

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

**Identifizierung und Charakterisierung langer nicht-
kodierender RNAs in der pathologischen kardialen
Hypertrophie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Pia Franziska Bünger
aus Lohne (Oldenburg)
Kiel, 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Frey, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andre Franke, Institut für Klinische Molekularbiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2020

Zum Druck genehmigt: 29.04.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	III
III.	Tabellenverzeichnis	V
IV.	Abkürzungsverzeichnis	VI
1.	Einleitung	1
1.1.	<i>Kardiale Hypertrophie</i>	1
1.1.1.	Klinische Bedeutung und Epidemiologie	1
1.1.2.	Pathophysiologie der pathologischen kardialen Hypertrophie	2
1.1.3.	Molekulare Signalwege der kardialen Hypertrophie	3
1.2.	<i>Lange nicht-kodierende RNAs</i>	5
1.2.1.	Nicht-kodierende RNAs	5
1.2.2.	Klassifikation und Biogenese langer nicht-kodierender RNAs	6
1.2.3.	Funktionen langer nicht-kodierender RNAs	8
1.2.4.	Bedeutung von langen nicht-kodierenden RNAs im Herzen	10
1.3.	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	13
2.	Material und Methoden	14
2.1.	<i>Material</i>	14
2.1.1.	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2.	Chemikalien	16
2.1.3.	Enzyme	17
2.1.4.	Kits	18
2.1.5.	Oligonukleotide	18
2.1.6.	Antikörper	19
2.1.7.	Vektoren und Plasmide	20
2.1.8.	Adenovirale Konstrukte	20
2.1.9.	SiRNA und Gapmer	20
2.1.10.	Puffer und Lösungen	21
2.1.11.	Nährmedien	22
2.1.12.	Bakterien	23
2.1.13.	Zelllinien	23
2.1.14.	Versuchstiere	24
2.2.	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	25
2.3.	<i>Zellbiologische Methoden</i>	26
2.5.	<i>Molekularbiologische Methoden – RNA</i>	41
2.6.	<i>Molekularbiologische Methoden – Proteinbiochemie</i>	45
2.7.	<i>Immunzytochemie</i>	47
2.8.	<i>Microarray</i>	48
2.10.	<i>Tierversuche</i>	50
2.11.	<i>Statistische Auswertung</i>	51
3.	Ergebnisse	52
3.1.	<i>Experimentelle Nachlasterhöhung durch transaortale Konstriktion im Mausmodell als Ausgangspunkt der Microarrayanalyse</i>	52

3.2.	<i>Ergebnisse des Microarrays</i>	54
3.3.	<i>Verifizierung der Microarrayergebnisse mittels quantitativer Real Time-PCR</i>	57
3.4.	<i>Charakterisierung der selektierten langen nicht-kodierenden RNAs in-vitro</i>	59
3.4.1.	RIAN	60
3.4.2.	2700099C1Rik	62
3.4.3.	Hectd2os	63
3.4.4.	Snhg18.....	65
3.4.5.	Malat-1.....	68
3.4.6.	linc-RAM.....	69
3.4.7.	1700123M08Rik	70
3.5.	<i>AK012407 kodiert für ein 64 Aminosäuren langes Peptid namens Overexpressed in Colon Carcinoma 1 (OCC-1)</i>	73
4.	Diskussion	80
4.1.	<i>Biomechanischer Stress führt zu einem distinkten Expressionsmuster langer nicht-kodierender RNAs im Herzen</i>	80
4.2.	<i>Charakterisierung pathophysiologisch interessanter langer nicht-kodierenden RNAs</i> 81	
4.2.1.	RNA Imprinted and Accumulated in the Nucleus (RIAN)	81
4.2.2.	Linc-RNA Activator of Myogenesis (Linc-RAM) und Myoregulin	82
4.2.3.	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (Malat-1)	82
4.2.4.	Uncharakterisierte lange nicht-kodierende RNAs.....	84
4.3.	<i>OCC-1 als neuer Regulator der kardialen Hypertrophie</i>	85
4.4.	<i>Lange nicht-kodierende RNAs und kurze Peptide</i>	89
4.5.	<i>Neue Therapieoption durch Modulation langer nicht-kodierender RNAs</i>	91
5.	Zusammenfassung	94
6.	Literaturverzeichnis	96
7.	Publikationen	106
8.	Danksagung	107

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Übersicht über die wichtigsten Signalkaskaden der kardialen Hypertrophie (Bernardo, Weeks et al. 2010).....	3
Abbildung 1-2: Klassifikation langer nicht-kodierender RNAs anhand der genomischen Lokalisation (Rinn and Chang 2012)	7
Abbildung 1-3: Funktionen langer nicht-kodierender RNAs (Wang and Chang 2011).....	8
Abbildung 2-1: Pipettierschema für die Titerbestimmung von Adenoviren in HEK293A Zellen	36
Abbildung 2-2: Microarray mit einem oder zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Stears, Martinsky et al. 2003).....	49
Abbildung 3-1: TAC-operierte Tiere entwickeln eine Herzhypertrophie.	53
Abbildung 3-2: MA-Plot für TAC gegen SHAM.	54
Abbildung 3-3: Heatmap als Darstellung der 30 am stärksten regulierten Sonden zwischen TAC- und SHAM-Gruppe.	55
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Selektion der langen nicht-kodierenden RNAs für die In-vitro Charakterisierung.	56
Abbildung 3-5: Bestätigung der differentiellen Regulation von RIAN, 2700099C18Rik, Hectd2os und Snhg18 mittels qPCR.	57
Abbildung 3-6: Bestätigung der differentiellen Regulation von Malat-1, Myoregulin und 1700123M08Rik mittels qPCR.	58
Abbildung 3-7: RIAN zeigt keine differentielle Regulation im Calcineurin-transgenen (CnA-TG) (A) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mausmodell (B).	60
Abbildung 3-8: siRNA-vermittelte Expressionshemmung von RIAN in NMCM führt zur Induktion des hypertrophen Genprogramms.	61
Abbildung 3-9: 2700099C18Rik zeigt keine differentielle Regulation im Calcineurin-transgenen (CnA-TG) (A) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mausmodell (B).	62
Abbildung 3-10: Hectd2os wird im Calcineurin-transgenen (CnA-TG) (A) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mausmodell gegenüber dem Wildtyp (WT) überexprimiert.	63
Abbildung 3-11: Die siRNA-vermittelte Expressionshemmung von Hectd2os in NMCM hat keinen Effekt auf die Expression des hypertrophen Genprogramms.	64
Abbildung 3-12: Snhg18 wird in der Calcineurin-transgenen Mauslinie (CnA-TG) überexprimiert (A).	65
Abbildung 3-13: Die siRNA-vermittelte Hemmung der Expression von Snhg18 in NMCM führt zur Induktion von ANF und BNP.....	66
Abbildung 3-14: Die Überexpression von Snhg18 in NMCM führt nicht zu signifikanten Alternationen des hypertrophen Genprogramms.	67
Abbildung 3-15: Die Expressionshemmung von Malat-1 in NMCM mittels GapmeR führt zu keiner Alternation des hypertrophen Genprogramms.	68
Abbildung 3-16: Die Expression von linc-RAM ist in der Calcineurin-transgenen Mauslinie (CnA-TG) im Vergleich zur Wildtyplinie (WT) signifikant vermindert (A).....	69
Abbildung 3-17: 1700123M08Rik ist im Calcineurin-transgenen (CnA-TG) (A) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mausmodell (B) nicht differentiell reguliert.	70
Abbildung 3-18: Die siRNA-vermittelte Expressionshemmung von 1700123M08Rik in NMCM führt zur Induktion des hypertrophen Genprogramms.	71
Abbildung 3-19: Die Überexpression von 1700123M08Rik in NMCM führte zu keiner Alternation des hypertrophen Genprogramms.....	72
Abbildung 3-20: Overexpressed in Colon Carcinoma (OCC-1) wird in verschiedenen Mausmodellen überexprimiert.....	73
Abbildung 3-21: In der Western Blot Analyse zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Überexpression des OCC-1 Peptids in der TAC-Gruppe.	74
Abbildung 3-22: Expression von Overexpressed in Colon Carcinoma (OCC-1) in verschiedenen Geweben mittels qPCR.	74
Abbildung 3-23: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lokalisation von OCC-1 in NRVCN.....	75

Abbildung 3-24: Die siRNA-vermittelte Expressionshemmung von OCC-1 führt zur Induktion des hypertrophen Genprogramms.....	76
Abbildung 3-25: Expression des fetalen Genprogramms bei Behandlung von NRVCs mit AdAk012407 und AdOCC-1 unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit Phenylephrin (PE).	78
Abbildung 3-26: Immunfluoreszenzmikroskopische Zellgrößenbestimmung in NRVCs nach Infektion mit AdAk012407 und AdOCC-1 unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit Phenylephrin.....	79

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Primer-Sequenzen für Klonierungen und Sequenzierungen	18
Tabelle 2-2: Primer-Sequenzen für die quantitative RealTime-PCR	18
Tabelle 2-3: Primer-Sequenzen der Multiplex-PCR für Hypertrophie-assoziierte Gene	19
Tabelle 2-4: Primärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenzzytologie	19
Tabelle 2-5: Sekundärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie	19
Tabelle 2-6: Vektoren für Gateway-Klonierungen	20
Tabelle 2-7: Plasmide zur die Transfektion von NMCM	20
Tabelle 2-8: Adenoviren zur Infektion von NRVCN	20
Tabelle 2-9: Silencer®Select Predesigned siRNAs zur Transfektion von NMCM.....	20
Tabelle 2-10: LNA longRNA Gappers zur Transfektion von NMCM	20
Tabelle 2-11: Ausplattierung NRVCN.....	28
Tabelle 2-12: Reaktionsansatz für die Klonierungs-PCR mit der Phusion Hotstart DNA-Polymerase	38
Tabelle 2-13: PCR-Protokoll für die Klonierungs-PCR mit der Phusion Hotstart DNA-Polymerase	38
Tabelle 2-14: Reaktionsansatz für die Klonierungs-PCR mit der DreamTaq DNA-Polymerase	39
Tabelle 2-15: PCR-Protokoll für die Klonierungs-PCR mit der DreamTaq DNA-Polymerase	40
Tabelle 2-16: Restriktionsverdau mit BamHI und SacI	40
Tabelle 2-17: Reaktionsansatz für die Ligation des PCR-Produkts und dem Gateway TurboGFP-C Entry Clone	41
Tabelle 2-18: Standardreaktionsansatz für die quantitative RealTime-PCR mit SYBR Green	43
Tabelle 2-19: Standardprogramm für die quantitative RealTime-PCR mit SYBR Green	43
Tabelle 2-20: Standardreaktionsansatz für die quantitative Multiplex-PCR.....	44
Tabelle 2-21: Standardprogramm für die quantitative Multiplex-PCR	44

IV. Abkürzungsverzeichnis

ACTA	α 1-skeletal actin
aHIF	Hypoxia inducible factor antisense RNA 2
ANF	Atrial Natriuretic Factor
ANOVA	Analysis of variance
BNP	Brain Natriuretic Peptide
Brg1	Brahma related gene 1
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Celsius
cDNA	Complementary DNA
Chast	Cardiac hypertrophy associated transcript
Chrf	Cardiac Hypertrophy related Factor
CnA-TG	Calcineurin-transgene Mauslinie
Ctrl	Kontrolle
C _t	Threshold Cycle
DAG	Diacylglycerol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dvl	Disheveled protein
E.coli	Escherichia coli
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular signal responsive kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum

FS	Fractional Shortening
GATA4	GATA binding protein 4
GATA6	GATA binding protein 6
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GSK3 β	Glycogen synthetase kinase 3 β
Hectd2os	Hectd2 opposite strang long non-coding RNAs
HRP	Horse Radish Peroxidase
IFH	Integration Host Factor
Ifu	Infectious units
IGF1	Insulin like growth factor 1
IP3	Inositoltriphosphat
IVS	Interventricular Septum
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCNQ1OT	KQT-like subfamily member 1 antisense transcript 1
l	Liter
LB	Luria Bertani
lncRNA	Lange nicht-kodierende RNA
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1A
LVAD	Linksventrikuläres Unterstützungssystem
LVID	Left Ventricular Internal Diameter
MALAT1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
MAPK	Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MesP1	mesodermalen Protein 1
MHC	Myosin Heavy Chain
Mhrt	Myosin heavy chain associated RNA transcript
min	Minuten
miRNA / miR	microRNA

MIRT	Myokardinfarkt assoziiertes Transkript
MLP	Muscle LIM protein
MLP-KO	MLP-Knockout Mauslinie
moi	Multiplizität der Infektion
mRNA	Messenger RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
NCS	Newborn Calf Serum
NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells
Nkx2-5	NK2 homebox 5
NMCM	Neonatale Mauskardiomyozyten
NRVCM	Neonatale venrikuläre Rattenkardiomyozyten
OCC-1	Overexpressed in Colon Carcinoma -1
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C β
Plekhm	pleckstrin homolog domain containing family member 1
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PW	Posterior Wall
qPCR	Quantitative RealtimePCR
Rcan1.4	Regulator of calcineurin 1.4
RIAN	RNA imprinted and accumulated in nucleus
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic Acid
RPL32	Ribosomal Protein L32
rpm	Runden pro Minute

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
s	Sekunden
SERCA	Sacroplasmatic reticulum Ca ²⁺ ATPase
siRNA	Small interfering RNA
Snhg18	Small nuclear RNA host gene 18
TAC	Transthorakale aortale Konstriktion
TAE	Tris Buffered Saline
TBS	Tris-Acetat EDTA
UV	Ultraviolett
WNT	wingless-type MMTV integration site family, member 1

1. Einleitung

1.1. Kardiale Hypertrophie

1.1.1. Klinische Bedeutung und Epidemiologie

Die kardiale Hypertrophie bezeichnet eine Herzvergrößerung mit Zunahme des Herzgewichts. Sie beruht auf einer Vergrößerung der Kardiomyozyten. Physiologisch tritt eine Hypertrophie im Rahmen des postnatalen Wachstums, bei Ausdauersportlern und während der Schwangerschaft auf. Davon abzugrenzen ist die pathologische Hypertrophie, die im Rahmen von Herzerkrankungen auftritt (Dorn, Robbins et al. 2003). Initial adaptiv, tritt sie bei chronischer kardialer Belastung, beispielsweise im Rahmen einer arteriellen Hypertonie, eines Vitiums oder nach ischämischer Myokardschädigung, auf und dient der Normalisierung der erhöhten Wandspannung sowie dem Erhalt einer suffizienten Pumpfunktion. Dieser Kompensationsmechanismus beruht auf den durch das Laplace-Gesetz beschriebenen Zusammenhängen zwischen Wandspannung (σ), intraluminalem Druck (p), Ventrikelradius (r) und Wanddicke (h): $\sigma = \frac{pr}{2h}$. Ein Fortbestehen der chronischen Belastung führt jedoch zur Dilatation der Ventrikel und somit zur Dekompensation der Herzfunktion (Grossman, Jones et al. 1975; Tham, Bernardo et al. 2015). Die enge Assoziation zwischen kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz konnte durch zahlreiche klinische Studien bestätigt werden (Mosterd and Hoes 2007; Tsao and Vasan 2015). Weiterhin konnte die kardiale Hypertrophie als unabhängiger Risikofaktor für Myokardinfarkte, Arrhythmien sowie für eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität identifiziert werden (Levy, Garrison et al. 1990).

Das akute oder chronische Pumpversagen des Herzens wird als Herzinsuffizienz bezeichnet. In den Industrienationen sind 1-2% der Bevölkerung von Herzinsuffizienz betroffen (Mosterd and Hoes 2007). Insbesondere im hohen Lebensalter nimmt die Prävalenz der Herzinsuffizienz zu. So konnte in der Rotterdam-Studie eine Prävalenz von 0,9% in der Altersgruppe von 55-64 Jahren, eine Prävalenz von 4% in der Altersgruppe von 65-74 Jahren sowie eine Prävalenz von 9,7% in der Altersgruppe von 75-84 Jahren beobachtet werden (Bleumink, Knetsch et al. 2004). Meist entsteht eine Herzinsuffizienz auf dem Boden einer koronaren Herzkrankheit oder einer arteriellen Hypertonie. Weniger häufige Ursachen sind Kardiomyopathien, Infektionen, Toxine und Klappenvitien. Typische Zeichen der Herzinsuffizienz sind Müdigkeit und verminderte Leistungsfähigkeit, Belastungs- oder Ruhedyspnoe, Orthopnoe, Nykturie,

gestaute Jugularvenen und periphere Ödeme. Trotz Verbesserungen in der Therapie, beispielsweise durch den Einsatz von ACE-Hemmern oder Betablockern, bleibt die Prognose der Herzinsuffizienz schlecht (Kemp and Conte 2012; Ponikowski, Voors et al. 2016). So blieb die Überlebensrate 5 Jahre nach Diagnosestellung zwischen 2000 und 2010 unverändert bei etwa 50% (Benjamin, Muntner et al. 2019). Ein Ziel der kardiologischen Grundlagenforschung ist somit das umfassende Verständnis der molekularen Mechanismen der kardialen Hypertrophie und Insuffizienz, um die Entwicklung neuer Therapiekonzepte zu ermöglichen.

1.1.2. Pathophysiologie der pathologischen kardialen Hypertrophie

Herzgewebe besteht aus Kardiomyozyten, Fibroblasten, vaskulären glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Immunzellen und der umgebenden extrazellulären Matrix. Obwohl Kardiomyozyten nur einen Anteil von 30% an der Gesamtzellzahl im Herzen haben, machen sie 70-80% des Herzgewichts aus (Bernardo, Weeks et al. 2010). Da Kardiomyozyten weitestgehend postmitotisch sind, ist das gesteigerte Herzgewicht im Rahmen einer kardialen Hypertrophie auf eine Zunahme der Myozytengröße zurückzuführen (Soonpaa, Kim et al. 1996). Als zellulärer Anpassungsmechanismus bei biomechanischem Stress kann die Myozytenhypertrophie durch eine Vielzahl von Stimuli hervorgerufen werden. Dazu zählen neben äußeren Reizen wie Druck- und Volumenbelastung auch genetische Mutationen als innere Auslöser, beispielsweise im Rahmen von familiären Kardiomyopathien. Neben einer Zunahme der Kardiomyozytengröße sind eine gesteigerte Proteinsynthese und eine Veränderung der Sarkomerstruktur charakteristisch für die Myozytenhypertrophie (Frey and Olson 2003). Weiterhin geht die kardiale Hypertrophie mit metabolischen und strukturellen Alternationen im Myokard einher. Während der Energiebedarf im gesunden Myokard zu 60-70% durch die β -Oxidation von Fettsäuren gedeckt wird, metabolisiert das hypertrophe Herz vor allem Glucose (Taegtmeyer 2002). Strukturell wird die pathologische Hypertrophie von Myozytenverlust und Fibrose begleitet (Hein, Arnon et al. 2003). Chronischer biomechanischer Stress und Ischämie führen zu Zelldegeneration und Zelluntergang durch Apoptose und Nekrose (Diwan and Dorn 2007). Gleichzeitig werden pro-fibrotische Signalwege stimuliert, die in der Proliferation von Myofibroblasten und Akkumulation von Kollagen resultieren (Khan and Sheppard 2006). Darüber hinaus trägt die fibrotisch bedingte Abnahme der Kapillardichte zur Dekompensation der Herzfunktion bei (Bernardo, Weeks et al. 2010). Neben diesen morphologischen Veränderungen zeigen sich in der pathologischen

Herzhypertrophie distinkte Veränderungen der Genexpression. Pathognomonisch ist insbesondere die Reexpression fetaler Gene, die in zahlreichen Studien im Tiermodell sowie in humanen Proben bestätigt werden konnte. Dazu wird die Expression der natriuretischen Peptide, atriales natriuretisches Peptid (ANF) und natriuretisches Peptid Typ B (BNP), sowie die Expression von α 1-skeletal Actin (ACTA1) gezählt. Ebenso kann im Mausmodell ein Isoformwechsel der kontraktilen Proteine vom adulten α -Myosin Heavy Chain (α -MHC) zum fetalen β -Myosin Heavy Chain (β -MHC) und eine verminderte Expression der Sacroplasmatic Reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA2a) beobachtet werden (Izumo, Nadal-Ginard et al. 1988; Takahashi, Allen et al. 1992; Arai, Alpert et al. 1993; Iemitsu, Miyauchi et al. 2001).

1.1.3. Molekulare Signalwege der kardialen Hypertrophie

Von besonderem Interesse sind die komplexen molekularen Mechanismen, die der Entstehung der kardialen Hypertrophie zu Grunde liegen. Durch jahrzehntelange kardiovaskuläre Forschung konnte die Beteiligung zahlreicher Signalwege an der Regulation der myokardialen Hypertrophie bestätigt werden. In Abbildung 1-1 sind die wichtigsten Signalkaskaden dargestellt.

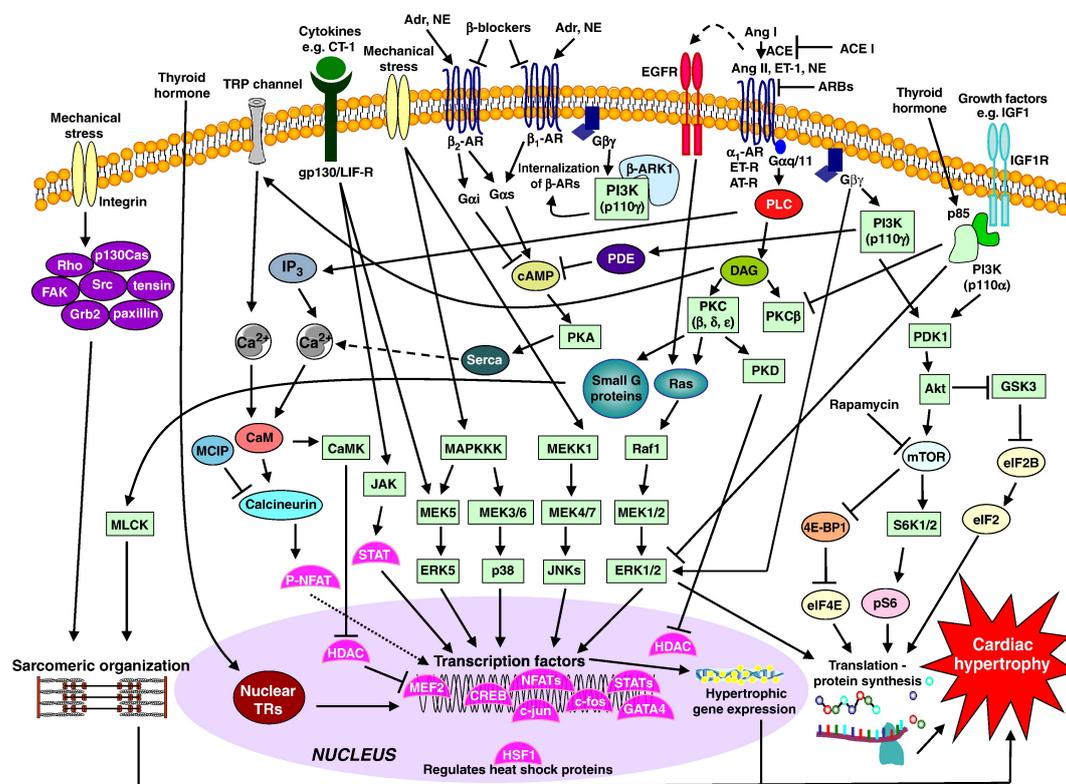


Abbildung 1-1: Übersicht über die wichtigsten Signalkaskaden der kardialen Hypertrophie (Bernardo, Weeks et al. 2010)

Zentrale Signalwege der kardialen Hypertrophie sind unter anderem die Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPK), der Calcineurin-NFAT-Signalweg sowie der mit der physiologischen Hypertrophie assoziierte Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) -Akt-Signalweg. Die Signalkaskaden werden an der Zelloberfläche durch Bindung von Hormonen, Zytokinen oder Wachstumsfaktoren an spezifische Rezeptoren sowie durch intrazelluläre Messfühler für Dehnung und biomechanischen Stress initiiert. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, verschiedener Proteasen und Phosphatasen sowie der Anstieg des intrazellulären Calciums (Heineke and Molkentin 2006). Durch Bindung von Angiotensin-II, Endothelin-I und Katecholaminen an $G_{\alpha q/\alpha 11}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren kommt es zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) durch die Phospholipase C β (PLC). Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche über die Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) zur Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum führt (Clerk and Sugden 1999; Rockman, Koch et al. 2002). Zudem führt die Aktivierung des $G_{\alpha q/\alpha 11}$ -Protein gekoppelten Rezeptors zur Aktivierung der Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen. Der MAPK-Signalweg besteht aus einer Sequenz von sukzessiv aktivierten Kinasen, die in der Phosphorylierung und Aktivierung von p38, c-Jun N-terminal Kinases (JNK) und Extracellular Signal Responsive Kinases (ERK) mündet. Die Aktivierung von p38, JNK und ERK führt über die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zu Veränderungen der kardialen Genexpression (Clerk and Sugden 1999). Der Calcineurin-NFAT-Signalweg wird durch Anstieg des intrazellulären Calciums aktiviert. Calcineurin ist eine Serin-Threonin-Phosphatase, die durch die calciumabhängige Bindung von Calmodulin aktiviert wird und den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) dephosphoryliert. Im aktiven, dephosphorylierten Zustand transloziert NFAT in den Zellkern und bindet die Transkriptionsfaktoren GATA Binding Protein 4 (GATA4) und Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) (Molkentin, Lu et al. 1998). Dies führt zur vermehrten Transkription prohypertropher Gene wie ANF, BNP und Regulator of Calcineurin 1.4 (RCAN1.4). An der komplexen Regulation des Calcineurin-NFAT-Signalwegs sind unter anderem Z-Scheiben-Proteine wie Calsarcin-1 (Frey, Barrientos et al. 2004) und Muscle LIM Protein (MLP) (Heineke, Ruetten et al. 2005) beteiligt. Weiterhin führen verschiedene Kinasen wie Glycogen Synthetase Kinase 3 β (GSK3 β) (Antos, McKinsey et al. 2002), p38 (Braz, Bueno et al. 2003), DYRK1A (Kuhn, Frank et al. 2009) und JNK (Liang, Bueno et al. 2003) über die Phosphorylierung von NFAT zur Inhibition des Calcineurin-NFAT-Signalwegs. Die Kinase GSK3 β ist als zentraler negativer Regulator der

kardialen Hypertrophie an weiteren Signalwegen, wie dem PI3K-Akt-Signalweg, beteiligt. Der PI3K-Akt-Signalweg wird durch Bindung von Insulin oder Insulin Like Growth Factor (IGF-1) an der Zellmembran initiiert. Durch die sukzessive Aktivierung von PI3K und Akt, kommt es durch Inhibition von GSK3 β und Aktivierung von Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) zu Veränderungen der Genexpression (Cantley 2002). Auch im Wntless-type MMTV Integration Site Family Member 1 (WNT)-Frizzled-Signalweg führt die Aktivierung von Disheveled über die Inhibition von GSK3 β zur Transkription prohypertropher Gene (van de Schans, van den Borne et al. 2007). An der Regulation der kardialen Hypertrophie sind noch viele weitere Faktoren und Signalwege beteiligt. Das umfassende Verständnis ihres Zusammenspiels ist eine zentrale Aufgabe der kardiologischen Grundlagenforschung.

1.2. Lange nicht-kodierende RNAs

1.2.1. Nicht-kodierende RNAs

Technische Fortschritte in der Molekularbiologie ermöglichten die vollständige Sequenzierung des Genoms und die Analyse des Transkriptom. Dabei zeigte sich, dass das tierische Genom weitaus komplexer ist als zuvor angenommen (Clark, Choudhary et al. 2013). Basierend auf Cricks zentralem Dogma der Molekularbiologie, welches den Transfer der genetischen Information der DNA über RNA zu Proteinen postulierte (Crick 1958), standen jahrzehntelang Proteine als Protagonisten der Zellfunktion und die zugehörigen Gene im Zentrum der Forschung. RNA hingegen wurde als bloßes Intermediat gesehen, welches dem Informationstransfer zwischen DNA und Protein diente (Li, Wu et al. 2014). Mit Abschluss des Human Genom Projekts 2003 wurde jedoch bekannt, dass proteinkodierende Gene nur 40% des humanen Genoms umfassen und nur 1,2% des Genoms für Exone kodiert (Lander, Linton et al. 2001). Aktiv transkribiert hingegen wird ein wesentlich größerer Anteil des Genoms (Carninci, Kasukawa et al. 2005; Djebali, Davis et al. 2012). Zahlreiche Studien bestätigten die Transkription von etwa 70-80% des Genoms durch verschiedene Techniken, wie cDNA-Sequenzierung (Carninci, Kasukawa et al. 2005), Chromatinanalysen (Guttman, Amit et al. 2009), Microarrays (Kapranov, Cheng et al. 2007) oder RNA-Sequenzierung (Cabili, Trapnell et al. 2011). Dabei zeigte sich, dass auch nicht-kodierende Transkription vor allem in räumlicher Nähe zu bekannten proteinkodierenden Genen stattfindet. Daraus entwickelte sich ein neues Modell der Genomorganisation, das proteinkodierende Gene in der Mitte eines Netzwerks aus regulatorischen nicht proteinkodierenden Genen sieht (Kapranov, Cheng et al. 2007).

Hinweise für die funktionelle Relevanz dieser nicht-kodierenden Gene ergeben sich aus ihrer differentiellen Transkription und genetischen Konservierung (Guttman, Amit et al. 2009), sowie aus der positiven Korrelation zwischen der Komplexität eines Organismus und dem Anteil nicht proteinkodierender Gene am Genom (Taft, Pheasant et al. 2007). Ihre Transkripte können anhand ihrer Länge in zwei Klassen unterteilt werden: kurze, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von <200 Nukleotiden und lange, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von >200 Nukleotiden (Kapranov, Cheng et al. 2007). Kurze nicht-kodierende RNAs entstehen meist durch posttranskriptionale Prozessierung langer Transkripte durch endogene RNAsen. Basierend auf ihrer Größe, Biogenese und Funktion können kurze nicht-kodierende RNAs in verschiedene Subklassen eingeteilt werden. Die bekanntesten Subgruppen stellen microRNAs (miRNA) und small interfering RNAs (siRNA) dar. Beide Subgruppen sind negative Regulatoren der Genexpression und führen nach Bindung einer komplementären Sequenz zur Degradation der Ziel Messenger RNA (mRNA) über einen Enzymkomplex (Clark, Choudhary et al. 2013). Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt jedoch auf der wesentlich heterogeneren Gruppe der langen nicht-kodierenden RNAs.

1.2.2. Klassifikation und Biogenese langer nicht-kodierender RNAs

Lange nicht-kodierende RNAs werden über das Fehlen von proteinkodierendem Potential und ihre Länge von über 200 Nukleotiden definiert. Da der Übergang zwischen kurzen und langen nicht-kodierenden RNAs bei einer Länge von 200 Nukleotiden auf technischen Gegebenheiten in der RNA-Isolation beruht, ist die Gruppe der langen nicht-kodierenden RNAs sehr heterogen. Diese Heterogenität erschwert ihre weitere Subklassifikation (Mercer, Dinger et al. 2009). Dennoch gibt es verschiedene Ansätze zur Klassifikation von langen nicht-kodierenden RNAs beispielsweise anhand ihrer genomischen Lokalisation, biologischen Eigenschaften, subzellulären Lokalisation und Funktion (St Laurent, Wahlestedt et al. 2015). Am weitesten verbreitet ist die Klassifikation des GENCODE Konsortiums, welche lange nicht-kodierende RNAs anhand ihrer Assoziation zu bekannten proteinkodierenden Genen einteilt (siehe Abbildung 1-2). Dabei wird zwischen langen nicht-kodierenden RNAs, die zwischen zwei proteinkodierenden Genen lokalisiert sind („intergenic“) und langen nicht-kodierenden RNAs, die innerhalb eines proteinkodierenden Gens lokalisiert sind („genic“), unterschieden. Für die weitere Klassifikation der „intergenic“ Gruppe wird die Transkriptionsrichtung in Bezug auf das nächstgelegene proteinkodierende Gen berücksichtigt. Die Transkription der langen nicht-

kodierenden RNAs kann konvergent oder divergent zur Transkriptionsrichtung des proteinkodierenden Gens sowie bidirektional erfolgen. Die „genic“ Gruppe kann anhand ihrer Position innerhalb des Gens weiter klassifiziert werden. Lange nicht-kodierende RNAs, die sich innerhalb eines Introns befinden und nicht mit Exonen überlappen, werden als „intronic“ bezeichnet. Dahingegen werden lange nicht-kodierende RNAs mit Überschneidungen mit einem Exon als „exonic“ bezeichnet werden. Weiterhin wird die Richtung der Transkription berücksichtigt. Stimmen Transkriptionsrichtung der langen nicht-kodierenden RNA und die des proteinkodierenden Gens überein, wird diese als „sense“ bezeichnet. Verläuft die Transkription der langen kodierenden RNA hingegen in die entgegengesetzte Richtung so wird dies als „antisense“ bezeichnet. Während „exonic“ lange nicht-kodierende RNAs immer in „antisense“ Richtung transkribiert werden, kann die Transkription von „intronic“ lange nicht-kodierende RNAs in beide Richtungen erfolgen (Derrien, Johnson et al. 2012).

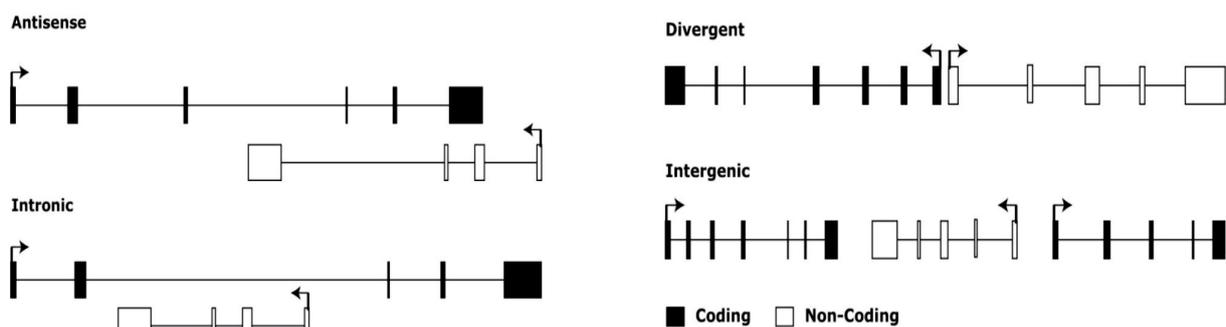


Abbildung 1-2: Klassifikation langer nicht-kodierender RNAs anhand der genomischen Lokalisation (Rinn and Chang 2012)

Die Biogenese der langen nicht-kodierenden RNAs entspricht weitgehend der der mRNA. Promotoren für lange nicht-kodierende RNAs werden über die Bindung von Transkriptionsfaktoren sowie epigenetische Modifikation in der Histonstruktur reguliert (Guttman and Rinn 2012). In den meisten Fällen erfolgt die Transkription der langen nicht-kodierenden RNAs durch die RNA-Polymerase II (Guttman, Amit et al. 2009). Seltener werden lange nicht-kodierende RNAs durch die RNA-Polymerase III transkribiert (Kapranov, Cheng et al. 2007). Dies trägt zur präzisen Regulation der Expression von langen nicht-kodierenden RNAs bei. Doch im Gegensatz zu mRNA werden lange nicht-kodierende RNAs deutlich geringer und zellspezifischer exprimiert. Während 53% die Proteine konstitutiv exprimiert werden, trifft dies nur auf 10% der langen nicht-kodierenden RNAs zu. Weiterhin sind 29% der langen nicht-kodierenden RNAs nur in einer Zelllinie zu finden (Djebali, Davis et al. 2012).

Posttranskriptional werden viele lange nicht-kodierende RNAs mit einer 5'-Methylguanosisin-Kappe und einem Poly(A)-Schwanz versehen (Guttman, Amit et al. 2009). Zudem enthalten 98% der langen nicht-kodierenden RNA Splicing-Stellen. Charakteristisch für lange nicht-kodierende RNAs ist die Zusammensetzung aus zwei Exonen, wohingegen mRNA meist aus einer größeren Anzahl von Exonen zusammengesetzt ist. Einige lange nicht-kodierende RNAs dienen zudem als Vorläufer für kleine nicht-kodierende RNAs. Während mRNA ins Zytosol transportiert wird, sind lange nicht-kodierende RNAs in allem Zellkompartimenten zu finden. Besonders hoch ist Konzentration der langen nicht-kodierenden RNAs im Zellkern, insbesondere im Chromatin (Derrien, Johnson et al. 2012). Der letzte Schritt in der Biogenese der langen nicht-kodierenden RNAs ist die Bildung von thermodynamisch stabilen Sekundärstrukturen. Lange nicht-kodierende RNAs können beispielsweise Helices oder Haarnadelstrukturen bilden, die die Interaktion mit DNA, Proteinen und anderen RNA-Molekülen ermöglichen. Die Sekundärstruktur der langen nicht-kodierenden RNA ist eng mit ihrer Funktion verknüpft und oftmals stärker genetisch konserviert als ihre Primärstruktur (Mercer and Mattick 2013).

1.2.3. Funktionen langer nicht-kodierender RNAs

Die Befähigung zur Interaktion mit DNA, Proteinen und anderen RNA-Molekülen ermöglicht die vielfältigen regulatorischen Funktionen der langen nicht-kodierenden RNAs. Obwohl nur eine kleine Anzahl der derzeit annotierten 15.778 langen nicht-kodierenden RNAs (GENCODE 2017) bereits funktionell charakterisiert wurde, konnte die Beteiligung langer nicht-kodierender RNAs an der Genregulation auf epigenetischer, transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene gezeigt werden (Mercer, Dinger et al. 2009).

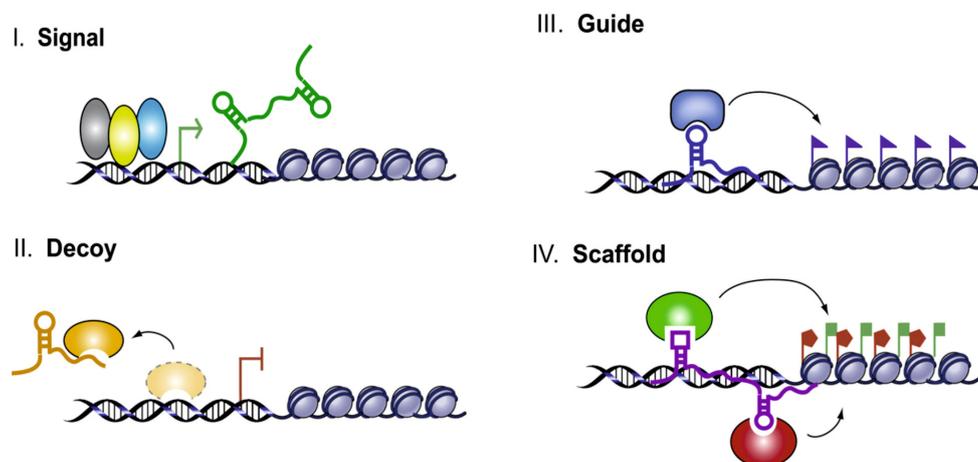


Abbildung 1-3: Funktionen langer nicht-kodierender RNAs (Wang and Chang 2011)

Die Funktionen der langen nicht-kodierenden RNAs wurden von Wang und Chang anhand von vier Grundmechanismen eingeteilt: Signal, Decoy (Köder), Guide (Wegweiser) und Scaffold (Grundgerüst). Der einfachste Mechanismus ist die Funktion der langen nicht-kodierenden RNAs als molekulares Signal für transkriptionelle Aktivität. Lange nicht-kodierende RNAs unterliegen einer strengen transkriptionellen Regulation und werden zeit- und ortsspezifisch als Antwort auf embryonale Entwicklungsreize oder externe Stimuli exprimiert. Somit können sie als Indikator für funktionell bedeutsame biologische Ereignisse dienen (Wang and Chang 2011). Ein Beispiel für die Funktion als Signal sind Enhancer RNAs, eine Untergruppe der langen nicht-kodierenden RNAs. Ihre Transkription erfolgt nach Bindung der RNA-Polymerase an spezifische Enhancer und korreliert mit dem Ausmaß der mRNA-Synthese an nahegelegenen Genen. Somit dienen sie als Signal für aktive genregulatorische Signalwege (Kim, Hemberg et al. 2010). Der zweite Mechanismus ist die Funktion der langen nicht-kodierenden RNAs als Köder. Nach ihrer Transkription binden diese langen nicht-kodierenden RNAs beispielsweise an Transkriptionsfaktoren oder miRNAs und unterbinden ihre Funktion (Wang and Chang 2011). Ein Beispiel für die Funktion als Köder ist Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (Malat-1). Malat-1 ist im Zellkern lokalisiert und bindet Serin/Arginin Splice Faktoren. Eine Deletion von Malat-1 in der Zellkultur führt zu Veränderungen dieser Aktivität der Splice Faktoren und zu alternativen Splicemustern (Tripathi, Ellis et al. 2010). Weiterhin können lange nicht-kodierende RNAs als Wegweiser fungieren, indem sie Proteine binden und zu spezifischen Zielgenen navigieren. Dabei ist neben einem cis-Effekt auf benachbarte Gene, auch ein trans-Effekt auf entfernt lokalisierte Gene beschrieben. Effektoren der langen nicht-kodierenden RNAs sind dabei sowohl Modulatoren der Chromatinstruktur wie Polycombproteine als auch klassische Transkriptionsfaktoren (Wang and Chang 2011). Ein Beispiel für die Wegweiserfunktion langer nicht-kodierender RNAs in cis ist die Inaktivierung eines X-Chromosoms bei weiblichen Säugetieren. An der Inaktivierung des X-Chromosoms sind die langen nicht-kodierende RNAs Xist und Tsix beteiligt. Xist dient als Wegweiser für Polycomb-repressive complex 2 (PRC2) und führt so zur Inaktivierung eines X-Chromosoms durch Methylierung von Histon H2. Gleichzeitig dient Tsix als Köder für PRC2 und verhindert so die Inaktivierung des anderen X-Chromosoms (Zhao, Sun et al. 2008). HOTAIR ist ein Beispiel für die Funktion von langen nicht-kodierenden RNAs in trans. Mammakarzinomzellen, die HOTAIR überexprimieren, sind mit einer vermehrten Invasivität assoziiert. Durch Microarrayanalysen zeigte sich, dass eine Überexpression von HOTAIR zu

einem genomweit veränderten PRC2-Rekrutierungsmuster und somit der Repression verschiedener Tumorsuppressorgene führt (Gupta, Shah et al. 2010). Außerdem können lange nicht-kodierenden RNAs als Grundgerüst fungieren auf dem verschiedene Effektoren versammelt werden (Wang and Chang 2011). Beispielsweise interagiert HOTAIR neben der Histon-Methyltransferase PRC2 auch mit dem Histon-Demethylase-Komplex LSD1. Beide Enzymkomplexe führen zur epigenetischen Repression des Zielgens. Während die Expression von HOTAIR die Interaktion der Komplexe ermöglichte, führte die Deletion von HOTAIR zur Besetzung der Zielgene mit PRC2 und LSD1. Dies unterstützt die Annahme das HOTAIR als Gerüst für verschiedene Histon-Modifikatoren dient (Tsai, Manor et al. 2010). Am Beispiel HOTAIR wird zudem deutlich, dass einige lange nicht-kodierende RNAs in einer Kombination der verschiedenen Grundmechanismen agieren (Wang and Chang 2011) .

1.2.4. Bedeutung von langen nicht-kodierenden RNAs im Herzen

Angesichts ihrer vielfältigen Funktionen spielen lange nicht-kodierende RNAs eine zentrale Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen und Erkrankungen wie der Embryogenese, dem Zellzyklus, der Apoptose sowie in der Karzinogenese und bei kardiovaskulären Erkrankungen (Tham, Bernardo et al. 2015). Die funktionelle Bedeutung von langen nicht-kodierenden RNAs im Herzen wurde erstmals anhand von „Braveheart“ beschrieben. Braveheart ist notwendig für die Differenzierung von kardialen Progenitorzellen während der murinen Embryogenese. So verhindert die Depletion von Braveheart in embryonalen Stammzellen die Differenzierung zu kardialen Progenitorzellen und führt zu einer verminderten Expression des für die Differenzierung benötigten Transkriptionsfaktors Mesodermales Protein 1 (MesP1). Funktionell liegt eine Interaktion zwischen Braveheart und der Histon-Methyltransferase PRC2 zugrunde, die die epigenetische Repression von MesP1 verhindert (Klattenhoff, Scheuermann et al. 2013). Auch für weitere lange nicht-kodierende RNAs konnte eine Beteiligung an der Entwicklung des Herzens gezeigt werden. So resultiert die homozygote Deletion von Fendrr in-vivo in einem pränatal letalen Phänotyp mit multiplen Organfehlbildungen, insbesondere des Herzens. Zudem konnte ein verändertes Histon-Methylierungsmuster beobachtet werden, welches in der vermehrten Expression von zentralen Transkriptionsfaktoren für die Herzentwicklung, wie GATA6 und Nkx2-5, resultierte. Vermutlich agiert Fendrr als Wegweiser für die Histon-Methyltransferasen PRC2 und

TrxG/MLL und spielt so eine wichtige Rolle in der epigenetischen Regulation der Herzentwicklung (Grote, Wittler et al. 2013).

Um Hinweise auf die funktionelle Bedeutung von langen nicht-kodierenden RNAs bei kardiovaskulären Erkrankungen zu erlangen, untersuchten verschiedene Studien die Expressionsprofile langer nicht-kodierender RNAs in humanen Herzinsuffizienzproben (Yang, Yamada et al. 2014) sowie nach Myokardinfarkt im Mausmodell (Zangrando, Zhang et al. 2014). Yang et al. führten RNA-Sequenzierungsanalysen mit humanen Proben aus gesundem Myokard sowie aus insuffizientem Myokard, vor und nach Implantation eines linksventrikulären Unterstützungssystems (LVAD), durch. Dabei zeigten sich etwa 600 differentiell regulierte lange nicht-kodierende RNAs im insuffizienten Myokard, von denen sich etwa 10% nach Implantation des LVADs normalisierten. Weiterhin konnte anhand des Expressionsprofils der langen nicht-kodierenden RNAs zwischen ischämischer und nicht ischämischer Genese der Herzinsuffizienz unterschieden werden. Dies impliziert die Bedeutung langer nicht-kodierender RNAs sowohl in der Pathogenese der Herzinsuffizienz wie auch im günstigen Remodelling nach Implantation des LVADs (Yang, Yamada et al. 2014). Im murinen Herzinfarktmodell konnte die differentielle Regulation von 30 langen nicht-kodierenden RNAs gezeigt werden. Insbesondere die Myokardinfarkt-assoziierten Transkripte (MIRT) 1 und 2 werden nach Myokardinfarkt überexprimiert und sind in das linksventrikuläre Remodelling involviert (Zangrando, Zhang et al. 2014). Aus diesem Expressionsprofil ergibt sich die potentielle Rolle langer nicht-kodierende RNAs als prognostische Biomarker nach Myokardinfarkt. So konnte im peripheren Blut von Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine vermehrte Expression von MALAT-1, aHIF und KCNQIOT sowie eine verminderte Expression von ANRIL nachgewiesen werden. Durch Berücksichtigung der Expression von KCNQIOT und ANRIL als Prädiktoren einer linksventrikulären Dysfunktion kann die Aussagekraft prognostischer Modelle verbessert werden (Vausort, Wagner et al. 2014). Auch die lange nicht-kodierende RNA LIPCAR kann im Plasma von Patienten mit Myokardinfarkt detektiert werden und ist ein potentieller Biomarker für kardiales Remodelling und erhöhte Mortalität (Kumarswamy, Bauters et al. 2014).

Von besonderem Interesse sind zudem die funktionellen Mechanismen der langen nicht-kodierenden RNAs im erkrankten Myokard. Bislang konnten nur wenige lange nicht-kodierende RNAs im Myokard funktionell charakterisiert werden. Eine der ersten im Myokard

charakterisierten langen nicht-kodierenden RNAs ist das Myosin heavy chain-associated RNA transcript (Mhrt). Durch Veränderungen der Chromatinstruktur kann Mhrt der Entwicklung der kardialen Hypertrophie entgegenwirken. Mhrt interagiert und inhibiert den Histonacetylierungsfaktor Brg1, der unter Stressbedingungen zu Hypertrophie-assoziierten Veränderungen in der Expression von Myh6 und Myh7 führt. Durch Untersuchungen im Mausmodell konnte der protektive Effekt von Mhrt bestätigt werden. So zeigen Mhrt transgene Mäuse sechs Wochen nach transaortaler Konstriktion im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine geringere Zunahme des ventrikulären Gewichts sowie eine deutlich bessere linksventrikuläre Funktion (Han, Li et al. 2014). Ein Beispiel für die prohypertrophen Effekte langer nicht-kodierender RNAs ist Cardiac Hypertrophy associated transcript (Chast). Bei Untersuchung von murinen Herzgewebe nach transaortaler Konstriktion sowie von Myokardbiopsien von Patienten mit Aortenstenose, zeigte sich eine vermehrte Expression von Chast. In-vitro und in-vivo führt die Überexpression von Chast zur Induktion einer Hypertrophie. Dahingegen kann durch GapmeR-vermittelte Hemmung der Chast-Expression die Entwicklung einer Hypertrophie nach transaortaler Konstriktion verhindert werden. GapmeRs sind synthetische Antisenseoligonukleotide, die speziell für die Inhibition nicht-kodierender RNAs entwickelt wurden und nach komplementärer Bindung zur RNase H vermittelten Degradation der Zielsequenz führen. Der hypertrophe Effekt von Chast beruht auf der negativen Regulation von Plekhn, das auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang lokalisiert ist. Die Inhibition von Plekhn geht mit der Hemmung der kardialen Autophagie und der Induktion prohypertropher Gene einher (Viereck, Kumarswamy et al. 2016). Weiterhin können lange nicht-kodierende RNAs durch Interaktion mit miRNAs Einfluss auf die Entwicklung der kardialen Hypertrophie nehmen. So agiert eine lange nicht-kodierende RNA namens Cardiac Hypertrophy related Factor (Chrf) als endogener Köder für miR-489. Die Überexpression von miR-489 in-vitro und in-vivo wirkt durch Inhibition von My88 einer Angiotensin-II-vermittelten Hypertrophieinduktion entgegen. Hingegen führt die Überexpression von Chrf zur verminderten Expression miR-489 und somit zur vermehrten Hypertrophieinduktion durch Angiotensin II. (Wang, Liu et al. 2014) .

1.3.Zielsetzung der Arbeit

Lange nicht-kodierende RNAs sind eine neue Gruppe von regulatorischen Molekülen, deren funktionelle Relevanz in zahlreichen biologischen Prozessen sowie in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen zunehmend erkannt wird. Auch in der kardialen Entwicklung sowie in der Genese kardiovaskulärer Erkrankungen spielen lange nicht-kodierende RNAs als Regulatoren der Genexpression eine Rolle. Dennoch ist über die Bedeutung langer nicht-kodierender RNAs in der Entwicklung der pathologischen kardialen Hypertrophie bislang wenig bekannt. Durch Identifikation funktionell bedeutsamer langer nicht-kodierender RNAs soll diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der kardialen Hypertrophie beitragen. Zudem kommt langen nicht-kodierenden RNAs durch ihre zellspezifische Expression eine potentielle klinische Rolle als Biomarker und therapeutisches Ziel zu. Als Grundlage für die Erstellung eines genomweiten Expressionsprofils langer nicht-kodierender RNAs in hypertrophen Kardiomyozyten wurde die transthorakale aortale Konstriktion, ein etabliertes Mausmodell für die kardiale Hypertrophie durch Druckbelastung, gewählt. Dazu wurden Myokardproben von Mäusen, die einer transthorakalen aortalen Konstriktion unterzogen wurden sowie Myokardproben scheinoperierter Kontrolltiere mit Hilfe eines Microarrays analysiert. Ferner sollte eine Auswahl interessanter langer nicht-kodierender RNAs nach Verifikation mittels quantitativer Realtime-PCR hinsichtlich ihrer Funktion in der kardialen Hypertrophie untersucht werden. Zu diesem Zweck, wurden in einer Primärkultur aus neonatalen Maus- oder Rattenkardiomyozyten die Auswirkungen der adenoviralen Überexpression und der siRNA-vermittelte Expressionshemmung dieser langen nicht-kodierenden RNAs unter nativen Bedingungen sowie nach Hypertrophieinduktion durch Phenylephrin untersucht. Als Maß für den hypertrophen Phänotyp wurden die Expression des hypertrophen Genprogramms und die Größe der Kardiomyozyten herangezogen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Amersham Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare
BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop	Keyence
Cellstar Zellkultur Multiwellplatten 6-well, 12-well, 24-well	Greiner Bio one
Cell Strainer weiß, Porengröße 70 µm	Sigma
CFx96 Realtime-PCR Detektionssystem	BioRad
Chromatographie-Papier	Whatman
Coverslips 18 mm Durchmesser	Karl Hecht KG
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph
ECX-F26.M UV-Transluminator	Peqlab
Elektroporationsküvette	Peqlab
Faltenfilter, Papier 110 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
FluorChem Q Camera (Western Blot)	Alpha Innotech
Galaxy Ministar Mikrozentrifuge	VWR
Heraceus Pico 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Horizon 11-14 Gelelektrophorese	Life Technologies
Infinite M200Pro Microplate Reader	Tecan
Mini PROTEAN Tetra System	BioRad
Multiply-µStrip 8er Kette Gefäße	Sarstedt
MyCycler Thermal Cycler	BioRad
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Kammer	Assistent
Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld
Olympus BX53 Mikroskop	Olympus
Parafilm	BEMIS
Pasteurpipetten, Glas	ROTH
Petrischalen 35 x 10 mm	Sarstedt

Pipette Eppendorf-Reference	Eppendorf-Reference
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipettenspitzen, ohne Stopfen	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	BioRad
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab
Precellys Keramikkügelchen	Peqlab
qRT-PCR Platten, 96-well	Bio-Rad
RCT Basis Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Sarstedt
Röhrchen, luftdurchlässig, 14 ml	Sarstedt
Schraubröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Seven Easy pH-Meter	Mettler-Toledo
Stemi 200-C Mikroskop	Zeiss
Steril-Cult 200 Inkubator	Labotect
Steriler Filter 0,2 µm Porengröße	Nalgene Labware
SterilGARD Sterilwerkbank	The Baker Company
TE150S Präzisionswaage	Sartorius
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Arbeitsstation	Scanlaf
Vacusaft Absaugsystem	Integra Bioscientific
Variomag Poly, Mehrstellenmagnetrührer	Thermo Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zellfilter 70 µm Porengröße	MACS Miltenyi Biotech
Zellkultur Flaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt
Zellschaber, 16cm, 2 Positionen	Sarstedt
Zentrifuge 5818	Eppendorf

2.1.2. Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific
Albumin fraction V, bovine	Merck KG
Carbenicillin	Sigma-Aldrich
Cytosine β -D-arabinofuranoside	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA Loading Dye 6x	Fermentas
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Scientific
EDTA	Serva Electrophoresis
Ethanol	ROTH
Ethidiumbromid	Invitrogen
FBS	PAA Laboratories
FCS Gold	PAA Laboratories
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
HBSS	PAA Laboratories
HEPES	Carl Roth
iQ Multiplex 2000 Reagent	Bio Rad
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kollagen I-Lösung aus Rinderhaut	BD Biosciences
Lipofectamin 2000 Reagent	Invitrogen
Lipofectamin RNAiMax Reagent	Invitrogen
Methanol	ROTH
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
Natriumhydrogenphosphat	AppliChem
NCS (Newborn Calf Serum)	PAA Laboratories
PageRuler Plus Protein Ladder	Thermo Scientific

Penicillin/Streptomycin	Invitrogen / GIBCO
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	ROTH
Phenylephrin	Sigma-Aldrich
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat (Bradford)	BioRad
Puffer BamHI	Thermo Scientific
Puffer Orange	Thermo Scientific
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
SDS	Serva Electrophoresis
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
TEMED	ROTH
Tris-Base	ROTH
Tris-HCl	ROTH
Triton X	Serva Electrophoresis
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Vectashield HardSet Mounting Medium	Vecta-Labs

2.1.3. Enzyme

Age I	Thermo Scientific
BamHI	Thermo Scientific
BP-Klonase II	Invitrogen
Complete-Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma-Aldrich
DreamTag DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Ecol	Thermo Scientific
Kollagenase Typ 2	Worthington/Cellsystems
LR-Klonase II	Invitrogen
Pankreatin	Thermo Scientific
Pac I	Biolabs
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Phusion Hotstart DNA-Polymerase	Thermo Fischer Scientific

Proteinase K	Invitrogen
Sacl	Thermo Scientific
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Trypsin-EDTA-solution	Invitrogen/GIBCO

2.1.4. Kits

ECL-Select Detektionssystem	GE Healthcare
Neonatal Heart Dissociation Kit, mouse and rat	MACS Miltenyi Biotech
Nucleo Spin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix	Invitrogen
QIAGEN PLUS Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Superscript III First Strand Kit	Invitrogen

2.1.5. Oligonukleotide

Tabelle 2-1: Primer-Sequenzen für Klonierungen und Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
Col_mOCC_F	GTC CAA CAG GAG CAG TTA AAG
GW-TurboGFP_F	GCC ATG CAT TAG TTA TTA GCC
GW-TurboGFP_R	TCT ACA AAT GTG GTA TGG CTG
mOcc-Sacl-C_F	GAG AGA GCT CCA ATG GGT TGC GGG AAC TCC
mOcc-BamHI-C_R	GAG AGG ATC CCT AAT TCT TCT GTA CAG TCT TTG
mOcc-EcoRI-N_F	GAG AGA ATT CGC CAC CAT GGG TTG CGG GAA CTC C
mOcc-AgeI-N_R	GAG AAC CGG TGG ATT CTT CTG TAC AGT CTT TGT TTG
AK005538_attb1 (1700123M08Rik)	CT GGC ACC ATGGGC GCT CCC CGC CAG TTT
AK005538_attb2 (1700123M08Rik)	GC TGG GTC GCC TCA GCA CAA AGC GCATCTTTATTG
AK002304_attb1 (Snhg18))	GCT GGC ACC ATGGTC CTC TAG CCC CGC CTC T
AK002304_attb2 (Snhg18)	GC TGG GTC GCC TCA AGA TTT CTA GAA TGC TTT AAT TTC TG
attb1 Adapter	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC TGG ACC
attb2 Adapter	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GCC

Tabelle 2-2: Primer-Sequenzen für die quantitative RealTime-PCR

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
Linc1_02_f (OCC-1)	GAGGTCCAGAGCGCGGCTT
Linc1_02_r (OCC-1)	CAGCTTCAGAGGGCAGGCCAA
NR_002847_F1 (Malat-1)	CTCGCCAGGTTTACAGTTTG
NR_002847_R1 (Malat-1)	CTCCCTGTTAAGACCACTCC
NR_024720/2_F3 (2700099C18Rik)	AAGCTGAGCGAAAGATATCCC

NR_024720/2_R3 (2700099C18Rik)	AGCTGCCCATCATCAAATAAAG
NR_028261_F1 (RIAN)	AAGTCACCATGGAGAACCAG
NR_028261_R1 (RIAN)	TTCAGGGTGGCAGTAAGATG
NR_033510/1_F3 (Hectd2os)	TCCTGACAGCTGTGATAGCG
NR_033510/1_R3 (Hectd2os)	AGCCCCAAAGAGCAAGTACC
NR_038041_F2 (Myoregulin)	CTGAACATGAGTGGCAAGAG
NR_038041_R2 (Myoregulin)	TGGTTTGAACTTACACACGG
NR_038186_F1 (Snhg18)	GCTACTTTCAGGATGGGCT
NR_038186_R1 (Snhg18)	ACAATCGTGGGAACCAGAGG
NR_040577_F2 (1700123M08Rik)	CAGTAGTCTCTGGACCCCA
NR_040577_R2 (1700123M08Rik)	GCAAATGCACAAAGCGCATC
Rpl32_mmu+rno_165_F	GGTGGCTGCCATCTGTTTTAC
Rpl32_mmu+rno_165_R	CCGCACCCTGTTGTCAATGC

Tabelle 2-3: Primer-Sequenzen der Multiplex-PCR für Hypertrophie-assoziierte Gene

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
Nppa_mmu+rno_F	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG
Nppa_mmu+rno_R	ACCTCATCTTCTACCGGCAT
Nppa_mmu+rno_PRB	FAM-TGATGGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA-BHQ1
Nppb_mmu_F	ACAAGATAGACCGGATCGGA
Nppb_mmu_R	AGCCAGGAGGTCTTCCTACA
Nppb_mmu_PRB	HEX-TCAGTGC GTTACAGCCCAAACGA-BHQ1
Nppb_rno_F	AGAAGATAGACCGGATCGGC
Nppb_rno_R	AGCCACGCAG GTCTTCCTAAA
Nppb_rno_PRB	HEX-TCAGCCCGTCACAGCCCAAAGCGA-BHQ1
Rcan1_mmu+rno_F	TAGCTCCCTGATTGCTTGTG
Rcan1_mmu+rno_R	GGATTCAAATTTGGCCCTGG
Rcan1_rno_PRB	Cy5.5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-Eclipse
Rcan1_mmu_PRB2	Cy5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-BHQ2
Rpl32_mmu+rno_F	CTGCTGATGTGCAACAAATCT
Rpl32_mmu+rno_R	GCTGTGCTGCTCTTTCTACAAT
Rpl32_mmu+rno_PRB	Texas Red-ACTGTGCTGAGATTGCTCACAATGTGT-BHQ2

2.1.6. Antikörper

Tabelle 2-4: Primärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenzzytologie

Bezeichnung	Spezies	Klasse	Isotyp	Einsatz	Hersteller
Anti- α -Actinin	Maus	monoklonal	IgG	IF 1:200	Sigma-Aldrich
Anti-OCC1 ab177759	Kaninchen	polyklonal	IgG	WB: 1:1000	Abcam
Anti-OCC1 PA5-20673	Kaninchen	polyklonal	IgG	WB: 1:1000	Invitrogen
Anti- α -Tubulin	Maus	monoklonal	IgG	WB: 1:5000	Sigma

Tabelle 2-5: Sekundärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie

Bezeichnung	Einsatz	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG AF546-konjugiert	IF 1:200	Life Technologies
Anti-Kaninchen-IgG HRP-konjugiert	WB: 1:5000	Santa Cruz
Anti-Maus-IgG AF488-konjugiert	IF: 1:200	Life Technologies

Anti-Maus-IgG HRP-konjugiert	WB: 1:5000	Santa Cruz
------------------------------	------------	------------

2.1.7. Vektoren und Plasmide

Tabelle 2-6: Vektoren für Gateway-Klonierungen

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
pDONR™221	Donorvektor mit attP1 und attP2-Stellen	Invitrogen
pDNA™-DEST40	Zielvektor mit CMV-Promotor, His-Tag (6x) und V5-Tag	Invitrogen
pAD/CMV/v5-Dest™	Zielvektor mit CMV-Promotor und V5-Tag zur Herstellung von Adenoviren	Invitroge
Gateway TurboGFP-C Entry Clone	Entryvektor mit N-terminalen GFP-Tag	evrogen

Tabelle 2-7: Plasmide zur die Transfektion von NMCM

Bezeichnung	Beschreibung
pcDNA-DEST40-negativ	Expressionskonstrukt, Negativkontrolle
pcDNA-DEST40-Snhg18	Expressionskonstrukt zur Überexpression von Snhg18
pcDNA-DEST40-1700123M08Rik	Expressionskonstrukt zur Überexpression von 1700123M08Rik

2.1.8. Adenovirale Konstrukte

Tabelle 2-8: Adenoviren zur Infektion von NRVCM

Bezeichnung	Beschreibung
AdlacZ	Viruskonstrukt, Negativkontrolle
AdAK012407	Viruskonstrukt zur Überexpression von AK012407
AdOCC-1	Viruskonstrukt zur Überexpression von OCC-1
AdNGFP-OCC-1	Viruskonstrukt mit N-terminalen GFP-Tag

2.1.9. SiRNA und Gapmer

Tabelle 2-9: Silencer®Select Predesigned siRNAs zur Transfektion von NMCM

Bezeichnung	Hersteller
Silencer®Select Predesigned Negative Control No.1 siRNA	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA n257990 (RIAN #1)	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA n257983 (RIAN #2)	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA n255846 (Snhg18 #1)	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA n255845 (Snhg18 #2)	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA n401502(Hectd2os)	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA n420682 (1700123M08Rik #1)	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA n420691 (1700123M08Rik #2)	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA s88226 (OCC-1 #1)	Ambion
Silencer®Select Predesigned siRNA s88228 (OCC-1 #2)	Ambion

Tabelle 2-10: LNA longRNA Gapmers zur Transfektion von NMCM

Bezeichnung	Hersteller
LNA longRNA Gapmer negative control A	Exiqon

2.1.10. Puffer und Lösungen

- **ADS-Puffer**

1,16 M NaCl

197 mM HEPES

94 mM NaH₂PO₄ • H₂O

55.5 mM Glucose

53.6 mM KCl

8,3 mM MgSO₄, pH7,4, steril filtriert

- **Kern-Lyse-Puffer**

20 mM Tris pH8

12,5 % (v/v) Glycerol

10 mM DTT

1% (v/v) NP-40

500 mM NaCl

zu 1 ml KLP sind kurz vor Gebrauch folgende Enzyme hinzuzufügen:

40 µl Complete Protease-Inhibitor-Cocktail

10 µl Phosphatase-Inhibitor 2

10 µl Phosphatase-Inhibitor 3

10 µl 1M DTT

- **Laemmli-Puffer (4x)**

250 mM Tris, pH 6,8

5 % SDS

40 % Glycerin

0,005 % Bromphenol blau

10 % 2-Mercaptoethanol

- **Laufpuffer, SDS-Page (10x)**

250 mM Tris

1,9 M Glycin

- **Sammelgelpuffer**

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

- **SNET-Puffer**

20 mM Tris-HCl, pH 8,0

5 mM EDTA, pH 8,0

400 mM NaCl

1 % SDS

- **TAE-Puffer**

3 M Tris-Acetat

0,05 M EDTA

pH 8,3

- **TBS**

100 mM Tris-Cl, pH 7,5

0,9 NaCl

- **Transferpuffer (10x)**

20 % Methanol

25 mM Tris

192 mM Glycerin

0,037 % SDS

- **Trenngelpuffer**

1,5 M Tris, pH 8,8

- **Trypsin-EDTA**

0,25 % Trypsin

0,053 mM EDTA in PBS

2.1.11. Nährmedien

- **LB-Medium (Luria-Bertani)**

1 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1% NaCl

Titration bis pH 7,0 mit NaOH

- **Wachstumsmedium (NRVCM und NMCM)**

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

10% FCS Gold

100 u/l Penicillin G

100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

- **Transfektionsmedium (NMCM)**

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

2 mM L-Glutamin

- **Infektionsmedium (NRVCM)**

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

100 u/l Penicillin G

100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

- **Wachstumsmedium (HEK293-A)**

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

10% FCS Gold

100 u/l Penicillin G

100 µg/ml Streptomycin

4 mM L-Glutamin

2.1.12. Bakterien

E.coli DH10B, elektrokompetent

Life-Technologies

2.1.13. Zelllinien

HEK293-A

HEK293-A sind ein Transformationsprodukt aus humanen embryonalen Nierenzellen und Adenovirus Typ V. Durch die stabile Expression des E1-Gens sind die Zellen befähigt aus Plasmiden rekombinante Adenoviren herzustellen.

NMCM

Neonatale Mauskardiomyozyten sind eine Primärkultur aus Kardiomyozyten von ein bis drei Tage alten Mäusen. Die Herstellung und Kultivierung von NMCM wird im Methodenteil beschrieben.

NRVCM

NRVCM sind eine Primärkultur aus ventrikulären Kardiomyozyten von ein bis drei Tage alten Ratten. Die Herstellung und Kultivierung von NRVCM wird im Methodenteil beschrieben.

2.1.14. Versuchstiere

Neugeborene Ratten für die Gewinnung von NRVCM

Adulte Ratten vom Wistar-Stamm wurden von Charles River Laboratories bezogen und in der Zentralen Tierhaltung des UKSH gezüchtet. Postnatal wurden die neugeborenen Ratten von der Mutter getrennt und getötet.

Neugeborene Mäuse für die Gewinnung von NMCM

Adulte Mäuse vom C57BL/6-Stamm wurden ebenfalls von Charles River Laboratories bezogen und in der Zentralen Tierhaltung des UKSH gezüchtet. Im Alter von ein bis drei Tagen wurden die neugeborenen Mäuse von der Mutter getrennt und getötet.

Adulte Mäuse vom C57BL/6-Stamm

Vor und während der Tierversuche waren die Mäuse in den Anlagen der Zentralen Tierhaltung des UKSH untergebracht.

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Herstellung von elektrokompetenten Bakterien

Die Zellmembran von elektrokompetenten Bakterien kann durch ein elektrisches Feld vorübergehend permeabilisiert werden und ermöglicht so die Aufnahme von Plasmiden in das Bakterium. Zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurden zunächst 50 ml LB-Medium mit E.coli DH10B versetzt und über Nacht bei 37°C 200 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur mit einem Liter vorgewärmten LB-Medium auf einen OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und erneut bei 37°C 200 rpm inkubiert. Sobald ein OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,8 gemessen wurde, wurde die Bakteriensuspension in einem Eiswasserbad heruntergekühlt und anschließend bei 4°C für 15 min bei 11000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde nun zweimal mit eisgekühlten ddH₂O gewaschen und zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in 250 ml 10% Glycerol in ddH₂O wurde die Suspension in 50µl Tubes aliquotiert und sofort bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 3 Aliquots separat mit einem Kontrollplasmid transformiert und 1/100 des Transformationsansatzes auf einem mit Carbenicillin versetzten Nährboden ausgestrichen. Am darauffolgenden Tag wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien gezählt.

2.2.2. Elektroporation

Für die Transformation mit Plasmiden durch Elektroporation wurden elektrokompetente E. coli für 5 min auf Eis aufgetaut. Eine Elektroporationsküvette, ein 2 ml Reaktionsgefäß, LB-Medium sowie das Plasmid wurden ebenfalls auf Eis bereitgestellt. Nun wurden 5 ng des Plasmids zu den aufgetauten Bakterien gegeben und nach Mischen durch sanftes Auf- und Abpipettieren in die Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Anschließend wurde der Ansatz in 1 ml LB-Medium aufgenommen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß für eine Stunde bei 37°C 400 rpm inkubiert. Je nach erwarteter Transformationseffizienz wurde ein angemessenes Volumen des Ansatzes auf einem Selektivnährboden ausgestrichen.

2.2.3. Herstellung von Selektivnährböden

Ein LB-Medium wurde mit Zusatz von 1,5% Agar hergestellt und autoklaviert. Anschließend wurde das Medium in einem Wasserbad auf etwa 55°C heruntergekühlt und mit einem Antibiotikum versetzt. Carbenicillin wurde mit einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt, Kanamycin und Spectinomycin mit einer Konzentration von 50 µg/ml. Unter einer Sterilbank

wurde die Lösung auf 10 cm Petrischalen verteilt. Nach dem Abkühlen wurden die Agarplatten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.4. Anzucht von Bakterien auf Selektivnährböden

Mit Hilfe von 3 bis 4 sterilen Kügelchen wurden die transformierten Bakterien auf der Agarplatte verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze geerntet und in eine Flüssigkultur überführt werden.

2.2.5. Anzucht von Bakterien in der Flüssigkultur

Entsprechend der Resistenzkassette des Plasmids wurde ein gewünschtes Volumen LB-Medium mit einem Antibiotikum versetzt und anschließend mit einer einzelnen Bakterienkolonie oder einem kleinen Volumen einer Bakteriensuspension angeimpft. Es folgte die Inkubation der Kultur bei 37°C 200 rpm über Nacht.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultur von Säugetierzellen

Die Kultivierung von Säugetierzellen erfolgte in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂. Alle Arbeitsschritte wie Ausplattierung, Infektion oder Transfektion von Zellen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurden für Zellenlinien und Primärkulturen unterschiedliche Sterilbanken verwendet.

2.3.2. Kollagenisierung

Für die Kultivierung von Ratten- und Mauskardiomyozyten wurden mit Kollagen Typ I beschichtete Kulturgefäße verwendet. Dazu wurde zunächst eine Lösung aus Kollagen Typ I und 0,01 M Salzsäure hergestellt. Die Lösung wurde nun auf die Kulturgefäße aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Kulturplatten zwei Mal mit ddH₂O gewaschen und bei 37°C getrocknet.

2.3.3. Präparation von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRVCM)

Zur Gewinnung von neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden ein bis drei Tage alte Ratten von Wistar-Stamm verwendet.

Nach Desinfektion des Kopfes und Brustkorbs mit 70% Ethanol wurden die Ratten durch Dekapitation getötet. Der Thorax wurde durch einen Längsschnitt eröffnet und das Herz mit Schere und Pinzette extrahiert. Die entnommenen Herzen wurden in eiskalten ADS-Puffer gesammelt. Unter einer sterilen Werkbank wurden die Ventrikel nun von überschüssigem

kardialem Gewebe befreit und mit einer Schere zerkleinert. Im Anschluss wurde das Gewebe in eine Verdauungslösung aus ADS-Puffer, Pankreatin (0,6 mg/l) und Kollagenase Typ II (0,5 mg/l) überführt, auf 75 cm² Kulturflaschen verteilt und für 20 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Es folgen drei bis vier Verdauungsschritte bis das Gewebe vollständig zersetzt war. Nach dem ersten Verdauungsschritt wurde der Überstand verworfen, das Gewebe mit frischer Verdauungslösung versetzt und erneut bei 37°C für 20 min inkubiert. Ab dem zweiten Verdauungsschritt wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer 25 ml Pipette versucht Kardiomyozyten aus den Gewebestücken zu lösen. Der Überstand wurde abgenommen und durch einen Sterilfilter in ein 50 ml Tube gegeben. Anschließend wurden 10 ml NBCS (New Born Calf Serum) durch den Sterilfilter zugefügt um letzte Kardiomyozyten aus dem Filter zu lösen und die Enzyme in der Verdauungslösung zu deaktivieren. Die Zellsuspension wurde nun bei Raumtemperatur und 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden anschließend in 10 ml NBCS resuspendiert und in einem 50 ml Tube gesammelt. Währenddessen wurde das in der 75 cm² Flasche verbliebene Gewebe mit frischer Verdauungslösung versetzt und erneut bei 37°C inkubiert. Nach dem letzten Verdauungsschritt wurde die gesammelte Zellsuspension erneut bei 1000 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und anschließend in einfach konzentrierten ADS-Puffer resuspendiert.

Um die isolierten Kardiomyozyten von Fibroblasten und Erythrozyten zu separieren, wurde ein Percollgradient verwendet. Der Gradient ermöglicht die Auftrennung der Zellsuspension nach Dichte. Zur Herstellung des Gradienten wurde zunächst eine Stammlösung aus 27 ml Percoll und 3 ml zehnfach konzentrierten ADS-Puffer hergestellt. Aus 9 ml Stammlösung und 11 ml einfach konzentrierten ADS-Puffer und Phenolrot wurde eine obere Phase mit niedriger Dichte erstellt. Für die untere Phase mit hoher Dichte wurden 13 ml Stammlösung und 7 ml einfach konzentrierter ADS-Puffer verwendet. Nun wurden 4 ml der oberen Phase in ein 15 ml Tube vorgelegt und anschließend 3 ml der unteren Phase vorsichtig durch die obere Phase auf den Boden des Tubes pipettiert. Anschließend wurden 2 ml Zellsuspension auf dem Gradienten gegeben und für 30 min bei 2400 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sammelten sich die Fibroblasten zwischen oberer und mittlerer Phase, die Kardiomyozyten zwischen mittlerer und unterer Phase und die Erythrozyten am Boden des Gefäßes (Iwaki, Sukhatme et al. 1990).

Die Kardiomyozyten wurden in ein 50 ml Gefäß überführt und in einfach konzentrierten ADS-Puffer resuspendiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min. Im Anschluss wurde das Zellpellet in einer angemessenen Menge Wachstumsmedium aufgenommen. Zum Auszählen wurden 150 µl Suspension mit 150 µl Trypanblau versetzt. Nun wurden 10 µl der Lösung in eine Neubauerzählkammer eingebracht und die ungefärbten Kardiomyozyten ausgezählt. Im Anschluss wurden die Zellen auf kollagenisierte Kulturgefäße verteilt und bei 37°C inkubiert. Die Zahl der ausplattierten Kardiomyozyten variierte je nach Verwendungszweck (siehe Tabelle 2-11).

Tabelle 2-11: Ausplattierung NRVCM

Verwendungszweck	Kulturgefäß	Zellzahl pro Well
Proteinisolation	6-Well-Platte	1 - 1,5 x 10 ⁶
RNA-Isolation	12-Well-Platte	0,3 - 0,5 x 10 ⁶
Immunfluoreszenz	12-Well-Platte mit Coverslips	0,1- 0,25 x10 ⁶

2.3.4. Infektion mit Adenoviren

Die Infektion mit Adenoviren erfolgte 24 Stunden nach der Ausplattierung der Zellen. Dazu wurde zunächst das serumhaltige Wachstumsmedium abgenommen und nach einmaligem Waschen mit warmen PBS durch ein serumfreies, virushaltiges Medium ersetzt. Für die Infektion mit AdlacZ, AdAK012407, AdOCC-1 sowie AdNGFP-OCC-1 wurde ein Verhältnis von Viruspartikeln zu Zielzellen von 25 moi gewählt. Die infizierten Kardiomyozyten wurden nun für weitere 72 Stunden inkubiert. Alle 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem serumfreiem Medium.

2.3.5. Stimulation von Kardiomyozyten mit Phenylephrin

Zur pharmakologischen Induktion einer Zellhypertrophie in NRVCM wurde der α_1 – Adrenorezeptor-Agonist Phenylephrin verwendet. Dazu wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert und 24 h und 48 h nach Infektion mit 100 µmol/l Phenylephrin versetzt.

2.3.6. Präparation von neonatalen Mauscardiomyozyten (NMCM)

Zur Herstellung von neonatalen Mauscardiomyozyten wurden ein bis drei Tage alte Mäuse sowie das Neonatal Heart Dissociation Kit von MACS Miltenyi Biotech verwendet.

Die Gewebeentnahme erfolgte analog zur Präparation der Rattenkardiomyozyten. Die entnommenen Herzen wurden in eiskalten HBSS gesammelt. Unter einer Sterilbank wurden Vorhöfe, Gefäße und Lungengewebe vom Ventrikel entfernt. Der Ventrikel wurde anschließend mit einer Schere zerkleinert. In der Zwischenzeit wurde eine Verdauungslösung mit dem Neonatal Heart Dissociation Kit vorbereitet. Nach Herstellerangaben werden zum Verdau von 16 - 40 Herzen 10 ml des Verdauansatzes benötigt. Dazu wurden zunächst zwei Enzymansätze hergestellt: Enzymmix I aus 250 µl Enzym P und 9200 µl Puffer X sowie Enzymmix II aus 50 µl Enzym A, 400 µl Enzym D und 100 µl Puffer Y. Nun wurden die beiden Enzymansätze vermischt und gemeinsam mit dem Gewebeansatz in einen Erlenmeyerkolben überführt. Der Erlenmeyerkolben wurde nun mit einem Stopfen verschlossen und bei 37°C und 160 rpm für 45 min in einem Wasserbad inkubiert. Nach 20 min Inkubation wurde der Verdauansatz einmalig für 60 s mittels Vortex vermischt. Um verbleibende Gewebereste nach Abschluss des Verdauens zu zerkleinern, wurde der Ansatz mehrfach in einer 10 ml Pipette auf- und abpipettiert. Im Anschluss wurde die Verdauungslösung über ein steriles 70 µm Zellsieb (cell strainer) in ein 50 ml Tube filtriert. Zur Inaktivierung der Verdauungsenzyme wurde der Ansatz mit 10 ml FCS versetzt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 600 rpm. Der Überstand wurde in ein 50 ml Tube überführt und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellpellets in jeweils 12 ml Wachstumsmedium aufgenommen und in einem 50 ml Tube vereint. Um die Kardiomyozyten von den Fibroblasten zu separieren wurde die Zellsuspension in eine 175 cm² Flasche überführt und für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation hafteten die Fibroblasten am Boden der Flasche. Die Kardiomyozyten hingegen befanden sich weiterhin in Suspension und wurden in ein 50 ml Gefäß überführt. Die Flasche wurde vorsichtig mit 10 ml Wachstumsmedium gespült und die Spüllösung der Zellsuspension zugefügt. Diese wurde nun für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein 50 ml Gefäß überführt und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets wurden nun einem angemessenen Volumen Wachstumsmedium aufgenommen, dem der Cytosine β-D-Arabinofuranoside zugefügt wurde. Durch den Zusatz von Cytosine β-D-Arabinofuranoside konnte das Wachstum der in der Suspension verbliebenen Fibroblasten gehemmt werden. Die Kardiomyozyten wurden nun mit Hilfe einer Neubauerzählkammer und Trypanblau ausgezählt und im Anschluss auf kollagenisierte Kulturgefäße ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der Zellen pro Well variierte je nach Verwendungszweck (siehe Tabelle 2-11).

2.3.7. Transfektion von Plasmiden in NMCM

Das Einschleusen von genetischem Material in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. In dieser Arbeit wurde die liposomale Transfektion zum Einbringen von Plasmiden, Antisenseoligonukleotiden und siRNAs in neonatale Mauskardiomyozyten verwendet. Dabei bildet das negativ-geladene genetische Material Komplexe mit positiv-geladenen Lipidvesikeln, welche mit der Zellmembran fusionieren können und so das genetische Material in das Innere der Zelle transportieren.

Als Transfektionsreagenz für das Einbringen von Plasmiden in NMCM wurde Lipofectamin 2000 verwendet. Dazu wurden Kardiomyozyten auf 12-Well-Platten ausplattiert. Nach 24 h wurde das Wachstumsmedium der NMCM gegen ein Transfektionsmedium ausgetauscht, das weder Antibiotika noch FCS enthielt. Anschließend wurden ein Lipofectamin- und ein Plasmidansatz vorbereitet. Für den Lipofectaminansatz wurden pro Well einer 12-Well-Platte 75 µl Transfektionsmedium mit 5 µl Lipofectamin 2000 versetzt. Der Plasmidansatz enthielt pro Well 1 µg Plasmid in 75 µl Transfektionsmedium. Die beiden Ansätze wurden nun in einem 5 ml Reaktionsgefäß vereint und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden je 150 µl des Ansatzes auf die Wells verteilt. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektion.

2.3.8. Expressionshemmung durch RNA-Interferenz

RNA-Interferenz bezeichnet das zielgerichtete Stilllegen von Genen durch Wechselwirkungen zwischen kleinen RNA-Fragmenten und mRNA in eukaryotischen Zellen. Zu diesen kleinen RNA-Fragmenten zählen neben miRNAs die siRNAs. Dabei handelt es sich um 20-25 Basenpaare lange RNA-Moleküle, die komplementäre einzelsträngige RNA-Moleküle binden und durch Bildung des sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC) abbauen. Durch die Transfektion von siRNAs können die oben genannten Prozesse zur funktionellen Charakterisierung der Ziel-RNA genutzt werden. Die Transfektion von siRNA in NMCM erfolgte analog zur Transfektion von Plasmiden. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin RNAiMax verwendet. Pro Well einer 12-Well-Platte wurden 5 µl Lipofectamin RNAiMax sowie 50 pmol der siRNA eingesetzt.

2.3.9. Expressionshemmung mit GapmeRs

GapmeRs sind Antisenseoligonukleotide, die zur Inhibition von mRNA und langen nicht-kodierenden RNAs eingesetzt werden. Sie bestehen aus einem Einzelstrang aus 16

Nukleotiden und führen nach komplementärer Bindung zum RNase H vermittelten Abbau der Ziel-RNA. Die Transfektion von GapmeRs wurde wie oben beschrieben mit RNAiMax durchgeführt. Dabei wurden pro Well einer 12-Well Platte 5 µl Lipofectamin RNAiMax sowie 50 pmol der Gapmer eingesetzt.

2.4. Molekularbiologische Methoden – DNA

2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA – Mini-Präparation

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus prokaryotischen Zellen im kleinen Maßstab wurde das NucleoSpin Plasmid Kit von Machery-Nagel verwendet. Dazu wurden zunächst 5 ml einer Flüssigkultur bei 11000 g für 1 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand möglichst vollständig abgenommen wurde, folgte die Resuspension des Pellet in A1 Puffer. Anschließend wurde Lysepuffer A2 zugefügt und der Ansatz nach vorsichtigem Invertieren für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des neutralisierenden Puffers A3 wurde die Lösung für 5 min bei 11000 g zentrifugiert um die ausfallende chromosomale DNA von der Plasmid-DNA zu trennen. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin Plasmidsäule überführt und 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe bei 11000 g mit 60°C warmen AW-Puffer und A4 Puffer. Anschließend wurde die Siliciamembran durch erneute Zentrifugation bei 11000 g für 2 min getrocknet und von Resten des ethanolhaltigen Waschpuffers befreit. Zum Eluieren der DNA wurden nun 50 µL AE Buffer (70°C) auf die Plasmidsäule gegeben, für mindestens 1 min bei 70°C inkubiert und dann für 1 min bei 11000 g zentrifugiert.

2.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA – Midi-Präparation

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus prokaryotischen Zellen im großen Maßstab wurde das QIAGEN PLUS Plasmid Midi Kit verwendet. Dazu wurden zunächst 25 bis 100 ml einer Flüssigkultur durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 6000 g geerntet und das Pellet in P1 Puffer resuspendiert. Nun wurde der Lysepuffer P2 zugegeben und die Lösung durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Die Lysereaktion wurde für höchstens 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des neutralisierende Puffers S3 wurde das Lysat in einer Filterkartusche überführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefallenen weißlichen Flocken aus genomischer DNA, Proteinen und Zellüberresten wurden nun durch den Filter von der Plasmid-DNA getrennt. Das Filtrat wurde mit BB Puffer versetzt und auf eine Plasmidsäule überführt. Die Plasmid-DNA band an die Membran, während die Lösung durch einen Unterdruck von etwa 300 mbar durch die Plasmidsäule floss.

Ebenfalls bei Unterdruck folgten zwei Waschschriffe mit ETR und PE Puffer. Um letzte Reste des ethanolhaltigen Waschpuffers zu entfernen, wurde die Plasmidsäule für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 200 µl EB-Puffer durch mindestens einminütige Inkubation und nachfolgender Zentrifugation eluiert.

2.4.3. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach molekularer Größe. Die negativgeladene DNA bewegt sich zur Anode, wobei kleinere Fragmente sich schneller bewegen als größer. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden 1 bis 2%ige Agarosegele hergestellt. In einer Mikrowelle wurde dazu 1-2% Agarose in TAE-Puffer geschmolzen, nach kurzem Abkühlen auf etwa 60°C mit Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Um Taschen für die Proben zu schaffen wurde ein Kamm in die flüssige Lösung eingebracht. Nachdem sich das Gel verfestigt hatte, wurde es in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und der Kamm entfernt. Im Anschluss wurden die mit Ladepuffer versetzten Proben sowie ein DNA-Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit einem UV-Transluminator fotografiert.

2.4.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Synthetische Oligonukleotide (Primer) hybridisieren an der Temple-DNA und dienen als Startmoleküle für die Synthese eines neuen DNA-Doppelstrang durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. So kann gezielt eine zwischen zwei gegenläufig orientierten Primern gelegene DNA-Sequenz amplifiziert werden. Je nach Länge, GC-Gehalt des DNA-Fragments und geforderter Genauigkeit des PCR-Produkts wurde eine geeignete DNA-Polymerase ausgewählt. Als Template wurden Plasmid-DNA und cDNA eingesetzt. Tabelle 2-1 zeigt alle für diverse PCR-Ansätze und anschließende Sequenzierung verwendeten Primer.

2.4.5. DNA-Extraktion aus Agarosegel

Zur Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wurde das QIAquick Gelextraktion Kit verwendet. Zunächst wurde die gewünschte Bande unter einem UV-Transluminator vollständig ausgeschnitten und das Gelfragment gewogen. Je 100 mg Gelfragment wurden 300 µl QC Puffer eingesetzt. Nun wurde das Gelfragment im entsprechenden Volumen QC Puffer bei 55°C inkubiert. Sobald sich das Fragment vollständig verflüssigt hatte, wurde die

Lösung in 750 µl Schritten auf eine Plasmidsäule gegeben und bei 18000 g zentrifugiert. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils einminütiger Zentrifugation: ein Waschschriff mit frischen QC Puffer, gefolgt von zwei Waschschriffen mit ethanolhaltigen PE Puffer. Die Siliciamembran wurde im Anschluss durch erneute Zentrifugation bei 18000 g für 2 min getrocknet und von Waschpufferresten befreit. Die Elution der DNA erfolgte mit 22 µl EB Puffer durch einminütige Inkubation bei Raumtemperatur und nachfolgender Zentrifugation.

2.4.6. Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA erfolgte mit dem NanoDrop Photospektrometer durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsmittels konnte so die DNA bzw. RNA-Konzentration bestimmt werden. Die Messung wurde in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt, aus denen ein Mittelwert ermittelt wurde.

2.4.7. Restriktionsverdau

Bakterielle Restriktionsendonukleasen ermöglichen die sequenzspezifische Spaltung von DNA. Sie sind in der Lage palindromische Doppelstrangsequenzen zu erkennen und die DNA an dieser Stelle durch Hydrolyse der Phosphodiesterbrücken zu spalten. Je nach Restriktionsenzym entstehen Enden ohne Überhang (blunt ends) oder mit Überhang (sticky ends).

Zum Verdau von 1,5 µg DNA wurden zwischen 10 und 20 U des Restriktionsenzym eingesetzt. Der Ansatz enthielt zudem 5 µl eines speziell auf das Restriktionsenzym angepassten Puffers und wurde mit dH₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen musste die eingesetzte Menge des Restriktionsenzym erhöht werden, für welches die Bedingungen nicht optimal waren. Der Ansatz wurde für 90 min bei 37°C inkubiert.

Mittels Gelelektrophorese konnte der Erfolg des Restriktionsverdaus überprüft werden. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Produkts mittels Gelextraktion.

2.4.8. Ligation

Ligation bezeichnet das enzymatische Zusammenfügen von DNA-Fragmenten mit komplementären Enden. Für die Ligation von Restriktionsfragmenten wurde die T4-Ligase

verwendet. Die Ligase ist in der Lage ein 5'Phosphat-Ende mit einem 3'Hydroxy-Ende durch eine Phosphodiesterbrücke zu verbinden.

Der Reaktionsansatz umfasste 2 µl T4 Ligase Puffer, 1U T4 Ligase, 100 ng Vektor und ein DNA-Insert im 3-fachen Überschuss und wurde mit dH₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und konnte nach zehnmütiger Inaktivierung bei 65°C zur Transformation eingesetzt werden.

2.4.9. Klonierung mit Gateway-Technologie

Die Gateway Technologie nutzt das reversible Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ zum Austausch von DNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Vektoren. Der Phage λ ist in der Lage seine DNA zwischen zwei spezifischen Sequenzabschnitten in das Genom von E.coli zu integrieren. Diese sogenannten *attachment sites* bestehen aus etwa 25 Basenpaaren und dienen als Bindungsstellen für die Rekombinationsenzyme.

Die Klonierung kann in zwei maßgebliche Schritte unterteilt werden: die Integration des Zielgens in einen Donor- oder Entryvektor und den Transfer des Zielgens in den Expressionsvektor.

Um das Zielgen in einen Donorvektor einzufügen müssen zunächst attB-Rekombinationsstellen an das Zielgen angefügt werden. Dazu wird das Zielgen in einer ersten PCR mit genspezifischen Primer amplifiziert, die zudem einen kurzen Abschnitt der attB-Sequenz enthalten. In einer zweiten PCR wird nun das Produkt der ersten PCR mit Primer amplifiziert, die die vollständige attB-Sequenz enthalten. Das Produkt wird zur Rekombination mit dem Donorvektor pDONR221 eingesetzt. Dazu wurden 100 ng PCR-Produkt, 150 ng Donorvektor und 2 µl BP-Klonase über Nacht bei 25°C inkubiert. Die BP-Klonase enthält Bakteriophage λ Integrase und E.coli Integrationsproteine (IFH) und katalysiert die Rekombination zwischen den attB-Stellen des PCR-Produkts und den attP-Stellen des Donorvektors. Das Selbstmordgen *ccdB* des Donorvektors wird so durch das Zielgen ersetzt, welches nun von zwei attL-Stellen flankiert ist. Eine weitere Option ist die Integration des Zielgens in einen Entryvektor mit attL Stellen mittels Restriktion und Ligation.

Im zweiten Schritt erfolgt nun die Integration des Zielgens in den Expressionsvektor mit Hilfe der LR-Klonase. Die LR-Klonase enthält zusätzlich zur Integrase und IFH das Enzym Exzisionase und ermöglicht die Rekombination der attL Stellen des Donor- oder Entryvektors mit den attR

Stellen des Expressionsvektors. Als Expressionsvektor wurde pcDNA-DEST40 oder pAD/CMV/V5-DEST ausgewählt. Es wurden 150 ng Donor- oder Entryvektor, 150 ng Expressionsvektor und 2 µl BP-Klonase über Nacht bei 25°C inkubiert.

Die hergestellten Plasmide wurden in E.coli transformiert und nach DNA-Isolation mittels Sequenzierung auf Mutationen geprüft. Die doppelte Selektion durch das Selbstmordgen *ccdB*, welches eine Hemmung der bakteriellen Gyrase vermittelt, sowie die im Vektor enthaltene Antibiotikaresistenzkassette trägt zur hohen Effizienz dieser Klonierungsmethode bei.

Exemplarisch für die verschiedenen Anwendungen der Gatewaytechnologie in dieser Arbeit ist das detaillierte Vorgehen zur Herstellung der Überexpressionskonstrukte für die langen nicht-kodierenden RNAs Snhg18 und 1700123M08Rik sowie die Herstellung des Adenoviruses AdNGFP-OCC-1 sind in Abschnitt 2.4.12 und 2.4.13 beschrieben.

2.4.10. Herstellung von Adenoviren

Zur Herstellung von adenoviralen Expressionskonstrukten wurde das Zielgen mit Hilfe der Gateway-Technologie in den adenoviralen pAD/CMV/V5-DEST-Zielvektor integriert. Nach PacI-Verdau wurde die gereinigte adenovirale DNA in HEK293A-Zellen transfiziert. Dazu HEK293A-Zellen auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Pro Well wurden 2 µg des PacI-verdauten Plasmid sowie 6 µl Lipofectamin 2000 für die Transfektion eingesetzt. HEK293-A Zellen enthalten regulatorische Gensequenzen, die den deletierten Adenoviren für die Replikation fehlen und ermöglichen so eine ausreichende Vermehrung der Adenoviren. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und in DMEM gefüllte 75 cm²-Flaschen überführt. Alle 2-3 Tage erfolgte eine morphologische Evaluation der Virusreplikation und ein Mediumwechsel mit frischen DMEM. Wenn die Zellen nahezu vollständig infiziert waren, im Mittel nach 10-14 Tagen, wurden die Zellen durch mechanisches Beklopfen der 75 cm²-Flasche inklusive Medium geerntet. Die Zellsuspension wurde nun in einem 15 ml Röhrchen für 15 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Während der virushaltige Überstand in ein 15 ml Tube überführt wurde, wurde das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Zum Freisetzen der enthaltenen Viren wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 30°C aufgetaut. Zum Abtrennen der Zellbestandteile folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde nun mit dem zuvor gewonnenen Überstand der Zellsuspension vereint. Um eine hochkonzentrierte Adenoviruslösung herzustellen, erfolgte die erneute

Infektion von HEK293-A Zellen. Dazu wurden pro Virus in zwei 175 cm² Flaschen HEK293-A Zellen ausgesät und bei Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz mit je 100 µl des Viruslysats beimpft. Nach etwa 2-3 Tagen war die maximale Infektionsrate der Zellen erreicht und es erfolgte die Ernte der Zellen mitsamt dem Medium durch mechanisches Beklopfen der 175 cm² Flaschen. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1,5 ml PBS resuspendiert. Nach dreimaligem Gefrieren in flüssigen Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 30°C erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C für 15 min. Der gewonnene Virusüberstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.4.11. Bestimmung der Infektiosität von Adenoviren

Als Maß für die Infektiosität eines Adenovirus wurde die Anzahl der infektiösen Viruspartikel oder „infectious units“ pro ml bestimmt (ifu/ml). Dazu wurden pro Virus-Konstrukt 12-Well mit je $0,3 \times 10^5$ HEK293-A Zellen auf einer 24-Well-Platte benötigt. Für jedes Virusaliquot wurde eine sechsstellige Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-7} mit DMEM hergestellt. Das erste Well wurde mit einer Negativkontrolle infiziert und das zweite Well mit 50 µl der 10^{-2} Verdünnung. Die restlichen Wells wurden mit je 50 µl der verbliebenen Verdünnungen in Duplikaten infiziert.

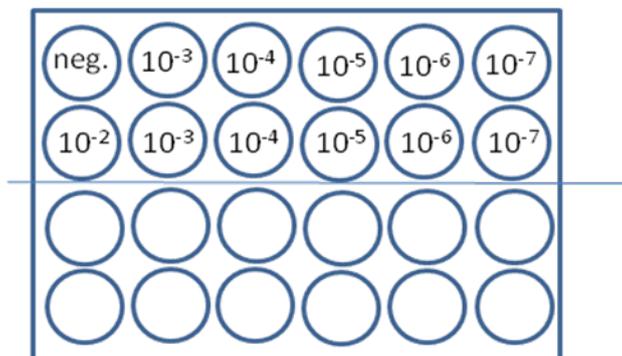


Abbildung 2-1: Pipettierschema für die Titerbestimmung von Adenoviren in HEK293A Zellen

Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit einem Lichtmikroskop betrachtet und das Well ausgewählt, welches noch genügend adhärente Zellen zum Auszählen der infizierten Zellen enthielt. Nun wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Dazu wurden die Zellen nach Abnehmen des Mediums für 5 min luftgetrocknet und anschließend für 10 min bei -20°C mit Methanol fixiert. Im Anschluss wurden die fixierten Zellen drei Mal mit 1% BSA in PBS gewaschen. Die zuvor ausgewählten Wells wurden nun mit 100 µl eines 1:50 in 1% BSA in PBS

verdünnten FITCH-gekoppelten Anti-Hexon-Antikörper für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1% BSA in PBS wurden die grün fluoreszierenden, infizierten Zellen bei 20-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Dabei wurde der Mittelwert aus den infizierten Zellen in 10 Gesichtsfeldern bestimmt und die Anzahl der infektiösen Viruspartikel anhand folgender Formel berechnet:

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

Der Mittelwert der infizierten Zellen pro Gesichtsfeld wurde mit dem Faktor 313 für die Anzahl der Gesichtsfelder pro Well multipliziert und anschließend durch das Produkt des Virusvolumens (0,05 ml) und der Virusverdünnung dividiert.

2.4.12. Klonierung der pcDNA-DEST40 Überexpressionskonstrukte für Snhg18 und 1700123M08Rik

Für die Klonierung der pcDNA-DEST40 Überexpressionskonstrukte für Snhg18 und 1700123M08Rik wurde die Gateway-Technologie verwendet. Wie zuvor beschrieben wurden dazu in einer ersten PCR attB-Verbindungsstellen an das Zielgen angefügt. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese verifiziert und nach Gelextraktion aufgereinigt. Anschließend wurde es als Template-DNA für eine zweiten PCR zur Vervollständigung der attB-Stellen eingesetzt. Für beide PCRs wurde die Phusion Hotstart DNA-Polymerase verwendet. Diese Polymerase zeichnet sich durch ihre hohe Spezifität sowie wie ihre 3'-5' Exonucleaseaktivität aus, die Mutationen im amplifizierten Produkt verhindert. Der Reaktionsansatz sowie das PCR-Protokoll wurden nach Herstellerangaben modifiziert und sind in Tabelle 2-12 und Tabelle 2-13 aufgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind Tabelle 2-1 zu entnehmen.

Tabelle 2-12: Reaktionsansatz für die Klonierungs-PCR mit der Phusion Hotstart DNA-Polymerase

Reagenz	Volumen für 50 µl Ansatz
ddH ₂ O	variabel
5x Phusion HF Buffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer A (10 µM)	1 µl
Primer B (10 µM)	1 µl
Template DNA	variabel (30 µg)
DMSO	1,5 µl
Phusion Hot Start DNA-Polymerase (2U/µl)	0,5 µl
	50 µl

Tabelle 2-13: PCR-Protokoll für die Klonierungs-PCR mit der Phusion Hotstart DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiales Denaturieren	98°C	30 s	1
Denaturieren	98°C	30 s	6
Annealing	60°C	10 s	(-1°C/Zyklus)
Elongation	72°C	2 min	
Denaturieren	98°C	30 s	24
Annealing	54°C	10 s	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlen	4°C	unbegrenzt	1

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mittels Gelextraktion aufgereinigt und für die BP-Reaktion mit dem Donorvektor pDONR221 eingesetzt. Der rekombinierte Donorvektor wurde durch Elektroporation in elektrokompetente E.coli DH10B transformiert. Nun wurden 100-300 µl der transformierten Bakterien auf einem Kanamycin-haltigen Nährboden ausgestrichen. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden mindestens 3 Klone isoliert und in Flüssigkulturen überführt. Am nächsten Tag wurde mit Hilfe des Nucleo Spin Plasmid Kits von Machery-Nagel die Plasmid-DNA isoliert und im Anschluss zur Sequenzierung an GATC Biotech gesendet. Nach Abgleich des Sequenzierungsergebnisses mit der Zielsequenz wurde die Plasmid-DNA zur LR-

Reaktion mit dem Expressionsvektor pcDNA-DEST40. Im Anschluss wurde der rekombinierte Expressionsvektor in elektrokompetente E.coli DH10B transformiert. Es folgte das oben beschriebene Ausstreichen der transformierten Bakterien, die Isolierung der Klone, die Anzucht in der Flüssigkultur sowie die Plasmid-DNA Isolierung und Sequenzierung. Nach erneutem Sequenzabgleich wurden Flüssigkulturen angesetzt und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAGEN PLUS Plasmid Midi Kits im großen Maßstab isoliert.

2.4.13. Klonierung des OCC-1 Adenovirus mit N-terminalen GFP-Tag

Für die Herstellung des in dieser Arbeit verwendeten OCC-1 Adenovirus mit N-terminalen GFP-Tag wurde mittels Restriktion und Ligation ein rekombinierter Entryvektor hergestellt, der in der LR-Reaktion eingesetzt werden konnte. Dazu wurde zunächst der offene Leserahmen der AK012407-Sequenz mit Hilfe der DreamTaq-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Gelextraktion erneut für die PCR eingesetzt. Reaktionsansatz und PCR-Protokoll sind Tabelle 2-14 und Tabelle 2-15 zu entnehmen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-1 zu finden.

Tabelle 2-14: Reaktionsansatz für die Klonierungs-PCR mit der DreamTaq DNA-Polymerase

Reagenz	Volumen für 50 µl Ansatz
ddH ₂ O	variabel
10 x DreamTaq Buffer	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Primer A (10 µM)	1 µl
Primer B (10 µM)	1 µl
Template DNA	variabel (30 µg DNA)
DreamTaq DNA-Polymerase	0,5 µl
	50 µl

Tabelle 2-15: PCR-Protokoll für die Klonierungs-PCR mit der DreamTaq DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiales Denaturieren	95°C	1 min	1
Denaturieren	95°C	30 s	30
Annealing	55°C	10 s	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlen	4°C	unbegrenzt	1

Anschließend wurden 5 µl des PCR-Produkts zur Verifikation auf ein Agarosegel aufgetragen, während der Rest mit Hilfe des Nucleo Spin Plasmid Kits von Machery-Nagel aufgereinigt wurde. Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt und der Gateway TurboGFP-C Entry Clone, welcher ein GFP-Tag am N-terminalen Ende des Zielgens anfügt zum Restriktionsverdau eingesetzt.

Tabelle 2-16: Restriktionsverdau mit BamHI und SacI

Restriktionsverdau PCR-Produkt		Restriktionsverdau Vektor	
PCR-Produkt	variabel (1,5 µg)	TurboGFP-C Entry Clone (1µg/µl)	1,5µl
10x BamHI Puffer	5 µl	10x BamHI Puffer	5 µl
BamHI (10U/µl)	1 µl	BamHI (10U/µl)	1 µl
SacI (10U/µl)	2µ	SacI (10U/µl)	2µ
ddH ₂ O	variabel	ddH ₂ O	10,5 µl
	20 µl		20 µl

Nach Inaktivierung des Verdau wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelextraktion aufgereinigt. Für die Ligation wurden nun das verdaute PCR-Produkt und der Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt.

Tabelle 2-17: Reaktionsansatz für die Ligation des PCR-Produkts und dem Gateway TurboGFP-C Entry Clone

Reagenz	Volumen für 20 µl Ansatz
T4 Ligase Puffer	2 µl
T4 Ligase (1U/µl)	1 µl
Vektor	variabel (100 ng)
PCR-Produkt	variabel (300 ng)
ddH ₂ O	variabel
	20 µl

Anschließend wurde der rekombinierte Entryvektor in elektrokompetente E.coli DH10B transformiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden mindestens 3 Klone isoliert und in eine Flüssigkultur überführt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits von Machery-Nagel isoliert und sequenziert. Nach erfolgreichem Sequenzabgleich wurde die Plasmid-DNA für die LR-Reaktion mit dem Expressionsvektor pAD/CMV/V5-DEST eingesetzt. Das weitere Vorgehen zur Herstellung eines Adenovirus ist in Abschnitt 2.4.10 beschrieben.

2.5. Molekularbiologische Methoden – RNA

2.5.1. RNA-Isolation aus der Zellkultur

Zur Isolation von RNA aus der Zellkultur wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit eiskalten PBS mit 1 ml QIAzol pro Well geerntet. Vorsichtiges Auf- und Abpipettieren trug dabei zur Lyse der Zellen bei. Anschließend wurde die Lösung mit 200 µl Chloroform versetzt und durch vortexen gemischt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 15000 g für 15 min trennte sich die wässrige RNA-haltige Phase von der Phenolphase. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Zum Fällern der RNA wurde die Lösung nun für 45 min oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4°C und 15000 g für 20 min sammelte sich ausgefallene RNA als durchsichtiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml 75% Ethanol und eine Zentrifugation bei 4°C und 15000 g für 5 min. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet für 5 bis 10 min an der Luft getrocknet. Nach Lösen der RNA in einem adäquaten Volumen

RNAse und DNAse freien Wasser erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Nanodrop Photospektrometers.

2.5.2. DNase Verdau

Zur Elimination von kontaminierender DNA erfolgte ein Verdau mit Desoxyribonuclease I. Dazu wurden 5 µg RNA in einem Volumen von 40 µl gelöst, mit je 5 µl DNase I Buffer und DNase I versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mit DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde nun mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und für 10 min bei 4°C und 17500 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstanden zwei Phasen. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl 99% Ethanol sowie 10 µl Natriumacetat versetzt. Zum Fällen der RNA wurde die Lösung nun für eine Stunde oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für eine Stunde bei 4°C und 17500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 4°C und 17500 g für 5 min wurde das Pellet für 5 bis 10 min luftgetrocknet. Die RNA wurde nun in einem adäquaten Volumen DEPC- Wasser gelöst. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration photometrisch mit Hilfe des Nanodrop Photospektrometers bestimmt.

2.5.3. Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription wurde die SuperScript III DNA-Polymerase verwendet. Zunächst wurden 1 µg RNA in einem Volumen von 11,5 µl DEPC Wasser gelöst, mit 250 ng Random Hexamer Primer und 0,5 µl 10 mM dNTPs versetzt und für 5 min bei 65°C im Thermocycler denaturiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix hergestellt, der pro Probe 4 µl 5x FS Buffer, 1 µl 0,1 mM DTT, 1 µl RNase Out RNase Inhibitor sowie 1 µl Superscript III DNA-Polymerase enthielt. Die denaturierte RNA wurde nun für 1 min auf Eis gelagert und anschließend mit 7 µl Mastermix pro Probe versetzt. Die Reverse Transkription erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: 10 min bei 25°C, gefolgt von 60 min bei 50°C und 15 min bei 70°C sowie Kühlen bei 4°C. Im Anschluss wurde die cDNA auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt.

2.5.4. RNA-Isolation aus Gewebe

Die Isolation von RNA aus Herzgewebe erfolgte mit Hilfe des Precellys 24 Homogenisator. In einem speziellen Reaktionsgefäß wurde das Herzgewebe mit 1 ml QIAzol und kleinen

Keramikkügelchen versetzt und im Homogenisator platziert. Durch die Homogenisation für zweimalig 20 s bei 5000 g wurde das Gewebe aufgebrochen. Im Anschluss wurde der Ansatz für 20 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die weiteren Schritte entsprechen dem RNA-Isolationsprotokoll für die Zellkultur.

2.5.5. Quantitative RealTime-PCR und Multiplex-PCR

Die RealTime-PCR ermöglicht die Quantifizierung von Gentranskripten mittels Fluoreszenzmessung. In dieser Arbeit wurde dazu SYBR Green verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff der an die kleine Furche von Doppelstrang-DNA bindet. Mit Hilfe des CFx96 RealTime-PCR Detektionssystem wurde das Fluoreszenzsignal am Ende jedes Elongationszyklus gemessen, welches sich proportional zur Menge der PCR-Produkte verhält. Dazu wurde ein Mastermix aus Platinum SYBR Green qPCR SuperMix, einem spezifischen Primerpaar pro Gen und DNase-freien dH₂O vorbereitet (siehe Tabelle 2-18). Der Mastermix wurde auf eine 96-Well-PCR-Platte verteilt und mit 20 ng cDNA versetzt. Die Messung erfolgte jeweils in Triplikaten. Tabelle 2-19 zeigt das Temperaturprotokoll des PCR-Zyklus für die quantitative RealTime-PCR mit SYBR Green.

Tabelle 2-18: Standardreaktionsansatz für die quantitative RealTime-PCR mit SYBR Green

Reagenz	Volumen für 18 µl Ansatz
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix	10 µl
Primer Forward (10 nM)	0,4 µl
Primer Reverse (10 nM)	0,4 µl
DNase-freies ddH ₂ O	7,6 µl
	18 µl

Tabelle 2-19: Standardprogramm für die quantitative RealTime-PCR mit SYBR Green

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
UDG Inkubation	50 °C	2 min	1
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95°C	5 s	40
Annealing und Elongation	60°C	30 s	
Schmelzkurve	95 °C	10 s	
Messung der Platte	60-95°C	5 s	+ 0,5°C pro Zyklus

Mit Hilfe einer Multiplex-PCR können mehrere Gensequenzen in einem Reaktionsansatz amplifiziert und spezifisch detektiert werden. Der verwendete Reaktionsansatz enthielt pro Gen zwei spezifische Primer sowie eine DNA-Sonde. In dieser Arbeit wurde die Multiplex-PCR zur Analyse der folgenden Gene verwendet: NppA, NppB, Rcan1.4 und RPL32. In Tabelle 2-20 und Tabelle 2-21 sind der Standardreaktionsansatz sowie das Standardprogramm für die quantitative Multiplex-PCR aufgeführt.

Tabelle 2-20: Standardreaktionsansatz für die quantitative Multiplex-PCR

Reagenz	Volumen für 18 µl Ansatz
iQ Powermix	10 µl
RPL32 Mix (Texas red)	0,5 µl
Nppa Mix (FAM)	0,5 µl
Nppb Mix (HEX)	0,5 µl
RCAN1.4 Mix (Cy5-Maus) (Cy5.5-Ratte)	0,5 µl
DNase-freies ddH ₂ O	6 µl
	18 µl

Tabelle 2-21: Standardprogramm für die quantitative Multiplex-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturation	95 °C	2 min	1
Denaturation	95°C	15 s	40
Annealing und Elongation	60°C	45 s	

Die Analyse der Fluoreszenzmessungen erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Der Threshold-Cycle (C_t , Schwellenzyklus) beschreibt den PCR-Zyklus, indem das Fluoreszenzsignal der Probe erstmals signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten sollte der C_t in der exponentiellen Amplifikationsphase liegen. Als erstes wurde das zu analysierende Gen auf ein Haushaltsgen normalisiert, indem die Differenz aus dem C_t -Wert des zu analysierenden Gens und dem C_t -Wert des Haushaltsgens gebildet wurde. Als Haushaltsgen wurde in dieser Arbeit für alle Analysen RPL32 verwendet. Die relative Quantifizierung ergibt sich anschließend aus der Differenz der normalisierten C_t -Werte aus unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

2.6. Molekularbiologische Methoden – Proteinbiochemie

2.6.1. Protein-Isolation aus der Zellkultur

Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit Kern-Lyse-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Wells gelöst. Pro Well wurden 200 µl Kern-Lyse-Puffer verwendet, dem kurz zuvor Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren zugefügt wurden. Zur Lyse der Zellen wurden die Zellsuspension unverzüglich in flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend bei 37°C in einem Thermozykler aufgetaut. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Nach Zentrifugation bei 18000 g und 4°C für 20 min wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.6.2. Protein-Isolation aus Gewebe

Die Isolation von Protein aus Herzgewebe erfolgte mit Hilfe des Precellys 24 Homogenisator. Dazu wurde das Gewebe in einem speziellen Reaktionsgefäß mit 1 ml Kern-Lyse-Puffer und Keramikkügelchen versetzt und im Precellys 24 platziert. Die Homogenisation erfolgte in zwei Zyklen von je 20 s bei 5000 rpm. Anschließend wurde die Suspension für 20 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.6.3. Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bradford-Reagenz

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe von Bradford-Reagenz. Zunächst wurde eine BSA-Lösung seriell zur Herstellung einer Standardkurve verdünnt. Dazu wurden 50 µl einer BSA-Stammlösung mit einer Proteinkonzentration von 2,56 ng/µl mit 50 µl ddH₂O verdünnt. Anschließend wurden 50 µl der erhaltenen Lösung mit wiederum 50 µl ddH₂O verdünnt. Die Verdünnung wurde ein weiteres Mal in gleicher Weise wiederholt. Je nach erwarteter Proteinkonzentration wurden die Proteinproben 1:2 bis 1:10-fach mit ddH₂O verdünnt, sodass ihre Proteinkonzentration innerhalb des Bereiches der Standardkurve lag. Die Bradford-Reagenz wurde nun 1:5 mit ddH₂O verdünnt und filtriert. Nun wurden je 2 µl der Standardverdünnungen und der Proteinproben in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und mit je 200 µl Bradford-Lösung versetzt. Nach Inkubation für mindestens 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung im Tecan Microplate Reader. Durch lineare Regression konnte nun die Proteinkonzentration der Proben aus der Standardkurve bestimmt werden.

2.6.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach molekularer Größe. Durch die Bindung von Natriumdodecyl-Sulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und erhalten eine einheitliche negative Ladung. Als erstes wurde ein spezieller Rahmen vorbereitet, in den zwei Glasplatten eingespannt wurden. Um ein Trenngel mit einem Acrylamidanteil von 12% herzustellen, wurden dann 2,6 ml Trenngelpuffer, 4 ml 30% Acrylamid und 3,2 ml ddH₂O vermischt und zur Polymerisation mit 30 µl APS sowie 15 µl TEMED versetzt. Der Rahmen wurde zu dreiviertel mit der Trenngellösung befüllt und anschließend mit Isopropanol aufgefüllt um eine gleichmäßige Gelkante zu erzeugen. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Isopropanol mit Hilfe eines Filterpapiers entfernt. Anschließend wurde der Rahmen mit einer Sammelgellösung mit einem Acrylamidanteil von 4% aufgefüllt. Mit Hilfe eines Kamms, der in das noch flüssige Sammelgel eingeführt wurde, konnten 10 oder 15 Taschen erzeugt werden. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt, der Kamm entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gespült. In der Zwischenzeit wurden die Proteinproben mit vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Geltaschen mit den Proteinproben und einem Farbmarker befüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V bis die Bromphenolblaubande die untere Kante des Gels erreichte.

2.6.5. Western Blot

Für den Transfer von Proteinen von einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran wurde ein Tank-Transfer-System verwendet. Dazu wurde das Gel vorsichtig aus dem Glasrahmen entfernt und in ein sogenanntes Sandwich eingebettet. Dieses Sandwich war von unten nach oben wie folgt aufgebaut: ein Schwamm, 3 Filterpapiere, das Polyacrylamidgel, eine PVDF-Membran, 3 Filterpapiere, ein Schwamm. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung zuvor für 30 s in Methanol inkubiert. Nachdem das Sandwich in die Blottingkammer eingesetzt wurde, wurde diese mit Transferpuffer und einer Kühlkammer befüllt. Der Transfer erfolgte nun bei einer konstanten Stromstärke von 330 mA für 60 min. Anschließend wurde die PVDF-Membran aus dem Sandwich entnommen und für 1 bis 2 h mit 5% Milchpulver in TBS-Puffer inkubiert. Durch die Inkubation in der Milchpulverlösung wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Milchproteine besetzt.

2.6.6. Detektion mit ECL

Nach der Inkubation in TBS-Puffer mit 5% Milchpulver, wurde die Membran mit einem primären Antikörper inkubiert. Dazu wurde ein entsprechender Antikörper in TBS-Puffer mit 5% Milchpulver verdünnt und mit der Membran in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in TBS-Puffer mit 5% Milchpulver verdünnt. Es wurden an Meerrettich-Peroxidase (HRP, Horse Radish Peroxidase) gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, die speziesspezifisch gegen die Primärantikörper gerichtet waren. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Anschließend konnten die Proteine mit Hilfe des Enhanced Chemilumineszenz Systems (ECL) und der FluorChem Q Kamera detektiert werden. Das ECL-System enthält eine Luminollösung und eine Peroxidlösung. Diese wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min unter Lichtausschluss mit der Membran inkubiert. Bei der Oxidation des Luminols durch die Meerrettich-Peroxidase entsteht eine Chemilumineszenz bei 425 nm, die von der FluorChem Q Kamera aufgenommen wurde. Die Quantifizierung des Lumineszenzsignals erfolgte mit Hilfe der Herstellersoftware AlphaView Q.

2.7. Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden NRVCN auf kollagenbeschichteten Glascoverslips ausgesät und in üblicher Weise behandelt (siehe 2.3). Zum Ernten wurden die Zellen zunächst dreimal mit eiskalten PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS. Nun wurden die Coverslips in eine feuchte Kammer überführt und eine Stunde mit 2,5% BSA in PBS zum Blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen inkubiert. Der Primärantikörper wurde in 2,5% BSA in PBS verdünnt und für mindestens 90 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit den Coverslips inkubiert. Im Anschluss wurden die Coverslips dreimal mit PBS gewaschen und dann mit einem an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 2,5% BSA in PBS verdünnt. Nach drei Waschschrten mit PBS wurden die Coverslips mit Mountingmedium auf einen Objektträger aufgebracht,

wobei die Zellseite der Coverslips nach unten gerichtet war. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4°C getrocknet.

Zur Bildgebung wurde das Keyence BZ 900 Mikroskop und die Herstellersoftware BZ-II Analyzer verwendet.

2.7.1. Zellgrößenbestimmung

Für die Zellgrößenbestimmung wurden NRVCM immunhistochemisch mit α -Aktinin und DAPI angefärbt. Als Sarkomerprotein ist α -Aktinin spezifisch für Kardiomyozyten, sodass der Fehler durch Ausmessung von Fibroblasten minimiert wurde. Zunächst wurden pro Coverslip 5x5x5 (x y z) Bilder mit dem Keyence BZ 900 Mikroskop in einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die einzelnen Bilder überlappten sich dabei zu 20%. Mit Hilfe der „Merge“- und „Full Focus“-Funktion des BZ-II Analyzer wurde aus den Bildern ein gemeinsames Bild erstellt. Die Bestimmung der Zellgrößen erfolgte automatisiert durch die Hybrid Cell Count Funktion des BZ-II Analyzer. Dazu wurde zunächst die Schwelle für Fluoreszenzintensität auf einem Referenzbild festgelegt. Den Zielbereich in der „single extraction mode“ bildeten die α -Aktinin gefärbten Kardiomyozyten. Damit nur einzelne Kardiomyozyten mit einem Zellkern in die Zellgrößenbestimmung eingingen, wurde innerhalb der Zielbereiche die Anzahl der mit DAPI angefärbten Zellkerne gezählt.

2.8. Microarray

Microarrays ermöglichen die parallele Untersuchung von tausenden von Gene in einer Gewebeprobe und finden Anwendung in der Genomanalyse, der Diagnostik und der Untersuchung differenzieller Genexpression. Jedes Testfeld auf dem fingernagelgroßen Microarray trägt als DNA-Sonde eine definierte cDNA- oder Oligonukleotidsequenz. Die zu untersuchende cDNA wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt und auf das Microarray aufgebracht. Durch Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Sonden können spezifische Gene nachgewiesen und ihre Expression anhand des Fluoreszenzsignals quantifiziert werden (Stears, Martinsky et al. 2003).

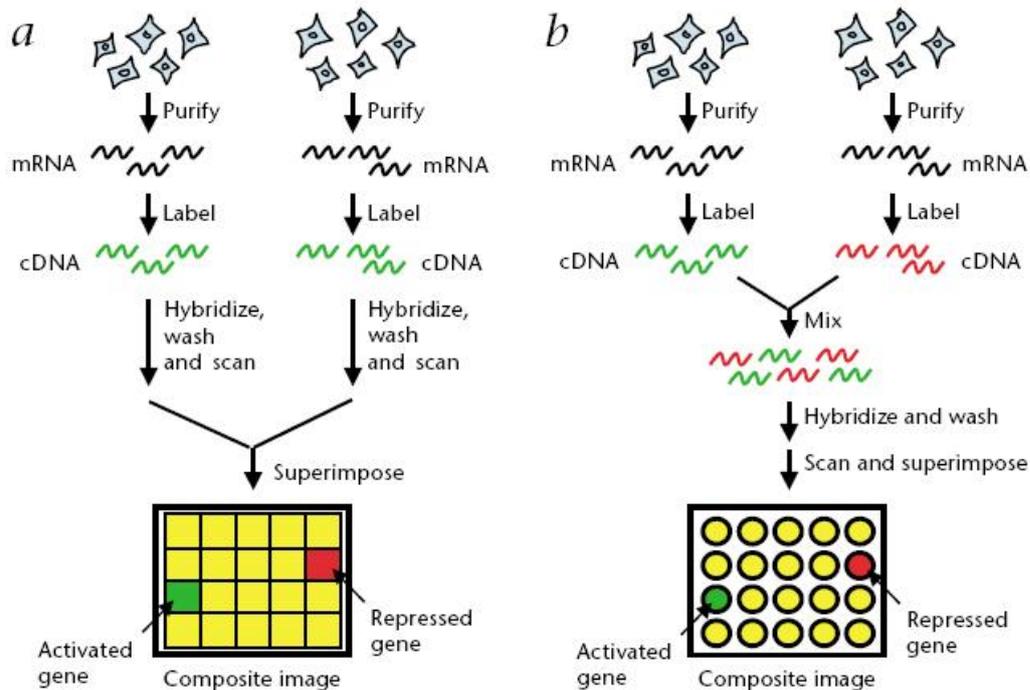


Abbildung 2-2: Microarray mit einem oder zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Stears, Martinsky et al. 2003). Bei einfarbigen Microarrays (a) wird für jede Probe ein separates Microarray verwendet und das Expressionsprofil durch nachträgliches Übereinanderlegen der separaten Bilder erzeugt. Dahingegen ermöglichen zweifarbiges Microarrays (b) die simultane Untersuchung von zwei verschiedenen cDNA-Proben. Das Expressionsprofil wird durch Übereinanderlegen der beiden Farbkanäle des Microarrays erzeugt.

Man unterscheidet zwischen Microarrays mit einem oder zwei Fluoreszenzfarbstoffen. Bei Verwendung von einem Fluoreszenzfarbstoff wird das Genexpressionsmuster verschiedener Proben mit separaten Microarrays analysiert. Supprimierte oder induzierte Gene werden durch nachträgliches Übereinanderlegen der verschiedenen Bilder detektiert. Die Verwendung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Analyse von zwei verschiedenen Proben auf einem Microarray. Supprimierte oder induzierte Gene werden durch Übereinanderlegen der Farbkanäle des Microarrays detektiert (Stears, Martinsky et al. 2003).

Das in dieser Arbeit untersuchte Expressionsprofil der langen nicht-kodierenden RNAs wurde durch das Comprehensive Biomarker Center in Heidelberg unter Verwendung des einfarbigen Agilent Mus musculus 8x60K_60mer gene expression Microarray erstellt. Zur Qualitätskontrolle erfolgte zunächst die Bestimmung der Qualität und Quantität der RNA-Proben durch das RNA 6000 Nano Kit im Agilent 2100 Bioanalyzer. Das Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit wurde zur Amplifikation und Markierung der cDNA verwendet. Die initiale Datenprozessierung erfolgte durch den GS2525_C Microarrayscanner und die Agilent Feature Extraction software (10.7.3.1).

2.9. Bioinformatische Analyse

Nach einer initialen Hintergrundkorrektur wurden die Daten normalisiert, um die Varianz zwischen den einzelnen Arrays zu minimieren. Dazu wurde eine varianzstabilisierende Normalisierung (VSN) angewendet. Zur Identifikation von differentiell regulierten langen nicht-kodierenden RNAs wurden verschiedene statistische Methoden angewendet. Neben Mittelwert, Median und Varianz wurde der parametrische t-test, der nicht-parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und die empirische Bayes Statistik herangezogen. Die erhaltenen p-Werte wurden für multiples Testen adjustiert. Zudem wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit Hilfe des euklidischen Abstands durchgeführt.

2.10. Tierversuche

Alle in dieser Arbeit erwähnten Tierversuche wurden durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein sowie durch den Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt.

2.10.1. Tierhaltung

Die Tiere wurden in der Zentralen Tierhaltung des UKSH, Campus Kiel, unter standardisierten Bedingungen gehalten. Zu jeder Zeit hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser und Trockenfutter. Ein Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden wurde eingehalten. Die Temperatur in der Haltungseinrichtung betrug durchgehend $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.10.2. Transaortale Konstriktion (TAC)

Durch die operative Konstriktion der Aorta transversa wurde eine Druckbelastung am Herzen mit nachfolgender kardialer Hypertrophie und Insuffizienz induziert. Der minimal-invasive Eingriff erfolgte unter Analgesie mit Buprenorphin und Narkose mit Isofluran. Zunächst wurde die Maus auf einem beheizten Operationstisch platziert und intubiert. Nach Rasur und Desinfektion des Thorax erfolgte ein transversaler Hautschnitt im Bereich des 2. Interkostalraums und die stumpfe Präparation bis zum Aortenbogen. Die Konstriktion der Aorta auf einen Durchmesser von 26 G erfolgte durch eine Ligatur zwischen den Abgängen des Truncus brachiocephalicus und der Arteria carotis communis sinistra. Anschließend wurde der Operationszugang durch eine Hautnaht verschlossen.

2.10.3. Echokardiographie

Für die Echokardiographie wurden die Mäuse mit Isofluran sediert, auf einer beheizten Vorrichtung gelagert und im Brustbereich rasiert. Die systolische und diastolische Darstellung der Stärke des Septums (Interventrikular Septum, IVS) und der Hinterwand (Posterior Wall, PW) sowie des linksventrikulären Diameters (Left Ventricular Internal Diameter, LVID) erfolgte in M-Mode. Aus dem diastolischen und systolischen linksventrikulären Diameter wurde anhand folgender Formel das Fractional Shortening berechnet: $FS = (LVIDD - LVIDS) / LVIDD$.

2.10.4. Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte nach zervikaler Dislokation in Isoflurannarkose.

2.11. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot 13.0. Nach Berechnung des jeweiligen Mittelwerts und des zugehörigen Standardfehlers wurde ein zweiseitiger Student t-Test bzw. ein ANOVA zur Signifikanztestung durchgeführt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Identifizierung von langen nicht-kodierenden RNAs mit pathophysiologischer Bedeutung für die kardiale Hypertrophie. Die Konstriktion der Aorta transversa (TAC), ein Mausmodell für die Druckbelastung des linken Ventrikels mit konsekutiver Entwicklung einer Herzhypertrophie und -insuffizienz, bildete die Grundlage der Untersuchung. Mit Gewebeproben aus Ventrikeln von TAC-operierten Mäusen und scheinoperierten Kontrolltieren (SHAM) wurde ein Microarray durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Microarrays sowie die in-vitro Charakterisierung ausgewählter langer nicht-kodierender RNAs dargestellt.

3.1. Experimentelle Nachlasterhöhung durch transaortale Konstriktion im Mausmodell als Ausgangspunkt der Microarrayanalyse

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die transthorakale aortale Konstriktion als Modell für die pathologische kardiale Hypertrophie. Dazu wurde eine Gruppe aus 7 Tieren einer operativen Konstriktion der Aorta transversa unterzogen, welche im Folgenden als TAC-Gruppe bezeichnet wird. Die Kontrollgruppe bildeten 9 Tiere, die eine Thorakotomie und Präparation, allerdings keine Ligatur des Aortenbogens erhielten. Zwei Wochen postoperativ wurden die Versuchstiere echokardiographisch untersucht und zur Organentnahme getötet.

Morphologisch zeigte sich in der TAC-Gruppe eine 1,54-fache Zunahme des Herzgewicht-Körpergewicht-Quotienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch der Quotient aus linksventrikulärem Gewicht und Körpergewicht war um das 1,55-fache erhöht. Der Quotient betrug in der Kontrollgruppe im Mittel 3,941 mg/g und in der TAC-Gruppe 6,129 mg/g. Statistisch ergibt sich für beide Quotienten ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Die Betrachtung des Herz- und linksventrikulären Gewichts im Bezug zum Körpergewicht lässt auf eine Zunahme des Herzgewichts unabhängig des Körpergewichts im Sinne einer Herzhypertrophie schließen. Echokardiographisch wurde das „Fractional Shortening“ des linken Ventrikels untersucht, welches der Auswurfsleistung des linken Ventrikels entspricht. Dabei zeigte sich eine signifikante Verminderung des „Fractional Shortenings“ von 34,79 % in der Kontrollgruppe auf 13,81 % in der TAC-Gruppe. Das entnommene Gewebe wurde auf die Expression bekannter Biomarker für die kardiale Hypertrophie untersucht. Beispielhaft wird

in Abbildung 3-1 die Expression des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF) dargestellt, welche in der TAC-Gruppe um das 14,63-fache erhöht war ($p < 0,001$).

Die Operation sowie Untersuchung der Versuchstiere wurden im Labor für molekulare Kardiologie am UKSH Kiel durchgeführt und sind als vorherige Arbeiten anzusehen.

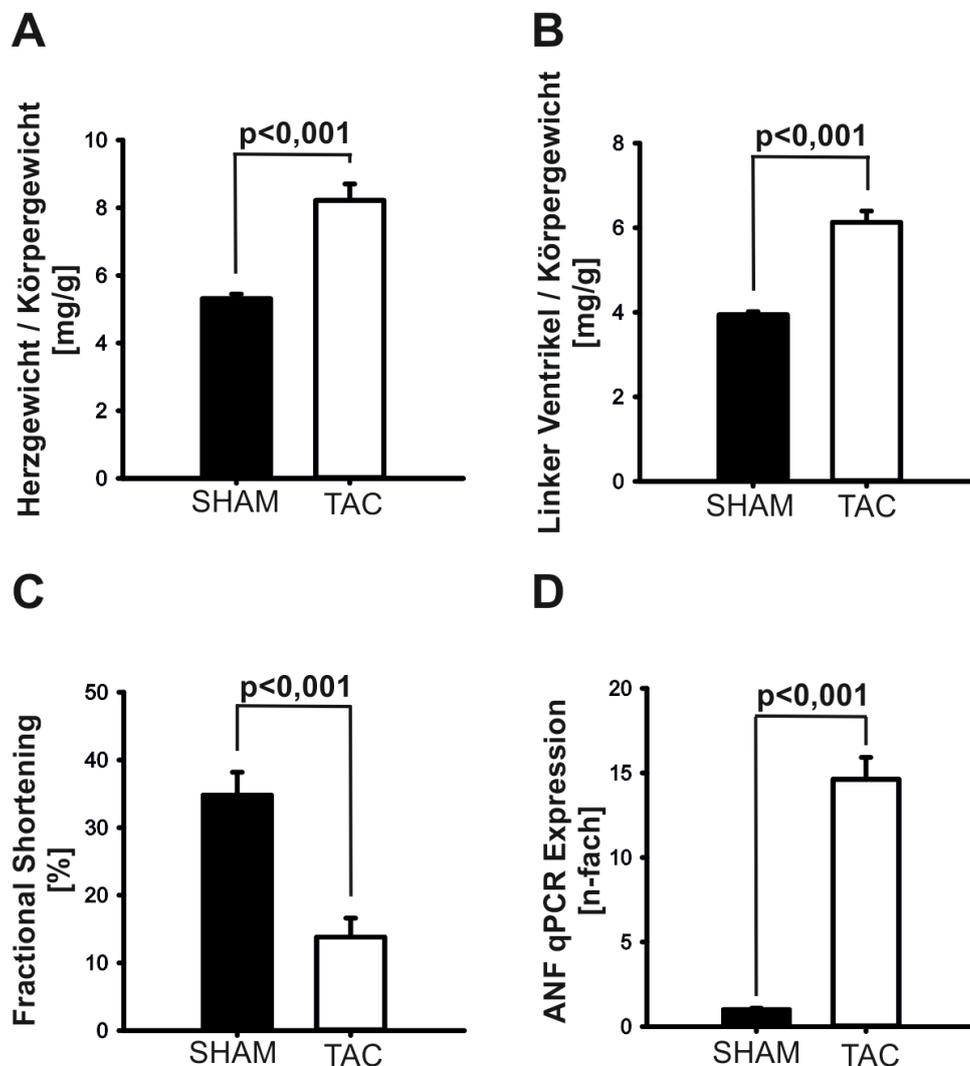


Abbildung 3-1: TAC-operierte Tiere entwickeln eine Herzhypertrophie. Vierzehn Tage postoperativ zeigten Mäuse nach einer Konstriktion der Aorta transversa (TAC) ein größeres Herz- und linksventrikuläres Gewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe (A-B). Zudem zeigten sich in der Gruppe der TAC-operierten Tiere echokardiographisch ein deutlich vermindertes „Fractional Shortening“ (C) sowie eine vermehrte ANF-Expression als biochemisches Zeichen der Hypertrophie (D). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. SHAM n=8, TAC n=7.

3.2. Ergebnisse des Microarrays

Zur Identifikation differentiell regulierter langer nicht-kodierender RNAs wurde ein Microarray mit RNA aus den Ventrikeln der 7 TAC-Tiere und der 9 Kontrolltiere durchgeführt. Die Analyse wurde von der Comprehensive Biomarker Center GmbH in Heidelberg durchgeführt. Dabei wurde ein „Agilent’s *Mus musculus* 8x60K_60-mer gene expression microarray“ verwendet, welches die Expression aller bekannten und potenziellen langen nicht-kodierenden RNA-Sequenzen untersucht.

A

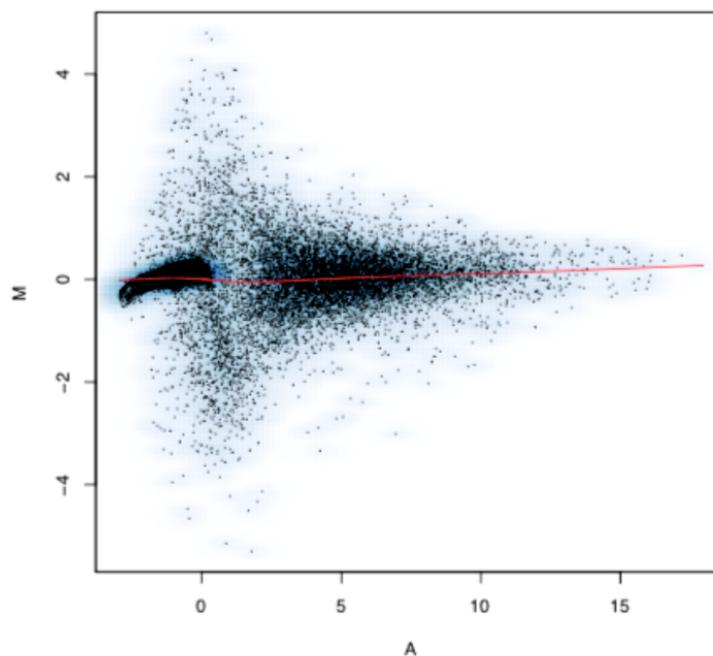


Abbildung 3-2: MA-Plot für TAC gegen SHAM. Der MA-Plot zeigt auf der x-Achse die mittlere log₂-Intensität des aktuellen und Referenzmicroarrays jeder Sonde als A-Wert und auf der y-Achse das Verhältnis der log₂-Intensität des aktuellen und Referenzmicroarrays jeder Sonde als M-Wert. Nach Normalisierung zeigt sich eine symmetrische Streuung der Datenpunkte um die x-Achse. Je weiter die Datenpunkte vom 0-Wert auf der y-Achse entfernt liegen, desto deregulierter ist die repräsentierte Sonde. Im Niedrigintensitätsbereich zeigt sich typischerweise eine höhere Streuung der Datenpunkte, da der Hintergrund größeren Einfluss hat.

Die Daten aus dem Microarray wurden bioinformatisch ausgewertet, um die Expressionsprofile der TAC und scheinoperierten Gruppe zu vergleichen und mögliche differentiell regulierte lange nicht-kodierende RNAs zu identifizieren. Um Unterschiede zwischen den Microarrays zu minimieren, erfolgte zunächst eine Hintergrundkorrektur sowie eine Normalisierung der Daten mit Hilfe der varianzstabilisierenden Normalisierungsmethode. Unter Anwendung der Hampel-Regel wurde ein Ausreißer in der Kontrollgruppe identifiziert,

welcher von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde. Die Kontrollgruppe wurde so von 9 auf 8 Tiere reduziert. Nach Normalisierung der Daten zeigte sich eine homogene Verteilung der Datenpunkte, welche in Abbildung 3-2 dargestellt wird.

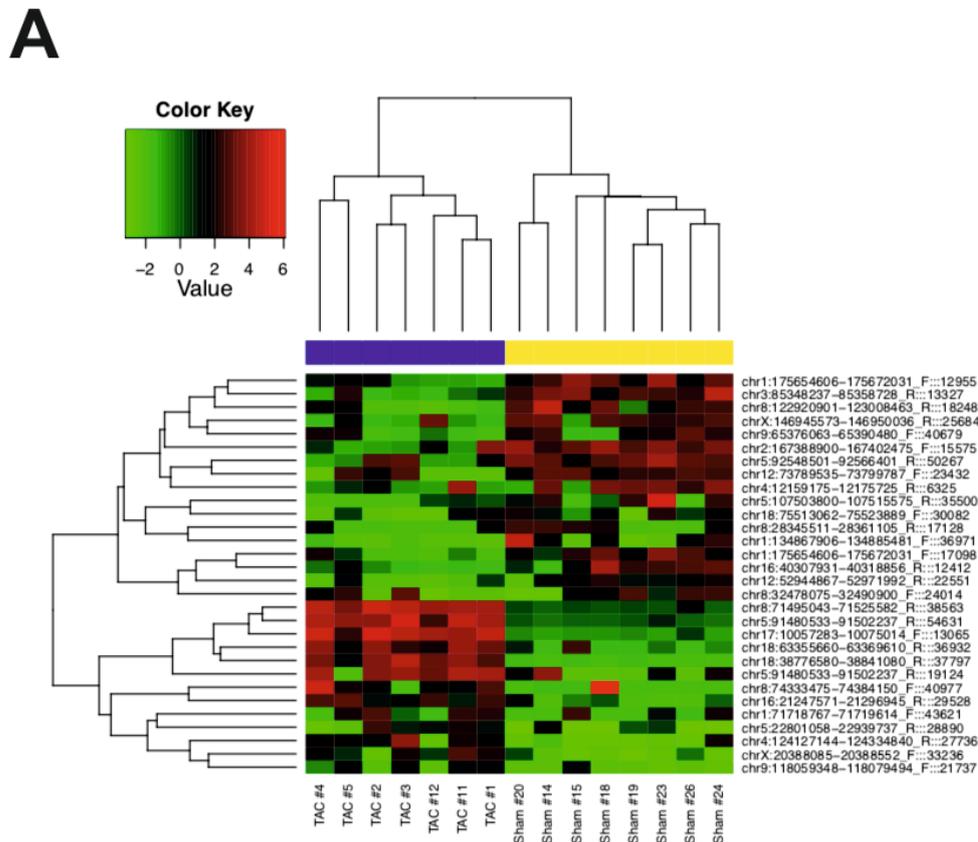


Abbildung 3-3: Heatmap als Darstellung der 30 am stärksten regulierten Sonden zwischen TAC- und SHAM-Gruppe. Die Darstellung beruht auf einer hierarchischen Clusteranalyse, die der Gruppierung von Gene durch Ähnlichkeitsmerkmale dient. Eine hohe Genexpression wird hier grün dargestellt, eine geringe Genexpression rot.

Zur Identifikation von differentiell regulierten langen nicht-kodierende RNAs wurden verschiedene statistische Methoden angewendet. Neben Mittelwert, Median und Varianz wurde der parametrische t-test, der nicht-parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und die empirische Bayes Statistik herangezogen. Nach Adjustierung der erhaltenden p-Werte für multiples Testen, zeigten sich 1364 differentiell regulierte lange nicht-kodierende RNAs. Zudem wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit Hilfe des euklidischen Abstands durchgeführt. Dabei werden Gruppen anhand von Ähnlichkeitsmerkmalen gebildet. Die

Ähnlichkeit innerhalb der Gruppe sollte möglichst hoch, die Ähnlichkeit zwischen den Gruppen hingegen möglichst gering sein. Abbildung 3-3 zeigt eine Clusteranalyse der 30 am stärksten regulierten Microarray-Sonden.

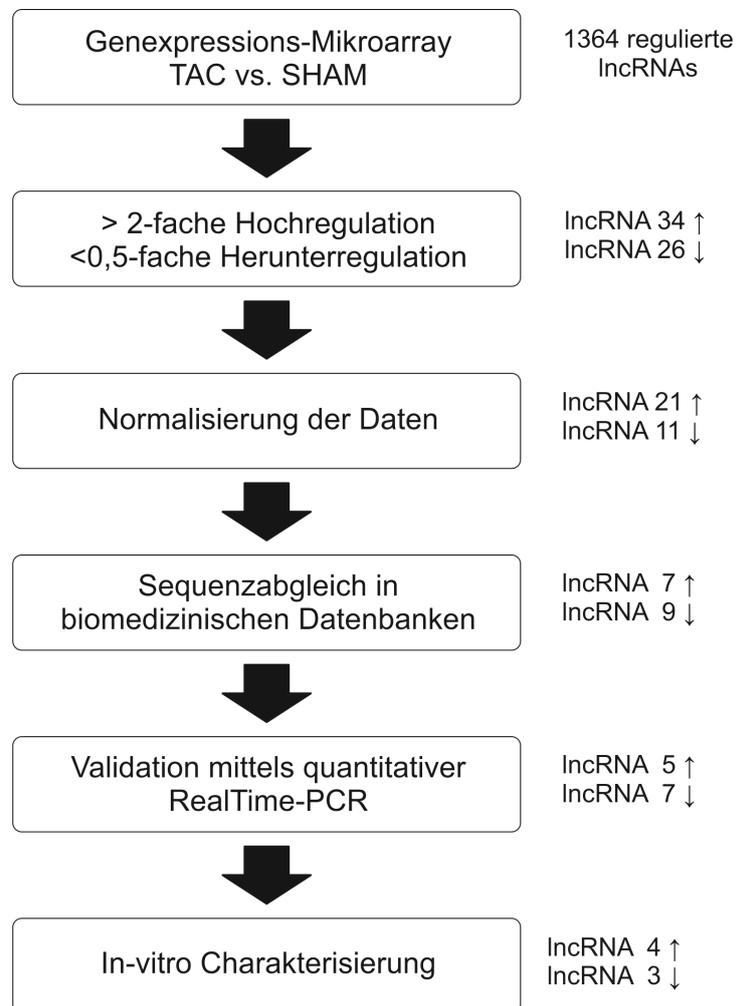


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Selektion der langen nicht-kodierenden RNAs für die in-vitro Charakterisierung. Ausgehend von 1364 differentiell regulierten langen nicht-kodierenden RNAs im Microarray erfolgte durch statistische Methoden und Sequenzabgleich in biomedizinischen Datenbanken eine Reduktion der Auswahl auf 16 lange nicht-kodierende RNAs. Die Expression von 12 dieser langen nicht-kodierenden RNAs konnte mittels qPCR bestätigt werden. Anschließend wurden 7 RNAs für weitere Analysen ausgewählt.

Für die weitere Analyse wurden nur die langen nicht-kodierenden RNAs betrachtet, die in der TAC-Gruppe eine mindestens 2-fache Überexpression oder eine mindestens 0,5-fache Herunterregulation zeigten. Dadurch reduzierte sich die Anzahl der langen nicht-kodierenden RNAs von 1364 auf 34 hochregulierte und 26 herunterregulierte lange nicht-kodierende RNAs. Durch weitere Normalisierung der Daten erfolgte eine Reduktion der Auswahl um 28 lange nicht-kodierende RNAs. Anschließend erfolgte ein Abgleich der Sequenzen der langen nicht-kodierenden RNAs in den biomedizinischen Datenbanken NCBI, ENSEMBL und NONCODE.

Dadurch konnten proteinkodierende Sequenzen, nicht annotierte lange nicht-kodierende RNAs, sowie in der Literatur bereits hinreichend charakterisierte lange nicht-kodierende RNAs ausgeschlossen wie z.B. DANCR werden. Die Expression der verbleibenden 7 hochregulierten sowie die 9 herunterregulierten langen nicht-kodierenden RNAs wurde mittels quantitativer RealTime-PCR (qPCR) validiert. Nachfolgend wurden 7 lange nicht-kodierende RNAs für die in-vitro Charakterisierung ausgewählt.

3.3. Verifizierung der Microarrayergebnisse mittels quantitativer Real Time-PCR

Um die aus dem Microarray gewonnenen Expressionsprofile der selektierten langen nicht-kodierenden RNAs zu überprüfen wurde die qPCR genutzt. Für folgende lange nicht-kodierende RNAs konnte so eine vermehrte Expression in der TAC-Gruppe gegenüber der scheinoperierten Gruppe nachgewiesen werden: RNA imprinted and accumulated in the nucleus (RIAN), 2700099C18Rik, HECT Domain 3 Ubiquitin Protein Ligase 2 Opposite Strand (Hectd2os) und Small Nuclear RNA Host Gene 18 (Snhg18).

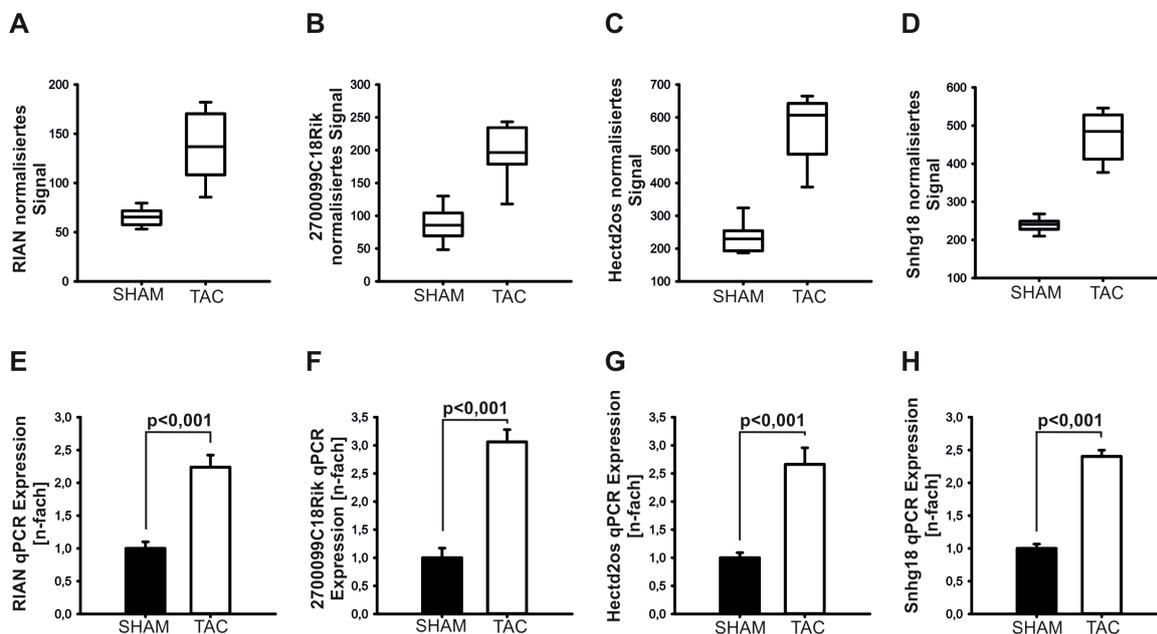


Abbildung 3-5: Bestätigung der differentiellen Regulation von RIAN, 2700099C18Rik, Hectd2os und Snhg18 mittels qPCR. In Abbildungen A-D ist das normalisierte Signal des Microarrays als Median \pm Standardfehler dargestellt (SHAM n=8, TAC n=7). Gegenübergestellt ist das Ergebnis der qPCR in den Abbildungen E-H als Mittelwert \pm Standardfehler (SHAM n=6, TAC n=6). Für die qPCR wurde RNA aus den Ventrikeln von TAC- und SHAM-operierten Tieren isoliert und mit spezifischen Primern auf die Expression von RIAN, 2700099C18Rik, Hectd2os und Snhg18 untersucht.

Im Microarray zeigte sich für RIAN ein Signalwert von 65,0 in der scheinoperierten Gruppe und ein Signalwert von 136,3 in der TAC-Gruppe. Dies entspricht einer 2,09-fachen Überexpression von RIAN in der TAC-Gruppe, welche sich in der qPCR bestätigte. Auch die vermehrte Expression von 2700099C18Rik in der TAC-Gruppe konnte mittels qPCR validiert werden. So zeigte sich für die TAC-Gruppe eine 2,23-fache Überexpression von 2700099C18Rik gegenüber der scheinoperierten Gruppe im Microarray und eine 3,06-fache Überexpression in der qPCR. Der Signalwert für Hectd2os erhöhte sich von einem Wert von 233,4 in der scheinoperierten Gruppe auf einen Wert von 562,3 in der TAC-Gruppe. In der qPCR zeigte sich eine um das 2,66-fach erhöhte Expression von Hectd2os in der TAC-Gruppe. Für Snhg18 ergab sich eine 1,96-fache Überexpression in der TAC-Gruppe im Microarray und eine 2,40-fache Überexpression in der qPCR. Die Expressionsunterschiede in der qPCR sind mit $p < 0,001$ als signifikant zu erachten.

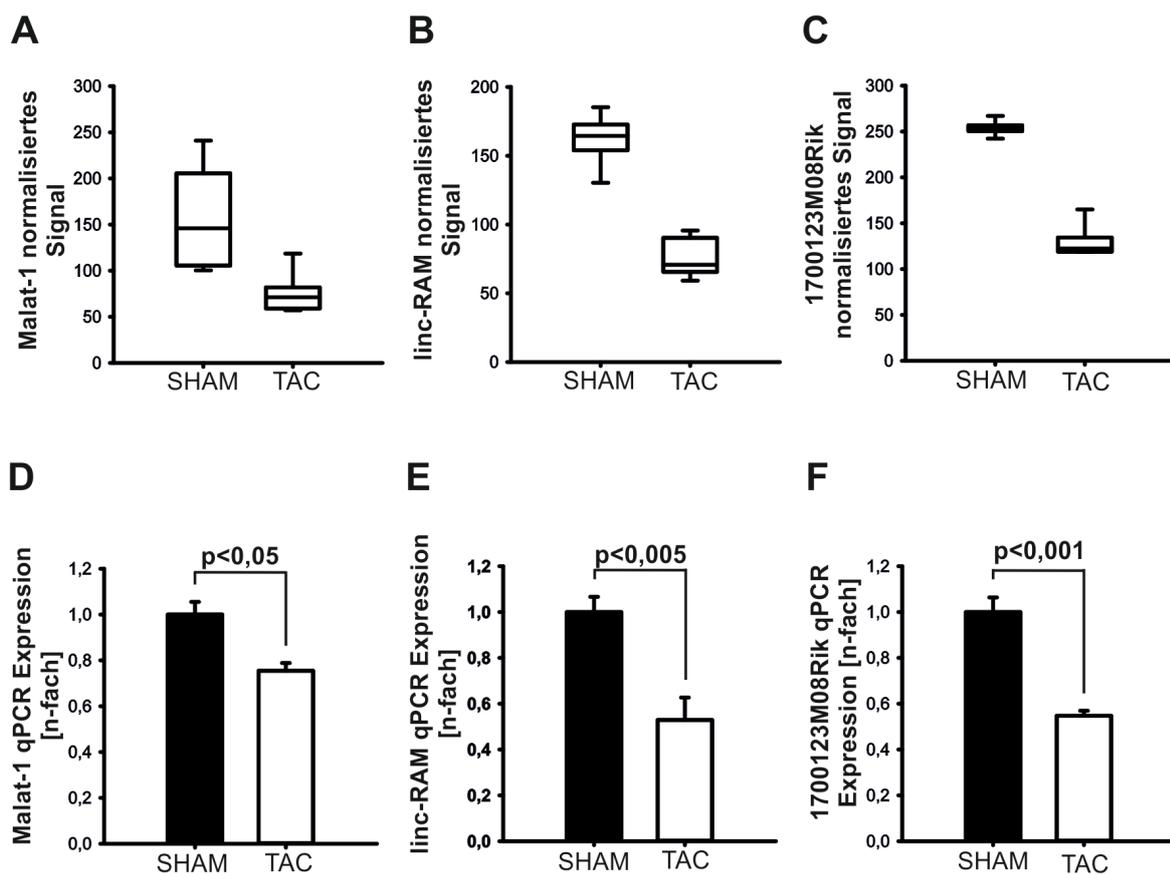


Abbildung 3-6: Bestätigung der differentiellen Regulation von Malat-1, Myoregulin und 1700123M08Rik mittels qPCR. In den Abbildungen A-C ist das normalisierte Signal des Microarrays als Median \pm Standardfehler dargestellt (SHAM n=8, TAC n=7). Gegenübergestellt ist das Ergebnis der qPCR in den Abbildungen D-F als Mittelwert \pm Standardfehler (SHAM n=6, TAC n=6). Für die qPCR wurde RNA aus den Ventrikeln von TAC- und SHAM-operierten Tieren isoliert und mit spezifischen Primern auf die Expression von Malat-1, Myoregulin und 1700123M08Rik untersucht.

Zudem konnte die verminderte Expression von Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (Malat-1), Linc-RNA Activator of Myogenesis (linc-RAM) und 1700123M08Rik in der TAC-Gruppe gegenüber der scheinoperierten Gruppe mittels qPCR bestätigt werden. So zeigte sich für Malat-1 eine Signalreduktion um 52% im Microarray. Die qPCR bestätigte lediglich eine um 25% verminderte Malat-1 Expression in der TAC-Gruppe gegenüber der scheinoperierten Gruppe. Weiterhin zeigte sich im Microarray eine um 53% verminderte Expression von linc-RAM in der TAC-Gruppe gegenüber der scheinoperierten Gruppe, welche durch die qPCR validiert wurde. Diese zeigte eine auf 52% reduzierte linc-RAM-Expression. Ebenso zeigte sich für 1700123M08Rik eine um 49% reduzierte Expression in der TAC-Gruppe im Microarray und eine um 46% reduzierte Expression in der qPCR. Mit einem $p < 0,001$ ist die verminderte Expression von 1700123M08Rik in der TAC-Gruppe gegenüber der scheinoperierten Gruppe statistisch signifikant.

3.4. Charakterisierung der selektierten langen nicht-kodierenden RNAs in-vitro

Um die pathophysiologische Bedeutung der langen nicht-kodierenden RNAs für die kardiale Hypertrophie zu evaluieren, wurde ihre Expression in verschiedenen Mausmodellen betrachtet. Dabei handelte es sich um die Calcineurin-transgene Mauslinie als Hypertrophiemodell (Frey, McKinsey et al. 2000), die MLP-Knockout Mauslinie als Modell für die dilatative Kardiomyopathie (Arber, Hunter et al. 1997) und die Calscarcin-1-Knockout Mauslinie. Calscarcin-1-Knockoutmäuse mit gemischtem genetischen Hintergrund zeigen unter basalen Bedingungen keinen kardialen Phänotyp, allerdings reagieren sie bei biomechanischem Stress mit vermehrter Hypertrophie (Frey, Barrientos et al. 2004). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Calscarcin-1-Knockoutmäuse mit einem bestimmten genetischen Hintergrund (C57BL/6) bereits unter basalen Bedingungen einen dilatativen Phänotyp mit verminderten „Fractional Shortening“ und vergrößerten enddiastolischen linksventrikulären Diameter zeigen. Zellgröße, Herzgewicht-Körpergewicht-Quotient und Fibrose-Marker sind im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Rangrez, Hoppe et al. 2017). Als in-vitro Modell wurden aufgrund der geringen genetischen Konservierung der langen nicht-kodierenden RNAs zwischen den Spezies neonatale Mauskardiomyozyten (NMCM) anstelle von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten (NRVCM) gewählt. In neonatalen Mauskardiomyozyten wurde zur weiteren Charakterisierung der langen nicht-kodierenden RNAs die Überexpression

sowie die siRNA-vermittelte Expressionshemmung untersucht. Dazu wurden folgende lange nicht-kodierende RNAs ausgewählt: RIAN, 2700099C18Rik, Hectd2os, Snhg18, Malat-1, linc-RAM und 1700123M08Rik.

3.4.1. RIAN

Zur Charakterisierung von RIAN wurde zunächst die Expression in verschiedenen Mausmodellen untersucht. Dabei zeigte sich weder für die Calcineurin-transgene noch für die MLP-Knockout Mauslinie eine differentielle Regulation von RIAN im Vergleich zum Wildtyp.

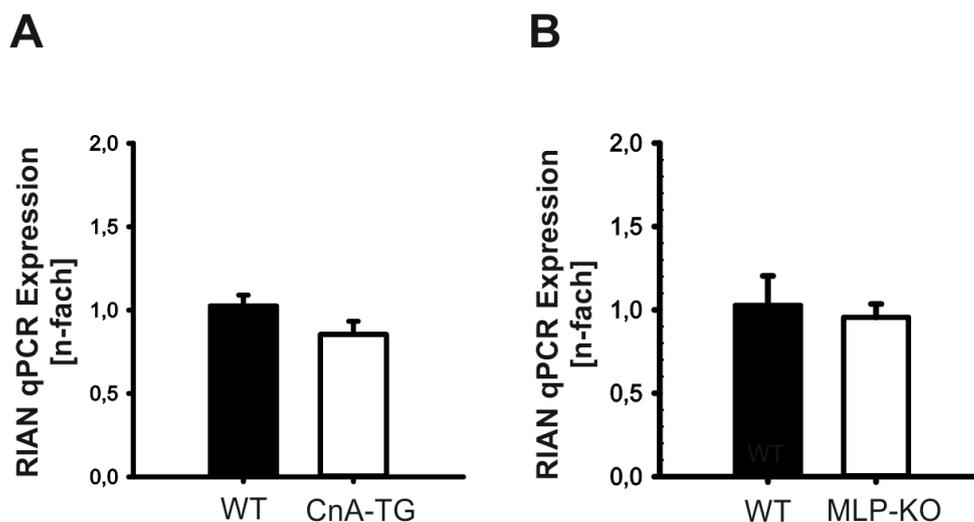


Abbildung 3-7: RIAN zeigt keine differentielle Regulation im Calcineurin-transgenen (CnA-TG) (A) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mausmodell (B). Für die qPCR wurde RNA aus Ventrikeln von Wildtypmäusen, Calcineurin-transgenen und MLP-Knockout Mäusen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit einem spezifischen Primer auf die Expression von RIAN untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. WT n=14/3, CnA n=16, MLP-KO n=5.

Im Hinblick auf die funktionelle Bedeutung von RIAN in der kardialen Hypertrophie wurde die siRNA-vermittelte Expressionshemmung in neonatalen Mauscardiomyozyten evaluiert. Dazu wurden zwei verschiedene siRNAs verwendet, die nach 48 h zu einer Reduktion der RIAN Expression um 71% bzw. 68% führten. Daraufhin kam es zur vermehrten Expression des hypertrophen Genprogramms (1,95-fache bzw. 2,41-fache Induktion von ANF und 1,54-fache bzw. 1,63-fache Induktion von BNP). Die Signifikanz der Effekte liegt bei $p < 0,001$ für ANF und bei $p = 0,004$ für BNP. Auch die Expression von RCAN.1.4 stieg um das 1,64-fache bzw. 2,40-fache nach Knockdown. Mit $p = 0,033$ bzw. $p < 0,001$ sind auch diese Ergebnisse als signifikant zu erachten.

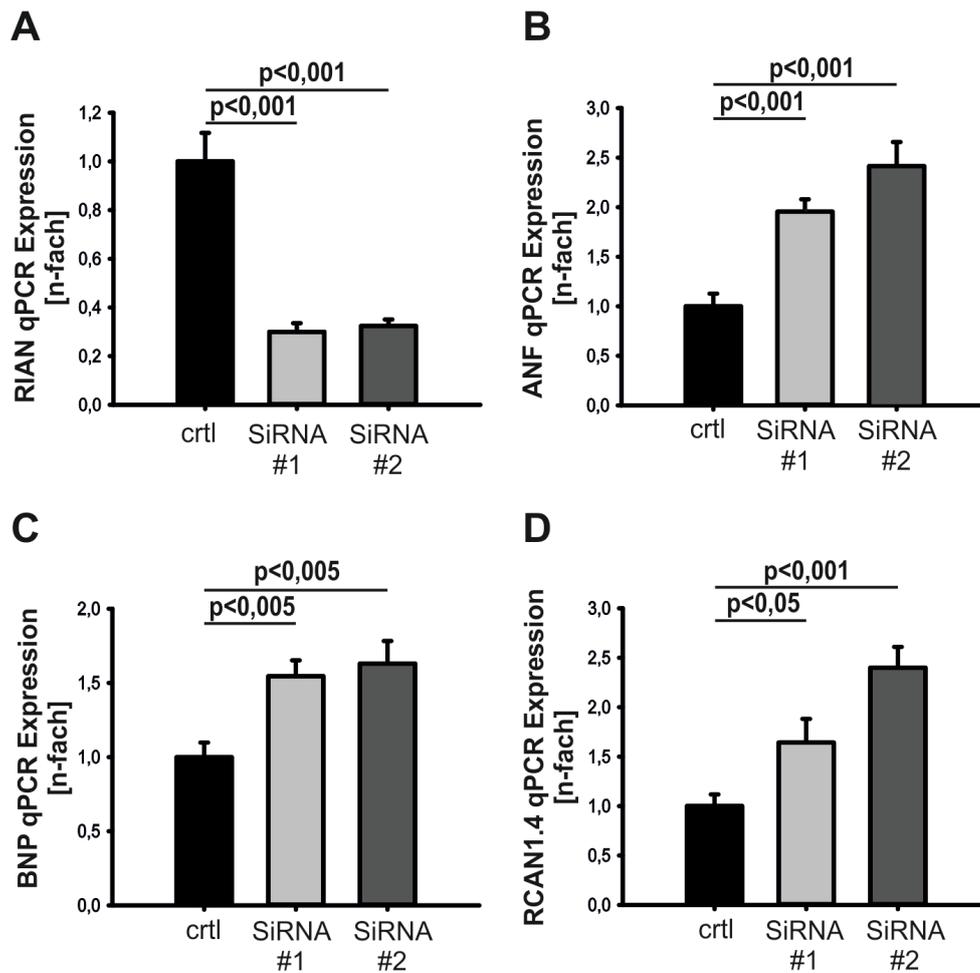


Abbildung 3-8: siRNA-vermittelte Expressionshemmung von RIAN in NMCM führt zur Induktion des hypertrophen Genprogramms. NMCM wurden mit zwei für RIAN spezifischen siRNAs transfiziert und für 48 h inkubiert. Die aus den geernteten Zellen gewonnene RNA wurde für die qPCR zu cDNA umgeschrieben. Die qPCR zeigte eine Reduktion der RIAN-Expression durch siRNA #1 und #2 (A) sowie einen Anstieg der kardialen Hypertrophiemarker ANF, BNP und RCAN1.4 (B-D). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je $n=3$.

3.4.2. 2700099C1Rik

Die Expression von 2700099C1Rik der Calcineurin-transgenen und der MLP-Knockout Mauslinie unterscheidet sich nicht signifikant von der Expression von 2700099C1Rik des Wildtyps.

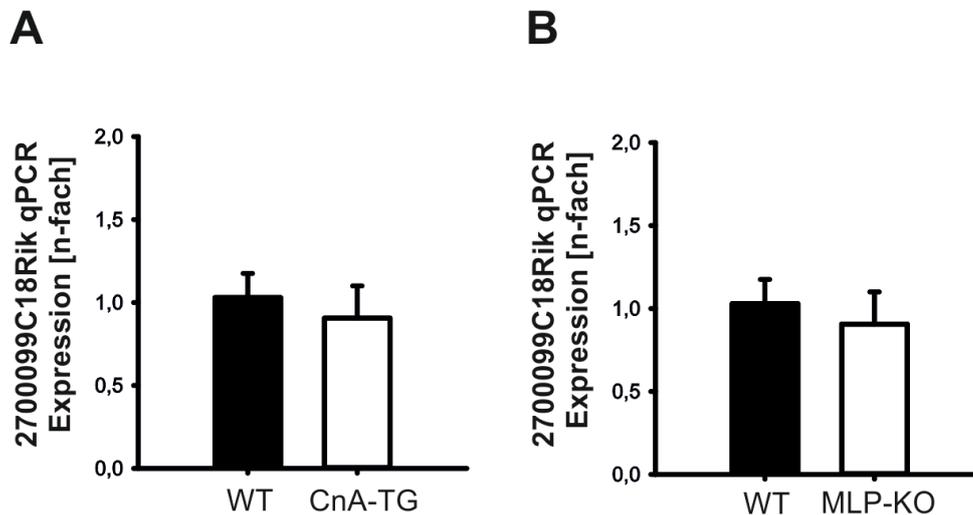


Abbildung 3-9: 2700099C18Rik zeigt keine differentielle Regulation im Calcineurin-transgenen (CnA-TG) (A) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mausmodell (B). Für die qPCR wurde RNA aus Ventrikeln von Wildtypmäusen, Calcineurin-transgenen und MLP-Knockout Mäusen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit einem spezifischen Primer auf die Expression von 2700099C18Rik untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. WT n=4/5, CnA n=6, MLP-KO n=10.

3.4.3. Hectd2os

Initial wurde die Hectd2os-Expression in verschiedenen Mausmodellen der kardialen Insuffizienz betrachtet. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine 4,66-fach erhöhte Hectd2os-Expression in der Calcineurin-transgenen Mauslinie. Der Unterschied ist mit einem $p < 0,001$ statistisch signifikant. In der MLP-Knockout Mauslinie zeigte sich ebenfalls eine mit $p = 0,004$ statistisch signifikante Steigerung Hectd2os-Expression um das 3,77-fache.

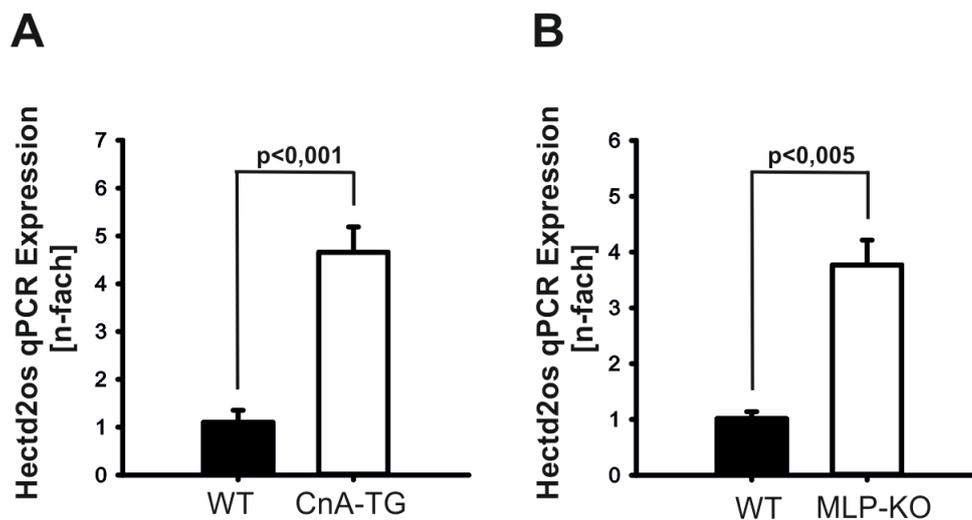


Abbildung 3-10: Hectd2os wird im Calcineurin-transgenen (CnA-TG) (A) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mausmodell gegenüber dem Wildtyp (WT) überexprimiert. Für die qPCR wurde RNA aus Ventrikeln von Wildtypmäusen, Calcineurin-transgenen und MLP-Knockout Mäusen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit einem spezifischen Primer auf die Expression von Hectd2os untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. WT n=4/3, CnA n=6, MLP-KO n=5.

Weiterhin wurde die siRNA-vermittelte Expressionshemmung von Hectd2os in neonatalen Mauskardiomyozyten untersucht. Diese führte zu einer Reduktion der Hectd2os Expression um 64%. Nach 48 h konnten keine statistisch signifikanten Effekte auf die Expression von ANF, BNP und RCAN1.4 in Folge der Expressionshemmung beobachtet werden.

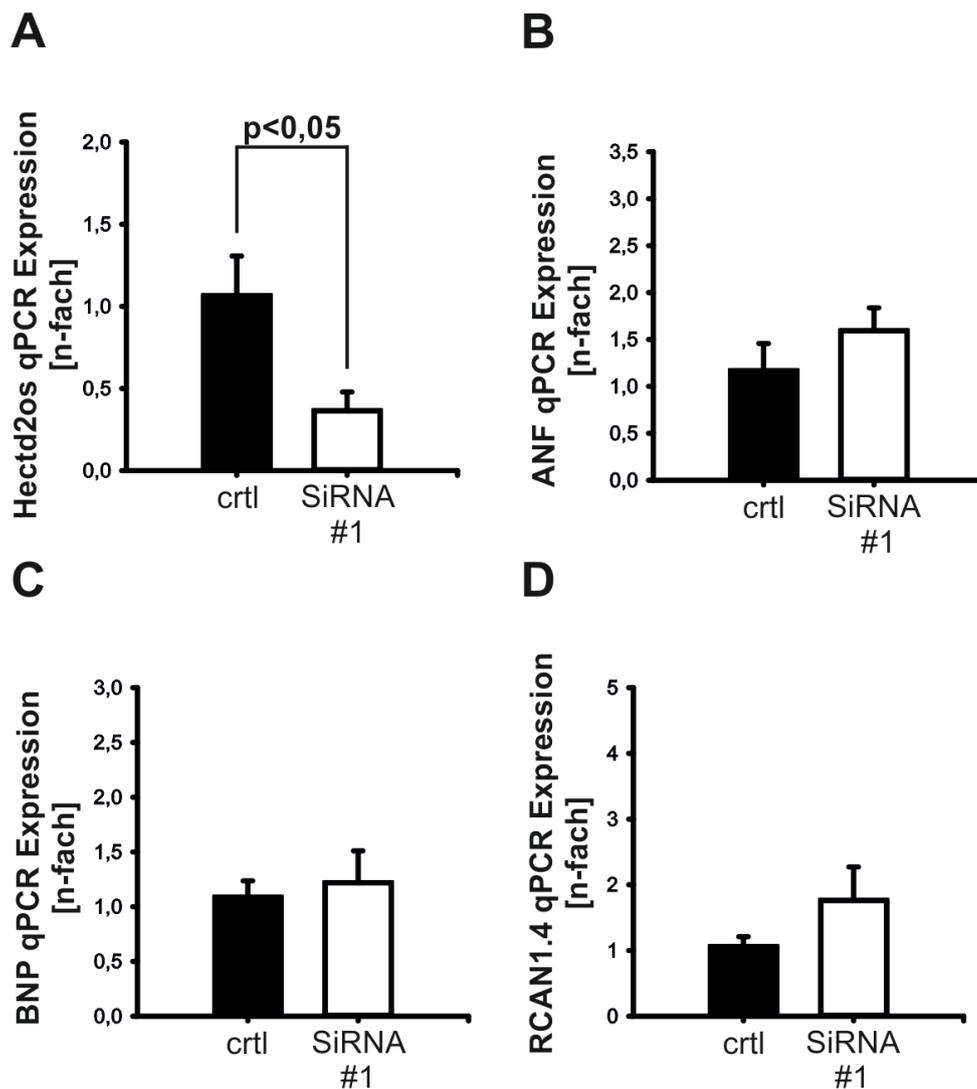


Abbildung 3-11: Die siRNA-vermittelte Expressionshemmung von Hectd2os in NMCM hat keinen Effekt auf die Expression des hypertrophen Genprogramms. NMCM wurden mit einer für Hectd2os spezifischen siRNA transfiziert und für 48 h inkubiert. Die aus den geernteten Zellen gewonnene RNA wurde für die qPCR zu cDNA umgeschrieben. Die qPCR bestätigte die verminderte Hectd2os Expression durch die siRNA (A). Statistisch signifikante Veränderungen in der Expression von ANF, BNP und RCAN1.4 (B-D) zeigten sich nicht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je n=2

3.4.4. Snhg18

Bei Untersuchung der Expression von Snhg18 in verschiedenen murinen Modellen der kardialen Insuffizienz, zeigt sich eine vermehrte Expression von Snhg18 in Calcineurin-transgenen Mäusen. Die gegenüber dem Wildtyp um das 1,87-fach gesteigerte Expression von Snhg18 in Calcineurin-transgenen Mäusen ist mit einem $p < 0,001$ statistisch signifikant. Zwischen der MLP-Knockout Mauslinie und der Wildtyplinie zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression von Snhg18.

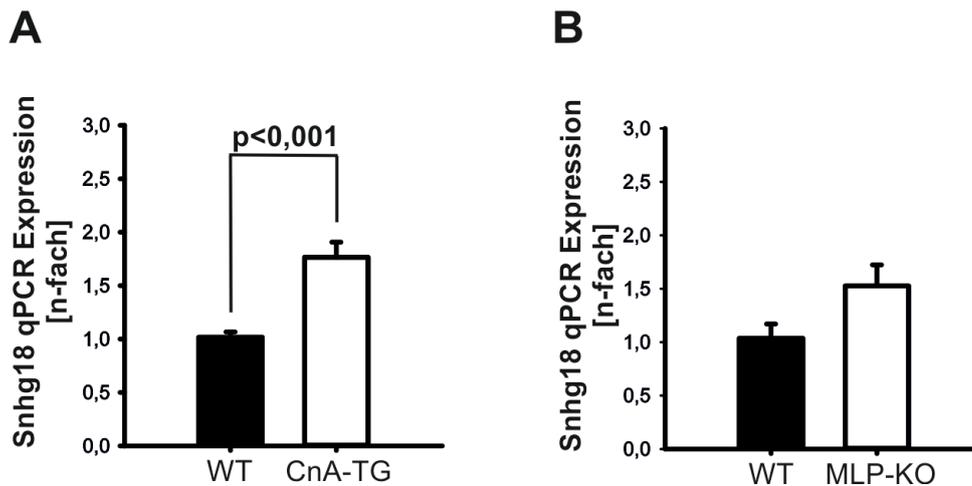


Abbildung 3-12: Snhg18 wird in der Calcineurin-transgenen Mauslinie (CnA-TG) überexprimiert (A). Zwischen Wildtyp (WT) und MLP-Knockout Mauslinie (MLP-KO) zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der Snhg18-Expression (B). Für die qPCR wurde RNA aus Ventrikeln von Wildtypmäusen, Calcineurin-transgenen und MLP-Knockout Mäusen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit einem spezifischen Primer auf die Expression von Snhg18 untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. WT n=14/5, CnA n=16, MLP-KO n=10.

Zur Evaluation der funktionellen Bedeutung von Snhg18 für die kardiale Hypertrophie wurden die Effekte der siRNA-vermittelten Expressionshemmung auf das hypertrophe Genprogramm in neonatalen Mauskardiomyozyten untersucht. Durch die verwendeten siRNAs konnte eine Reduktion der Expression von Snhg18 um 68% bzw. 72% erreicht werden. Nach 48 h zeigte sich eine 1,43-fach bzw. 1,79-fach gesteigerte Expression von ANF sowie eine 1,20-fach bzw. 1,63-fach gesteigerte Expression von BNP. Die Effekte von siRNA #2 sind mit einem $p=0,014$ bzw. $p=0,001$ als statistisch signifikant zu bewerten. Die Expression von RCAN1.4 zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen in Folge der Expressionshemmung.

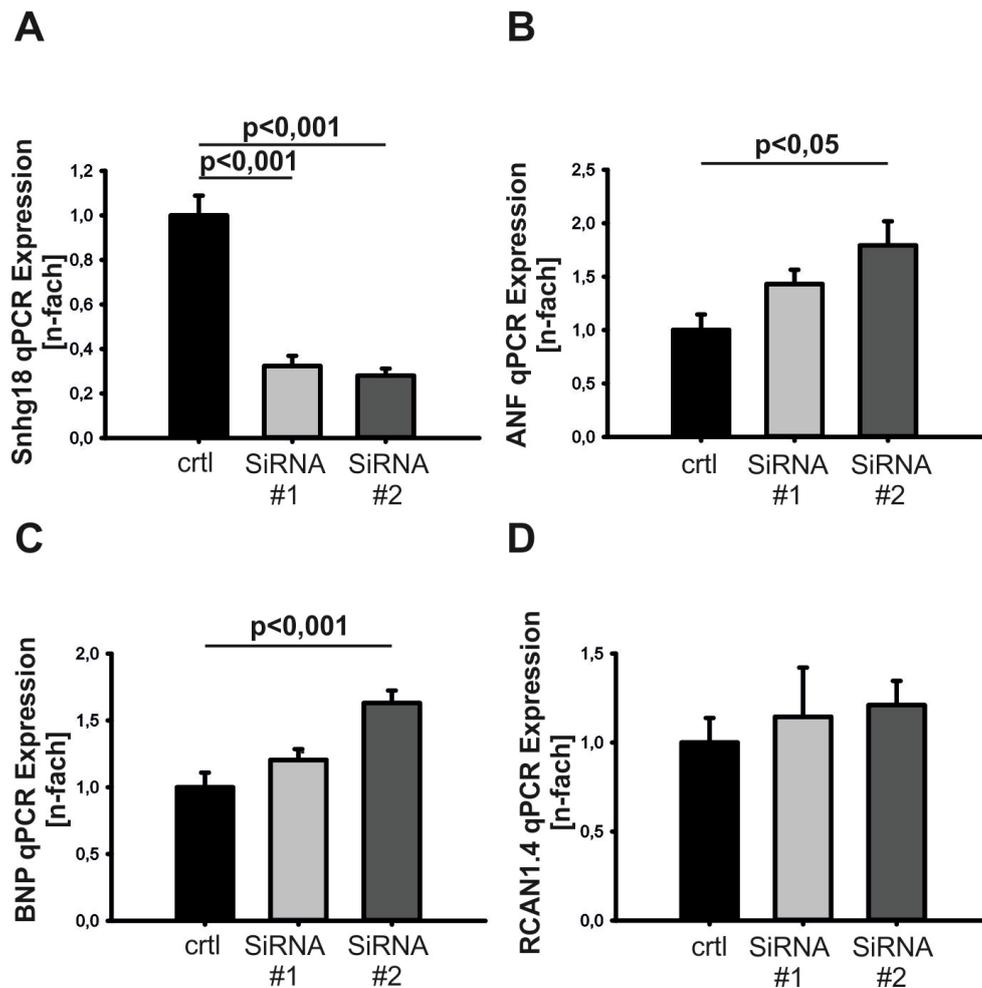


Abbildung 3-13: Die siRNA-vermittelte Hemmung der Expression von Snhg18 in NMCM führt zur Induktion von ANF und BNP. NMCM wurden mit zwei für Snhg18 spezifischen siRNAs transfiziert und für 48 h inkubiert. Die aus den geernteten Zellen isolierte RNA wurde für die qPCR zu cDNA umgeschrieben. Dabei zeigte sich in Folge der reduzierten Snhg18-Expression (A) ein Anstieg von ANF und BNP(B-C). Die Expression von RCAN1.4 blieb unverändert (D). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je n=3.

Um weitere Einblicke in die Funktion von Snhg18 zu erhalten, wurde Snhg18 in neonatalen Muskardiomyozyten überexprimiert. Dazu wurde wie in Abschnitt 2.4.9 beschrieben ein Überexpressionskonstrukt mit Hilfe der Gateway-Technologie[®] hergestellt. Als Zielvektor wurde pcDNA-DEST40 verwendet. Nach erfolgreicher Klonierung erfolgte die Transfektion von neonatalen Muskardiomyozyten mit Lipofectamin 2000 und dem pcDNA-DEST40-Snhg18-Konstrukt. So konnte eine 117-fache Überexpression von Snhg18 erreicht werden. 48 h nach Transfektion zeigten sich keine statistisch signifikanten Effekte der Überexpression auf die Expression von ANF, BNP und RCAN1.4.

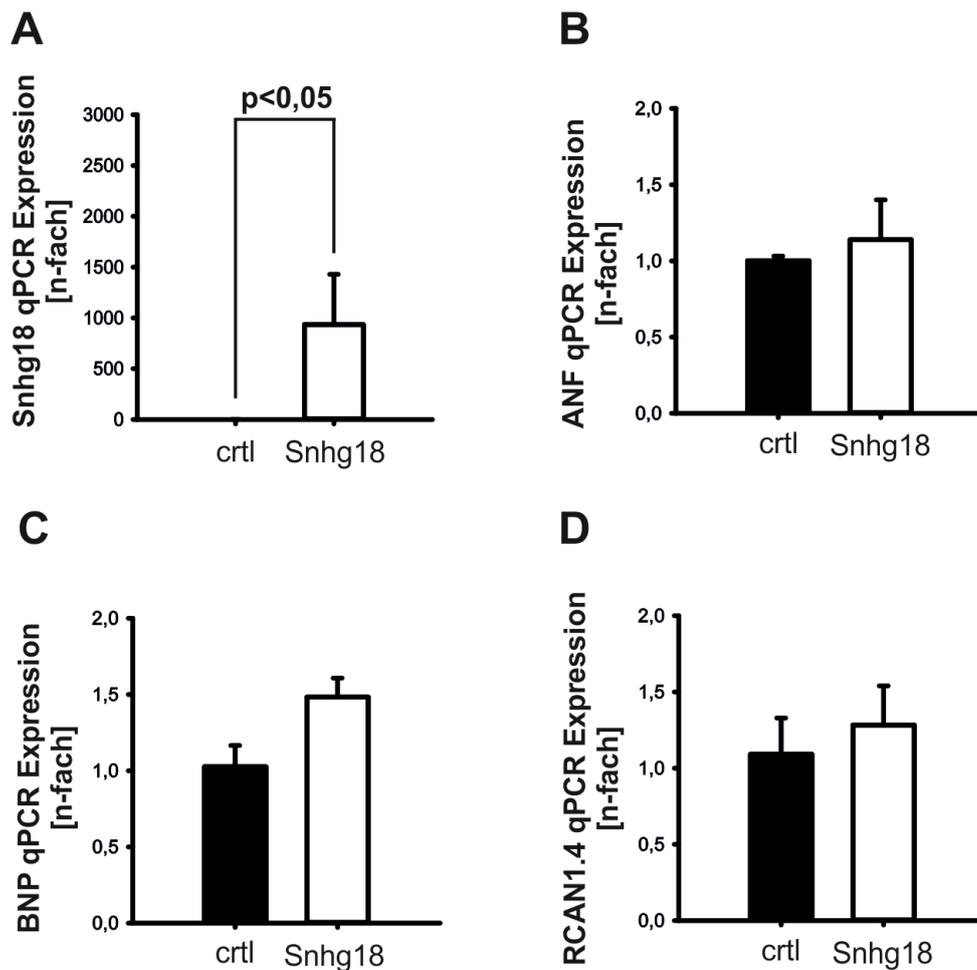


Abbildung 3-14: Die Überexpression von Snhg18 in NMCM führt nicht zu signifikanten Alternationen des hypertrophen Genprogramms. NMCM wurden mit 1 µg des pcDNA-DEST40-Snhg18-Konstrukts transfiziert und für 48 h inkubiert. Die aus den geernteten Zellen isolierte RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und mittels qPCR auf die Expression von Snhg18 sowie des hypertrophen Genprogramms untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Überexpression von Snhg18 (A). Die Expression von ANF, BNP und RCAN1.4 blieb nach Transfektion unverändert (B-D). Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je n=3.

3.4.5. Malat-1

Die funktionelle Bedeutung von Malat-1 wurde durch Expressionshemmung in neonatalen Mauskardiomyozyten untersucht. Die verwendete GapmeR führte zu einer Reduktion der Expression von Malat-1 um 91%. 48 h nach Transfektion wurde die Expression des hypertrophen Genprogramms überprüft. Dabei zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expression von ANF, BNP und RCAN1.4 in Folge der Expressionshemmung.

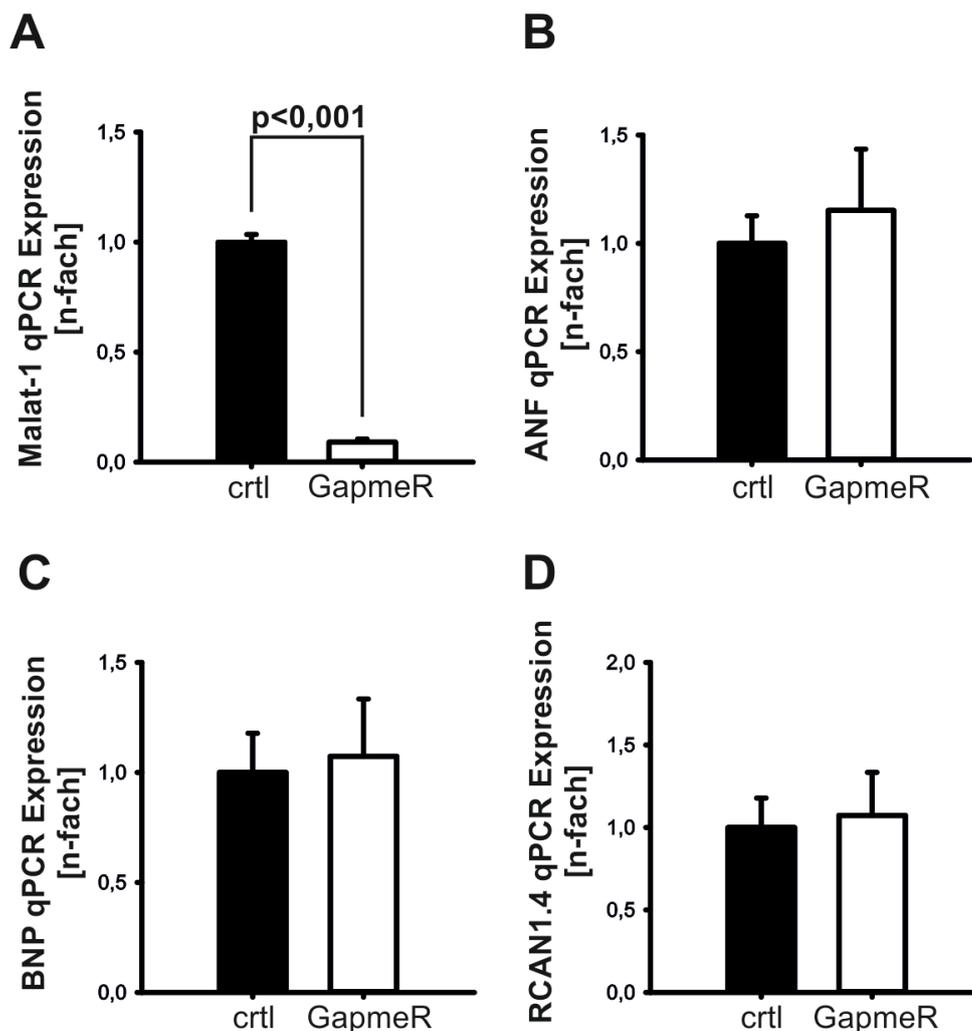


Abbildung 3-15: Die Expressionshemmung von Malat-1 in NMCM mittels GapmeR führt zu keiner Alternation des hypertrophen Genprogramms. NMCM wurden mit einer für Malat-1 spezifischen GapmeR transfiziert und für 48 h inkubiert. Die aus den geernteten Zellen isolierte RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und mittels qPCR auf die Expression von Malat-1 und des hypertrophen Genprogramms untersucht. Es bestätigte sich eine Reduktion der Expression von Malat-1 nach Transfektion (A). In Folge dessen, zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Expression von ANF, BNP und RCAN1.4 (B-D). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je n=2.

3.4.6. linc-RAM

Bei Betrachtung verschiedener Mausmodelle der Herzinsuffizienz, zeigt sich in der Calcineurin-transgenen Mauslinie eine Verminderung der linc-RAM-Expression um 76% gegenüber der Wildtyplinie. Mit einem $p < 0,001$ ist die verminderte Expression statistisch signifikant. Mäuse der MLP-Knockout Linie zeigten gegenüber der Wildtyplinie keine veränderte Expression von linc-RAM.

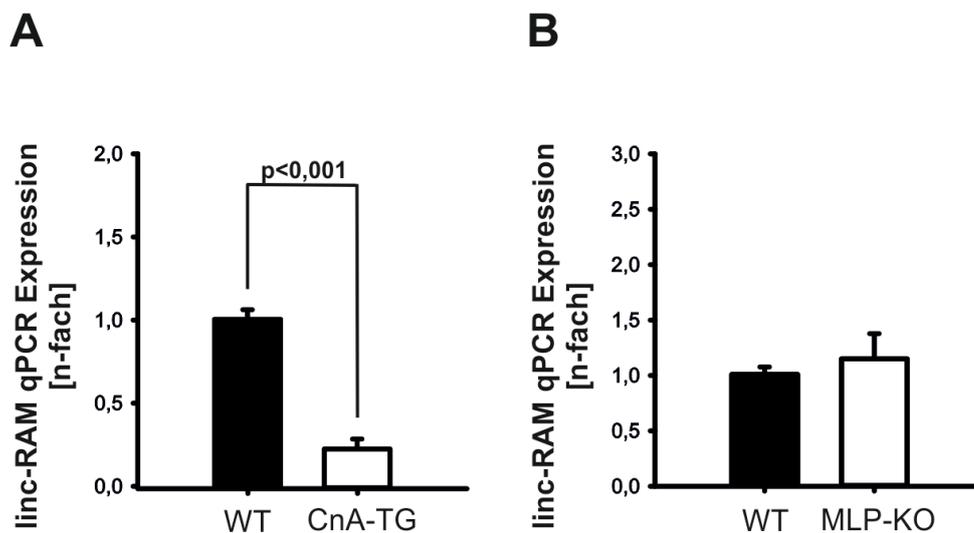


Abbildung 3-16: Die Expression von linc-RAM ist in der Calcineurin-transgenen Mauslinie (CnA-TG) im Vergleich zur Wildtyplinie (WT) signifikant vermindert (A). Zwischen Wildtyplinie und MLP-Knockout Mauslinie zeigte sich keine Veränderung der linc-RAM-Expression (B). Für die qPCR wurde RNA aus Ventrikeln von Wildtypmäusen, Calcineurin-transgenen und MLP-Knockout Mäusen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit einem spezifischen Primer auf die Expression von linc-RAM untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. WT n=4/5, CnA n=6, MLP-KO n=10.

3.4.7. 1700123M08Rik

Zur Charakterisierung von 1700123M08Rik wurde zunächst die Expression im Calcineurin-transgenen und MLP-Knockout Mausmodell untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Alternationen der Expression von 1700123M08Rik.

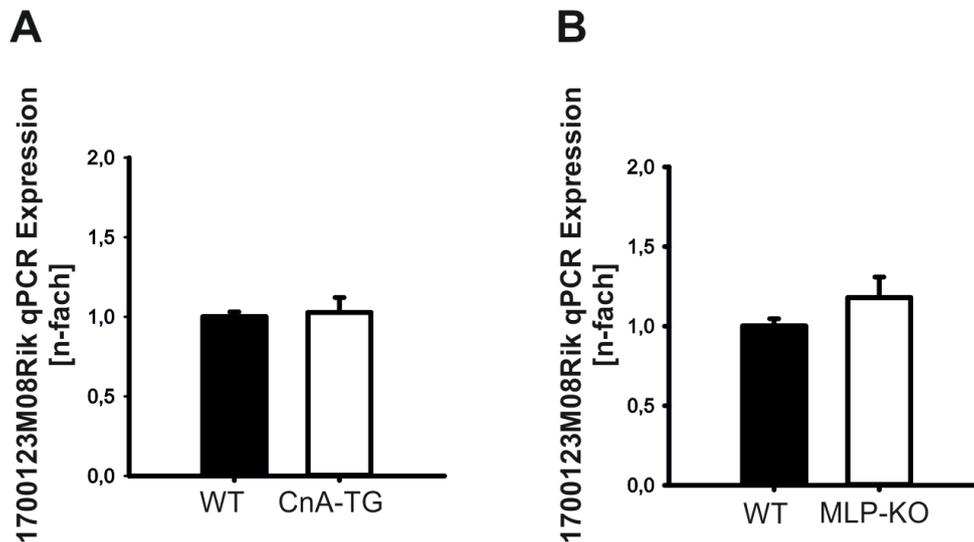


Abbildung 3-17: 1700123M08Rik ist im Calcineurin-transgenen (CnA-TG) (A) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mausmodell (B) nicht differentiell reguliert. Für die qPCR wurde RNA aus Ventrikeln von Wildtypmäusen, Calcineurin-transgenen und MLP-Knockout Mäusen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit einem spezifischen Primer auf die Expression von 1700123M08Rik untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. WT n=4/3, CnA n=6, MLP-KO n=5.

Weiterhin wurden die Effekte der siRNA-vermittelten Expressionshemmung von 1700123M08Rik auf die Expression des hypertrophen Genprogramms ermittelt. Dabei konnte 48 h nach Transfektion eine Reduktion der Expression von 1700123M08Rik um 51% bzw. 31% durch die verwendeten siRNAs erreicht werden. In Folge dessen konnte eine Induktion des hypertrophen Genprogramms beobachtet werden. So zeigte sich ein mit $p < 0,001$ statistisch signifikanter Anstieg der ANF-Expression auf das 2,51-fache bzw. das 2,18-fache. Die Expression von BNP stieg 2,22-fach bzw. 1,42-fach. Die Signifikanz der Ergebnisse liegt bei $p = 0,004$ bzw. $p = 0,011$. Ebenso konnte eine mit $p = 0,016$ bzw. $p < 0,001$ statistisch signifikante Zunahme der RCAN1.4-Expression um das 2,14-fache bzw. 2,47-fache beobachtet werden.

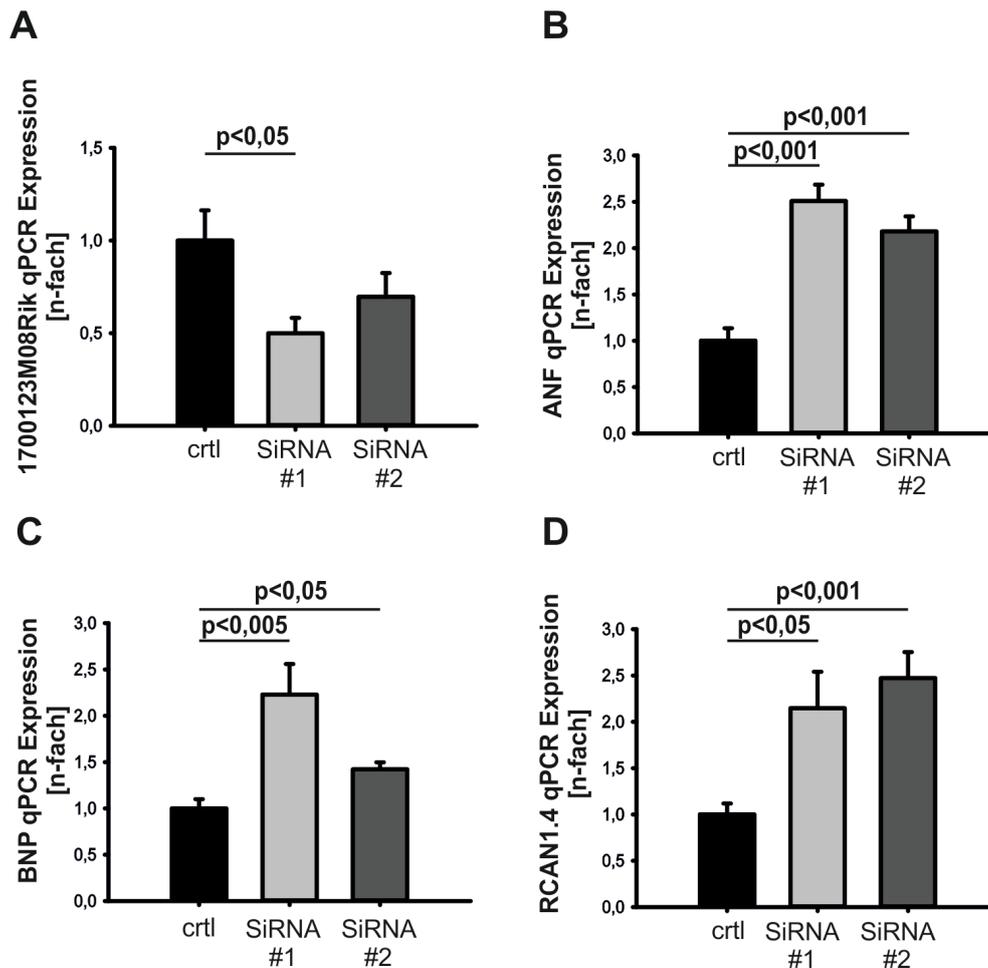


Abbildung 3-18: Die siRNA-vermittelte Expressionshemmung von 1700123M08Rik in NMCM führt zur Induktion des hypertrophen Genprogramms. NMCM wurden mit zwei für 1700123M08Rik-spezifischen siRNAs transfiziert und für 48 h inkubiert. Die aus den geernteten Zellen isoliert RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und mittels qPCR auf die Expression von 1700123M08Rik, sowie des hypertrophen Genprogramms, untersucht. Es zeigte sich in Folge der verminderten Expression von 1700123M08Rik (A) ein Anstieg der Expression von ANF, BNP und RCAN1.4 (B-D). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je n=3.

Daraufhin wurde ein Überexpressionskonstrukt zur weiteren funktionellen Charakterisierung von 1700123M08Rik hergestellt. Die Klonierung erfolgte wie in Abschnitt 2.4.9 beschrieben mit Hilfe der Gateway-Technologie®. Über mehrere Zwischenschritte wurde die Sequenz von 1700123M08Rik in den Zielvektor pcDNA-DEST40 eingefügt. Nach erfolgreicher Klonierung wurden neonatale Mauskardiomyozyten mit Lipofectamin 2000 und dem pcDNA-DEST40-1700123M08Rik-Konstrukt transfiziert. 48 h nach Transfektion ergab sich eine mit $p=0,002$ statistisch signifikante Überexpression um das 884-fache. Signifikante Veränderungen des hypertrophen Genprogramms konnten in Folge der Überexpression nicht beobachtet werden.

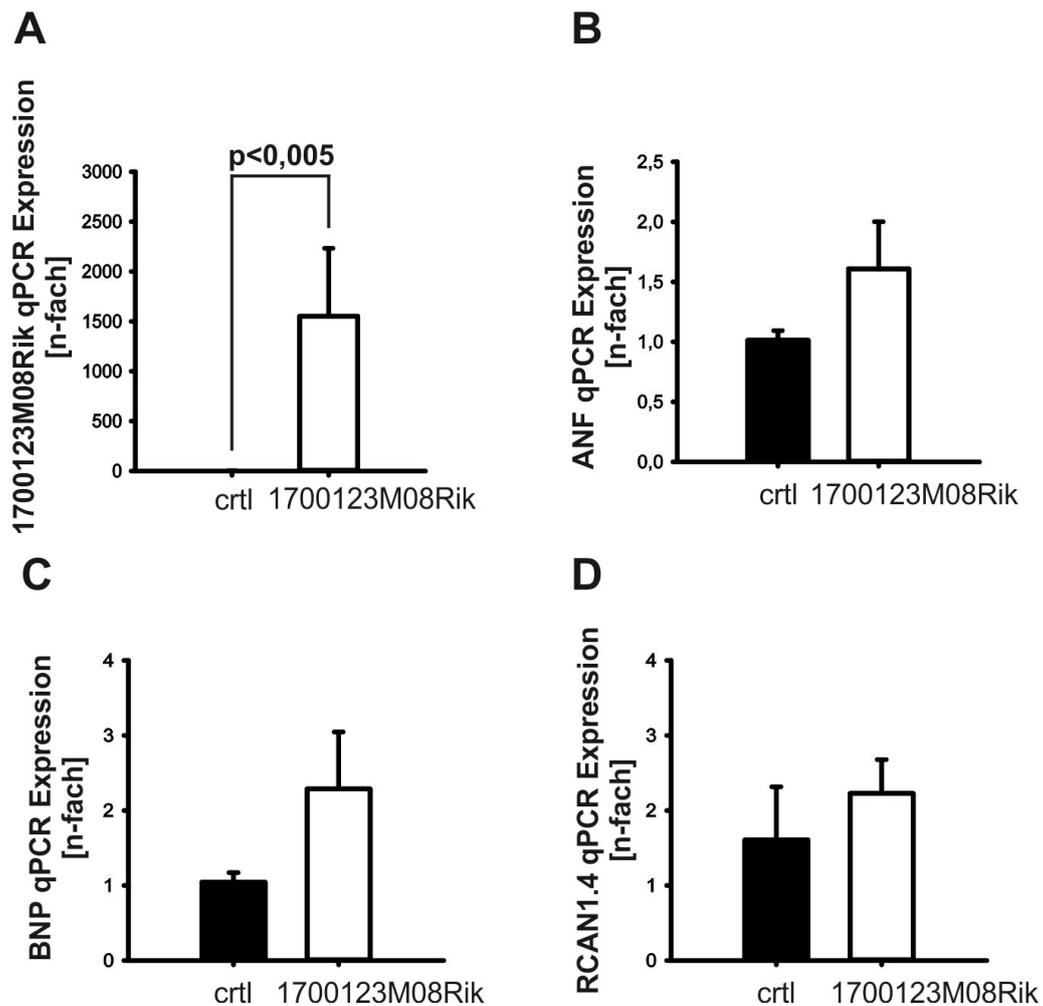


Abbildung 3-19: Die Überexpression von 1700123M08Rik in NMCM führte zu keiner Alternation des hypertrophen Genprogramms. NMCM wurden mit 1 µg des pcDNA-DEST40-1700123M08Rik transfiziert und für 48 h inkubiert. Die aus den geernteten Zellen isolierte RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und mittels qPCR auf die Expression von 1700123M08Rik sowie des hypertrophen Genprogramms untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Überexpression von 1700123M08Rik (A). Statistisch signifikante Veränderung der Expression von ANF, BNP und RCAN1.4 zeigten sich nicht (B-D). Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je n=3.

3.5. AK012407 kodiert für ein 64 Aminosäuren langes Peptid namens Overexpressed in Colon Carcinoma 1 (OCC-1)

Neben der differentiellen Regulation der 7 zuvor beschriebenen langen nicht-kodierenden RNAs im TAC-Modell, zeigte das Microarray eine 3,2-fach erhöhte Expression von AK012407 in der TAC-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Doch die Sequenzanalyse zeigte, dass AK012407 einen offenen Leserahmen für das 64 Aminosäuren lange Peptid Overexpressed in Colon Carcinoma 1 (OCC-1) enthält (Pibouin, Villaudy et al. 2002).

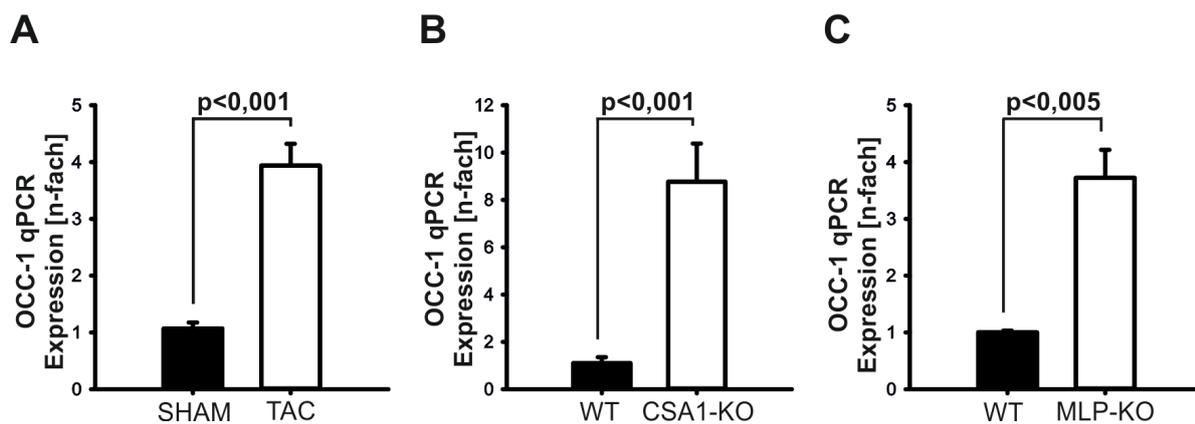


Abbildung 3-20: Overexpressed in Colon Carcinoma (OCC-1) wird in verschiedenen Mausmodellen überexprimiert. Für die qPCR wurde RNA aus Ventrikeln von Wildtypmäusen (WT), Calsarcin-Knockout (CSA1-KO) und MLP-Knockout (MLP-KO) Mäusen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit einem spezifischen Primer auf die Expression von OCC-1 untersucht. Die gegenüber der Kontrollgruppe (SHAM) vermehrte Expression von OCC-1 in der TAC-Gruppe konnte mittels qPCR bestätigt werden (A). Darüber hinaus ist die Expression von OCC-1 auch im Calsarcin-Knockout (B) sowie im MLP-Knockout Mausmodell (C) gegenüber dem Wildtyp erhöht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. SHAM n=9, TAC=5 WT n=6/4, CSA1-KO n=6, MLP-KO n=9.

Indes konnte die Überexpression von OCC-1 in der TAC-Gruppe durch qPCR bestätigt werden. Hier zeigte sich eine mit $p < 0,001$ statistisch signifikante um das 3,93-fach erhöhte Expression von OCC-1 in der TAC-Gruppe. Des Weiteren konnte gegenüber der Wildtyplinie eine 8,76-fach gesteigerte OCC-1-Expression in der Calsarcin1-Knockout Mauslinie sowie eine 3,72-fach gesteigerte OCC-1-Expression in der MLP-Knockout Mauslinie beobachtet werden. Beide Ergebnisse sind mit $p < 0,001$ statistisch signifikant.

Auch die Western Blot Analyse zeigte eine um das 1,41-fache vermehrte Expression von OCC-1 in der TAC-Gruppe gegenüber der SHAM-Gruppe. Statistisch war das Ergebnis nicht signifikant.

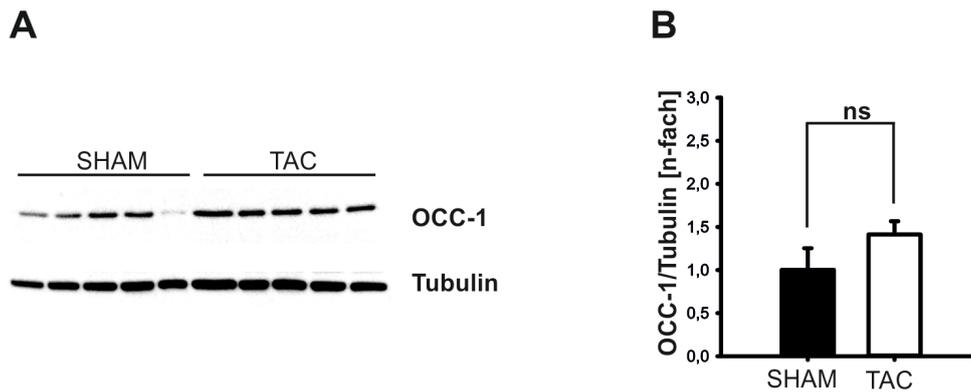


Abbildung 3-21: In der Western Blot Analyse zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Überexpression des OCC-1 Peptids in der TAC-Gruppe. Für die Western Blot Analyse wurde Protein aus dem Herzgewebe der TAC- und SHAM-Gruppe isoliert. Nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz wurde die Proteinexpression von OCC-1 mittels Western Blot bestimmt. Als endogene Ladekontrolle diente α -Tubulin. Abbildung (A) zeigt den Western Blot für OCC-1 und Abbildung (B) die densitometrisch-ermittelte relative OCC-1 Expression. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. SHAM n=5, TAC n=5

Um einen Einblick in die Funktion von OCC-1 zu erhalten, wurde zunächst die Expression von OCC-1 in verschiedenen Geweben bestimmt. Die höchste Expression von OCC-1 zeigte sich dabei in Gehirn, Leber und Hoden. Die geringste Expression von OCC-1 trat in der Milz auf. In Herz, Muskel und Lunge zeigte sich eine moderate OCC-1 Expression.

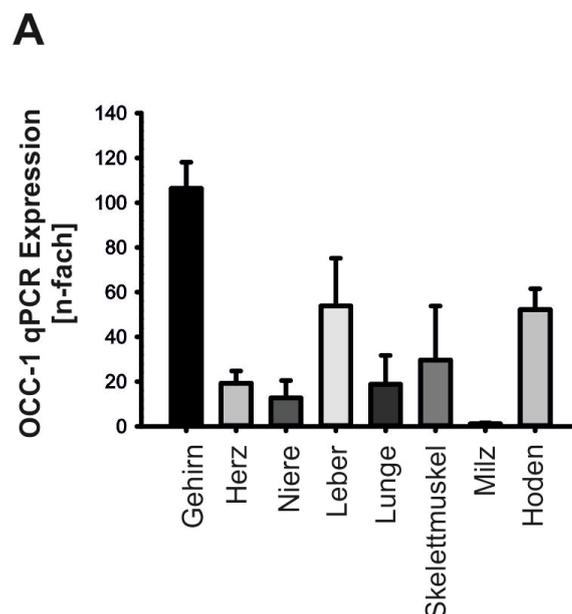


Abbildung 3-22: Expression von Overexpressed in Colon Carcinoma (OCC-1) in verschiedenen Geweben mittels qPCR. Es wurde RNA aus verschiedenen Geweben einer Maus der Wildtypelinie isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mittels qPCR auf die Expression von OCC-1 untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Weiterhin erfolgte die immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der intrazellulären Lokalisation von OCC-1 in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten. Dazu wurde das Peptid mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers unter nativen Bedingungen sowie nach

adenoviraler Überexpression angefärbt. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde ein Adenovirus generiert, welches am N-terminalen Ende der OCC-1 Sequenz ein grün fluoreszierendes Protein als Tag (N-GFP) enthält. OCC-1 stellte sich punktförmig im Zytoplasma mit perinuklearen Verdichtungen dar.

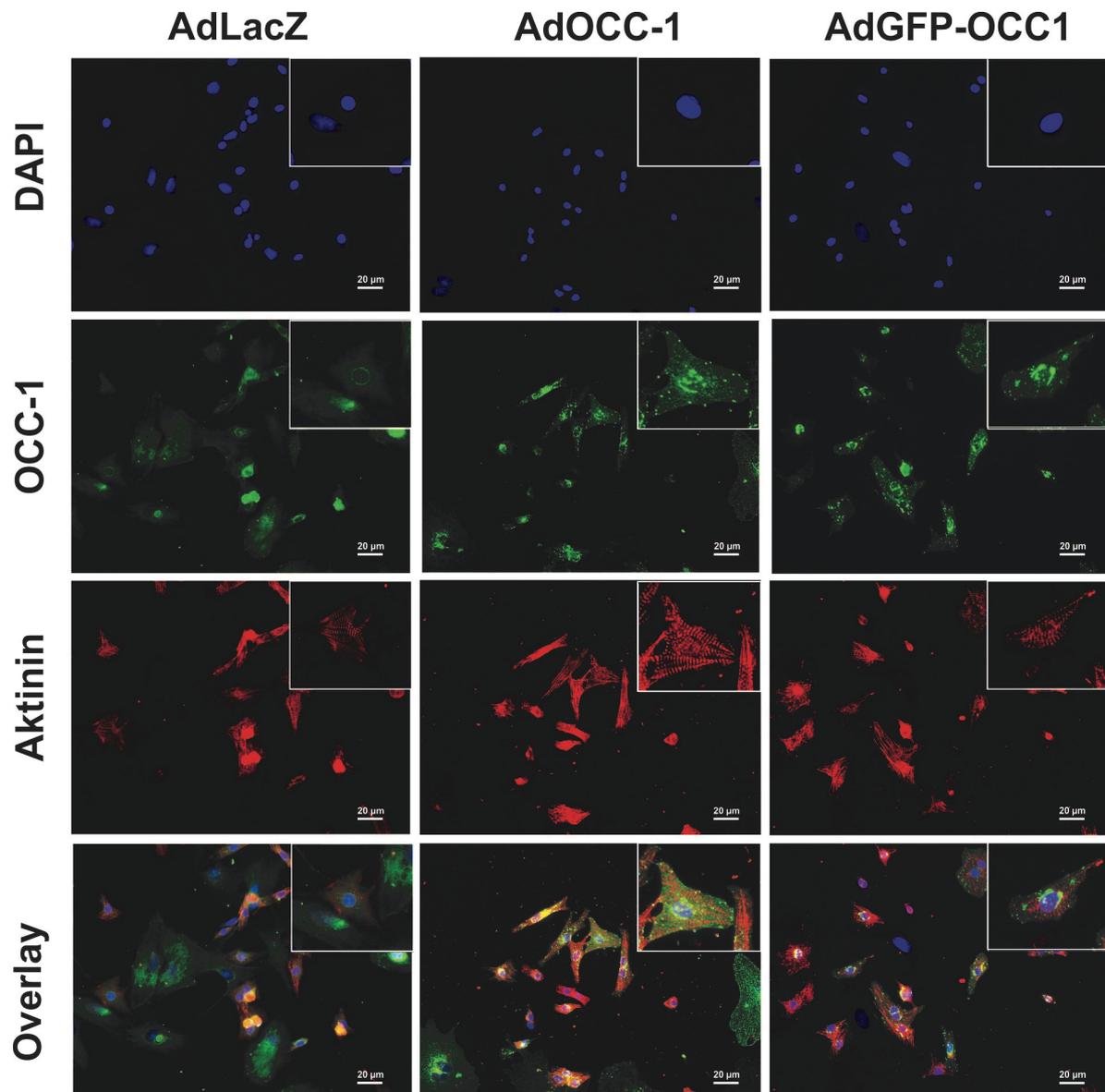


Abbildung 3-23: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lokalisation von OCC-1 in NRVCN. OCC-1 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers unter nativen (lacZ) sowie nach adenoviraler Überexpression (AdOCC-1) im grünen Kanal dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI im blauen Kanal und Aktinin als Kofärbung im roten Kanal dargestellt. Es zeigt sich eine punktförmige perinukleare Lokalisation von OCC-1. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde ein Adenovirus hergestellt, das am N-terminalen Ende der OCC-1 Sequenz ein GFP-Tag enthält (NGFP OCC-1).

Zur Evaluation der funktionellen Relevanz von OCC-1 für die kardiale Hypertrophie wurde die siRNA vermittelte Expressionshemmung in neonatalen Mauscardiomyozyten untersucht. Durch die verwendeten siRNAs konnte eine Reduktion der OCC-1-Expression um 56% bzw.

45% erreicht werden. Resultierend konnte eine Induktion des hypertrophen Genprogramms beobachtet werden. Die ANF-Expression stieg um das 1,36-fache bzw. das 1,62-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die BNP-Expression stieg um das 1,50-fache bzw. das 1,63-fache. Ebenso konnte ein mit $p=0,013$ bzw. $p=0,002$ statistisch signifikanter Anstieg von RCAN1.4 um das 1,59-fache bzw. um das 1,73-fache verzeichnet werden.

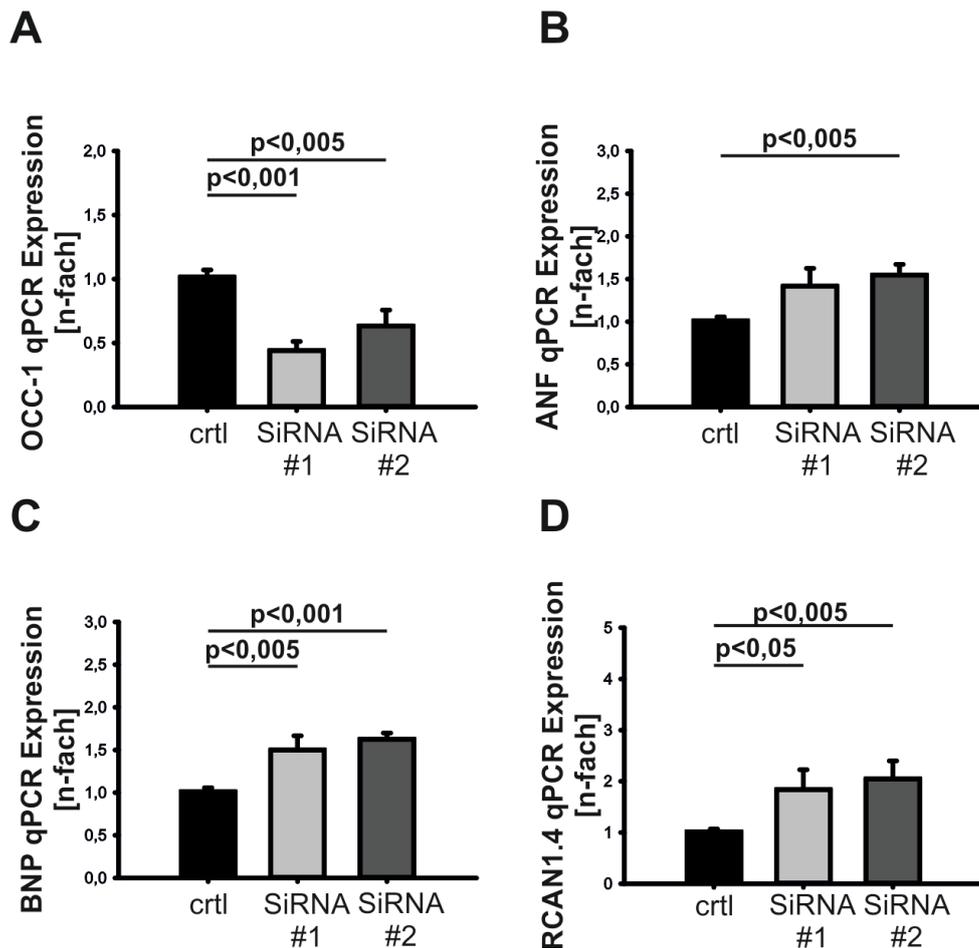


Abbildung 3-24: Die siRNA-vermittelte Expressionshemmung von OCC-1 führte zur Induktion des hypertrophen Genprogramms. NMCM wurden mit zwei für OCC-1 spezifischen siRNAs transfiziert und für 48 h inkubiert. Die aus den geernteten Zellen isolierte RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und mittels qPCR auf die Expression von OCC-1, sowie des hypertrophen Genprogramms, untersucht. Dabei bestätigte sich eine signifikante Reduktion der OCC-1-Expression (A), in deren Folge es zur vermehrten Expression von ANF, BNP und RCAN1.4 kam (B-D). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je $n=3$

Um zwischen den Effekten von AK012407 und OCC-1 zu differenzieren wurden zwei Adenoviren hergestellt. Der erste Virus enthielt die komplette Sequenz von AK012407, während der zweite Virus nur den offenen Leserahmen für OCC-1 enthielt. Da der Versuch der adenoviralen Überexpression in neonatalen Mauskardiomyozyten scheiterte und sich eine ausreichende genetische Konservierung in der Ratte zeigte, wurden die weiteren Analysen in

neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Zunächst wurde der Effekt der beiden verschiedenen Adenoviren auf das hypertrophe Genprogramm unter nativen Bedingungen sowie nach pharmakologischer Hypertrophieinduktion durch Phenylephrin evaluiert. Als α 1-Adrenorezeptor-Agonist führt Phenylephrin (PE) über verschiedene Signalwege zu Alternationen der kardialen Proteinexpression und zu Zunahme der Zellgröße. Unter nativen Bedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression des hypertrophen Genprogramms durch die Behandlung mit den beiden Viren beobachtet werden. Nach Stimulation mit Phenylephrin zeigte sich eine vermehrte Expression des hypertrophen Genprogramms, insbesondere nach Behandlung mit AdOCC. So stieg die ANF-Expression nach Behandlung mit Phenylephrin um das 7,05-fache bei gleichzeitiger Behandlung mit dem Kontrollvirus AdlacZ, um das 7,61-fache bei gleichzeitiger Behandlung mit AdAK012407 sowie um das 8,57-fache bei gleichzeitiger Behandlung mit AdOCC-1. Weiterhin zeigte sich in stimulierten Kardiomyozyten eine 4,78-fach gesteigerte BNP-Expression bei Infektion mit AdlacZ, eine 5,46-fach gesteigerte BNP-Expression bei Infektion mit AdAK012407 sowie eine 7,54-fach gesteigerte BNP-Expression bei Infektion mit AdOCC-1. Die gegenüber der Behandlung mit AdlacZ und AdAK012407 verstärkte BNP-Induktion durch Phenylephrin bei Infektion mit AdOCC-1 ist mit $p < 0,001$ bzw. $p < 0,029$ statistisch signifikant. Ebenso zeigt sich eine signifikant verstärkte Induktion von RCAN1.4 nach Behandlung mit Phenylephrin und AdOCC-1. Nach Stimulation mit Phenylephrin stieg die RCAN1.4-Expression um das 1,47-fache bei Infektion mit AdlacZ, um das 1,74-fache bei Infektion mit AdAK012407 sowie um das 2,39-fache bei Infektion mit AdOCC-1.

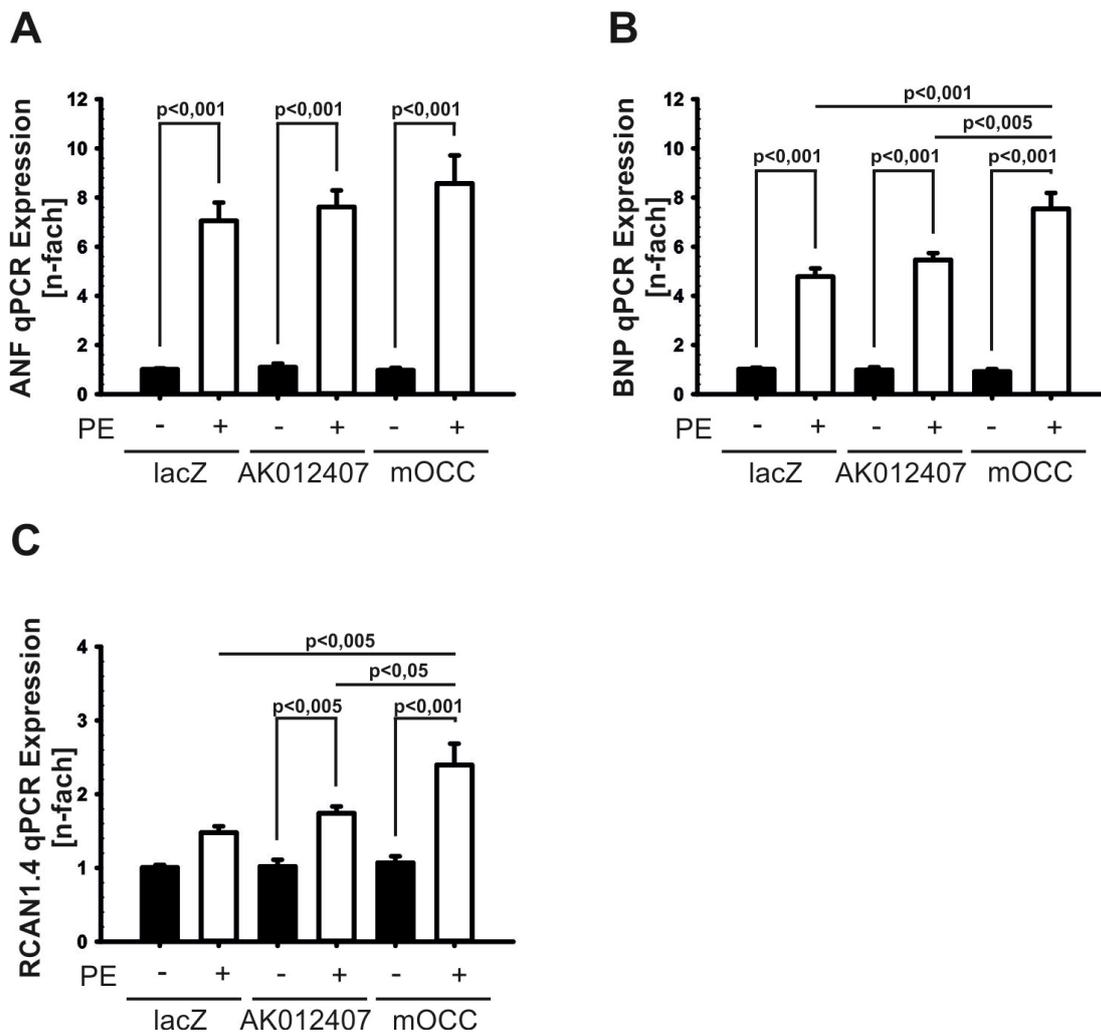


Abbildung 3-25: Expression des fetalen Genprogramms nach Behandlung von NRVCMs mit AdAk012407 und AdOCC-1 unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit Phenylephrin (PE). NRVCMs wurden mit 25 moi AdlacZ, AdAK12407 und AdOCC-1 infiziert. Nach 24 h und 48 h Inkubation erfolgte die Stimulation mit je 100 μ M PE. Die aus den geernteten Zellen isolierte RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und mittels qPCR auf die Expression des hypertrophen Genprogramms untersucht. Dabei zeigte sich eine verstärkte Induktion von BNP (B) und RCAN1.4 (C) nach Stimulation bei Infektion mit AdOCC-1. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je n=3.

Zur weiteren Evaluation des hypertrophen Effekts von AdOCC-1 wurde eine immunfluoreszenzmikroskopische Zellgrößenbestimmung in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Dabei wurde die Zellgröße nach Infektion mit AdlacZ, AdAK012407 und AdOCC-1 unter nativen Bedingungen sowie nach Stimulation mit Phenylephrin betrachtet. Unter nativen Bedingungen zeigte sich im Vergleich zur Behandlung mit AdlacZ eine Zunahme der Zellgröße bei Behandlung mit AdOCC-1 um 15%. Die Größenzunahme ist mit $p < 0,001$ statistisch signifikant. Nach Stimulation mit Phenylephrin zeigte sich eine Zunahme der Zellgröße in allen Behandlungsgruppen. Doch der Größenzuwachs der mit AdOCC-1 infizierten Kardiomyozyten nach Stimulation überstieg den

Größenzuwachs der Kontroll- und AdAK012407-Gruppe signifikant. So zeigte sich bei Behandlung mit AdlacZ eine relative Größenzunahme von 11% nach Stimulation mit Phenylephrin, wohingegen bei Behandlung mit AdOCC-1 eine relative Größenzunahme von 46% nach Stimulation zu beobachten war. In Zusammenschau von Expressionsanalyse und Zellgrößenbestimmung zeigt sich eine Steigerung der hypertrophen Effekte von Phenylephrin durch Infektion mit AdOCC-1.

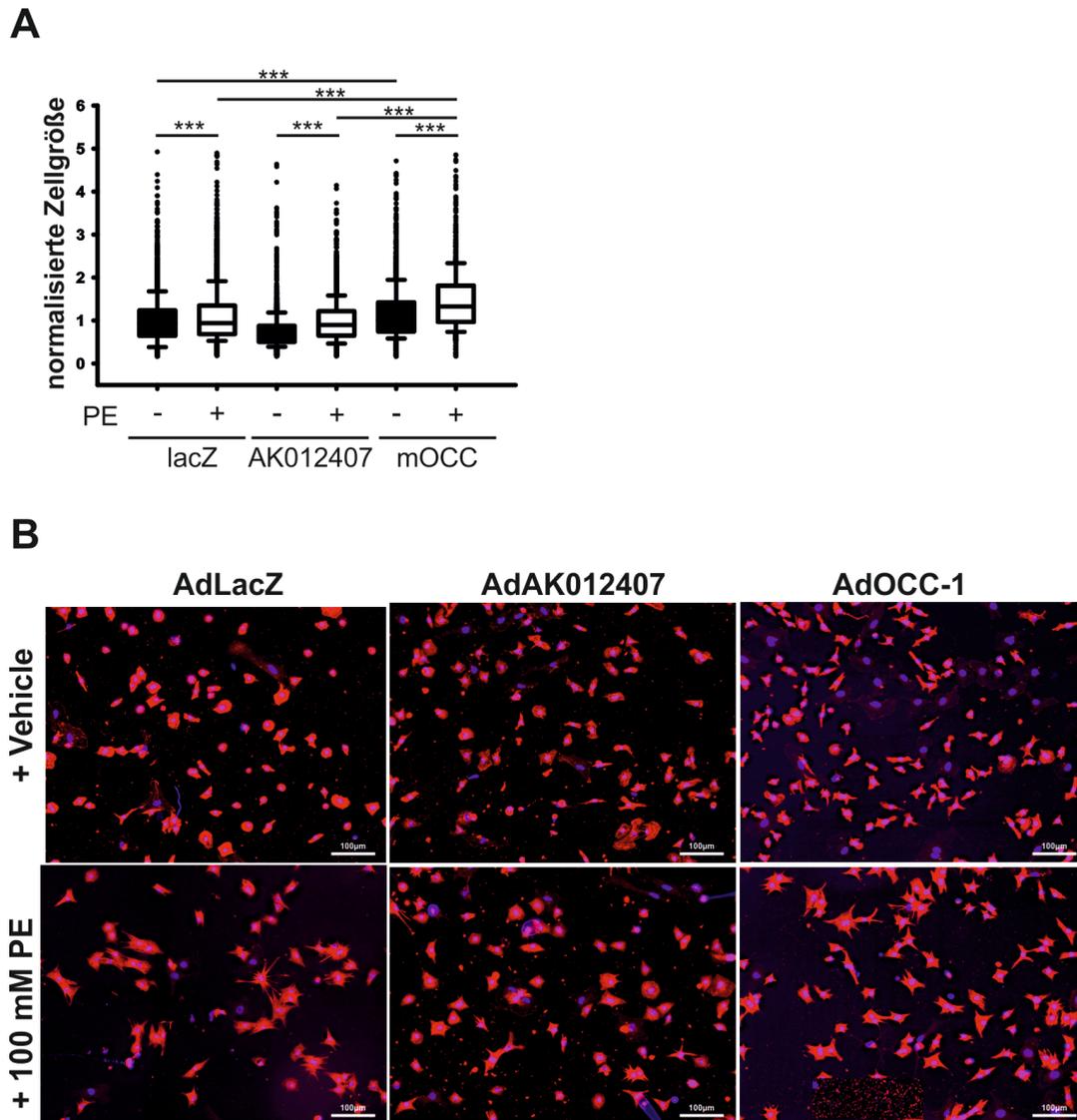


Abbildung 3-26: Immunfluoreszenzmikroskopische Zellgrößenbestimmung in NRVCMs nach Infektion mit AdAK012407 und AdOCC-1 unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit Phenylephrin. NRVCMs wurden auf Coverslips ausgesät und mit 25 moi AdlacZ, AdAK12407 und AdOCC-1 infiziert. Nach 24 h und 48 h Inkubation erfolgte die Stimulation mit je 100 μ M PE. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen fixiert und mit DAPI und α -Aktinin angefärbt. Mit Hilfe einer speziellen Software konnte die Zellgröße immunfluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden. Dabei zeigte sich ein verstärkter hypertropher Effekt der Phenylephrinstimulation bei Infektion mit AdOCC-1 (A). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je n=3.

4. Diskussion

4.1. Biomechanischer Stress führt zu einem distinkten Expressionsmuster langer nicht-kodierender RNAs im Herzen

Mechanische Belastung ist ein bekannter Stimulus für die Entwicklung der kardialen Hypertrophie. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarrayanalysen konnten 1364 lange nicht-kodierende RNAs im Myokard identifiziert werden, die durch transaortale Konstriktion differentiell reguliert zu sein scheinen. Konsistent zu unseren Ergebnissen wurden in der Literatur bereits spezifische Expressionsprofile langer nicht-kodierender RNAs nach experimenteller Nachlasterhöhung beschrieben. Sun et. al. untersuchten die Expression langer nicht-kodierender RNAs vier Wochen nach transaortaler Konstriktion und beschrieben eine differentielle Regulation von 1470 langen nicht-kodierenden RNAs im Mausmyokard ($p < 0,05$) (Sun, Zhang et al. 2014). Gleichwohl zeigte sich in einer ähnlichen Studie im Rattenmyokard eine Vielzahl differentiell regulierter langer nicht-kodierender RNAs. So wurden vier Wochen nach transaortaler Konstriktion 80 lange nicht-kodierende RNAs mit $>2,0$ -fach erhöhter Expression ($p < 0,005$) sowie 172 lange nicht-kodierende RNAs mit einer $<0,5$ -fach erniedrigten Expression nach transaortaler Konstriktion ($p < 0,005$) detektiert (Li, Zhang et al. 2016). Im Gegensatz dazu wurde in einer RNA-Sequenzierungsstudie lediglich die differentielle Regulation von 17 langen nicht-kodierenden RNAs im TAC-Modell beschrieben (Matkovich, Edwards et al. 2014). Eine mögliche Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse könnte in der Anwendung unterschiedlicher statistischer Kriterien liegen. Darüber hinaus wird der Vergleich von Studien durch die abweichende Annotation der langen nicht-kodierenden RNAs erschwert. Hinderlich für die Identifikation für Kardiomyozyten spezifischer Transkripte in allen Studien ist zudem das Vorhandensein von anderen Zelltypen im adulten Myokard (Hermans-Beijnsberger, van Bilsen et al. 2018). Dennoch legen diese Studien die Bedeutung von langen nicht-kodierenden RNAs in der Entwicklung der Herzhypertrophie nahe. Unterstützend ist die differentielle Regulation dieser langen nicht-kodierenden RNAs mit Veränderungen in der Expression von mRNAs assoziiert, die an verschiedenen Signalkaskaden und biologischen Prozessen beteiligt sind (Sun, Zhang et al. 2014; Li, Zhang et al. 2016).

4.2. Charakterisierung pathophysiologisch interessanter langer nicht-kodierenden RNAs

Um weitere Einblicke in die Bedeutung der langen nicht-kodierenden RNAs in der kardialen Hypertrophie zu gewinnen, wählten wir durch Anwendung statistischer Kriterien und Sequenzabgleich in biomedizinischen Datenbanken 7 pathophysiologisch interessante, lange nicht-kodierende RNAs für die weitere Charakterisierung in-vitro aus. Darunter befanden sich neben bis dato nicht charakterisierten Transkripten bekannte lange nicht-kodierende RNAs wie RIAN, Myoregulin und Malat-1.

4.2.1. RNA Imprinted and Accumulated in the Nucleus (RIAN)

Die 3584 Basenpaare umfassende, intergenische, lange nicht-kodierende RNA RIAN ist im Dlk1-Dio3-Cluster auf Chromosom 12 des Mausgenoms lokalisiert. Das über 200 Kilobasen umspannende Cluster enthält neben den langen nicht-kodierenden RNAs Glt2, Anti-Rlt1, RIAN und Mirg über 50 miRNAs und snoRNAs. Ein humanes Homolog des in allen Säugetieren konservierten Clusters befindet sich auf Chromosom 14. Von besonderem Interesse ist die epigenetische Regulation des Dlk1-Dio3-Clusters durch genomisches Imprinting. Zwei Syndrome stehen im Zusammenhang mit fehlerhaftem Imprinting des Dlk1-Dio3-Clusters: das Temple- und das Kagami-Ogata-Syndrom. Charakteristisch für beide Syndrome sind Skelettfehlbildungen, Wachstumsretardierung, metabolische Störung und Muskelhypotonie. Vereinzelt wurden auch kardiale Fehlbildungen wie Ventrikelseptumdefekte oder Kardiomegalie beschrieben. Obwohl verschiedene Mausmodelle mit mutiertem Dlk1-Dio3-Cluster keinen kardialen Phänotyp aufweisen, konnte für zahlreiche dem Cluster entstammende miRNAs sowie für die lange nicht-kodierende RNA Glt2 eine Beteiligung an Herz- und Muskelentwicklung sowie an kardialen Pathologien gezeigt werden. Über 30% der dem Dlk1-Dio3-Cluster entstammenden miRNAs zeigen in murinen Myokardinfarktmodellen eine vermehrte Expression. Unter ihnen befindet sich auch miR-370, deren Vorläufer eine Splicevariante RIANs ist (Dill and Naya 2018). Weitere der 18 bekannten Splicevarianten RIANs sind in die Organogenese von Muskulatur und Gehirn (Gu, He et al. 2011; Gu, He et al. 2012) sowie in die postnatalen metabolischen Anpassung (Labielle, Marty et al. 2014) involviert. In dieser Arbeit wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen RIAN und kardialer Hypertrophie beschrieben. Im TAC-Modell konnte eine signifikant erhöhte Expression von RIAN im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die mit der siRNA-vermittelten

Expressionshemmung von RIAN einhergehende Induktion des hypertrophen Genprogramms deutet auf einen antihypertrophen Effekt RIANS hin.

4.2.2. Linc-RNA Activator of Myogenesis (Linc-RAM) und Myoregulin

Die lange nicht-kodierende RNA Linc-RNA Activator of Myogenesis (Linc-RAM) umfasst 446 Nukleotide und ist auf Chromosom 10 im Mausgenom lokalisiert. Sie zeigt eine spezifische Expression in murinen Skelettmuskelzellen und ist sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma lokalisiert (Yu, Zhang et al. 2017). Zudem kodiert linc-RAM für ein Peptid aus 46 Aminosäuren namens Myoregulin. Myoregulin ist in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert und wird vorwiegend in Muskelfasern Typ A (schnell) exprimiert. Analog zu den verwandten Peptiden Phospholamban und Sarcolipin inhibiert Myoregulin die Aktivität der Calciumpumpe SERCA. Diese steuert die Wiederaufnahme von Calcium ins sarkoplasmatische Retikulum und spielt so eine wichtige Rolle in der Regulation der Muskelfunktion (Anderson, Anderson et al. 2015). Darüber hinaus ist linc-RAM durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MyoD an der Differenzierung von Skelettmuskelzellen beteiligt. Die Deletion von linc-RAM in-vivo resultierte in einer Verminderung der Myofibrillen sowie einer verzögerten Muskelregeneration nach ischämischer Schädigung. In-vitro-Studien belegten zudem den günstigen Effekt von linc-RAMs auf die Myoblastendifferenzierung unabhängig von Myoregulin (Yu, Zhang et al. 2017). Im Myokard wurde eine verminderte Expression von linc-RAM in Infarktgewebe detektiert (Zangrando, Zhang et al. 2014). Wir konnten zudem eine signifikant verminderte Expression von linc-RAM im TAC- und MLP-Knockout-Modell für Herzinsuffizienz nachweisen. Diese differentielle Expression weist auf eine funktionelle Bedeutung linc-RAMs im Myokard hin.

4.2.3. Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (Malat-1)

Malat-1 zählt zu den am besten beschriebenen langen nicht-kodierenden RNAs. Die im humanen Genom auf Chromosom 11 (Mus musculus: Chromosom 19) lokalisierte lange nicht-kodierende RNA ist hoch konserviert und wird ubiquitär in allen menschlichen Geweben exprimiert (Ji, Diederichs et al. 2003). Erstmals in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen beschrieben (Ji, Diederichs et al. 2003; Hutchinson, Ensminger et al. 2007), ist die vermehrte Expression von Malat-1 charakteristisch für verschiedene Tumore und ist mit einer erhöhten Metastasierungsrate sowie mit einem verminderten Patientenüberleben assoziiert (Gutschner, Hammerle et al. 2013; Wu, Lu et al. 2016). Mechanistisch ist Malat-1 durch

Bindung von Serin/Arginin-Splice Faktoren an der Regulation des alternativen Splicings beteiligt (Tripathi, Ellis et al. 2010) und erfüllt darüber hinaus eine regulatorische Funktion in cis (Zhang, Arun et al. 2012). Neben der Beteiligung an der Karzinogenese mehren sich die Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung von Malat-1 bei kardiovaskulären Erkrankungen. Im Mausmodell geht die genetische Ablation von Malat-1 mit einer verminderten Netzhautvaskularisation und einer gehemmten Proliferation der Endothelzellen einher. Weiterhin führte die GapmeR-vermittelte Herunterregulation von Malat-1 in-vivo zu einer verminderten Revaskularisation nach Ischämie (Michalik, You et al. 2014). Zellkulturstudien belegen eine beeinträchtigte Myoblastendifferenzierung nach Expressionshemmung von Malat-1 durch Regulation von miR-133 (Watts, Johnsen et al. 2013; Han, Yang et al. 2015). Diese miRNA wirkt im Herzen über die Hemmung von β_1 -Adrenorezeptoren und des SRF-Signalwegs der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie entgegen (Care, Catalucci et al. 2007; Castaldi, Zaglia et al. 2014). Malat-1 aktiviert zudem den prohypertrophen MAPK-Signalweg (Wu, Wang et al. 2014). Dennoch liefern in-vivo Studien zur funktionellen Bedeutung von Malat-1 in der kardialen Hypertrophie widersprüchliche Ergebnisse. In einem Modell für die diabetische Kardiomyopathie wurde nach Expressionshemmung von Malat-1 ein protektiver Effekt auf die linksventrikuläre Funktion beobachtet. Dahingegen konnten nach transaortaler Konstriktion oder chronischer Angiotensin-II Infusion keine Unterschiede zwischen Malat-1-defizienten und Wildtypmäusen hinsichtlich Myokardhypertrophie, Angiogenese, Inflammation und Fibrose detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse ist die Ausbildung kompensatorischer Mechanismen während der Embryogenese Malat-1-defizienter Mäuse, die eine normale kardiale Funktion und Anpassung erlauben. Unterstützend für diese Hypothese zeigt sich der Effekt von Malat-1 auf Revaskularisation, miR-133, den MAPK-Signalweg sowie dem Fortschreiten der diabetischen Kardiomyopathie lediglich nach posttranskriptioneller Expressionshemmung (Peters, Hermans-Beijnsberger et al. 2016). In unseren Untersuchungen zeigte sich eine verminderte Expression von Malat-1 nach transaortaler Konstriktion. Unter nativen Bedingungen konnte in neonatalen Mauskardiomyozyten kein Einfluss einer GapmeR-vermittelten Expressionshemmung von Malat-1 auf das hypertrophe Genprogramm beobachtet werden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Gruppen scheint Malat-1 somit nur eine untergeordnete Rolle in der Genese der kardialen Hypertrophie zu spielen. Zur weiteren

Evaluation dieser Hypothese sind die Folgen der Expressionshemmung von Malat-1 unter hypertrophen Bedingungen sowie die Folgen einer Malat-1 Überexpression von Interesse.

4.2.4. Uncharakterisierte lange nicht-kodierende RNAs

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit die zuvor nicht charakterisierten Transkripte Hectd2os, Snhg18 und 1700123M08Rik erstmals im Zusammenhang mit der kardialen Hypertrophie beschrieben.

Namensgebend für die 2662 Basenpaare umfassende nicht-kodierende RNA Hectd2os ist ihre Lokalisation auf den Gegenstrang des HECT Domain 3 Ubiquitin Protein Ligase 2 (Hectd2) auf Chromosom 19. Während die Ubiquitinligase Hectd2 im Zusammenhang mit Prionenerkrankungen (Lloyd, Maytham et al. 2009), dem Prostatakarzinom (Sun, Wang et al. 2014) sowie der Regulation von proinflammatorischen Proteinen (Coon, McKelvey et al. 2015) beschrieben wurde, ist über die Funktion der lange nicht-kodierenden RNA Hectd2os bislang nichts bekannt. Hinweisend auf eine funktionelle Bedeutung von Hectd2os im Myokard, beobachteten wir eine vermehrte Expression in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen. Doch die Hemmung der Expression von Hectd2os mit Hilfe einer spezifischen siRNA führte nicht zu signifikanten Veränderungen in der Expression des hypertrophen Genprogramms. Eine Aussage über einen möglichen pro- oder antihypertrophen Effekt ist durch diesen ausschließlich unter nativen Bedingungen durchgeführten Versuch jedoch nur schwer möglich. Neben der Untersuchung der Stilllegung und Überexpression von Hectd2os unter hypertrophen Bedingungen, stellt die mögliche Regulation der benachbarten Ubiquitinligase Hectd2 und somit der Proteindegradation einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Experimente dar.

Das nicht-kodierende small nuclear RNA host gene 18 (Snhg18) ist auf Chromosom 15 lokalisiert und umfasst 1500 Basenpaare. Das gleichnamige humane Ortholog auf Chromosom 5 wurde im Zusammenhang mit der Radiosensitivität von Gliomen beschrieben (Zheng, Yao et al. 2016). Des Weiteren identifizierte eine genomweite Assoziationsstudie zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen im humanen Snhg18-Gen, die mit dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit assoziiert sind (van der Harst and Verweij 2018). Gleichwohl deutet die differenzielle Regulation von Snhg18 im TAC- und Calcineurin transgenen Mausmodell auf eine funktionelle Bedeutung im Myokard hin. Aus den durchgeführten Funktionsgewinn und

–verlust-Studien lässt sich auf einen antihypertrophen Effekt von Snhg18 in neonatalen Mauskardiomyozyten schließen.

Ferner beobachteten wir eine signifikant verminderte Expression von 1700123M08Rik in der TAC-Gruppe. Interessanterweise konnte auch in infarziertem Myokard eine verminderte Expression dieser nicht charakterisierten langen nicht-kodierenden RNA detektiert werden (Zangrando, Zhang et al. 2014). Weiterhin erlauben die in dieser Arbeit durchgeführten in-vitro Versuche Rückschlüsse auf einen antihypertrophen Effekt in Mauskardiomyozyten. So konnten in Überexpressionsversuchen keine Auswirkungen auf das hypertrophe Genprogramm beobachtet werden, wohingegen die siRNA-vermittelte Stilllegung von 1700123M08Rik mit einer vermehrten Expression von ANP, BNP und Rcan1.4 einherging.

Bei näherer Betrachtung fällt auf, dass weder die Überexpression von Snhg18 noch die Überexpression von 1700123M08Rik unter basalen Bedingungen mit signifikanten Veränderungen in der Expression des fetalen Genprogramms einhergehen. Unter der Annahme einer antihypertrophen Wirkung dieser langen nicht-kodierenden RNAs sind diese Ergebnisse bei fehlendem hypertrophem Stimulus nicht verwunderlich. Dennoch sind im Zusammenhang mit der funktionellen Untersuchung von langen nicht-kodierenden RNAs Überexpressionsstudien kritisch zu betrachten, da viele lange nicht-kodierende RNAs regulatorische Funktionen in cis erfüllen und ihre genomische Lokalisation somit von entscheidender Bedeutung ist (Beermann, Piccoli et al. 2016). Zur Bestätigung des antihypertrophen Effekts von Snhg18 und 1700123M08Rik sind Untersuchungen unter hypertrophen Bedingungen, beispielsweise nach pharmakologischer Stimulation, notwendig.

4.3.OCC-1 als neuer Regulator der kardialen Hypertrophie

Initial als nicht kodierend beschrieben, wurde das OCC-1 Gen in Kolonkarzinomzellen entdeckt (Pibouin, Villaudy et al. 2002). Im humanen Genom ist OCC-1 auf Chromosom 12q23.3 lokalisiert und wurde bislang vor allem hinsichtlich seiner Funktion in der Karzinogenese untersucht. Es bestehen verschiedene Splicevarianten des humanen OCC-1 Gens: OCC-1 A/B, OCC-1 C und OCC-1 D. Während OCC-1 A/B und OCC-1 C für kurze Peptide kodieren, enthält OCC-1 D keinen offenen Leserahmen (Najafi, Soltani et al. 2017). Das hochkonservierte OCC-1 A/B Peptid, auch Adipogenesis downregulating transcript 3 (AGD3) genannt, konnte in mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden und inhibiert die Adipogenese (Kikuchi,

Fukuda et al. 2009). Zusätzlich wird AGD3 in Regionen des Gehirns exprimiert, die mit der Regulation der Nahrungsaufnahme assoziiert sind und interagiert im Insulinsignalweg (Chai, Li et al. 2013). Die Splicevarianten OCC-1 A/B und OCC-1 D weisen eine vermehrte Expression in Kolonkarzinom- sowie in Mammakarzinomzellen auf. OCC-1 C zeigt in Tumorzellen keine aberrante Expression. (Najafi, Soltani et al. 2017; Ghalaei, Kay et al. 2018). In verschiedenen Tumorzelllinien konnte nach Überexpression von OCC-1 A/B und OCC-1 D ein Zellzyklusarrest sowie eine verminderte Zellviabilität beobachtet werden (Najafi, Soltani et al. 2017; Ghalaei, Kay et al. 2018). Umgekehrt führt die Expressionshemmung von OCC-1 A/B zur vermehrten Zellproliferation und Zellzyklusprogression in-vivo und in-vitro (Lan, Xiao et al. 2018). Interessanterweise führt die Überexpression von OCC-1 A/B in SW480-Zellen mit konstitutiv aktiven WNT-Signalweg zu einer vermehrten Progression des Zellzyklus. Der WNT-Signalweg zählt zu den am besten charakterisierten Signalwegen in Kolonkarzinomzellen. WNT-Proteine sind sezernierte Glykoproteine, die vor allem parakrin agieren. Über ihre Bindung an den Frizzled-Rezeptor werden verschiedene Effektorproteine wie Dishevelled aktiviert, die den sogenannten Destruction Complex inhibieren und zur Freisetzung von β -Catenin führen. Daraufhin akkumuliert β -Catenin in der Zelle und initiiert die Transkription verschiedener Gene wie Cyclin D und myc (Rao and Kuhl 2010). In Tumorzellen kann die konstitutive Aktivität des WNT-Signalwegs zur unkontrollierten Transkription β -Catenin-abhängiger Gene und so zum Verlust der Zellzykluskontrolle kommen. Exemplarisch tritt im Rahmen des Familiären Polyposis Syndrom eine Funktionsverlustmutation im APC-Protein auf, das am destruction complex beteiligt ist (Bienz and Clevers 2000). Um Effekte von OCC-1 auf den WNT-Signalweg zu untersuchen, wurde die Überexpression der gesamten OCC-1 A/B-Sequenz sowie die Überexpression des offenen Leserahmens separat mit Hilfe eines spezifischen Luciferase-Assays evaluiert. Dabei wurde nach Überexpression der gesamten Sequenz eine Hemmung der WNT-Aktivität beobachtet, wohingegen das Peptid den WNT-Signalweg aktiviert. (Najafi, Soltani et al. 2017) Außerdem beeinflusst die nicht-kodierende OCC-1 D Variante den WNT-Signalweg über die Hemmung die Expression des benachbarten APPL2-Gens. (Ghalaei, Kay et al. 2018) APPL2 ist ein bekannter positiver Regulator des WNT-Signalweg (Rashid, Pilecka et al. 2009) und führt eine Interaktion mit dem PI3K/Akt-Signalweg zur Progression des Zellzyklus (Ghalaei, Kay et al. 2018). Zusätzlich wirkt OCC-1 als RNA-Transkript über die Beförderung der Ubiquitinierung und Degradation von Hu-antigen R (HuR) antiproliferativ (Lan, Xiao et al. 2018). Das RNA-bindende Protein HuR stabilisiert mRNA über die Bindung von ARE-Elemente

am 3'-Ende der mRNA, die andernfalls zur raschen Degradation der mRNA führen (Suresh Babu, Joladarashi et al. 2015). Zielmoleküle dieses RNA-stabilisierenden Proteins sind an der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Inflammation, Angiogenese sowie an kardialen Pathologien beteiligt. In Tumorzellen wirkt HuR über die Beförderung der Cyclinexpression proliferativ (Rajasingh 2015). Überexpressionsstudien verdeutlichen, dass OCC-1 in Kolonkarzinomzellen vorwiegend als nicht-kodierende RNA agiert. So führt die Überexpression der gesamte OCC-1 Sequenz sowie einer Sequenz mit mutierten offenen Leserahmen zur Hemmung der Proliferation und HuR Expression, wohingegen die selektive Überexpression des offenen Leserahmens keinen Einfluss auf Proliferation und HuR-Expression hat. Weiterhin erscheint die Relevanz des OCC-1 Peptids in Kolonkarzinomzellen aufgrund seiner fehlenden Nachweisbarkeit auf Proteinebene fraglich (Lan, Xiao et al. 2018).

Abseits seiner Funktion in der Karzinogenese, konnten wir OCC-1 als neuen Regulator der kardialen Hypertrophie identifizieren. Basierend auf der vermehrten Expression von OCC-1 in verschiedenen murinen Herzinsuffizienzmodellen untersuchten wir die funktionelle Bedeutung von OCC-1 im Myokard. Zur initialen Charakterisierung betrachteten wir die gewebespezifische Expression sowie die subzelluläre Lokalisation von OCC-1. Vergleichbar mit den Untersuchungen des FANTOM-Konsortiums (Yue, Cheng et al. 2014) detektierten wir eine hohe RNA-Expression von OCC-1 in Gehirn und Testis, eine moderate Expression im Herzen und Lunge sowie eine geringe Expression in der Milz. Parallel zu unseren Ergebnissen in Kardiomyozyten, wurde Lokalisation der OCC-1 Transkripte und des OCC-1 Peptids meist als zytoplasmatisch beschrieben (Chai, Li et al. 2013; Lan, Xiao et al. 2018). Differenzierend zwischen den Splicevarianten des humanen OCC-1 Gens, berichteten Najafi et al. über eine nukleäre Lokalisation des OCC-1 A/B Peptids und über eine zytoplasmatische Lokalisation des OCC-1 C Peptids in humanen Kolonkarzinomzellen (Najafi, Soltani et al. 2017). Aktuell sind drei Transkripte des murinen OCC-1 Homolog auf Chromosom 10 beschrieben: zwei proteinkodierende Transkripte, die jeweils einen ORF für ein Peptid aus 63 oder 61 Aminosäuren enthalten sowie ein nicht-kodierendes Transkript (Zerbino, Achuthan et al. 2018). Falls ebenfalls Unterschiede in der Lokalisation der murinen Peptide bestehen, wären diese durch einen polyklonalen Antikörper wahrscheinlich nicht zu detektieren. Abweichend von den Ergebnissen in Kolonkarzinomzellen (Lan, Xiao et al. 2018), konnten wir ein OCC-1 Peptid mittels Western Blot nachweisen. Eine mögliche Erklärung bietet die Betrachtung der

gewebespezifischen Proteinexpression. Der „Human Protein Atlas“ berichtet über eine geringe Proteinexpression von OCC-1 in Kolonepithelzellen, wohingegen Kardiomyozyten eine mittlere OCC-1 Proteinexpression aufweisen (Uhlen, Fagerberg et al. 2015). Doch auch in unseren Untersuchungen ist die Zunahme der OCC-1 Expression nach transaortaler Konstriktion auf RNA-Ebene deutlich ausgeprägter als auf Proteinebene. Während sich auf RNA-Ebene ein Zuwachs der OCC-1 Expression um das 3,9-fache zeigte, war die 1,4-fach erhöhte OCC-1 Expression auf Proteinebene statistisch nicht signifikant. In Zusammenschau mit den Ergebnissen in Kolonkarzinomzellen stellt sich die Frage, ob OCC-1 im Herzen ebenfalls vorwiegend als lange nicht-kodierende RNA agiert. Um zwischen den Effekten des RNA-Transkripts und des Peptids im Myokard zu differenzieren, untersuchten wir die Überexpression der gesamten OCC-1 Sequenz sowie die selektive Überexpression des offenen Leserahmens. Unter nativen Bedingungen führte die selektive Überexpression des offenen Leserahmens zur Zunahme der Zellgröße. Darüber hinaus wurde die hypertrophe Wirkung von Phenylephrin durch die Überexpression des offenen Leserahmens verstärkt. Im Gegensatz dazu zeigten sich nach Überexpression der gesamten Sequenz keine verstärkte Hypertrophieinduktion durch Phenylephrin. Möglich wäre ein antihypertropher Effekt der nicht-kodierende Anteile des OCC-1 Transkripts, der der prohypertrophen Wirkung des Peptids entgegensteht. Unterstützend dafür zeigte sich eine vermehrte Expression prohypertropher Gene nach siRNA-vermittelter Expressionshemmung des gesamten Transkripts. Mechanistisch könnte die beim Kolonkarzinom beschriebene, reziproke Regulation des WNT-Signalwegs den gegensätzlichen Effekten von RNA und Peptid zugrunde liegen. Neben seiner Bedeutung in der Tumorgenese ist die differentielle Regulation des WNT-Signalwegs essentiell für die Kardiogenese (Grigoryan, Wend et al. 2008). Unter pathologischen Bedingungen, wie bei ischämischer Schädigung oder in Rahmen einer chronischen Druckbelastung, kommt es zur Reaktivierung des WNT-Signalwegs im Myokard. Verschiedene Studien belegen die hypertrophe Wirkung des WNT-Signalwegs. In-vivo führt die Überexpression von Dishelved einem zentralen Effektorprotein des WNT-Signalwegs, zur Entwicklung einer schweren Kardiomyopathie in-vivo (Malekar, Hagenmueller et al. 2010). Umgekehrt zeigen Dishelved-defiziente Mäuse nach transaortaler Konstriktion eine verminderte Herzhypertrophie sowie eine verbesserte Herzfunktion im Vergleich zu Wildtyptieren (van de Schans, van den Borne et al. 2007). Vermittelt wird der hypertrophe Effekt des WNT-Signalwegs zum einen über die β -Catenin-abhängige Induktion der Expression

der natiuretischen Peptide und hypertropher Marker wie β -MHC und α -actin (Zhao, Wang et al. 2018). Zum anderen werden β -Catenin-unabhängig bekannte hypertrophe Signalwege initiiert (Malekar, Hagenmueller et al. 2010). Das WNT-Effektorprotein Dishelved führt über PLC zur Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme wie Calcineurin und Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II und aktiviert den JNK-Signalweg (Dawson, Aflaki et al. 2013). Somit könnte die Aktivierung des WNT-Signalwegs den hypertrophen Effekt des OCC-1 Peptid erklären, während die nicht-kodierenden Anteile von OCC-1 über die Hemmung des Signalwegs antihypertroph wirken. Ebenso könnte die Beförderung der Degradation von HuR zu den antihypertrophen Effekten der nicht-kodierenden Anteile von OCC-1 beitragen. In Kardiomyozyten führt die Stimulation mit Phenylephrin über p38 MAPK zur Aktivierung von HuR, die durch die Translokation ins Zytoplasma gekennzeichnet ist. Durch Überexpression von HuR kann eine Kardiomyozytenhypertrophie in-vitro induziert werden. Umgekehrt zeigt sich nach Hemmung der HuR-Aktivität, durch siRNA-vermittelte Expressionshemmung oder pharmakologische Inhibition, eine Abschwächung der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie sowie eine verminderte NFAT-Aktivität (Slone, Anthony et al. 2016).

Zusammenfassend wäre eine Wirkung von OCC-1 in Form einer langen nicht kodierenden RNA als negativer Regulator und des OCC-1 Peptids als positiver Regulator der kardialen Hypertrophie möglich. Da auf Proteinebene keine gesteigerte Expression des Peptids im hypertrophen Myokard nachweisbar ist, erscheint der protektive Effekt der langen nicht-kodierenden RNA in diesem Falle vordergründlich. Dennoch bleibt aktuell unklar, inwiefern Unterschiede in der Überexpression des Peptids zwischen AdAK012407 und AdOCC-1 zu den Unterschieden in der hypertrophen Antwort nach Stimulation mit Phenylephrin beitragen. Zur Evaluation der oben genannten Hypothese wären somit neben Western Blot-Analysen, Überexpressionsstudien mit mutierten offenen Leserahmen von Interesse, um die Funktion der langen nicht-kodierenden RNA unabhängig vom Peptid zu untersuchen. Ebenso bleibt die Frage, ob die in Kolonkarzinomzellen beschriebene Regulation des WNT-Signalwegs sowie die Regulation der posttranskriptionellen Genregulation über HuR der Wirkung von OCC-1 im Myokard zu Grunde liegen, Gegenstand weiterer Studien.

4.4. Lange nicht-kodierende RNAs und kurze Peptide

Obwohl die Beteiligung von langen nicht-kodierenden RNAs an zahlreichen biologischen Prozessen nachgewiesen werden konnte, wird die funktionelle Relevanz von langen nicht-

kodierenden RNAs noch immer kontrovers diskutiert. Insbesondere die geringe genomische Konservierung und die geringe Expression vieler langer nicht-kodierender RNAs lässt Kritiker an ihrer Funktionalität zweifeln (Palazzo and Lee 2015). Darüber hinaus wird das Fehlen von kodierendem Potential angesichts der oftmals in der Sequenz enthaltenen kurzen offenen Leserahmen angezweifelt. So enthalten von 106.063 langen nicht-kodierenden RNAs im humanen Genom 9.387 offene Leserahmen für kurze Peptide (Ma, Li et al. 2015; Pan, Meng et al. 2018). Unterstützend wurde in Ribosomen Profiling Studien deutlich, dass eine Vielzahl von langen nicht-kodierenden RNAs mit Ribosomen assoziiert sind (Ingolia, Lareau et al. 2011). Nachweislich kann die Translation langer nicht-kodierender RNAs zur Entstehung funktioneller Peptide wie Myoregulin führen (Anderson, Anderson et al. 2015). Weitere Beispiele sind das an der DNA-Reparatur beteiligte Peptid MRI-2 (Slavoff, Heo et al. 2014) sowie HOXB-AS5, welches das Wachstum von Tumorzellen hemmt (Huang, Chen et al. 2017). In Zusammenschau mit den oft ungeklärten Funktionsmechanismen langer nicht-kodierender RNAs argumentieren Kritiker, dass es sich bei einem Großteil der langen nicht-kodierenden RNAs in Wahrheit um falsch annotierte mRNA für kurze Peptide handelt. Andererseits kann nur ein Bruchteil der laut Ribosomen Profiling Studien translatierten Peptide aus langen nicht-kodierenden RNAs mittels Massenspektrometer nachgewiesen werden (Housman and Ulitsky 2016). Exemplarisch konnten in humanen K562-Zellen nur 8 Peptide aus langen nicht-kodierenden RNAs detektiert werden, welches einen Anteil von 0,4% der exprimierten langen nicht-kodierenden RNAs entspricht (Slavoff, Mitchell et al. 2013). Eine mögliche Erklärung ist die mangelnde Sensitivität der Massenspektroskopie zur Detektion von Peptiden unter einer Länge von 50 Aminosäuren (Bazzini, Johnstone et al. 2014). Dennoch könnte die Translation langer nicht-kodierender RNAs, ähnlich wie die Translation kurzer offener Leserahmen in der 5'-UTR Region von mRNA, regulatorische Funktionen erfüllen. Möglich wäre eine Regulation der zellulären Lokalisation, die Modulation transkriptionsabhängiger RNA-Abbaumechanismen wie dem Nonsense mediated decay sowie der Schutz vor Dislokation von Bindungsfaktoren durch Ribosomen (Ulitsky and Bartel 2013; Housman and Ulitsky 2016). Weiterhin schließt kodierendes Potential eine regulatorische Funktion als RNA nicht aus. So konnte für bekannte mRNAs eine unabhängige Funktion auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (Sampath and Ephrussi 2016). Ein Beispiel ist das Tumorsuppressorprotein p53, das eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus sowie in der DNA-Reparatur spielt (Lane and Crawford 1979). Als mRNA inhibiert p53 die Ubiquitinligase MDM2, die an der

Regulation der Degradation und Synthese des p53 Proteins beteiligt ist (Candeias, Malbert-Colas et al. 2008). Außerdem ist Ube3a als RNA-Transkript am dendritischen Wachstum und der Reifung von Neuronen im Hippocampus beteiligt, während Ube3a auf Proteinebene eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Synapsen sowie beim Lernen und der Gedächtnisbildung spielt (Valluy, Bicker et al. 2015). Parallel dazu werden in dieser Arbeit mit Linc-RAM/Myoregulin und OCC-1 zwei weitere Beispiele für bifunktionelle RNA mit regulatorischer Funktion auf RNA-Ebene und proteinkodierender Funktion beschrieben. Meist handelt es sich bei bifunktionellen RNA um zwei Transkripte, die durch alternatives Splicing aus einem Genlocus entstehen (Hube and Francastel 2018). Aktuell gibt es nur wenige validierte Beispiele für RNA-Transkripte mit dualer Funktion, doch auf Splicevarianten beruhende Analysen gehen von etwa 300 bifunktionellen Transkripten im humanen Genom aus (Ulveling, Francastel et al. 2011). Ob sich diese Vorhersagen bewahrheiten bleibt abzuwarten. Doch angesichts der sich mehrenden Beispiele für mRNA mit regulatorischer Funktion und nicht-kodierenden RNAs entstammenden Peptiden, muss die strikte Unterscheidung zwischen kodierenden und nicht-kodierenden RNAs überdacht werden (Hube and Francastel 2018).

4.5. Neue Therapieoption durch Modulation langer nicht-kodierender RNAs

Fortschritte in der Entwicklung von Antisense-basierten Verfahren und neuen Vektoren für den Gentransfer eröffnen neue therapeutische Möglichkeiten für kardiovaskuläre Erkrankungen. Dabei stellen lange nicht-kodierende RNAs durch ihre oftmals zelltypspezifische Expression attraktive Zielmoleküle dar. Als Vorbild für die Entwicklung von Therapiestrategien dient die pharmakologische Modulation von miRNAs. Diese wird in Form von Antisenseoligonukleotiden, wie Miravirsen, bereits in klinischen Studien erprobt (Bar, Chatterjee et al. 2016). Miravirsen inhibiert miR-122, die für die Stabilität und Vermehrung des Hepatitis-C Virus essentiell ist (Jopling, Yi et al. 2005; Henke, Goergen et al. 2008). Im Rahmen einer multizentrischen Phase 2a Studie konnte bei Patienten mit chronischer Hepatitis C eine dosisabhängige Reduktion der Viruslast nach subkutaner Applikation von Miravirsen nachgewiesen werden (Janssen, Reesink et al. 2013). Zur pharmakologischen Inhibition von langen nicht-kodierenden RNAs können neben Antisenseoligonukleotide auch siRNAs und GapmeRs eingesetzt werden (Lucas, Bonauer et al. 2018). GapmeRs enthalten eine Nukleotidsequenz, die beidseits von 14 bis 16 modifizierten locked nucleic acids (LNA) flankiert wird. Durch die Integration dieser LNA-Moleküle kann die Stabilität und Zielaffinität

der GapmeRs gesteigert werden. Mechanistisch vermitteln GapmeRs nach Bindung der komplementären Zielsequenz die Spaltung der langen nicht-kodierenden RNAs durch RNase H (Beermann, Piccoli et al. 2016). Studien im Mausmodell bestätigen das therapeutische Potential der pharmakologischen Inhibition von langen nicht-kodierenden RNAs im Herzen. Beispielsweise verhindert die GapmeR-vermittelte Inhibition von Chast die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie nach experimenteller Nachlasterhöhung (Viereck, Kumarswamy et al. 2016). Weiterhin hemmt die Inhibition von Meg3 die Entwicklung einer kardialen Fibrose und verbessert die diastolische Funktion im TAC-Modell (Piccoli, Gupta et al. 2017). Gegenwärtig ist für eine suffiziente Inhibition von langen nicht-kodierenden RNAs im Herzen eine wiederholte Applikation hochdosierter siRNAs oder GapmeRs (4-20 mg/kg) notwendig. Bekannte dosisabhängige Nebenwirkungen von Oligonukleotid-basierten Therapien sind Hepatotoxizität, die Aktivierung von Immunsystem und Thrombozytenaggregation sowie Zielsequenz-abhängige Effekte. Um eine Dosisreduktion zu erreichen und somit die toxischen Effekte zu reduzieren werden derzeit verschieden Strategien zur zelltypspezifischen Distribution der Oligonukleotide untersucht. Naheliegend bei Herzerkrankungen wäre beispielsweise die zentralkoronare Applikation mittels Herzkatheter. Ein weiterer therapeutischer Ansatz besteht in der Wiederherstellung der Funktion pathologisch supprimierter langen nicht-kodierenden RNAs durch virale Vektoren oder synthetische RNA-Moleküle (Lucas, Bonauer et al. 2018). Exemplarisch führt die intrakoronare Injektion eines MDRL exprimierenden Adenovirus zur Reduktion des Infarktareals nach experimenteller Ischämie und Reperfusion im Mausmodell (Wang, Sun et al. 2014). Außerdem hemmt die adenovirale Überexpression der langen nicht-kodierenden RNA CARL das kardiale Remodelling in-vivo (Wang, Long et al. 2014). Dennoch kann die korrekte genomische Lokalisation durch konventionelle adenovirale Überexpression nicht gewährleistet werden. Somit ist die adenovirale Überexpression für vorwiegend in cis agierende lange nicht-kodierende RNAs nicht geeignet (Lucas, Bonauer et al. 2018). Davon abgesehen erschwert die geringe genomische Konservierung vieler langer nicht-kodierender RNAs den Transfer von Therapiestrategien vom Mausmodell auf den Menschen. Neben der Suche nach einem geeigneten präklinischen Modell für Funktions- und Toxizitätsstudien, ist ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen und der Funktion von langen nicht-kodierenden RNAs in der zellulären Homöostase essentiell für die möglichst risikoarme Anwendung von auf langen nicht-kodierend RNA basierten Therapien. Doch trotz vieler offenen Fragen stellen

lange nicht-kodierende RNAs in Anbetracht der bestehenden Möglichkeiten zur pharmakologischen Modulation sowie ihrer Beteiligung an verschiedenen kardialen Pathologien vielversprechende Zielmoleküle für zukünftige Therapie dar (Bar, Chatterjee et al. 2016).

5. Zusammenfassung

Lange nicht-kodierende RNAs sind eine heterogene Gruppe von regulatorischen Transkripten mit einer Länge von über 200 Basenpaaren. Durch ihre Beteiligung an der Regulation von Chromatinstruktur, Transkription, posttranskriptioneller Prozessierung sowie durch die Modulation molekularer Signalwegen sind lange nicht-kodierende RNA an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen konnten spezifische Expressionsprofile von langen nicht-kodierenden RNAs detektiert werden, die ihre funktionelle Bedeutung sowie ihr Potential als mögliche Biomarker oder therapeutische Zielmoleküle unterstreichen. Um einen Einblick in die Bedeutung langer nicht-kodierender RNAs für die pathologische kardiale Hypertrophie zu gewinnen, untersuchten wir das Expressionsprofil langer nicht-kodierender RNAs nach experimenteller Nachlastserhöhung. Die Microarrayanalyse zeigte eine differentielle Regulation von 1364 langen nicht-kodierenden RNAs nach transthorakaler aortaler Konstriktion. Durch Anwendung statistischer Kriterien wurden 7 lange nicht-kodierende RNAs ausgewählt, deren Expression mittels qPCR validiert und deren Funktion in-vitro weiter untersucht wurde. Unter diesen langen nicht-kodierenden RNAs befanden sich neben vollkommen unbeschriebenen Transkripten auch bekannte lange nicht-kodierende RNAs wie Malat-1, linc-RAM und RIAN. Interessanterweise zeigte sich in „gain- and loss-of-function“ Experimenten für Snhg18 und 1700123M08Rik ein antihypertropher Effekt auf neonatalen Kardiomyozyten. Zusätzlich zeigte sich im Microarray eine vermehrte Expression von AK0120407 im TAC-Modell. Doch die Sequenzanalyse zeigte, dass AK012047 für ein Peptid aus 63 Aminosäuren namens OCC-1 kodiert. In der qPCR bestätigte sich die vermehrte Expression von OCC-1 im TAC-Modell sowie in weiteren murinen Herzinsuffizienzmodellen. In-vitro wurde die siRNA-vermittelte Herunterregulation von OCC-1 in neonatalen Mausekardiomyozyten von einer Induktion hypertropher Gene wie ANF und BNP begleitet. Um zwischen den Effekten von AK012407 und dem OCC-1 Peptid zu differenzieren, wurden die adenovirale Überexpression der gesamten AK012407 Sequenz sowie die selektive Überexpression des offenen Leserahmens für OCC-1 untersucht. Dabei zeigte sich ein verstärkter hypertropher Effekt von Phenylephrin auf Zellgröße und Genexpression nach selektiver Überexpression des offenen Leserahmens. Wir vermuten einen prohypertrophen Effekt des Peptids, dem die antihypertrophe Wirkung der nicht-kodierenden Anteile AK012407s entgegenstehen. Zusammenfassend konnte eine Gruppe von langen nicht-

kodierenden RNAs mit differentieller Regulation in einem Mausmodell für kardiale Hypertrophie identifiziert werden. Das therapeutische Potential dieser neuen Erkenntnisse muss in künftigen Studien evaluiert werden.

6. Literaturverzeichnis

- Anderson, D. M., K. M. Anderson, et al. (2015). "A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance." Cell 160(4): 595-606.
- Antos, C. L., T. A. McKinsey, et al. (2002). "Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 99(2): 907-912.
- Arai, M., N. R. Alpert, et al. (1993). "Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium." Circ Res 72(2): 463-469.
- Arber, S., J. J. Hunter, et al. (1997). "MLP-Deficient Mice Exhibit a Disruption of Cardiac Cytoarchitectural Organization, Dilated Cardiomyopathy, and Heart Failure." Cell 88(3): 393-403.
- Bar, C., S. Chatterjee, et al. (2016). "Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Pathology, Diagnosis, and Therapy." Circulation 134(19): 1484-1499.
- Bazzini, A. A., T. G. Johnstone, et al. (2014). "Identification of small ORFs in vertebrates using ribosome footprinting and evolutionary conservation." EMBO J 33(9): 981-993.
- Beermann, J., M. T. Piccoli, et al. (2016). "Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches." Physiol Rev 96(4): 1297-1325.
- Benjamin, E. J., P. Muntner, et al. (2019). "Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation: CIR0000000000000659.
- Bernardo, B. C., K. L. Weeks, et al. (2010). "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies." Pharmacol Ther 128(1): 191-227.
- Bienz, M. and H. Clevers (2000). "Linking colorectal cancer to Wnt signaling." Cell 103(2): 311-320.
- Bleumink, G. S., A. M. Knetsch, et al. (2004). "Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study." Eur Heart J 25(18): 1614-1619.
- Braz, J. C., O. F. Bueno, et al. (2003). "Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling." J Clin Invest 111(10): 1475-1486.
- Cabili, M. N., C. Trapnell, et al. (2011). "Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses." Genes Dev 25(18): 1915-1927.

- Candeias, M. M., L. Malbert-Colas, et al. (2008). "P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions." Nat Cell Biol 10(9): 1098-1105.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science 296(5573): 1655-1657.
- Care, A., D. Catalucci, et al. (2007). "MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy." Nat Med 13(5): 613-618.
- Carninci, P., T. Kasukawa, et al. (2005). "The transcriptional landscape of the mammalian genome." Science 309(5740): 1559-1563.
- Castaldi, A., T. Zaglia, et al. (2014). "MicroRNA-133 modulates the beta1-adrenergic receptor transduction cascade." Circ Res 115(2): 273-283.
- Chai, B., J. Y. Li, et al. (2013). "A novel transcript is up-regulated by fasting in the hypothalamus and enhances insulin signalling." J Neuroendocrinol 25(3): 292-301.
- Clark, M. B., A. Choudhary, et al. (2013). "The dark matter rises: the expanding world of regulatory RNAs." Essays Biochem 54: 1-16.
- Clerk, A. and P. H. Sugden (1999). "Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists." Am J Cardiol 83(12A): 64H-69H.
- Coon, T. A., A. C. McKelvey, et al. (2015). "The proinflammatory role of HECTD2 in innate immunity and experimental lung injury." Sci Transl Med 7(295): 295ra109.
- Crick, F. H. (1958). "On protein synthesis." Symp Soc Exp Biol 12: 138-163.
- Dawson, K., M. Aflaki, et al. (2013). "Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential." J Physiol 591(6): 1409-1432.
- Derrien, T., R. Johnson, et al. (2012). "The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression." Genome Res 22(9): 1775-1789.
- Dill, T. L. and F. J. Naya (2018). "A Hearty Dose of Noncoding RNAs: The Imprinted DLK1-DIO3 Locus in Cardiac Development and Disease." J Cardiovasc Dev Dis 5(3).
- Diwan, A. and G. W. Dorn, 2nd (2007). "Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets." Physiology (Bethesda) 22: 56-64.
- Djebali, S., C. A. Davis, et al. (2012). "Landscape of transcription in human cells." Nature 489(7414): 101-108.

- Dorn, G. W., 2nd, J. Robbins, et al. (2003). "Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation." Circ Res 92(11): 1171-1175.
- Frey, N., T. Barrientos, et al. (2004). "Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress." Nat Med 10(12): 1336-1343.
- Frey, N., T. A. McKinsey, et al. (2000). "Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function." Nature Medicine 6: 1221.
- Frey, N. and E. N. Olson (2003). "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." Annu Rev Physiol 65: 45-79.
- GENCODE (2017). Statistics about the current Human GENCODE Release (version 28).
- Ghalaeei, A., M. Kay, et al. (2018). "Overexpressed in colorectal carcinoma gene (OCC-1) upregulation and APPL2 gene downregulation in breast cancer specimens." Mol Biol Rep.
- Grigoryan, T., P. Wend, et al. (2008). "Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice." Genes Dev 22(17): 2308-2341.
- Grossman, W., D. Jones, et al. (1975). "Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle." J Clin Invest 56(1): 56-64.
- Grote, P., L. Wittler, et al. (2013). "The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse." Dev Cell 24(2): 206-214.
- Gu, T., H. He, et al. (2012). "Expression of macro non-coding RNAs Meg8 and Irm in mouse embryonic development." Acta Histochem 114(4): 392-399.
- Gu, T., H. He, et al. (2011). "Expression of non-coding RNA AB063319 derived from Rian gene during mouse development." J Mol Histol 42(2): 105-112.
- Gupta, R. A., N. Shah, et al. (2010). "Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis." Nature 464(7291): 1071-1076.
- Gutschner, T., M. Hammerle, et al. (2013). "MALAT1 -- a paradigm for long noncoding RNA function in cancer." J Mol Med (Berl) 91(7): 791-801.
- Guttman, M., I. Amit, et al. (2009). "Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals." Nature 458(7235): 223-227.
- Guttman, M. and J. L. Rinn (2012). "Modular regulatory principles of large non-coding RNAs." Nature 482(7385): 339-346.
- Han, P., W. Li, et al. (2014). "A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy." Nature 514(7520): 102-106.

- Han, X., F. Yang, et al. (2015). "Malat1 regulates serum response factor through miR-133 as a competing endogenous RNA in myogenesis." FASEB J 29(7): 3054-3064.
- Hein, S., E. Arnon, et al. (2003). "Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms." Circulation 107(7): 984-991.
- Heineke, J. and J. D. Molkentin (2006). "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." Nat Rev Mol Cell Biol 7(8): 589-600.
- Heineke, J., H. Ruetten, et al. (2005). "Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc." Proc Natl Acad Sci U S A 102(5): 1655-1660.
- Henke, J. I., D. Goergen, et al. (2008). "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA." EMBO J 27(24): 3300-3310.
- Hermans-Beijnsberger, S., M. van Bilsen, et al. (2018). "Long non-coding RNAs in the failing heart and vasculature." Noncoding RNA Res 3(3): 118-130.
- Housman, G. and I. Ulitsky (2016). "Methods for distinguishing between protein-coding and long noncoding RNAs and the elusive biological purpose of translation of long noncoding RNAs." Biochim Biophys Acta 1859(1): 31-40.
- Huang, J. Z., M. Chen, et al. (2017). "A Peptide Encoded by a Putative lncRNA HOXB-AS3 Suppresses Colon Cancer Growth." Mol Cell 68(1): 171-184 e176.
- Hube, F. and C. Francastel (2018). "Coding and Non-coding RNAs, the Frontier Has Never Been So Blurred." Front Genet 9: 140.
- Hutchinson, J. N., A. W. Ensminger, et al. (2007). "A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains." BMC Genomics 8: 39.
- Iemitsu, M., T. Miyauchi, et al. (2001). "Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281(6): R2029-2036.
- Ingolia, N. T., L. F. Lareau, et al. (2011). "Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes." Cell 147(4): 789-802.
- Iwaki, K., V. P. Sukhatme, et al. (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." Journal of Biological Chemistry 265(23): 13809-13817.
- Izumo, S., B. Nadal-Ginard, et al. (1988). "Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload." Proc Natl Acad Sci U S A 85(2): 339-343.

- Janssen, H. L., H. W. Reesink, et al. (2013). "Treatment of HCV infection by targeting microRNA." N Engl J Med 368(18): 1685-1694.
- Ji, P., S. Diederichs, et al. (2003). "MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer." Oncogene 22(39): 8031-8041.
- Jopling, C. L., M. Yi, et al. (2005). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." Science 309(5740): 1577-1581.
- Kapranov, P., J. Cheng, et al. (2007). "RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription." Science 316(5830): 1484-1488.
- Kemp, C. D. and J. V. Conte (2012). "The pathophysiology of heart failure." Cardiovasc Pathol 21(5): 365-371.
- Khan, R. and R. Sheppard (2006). "Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia." Immunology 118(1): 10-24.
- Kikuchi, K., M. Fukuda, et al. (2009). "Transcripts of unknown function in multiple-signaling pathways involved in human stem cell differentiation." Nucleic Acids Res 37(15): 4987-5000.
- Kim, T. K., M. Hemberg, et al. (2010). "Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers." Nature 465(7295): 182-187.
- Klattenhoff, C. A., J. C. Scheuermann, et al. (2013). "Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment." Cell 152(3): 570-583.
- Kuhn, C., D. Frank, et al. (2009). "DYRK1A is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy." J Biol Chem 284(25): 17320-17327.
- Kumarswamy, R., C. Bauters, et al. (2014). "Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure." Circ Res 114(10): 1569-1575.
- Labialle, S., V. Marty, et al. (2014). "The miR-379/miR-410 cluster at the imprinted Dlk1-Dio3 domain controls neonatal metabolic adaptation." EMBO J 33(19): 2216-2230.
- Lan, Y., X. Xiao, et al. (2018). "Long noncoding RNA OCC-1 suppresses cell growth through destabilizing HuR protein in colorectal cancer." Nucleic Acids Res 46(11): 5809-5821.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature 409(6822): 860-921.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature 278(5701): 261-263.

- Levy, D., R. J. Garrison, et al. (1990). "Prognostic Implications of Echocardiographically Determined Left Ventricular Mass in the Framingham Heart Study." New England Journal of Medicine 322(22): 1561-1566.
- Li, X., Z. Wu, et al. (2014). "lncRNAs: insights into their function and mechanics in underlying disorders." Mutat Res Rev Mutat Res 762: 1-21.
- Li, X., L. Zhang, et al. (2016). "Unraveling the Expression Profiles of Long Noncoding RNAs in Rat Cardiac Hypertrophy and Functions of lncRNA BC088254 in Cardiac Hypertrophy Induced by Transverse Aortic Constriction." Cardiology 134(2): 84-98.
- Liang, Q., O. F. Bueno, et al. (2003). "c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling." EMBO J 22(19): 5079-5089.
- Lloyd, S. E., E. G. Maytham, et al. (2009). "HECTD2 is associated with susceptibility to mouse and human prion disease." PLoS Genet 5(2): e1000383.
- Lucas, T., A. Bonauer, et al. (2018). "RNA Therapeutics in Cardiovascular Disease." Circ Res 123(2): 205-220.
- Ma, L., A. Li, et al. (2015). "LncRNAWiki: harnessing community knowledge in collaborative curation of human long non-coding RNAs." Nucleic Acids Res 43(Database issue): D187-192.
- Malekar, P., M. Hagenmueller, et al. (2010). "Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling." Hypertension 55(4): 939-945.
- Matkovich, S. J., J. R. Edwards, et al. (2014). "Epigenetic coordination of embryonic heart transcription by dynamically regulated long noncoding RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A 111(33): 12264-12269.
- Mercer, T. R., M. E. Dinger, et al. (2009). "Long non-coding RNAs: insights into functions." Nat Rev Genet 10(3): 155-159.
- Mercer, T. R. and J. S. Mattick (2013). "Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation." Nat Struct Mol Biol 20(3): 300-307.
- Michalik, K. M., X. You, et al. (2014). "Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth." Circ Res 114(9): 1389-1397.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, et al. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." Cell 93(2): 215-228.
- Mosterd, A. and A. W. Hoes (2007). "Clinical epidemiology of heart failure." Heart 93(9): 1137-1146.
- Najafi, H., B. M. Soltani, et al. (2017). "Alternative splicing of the OCC-1 gene generates three splice variants and a novel exonic microRNA, which regulate the Wnt signaling pathway." RNA 23(1): 70-85.

- Palazzo, A. F. and E. S. Lee (2015). "Non-coding RNA: what is functional and what is junk?" Front Genet 6: 2.
- Pan, J., X. Meng, et al. (2018). "Insights into the noncoding RNA-encoded peptides." Protein Pept Lett.
- Peters, T., S. Hermans-Beijnsberger, et al. (2016). "Long Non-Coding RNA Malat-1 Is Dispensable during Pressure Overload-Induced Cardiac Remodeling and Failure in Mice." PLoS One 11(2): e0150236.
- Pibouin, L., J. Villaudy, et al. (2002). "Cloning of the mRNA of overexpression in colon carcinoma-1: a sequence overexpressed in a subset of colon carcinomas." Cancer Genet Cytogenet 133(1): 55-60.
- Piccoli, M. T., S. K. Gupta, et al. (2017). "Inhibition of the Cardiac Fibroblast-Enriched lncRNA Meg3 Prevents Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction." Circ Res 121(5): 575-583.
- Ponikowski, P., A. A. Voors, et al. (2016). "2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC." Eur Heart J 37(27): 2129-2200.
- Rajasingh, J. (2015). "The many facets of RNA-binding protein HuR." Trends Cardiovasc Med 25(8): 684-686.
- Rangrez, A. Y., P. Hoppe, et al. (2017). "MicroRNA miR-301a is a novel cardiac regulator of Cofilin-2." PLoS One 12(9): e0183901.
- Rao, T. P. and M. Kuhl (2010). "An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more." Circ Res 106(12): 1798-1806.
- Rashid, S., I. Pilecka, et al. (2009). "Endosomal adaptor proteins APPL1 and APPL2 are novel activators of beta-catenin/TCF-mediated transcription." J Biol Chem 284(27): 18115-18128.
- Rinn, J. L. and H. Y. Chang (2012). "Genome regulation by long noncoding RNAs." Annu Rev Biochem 81: 145-166.
- Rockman, H. A., W. J. Koch, et al. (2002). "Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function." Nature 415(6868): 206-212.
- Sampath, K. and A. Ephrussi (2016). "CncRNAs: RNAs with both coding and non-coding roles in development." Development 143(8): 1234-1241.
- Slavoff, S. A., J. Heo, et al. (2014). "A human short open reading frame (sORF)-encoded polypeptide that stimulates DNA end joining." J Biol Chem 289(16): 10950-10957.
- Slavoff, S. A., A. J. Mitchell, et al. (2013). "Peptidomic discovery of short open reading frame-encoded peptides in human cells." Nat Chem Biol 9(1): 59-64.

Slone, S., S. R. Anthony, et al. (2016). "Activation of HuR downstream of p38 MAPK promotes cardiomyocyte hypertrophy." Cell Signal 28(11): 1735-1741.

Soonpaa, M. H., K. K. Kim, et al. (1996). "Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development." Am J Physiol 271(5 Pt 2): H2183-2189.

St Laurent, G., C. Wahlestedt, et al. (2015). "The Landscape of long noncoding RNA classification." Trends Genet 31(5): 239-251.

Stears, R. L., T. Martinsky, et al. (2003). "Trends in microarray analysis." Nat Med 9(1): 140-145.

Sun, L., Y. Zhang, et al. (2014). "Expression profile of long non-coding RNAs in a mouse model of cardiac hypertrophy." Int J Cardiol 177(1): 73-75.

Sun, T., X. Wang, et al. (2014). "MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A." Oncogene 33(21): 2790-2800.

Suresh Babu, S., D. Joladarashi, et al. (2015). "RNA-stabilizing proteins as molecular targets in cardiovascular pathologies." Trends Cardiovasc Med 25(8): 676-683.

Taegtmeyer, H. (2002). "Switching metabolic genes to build a better heart." Circulation 106(16): 2043-2045.

Taft, R. J., M. Pheasant, et al. (2007). "The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity." Bioessays 29(3): 288-299.

Takahashi, T., P. D. Allen, et al. (1992). "Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene." Circ Res 71(1): 9-17.

Tham, Y. K., B. C. Bernardo, et al. (2015). "Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets." Arch Toxicol 89(9): 1401-1438.

Tripathi, V., J. D. Ellis, et al. (2010). "The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation." Mol Cell 39(6): 925-938.

Tsai, M. C., O. Manor, et al. (2010). "Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes." Science 329(5992): 689-693.

Tsao, C. W. and R. S. Vasan (2015). "Cohort Profile: The Framingham Heart Study (FHS): overview of milestones in cardiovascular epidemiology." Int J Epidemiol 44(6): 1800-1813.

Uhlen, M., L. Fagerberg, et al. (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." Science 347(6220): 1260419.

- Ulitsky, I. and D. P. Bartel (2013). "lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms." Cell 154(1): 26-46.
- Ulveling, D., C. Francastel, et al. (2011). "Identification of potentially new bifunctional RNA based on genome-wide data-mining of alternative splicing events." Biochimie 93(11): 2024-2027.
- Valluy, J., S. Bicker, et al. (2015). "A coding-independent function of an alternative Ube3a transcript during neuronal development." Nat Neurosci 18(5): 666-673.
- van de Schans, V. A., S. W. van den Borne, et al. (2007). "Interruption of Wnt signaling attenuates the onset of pressure overload-induced cardiac hypertrophy." Hypertension 49(3): 473-480.
- van der Harst, P. and N. Verweij (2018). "Identification of 64 Novel Genetic Loci Provides an Expanded View on the Genetic Architecture of Coronary Artery Disease." Circ Res 122(3): 433-443.
- Vausort, M., D. R. Wagner, et al. (2014). "Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction." Circ Res 115(7): 668-677.
- Viereck, J., R. Kumarswamy, et al. (2016). "Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling." Sci Transl Med 8(326): 326ra322.
- Wang, K., F. Liu, et al. (2014). "The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489." Circ Res 114(9): 1377-1388.
- Wang, K., B. Long, et al. (2014). "CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 downregulation." Nat Commun 5: 3596.
- Wang, K., T. Sun, et al. (2014). "MDRL lncRNA regulates the processing of miR-484 primary transcript by targeting miR-361." PLoS Genet 10(7): e1004467.
- Wang, K. C. and H. Y. Chang (2011). "Molecular mechanisms of long noncoding RNAs." Mol Cell 43(6): 904-914.
- Watts, R., V. L. Johnsen, et al. (2013). "Myostatin-induced inhibition of the long noncoding RNA Malat1 is associated with decreased myogenesis." Am J Physiol Cell Physiol 304(10): C995-1001.
- Wu, X. S., X. A. Wang, et al. (2014). "MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the ERK/MAPK pathway." Cancer Biol Ther 15(6): 806-814.
- Wu, Y., W. Lu, et al. (2016). "Prognostic value of long non-coding RNA MALAT1 in cancer patients." Tumour Biol 37(1): 897-903.
- Yang, K. C., K. A. Yamada, et al. (2014). "Deep RNA sequencing reveals dynamic regulation of myocardial noncoding RNAs in failing human heart and

remodeling with mechanical circulatory support." Circulation 129(9): 1009-1021.

Yu, X., Y. Zhang, et al. (2017). "Long non-coding RNA Linc-RAM enhances myogenic differentiation by interacting with MyoD." Nat Commun 8: 14016.

Yue, F., Y. Cheng, et al. (2014). "A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome." Nature 515(7527): 355-364.

Zangrando, J., L. Zhang, et al. (2014). "Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction." BMC Genomics 15: 460.

Zerbino, D. R., P. Achuthan, et al. (2018). "Ensembl 2018." Nucleic Acids Res 46(D1): D754-D761.

Zhang, B., G. Arun, et al. (2012). "The lncRNA Malat1 is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role in the adult." Cell Rep 2(1): 111-123.

Zhao, J., B. K. Sun, et al. (2008). "Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome." Science 322(5902): 750-756.

Zhao, Y., C. Wang, et al. (2018). "An essential role for Wnt/beta-catenin signaling in mediating hypertensive heart disease." Sci Rep 8(1): 8996.

Zheng, R., Q. Yao, et al. (2016). "Upregulation of Long Noncoding RNA Small Nucleolar RNA Host Gene 18 Promotes Radioresistance of Glioma by Repressing Semaphorin 5A." Int J Radiat Oncol Biol Phys 96(4): 877-887.

7. Publikationen

Pia Bünger¹, Franziska Dierck^{1,2}, Inga Schmidt¹, Norbert Frey^{1,2} und Christian Kuhn^{1,2}, *Identification and Characterization of long non-coding RNAs in pathological cardiac hypertrophy*, Posterpräsentation der DGK Herztage der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Berlin, 2018.

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

² DZHK (Deutsches Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung), Standort Hamburg/Kiel/Lübeck

8. Danksagung

Als erstes danke ich Prof. Dr. med. Frey für die Möglichkeit der Dissertation und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Labor.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Christian Kuhn für die Bereitstellung des Themas und die kompetente Betreuung während der unterschiedlichen Phasen dieser Arbeit.

Für die Hilfe beim Erlernen molekularbiologischer Methoden möchte ich mich bei allen Mitarbeitern/-innen des Labors für Molekulare Kardiologie bedanken. Insbesondere danke ich Franziska Dierck für die tatkräftige Unterstützung sowie für die wertvollen Anregungen und Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch Gabriele Brunke, Susanne Hille und Inga Schmidt gilt mein Dank für die praktische Hilfe im Labor.

Zudem möchte ich meinem Freund Jakob Belter für die Unterstützung und Durchsicht der Arbeit danken.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mir Medizinstudium und Promotion ermöglichten und mich auf meinen Lebensweg stets unterstützt haben.