Rezeptor-Agonisten Phenylephrin (PE) stimuliert, um eine mögliche hypertrophische Wirkung von miR-146a und miR-503 zu evaluieren.

Zur zuverlässigen Überexpression der microRNAs wurden zuvor generierte adenovirale Konstrukte verwendet. Die suffiziente Herunterregulation von miR-146a und miR-503 wurde mit sog. Anti-microRNAs (AntimiRs) erreicht, die an der reifen microRNA binden und prinzipiell die Degradation bzw. Translationshemmung der Ziel-mRNA verhindern. Um die Zellgrößen zu bestimmen, wurden die Zellen immunhistochemisch mit einem Anti- α -Actinin-Antikörper markiert und bioinformatisch vermessen.

Wie bereits publiziert, zeigte sich, dass die mit PE stimulierten Kontrollzellen (AntimiR-neg + PE) 37% größer waren als die Kontrollzellen ohne PE-Stimulation ($\pm 0,05$, $p < 0,001$) (Abbildung 19 A, B). Durch den *Knockdown* von miR-503 zeigte sich eine deutliche Abschwächung dieser pro-hypertrophischen Wirkung von PE. So war die Zellquerschnittsfläche nach Stimulation mit PE 29% ($\pm 0,06$, $p < 0,001$) geringer als bei den mit Kontroll-AntimiR transfizierten und mit PE stimulierten Zellen (Abbildung 19 B). Der *Knockdown* von miR-146a zeigte ebenfalls einen anti-hypertrophischen Effekt auf die Zellgröße bei PE-Stimulation (-28%, $\pm 0,05$, $p < 0,001$) (Abbildung 19 B). Dabei wurde die Wirkung von Phenylephrin nahezu aufgehoben. Die durchschnittliche Zellquerschnittsfläche betrug ohne PE-Stimulus $359,53 \mu\text{m}^2$ und mit PE-Simulation $381,99 \mu\text{m}^2$. Das entspricht einer Vergrößerung von nur 6,24% und liegt damit im normalen Schwankungsbereich zwischen einzelnen Experimenten (Abbildung 19 B). Die subjektive mikroskopische Analyse der Zellen wies ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Virusgruppen auf (Abbildung 19 A).

Wie in Abbildung 19 C dargestellt, führte die Überexpression von miR-146a und miR-503 zu keiner signifikanten Veränderung der Zellgröße (AdmiR-146a 1,06-fach, $\pm 0,11$, $p = \text{n.s.}$ und AdmiR-503 0,97-fach, $\pm 0,14$, $p = \text{n.s.}$). Nach Stimulation der Zellen mit Phenylephrin zeigte sich, wie erwartet, eine deutliche Hypertrophie der Kontrollzellen (AdmiR-neg + PE 1,36-fach, $\pm 0,29$, $p < 0,001$). Die adenovirale Überexpression und gleichzeitige Stimulation mit PE führte zu einer signifikanten Zellhypertrophie verglichen mit

den Kontroll-miR überexprimierenden Zellen (AdmiR-146a + PE 1,34-fach, $\pm 0,22$, $p < 0,001$ und AdmiR-503 + PE 1,19-fach, $\pm 0,18$, $p < 0,001$) (Abbildung 19 C).

Im PE-Stimulations-Modell zeigte die Überexpression von miR-146a und miR-503 keinen Einfluss auf die Hypertrophie von Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrollzellen. Der *Knockdown* von miR-146a und miR-503 wiederum zeigt eine signifikante anti-hypertrophische Wirkung von AntimiR-146a und AntimiR-503 im PE-Stimulations-Modell (Abbildung 19 A, B). Somit kann hier dargestellt werden, dass ein *Knockdown* von miR-146a und miR-503 die Zellen *in vitro* vor pathologischen Stimuli schützen könnte.

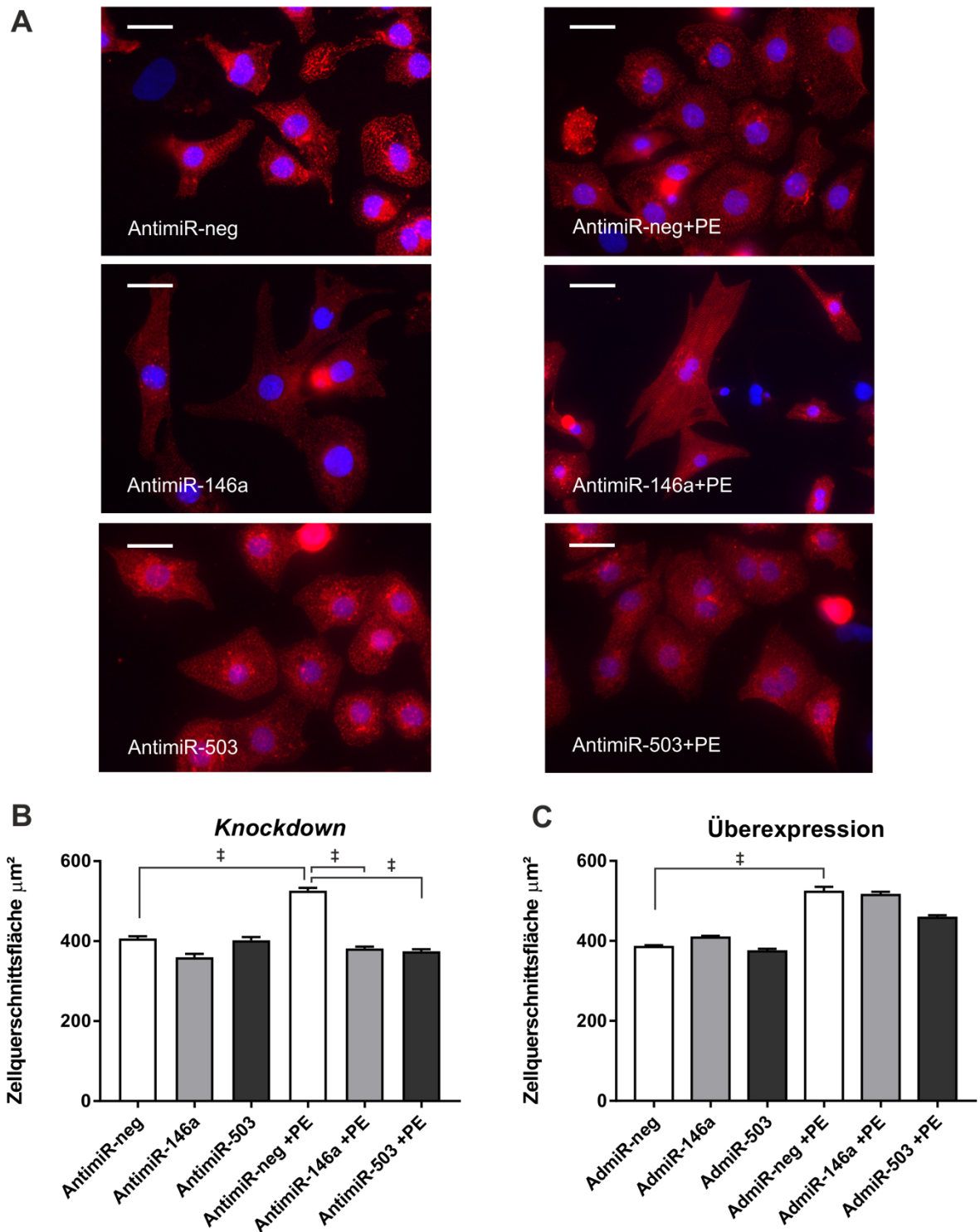


Abbildung 19: Knockdown von miR-146a reduziert pro-hypertrophische Effekte

(A) Immunhistochemische Färbung von NRVCM mit Anti- α -Actinin zur Darstellung der Zelloberfläche mit und ohne Stimulation mit Phenylephrin (\pm PE). (B) Der *Knockdown* von miR-146a hebt die prohypertrophischen Effekte von PE auf. (C) Überexpression von miR-146a und miR-503 und Stimulation mit PE führt zu einer signifikanten Zellhypertrophie. Maßstab Balken 20 μm . N=3, ‡ p<0,001.

3.10 Target Scan

MicroRNAs beeinflussen die post-transkriptionelle Genregulation durch komplementäre Bindung der Seed-Sequenz der microRNA an die 3' untranslatierte Region (3'-UTR) der mRNA (Bartel, 2004).

Die spezifischen miR-Funktionen können nur verstanden werden, wenn die Regulation der Zielstrukturen und die damit verbundene Inhibition der Proteinsynthese bekannt ist.

Für die Vorhersage von Zielstrukturen der miR-146a und miR-503 wurden verschiedene web-basierte Suchmaschinen genutzt:

1. *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>),
2. *microRNA.org* (<http://www.microrna.org/microrna/getDownloads.do>),
3. *DIANA microT v4* (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>),
4. *PicTar* (http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/new_PicTar_mouse.cgi).

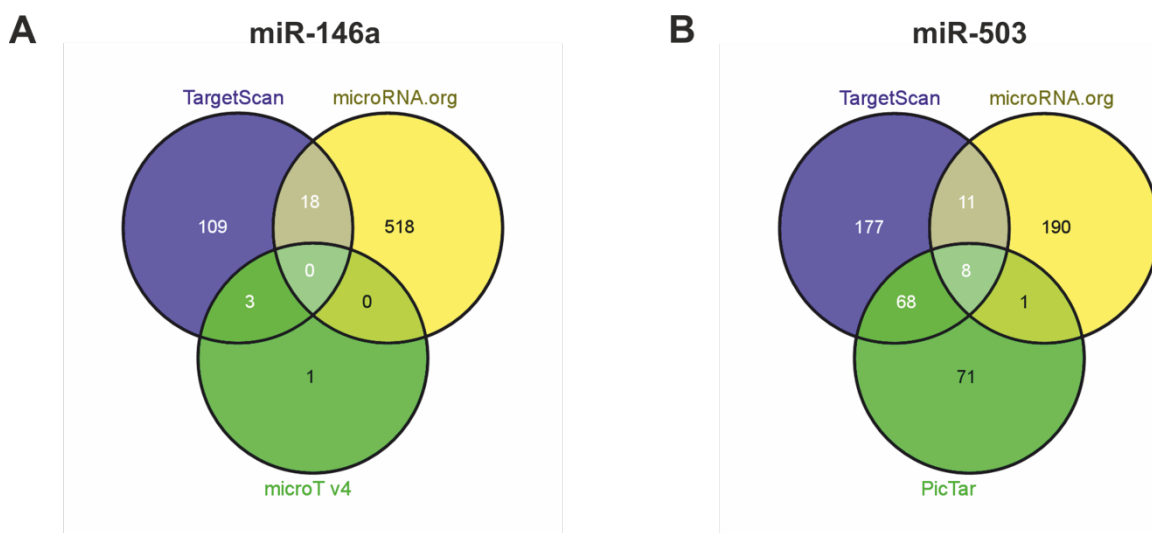


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Vorhersagemodelle mithilfe von Venn-Diagrammen

Zur Identifizierung potenzieller Ziel-mRNAs wurden die web-basierten Suchmaschinen *TargetScan*, *microRNA.org*, *microT v4* und *PicTar* angewendet. Die resultierenden Schnittmengen wurden bezüglich ihrer microRNA-mRNA Wechselwirkungen in Kardiomyozyten überprüft.

In Zusammenarbeit mit Dr. Inka Boomgarden (Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein) führten wir eine bioinformatische Analyse zur Verifizierung von möglichen Zielstrukturen der untersuchten miRs aus. Dabei verwendet jede Suchmaschine andere statistische Algorithmen zur Vorhersage von miR-Bindungsstellen an

der Ziel-mRNA. Die vorhergesagten Zielgene wurden anschließend bezüglich ihrer Spezifität und Relevanz in Herzmuskelzellen analysiert. Dabei konnten wir vier vielversprechende Zielstrukturen identifizieren, die mit großer Wahrscheinlichkeit durch miR-146a bzw. miR-503 reguliert werden und deren Wechselwirkungen mit den oben genannten miRs vermutlich einen Einfluss auf die Signaltransduktion in Kardiomyozyten haben.

Für die von uns untersuchte miR-146a wurden drei vielversprechende Zielgene übereinstimmend vorausgesagt: *Apelin*, *Frizzled class receptor 1* und *Stanniocalcin 1* (Tabelle 3-4). Für miR-503 wurde *Apelin* sowie *Cyclin D2* als potentielle Zielstruktur vorhergesagt (Tabelle 3-4).

Apelin ist ein Peptid, welches in humanen Organismen durch das *ApIn*-Gen codiert wird (Tatemoto et al., 1998) und der endogene Ligand für den G-Protein-gekoppelten APJ-Rezeptor ist (Lee et al., 2000).

Cyclin D2 (CCND2) ist ein Protein, welches eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus spielt, indem es den Eintritt von der G1-Phase in die S-Phase steuert (Bertoli et al., 2013). Außerdem ist CCND2 bedeutend für die Proliferation und Hypertrophie von Kardiomyozyten (Pasumarthi et al., 2005, Zhong et al., 2006).

Das Protein Frizzled class receptor 1 wird durch das *Fzd1*-Gen codiert und gehört zur „*Frizzled*“-Genfamilie (Sagara et al., 1998). Diese Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptor Proteinen fungieren als Mediatoren im *Wnt Signaling Pathway* (Malbon, 2004).

Stanniocalcin 1 ist ein Glykoprotein, welches homolog zu dem Hormon Stanniocalcin ist. Es wird im humanen Organismus durch das *Stc1*-Gen codiert. Stanniocalcin gehört zu einer Familie von Hormonen, die den Calcium-Phosphat-Haushalt im Körper reguliert (Madsen et al., 1998).

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass die vier identifizierten Zielstrukturen relevante Einflüsse bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen tragen (Sato et al., 2013, Busk et al., 2002). Somit könnten weitergehende Untersuchungen der Interaktionen zwischen den von uns gefundenen miRs und diesen Zielstrukturen interessante Aufschlüsse über die Entstehung und auch Therapie von Herzkreislauferkrankungen liefern.

Tabelle 3-4: Vorhersage von microRNA-mRNA Interaktionen

Nummer	microRNA	Zielgen mRNA	Position der Bindungsstelle	Bindungsstellen-Typ ^a
1	rno-miR-146a	<i>Apln</i>	49 – 55	7mer-A1
		<i>Fzd1</i>	1517 – 1523	7mer-M8
		<i>Stc1</i>	2378 – 2385	8mer
2	rno-miR-503	<i>Apln</i>	1490 – 1496	7mer-A1
		<i>Ccnd2</i>	631 – 637	7mer-A1
		<i>Ccnd2</i>	1762 – 1768	7mer-A1

^a TargetScan 7.0 sagt folgende Bindungsstellen vorher: 8mer – exakte Übereinstimmung der Positionen 2-8 der reifen miRNA (Seed-Sequenz und Position 8) gefolgt von einem Adenosin; 7mer-M8 – exakte Übereinstimmung der Positionen 2-8 der reifen miRNA (Seed-Sequenz und Position 8); 7mer-A1 – exakte Übereinstimmung der Positionen 2-7 der reifen miRNA (Seed-Sequenz und Position 7) gefolgt von einem Adenosin.

3.11 MiR-146a reguliert Stanniocalcin 1

Zur Verifizierung der biostatistischen Zielgen-Voraussage von *Apln*, *Ccnd2*, *Fzd1* und *Stc1* wurden 3'UTR-Luciferase-Konstrukte generiert.

Zur Überprüfung der Regulation von Zielstrukturen der miR-146a wurden die 3'UTR-Luciferase-Konstrukte von *Apln*, *Fzd1* und *Stc1* mit miR-146a *Mimics* (5, 10, 25 pmol) co-transfiziert.

Nach der Überexpression von miR-146a kam es zu einem signifikanten Abfall der Luciferaseaktivität der Reportergenkonstrukte von Apelin und Stanniocalcin 1 (Abbildung 21 A, C). Die Aktivität von Frizzled class receptor 1 hingegen verringerte sich ebenfalls signifikant in den beiden höheren Dosen (Abbildung 21 B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass miR-146a die post-transkriptionelle Translation von Apelin und Stanniocalcin 1 wesentlich inhibiert und diese als Zielstrukturen von miR-146a relevant sein könnten.

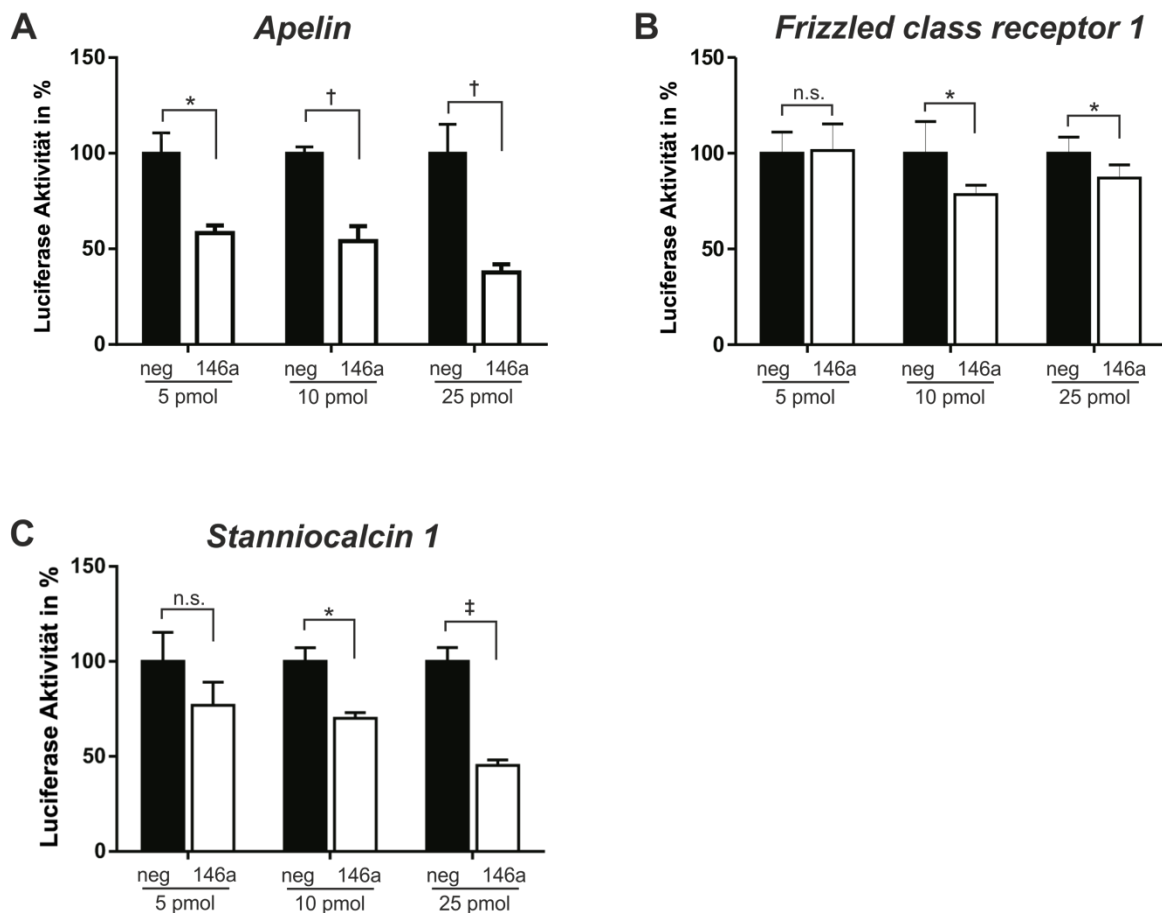


Abbildung 21: Apelin und Stanniocalcin 1 sind Zielstrukturen von miR-146a

(A) Die dosisabhängige Überexpression von miR-146a führt zur signifikanten Aktivitätsverringerng des Luciferasekonstrukts, welches die miR-146a-Bindungsstelle der 3'UTR von Apelin enthält. (B) Geringe Aktivitätsveränderungen des Luciferasekonstrukts von *Fzd1*. (C) Signifikant niedrigere Luciferaseaktivität von Stanniocalcin 1 bei Überexpression von miR-146a.

Stoffmenge miRNA Mimics: 5, 10, 25 pmol. N=3, * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$.

3.12 Apelin ist eine Ziel-mRNA von miR-503

Zur Überprüfung der Zielstrukturvorhersage wurden für miR-503 verschiedene 3'UTR-Luciferase-Assays durchgeführt. Potentielle Zielstrukturen waren dabei *Apln* und *Ccnd2*.

Hierbei zeigte sich eine hochsignifikante Verringerung der Luciferaseaktivität von Apelin durch Überexpression von miR-503 (Abbildung 22 A). Trotz zweier vorhergesagter Bindungsstellen zwischen der Seed-Sequenz von miR-503 und der 3'UTR von Cyclin D2, wurde die Aktivität des Cyclin D2-Konstruktes von miR-503 nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung 22 B). Der Grund dafür könnte sein, dass trotz bioinformatischer Vorhersage der

Bindungsstellen schlichtweg die miR-503 nicht an der 3'UTR von Cyclin D2 binden kann, bzw. die Bindung nicht stabil genug ist, um eine signifikante Verringerung der Luciferaseaktivität zu bewirken.

Somit konnte gezeigt werden, dass Apelin eine von miR-503 regulierte Zielstruktur ist.

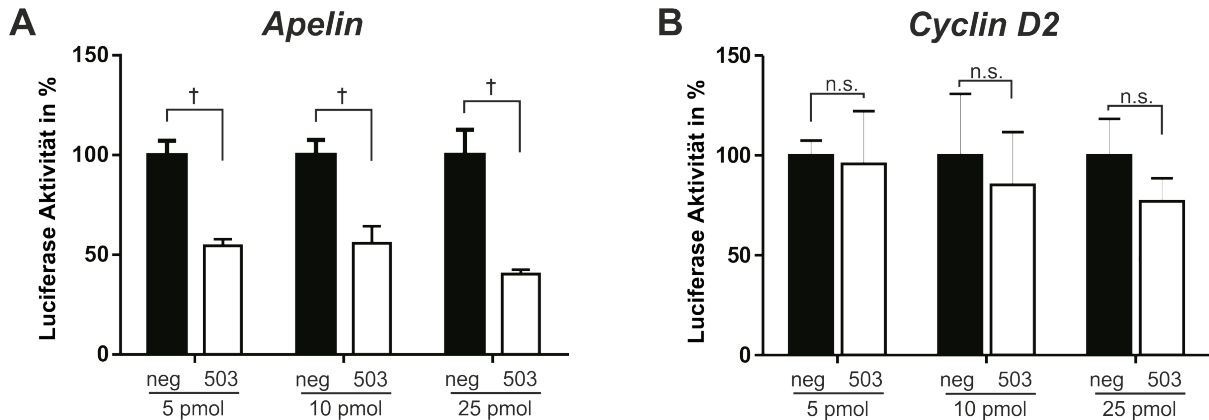


Abbildung 22: Verifizierung der biostatistischen Zielgen-Vorhersage mithilfe von Luciferasekonstrukten

(A) Signifikante Verringerung der Luciferaseaktivität des 3'UTR-Konstruktes von Apelin durch Überexpression von miR-503. (B) Fehlende Aktivitätsveränderung des Cyclin D2-Konstruktes nach Überexpression von miR-503. Stoffmenge miRNA Mimics: 5, 10, 25 pmol. N=3, † p<0,01.

4 Diskussion

4.1 MiR-146a und miR-503 werden durch Stress reguliert

Biomechanischer Stress auf Kardiomyozyten in Form von dynamischer biphasischer Dehnung (Stretch) führt zur Hypertrophie der Zellen. Diese geht einher mit einer erhöhten Sarkomer-Organisation sowie der Induktion des hypertrophischen Genprogramms. Bisher blieb jedoch unklar, welche Signalwege durch biomechanischen Stress spezifisch aktiviert werden und welchen Einfluss miRNAs dabei aufweisen.

Dieses ist eine erste vergleichende, genomweite Analyse des miR-Expressionsmusters von dynamisch biomechanisch gedehnten Kardiomyozyten. Wir konnten zeigen, dass sowohl biomechanischer Stress als auch die pharmakologische Stimulation durch Phenylephrin zu einer differentiellen Regulation von miR-146a und miR-503 führt.

Akuter Stress (Stunden) führt zur Herunterregulation von miR-146a und zur Heraufregulation von miR-503. Chronischer Stress (Wochen) wiederum führt zur Induktion beider miRNAs. Dabei scheinen interessanterweise die primären Kompensationsmechanismen der miR-146a eine differentielle Regulation zwischen akutem und chronischen Stress zu bewirken. Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Untersuchungen beobachtet (Frank et al., 2012, Pimentel et al., 2001, Li et al., 2015).

4.1.1 MicroRNA-146a beeinflusst das myokardiale Remodeling

Die miR-146a wird in der Literatur als anti-inflammatorische miRNA, mit tiefgreifenden Effekten bei der Hemmung der angeborenen Immunantwort, beschrieben (Saba et al., 2014). Lokalisiert im nichtcodierenden Abschnitt von Chromosom 5 (5q33.3) wird miR-146a als einzelne miRNA transkribiert und gehört somit keinem Cluster an. Huang et al. konnten zeigen, dass die simultane *in vivo* Stimulation von miR-21 und miR-146a bei myokardialen Ischämien in Mäusen eine kardiale Dysfunktion abmildert und Apoptose reduziert (Huang et al., 2016). Dabei beeinflussen miR-21 und miR-146a synergistisch dieselben Signalwege. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass durch akuten Stress auf Kardiomyozyten die Expression von miR-146a verringert wird und somit eine *in vivo* Stimulation von miR-146a möglicherweise die kardiale Antwort auf Stress verbessern könnte.

Der kardiovaskuläre Einfluss von miR-146a wurde kürzlich auch bei Patienten mit ischämischen Hirninfarkt erkannt. Die miR-146a-Expression war im akuten Stadium supprimiert, im subakuten Stadium wiederum erhöht (Li et al., 2015). Diese Beobachtung ist

kongruent mit unserem Ergebnis und lässt den Einfluss von miR-146a auf kardiovaskuläre Ereignisse vermuten. Des Weiteren wurde miR-146a in Zusammenhang mit der Pathogenese von kardialen Erkrankungen gebracht. Durch die Überexpression von NF- κ B, TNF- α und *Fos* wird miR-146a ebenfalls induziert und damit einhergehend eine Entzündungsreaktion im Herzen vermittelt, die eine Induktion des myokardialen Remodelings verursacht, die kardiale Funktion verschlechtert und den Prozess der Herzinsuffizienz beschleunigt (Palomer et al., 2015). Interessanterweise zeigten auch unsere Untersuchungen einer chronischen Druckbelastung (Aortic Banding) miR-146a heraufreguliert, weshalb es als plausibel erscheint, dass auch durch die Nachlasterrhöhung eine Expressionssteigerung von miR-146a das myokardiale Remodeling beeinflusst.

Nach einem stattgefundenen Myokardinfarkt kann die Entzündungsreaktion in der Infarktregion zu einer Ventrikelruptur führen. Humane postmortale Myokardproben zeigten miR-146a heraufreguliert und lassen einen Zusammenhang zwischen dem miR-146a-vermittelten Entzündungsprozess und der Ventrikelruptur nach Myokardinfarkt herstellen (Zidar et al., 2011). Außerdem scheint miR-146a eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von immunologischen und kardialen Signalwegen zu haben. In Monozyten und Kardiomyozyten bildet miR-146a eine negative Rückkopplungsschleife und inhibiert die Expression pathologischer Moleküle wie NF- κ B und TNF- α und verhindert somit die Vermittlung pathologischer Signale (van de Vrie et al., 2011). In Übereinstimmung dazu konnten wir zeigen, dass die adenovirale Überexpression von miR-146a die Expression von *Rcan1.4* 3,2-fach erhöhte. Zudem haben *Zheng et al.* festgestellt, dass *Rcan1.4* über den NF- κ B Signalweg aktiviert werden kann (Zheng et al., 2014), was für unsere Untersuchungen den Zusammenhang zwischen der Überexpression von miR-146a, der Heraufregulation von *Rcan1.4* und der daraus folgenden Aktivierung von NF- κ B herstellen könnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus der miR-146a zu einem erhöhten Myokardinfarkt-Risiko führt (Chen et al., 2014) sowie die Bindung zur mRNA von TCF21 verhindert und damit eine Risikoerhöhung für die koronare Herzkrankheit assoziiert ist (Bastami et al., 2016). Zusätzlich zur Vermittlung pathologischer Signale zeigten *Athyros et al.*, dass miR-146a mit der Plaque-Destabilisierung in Koronararterien in Beziehung steht und die Expression von miR-146a durch Statine sowie der Inhibition des Renin-Angiotensin-Systems positiv beeinflusst wird (Athyros et al., 2014).

4.1.2 Der Einfluss von miR-503 auf Herz-Kreislaufkrankungen

MiR-503 und miR-424 werden als polycistronische pri-miRNA co-transkribiert und als miR-424-503 Gencluster zusammengefasst (Finnerty et al., 2010). Zudem ist miR-503 ein Mitglied der erweiterten miR-16 Familie und wird in der Literatur überwiegend als Tumor-suppressive miRNA beschrieben, die den Ablauf des Zellzyklus und die Proliferation von Zellen reguliert (Qiu et al., 2013, Xiao et al., 2013, Yang et al., 2014).

Die miR-16 Familie, bestehend aus miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-103 und miR-107, nur in Säugetieren exprimiert werden miR-195, miR-424, miR-497, miR-503 und miR-646. Diese 10 miRNAs führen eine homologe Seed-Sequenz mit 6 gleichen Nukleotiden. MiR-503 unterscheidet sich insofern, als dass das letzte Nukleotid der Seed-Sequenz Guanin statt Adenosin ist. Es wurde evident, dass verschiedene Mitglieder der miR-16 Familie überlappende miR-Zielstrukturen regulieren können (Forrest et al., 2010). Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass nur miR-503 als Teil der miR-16 Familie durch biomechanischen Stress differentiell reguliert wird. Über den Einfluss von miR-503 auf kardiovaskuläre Ereignisse ist bisher wenig bekannt.

Eine wichtige kardiovaskuläre Beobachtung wurde kürzlich publiziert. MiR-503 begünstigt die kardiale Fibrosierung durch eine erhöhte Apelin-induzierte Kollagenproduktion (Zhou et al., 2016). In Übereinstimmung dazu konnten wir in unseren Untersuchungen feststellen, dass miR-503 bei akutem und chronischen biomechanischen Stress signifikant heraufreguliert wird und eine Überexpression von miR-503 ebenfalls ANF (*Nppa*) und *Rcan1.4* induziert. Zudem deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass über die neu identifizierte Zielstruktur Apelin auch die Hypertrophie von Kardiomyozyten induziert werden kann.

Caporali et al. konnten demonstrieren, dass miR-503 einen bedeutenden Einfluss auf die Inhibition der Angiogenese im Kontext von Diabetes mellitus nimmt. Die Adenovirus- und AntimiR-vermittelte Inhibition von miR-503 verbesserte die postischämische regenerative Neovaskularisation sowie den Blutfluss bei Diabetespatienten (Caporali et al., 2011). Kongruent dazu konnten wir zeigen, dass die AntimiR-vermittelte Inhibition von miR-503 die Hypertrophie von Kardiomyozyten nach Stimulation mit Phenylephrin attenuiert. Weiterhin wurde bekannt, dass miR-503 simultan FGF2 und VEGFA, die beiden potentesten angiogenetischen Faktoren, herunterreguliert. Diese anti-angiogenetische Funktion von miR-503 konnte bei der Tumorgenese in HCC-Zellen beobachtet werden (Zhou et al., 2013).

4.2 Induktion des hypertrophischen Genprogramms

Es konnte in vorhergehenden Arbeiten gezeigt und in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die biomechanische Belastung von Kardiomyozyten durch Stretch eine Zellhypertrophie und die Induktion des hypertrophischen Genprogramms bewirkt (Frank et al., 2008, De Jong et al., 2013). Wir konnten außerdem zeigen, dass die Stimulation von Kardiomyozyten mit Phenylephrin, einem starken Induktor der Myokardhypertrophie, zur Hypertrophie der Zellen *in vitro* führte.

In beiden Modellen kam es zu einer Expressionsverringering von miR-146a und einer Expressionserhöhung von miR-503. Auch nach adenoviraler Überexpression führte der Stretch zu einer Halbierung der miR-146a Expression und einer 67%-igen Induktion von miR-503. Dies zeigt den bedeutenden Einfluss der biomechanischen Belastung auf die differentielle Regulation von miR-146a und miR-503.

Ungeklärt blieb bisher, wie miR-146a die Induktion der Hypertrophie beeinflusst. Unter basalen Bedingungen führte bereits die adenovirale Überexpression von miR-146a zu einer signifikanten Induktion des hypertrophischen Genprogramms. Nach 24 h Stretch wurde eine weitere Gen-Induktion (*Nppa*) des natriuretischen Peptides (ANF) sowie des *regulator of calcineurin* (*Rcan1.4*) beobachtet. Interessanterweise reduzierte der *Knockdown* von miR-146a die pro-hypertrophischen Effekte *in vitro*: Nach Stimulation mit PE bleibt die Zellgröße der Kardiomyozyten annähernd gleich. Somit scheint die Regulation von miR-146a durch biomechanischen und pharmakologischen Stress über gleiche Signalwege gesteuert zu werden. Ein potentieller Signalweg kann hier die Expressionsänderung der anti-hypertrophischen MAP-Kinase (MKP-1) sein. In Monozyten wurde beobachtet, dass der miR-146a-*Knockdown* die Expression von MKP-1 inhibiert (Brudecki et al., 2013b). Die von uns beobachtete Stretch-bedingte Herunterregulation von miR-146a könnte somit auch zu einer geringeren Expression von MKP-1 und subsequent zu einer Hypertrophie-Induktion führen.

Ein weiterer durch die miR-146a modellierter Signalweg scheint die Phosphorylierung von p38-MAPK, Bestandteil der maladaptiven Hypertrophie, sowie die Aktivierung des Akt-Signalweges, ein Induktor der physiologischen Hypertrophie, zu sein. So wirkt die Kombination aus miR-21 und miR-146a über die genannten Signalwege protektiv bei Myokardischämien in Mäusen, resultierend in einer verringerten Infarktgröße und verbesserter kardialer Funktion (Huang et al., 2016). Der *Knockdown* von miR-146a wiederum induziert die p38-MAPK-Phosphorylierung in humanen Monozyten und könnte somit zumindest teilweise die maladaptive Hypertrophie forcieren (Brudecki et al., 2013a).

Die Stretch-induzierte Suppression von miR-146a und daraus resultierende Induktion von ANF (*Nppa*) und *Rcan1.4* könnte also über die p38-MAPK-Phosphorylierung und Inaktivierung des Akt-Signalweges gesteuert sein.

Die adenovirale Überexpression von miR-503 führte bereits unter basalen Bedingungen zu einer Regulation von typischen Vertretern des hypertrophischen Genprogramms sowie der Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges, welche durch Stretch nochmals verstärkt wurde. Der AntimiR-vermittelte *Knockdown* von miR-503 reduzierte die hypertrophische Zellantwort nach Stimulation mit PE. In diesem Zusammenhang ist es also möglich, dass durch den *Knockdown* von miR-503 die Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges ausbleibt und eine Hypertrophie zumindest abgeschwächt wird. Zusammengenommen wirkt miR-503 somit pro-hypertroph und die Inhibition von miR-503 schwächt diese Effekte deutlich ab.

Eine weitere mögliche Interaktion von miR-503 stellt dabei der PI3K-Signalweg dar, ein positiver Regulator der adaptiven Hypertrophie. Bisher ist bekannt, dass miR-503 im Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) supprimiert (Yang et al., 2014). Supprimiert miR-503 ebenfalls in Kardiomyozyten die PI3-Kinase, könnte dies eine mögliche Erklärung für die pro-hypertrophe Wirkung von miR-503 sein.

Somit konnten wir zeigen, dass miR-146a und miR-503 Einfluss sowohl auf die Induktion des hypertrophischen Genprogramms als auch die Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges haben. Dabei scheint die Hypertrophie über den p38-MAPK- und den PI3K/Akt-Signalweg induziert zu sein.

4.3 MiR-146a hat eine hypertrophische Funktion in Kardiomyozyten

Unsere bioinformatische Analyse deckte Apelin, Frizzled class receptor 1 (*Fzd1*) und Stanniocalcin 1 (*Stc1*) als relevante Zielstrukturen von miR-146a auf. Mittels 3'UTR-Luciferase-Assay konnten wir Apelin und Stanniocalcin 1 als Zielstruktur bestätigen.

Das Glykoprotein Stanniocalcin 1 gehört zu einer Familie von Hormonen, die den Calcium-Phosphat-Haushalt im Körper reguliert (Madsen et al., 1998) und wurde ursprünglich als Calcium-regulierendes Hormon in Fischen identifiziert (Sheikh-Hamad, 2010, Yeung et al., 2012). Aktuelle Studienergebnisse zeigen jedoch, dass *Stc1* auch ubiquitär in humanen Geweben gebildet wird und überwiegend als para- und autokriner Faktor verschiedene biologische Prozesse reguliert (Mohammadipoor et al., 2016). Darüber hinaus kann *Stc1* auch als intrakriner Faktor in Mitochondrien translozieren, die auch von anderen Faktoren

wie Angiotensin-II, TGF- β , Wachstumshormon und ANF beeinflusst werden (Re und Cook, 2010).

Außerdem scheint Stc1 eine signifikante Rolle bei der Regulation der adaptiven und maladaptiven Prozesse zu spielen, die zum Phänotyp der Herzinsuffizienz führen. *Sheikh-Hamad et al.* fanden Stc1 in Kardiomyozyten und vaskulären, glatten Muskelzellen von herzinsuffizienten Patienten auf Proteinebene signifikant heraufreguliert, wobei nicht abschließend geklärt ist, ob dies Ursache oder Folge der Herzinsuffizienz ist. Nach der Behandlung mit einem ventrikulären Unterstützungssystem (LVAD) beispielsweise zeigte sich Stc1 signifikant herunterreguliert (Sheikh-Hamad et al., 2003).

In Übereinstimmung zu unseren Untersuchungen könnte in diesem Kontext auch miR-146a eine wesentliche Rolle spielen. Nach akutem biomechanischen Stress wird miR-146a signifikant herunterreguliert. Eine Herunterregulation von miR-146a könnte eine erhöhte Translation der Ziel-mRNA, in diesem Fall Stc1, verursachen und somit zu einer Expressionserhöhung von Stc1 auf Proteinebene mit den oben genannten maladaptiven Prozessen führen.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die Hinzugabe von rekombinantem Stc1 in das Medium von neonatalen Rattenkardiomyozyten die endogene Schlagfrequenz senkt und den kontraktionsbedingten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration verringert (Sheikh-Hamad et al., 2003). Die differentielle Regulation der myokardialen Stc1-Expression bei Herzinsuffizienz scheint auch die Veränderungen des Calcium-Haushalts insuffizienter Herzen zu bedingen.

Weiterhin wurde bekannt, dass Stc1 Einfluss auf die TLR4-Konzentration (engl. *toll-like receptor*) nimmt (Mohammadipoor et al., 2016). Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten, dass die TLR4-Inhibition mit einer verbesserten kardialen Funktion nach Myokardischämien verknüpft ist, durch die Abschwächung der myokardialen Inflammation und der Reduktion der Infarktgröße (Shimamoto et al., 2006, Chong et al., 2004). Ferner vermittelt TLR4 das maladaptive linksventrikuläre Remodeling und beeinträchtigt die kardiale Funktion nach Myokardischämien (Timmers et al., 2008). Stc1 reguliert die Feinabstimmung der TLR4- und TLR2-Antwort durch die Balanceverschiebung zwischen konkurrierenden MAP-Kinasen wie ERK1/2 und p38, beide modulieren die Signalwege der maladaptiven Hypertrophie (Mohammadipoor et al., 2016).

Mit unseren Untersuchungen können wir diesen Signalweg auch für die Stretch-bedingte Herunterregulation von miR-146a und einer damit erhöhten Phosphorylierung der p38-MAPK bestätigen. Hier scheint Stc1 eine wichtige regulatorische Funktion zu übernehmen und

durch die Expressionserhöhung von Stc1 die Balance in Richtung einer maladaptiven Hypertrophie verschieben.

Kürzlich wurde bekannt, dass Stc1 zudem antioxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt und eine ischämische kardiale Schädigung abmildert (Mohammadipoor et al., 2016).

Somit stellt sich hier ein sehr interessanter möglicher Signalweg bei der Vermittlung kardialer Hypertrophie im Rahmen des myokardialen Remodelings dar. Mit Stc1 als Zielstruktur von miR-146a könnte somit ein neuer, vielversprechender Regulationsmechanismus über TLR4 und die „maladaptiven“ MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 gefunden worden sein.

4.4 Regulierung der Hypertrophie durch miR-503

Übereinstimmend haben die verwendeten Biodatenbanken Apelin und Cyclin D2 als Zielstrukturen der miR-503 ermittelt. Unsere *in vitro* Untersuchung bestätigte nur Apelin als Ziel-mRNA von miR-503.

Apelin ist ein Peptid, welches in humanen Organismen durch das *APLN*-Gen codiert wird (Tatemoto et al., 1998) und der endogene Ligand für den G-Protein-gekoppelten APJ-Rezeptor ist (Lee et al., 2000). Dieser wird an der Oberfläche von verschiedenen Zelltypen exprimiert und zeigt eine signifikante Homologie zum Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (O'Dowd et al., 1993). Kardiovaskulär hat Apelin eine zentrale Bedeutung: Die vaskuläre Expression des Rezeptors nimmt einen wesentlichen Einfluss auf die Blutdruck Kontrolle und die Aktivierung des Rezeptors fördert die Ausbildung von neuen Gefäßen (Angiogenese) (Lee et al., 2000, Kasai et al., 2004). Der Apelin-Rezeptor wird zudem in Kardiomyozyten von Erwachsenen exprimiert und ist einer der potentesten Stimulatoren der kardialen Kontraktilität (Szokodi et al., 2002, Ashley et al., 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Apelin die ACE-2 Aktivität erhöht und das myokardiale Remodeling verbessert (Sato et al., 2013). In Übereinstimmung dazu zeigten erwachsene Apelin-*Knockout*-Mäuse eine progressive Verschlechterung der kardialen Kontraktilität (Kuba et al., 2007). Apelin agiert somit als Mediator des kardiovaskulären Systems und spielt eine bedeutende Rolle beim post-Myokardinfarkt-Remodeling (Wang et al., 2013a).

Mit unseren Untersuchungen können wir diese Beobachtungen bestätigen. Die Stretch-induzierte Heraufregulation von miR-503 führt zu einer Induktion des hypertrophischen Genprogramms und einer Hypertrophie von Kardiomyozyten. Die Überexpression von miR-503 wiederum bewirkt eine Expressionsverringering von Apelin und somit eine Verschlechterung der kardialen Kontraktilität.

Den ersten relevanten kardiovaskulären Zusammenhang zwischen miR-503 und Apelin haben kürzlich *Zhou et al.* hergestellt. In TAC-Mäusen (engl. *Transverse aortic constriction* – Nachlasterhöhung durch Aortenligatur) fanden sie miR-503 heraufreguliert und stellten deckungsgleich mit unseren Beobachtungen fest, dass eine Überexpression von miR-503 zu einer Suppression von Apelin auf mRNA- und Proteinebene führt (Zhou et al., 2016). *Zhou et al.* beobachteten weiterhin, dass die spezifische Inhibition von miR-503 die kardiale Funktion von TAC-Mäusen verbessert und eine Überexpression von miR-503 die kardiale Fibrosierung über den Apelin-TGF- β -CTGF-Signalweg (engl. *Transforming growth factor; Connective tissue growth factor*) begünstigt (Zhou et al., 2016).

Mit unseren Experimenten konnten wir nun Hinweise auf einen weiteren pathologischen Prozess des myokardialen Remodelings liefern, nämlich die Verbindung von miR-503 zu Apelin im Kontext einer Stretch-bedingten pathologischen Hypertrophie von Kardiomyozyten. *Kim et al.* konnten zeigen, dass bei der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie miR-503 gemeinsam mit ihrer Zielstruktur Apelin den FGF (engl. *Fibroblastic growth factor*) reguliert. Es ist also denkbar, dass der komplexe Prozess des myokardialen Remodelings über die Fibrosierung und Hypertrophie teilweise durch miR-503 und Apelin reguliert wird.

In unserer *in vitro* Untersuchung zur Bestätigung der vorhergesagten Zielstrukturen zeigte nach Überexpression von miR-503 die Cyclin D2 Aktivität nur eine geringe, nicht signifikante Abschwächung. *Rieswijk et al.* Haben in einem anderen Modell eine Interaktion zwischen miR-503 und Cyclin D2 in Kardiomyozyten feststellen können. Die Arbeitsgruppe demonstrierte eine gegensätzliche Regulation von miR-503 und Cyclin D2 in Hepatozyten von Mäusen. Dabei zeigte sich eine miR-503-induzierte Herunterregulation von Cyclin D2 (Rieswijk et al., 2015). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei der Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie in Ratten der ERK1/2-Cyclin D2-Signalweg signifikant heraufreguliert wird (Tang et al., 2015).

In Zusammenfassung unserer Untersuchungen und der aktuellen Publikationen könnte die Expressionsveränderung von miR-503 mit seinen Zielstrukturen Apelin und Cyclin D2 einen möglichen Signalweg der Induktion kardialer Hypertrophie *in vitro* und *in vivo* darstellen. Dabei stellt insbesondere die MAP-Kinase ERK1/2, die über miR-503 und den Cyclin D2-Signalweg heraufreguliert sein könnte, einen interessanten, weil Hypertrophie-induzierenden Ansatzpunkt dar.

4.5 Therapiepotenzial von microRNAs

Ein entscheidender therapeutischer Ansatzpunkt des myokardialen Remodelings ist die Abschwächung dieses maladaptiven Prozesses sowie dessen frühzeitige Diagnostik. Dabei sind microRNAs als Biomarker und therapeutische Zielstrukturen in den letzten zehn Jahren vermehrt in den Fokus der Wissenschaft gerückt (Budhu et al., 2010, Elmen et al., 2008, Oerlemans et al., 2012). Im kardiovaskulären Bereich gibt es bereits therapeutische Ansätze zur gezielten Überexpression oder Hemmung einzelner microRNAs (Suarez et al., 2008, Hinkel et al., 2013).

MiR-146a wird in der Literatur als anti-inflammatorische miRNA beschrieben (Saba et al., 2014). Das therapeutische und diagnostische Potential von miR-146a wurde erstmalig bei peripartaler Kardiomyopathie (PPCM) in Mäusen beobachtet. Dabei induzierte Prolaktin die Freisetzung von miR-146a-angereicherten Exosomen aus Endothelzellen. Diese wurden von Kardiomyozyten aufgenommen und führten zu einer erhöhten miR-146a-Expression, zur Herunterregulation der miR-146a-Zielstrukturen *ErbB4*, *Notch1* sowie *Irak1* und konsekutiv zur Verschlechterung der kontraktile Funktion (Halkein et al., 2013). Mäuse mit einem Kardiomyozyten-spezifischen *Knockout* von *Stat3* (sog. CKO-Mäuse) entwickelten einen PPCM-ähnlichen Phänotyp mit einer erhöhten kardialen miR-146a-Expression sowie einer Herunterregulation von *ErbB4*, *Nras*, *Notch1* und *Irak1*. Unsere bioinformatische Analyse hingegen zeigte für die hier genannten Zielstrukturen keine Bindungsstellen mit der miR-146a.

Interessanterweise führte die Inhibition von miR-146a mittels LNA-modifizierter Antisense-Oligonukleotide (engl. *locked nucleic acid*) oder AntimiRs in CKO-Mäusen zu einer Abschwächung der kardialen Dysfunktion, einer verringerten Fibrosierung und einer Verbesserung der peripartalen Kardiomyopathie. Weiterhin zeigten Halkein et al., dass die miR-146a-Expression im Plasma und Herz von Patienten mit peripartaler Kardiomyopathie erhöht war, bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie hingegen nicht (Halkein et al., 2013). Somit konnte hier erstmalig der therapeutische und diagnostische Nutzen einer einzelnen miRNA gezeigt werden. Dabei scheint eine erhöhte miR-146a-Expression prädiktiv für das Auftreten einer peripartalen Kardiomyopathie zu sein.

Mit der von uns gezeigten Heraufregulation von miR-146a im Zusammenhang von chronischem biomechanischen Stress auf Kardiomyozyten und der damit einhergehenden Hypertrophie, könnte miR-146a auch für kardiovaskuläre Erkrankungen einen sensitiven Biomarker sowie eine therapeutische Option in Form einer miR-146a-Inhibition darstellen.

Kongruent zu dieser Hypothese zeigten Liu et al. kürzlich, dass miR-146a und miR-21 gemeinsam als prädiktive Biomarker für das linksventrikuläre Remodeling nach

Myokardinfarkt eingesetzt werden können (Liu et al., 2015). Zudem konnte die dargestellte Kombination aus miR-146a und miR-21 die kardiale Dysfunktion und Apoptose in Mäusen reduzieren (Huang et al., 2016). Die Synergie der beiden miRs hat hier anscheinend eine größere Wirkung an denselben Zielstrukturen. Interessant erscheint vor allem die prognostische Wertigkeit beide miRs für das ventrikuläre Remodeling. Zudem wurde gezeigt, dass der AT1-Rezeptorblocker Azilsartan die Plasmawerte von miR-146a und miR-342-3p in murinen Herzinsuffizienz-Modellen normalisieren kann (Kaneko et al., 2016).

Die als Tumor-suppressiv beschriebene miR-503 zeigte in unseren Untersuchungen eine pro-hypertrophe Wirkung in Kardiomyozyten, welche Stress in Form von biomechanischem dynamischen Stretch, transversaler aortaler Konstriktion (TAC) oder pharmakologischen Stimuli (PE) ausgesetzt waren. Wir konnten zeigen, dass der AntimiR-vermittelte *Knockdown* die pro-hypertrophen Effekte von miR-503 *in vitro* reduziert. Zudem konnte die Regulation des kardiovaskulär-wirksamen Peptides Apelin durch miR-503 von uns und einer anderen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Zhou et al., 2016).

Therapeutisch möglich könnte die Inhibition von miR-503 durch LNA-modifizierte Antisense-Oligonukleotide oder AntimiRs zur Attenuierung einer Stress-responsiven Hypertrophie *in vivo* sein.

Dabei kann sich jedoch durch die Inhibition von miR-503 eine potentiell neoplastische Nebenwirkung ergeben, denn zwei der bisher validierten Zielstrukturen von miR-503 sind die Zellzyklus-regulierenden Proteine Cyclin D1 und Cyclin D2 (Jiang et al., 2009). Die Folgen einer Überexpression von miR-503 wird in der Literatur hingegen ambivalent beschrieben. Einerseits bewirkt die Überexpression von miR-503 eine Inhibition der Zellproliferation in humanen Brustkrebszellen durch Suppression der Cyclin D1-Expression (Long et al., 2015). Andere Untersuchungen ergaben eine miR-503-induzierte Tumorprogression beim Ösophaguskarzinom (Ide et al., 2015).

Somit bliebe für die miR-503 basierte kardiale Therapie eine Myokard-spezifische Distribution unentbehrlich. Eine kardiale Applikation mittels myokardialer oder koronarer Injektion wäre hierbei denkbar (Caroli et al., 2013). Idealerweise wäre also die kardiotope miR-503 basierte Therapie durch LNA-modifizierte Antisense-Oligonukleotide oder AntimiRs, wobei Wirkdauer und Nebenwirkungen bisher noch unzureichend verstanden sind (Biglino et al., 2017).

Eine weitere Problematik ergibt sich durch die nahezu vollständige Homologie der Seed-Sequenz von miR-503 und den Mitgliedern der miR-16 Familie. Durch die teils überschneidende Regulation derselben Zielstrukturen könnte sich eine parallele Wirkung der miR-503 Therapie ergeben. Auch wenn aus der erweiterten miR-16 Familie in unseren

Untersuchungen nur miR-503 durch dynamischen biomechanischen Stretch reguliert wurde, könnte reziprok eine Inhibition von miR-503 auch die Zielstrukturen der miR-16 Familie beeinflussen.

Eine neuartige Therapieform zur Bereitstellung von miRNAs wurde kürzlich mit miR-503 in Endothelzellen getestet. *Masotti et al.* beschichteten spezielle Kohlenstoffnanoröhren (CNT, engl. *carbon nanotubes*) mit pre- oder AntimiR-Oligonukleotiden und gewährleisteten somit die kontinuierliche Distribution von miR-503 in Endothelzellen (Masotti et al., 2016). Zudem konnte demonstriert werden, dass die gelösten miRNAs die Zellproliferation regulieren und durch Modulation ihrer Zielstrukturen die Angiogenese *in vivo* und *in vitro* beeinflussen.

Somit öffnet sich hier eine Möglichkeit für miR-503, indem beispielsweise koronare Stents oder CNTs mit einer AntimiR-Beschichtung implantiert werden und durch die Freisetzung der jeweiligen miRNA das myokardiale Remodeling positiv beeinflusst wird (Dai und Tan, 2015).

4.6 Ausblick

Ein weiterer Schritt ist die Untersuchung der Rolle von miR-146a und miR-503 bei der Entwicklung einer pathologischen kardialen Hypertrophie *in vivo*. Ein möglicher Ansatz wäre dabei die Entwicklung von spezifischen Adeno-assoziierten Viren (AAV). AAV-Subtypen können spezifisch modifiziert und für die gewebsspezifische Expression einer bestimmten Nukleinsäure in Mausschwanz-Venen injiziert werden (Ying et al., 2010, Pleger et al., 2011). Deshalb ist zur Fortführung dieses Projekts als nächstes eine Myokard-spezifische Überexpression von miR-146a und miR-503 mithilfe des kardiotropen Adeno-assoziierten Virus 9 (AAV9) in Herzen von Wildtyp-Mäusen geplant. So könnte die mögliche Entwicklung einer kardialen Hypertrophie durch miR-146a oder miR-503 *in vivo* untersucht werden. Gleichmaßen können die Auswirkungen eines Knockdowns von miR-146a oder miR-503 in Mäusen untersucht werden, die durch Aortic Banding eine Nachlasterrhöhung erfahren haben und daraus folgend eine kardiale Hypertrophie entwickeln.

Wichtig für weiterführende Untersuchungen bleibt außerdem die Verifizierung der Regulation von *Stc1* durch miR-146a sowie von *Apelin* durch miR-503 und die Untersuchung der beteiligten Signalwege.

Der mögliche therapeutische Einsatz von miR-503 wird - aufgrund der potentiell onkogenen Nebenwirkung - eine Kardiomyozyten-spezifische Distribution unabdingbar machen, bliebe aber riskant. Mittels der kürzlich etablierten CNT (engl. *carbon nanotubes*) ist eine LNA-modifizierte Antisense-Oligonukleotid- oder AntimiR-vermittelte Therapie des Myokards denkbar. Hierzu müssten genaue Evaluationen der Organspezifität der miR-146a-Expression und Aufnahme erfolgen, um Effekte an anderen Organen ausschließen zu können.

Die untersuchte miR-146a hat weniger systemische Nebenwirkungen und wird in der Literatur als anti-inflammatorische miRNA beschrieben. Somit wäre eine systemische Distribution mittels adenoviraler Überexpression denkbar, jedoch ist es therapeutisch sinnvoller eine spezifische Applikation zu wählen, um systemische Wechselwirkungen zu minimieren.

5 Zusammenfassung

Biomechanischer Stress, beispielsweise verursacht durch arterielle Hypertonie oder Klappenvitien, ist ein typischer Auslöser des myokardialen Remodelings, einem maladaptiven Prozess der sich durch Hypertrophie, Apoptose und Fibrose von Kardiomyozyten kennzeichnet. Durch diese maladaptiven Vorgänge kommt es zu Herzinsuffizienz, bösartigen Arrhythmien und schließlich plötzlichem Herztod.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorhergehenden Untersuchungen zeigen, dass durch biaxialen mechanischen Stretch eine Vielzahl von Genen und microRNAs differentiell reguliert werden. MicroRNAs sind hoch konservierte, kurze RNAs, welche posttranskriptionell die Genexpression beeinflussen.

Die als anti-inflammatorisch beschriebene miR-146a wird durch akuten Stress herunter- und chronischen Stress heraufreguliert. Die miR-503, Mitglied der erweiterten miR-16-Familie, wird durch akuten und chronischen biomechanischen Stress vermehrt exprimiert. Interessanterweise führt die adenovirale Überexpression von miR-146a bzw. miR-503 zur Induktion des hypertrophischen Genprogramms. Umgekehrt reduziert der AntimiR-vermittelte *Knockdown* von miR-146a oder miR-503 ihre „pro-hypertrophe“ Wirkung in Phenylephrin-stimulierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRVCM).

Um den Einfluss von miR-146a und miR-503 auf die Stressregulation in Kardiomyozyten und deren Signalwege zu untersuchen, führten wir eine bioinformatische Zielgen-Vorhersage mithilfe der webbasierten Suchmaschinen *TargetScan*, *microRNA.org*, *DIANA microT v4* und *PicTar* durch.

Wir überprüften die *in silico* Ergebnisse mithilfe eines 3'UTR-Luciferase-Assays und konnten neben bereits validierten Zielstrukturen Stanniocalcin 1 (*Stc1*) und *Apelin* als Zielstrukturen validieren. Eine Steigerung der miR-146a-Aktivität mittels Überexpression führte zu einer signifikanten Reduzierung der Luciferaseaktivität eines *Stc1*-Luciferase-3'UTR-Konstruktes in HEK-Zellen. Die gleiche Beobachtung konnte für miR-503 und das *Apelin*-Konstrukt gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit miR-146a und miR-503 zwei differentiell regulierte miRs entdeckt, die über ihre Zielstrukturen *Stc1* und *Apelin* kardiomyozytäre Signalwege modulieren und damit einen Teil der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen erklären könnten.

6 Literaturverzeichnis

- AMERES, S. L., MARTINEZ, J. & SCHROEDER, R. 2007. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 130, 101-12.
- ASHLEY, E. A., POWERS, J., CHEN, M., KUNDU, R., FINSTERBACH, T., CAFFARELLI, A., DENG, A., EICHHORN, J., MAHAJAN, R., AGRAWAL, R., GREVE, J., ROBBINS, R., PATTERSON, A. J., BERNSTEIN, D. & QUERTERMOUS, T. 2005. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res*, 65, 73-82.
- ATHYROS, V. G., KATSIKI, N., KARAGIANNIS, A. & MIKHAILIDIS, D. P. 2014. Combination of statin plus renin angiotensin system inhibition for the prevention or the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*, 20, 6299-305.
- BAEK, D., VILLEN, J., SHIN, C., CAMARGO, F. D., GYGI, S. P. & BARTEL, D. P. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455, 64-71.
- BARRY, S. P., DAVIDSON, S. M. & TOWNSEND, P. A. 2008. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2023-39.
- BARTEL, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97.
- BARTEL, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-33.
- BASTAMI, M., GHADERIAN, S. M., OMRANI, M. D., MIRFAKHRAIE, R., VAKILI, H., PARSA, S. A., NARIMAN-SALEH-FAM, Z. & MASOTTI, A. 2016. MiRNA-Related Polymorphisms in miR-146a and TCF21 Are Associated with Increased Susceptibility to Coronary Artery Disease in an Iranian Population. *Genet Test Mol Biomarkers*, 20, 241-8.
- BAUERSACHS, J. 2010. Regulation of myocardial fibrosis by MicroRNAs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56, 454-9.
- BELKE, D. D., BETUING, S., TUTTLE, M. J., GRAVELEAU, C., YOUNG, M. E., PHAM, M., ZHANG, D., COOKSEY, R. C., MCCLAIN, D. A., LITWIN, S. E., TAEGTMEYER, H., SEVERSON, D., KAHN, C. R. & ABEL, E. D. 2002. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest*, 109, 629-39.
- BERNT, A., RANGREZ, A. Y., EDEN, M., JUNGMANN, A., KATZ, S., ROHR, C., MULLER, O. J., KATUS, H. A., SOSSALLA, S. T., WILLIAMS, T., RITTER, O., FRANK, D. & FREY, N. 2016. Sumoylation-independent activation of Calcineurin-NFAT-signaling via SUMO2 mediates cardiomyocyte hypertrophy. *Sci Rep*, 6, 35758.
- BERTOLI, C., SKOTHEIM, J. M. & DE BRUIN, R. A. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 518-28.
- BIGLINO, G., CAPUTO, M., RAJAKARUNA, C., ANGELINI, G., VAN ROOIJ, E. & EMANUELI, C. 2017. Modulating microRNAs in cardiac surgery patients: Novel therapeutic opportunities? *Pharmacol Ther*, 170, 192-204.
- BONAUER, A., BOON, R. A. & DIMMELER, S. 2010. Vascular microRNAs. *Curr Drug Targets*, 11, 943-9.
- BRENNECKE, J., STARK, A., RUSSELL, R. B. & COHEN, S. M. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3, e85.
- BRUDECKI, L., FERGUSON, D. A., MCCALL, C. E. & EL GAZZAR, M. 2013a. MicroRNA-146a and RBM4 form a negative feed-forward loop that disrupts cytokine mRNA translation following TLR4 responses in human THP-1 monocytes. *Immunol Cell Biol*, 91, 532-40.
- BRUDECKI, L., FERGUSON, D. A., MCCALL, C. E. & EL GAZZAR, M. 2013b. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 disrupts proinflammatory protein synthesis in endotoxin-adapted monocytes. *Clin Vaccine Immunol*, 20, 1396-404.

- BUDHU, A., JI, J. & WANG, X. W. 2010. The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol*, 3, 37.
- BUENO, O. F., DE WINDT, L. J., LIM, H. W., TYMITZ, K. M., WITT, S. A., KIMBALL, T. R. & MOLKENTIN, J. D. 2001. The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ Res*, 88, 88-96.
- BUENO, O. F., DE WINDT, L. J., TYMITZ, K. M., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., KLEVITSKY, R., HEWETT, T. E., JONES, S. P., LEFER, D. J., PENG, C. F., KITSIS, R. N. & MOLKENTIN, J. D. 2000. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*, 19, 6341-50.
- BUENO, O. F., WILKINS, B. J., TYMITZ, K. M., GLASCOCK, B. J., KIMBALL, T. F., LORENZ, J. N. & MOLKENTIN, J. D. 2002. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4586-91.
- BUNDESAMT, S. 2014. Todesursachen in Deutschland. *Gesundheit*. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.
- BURCHFIELD, J. S., XIE, M. & HILL, J. A. 2013. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation*, 128, 388-400.
- BUSK, P. K., BARTKOVA, J., STROM, C. C., WULF-ANDERSEN, L., HINRICHSEN, R., CHRISTOFFERSEN, T. E., LATELLA, L., BARTEK, J., HAUNSO, S. & SHEIKH, S. P. 2002. Involvement of cyclin D activity in left ventricle hypertrophy in vivo and in vitro. *Cardiovasc Res*, 56, 64-75.
- CAPORALI, A., MELONI, M., VOLLENKLE, C., BONCI, D., SALA-NEWBY, G. B., ADDIS, R., SPINETTI, G., LOSA, S., MASSON, R., BAKER, A. H., AGAMI, R., LE SAGE, C., CONDORELLI, G., MADEDDU, P., MARTELLI, F. & EMANUELI, C. 2011. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation*, 123, 282-91.
- CAROLI, A., CARDILLO, M. T., GALEA, R. & BIASUCCI, L. M. 2013. Potential therapeutic role of microRNAs in ischemic heart disease. *J Cardiol*, 61, 315-20.
- CARRARO, G., EL-HASHASH, A., GUIDOLIN, D., TIOZZO, C., TURCATEL, G., YOUNG, B. M., DE LANGHE, S. P., BELLUSCI, S., SHI, W., PARNIGOTTO, P. P. & WARBURTON, D. 2009. miR-17 family of microRNAs controls FGF10-mediated embryonic lung epithelial branching morphogenesis through MAPK14 and STAT3 regulation of E-Cadherin distribution. *Dev Biol*, 333, 238-50.
- CHEN, C., HONG, H., CHEN, L., SHI, X., CHEN, Y. & WENG, Q. 2014. Association of microRNA polymorphisms with the risk of myocardial infarction in a Chinese population. *Tohoku J Exp Med*, 233, 89-94.
- 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. 2008. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2111-6.
- CHENG, Y., JI, R., YUE, J., YANG, J., LIU, X., CHEN, H., DEAN, D. B. & ZHANG, C. 2007. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol*, 170, 1831-40.
- CHENG, Y., LIU, X., ZHANG, S., LIN, Y., YANG, J. & ZHANG, C. 2009. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol*, 47, 5-14.
- CHIEN, K. R., KNOWLTON, K. U., ZHU, H. & CHIEN, S. 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*, 5, 3037-46.
- CHONG, A. J., SHIMAMOTO, A., HAMPTON, C. R., TAKAYAMA, H., SPRING, D. J., ROTHNIE, C. L., YADA, M., POHLMAN, T. H. & VERRIER, E. D. 2004. Toll-like

- receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128, 170-9.
- CLOONAN, N. 2015. Re-thinking miRNA-mRNA interactions: intertwining issues confound target discovery. *Bioessays*, 37, 379-88.
- COHN, J. N., FERRARI, R. & SHARPE, N. 2000. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 35, 569-82.
- CONRAD, N., JUDGE, A., TRAN, J., MOHSENI, H., HEDGE COTT, D., CRESPILO, A. P., ALLISON, M., HEMINGWAY, H., CLELAND, J. G., MCMURRAY, J. J. V. & RAHIMI, K. 2017. Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. *Lancet*.
- CUI, X. & CHURCHILL, G. A. 2003. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol*, 4, 210.
- 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. 2008. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*, 118, 1567-76.
- DAI, X. & TAN, C. 2015. Combination of microRNA therapeutics with small-molecule anticancer drugs: mechanism of action and co-delivery nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 81, 184-97.
- DE JONG, A. M., MAASS, A. H., OBERDORF-MAASS, S. U., DE BOER, R. A., VAN GILST, W. H. & VAN GELDER, I. C. 2013. Cyclical stretch induces structural changes in atrial myocytes. *J Cell Mol Med*, 17, 743-53.
- DE JONG, S., VAN VEEN, T. A., VAN RIJEN, H. V. & DE BAKKER, J. M. 2011. Fibrosis and cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57, 630-8.
- 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. 2000. Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anoikis and the progression to early failure. *Circulation*, 101, 2854-62.
- DORN, G. W., 2ND 2007. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 49, 962-70.
- DORN, G. W., 2ND 2009. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodeling. *Cardiovasc Res*, 81, 465-73.
- DORN, G. W., 2ND, ROBBINS, J. & SUGDEN, P. H. 2003. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*, 92, 1171-5.
- DUISTERS, R. F., TIJSEN, A. J., SCHROEN, B., LEENDERS, J. J., LENTINK, V., VAN DER MADE, I., HERIAS, V., VAN LEEUWEN, R. E., SCHELLINGS, M. W., BARENBRUG, P., MAESSEN, J. G., HEYMANS, S., PINTO, Y. M. & CREEMERS, E. E. 2009. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res*, 104, 170-8, 6p following 178.
- EBELT, H., ZHANG, Y., KAMPKE, A., XU, J., SCHLITT, A., BUERKE, M., MULLER-WERDAN, U., WERDAN, K. & BRAUN, T. 2008. E2F2 expression induces proliferation of terminally differentiated cardiomyocytes in vivo. *Cardiovasc Res*, 80, 219-26.
- EBERT, M. S. & SHARP, P. A. 2012. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149, 515-24.
- ELMEN, J., LINDOW, M., SCHUTZ, S., LAWRENCE, M., PETRI, A., OBAD, S., LINDHOLM, M., HEDTJARN, M., HANSEN, H. F., BERGER, U., GULLANS, S., KEARNEY, P., SARNOW, P., STRAARUP, E. M. & KAUPPINEN, S. 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, 452, 896-9.

- ENGELHARDT, S., HEIN, L., WIESMANN, F. & LOHSE, M. J. 1999. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7059-64.
- ESPOSITO, G., PRASAD, S. V., RAPACCIUOLO, A., MAO, L., KOCH, W. J. & ROCKMAN, H. A. 2001. Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. *Circulation*, 103, 1453-8.
- ESPOSITO, G., RAPACCIUOLO, A., NAGA PRASAD, S. V., TAKAOKA, H., THOMAS, S. A., KOCH, W. J. & ROCKMAN, H. A. 2002. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation*, 105, 85-92.
- FAGARD, R. 2003. Athlete's heart. *Heart*, 89, 1455-61.
- FENG, J. A., PERRY, G., MORI, T., HAYASHI, T., OPARIL, S. & CHEN, Y. F. 2003. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in atrial natriuretic peptide-deficient mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30, 343-9.
- FINNERTY, J. R., WANG, W. X., HEBERT, S. S., WILFRED, B. R., MAO, G. & NELSON, P. T. 2010. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J Mol Biol*, 402, 491-509.
- FISHER, S. A., LANGILLE, B. L. & SRIVASTAVA, D. 2000. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res*, 87, 856-64.
- FORREST, A. R., KANAMORI-KATAYAMA, M., TOMARU, Y., LASSMANN, T., NINOMIYA, N., TAKAHASHI, Y., DE HOON, M. J., KUBOSAKI, A., KAIHO, A., SUZUKI, M., YASUDA, J., KAWAI, J., HAYASHIZAKI, Y., HUME, D. A. & SUZUKI, H. 2010. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. *Leukemia*, 24, 460-6.
- FRANK, D., FRAUEN, R., HANSELMANN, C., KUHN, C., WILL, R., GANTENBERG, J., FUZESI, L., KATUS, H. A. & FREY, N. 2010. Lmcd1/Dyxin, a novel Z-disc associated LIM protein, mediates cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 673-82.
- FRANK, D., GANTENBERG, J., BOOMGAARDEN, I., KUHN, C., WILL, R., JARR, K. U., EDEN, M., KRAMER, K., LUEDDE, M., MAIRBAURL, H., KATUS, H. A. & FREY, N. 2012. MicroRNA-20a inhibits stress-induced cardiomyocyte apoptosis involving its novel target Egln3/PHD3. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 711-7.
- FRANK, D., KUHN, C., BRORS, B., HANSELMANN, C., LUDDE, M., KATUS, H. A. & FREY, N. 2008. Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension*, 51, 309-18.
- FREY, N., FRANK, D., LIPPL, S., KUHN, C., KOGLER, H., BARRIENTOS, T., ROHR, C., WILL, R., MULLER, O. J., WEILER, H., BASSEL-DUBY, R., KATUS, H. A. & OLSON, E. N. 2008. Calcineurin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J Clin Invest*, 118, 3598-608.
- FREY, N., KATUS, H. A., OLSON, E. N. & HILL, J. A. 2004. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*, 109, 1580-9.
- FREY, N. & OLSON, E. N. 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*, 65, 45-79.
- FREY, N., OLSON, E. N. & HILL, J. A. 2012. Chapter 35 - Mechanisms of Stress-Induced Cardiac Hypertrophy. *Muscle*. Boston/Waltham: Academic Press.
- GIT, A., DVINGE, H., SALMON-DIVON, M., OSBORNE, M., KUTTER, C., HADFIELD, J., BERTONE, P. & CALDAS, C. 2010. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*, 16, 991-1006.
- HALKEIN, J., TABRUYN, S. P., RICKE-HOCH, M., HAGHIKIA, A., NGUYEN, N. Q., SCHERR, M., CASTERMANS, K., MALVAUX, L., LAMBERT, V., THIRY, M., SLIWA,

- K., NOEL, A., MARTIAL, J. A., HILFIKER-KLEINER, D. & STRUMAN, I. 2013. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 123, 2143-54.
- HAMACHER-BRADY, A., BRADY, N. R. & GOTTLIEB, R. A. 2006. The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther*, 20, 445-62.
- HAMPEL, F. R. 1985. The Breakdown Points of the Mean Combined With Some Rejection Rules. *Technometrics*, 27, 95-107.
- HEIN, S., ARNON, E., KOSTIN, S., SCHONBURG, M., ELSASSER, A., POLYAKOVA, V., BAUER, E. P., KLOVEKORN, W. P. & SCHAPER, J. 2003. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*, 107, 984-91.
- HEINEKE, J. & MOLKENTIN, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 589-600.
- HILL, J. A. & OLSON, E. N. 2008. Cardiac plasticity. *N Engl J Med*, 358, 1370-80.
- HINKEL, R., PENZKOFER, D., ZUHLKE, S., FISCHER, A., HUSADA, W., XU, Q. F., BALOCH, E., VAN ROOIJ, E., ZEIHNER, A. M., KUPATT, C. & DIMMELER, S. 2013. Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation*, 128, 1066-75.
- HIROTA, H., CHEN, J., BETZ, U. A., RAJEWSKY, K., GU, Y., ROSS, J., JR., MULLER, W. & CHIEN, K. R. 1999. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*, 97, 189-98.
- HOGAN, P. G., CHEN, L., NARDONE, J. & RAO, A. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 17, 2205-32.
- HUANG, W., TIAN, S. S., HANG, P. Z., SUN, C., GUO, J. & DU, Z. M. 2016. Combination of microRNA-21 and microRNA-146a Attenuates Cardiac Dysfunction and Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in Mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, 5, e296.
- HUNTZINGER, E. & IZAURRALDE, E. 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12, 99-110.
- IDE, S., TOIYAMA, Y., SHIMURA, T., KAWAMURA, M., YASUDA, H., SAIGUSA, S., OHI, M., TANAKA, K., MOHRI, Y. & KUSUNOKI, M. 2015. MicroRNA-503 promotes tumor progression and acts as a novel biomarker for prognosis in oesophageal cancer. *Anticancer Res*, 35, 1447-51.
- IKEDA, S., HE, A., KONG, S. W., LU, J., BEJAR, R., BODYAK, N., LEE, K. H., MA, Q., KANG, P. M., GOLUB, T. R. & PU, W. T. 2009. MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol*, 29, 2193-204.
- IKEDA, S., KONG, S. W., LU, J., BISPING, E., ZHANG, H., ALLEN, P. D., GOLUB, T. R., PIESKE, B. & PU, W. T. 2007. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*, 31, 367-73.
- IKEDA, S. & PU, W. T. 2010. Expression and function of microRNAs in heart disease. *Curr Drug Targets*, 11, 913-25.
- IWAKI, K., SUKHATME, V. P., SHUBEITA, H. E. & CHIEN, K. R. 1990. Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J Biol Chem*, 265, 13809-17.
- IWASE, M., BISHOP, S. P., UECHI, M., VATNER, D. E., SHANNON, R. P., KUDEJ, R. K., WIGHT, D. C., WAGNER, T. E., ISHIKAWA, Y., HOMCY, C. J. & VATNER, S. F. 1996. Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circ Res*, 78, 517-24.

- JIANG, Q., FENG, M. G. & MO, Y. Y. 2009. Systematic validation of predicted microRNAs for cyclin D1. *BMC Cancer*, 9, 194.
- KANEKO, M., SATOMI, T., FUJIWARA, S., UCHIYAMA, H., KUSUMOTO, K. & NISHIMOTO, T. 2016. AT1 receptor blocker azilsartan medoxomil normalizes plasma miR-146a and miR-342-3p in a murine heart failure model. *Biomarkers*, 1-8.
- KASAI, A., SHINTANI, N., ODA, M., KAKUDA, M., HASHIMOTO, H., MATSUDA, T., HINUMA, S. & BABA, A. 2004. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 325, 395-400.
- KEHAT, I. & MOLKENTIN, J. D. 2010. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*, 122, 2727-35.
- KEYS, J. R., GREENE, E. A., KOCH, W. J. & ECKHART, A. D. 2002. Gq-coupled receptor agonists mediate cardiac hypertrophy via the vasculature. *Hypertension*, 40, 660-6.
- KHOYNEZHAD, A., JALALI, Z. & TORTOLANI, A. J. 2007. A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure. *Tex Heart Inst J*, 34, 352-9.
- KOEHLER, A. N. & BEGLEY, T. P. 2007. Microarrays in Chemical Biology. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- KOHL, P. 2003. Heterogeneous cell coupling in the heart: an electrophysiological role for fibroblasts. *Circ Res*, 93, 381-3.
- KOZOMARA, A. & GRIFFITHS-JONES, S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42, D68-73.
- KUBA, K., ZHANG, L., IMAI, Y., ARAB, S., CHEN, M., MAEKAWA, Y., LESCHNIK, M., LEIBBRANDT, A., MARKOVIC, M., SCHWAIGHOFER, J., BEETZ, N., MUSIALEK, R., NEELY, G. G., KOMNENOVIC, V., KOLM, U., METZLER, B., RICCI, R., HARA, H., MEIXNER, A., NGHIEM, M., CHEN, X., DAWOOD, F., WONG, K. M., SARAO, R., CUKERMAN, E., KIMURA, A., HEIN, L., THALHAMMER, J., LIU, P. P. & PENNINGER, J. M. 2007. Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res*, 101, e32-42.
- KULTZ, D. 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol*, 67, 225-57.
- LAI, E. C. 2004. Predicting and validating microRNA targets. *Genome Biol*, 5, 115.
- LANFORD, R. E., HILDEBRANDT-ERIKSEN, E. S., PETRI, A., PERSSON, R., LINDOW, M., MUNK, M. E., KAUPPINEN, S. & ORUM, H. 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 327, 198-201.
- LEE, D. K., CHENG, R., NGUYEN, T., FAN, T., KARIYAWASAM, A. P., LIU, Y., OSMOND, D. H., GEORGE, S. R. & O'DOWD, B. F. 2000. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem*, 74, 34-41.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- LEE, Y. S. & DUTTA, A. 2009. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 199-227.
- LEWIS, B. P., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
- LEWIS, B. P., SHIH, I. H., JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P. & BURGE, C. B. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115, 787-98.
- LI, J., NEGRO, A., LOPEZ, J., BAUMAN, A. L., HENSON, E., DODGE-KAFKA, K. & KAPILOFF, M. S. 2010. The mAKAPbeta scaffold regulates cardiac myocyte hypertrophy via recruitment of activated calcineurin. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 387-94.
- LI, S. H., SU, S. Y. & LIU, J. L. 2015. Differential Regulation of microRNAs in Patients with Ischemic Stroke. *Curr Neurovasc Res*, 12, 214-21.
- LIU, C. G., CALIN, G. A., VOLINIA, S. & CROCE, C. M. 2008a. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc*, 3, 563-78.

-
- LIU, J., FARMER, J. D., JR., LANE, W. S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I. & SCHREIBER, S. L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66, 807-15.
- LIU, N., BEZPROZVANNAYA, S., WILLIAMS, A. H., QI, X., RICHARDSON, J. A., BASSELDUBY, R. & OLSON, E. N. 2008b. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev*, 22, 3242-54.
- LIU, N. & OLSON, E. N. 2010. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell*, 18, 510-25.
- LIU, X., DONG, Y., CHEN, S., ZHANG, G., ZHANG, M., GONG, Y. & LI, X. 2015. Circulating MicroRNA-146a and MicroRNA-21 Predict Left Ventricular Remodeling after ST-Elevation Myocardial Infarction. *Cardiology*, 132, 233-41.
- LONG, J., OU, C., XIA, H., ZHU, Y. & LIU, D. 2015. MiR-503 inhibited cell proliferation of human breast cancer cells by suppressing CCND1 expression. *Tumour Biol*, 36, 8697-702.
- LORELL, B. H. & CARABELLO, B. A. 2000. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*, 102, 470-9.
- LYON, R. C., ZANELLA, F., OMENS, J. H. & SHEIKH, F. 2015. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*, 116, 1462-76.
- MADSEN, K. L., TAVERNINI, M. M., YACHIMEC, C., MENDRICK, D. L., ALFONSO, P. J., BUERGIN, M., OLSEN, H. S., ANTONACCIO, M. J., THOMSON, A. B. & FEDORAK, R. N. 1998. Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine. *Am J Physiol*, 274, G96-102.
- MALBON, C. C. 2004. Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front Biosci*, 9, 1048-58.
- MARTINEZ, J. & TUSCHL, T. 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, 18, 975-80.
- MASOTTI, A., MILLER, M. R., CELLUZZI, A., ROSE, L., MICCIULLA, F., HADOKÉ, P. W., BELLUCCI, S. & CAPORALI, A. 2016. Regulation of angiogenesis through the efficient delivery of microRNAs into endothelial cells using polyamine-coated carbon nanotubes. *Nanomedicine*, 12, 1511-22.
- MATKOVICH, S. J., VAN BOOVEN, D. J., YOUKER, K. A., TORRE-AMIONE, G., DIWAN, A., ESCHENBACHER, W. H., DORN, L. E., WATSON, M. A., MARGULIES, K. B. & DORN, G. W., 2ND 2009. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation*, 119, 1263-71.
- MCMULLEN, J. R., SHIOI, T., HUANG, W. Y., ZHANG, L., TARNAVSKI, O., BISPING, E., SCHINKE, M., KONG, S., SHERWOOD, M. C., BROWN, J., RIGGI, L., KANG, P. M. & IZUMO, S. 2004. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem*, 279, 4782-93.
- MOHAMMADIPOOR, A., LEE, R. H., PROCKOP, D. J. & BARTOSH, T. J. 2016. Stanniocalcin-1 attenuates ischemic cardiac injury and response of differentiating monocytes/macrophages to inflammatory stimuli. *Transl Res*.
- MOLKENTIN, J. D. 2000. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res*, 87, 731-8.
- MOLKENTIN, J. D. 2004. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res*, 63, 467-75.
- MOLKENTIN, J. D., LU, J. R., ANTOS, C. L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S. R. & OLSON, E. N. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 93, 215-28.
-

- MORI, T., CHEN, Y. F., FENG, J. A., HAYASHI, T., OPARIL, S. & PERRY, G. J. 2004. Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. *Cardiovasc Res*, 61, 771-9.
- NARULA, J., HAIDER, N., VIRMANI, R., DISALVO, T. G., KOLODIE, F. D., HAJJAR, R. J., SCHMIDT, U., SEMIGRAN, M. J., DEC, G. W. & KHAW, B. A. 1996. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*, 335, 1182-9.
- NATTEL, S., MAGUY, A., LE BOUTER, S. & YEH, Y. H. 2007. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev*, 87, 425-56.
- NISHIKIMI, T., MAEDA, N. & MATSUOKA, H. 2006. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 69, 318-28.
- O'DOWD, B. F., HEIBER, M., CHAN, A., HENG, H. H., TSUI, L. C., KENNEDY, J. L., SHI, X., PETRONIS, A., GEORGE, S. R. & NGUYEN, T. 1993. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 136, 355-60.
- OERLEMANS, M. I., MOSTERD, A., DEKKER, M. S., DE VREY, E. A., VAN MIL, A., PASTERKAMP, G., DOEVENDANS, P. A., HOES, A. W. & SLUIJTER, J. P. 2012. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO Mol Med*, 4, 1176-85.
- OHTANI, K. & DIMMELER, S. 2011. Control of cardiovascular differentiation by microRNAs. *Basic Res Cardiol*, 106, 5-11.
- 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. 1997. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*, 336, 1131-41.
- OLSON, E. N. 2004. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med*, 10, 467-74.
- ORGANIZATION, W. H. 2014. Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014. Geneva: World Health Organization.
- PALOMER, X., CAPDEVILA-BUSQUETS, E., BOTTERI, G., DAVIDSON, M. M., RODRIGUEZ, C., MARTINEZ-GONZALEZ, J., VIDAL, F., BARROSO, E., CHAN, T. O., FELDMAN, A. M. & VAZQUEZ-CARRERA, M. 2015. miR-146a targets Fos expression in human cardiac cells. *Dis Model Mech*, 8, 1081-91.
- PASUMARTHI, K. B., NAKAJIMA, H., NAKAJIMA, H. O., SOONPAA, M. H. & FIELD, L. J. 2005. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res*, 96, 110-8.
- 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. 2001. Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*, 89, 453-60.
- PLEGER, S. T., SHAN, C., KSIENZYK, J., BEKEREDJIAN, R., BOEKSTEGERS, P., HINKEL, R., SCHINKEL, S., LEUCHS, B., LUDWIG, J., QIU, G., WEBER, C., RAAKE, P., KOCH, W. J., KATUS, H. A., MULLER, O. J. & MOST, P. 2011. Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model. *Sci Transl Med*, 3, 92ra64.
- PORRELLO, E. R., MAHMOUD, A. I., SIMPSON, E., HILL, J. A., RICHARDSON, J. A., OLSON, E. N. & SADEK, H. A. 2011. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, 331, 1078-80.
- QIU, T., ZHOU, L., WANG, T., XU, J., WANG, J., CHEN, W., ZHOU, X., HUANG, Z., ZHU, W., SHU, Y. & LIU, P. 2013. miR-503 regulates the resistance of non-small cell lung cancer cells to cisplatin by targeting Bcl-2. *Int J Mol Med*, 32, 593-8.

- RAO, P. K., TOYAMA, Y., CHIANG, H. R., GUPTA, S., BAUER, M., MEDVID, R., REINHARDT, F., LIAO, R., KRIEGER, M., JAENISCH, R., LODISH, H. F. & BLELLOCH, R. 2009. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*, 105, 585-94.
- RAZEGHI, P. & TAEGTMEYER, H. 2006. Hypertrophy and atrophy of the heart: the other side of remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, 1080, 110-9.
- RE, R. N. & COOK, J. L. 2010. The mitochondrial component of intracrine action. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299, H577-83.
- RIESWIJK, L., BRAUERS, K. J., COONEN, M. L., VAN BREDA, S. G., JENNEN, D. G. & KLEINJANS, J. C. 2015. Evaluating microRNA profiles reveals discriminative responses following genotoxic or non-genotoxic carcinogen exposure in primary mouse hepatocytes. *Mutagenesis*, 30, 771-84.
- ROCKMAN, H. A., KOCH, W. J. & LEFKOWITZ, R. J. 2002. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415, 206-12.
- ROTHERMEL, B. A., MCKINSEY, T. A., VEGA, R. B., NICOL, R. L., MAMMEN, P., YANG, J., ANTOS, C. L., SHELTON, J. M., BASSEL-DUBY, R., OLSON, E. N. & WILLIAMS, R. S. 2001. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3328-33.
- SABA, R., SORENSEN, D. L. & BOOTH, S. A. 2014. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Front Immunol*, 5, 578.
- SAGARA, N., TODA, G., HIRAI, M., TERADA, M. & KATOH, M. 1998. Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7. *Biochem Biophys Res Commun*, 252, 117-22.
- SANDLER, H. & DODGE, H. T. 1963. Left Ventricular Tension and Stress in Man. *Circ Res*, 13, 91-104.
- SANDMANN, S., CLAAS, R., CLEUTJENS, J. P., DAEMEN, M. J. & UNGER, T. 2001. Calcium channel blockade limits cardiac remodeling and improves cardiac function in myocardial infarction-induced heart failure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 37, 64-77.
- SANNA, B., BUENO, O. F., DAI, Y. S., WILKINS, B. J. & MOLKENTIN, J. D. 2005. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol*, 25, 865-78.
- SATO, T., SUZUKI, T., WATANABE, H., KADOWAKI, A., FUKAMIZU, A., LIU, P. P., KIMURA, A., ITO, H., PENNINGER, J. M., IMAI, Y. & KUBA, K. 2013. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *J Clin Invest*, 123, 5203-11.
- SAYED, D., HE, M., HONG, C., GAO, S., RANE, S., YANG, Z. & ABDELLATIF, M. 2010. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem*, 285, 20281-90.
- SCHMIEDEL, J. M., KLEMM, S. L., ZHENG, Y., SAHAY, A., BLUTHGEN, N., MARKS, D. S. & VAN OUDENAARDEN, A. 2015. Gene expression. MicroRNA control of protein expression noise. *Science*, 348, 128-32.
- SHEIKH-HAMAD, D. 2010. Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298, F248-54.
- SHEIKH-HAMAD, D., BICK, R., WU, G. Y., CHRISTENSEN, B. M., RAZEGHI, P., POINDEXTER, B., TAEGTMEYER, H., WAMSLEY, A., PADDA, R., ENTMAN, M., NIELSEN, S. & YOUKER, K. 2003. Stanniocalcin-1 is a naturally occurring L-channel inhibitor in cardiomyocytes: relevance to human heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H442-8.
- SHIMAMOTO, A., CHONG, A. J., YADA, M., SHOMURA, S., TAKAYAMA, H., FLEISIG, A. J., AGNEW, M. L., HAMPTON, C. R., ROTHNIE, C. L., SPRING, D. J., POHLMAN, T.

- H., SHIMPO, H. & VERRIER, E. D. 2006. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 114, 1270-4.
- SHIMIZU, I. & MINAMINO, T. 2016. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 97, 245-62.
- SHIN, S. Y., CHOO, S. M., KIM, D., BAEK, S. J., WOLKENHAUER, O. & CHO, K. H. 2006. Switching feedback mechanisms realize the dual role of MCIP in the regulation of calcineurin activity. *FEBS Lett*, 580, 5965-73.
- SHIOJIMA, I., SATO, K., IZUMIYA, Y., SCHIEKOFER, S., ITO, M., LIAO, R., COLUCCI, W. S. & WALSH, K. 2005. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*, 115, 2108-18.
- SMALL, E. M., FROST, R. J. & OLSON, E. N. 2010. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*, 121, 1022-32.
- SMALL, E. M. & OLSON, E. N. 2011. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*, 469, 336-42.
- SOONPAA, M. H. & FIELD, L. J. 1998. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res*, 83, 15-26.
- SOPONTAMMARAK, S., ALIHAROOB, A., OCAMPO, C., ARCILLA, R. A., GUPTA, M. P. & GUPTA, M. 2005. Mitogen-activated protein kinases (p38 and c-Jun NH2-terminal kinase) are differentially regulated during cardiac volume and pressure overload hypertrophy. *Cell Biochem Biophys*, 43, 61-76.
- STENVANG, J., PETRI, A., LINDOW, M., OBAD, S. & KAUPPINEN, S. 2012. Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence*, 3, 1.
- SUAREZ, Y., FERNANDEZ-HERNANDO, C., YU, J., GERBER, S. A., HARRISON, K. D., POBER, J. S., IRUELA-ARISPE, M. L., MERKENSCHLAGER, M. & SESSA, W. C. 2008. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14082-7.
- SZOKODI, I., TAVI, P., FOLDES, G., VOUTILAINEN-MYLLYLA, S., ILVES, M., TOKOLA, H., PIKKARAINEN, S., PIUHOLA, J., RYSA, J., TOTH, M. & RUSKOAHO, H. 2002. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*, 91, 434-40.
- TAIGEN, T., DE WINDT, L. J., LIM, H. W. & MOLKENTIN, J. D. 2000. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1196-201.
- TAKEISHI, Y., HUANG, Q., ABE, J., GLASSMAN, M., CHE, W., LEE, J. D., KAWAKATSU, H., LAWRENCE, E. G., HOIT, B. D., BERK, B. C. & WALSH, R. A. 2001. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 1637-48.
- 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. & KATSUKI, M. 2000. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4239-44.
- TANG, F. C., WANG, H. Y., MA, M. M., GUAN, T. W., PAN, L., YAO, D. C., CHEN, Y. L., CHEN, W. B., TU, Y. S. & FU, X. D. 2015. CyPA-CD147-ERK1/2-cyclin D2 signaling pathway is upregulated during rat left ventricular hypertrophy. *Sheng Li Xue Bao*, 67, 393-400.
- TATEMOTO, K., HOSOYA, M., HABATA, Y., FUJII, R., KAKEGAWA, T., ZOU, M. X., KAWAMATA, Y., FUKUSUMI, S., HINUMA, S., KITADA, C., KUROKAWA, T., ONDA, H. & FUJINO, M. 1998. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 471-6.
- TATSUGUCHI, M., SEOK, H. Y., CALLIS, T. E., THOMSON, J. M., CHEN, J. F., NEWMAN, M., ROJAS, M., HAMMOND, S. M. & WANG, D. Z. 2007. Expression of microRNAs is

- dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 1137-41.
- TEIGER, E., THAN, V. D., RICHARD, L., WISNEWSKY, C., TEA, B. S., GABOURY, L., TREMBLAY, J., SCHWARTZ, K. & HAMET, P. 1996. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest*, 97, 2891-7.
- THUM, T. 2008. Cardiac dissonance without conductors: how dicer depletion provokes chaos in the heart. *Circulation*, 118, 1524-7.
- 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. 2007. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*, 116, 258-67.
- THUM, T., GROSS, C., FIEDLER, J., FISCHER, T., KISSLER, S., BUSSEN, M., GALUPPO, P., JUST, S., ROTTBAUER, W., FRANTZ, S., CASTOLDI, M., SOUTSCHEK, J., KOTELIANSKY, V., ROSENWALD, A., BASSON, M. A., LICHT, J. D., PENA, J. T., ROUHANIFARD, S. H., MUCKENTHALER, M. U., TUSCHL, T., MARTIN, G. R., BAUERSACHS, J. & ENGELHARDT, S. 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456, 980-4.
- TIMMERS, L., SLUIJTER, J. P., VAN KEULEN, J. K., HOEFER, I. E., NEDERHOFF, M. G., GOUMANS, M. J., DOEVENDANS, P. A., VAN ECHTELD, C. J., JOLES, J. A., QUAX, P. H., PIEK, J. J., PASTERKAMP, G. & DE KLEIJN, D. P. 2008. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res*, 102, 257-64.
- VALENCIA-SANCHEZ, M. A., LIU, J., HANNON, G. J. & PARKER, R. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*, 20, 515-24.
- VAN DE VRIE, M., HEYMANS, S. & SCHROEN, B. 2011. MicroRNA involvement in immune activation during heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*, 25, 161-70.
- VAN ROOIJ, E. & OLSON, E. N. 2012. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nat Rev Drug Discov*, 11, 860-72.
- VAN ROOIJ, E., SUTHERLAND, L. B., LIU, N., WILLIAMS, A. H., MCANALLY, J., GERARD, R. D., RICHARDSON, J. A. & OLSON, E. N. 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18255-60.
- VEGA, R. B., ROTHERMEL, B. A., WEINHEIMER, C. J., KOVACS, A., NASEEM, R. H., BASSEL-DUBY, R., WILLIAMS, R. S. & OLSON, E. N. 2003. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 669-74.
- WAKATSUKI, T., SCHLESSINGER, J. & ELSON, E. L. 2004. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci*, 29, 609-17.
- WANG, W., MCKINNIE, S. M., PATEL, V. B., HADDAD, G., WANG, Z., ZHABYEYEV, P., DAS, S. K., BASU, R., MCLEAN, B., KANDALAM, V., PENNINGER, J. M., KASSIRI, Z., VEDERAS, J. C., MURRAY, A. G. & OUDIT, G. Y. 2013a. Loss of Apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic Apelin analogues. *J Am Heart Assoc*, 2, e000249.
- WANG, X., HA, T., LIU, L., ZOU, J., ZHANG, X., KALBFLEISCH, J., GAO, X., WILLIAMS, D. & LI, C. 2013b. Increased expression of microRNA-146a decreases myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 97, 432-42.
- WANG, Y. & LEE, C. G. 2009. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *J Cell Mol Med*, 13, 12-23.
- WEBER, K. T. 1997. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*, 96, 4065-82.

- WILKINS, B. J., DAI, Y. S., BUENO, O. F., PARSONS, S. A., XU, J., PLANK, D. M., JONES, F., KIMBALL, T. R. & MOLKENTIN, J. D. 2004. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 94, 110-8.
- XIAO, F., ZHANG, W., CHEN, L., CHEN, F., XIE, H., XING, C., YU, X., DING, S., CHEN, K., GUO, H., CHENG, J., ZHENG, S. & ZHOU, L. 2013. MicroRNA-503 inhibits the G1/S transition by downregulating cyclin D3 and E2F3 in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*, 11, 195.
- XIE, X., LU, J., KULBOKAS, E. J., GOLUB, T. R., MOOTHA, V., LINDBLAD-TOH, K., LANDER, E. S. & KELLIS, M. 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434, 338-45.
- XU, N., PAPAGIANNAKOPOULOS, T., PAN, G., THOMSON, J. A. & KOSIK, K. S. 2009. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 137, 647-58.
- YANG, B., LIN, H., XIAO, J., LU, Y., LUO, X., LI, B., ZHANG, Y., XU, C., BAI, Y., WANG, H., CHEN, G. & WANG, Z. 2007. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*, 13, 486-91.
- YANG, J., ROTHERMEL, B., VEGA, R. B., FREY, N., MCKINSEY, T. A., OLSON, E. N., BASSEL-DUBY, R. & WILLIAMS, R. S. 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res*, 87, E61-8.
- YANG, Y., CHENG, H. W., QIU, Y., DUPEE, D., NOONAN, M., LIN, Y. D., FISCH, S., UNNO, K., SERETI, K. I. & LIAO, R. 2015. MicroRNA-34a Plays a Key Role in Cardiac Repair and Regeneration Following Myocardial Infarction. *Circ Res*, 117, 450-9.
- YANG, Y., LIU, L., ZHANG, Y., GUAN, H., WU, J., ZHU, X., YUAN, J. & LI, M. 2014. MiR-503 targets PI3K p85 and IKK-beta and suppresses progression of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 135, 1531-42.
- YEUNG, B. H., LAW, A. Y. & WONG, C. K. 2012. Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol*, 349, 272-80.
- YIN, C., WANG, X. & KUKREJA, R. C. 2008. Endogenous microRNAs induced by heat-shock reduce myocardial infarction following ischemia-reperfusion in mice. *FEBS Lett*, 582, 4137-42.
- YING, Y., MULLER, O. J., GOEHRINGER, C., LEUCHS, B., TREPEL, M., KATUS, H. A. & KLEINSCHMIDT, J. A. 2010. Heart-targeted adeno-associated viral vectors selected by in vivo biopanning of a random viral display peptide library. *Gene Ther*, 17, 980-90.
- YOUSEF, M., SHOWE, L. & SHOWE, M. 2009. A study of microRNAs in silico and in vivo: bioinformatics approaches to microRNA discovery and target identification. *FEBS J*, 276, 2150-6.
- 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. 2007. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 129, 303-17.
- ZHAO, Y., SAMAL, E. & SRIVASTAVA, D. 2005. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436, 214-20.
- ZHENG, L., LIU, H., WANG, P., SONG, W. & SUN, X. 2014. Regulator of calcineurin 1 gene transcription is regulated by nuclear factor-kappaB. *Curr Alzheimer Res*, 11, 156-64.
- ZHONG, W., MAO, S., TOBIS, S., ANGELIS, E., JORDAN, M. C., ROOS, K. P., FISHBEIN, M. C., DE ALBORAN, I. M. & MACLELLAN, W. R. 2006. Hypertrophic growth in

- cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway. *EMBO J*, 25, 3869-79.
- ZHOU, B., MA, R., SI, W., LI, S., XU, Y., TU, X. & WANG, Q. 2013. MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth. *Cancer Lett*, 333, 159-69.
- ZHOU, Y., DENG, L., ZHAO, D., CHEN, L., YAO, Z., GUO, X., LIU, X., LV, L., LENG, B., XU, W., QIAO, G. & SHAN, H. 2016. MicroRNA-503 promotes angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting Apelin-13. *J Cell Mol Med*, 20, 495-505.
- ZHU, M., WANG, N., TSAO, S. W., YUEN, M. F., FENG, Y., WAN, T. S., MAN, K. & FENG, Y. 2011. Up-regulation of microRNAs, miR21 and miR23a in human liver cancer cells treated with *Coptidis rhizoma* aqueous extract. *Exp Ther Med*, 2, 27-32.
- ZHU, W., ZOU, Y., SHIOJIMA, I., KUDOH, S., AIKAWA, R., HAYASHI, D., MIZUKAMI, M., TOKO, H., SHIBASAKI, F., YAZAKI, Y., NAGAI, R. & KOMURO, I. 2000. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, 275, 15239-45.
- ZIDAR, N., BOSTJANCIC, E., GLAVAC, D. & STAJER, D. 2011. MicroRNAs, innate immunity and ventricular rupture in human myocardial infarction. *Dis Markers*, 31, 259-65.

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Prof. Dr. med. Derk Frank für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Außerdem gilt Herrn Prof. Frank mein persönlicher Dank, da er mich - trotz der hohen Belastung im klinischen Alltag - fortwährend unterstützt hat und stets konstruktive Ideen und Lösungsvorschläge parat hatte.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Norbert Frey für die Zustimmung, meine Untersuchungen in dem Labor für Molekulare Kardiologie der Klinik für Innere Medizin III durchzuführen sowie die kritische Beurteilung der Dissertation.

Katharina Stiebeling danke ich für die Einführung in die Labormethoden und ihre Hilfsbereitschaft während der gesamten experimentellen Arbeiten im Labor.

Gleichfalls bedanke ich mich bei meinen Kommilitonen, Phillip Hoppe und Jost Pott, für die Hilfe im Labor und die Beratung bei der Versuchsplanung.

Mein besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Alexander Bernt für die außerordentliche Unterstützung in vielen wissenschaftlichen Fragestellungen und den Gedankenaustausch bei der Durchführung der Untersuchungen.

Herzlichen Dank an meine Familie und meine Freunde. Ihr habt mich immer unterstützt und besonders in schwierigen Zeiten zu mir gehalten und an mich geglaubt. Vielen Dank.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Malte Kamrath
Adresse: Türkenstraße 33 B, 80799 München
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Geboren: 22.04.1986, Berlin

Ärztliche Tätigkeit

01.11.2016 – dato Facharztausbildung in der Klinik für Anästhesiologie der Universität München (Campus Großhadern)

Universität

23.11.2015 Approbation als Arzt
11/2015 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
11/2014 – 11/2015 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
10/2014 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
09/2009 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
10/2007 – 10/2014 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Wehrdienst

10/2005 – 09/2006 Grundwehrdienst in der Sportfördergruppe Potsdam


Schulbildung

06/2005 Bertha-von-Suttner Oberschule, Berlin
Abschluss mit dem Abitur (Note: 1,6)

Stipendien und Preise

2010 – 2015 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
2013 – 2014 Otto-Hess-Promotionsstipendium (Dt. Ges. für Kardiologie)
2013 – 2014 Promotionsstipendium der CAU zu Kiel
2011 Holsteiner Studienpreis (3. Preis)

Veröffentlichungen

Nr. 2146	Punkte: 3,3	 *A2146*
angemeldet für: Postervorträge - Otto-Hess-Promotionsstipendiaten		05.09.2016 09:04
Topics: 08.4 Hypertrophie, Remodeling 08.5 Ischämie, Protektion, Regeneration		

Phasic biomechanical stretch leads to regulation of a specific subset of microRNAs including miR-146a

M. Kamrath¹, J. Gantenberg¹, A. Kluge¹, J. Pott¹, K. Stiebeling¹, P. Hoppe¹, I. Boomgaarden¹, N. Frey¹, D. Frank¹

¹Klinik für Innere Medizin III, Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel;

Introduction

Biomechanical stress on the heart, e.g. induced by hypertension, myocardial infarction or valve disease contributes to a complex process termed myocardial remodeling, which involves hypertrophy, apoptosis and fibrosis. These maladaptive processes cause heart failure, malignant cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. Despite substantial research on the molecular pathophysiology, many components of the signal transduction of myocardial remodeling still remain unknown. During the last decade, the small, non-coding microRNAs (miRs) have come into the focus as crucial regulators of the heart's response to increased cardiac stress.

Methods and results

To identify unknown miRs involved in stress-dependent remodeling, we conducted a genome-wide miR-microarray of dynamically biomechanically stretched neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) at 2, 6 and 24 hours stretch (1Hz, 15%). Out of 679 miRs, bioinformatical analyses of the microarray data revealed several differentially regulated miRs including miR-146a. Expression was confirmed by RT-qPCR and we found miR-146a downregulated to 63.6% (+/- 0.08, p<0.05) after 6 h and down to 49.5% (+/-0.08, p<0.05) after 24h of stretch. In contrast, chronic biomechanical stress *in vivo* (pressure overload mediated by transverse aortic constriction, TAC) caused a significant upregulation of the miR-146a (4.4-fold, +/-0.67, p<0.01). Multi tissue expression analyses revealed highest expression of the miR-146a in both heart and (fast-twitch) skeletal muscle tissue. In myocardial tissue, miR-146a was expressed at higher levels in NRCM than in fibroblasts (p<0.05).

To gain further information about the potential role of the microRNA in cardiomyocytes, we performed knockdown/overexpression NRCM stretch experiments *in vitro* to verify the influence of the selected miR on the expression of the hypertrophic gene program and the calcineurin-dependent regulated marker RCAN1-4. Interestingly, adenovirus-mediated overexpression of miR-146a upregulated *nppa* 2.4-fold (+/-0.4, p<0.05) and RCAN1-4 3.2-fold (+/-0.4, p<0.001) compared to a non-sense miR (miR-neg). In NRCM subjected to biomechanical stress, stretch itself led to an induction of *nppa* in miR-neg-treated NRCM 2.1-fold (+/-0.4, p<0.05) compared to unstretched control cells while miR-146a caused a further induction of 1.9 fold (+/-0.4, p<0.01) compared to stretched miR-neg control cells.

Besides already validated targets of miR-146a (such as *Notch1*, *ErbB4*, *Irak1*, *Traf6* and *Nras*), our target site prediction search also revealed three more novel targets which could be confirmed using 3'UTR luciferase fusion constructs.

Conclusions

Taken together, we here show that phasic stretch leads to differential regulation of a subset of miRs including downregulation of miR-146a. Mechanistically, its overexpression induces the hypertrophic gene program at baseline and in the setting of biomechanical stretch. These data suggest a role for miR-146a in cardiac hypertrophy and remodeling besides its known relevance in the pathogenesis of peripartum cardiomyopathy and ischemia/reperfusion injury. Ongoing work now focuses on the further characterization of potential targets.