

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

Identifizierung und Charakterisierung von Long Noncoding RNAs im Modell der Calcineurin-vermittelten kardialen Hypertrophie der Maus

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

vorgelegt von
Anne Sophie Schepers
aus
Hamburg
Kiel 2020

1. Berichtersteller/in: Prof. Dr. Norbert Frey,
Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie,
Medizinische Klinik / Innere Medizin III,
Universität Heidelberg
2. Berichtersteller/in: Priv.-Doz. Dr Inga Voges,
Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel den 17.01.2022

gez.: Priv.-Doz. Dr. Matthias Lutz
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
**"Identifizierung und Charakterisierung von Long
Noncoding RNAs im Modell der Calcineurin-vermittelten
kardialen Hypertrophie der Maus"** eigenständig angefertigt
und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und
Hilfsmittel verwendet zu haben.

Darmstadt, den 14.08.2020

.....
(Schepers)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
----------------------------	-----

Tabellenverzeichnis.....	IV
--------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis	V
-----------------------------	---

1 Einleitung	1
---------------------------	----------

1.1 Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie	1
1.2 Molekulare Mechanismen der kardialen Hypertrophie	5
1.2.1 G_s -, G_q/G_{11} - und G_i -Signalkaskaden und GTP-Bindeproteine	5
1.2.2 Phosphatidylinositol-3-Kinasen, AKT, Glykogensynthetase Kinase-2/3	11
1.2.3 Histone Acetyltransferase, - Deacetylase, Myocyte Enhancer Factor 2	13
1.2.4 Proteinkinase C	16
1.2.5 Gp130-Rezeptor, Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)	20
1.2.6 Calcineurin-NFAT	21
1.3 Long Noncoding RNAs (lncRNAs)	24
1.3.1 Charakteristika der Long Noncoding RNAs	24
1.3.2 Long Noncoding RNA Transkriptklassen	25
1.3.3 Mechanismen der Genregulation durch Long Noncoding RNAs	26
1.3.4 Kardiale Long Noncoding RNAs	28
1.3.5 Long Noncoding RNA als diagnostisches und therapeutisches Ziel	31
1.4 Zielsetzung der Arbeit	33

2 Materialien und Methoden	34
---	-----------

2.1 Materialien	34
2.1.1 Geräte	34
2.1.2 Chemikalien	35
2.1.3 Enzyme	36
2.1.4 Kits	36
2.1.5 Oligonukleotide	37
2.1.6 Puffer und Lösungen	39
2.1.7 Medien	40
2.1.8 Versuchstiere	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 Kultur von Säugetierzellen	41
2.2.2 Beschichtung von Kulturgefäßen mit Kollagen	41
2.2.3 Primärkultur von neonatalen Mauskarдиоmyozyten	41
2.2.4 Kultur von Säugetierzelllinien	43
2.2.5 Transfektion mit LNA GapmeRs	44
2.2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit RNA	46
2.2.7 Tierversuche	50
2.2.8 Statistische Auswertung	51

3	Ergebnisse	52
3.1	Entwicklung einer kardialen Hypertrophie in Calcineurin-Transgen-Mäusen.....	52
3.1.1	Echokardiographie der Calcineurin-Transgen-Tiere	52
3.1.2	Morphometrische Untersuchung der Calcineurin-transgenen Mäuse	54
3.1.3	Charakterisierung der kardialen Hypertrophie in Calcineurin-transgenen Mäusen	55
3.2	Identifizierung von Long Noncoding RNA-Sequenzen in kardialer Hypertrophie	56
3.2.1	RNA-Sequenzierung und differentielle Expression	56
3.2.2	Validierung der differentiellen Regulation ausgewählter lncRNAs in Calcineurin-transgenen Mäusen	58
3.3	Untersuchung bekannter lncRNAs im Calcineurin-transgenen Mausmodell	62
3.4	Knockdowns der Long Noncoding RNA MALAT1 in C2C12-Zellen	63
3.5	Charakterisierung der Long Noncoding RNA Gm9917.....	65
3.5.1	Identifizierung der Long Noncoding RNA Gm9917 und ihrer Transkriptvarianten.....	65
3.5.2	Polyadenylierung der Long Noncoding RNA Gm9917	66
3.5.3	Knockdown der Long Noncoding RNA Gm9917 in neonatalen Kardiomyozyten der Maus	68
3.5.4	Die Hemmung der lncRNA Gm9917 induziert das hypertrophe Genprogramm in neonatalen Maus-Kardiomyozyten.....	69
4	Diskussion.....	70
4.1	Kardiale Hypertrophie im Tiermodell.....	70
4.1.1	Das Calcineurin-transgene Mausmodell entwickelt eine kardiale Hypertrophie	72
4.2	Identifizierung differentiell regulierter lncRNAs in kardialer Hypertrophie	73
4.3	Charakterisierung spezifischer Long Noncoding RNAs	74
4.3.1	Gm9917 als neues Modulator der kardialen Hypertrophie	75
4.4	Schlussfolgerung	76
5	Zusammenfassung	77
6	Veröffentlichungen	78
7	Literaturverzeichnis	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifikation der Herzinsuffizienz	2
Abbildung 2: Signalkaskaden der kardialen Hypertrophie im Überblick	5
Abbildung 3: Signalkaskade der Mitogen Activated Protein Kinasen	8
Abbildung 4: Schematischer Überblick der Proteinkinase-Klassen	16
Abbildung 5: Die Calcineurin-Signalkaskade	23
Abbildung 6: Einteilung lncRNA Transkriptklassen in abgewandelter Darstellung	25
Abbildung 7: Molekulare Mechanismen der lncRNA	28
Abbildung 8 (A-C): Echokardiographische Charakterisierung	53
Abbildung 9 (A, B): Morphometrische Charakterisierung.....	54
Abbildung 10 (A-C): Quantitative Realtime-PCR der Hypertrophiemarker	55
Abbildung 11 (A, B): Bioinformatische Analyse von Hypertrophie-assoziierten Sequenzen	57
Abbildung 12 (A-D): Quantitative Realtime-PCR der lncRNA-Sequenzen A: 4921504A21Rik, B: 1110019D14Rik, C: 6430562O15Rik, D: Gm15328....	59
Abbildung 13 (E-H): Quantitative Realtime-PCR der lncRNA-Sequenzen E: Gm26722, F: Rmst, G: Gm5532, H: Gm20619	60
Abbildung 14 (I-K): Quantitative Realtime-PCR der lncRNA-Sequenzen I: Gm9917, J: Gm12295_ 1, K: Gm12295_2	61
Abbildung 15 (A-C): Quantitative Realtime-PCR bekannter Sequenzen	62
Abbildung 16 (A-D): Quantitative Realtime-PCR eines Knockdowns.....	64
Abbildung 17: Darstellung der Gm9917-Transkriptvarianten.....	65
Abbildung 18: Expressionsmuster der lncRNA Gm9917 in der Maus	65
Abbildung 19: Quantitative Realtime-PCR von Gm9917 Transkriptvarianten	66
Abbildung 20 (A, B): Gelelektrophorese von Realtime PCR Produkten.....	67
Abbildung 21: Quantitative Realtime-PCR eines Knockdowns.....	68
Abbildung 22 (A-C): Quantitative Realtime-PCR der Hypertrophiemarker	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien für den Enzymmix	42
Tabelle 2: Aufteilung von NMVCM-Zellen und Medium bei 6-/12-Well Platte	43
Tabelle 3: Aufteilung von C2C12-Zellen und Medium	44
Tabelle 4: Transfektionsansatz 1: LNA GapmeR.....	45
Tabelle 5: Transfektionsansatz 2: Lipofectamin.....	45
Tabelle 6: Verkürzungsfraction (FS %).....	50
Tabelle 7: Signifikanzaufschlüsselung	51

Abkürzungsverzeichnis

ACC	American College of Cardiology
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AHA	American Heart Association
AI	Autoinhibitorische Domäne
AKAP	A-Kinase Anker Protein
AP-1	Aktivatorprotein-1
APF	Autophagy Promoting Factor
ARE	AU-reiche Elemente
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
ARK1	Adrenorezeptor-Kinase 1
ASK 1/2	Apoptose-Signal regulierte Kinase 1/2
ASO	Antisense-Oligonukleotide
ATF 1/2/6	Cyclic AMP-Dependent Transcription Factor
BAD	BCL2 associated Agonist of Cell Death
bp	Basenpaare
BRG1	Brahma Related Gene 1
BVHT	Braveheart
°C	Grad Celsius
CAMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CARMEN	Cardiac Mesoderm Enhancer-associated Noncoding RNA
CaM	Calmodolin-bindende Domäne
CARL	Cardiac Apoptosis-Related lncRNA
cDNA	Copy DNA
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CHAER	Cardiac-Hypertrophy-associated Epigenetic Regulator
CHAST	Cardiac Hypertrophy-associated Transcript
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CHRF	Cardiac Hypertrophy-Related Factor
CIB1	Calcium- und Integrin Binding Protein 1
circRNA	Circular RNA
CnA	Calcineurin-A bindende Domäne
CnB	Calcineurin-B bindende Domäne

CoREST	Corepressor to Restrictive Silencing Factor
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
CREB	cAMP- Response Element Binding Protein
CRISPR/CAS	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CsA	Cyclosporine A
CT-1	Cardiotrophin-1
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DUSP5	Dual Specifity Protein Phosphatase 5
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELK	ETS-Like-1-Protein
ERK	Extrazellular Responsive Kinase
ESC	European Society of Cardiology
ETS	Erythroblast Transformation Specific
ET-1	Endothelin-1
FBS	Fetal Bovine Serum
Fendrr	Foxf1 Adjacent Noncoding Developmental Regulatory RNA
FCS	Fetal Calf Serum
FK506	Tacrolimus
Fold Change	Differenzielle Regulation
FS	Fractional Shortening
g	Gramm
GATA4	GATA Binding Protein 4
GATA6	GATA Binding Protein 6
GAPS	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glyceralydehyde-2-Phosphat Dehydrogenase
GEF	Guaninnucleotid Exchange Factor
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren

GRK	Glykogen Synthase Kinase 2
h	Stunde
HATs	Histon-Acetyltransferasen
HAND1/2	Heart and Neural Crest Derivatives-Expresses Protein 1/2
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	Histon-Deacetylasen
H3K27	Histon 3-Lysin 37
HFmrEF	Heartfailure with midrange Ejection Fraction
HFrEF	Heart failure with reduced Ejection Fraction
HFpEF	Heart failure with preserved Ejection Fraction
HOTAIR	Homeotic Genes Transcript Antisense RNA
HR1	Homologie-Region 1
HuR	Humanes Antigen R
IGF-1	Insulin-Like-Growthfactor-1
IL-6	Interleukin 6
Ins-1,4,5-P3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IVSd	Interventrikuläres Septum in der Diastole
IPP1	Proteinphosphatase-Inhibitor
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
JPX	XIST-Activator Non-Protein Coding
IVD	Wandstärke des interventrikulären Septums
Kb	Kilobasenpaar
KHK	Koronare Herzerkrankung
Ko	Knockout
kV	Kilovolt
L	Liter
LIF	Leukemie-hemmender Faktor
lincRNA	Long Intergenic RNA
LIPCAR	Long Intergenic Noncoding RNA Predicting Cardiac Remodelling
lncRNA	Long Noncoding RNA
LNA	Locked Nucleid Acid
LSD1	Lysine-specific Demethylase-1
LVEF	Left Ventricular Ejection Fraction

LVIDd	Durchmesser des Linken Ventrikels Enddiastolisch
LVIDs	Durchmesser des Linken Ventrikels Endsystolisch
LVPWd	Diastolischer Diameter d. Post. Wand des Li. Ventrikels
M	Molar
m-	Mili
MALAT1	Metastasis-associated Lung-Adenocarcinoma Transcript 1
MAPK	Mitogen aktivierende Proteinkinase
MCIP	Myocyte Enriched Calcineurin-Interactin Protein
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MEK1/2	MAP-Kinase-ERK-Kinase
MEKK	MAPK/ERK-Kinase-Kinase 1-4
MESP1	Mesoderm Posterior Transkriptionsfaktor 1
MHC	Myosin Heavy Chain
MHRT	Myosin Heavy Chain associated RNA Transkript
min	Minute
miRNA	Micro RNA
MK-2	MAPK-aktivierte Proteinkinase 2
MKK	MAPK-Kinase
MKP-1	MAPK Phosphatase-1
MLK 1-3	Mixed Lineage Kinase 1-3
MLP	Muscle LIM Protein
MNK1	Serin-Threonin-Protein Kinase 1
mRNA	Messenger RNA
MST	Mammalian-Sterile-20-Like Kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MyBPC	Myosin-bindende Protein-C
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
MYH7	Myosin Heavy Chain 7
n	Anzahl durchgeführter Versuche
n-	Nano-
NATS	Natural Antisense Transcripts
ncRNA	Nicht-Protein-kodierende RNAs
NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells

NKX2-5	NK2 Homebox 5
NMVCN	Neonatale Ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus
NPPA	Natriuretic peptide type A
NPPB	Natriuretic peptide type B
NRF	Necrosis-Related Factor
NRON	Noncoding Repressor of NFAT
NYHA	New York Heart Association
OHP	Oligo-Hexamer Primer
ORF	Open Reading Frame
PS	Phosphatidylserin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	Phosphoinositid-dependent Kinase 1
PELKH1	Peckstrin Homology Domain Containing Family
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
piRNA	Piwi-Interacting RNA
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PKN	Proteinkinase N
PLN	Phospholamban
PMA	Phosphorbolester Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP2B	Proteinphosphatase 2B
PRC2	Polycomb Repressive Complexes 2
qRT-PCR	Qualitative Realtime-PCR
RAAS	Renin-Aldosteron-System
Rassf1	Ras-associated Domain Family Member 1
RCAN1-4	Regulator of Calcineurin 1-4
RHP	Random-Hexamer Primer
Rmst	Rhabdomyosarcoma 2-associated Transcript
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

ROR	Regulator of Reprogramming
Rpl32	Ribosomal Protein L32
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RCAN1-4	Calcineurin-abhängiges RCAN1-4
rRNA	Ribosomal RNA
RNAP2	RNA-Polymerase II
SAF-A	Scaffold-Attachement-Factor A
SAP1a	ETS-Domänen-Transkriptionsfaktor
Sek	Sekunden
SEM	Standard Error of the Mean
SERCA	Sarkoplasmatische Retikulum Calcium ATPase
SGK-1	Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase-1
SGLT-2	Glukosetransporters Sodium Dependent Glucose Cotransporter 2
SHARP	SMART/HDAC1-associated Repressor Protein
siRNA	Small Interfering RNAs
SnRNA	Small Nuclear RNA
SMRT	Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor
sncRNA	Small Noncoding RNAs
snRNA	Small Nuclear RNA
snoRNA	Small Nucleolar RNA
SNRP 70	Small Nuclear Ribonucleoprotein U1 Subunit 70
SOCS 3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
SOS 1	Son of Sevenless 1
SRC-Kinase	Sarcoma-Kinase
SRF	Serum Response Faktor
SR-Gen	Serin-Arginin-Gen
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SUZ12	Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
TAC	Transaortic-Banding
TAO 1/2	Thousand and One Amino Acid Protein Kinase 1/2
TAK1	Transkriptionsfaktor 1
TBX5	T-Box 5

TERC	Telomerase mit einer RNA-Untereinheit
TERRA	Telomeric Repeat-Containing RNA
TG	Transgen
TNP-Inhibitor	Trifluormethylbenzyl-Nitrobenzyl-Purine-Inhibitor
TPL-2	Tumor Progression Lokus-2
tRNA	Transfer RNA
TRIS	Trishydroxylmethylaminomethan
TSIX	X-Inactive-Specific Transcript
TTP	Tris-Tetra-Prolin
Tusc2	Tumor Suppressor Candidate 2
μ-	Mikro
UDG	Uracil-DNA-Glycolylase
WT	Wildtyp
XIST	X-Inactive Specific Transcript

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie

Die Europäische Fachgesellschaft für Kardiologie (European Society Of Cardiology, ESC) definiert die Herzinsuffizienz (HF) als ein Syndrom, bei dem das Herz aufgrund einer strukturellen Erkrankung in Ruhe oder bei Belastung nicht in der Lage ist, die Sauerstoffversorgung des Körpers sicherzustellen (Mudd & Kass, 2008). Gekennzeichnet ist dieses klinische Syndrom durch Ruhe- und Belastungsdyspnoe, Orthopnoe, Lungenödem, Pleuraergüsse, Aszites und periphere Ödeme sowie Fatigue (Ponikowski et al., 2016).

Es existieren verschiedene Einteilungen der Herzinsuffizienz: Abhängig vom klinisch vorrangig betroffenen Ventrikel werden Linksherz-, Rechtsherz- und Globalherzinsuffizienz unterschieden. (Ponikowski et al., 2016; Roger, 2013). Die aktuelle Leitlinie der ESC teilt die Herzinsuffizienz vor allem anhand der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) ein. Diese wird in drei Kategorien unterteilt:

- (1) Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion („Heart failure with preserved ejection fraction“ (HFpEF) – LVEF > 50%
- (2) Herzinsuffizienz mit reduzierter systolischer Funktion („Heart failure with reduced ejection fraction“ (HFrEF) – LVEF < 40%
- (3) Herzinsuffizienz mit intermediärer systolischer Funktion („Heart failure with mid-range ejection fraction“ (HFmrEF) – LVEF 40-49%

Eine gestörte Relaxationsfähigkeit der Herzkammern mit erhöhten linksventrikulären Füllungsdrücken bei erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF > 50%) definiert die Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion (HFpEF), auch als „diastolische Herzinsuffizienz“ bezeichnet. Ursachen hierfür sind z.B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, chronische Nierenerkrankung, Eisenmangel und die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD) (Ponikowski et al., 2016; Yancy et al., 2013).

In der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion ist vor allem die koronare Herzkrankheit relevant, aber auch arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Adipositas, eine familiäre Vorgeschichte einer Herzinsuffizienz und die Exposition gegenüber kardiotoxischen Wirkstoffen sind beschrieben. Auch die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) fällt in diese Kategorie (Ponikowski et al., 2016; Yancy et al., 2013).

In der Kategorisierung des klinischen Spektrums der Herzinsuffizienz besteht zwischen HFpEF und HFrEF eine „Grauzone“ der intermediär reduzierten linksventrikulären Funktion, die z.T.

Aspekte beider anderen Krankheitsbilder aufweisen kann. Zur besseren Erforschung dieser möglicherweise eigenen Entität wurde in der neuen Fassung der Herzinsuffizienz-Leitlinie mit HFmrEF nun eine eigene Kategorie eingeführt. (Federmann & Hess, 1994; Pearse & Cowie, 2016; Ponikowski et al., 2016).

Eine symptomorientierte Einteilung der Herzinsuffizienz umfasst die der New York Heart Association (NYHA). Hier wird die Herzinsuffizienz abhängig von der Schwere der Symptome und der Belastungsintoleranz beschrieben. Das American College of Cardiology und die American Heart Association (ACC/AHA) ergänzten die NYHA-Klassifikation, um auch asymptomatische Herzinsuffizienzen einzubeziehen (Ponikowski et al., 2016).

NYHA-Klassifikation bei Herzinsuffizienz nach Leistungsfähigkeit		ACC/AHA-Klassifikation der Herzinsuffizienz nach Progression	
NYHA I (asymptomatisch)	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.	Stadium A (keine Herzerkrankung)	Patienten, die unter hohem Risiko stehen, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln.
NYHA II (leicht)	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe und bei geringer Anstrengung. Stärkere körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris, z. B. Bergaufgehen oder Treppensteigen.	Stadium B (asymptomatische Herzerkrankung)	Patienten mit struktureller Herzerkrankung, die mit einer Herzinsuffizienz assoziiert sind.
NYHA III (mittelschwer)	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris, z. B. Gehen in der Ebene.	Stadium C (strukturelle Herzerkrankung)	Patienten, die gegenwärtig oder zu einem früheren Zeitpunkt Symptome aufweisen oder aufgewiesen haben, die mit einer Herzinsuffizienz assoziiert sind.
NYHA IV (schwer)	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe, Bettlägerigkeit.	Stadium D (refraktäre Herzerkrankung)	Patienten mit fortgeschrittener struktureller Herzerkrankung und erheblichen Beschwerden in Ruhe trotz maximaler medikamentöser Therapie, die spezifische Interventionen benötigen.

Abbildung 1: Klassifikation der Herzinsuffizienz, (Ponikowski et al., 2016)

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz ist abhängig vom Lebensalter. Geschlechtsspezifisch konnte gezeigt werden, dass in jüngeren Altersklassen eher Männer und in höheren Altersklassen eher Frauen betroffen sind (Bursi et al., 2006). Die alters- und geschlechtsbezogene Inzidenz der Herzinsuffizienz ist in den letzten Jahren insbesondere bei der HFrEF zurückgegangen, ohne dass sich die Sterblichkeitsrate veränderte (Gerber et al., 2015). Die Daten hospitalisierter Patienten zeigten, dass die HFpEF vermehrt im erhöhten Lebensalter und mit weiblichem Geschlecht assoziiert ist (Mosterd et al., 1999; Owan et al., 2006).

In der ESC-HF-Pilotstudie betrug die 12-monatige Gesamtmortalität stationärer Herzinsuffizienzpatienten 17 Prozent, für ambulante Patienten lag diese bei 7 Prozent. Die meisten Todesfälle wurden auf kardiovaskuläre Ursachen zurückgeführt und die Gesamtmortalität der HFrEF im Vergleich zur HFpEF war höher (Maggioni et al., 2013; Pocock et al., 2013).

In der randomisiert kontrollierten PARADIGM-HF-Studie konnte durch die Einnahme der Medikamentengruppen des Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitors Sacubitril in Kombination mit dem Angiotensinrezeptorantagonist Valsartan im Vergleich zu dem ACE-Hemmer Enalapril in einer 27-monatigen Nachbeobachtungszeit ein Vorteil der Einnahme des Sacubitril/Valsartans gezeigt werden. Die Studie zeigte, dass die kardiovaskuläre Mortalität und eine durch Herzinsuffizienz bedingte Hospitalisierung bei Sacubitril/Valsartan auf 21,8 Prozent und bei Enalapril auf 26,5 Prozent reduziert werden konnten. Auch in der Gesamtmortalität zeigte die Einnahme von Sacubitril/Valsartan einen 2,8 prozentigen Vorteil (McMurray, Packer, Desai, Gong, Lefkowitz, Rizkala, Rouleau, Shi, Solomon, Swedberg, Zile, Investigators, et al., 2014).

Zentraler Adaptationsmechanismus des Herzens an eine gesteigerte Belastung ist die kardiale Hypertrophie. Damit kommt der kardialen Hypertrophie im Bereich der Herzinsuffizienz eine besondere Bedeutung zu: Ein wichtiger unabhängiger Prädiktator für das Auftreten einer Herzinsuffizienz ist die linksventrikuläre Hypertrophie (Levy, Garrison, Savage, Kannel, & Castelli, 1990). Das Risiko für eine Entwicklung einer Herzinsuffizienz steigt mit zunehmender kardialer Hypertrophie um 3 Prozent pro 1 g/m² erhöhten linksventrikulären Massenindex (de Simone, Gottdiener, Chinali, & Maurer, 2008). Wird der Herzmuskel geschädigt oder einer erhöhten hämodynamischen Belastung ausgesetzt, kommt es zu Kompensationsmechanismen (D. Han, Gao, & Cao, 2017; Mann & Bristow, 2005). Diese umfassen die frühe Aktivierung des adrenergen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), um das Herzzeitvolumen mittels Erhöhung des peripheren Widerstandes und Flüssigkeitsretention zu erhalten (Dzau, Colucci, Hollenberg, & Williams, 1981; Eisenhofer et al., 1996; Hasking et al., 1986).

Die kardiale Hypertrophie ist definiert über eine Größenzunahme der Herzmuskelzellen, ohne Vermehrung der Anzahl der Zellen (Heineke & Molkentin, 2006). Hierbei unterscheidet man die physiologische und pathologische kardiale Hypertrophie. Die physiologische Hypertrophie tritt als Reaktion eines gesteigerten Bedarfes, z.B. bei sportlicher Betätigung oder während der Schwangerschaft, auf. Die pathologische Hypertrophie tritt im Rahmen von langfristigem biomechanischem Stress oder extrinsischen Faktoren und strukturellen Erkrankungen des Herzens, wie arterieller Hypertonie und Vitien, auf. Dies kann bei einer intrinsischen Genese auch im Rahmen der hypertrophen Kardiomyopathien entstehen (Frey & Olson, 2003; Heineke & Molkentin, 2006). Morphologisch lassen sich konzentrische Hypertrophie und exzentrische Hypertrophie unterscheiden. Im Rahmen des konzentrischen Remodelling kommt es vor allem auf Grund von Druckbelastung des linken Ventrikels zu einer Zunahme der relativen Wanddicke. Die exzentrische Hypertrophie ist vor allem als Folge einer Volumenbelastung durch eine Zunahme

der Herzmasse und ein erhöhtes Kammervolumen definiert. (Berenji, Drazner, Rothermel, & Hill, 2005; Bernardo, Weeks, Pretorius, & McMullen, 2010; Heineke & Molkentin, 2006; Hill & Olson, 2008). Die initial adaptive Hypertrophie mit Steigerung der Proteinbiosynthese ist zunächst vorteilhaft und kann die Muskelökonomie verbessern (Frey & Olson, 2003; Shen, Jiang, Bei, Xiao, & Li, 2017). Bei anhaltender pathologischer Belastung kommt es zu einer Zunahme des Bindegewebes (Fibroblasten), der extrazellulären Matrix (Kollagen) und einem vermehrten Untergang von Myozyten durch Apoptose und Nekrose (Sabbah & Sharov, 1998; Segura, Frazier, & Buja, 2014). Die anfänglichen reversiblen Veränderungen im Rahmen der Hypertrophie führen auf Dauer zu einer erhöhten Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen und einer erhöhten Mortalität (Frey & Olson, 2003; Kaab et al., 1998; Mudd & Kass, 2008). Im Rahmen der Framingham-Studie wurde die linksventrikuläre Hypertrophie als eigenständiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, die Entstehung von Herzrhythmusstörungen und des plötzlichen Herztodes beschrieben (Kannel, Gordon, & Offutt, 1969; Levy et al., 1990). Aus diesem Grund wird die Hypertrophie nicht mehr als alleinige kompensatorische Anpassungsreaktion auf Veränderungen verstanden, sondern vielmehr als zentraler maladaptiver Prozess in der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion und Herzinsuffizienz (Frey & Olson, 2003).

1.2 Molekulare Mechanismen der kardialen Hypertrophie

Kardiale Hypertrophie ist die zelluläre Antwort auf biomechanischen Stress und kann auf molekularer Ebene als eine Vorstufe der Herzinsuffizienz betrachtet werden. Dabei sind eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege beteiligt. Diese interagieren mit autonomen, endokrinen und parakrinen Signalwegen. Hierbei spielt die Bindung an membrangebundene Rezeptoren der Zelle eine zentrale Rolle (Mudd & Kass, 2008). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die zentralen Signalwege der kardialen Hypertrophie, auf die im Folgenden näher eingegangen wird (Frey & Olson, 2003).

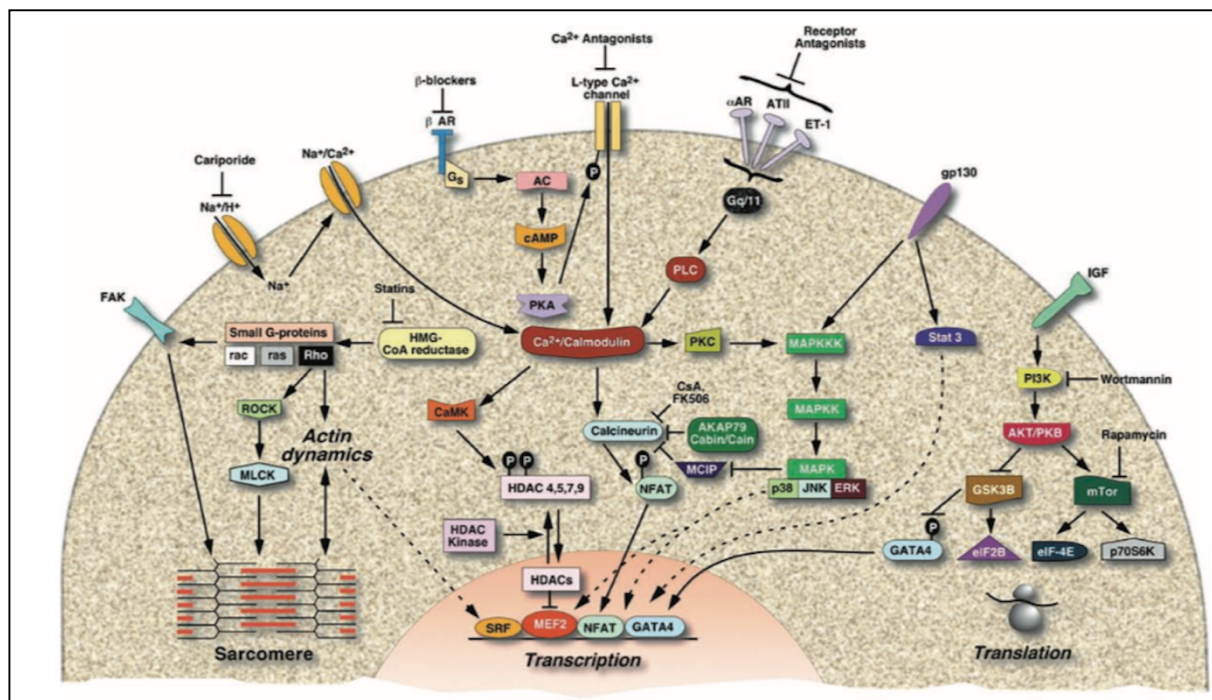


Abbildung 2: Signalkaskaden der kardialen Hypertrophie im Überblick, (Frey & Olson, 2003)

1.2.1 G_s -, G_q/G_{11} - und G_i -Signalkaskaden und GTP-Bindeproteine

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) werden in kleine G-Proteine und Heterotrimeren unterteilt. Durch eine Interaktion mit einem Liganden an die konservierte Struktur aus sieben α -Helices kommt es durch zytoplasmatisch-gebundenes GTP zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Hierbei werden die beiden $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten frei, um weitere Effektormoleküle in der Zelle zu aktivieren. Die $G\alpha$ -Untereinheit besitzt die Fähigkeit durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität das GTP-Molekül zu einem GDP-Molekül zu hydrolysieren. Dies führt zu einer Inaktivierung mit erneuter Anlagerung der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Kleine G-Proteine, wie

Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase aktivierende Proteine (GAPs), unterstützen diesen Prozess. Im kardiovaskulären Kontext sind die drei G-Proteinklassen G_s , G_q/G_{11} und G_i näher zu betrachten (Clapham & Neer, 1997; Rockman, Koch, & Lefkowitz, 2002). Endogene Agonisten, wie Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholamine der α_1 -adrenergen Rezeptoren, aktivieren durch G_q/G_{11} -gekoppelte Prozesse die Phospholipase C β . Durch die Bildung von Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Triphosphat (Ins-1,4,5-P3) führt dies zu einem vermehrten intrazellulären Calciumeinstrom, so dass der Calcineurin/NFAT-Signalweg induziert und das hypertrophe Genprogramm aktiviert wird (Nicol, Frey, & Olson, 2000; Rockman et al., 2002). In einer transgenen Überexpression der Rezeptoren und des nachgeschalteten G_q -Rezeptors konnte ebenso die Entstehung einer kardialen Hypertrophie beobachtet werden. Die Hemmung des G_q/G_{11} -Rezeptors führte zu einer Myokardhypoplasie und ist als Phänotyp embryonal letal (Offermanns et al., 1998). Die genetische Deletion des G_q -Rezeptors hemmt die Induktion kardialer Hypertrophie im Rahmen der akuten Nachlasterhöhung durch operative Aortenkonstriktion in der Maus (TAC, „Transverse Aortic Constriction“, „Aortic Banding“) (Wettschureck et al., 2001).

Durch β_1 -adrenerge Rezeptoren erfolgt eine G_s -Rezeptor-getriggerte Signaltransduktion über eine Adenylatzyklase-getriggerte Stimulation der Proteinkinase A durch cAMP. Die kardiale Überexpression von β_1 -Rezeptoren im Herzen führt zu einer initialen Steigerung der kontraktilen Funktion und im Verlauf zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Herzleistung mit Hypertrophie und Fibrose (Bisognano et al., 2000; Engelhardt, Hein, Keller, Klambt, & Lohse, 2002).

Die β_2 -adrenergen Rezeptoren zeigen sowohl eine G_s - als auch eine G_i -gekoppelte Signaltransduktion. Die spezifische Rezeptorwirkung ist abhängig von der Rezeptorkonzentration. G_q -transgene Mäuse mit einer moderaten Konzentration der β_2 -adrenergen Rezeptoren zeigen zunächst einer Verbesserung der kardialen kontraktilen Funktion. Bei gesteigerter Rezeptorkonzentration entwickelt sich eine Kardiomyopathie (Dorn, Tepe, Lorenz, Koch, & Liggett, 1999). Herzinsuffizienz ist gekennzeichnet durch eine verringerte Anzahl an β -Rezeptoren und eine funktionelle Dephosphorylierung mit Entkopplung durch die β -Adrenorezeptorkinase 1 (β -ARK1). Eine Peptiduntereinheit von β -ARK1, der β -Adrenorezeptorkinase Carboxyl-Terminus (β -ARKct) kann die Entwicklung einer Dilatativen Kardiomyopathie in Myeloperoxidase-defizienten Mäusen hemmen (Rockman et al., 1998).

Die G_i -Signalinduktion erfolgt über β_2 -adrenerge und M_2 -muskarinerge Rezeptoren, durch eine Blockade der Acetylcholinesterase. Im Menschen sind G_i -Rezeptoren im hypertrophierten Herz

hochreguliert, bevor es zu einer Dekompensation mit Herzversagen kommt (Bohm et al., 1993; Neumann et al., 1988). Eine Überexpression der G_i -Rezeptoren führt zu einer Kardiomyopathie und tödlichen Arrhythmien (Redfern et al., 2000).

Kleine G-Proteine sind wichtige Interaktionspartner zwischen verschiedenen zellulären Prozessen. Insgesamt gibt es 5 Klassen der kleinen G-Proteine: RHO, RAS, ARF, RAB und RAN. Stellvertretend für alle sei hier RAS, das erstbeschriebene prohypertrophe kleine G-Protein, erwähnt. Bei konsekutiver Überexpression in transgenen Mäusen konnte hier eine Hypertrophie erzeugt werden (Hunter, Tanaka, Rockman, Ross, & Chien, 1995). Eine Ras-Unterdrückung verhinderte jedoch eine Phenylephrin-vermittelte Hypertrophie und Proteinsynthese (Fuller, Gillespie-Brown, & Sugden, 1998; Thorburn, 1994).

1.2.1.1 Mitogen Activated Protein Kinasen

Mitogen Activated Protein Kinasen (MAPK) sind Serin-Threonin-Kinasen, die extrazelluläre Stimuli in ein breites Spektrum zellulärer Reaktionen umwandelt. Hierbei spielen sie in eukaryotischen Zellen eine große Rolle in der Regulierung von Genexpression, Mitose, Apoptose und Differenzierung. Die konventionellen MAPKs umfassen die extrazellulären, signalregulierenden Kinasen. Entsprechend ihrer Sequenzhomologie werden sie in drei verschiedene Subfamilien unterteilt: Extrazellulär Responsive Kinasen (ERKs: Isoform ERK 1/2), C-Jun N-Terminale Kinasen (JNKs: Isoform JNK1/2/3) und p38- Mitogen-Activated Protein Kinasen (p38-MAPKs: Isoform p38 α , p38 β , p38 γ) (Fanger, Johnson, & Johnson, 1997; Kyriakis & Avruch, 2001; Lavoie & Therrien, 2015; McCain, 2013; Pearson et al., 2001). Die MAPK Phosphatase-1 (MKP-1) ist ein Inhibitor aller drei MAPK- Subklassen und hemmt die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie (Bueno et al., 2001).

Jede Gruppe der MAP-Kinasen besteht aus drei Kinasen: MAPK, MAPK-Kinase (MAPKK) und einer MAPKK-Kinase-Kinase (MAPKKK). Durch Zytokine und zellulären Stress kommt es durch eine Phosphorylierung zu einer Aktivierung dieser verschiedenen MAPK-Wege (Cargnello & Roux, 2011). Im Folgenden wird auf die einzelnen Signalwege genauer eingegangen. Eine Übersicht gibt die Abbildung 3.

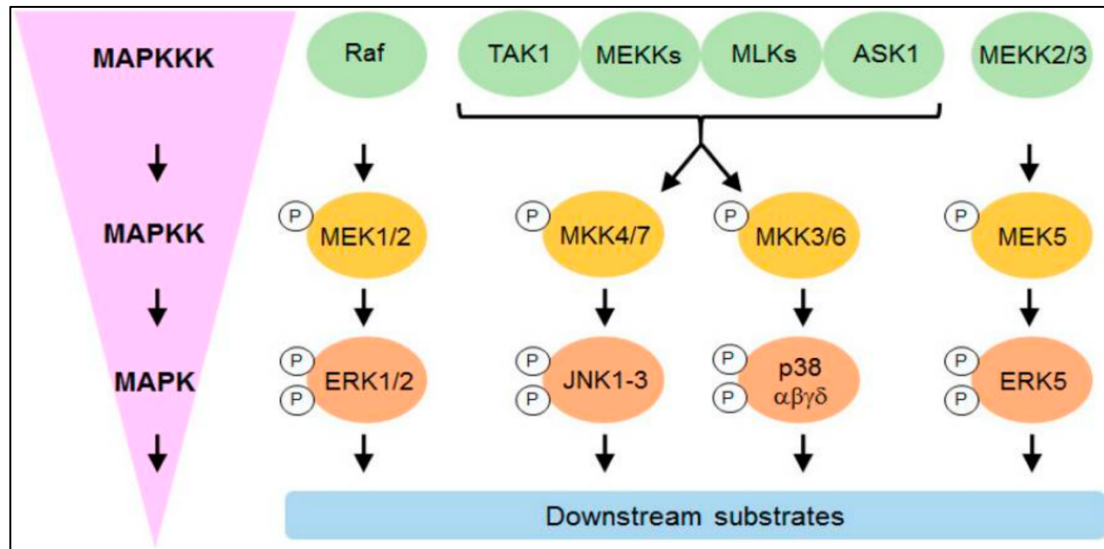


Abbildung 3: Signalkaskade der Mitogen Activated Protein Kinasen, (Turner & Blythe, 2019)

Die Kinasen ERK1 und ERK2 werden durch Wachstumsfaktoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Zytokine und osmotischen Stress aktiviert (Raman, Chen, & Cobb, 2007). Als Beispiel für diese Signalnetzwerk-kaskade wird hier der Epitheliale Growth Factor (EGF) als endogener Agonist beschrieben. Durch eine Bindung an den Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR), wird die RAS-GTPase aktiviert. Zusätzlich bewirkt diese Bindung die Aktivierung des EGFR-assoziierten Nukleotid-Austauschfaktors Son of Sevenless (SOS1) (Johnson & Chen, 2012; Vo et al., 2016). SOS 1 initiiert eine Umwandlung von GTP in GDP, so dass es zu einer negativen Rückkopplung durch Bindung von GTP an die RAS-GTPase kommt. Die RAS-Superfamilie besteht aus über 150 kleinen G-Proteinen (HRAS, KRAS, NRAS) (Johnson & Chen, 2012). Ihre Signaltransduktion aktiviert die Serin-Threonin Kinase RAF. Die RAF-Familie umfasst mehrere Varianten (ARAF, BRAF, CRAF), welche für die Fortsetzung des Signalwegs durch die MAP-Kinase-ERK-Kinase (MEK1/2) und die Extrazellulär Signalregulierte Kinase (ERK1/2) verantwortlich sind (Matallanas et al., 2011; McCain, 2013). Aktiviertes ERK 1/2 transloziert in den Zellkern und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren, wie ELK-1, ETS1/2, C-Fos, p53 und GATA4 (Kehat & Molkentin, 2010a; Liang, Wiese, et al., 2001). Durch eine Aktivierung und Unterdrückung von Zielgenen im Zellkern kann über Wachstum oder Abwehr eines Zelltodes entschieden werden (Widmann, Gibson, Jarpe, & Johnson, 1999). Hierdurch wird ERK1/2 ebenso eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und der Progression einer Herzinsuffizienz zugeschrieben (Bueno et al., 2000; Clerk & Sugden, 2004; Gerits, Kostenko, & Moens, 2007; Petrich & Wang, 2004; Sala et al., 2012; Y. Wang, 2007).

Die spezifische Rolle von ERK1/2 wird in der Modulation der kardialen Hypertrophie intensiv diskutiert, da hier auf den ersten Blick widersprüchliche Forschungsergebnisse vorliegen. Als Reaktion auf eine Stimulation zeigt sich die ERK-Signalgebung in Bezug auf den pathophysiologischen Kontext kardialer Hypertrophien auf zwei unterschiedliche Weisen. In der frühen Phase der chronischen Drucküberlastung sind positive Effekte, wie die Entwicklung von adaptiver konzentrischer Hypertrophie und die Prävention des Zelltodes, beschrieben. Andererseits zeigt sich ERK1/2 jedoch auch bei einer maladaptiven Hypertrophie und bei Chemotherapie-vermittelten, kardialen Folgen aktiviert (Gallo, Vitacolonna, Bonzano, Comoglio, & Crepaldi, 2019; Kehat & Molkentin, 2010b).

Die Hemmung von ERK1/2 oder der MAPK-Kinase MEK1 bewirkt keine direkte Induktion einer konzentrischen Hypertrophie (D'Angelo et al., 1997; Glennon et al., 1996). Die transgene Überexpression von MEK1 führt zu einer ERK1/2-Aktivierung. Hierbei ist keine Steigerung der Aktivität von JNK und p38 zu bemerken. Es induziert eine adaptive kardiale Hypertrophie mit normaler systolischer Funktion und einer diastolischen Dysfunktion, analog einer hypertrophen Kardiomyopathie (Bueno et al., 2000). Eine Überexpression von MEK5, welches ERK5 stimuliert, bildet eine maladaptive exzentrische Herzhypertrophie aus und führt zu einer Kardiomyopathie mit plötzlichem Herztod (Gallo et al., 2019; Nicol et al., 2001).

Die MAP-Kinase JNK wird durch direkte Agonisten, wie Endothelin-1, Phenylephrin oder Angiotensin II und durch mechanische Dehnung der Kardiomyozyten, aktiviert (Komuro et al., 1996; Ramirez, Zhao, Schulman, & Brown, 1997; Yano, Kim, Izumi, Yamanaka, & Iwao, 1998). Hierbei kommt es zu einer direkten Phosphorylierung von der MAPK-Kinase MKK4 oder MKK7, welche wiederum von der MAPK/ERK-Kinase-Kinase 1-4 (MEKK1-4), der Mixed Lineage Kinase 1-3 (MLK1-3), dem Tumor Progression Lokus-2 (TPL-2), der Dual Leucine Zipper Kinase (DLK), dem Transkriptionsfaktor 1 (TAK1), der Thousand and One Amino Acid Proteinkinase 1/2 (TAO1/2) und der Apoptose-Signal-regulierte Kinase 1/2 (ASK1/2) reguliert werden (Lawler, Fleming, Goedert, & Cohen, 1998).

Die Ablation von MKK4 durch eine mutierte dominant-negative Isoform, hemmt die Entwicklung einer Hypertrophie in vitro nach Stimulation mit Endothelin-1 und in vivo während einer Nachlasterhöhung (Choukroun et al., 1999; Choukroun et al., 1998). Dabei spielt die G_q-Rezeptor-vermittelte Signalkaskade eine entscheidende Rolle. Experimentelle Versuche, eine TAC-induzierte Hypertrophie durch eine MEKK1-Inhibition zu hemmen, zeigen sich nicht erfolgreich und führen zur Entwicklung einer Dilatativen Kardiomyopathie (Bogoyevitch et al., 1996; Sadoshima et al., 2002). Die Überexpression der MKK7 führt zu einer spezifischen Erhöhung der JNK-Aktivität, so dass transgene Mäuse an einer Herzinsuffizienz versterben (Petrich & Wang, 2004).

Eine Inaktivierung des JNK-Signalwegs im transgenen Tiermodell verhindert eine kardiale Hypertrophie (Ma, Liu, & Chen, 2018).

Die MAP-Kinase p38-Familie hat unterschiedliche Expressions- und Funktionsmuster in einzelnen Herzzelltypen. Das Stimulationsmuster zeigt sich ähnlich zur JNK. Eine direkte Stimulation durch ET-1 oder Phenylephrin, als auch durch eine Drucküberlastung, zeigen eine Aktivierung der MAP-Kinase p38 (Takeishi et al., 2001; Ueyama et al., 1999; Y. Wang et al., 1998). Auf der molekularen Ebene kommt es hierbei zu einer Aktivierung von Kinasen, wie der Mammalian-Sterile-20-Like Kinase (MST1), der MAPK/ERK-Kinase-Kinase (MEKK1-4), der Mixed Lineage Kinase 3 (MLK3), des Transkriptionsfaktors 1 (TAK1) und der Apoptose-Signal-regulated Kinase (ASK). Diese führen zu einer weiteren Aktivierung der Kinasen MKK3/4/6/7 (D. Zhang et al., 2000). Ein weiterer Signaltransduktionsweg wird vor allem während der Entwicklung myokardialer Ischämie beobachtet. Hier erfolgt eine direkte Bindung des TGF- β -aktivierten Proteins 1 (TAK1), welches direkt an die MAPK p38 bindet (G. Lu et al., 2006; Tanno et al., 2003).

Der p38-Signalweg ist in der Lage, die Gen-Proteinexpression durch mehrere komplementäre Methoden zu modulieren und die Regulation der Chromatinstruktur durch DNA-Methylierung und Histon-Phosphorylierung modifizieren (X. Li et al., 2018; Vermeulen, Vanden Berghe, Beck, De Bosscher, & Haegeman, 2009). Ebenso ist die Kinase p38 in der Lage Gentranskription direkt durch eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie ATF1/2/6, C/EBP α , CHOP, CREB, C-Myc, C-Fos, ELK-1, GATA4, MEF2a/c/d, NFAT, SRF und STAT1 zu beeinflussen (Turner, 2011; Yokota & Wang, 2016). Eine weitere Aufgabe des p38-Signalweges ist die Regulation der Stabilität und des Zerfalls spezifischer mRNAs durch Phosphorylierung spezifischer RNA-bindender Proteine, einschließlich des mRNA-stabilisierenden Faktors Humanes Antigen R (HuR) und des mRNA-destabilisierenden Faktors Tristetraprolin (TTP) (Dean, Sully, Clark, & Saklatvala, 2004; O'Neil, Ammit, & Clark, 2018). Diese beiden Faktoren konkurrieren umeinander, um die mRNA-Stabilität durch Bindung an AU-reiche Elemente (AREs) an den 3'-untranslatierten Regionen (3'UTRs) spezifischer mRNAs zu regulieren. Durch die Phosphorylierung von HuR wird die Stabilität spezifischer mRNAs erhöht. Bei einer Phosphorylierung von TTP wird ein mRNA-Zerfall reduziert. Hierdurch führt die p38-vermittelte Phosphorylierung zu einem Anstieg eines mRNA-Spiegels. Der genaue Wirkmechanismus ist bisher noch nicht bekannt, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (MK2), ein Substrat von p38, eine verantwortliche Kinase ist (Dean et al., 2004; Soni, Anand, & Padwad, 2019). Durch den p38-Signalweg kann ebenso eine Proteintranslation durch Phosphorylierung der MAPK-Interagierenden Serin-Threonin-Protein Kinase 1 (MNK1) reguliert werden (Turner & Blythe, 2019).

Die Kinase ERK5 ist die am wenigsten untersuchte MAP-Kinase. Sie ist in der embryonalen Entwicklung und Entstehung des Gefäßsystems essentiell. Eine Aktivierung erfolgt ebenso durch Stress- und Wachstumsstimuli, so dass MEKK2/3 phosphoryliert wird und MEK5 aktiviert wird. Inaktives ERK5 ist im Zytoplasma lokalisiert und transloziert mit aktivem MEK5 oder bei Stimulation in den Zellkern (X. Wang et al., 2006). Mögliche Substrate sind Transkriptionsfaktoren, wie MEF2, SAP1a, C-Myc, SGK, Connexin 43 und BAD (Cargnello & Roux, 2011; Hayashi & Lee, 2004; X. Wang et al., 2006).

1.2.2 Phosphatidylinositol-3-Kinasen, AKT, Glykogensynthetase Kinase-2/3

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) werden über verschiedene Rezeptoren aktiviert, so zum Beispiel Insulin-Like-Growth Factor-1 (IGF-1) bindende Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und G-Protein Rezeptoren (GPCR) mit α - und β_2 -adrenergen Agonisten. Ergebnisse aus Tiermodellen zeigten, dass PI3K auch durch eine G $\beta\gamma$ -abhängige Signalkaskade aktiviert wird (Naga Prasad, Esposito, Mao, Koch, & Rockman, 2000). Die Überexpression von PI3K führt in transgenen Mäusen zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie. Die Expression einer dominant-negativen PI3K erniedrigt das Herzgewicht in vivo (Shioi et al., 2000). Diese Veränderungen basieren hauptsächlich auf Unterschieden der Kardiomyozytengröße bei unbeeinträchtigter Funktion (Frey & Olson, 2003).

Zentraler Interaktionspartner der PI3-Kinase ist die Serin-Threonin-Kinase AKT (Proteinkinase B). Durch eine Bindung von PI3K-phosphorylierten Phosphoinositiden und der phosphorylierten Phosphoinositid-dependent Kinase 1 (PDK1) wird AKT aktiviert (Alessi et al., 1997). Eine transgene Überexpression von AKT induziert in Kardiomyozyten und in Skelettmuskelzellen führend den Phänotyp einer adaptiven Hypertrophie (Bodine et al., 2001; Matsui et al., 2002; Shioi et al., 2002).

Als weitere Modulatoren des PI3K/AKT-Signalweges konnten die Glykogensynthase-Kinase 2 (GRK-2), Glykogensynthase Kinase-3 (GSK-3) und die Serin-Threonin-Kinase Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) identifiziert werden. Der mTOR-Proteinkomplex wird über die Komplex-Bindung des immunsuppressiven Makrolidantibiotikum Rapamycin an seinen intrazellulären Rezeptor FK506 Binding Protein 12 (FKBP12) inhibiert. Die systemische Gabe von Rapamycin bei Mäusen vor transverser Aortenkonstriktion hemmt die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie (Shioi et al., 2003).

Auch die Gabe von Rapamycin nach Aortenkonstriktion hemmt die kardiale Hypertrophie. Dabei zeigte sich für die kompensierte Hypertrophie ohne Funktionsstörungen ein besseres Ansprechen, als für die dekomensierte Hypertrophie mit Herzinsuffizienz (McMullen et al., 2004).

Die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) ist ein zentraler Inhibitor der kardialen Hypertrophie und reguliert die nukleäre Lokalisation und Aktivierung des Transkriptionsfaktor Nuclear Factor of activated T-Cells (NFAT) über seine Phosphorylierung. Hierüber kommt es zum nukleären Export und der Translokation von NFAT und GATA4 in das Zytosol (Morisco et al., 2001; Morisco et al., 2000). Die GSK-3 wird durch die Phosphorylierung von AKT inaktiviert, so dass eine zusätzliche negative Rückkopplung besteht. Die kardiale Überexpression von GSK-3 reduziert in Calcineurin-transgenen Mäusen die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie (Antos et al., 2001).

Ebenso hat die Glykogensynthase-Kinase 2 (GRK-2) eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Progression der kardialen Hypertrophie. Die GRK-2 bindet an die G $\beta\gamma$ -Untereinheiten von dissoziierten G-Proteinen, so dass durch Phosphorylierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weitere Signalwege aktiviert werden (Cannavo, Liccario, & Koch, 2013). Freigesetztes β -Arrestin aktiviert Clathrin-vermittelte Rezeptor-Endozytose und -Degradierung, so dass es zu einer reduzierten humoralen Reaktionsfähigkeit und einem gesteigerten Sympatikotonus mit zusätzlich gesteigertem RAAS-System kommt. Dies begünstigt eine kardiale Hypertrophie und die Entstehung von einer Herzinsuffizienz (Raake et al., 2008; Schlegel et al., 2017).

Sowohl in vivo als auch in vitro zeigt eine Überexpression von GRK-2 eine erhöhte Interaktion von GRK-2 und PI3K, so dass eine Kardiomyozytenhypertrophie induziert wird (Koch et al., 1995; Raake et al., 2013; Raake et al., 2008; Rockman et al., 1998; Schlegel et al., 2017).

Durch eine GRK-2-Hemmung, einen GRK-2-Knockdown oder eine Expression des hemmenden Peptids β ARKct zeigten in vivo-Modelle eine verbesserte Kontraktilität (Raake et al., 2013). Durch einen Knockdown von GRK2 zeigt sich in vivo als Reaktion auf Belastung ein reduziertes Herz-Körpergewichtsverhältnis (Raake et al., 2008; Raake et al., 2012). Auch in vitro können ein verringertes kardiales Remodelling und eine reduzierte fetale Geninduktion beobachtet werden. In einem GRK-2-Knockdown mit TAC-behandelten Mäusen zeigt sich eine reduzierte kardiale Hypertrophie. Durch eine Kardiomyozytenstimulation mit Angiotensin II und Phenylephrin wird hier eine erhöhte Expression der GRK-2 ausgelöst. Eine verstärkte Signalübertragung durch Proteinkinase B verursacht eine Hemmung der GSK-3 und Akkumulation von NFAT (Raake et al., 2008; Raake et al., 2012; Schlegel et al., 2017).

1.2.3 Histon- Acetyltransferase, - Deacetylase, Myocyte Enhancer Factor 2

Eine wesentliche Kontrolle des Herzwachstums und der zellulären Genexpression als Reaktion auf Stressreize, entsteht durch posttranslationale Modifikation von Histonen. Hierbei wird die regulatorische Sequenz des Chromatins zu Aktivatoren oder Repressoren moduliert. Man unterscheidet zwischen einer Stimulation der Genexpression mittels Acetylierung durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) und einer Deacetylierung mittels Histon-Deacetylasen (HDACs). Bei der Acetylierung kommt es zu einer Relaxation der Chromatinstruktur, so dass ein Zugang zu den Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird. Durch eine Deacetylierung entsteht eine Chromatinkondensation und Unterdrückung der Transkription (Bucks & Olson, 2006).

Histon-Acetyltransferasen bestehen aus mindestens 5 Gruppen. Die am umfassendsten untersuchten sind p300 und der eng verwandte Coaktivator CREB-Binding Protein (CBP). Sie spielen eine entscheidende Rolle beim physiologischen und pathologischen Wachstum kardialer Myozyten (Bucks & Olson, 2006). Studien zeigten, dass p300-Knockout-Mäuse kardiale Strukturdefekte mit verminderter Trabekulation und eine verminderte Expression der Muskelstrukturproteine β -MHC und α -Aktinin aufwiesen (Yao et al., 1998). Bei induzierten Herzhypertrophien wurde eine hohe p300-Aktivität erkannt (R. Gusterson et al., 2002). In Gen-Knockin-Ansätzen, sowie transgenen p300-Mausmodellen zeigte sich die Histon-Acetyltransferase Domäne von p300 essentiell für die Bildung des Herzens (Shikama et al., 2003) und die Entwicklung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz (R. J. Gusterson, Jazrawi, Adcock, & Latchman, 2003; Yanazume et al., 2003). Das Protein p300 steht in dem Mechanismus als Adapter für die Hypertrophie-induzierenden Transkriptionsfaktoren GATA4, SRF und MEF2 (Dai & Markham, 2001; Kakita et al., 1999; Sartorelli, Huang, Hamamori, & Kedes, 1997; Slepak et al., 2001). Gleichzeitig wird die Aktivität von p300/CBP durch Signalwege erhöht, die das fetale Genprogramm fördern (Bucks & Olson, 2006).

Histon-Deacetylasen werden in drei Klassen unterteilt. Die Klasse I fördert das Zellwachstum (Antos et al., 2001; Kook et al., 2003). Die Klasse II zeigt bei Expression eine Suppression des Myozytenwachstums (McKinsey, Zhang, & Olson, 2002b; C. L. Zhang et al., 2002) und eine potentielle Funktion der Klasse III ist im Herzen noch nicht vollständig entschlüsselt (Bucks & Olson, 2006).

HDACs der Gruppe II (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) enthalten neben der katalytischen Domäne eine große N-terminale Verlängerung für transkriptionelle Wechselwirkungen, so dass Phosphorylierungen einen nukleären Export steuern können (Bucks & Olson, 2006).

In vivo-Studien bei HDAC5- und HDAC9-Knockout-Tieren zeigten, dass Histon-Deacetylasen unabhängig vom gleichzeitigen Vorkommen beider, nur an Signalwegen einer pathologischen und

nicht an der physiologischen Hypertrophie beteiligt sind (Backs & Olson, 2006; C. L. Zhang et al., 2002). Eine adenovirale Überexpression konstitutiv aktiver HDAC4/5- und HDAC9-Mutanten verhinderten eine induzierte Kardiomyozytenhypertrophie (Chang et al., 2004; C. L. Zhang et al., 2002). Weitere Studien zeigten, dass Mäuse die Homozygot für ein Null-Allel von HDAC5 oder HDAC9 lebensfähig sind. Der Großteil der HDAC5/9 Doppel-Mutanten-Mäuse verstarben hingegen mit dünnwandigem Myokard und septalen Ventrikeldefekten in der Spätembryogenese, so dass HDACs an der Regulierung und Aktivierung von Herztranskriptionsfaktoren in der Herzentwicklung beteiligt sind (Chang et al., 2004). HDAC4/7-Knockout-Mäuse zeigten sich hingegen nicht lebensfähig und sind aktuell noch Forschungsbestandteil verschiedener Gen-Deletions-Studien (Backs & Olson, 2006).

Das abnormale Herzwachstum bei HDAC-Klasse II-Knockout-Tieren korreliert mit der Überaktivierung des Myocyte Enhancer Faktor 2 (MEF2) -Transkriptionsfaktors (D. Zhang et al., 2000). Frühere Studien zeigten, dass MEF2 direkt mit HDACs der Klasse II über ein für diese Klasse spezifisches 18-Aminosäuremotiv assoziieren (Lemerrier et al., 2000; J. Lu, McKinsey, Nicol, & Olson, 2000; J. Lu, McKinsey, Zhang, & Olson, 2000; Miska et al., 1999; Sparrow et al., 1999; C. L. Zhang et al., 2002; C. L. Zhang, McKinsey, Lu, & Olson, 2001). Durch die Bildung eines Komplexes beider kommt es zu einer Unterdrückung von Genen, die MEF2 Bildungsstellen beherbergen (McKinsey, Zhang, & Olson, 2002a).

Ebenso interagiert auch die Histon-Acetyltransferase p300 mit derselben Domäne von MEF2, die von der Histon-Deacetylase der Klasse II besetzt wird, so dass die Interaktionen beider gegenseitig ausgeschlossen werden. Je nach Interaktionspartner des MEF2 entsteht hierbei ein positives oder negatives Transkriptionssignal (A. Han, He, Wu, Liu, & Chen, 2005; McKinsey, Zhang, & Olson, 2001; Sartorelli et al., 1997). MEF2 interagiert mit GATA- und NFAT-Transkriptionsfaktoren (Dai, Xu, & Molkentin, 2005; Liang, De Windt, et al., 2001; Morin, Charron, Robitaille, & Nemer, 2000), ähnlich wie HDAC II mit SRF, GATA, NFAT und Myocardin (Backs & Olson, 2006; Cao et al., 2005; Davis, Gupta, Camoretti-Mercado, Schwartz, & Gupta, 2003; Torrado et al., 2003; Watanabe et al., 2003).

Histon-Acetyltransferasen und -Deacetylasen der Klasse II konkurrieren zusätzlich um die Assoziation mit Calmodulin (CaM). Eine Strukturanalyse von HDAC4/5 zeigte ein CaM-bindendes Motiv innerhalb der MEF2-bindenden Region. Bei der Bindung von Calcium an CaM assoziiert der Komplex mit HDACs der Klasse II, so dass MEF2 verdrängt wird und eine HDAC-Phosphorylierung und Auflösung der Unterdrückung von MEF2-Zielgenen erzeugt wird (Backs & Olson, 2006; Youn, Grozinger, & Liu, 2000).

Aktuelle Studien zeigen, dass eine HDAC-Hemmung, beispielsweise durch Trichostatin A, eine drucküberlastungsinduzierte kardiale Hypertrophie reduzieren und eine Histonacetylierung von Zielgenen in direktem Zusammenhang mit Herzkontraktilität, Ablagerung von Kollagen und der Entstehung von Entzündungsprozessen stehen (McIntyre, Daniels, Molenaars, Houtkooper, & Janssens, 2019; Ooi et al., 2015). Ebenso konnte bei Streptozocin-induziertem Diabetes Mellitus durch eine Behandlung von Natriumbutyrat eine Besserung der Myokardfunktion und Reduktion einer Herzhypertrophie mit verringertem Herz-/Tibia-Längen-Verhältnis in Mäusen beobachtet werden (Chen et al., 2015). Bei einer Hinzunahme von Natriumbutyrat zu einer fettreichen Ernährung konnte die Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz reduziert werden. Ein möglicher Mechanismus ist hier die verbesserte mitochondriale Funktion, Thermogenese und Fettsäureoxidation (Gao et al., 2009; Henagan et al., 2015; McIntyre et al., 2019). Weitere Studien zeigten, dass sich bei natürlich gealterten Mäusen eine Nahrungsergänzung mit Natriumbutyrat den Glukosestoffwechsel verbesserte. Möglich wäre hier ein altersbedingter Nutzen, der über eine ernährungsbedingte Funktionsstörung hinausgeht (McIntyre et al., 2019; Walsh et al., 2015).

1.2.4 Proteinkinase C

Proteinkinase C (PKC) ist eine ubiquitär exprimierte Serin-Threonin-Kinase. Die Unterteilung erfolgt in klassische, neuartige und atypische Formen. Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über diese.

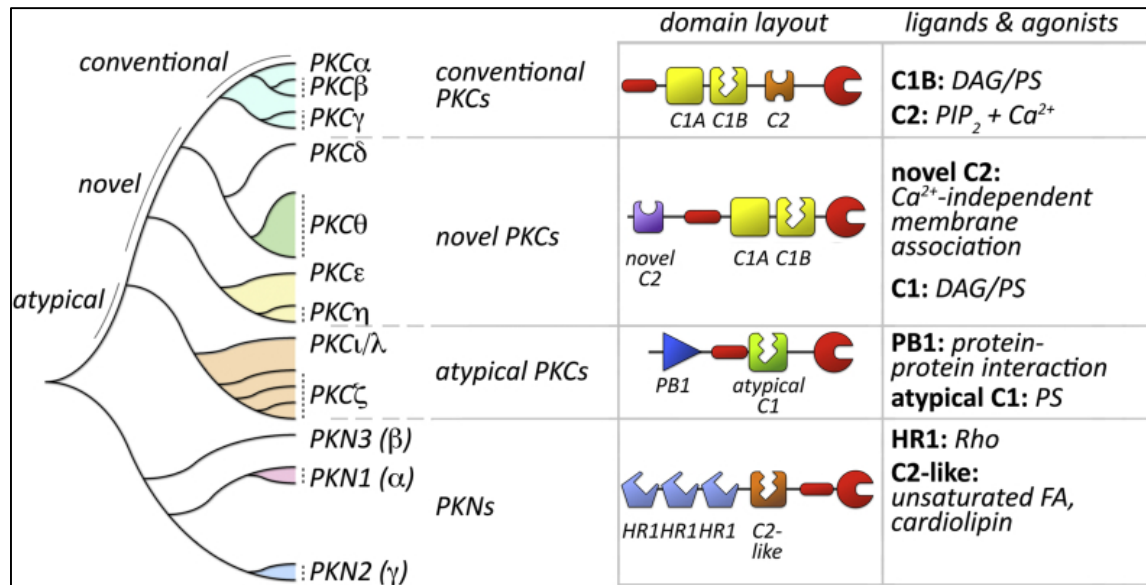


Abbildung 4: Schematischer Überblick der Proteinkinase-Klassen, (Marrocco et al., 2019)

Die klassische Proteinkinase C (α , β I, β II und γ) enthält zwei C1-Domänen, C1A und C1B an ihrem N-Terminus. An die C1B-Domäne erfolgt die Bindung von Diacylglycerin (DAG) oder Phosphatidylserin (PS). Auf die C1-Domäne folgt eine C2-Domäne. Diese bindet 4,5-Bisphosphat (PIP₂) und Calcium (Marrocco et al., 2019).

Die neuartige Proteinkinase C (δ , ϵ , θ , η) und die atypische Proteinkinase C (ζ , λ) enthalten in ihrem N-Terminus eine neuartige C2-Domäne. Diese ist Calcium unabhängig und enthält eine Phox- und Bem1-Domäne, so dass eine Protein-Protein-Interaktion vermittelt werden kann. Die klassischen und neuartigen Proteinkinase-Gruppen enthalten zusätzlich noch eine C1-Domäne, an die Phosphatidylserin binden kann. Die neuartigen Proteinkinasen können zusätzlich durch Diacylglycerin aktiviert werden (Marrocco et al., 2019).

Die Proteinkinase N (PKN) zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu der Proteinkinase C-Familie, so dass sie schematisch mit in die Gruppe der Proteinkinase C geordnet wird. Ursprünglich entdeckte man diese bei der Hybridisierung eines cDNA-Fragments, welches für die PKC β 2-Domäne kodiert (Mukai & Ono, 1994). Man unterscheidet die Proteinkinase N in drei Isoformen: die PKN1 (PKN, PRK1, PAK1/PKN α), PKN2 (PRK2, PKN β) und PKN3. Ihre katalytische Domäne hat Ähnlichkeiten mit der Sequenz der Proteinkinase C-Familie, jedoch unterscheiden sie sich in der

N-terminalen regulatorischen Domäne. Jede Proteinkinase N weist drei Coiled-Coil-Homologie-Region1 (HR1)-Domänen auf. Hierdurch kann eine Bindung der kleinen GTPasen der Rho-Familie (RhoA, RhoB, RhoC) erfolgen (Flynn, Mellor, Palmer, Panayotou, & Parker, 1998; Hutchinson, Lowe, McLaughlin, Mott, & Owen, 2013; Yoshinaga, Mukai, Toshimori, Miyamoto, & Ono, 1999). Eine Aktivierung der autoinhibitorischen C2-ähnlichen Domäne erfolgt durch ungesättigte Fettsäuren, wie Arachidon-, Lysophosphatid-, Linolsäure, Cardiolipin, PIP2 und PIP3 (Ochoa et al., 2001).

Proteinkinasen enthalten eine Reihe von konservierten Phosphorylierungsstellen. Diese befinden sich innerhalb der Kinase in unterschiedlichen Regionen, wie der Aktivierungsschleife, des Wendemotivs und des hydrophoben Motivs. Die Phosphorylierung an diesen Stellen ist für die Reifung und Aktivierung der Kinase entscheidend. Im Folgenden wird auf die einzelnen Phosphorylierungen eingegangen. Die initiale Aktivierung der Kinasen PKC und PKN erfolgt durch eine 3-Phosphoinositid-dependent Kinase 1 (PDK1) in der Aktivierungsschleife. Durch die Phosphorylierung der PKC werden molekulare Chaperone, wie HSP90, Cdc34 und TORC2 aktiviert. Diese vermitteln eine Reifung und Stabilisierung der Proteinkinase C. Ebenso führt eine PDK1 abhängige Phosphorylierung der PKN1 durch Bindung eines aktivierten RhoA-Proteins zu einer verstärkten Aktivität (Facchinetti et al., 2008; Flynn, Mellor, Casamassima, & Parker, 2000; Gould, Kannan, Taylor, & Newton, 2009; Ikenoue, Inoki, Yang, Zhou, & Guan, 2008).

Eine Auto-Phosphorylierung oder die Wirkung anderer Kinasen, wie PKC-Isoenzyme (mTor, SRC-Kinasen oder PI3K) lösen eine Phosphorylierung der Proteinkinase C im Wendemotiv und hydrophoben Motiv aus (Freeley, Volkov, Kelleher, & Long, 2005; Newton, 2003; Thebault & Ochoa-Garay, 2004). Die PKN wird durch die MEK-Kinase 2 (MEKK2) aktiviert (W. Sun, Vincent, Settleman, & Johnson, 2000).

Die Proteinkinase $C\alpha$ ist vor allem in Kardiomyozyten exprimiert. Eine zentrale Rolle zeigt sie in der Entwicklung von menschlichen Herzpathologien. In der Entwicklung einer Herzinsuffizienz zeigt sie sich als wichtiger Regulator der Muskelkontraktilität (Bowling et al., 1999; Braz et al., 2004; Simonis et al., 2007; Yang et al., 2005).

Während PKC α -Knockout-Mäuse eine erhöhte kardiale Funktionsleistung und eine normale Hypertrophiereaktion auf Drucküberlastung zeigten, führte eine kardialspezifische Überexpression zu einer kardialen Hypertrophie mit reduziertem Fractional Shortening (Braz et al., 2004).

PKC α phosphoryliert eine Vielzahl kardial spezifischer Substratproteine. Zu diesen gehören der Proteinphosphatase-Inhibitor (I $PP1$), die $\alpha1C$ -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals, Troponin-

Komplex-Proteine oder Titin. Die IPP1-Phosphorylierung durch PKC zeigt sich als Modulator der Protein-Phosphatase1-Aktivität. Hierdurch kommt es zu einer Phospholamban (PLN)-Phosphorylierung, so dass hier eine indirekt modulierende Wirkung auf die endoplasmatische Calcium-ATPase des Sarcoplasmatischen Retikulums entsteht (Marrocco et al., 2019). Andere Studien identifizieren zusätzlich Phospholamban als Substrat der PKC α (Colyer, 1998; Kranias & Solaro, 1982).

Auch die übrigen Proteinkinasen C (PKC β , PKC δ , PKC ϵ) zeigen sich in niedriger Konzentration oder während eines pathologischen kardialen Remodellings exprimiert (Hambleton et al., 2006; Marrocco et al., 2019; Newton, Antal, & Steinberg, 2016; Simonis et al., 2007).

Die Analyse der Herzfunktion für PKC β und PKC γ ergibt, dass ihre Deletion in Knockout-Mausmodellen einen vernachlässigbaren kardialen Phänotyp ausbilden (Q. Liu et al., 2009).

Die Isoform PKC β wird in Kardiomyozyten der Maus jedoch im Rahmen von kardialen Pathologien exprimiert. Hier ist das basale Niveau der Proteinkinase C- β in adulten Mäusen erniedrigt, jedoch essentiell in der prohypertrophen Herzentwicklung (Palaniyandi, Sun, Ferreira, & Mochly-Rosen, 2009).

Studien von Wakasaki et al. zeigten, dass eine konstitutive Überexpression der PKC β Isoform in transgenen Mäusen zu einer linksventrikulären Hypertrophie, Myokardfibrose und verminderter LV-Funktion führt (Wakasaki et al., 1997). Bowman et al. konnten während einer geringen Expression von PKC β in transgenen adulten Mäusen jedoch nur eine leichte ventrikuläre Hypertrophie ohne pathologische Veränderungen zeigen. Hierbei führte eine Überexpression in Neugeborenen zum plötzlichen Herztod (Bowman et al., 1997). Die Wirkung der PKC β auf die Calcium-Homöostase und Calciumreaktion auf Myofilamente ist altersabhängig (Takeishi et al., 1998). In Studien von Huang et al. und Heinrich et al. wurde in Abhängig des Alters der transgenen Tiere eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber einer Aktivierung durch Phospholamban-Phosphorylierung oder des Calcium-Spiegels detektiert (Heinrich & Simpson, 1988; Huang et al., 2001).

Studien zu neuartigen PKCs im Herzen konzentrieren sich vor allem auf die Rolle der Ischämie-Reperfusionsverletzung. Hierbei zeigt sich, dass die neuen PKC-Isoenzyme in der Lage sind Substrate in und außerhalb der Mitochondrien zu phosphorylieren. Außerhalb der Mitochondrien konnten bisher Substrat-Targets, wie das Myosin-bindende Protein-C (MyBPC) oder die regulatorische Untereinheit des spannungsgesteuerten Kaliumkanals (Kv1,5), identifiziert werden (David et al., 2012; Smyrniak et al., 2018).

Knockout-Mäuse für PKC θ entwickeln eine Dilatative Kardiomyopathie mit verstärkter Entstehung von Fibrose und einem reduziertem Fractional Shortening. Auf molekularer Ebene wurden hierbei eine erhöhte ANF-Konzentration und Aktivierung der p38- und JNK-Signalwege detektiert (Paoletti et al., 2010).

PKC δ -Knockout-Maus-Modelle zeigten dramatische Veränderungen des Herzstoffwechsels mit geringer Konzentration an glykolytischen Enzymen und einer erhöhten Konzentration an Enzymen, die an beta-Oxidation und am Lipidstoffwechsel beteiligt waren. Der komplette Verlust beider Isoenzyme PKC δ and PKC ϵ führte während der postnatalen Entwicklung zu einer phänotypisch pathologischen kardialen Hypertrophie (Song, Matkovich, Zhang, Hammer, & Dorn, 2015). Während der embryonalen Entwicklung war ein Verlust der Isoenzyme nicht mit dem Leben vereinbar und zeigte eine abnorme Hypertrophie (Churchill & Mochly-Rosen, 2007).

Die Proteinkinasen PKC δ und PKC ϵ spielen ebenso eine wesentliche Rolle während der Entwicklung einer Ischämie bei Myokardinfarkten. Daten zu der PKC δ sind aktuell noch umstritten. Einerseits zeigte sich, dass die PKC δ bei induzierter Gewebeischämie eine Reperfusion fördert (Inagaki et al., 2003). Andererseits zeigten PKC δ -Knockout-Mäuse jedoch eine Verstärkung der Ischämie und mit Verstärkung der Infarktgröße (Mayr et al., 2004). Ein Knockout der PKC ϵ zeigte im Gegenzug jedoch eine protektive kardiale Wirkung (Churchill & Mochly-Rosen, 2007).

Die Rolle der Proteinkinase η ist noch nicht in Gänze erforscht. Jedoch konnte ihre Expression bereits im Herzen detektiert werden (Bacher, Zisman, Berent, & Livneh, 1991).

Atypische PKCs zeigen eine wichtige Rolle bei der embryonalen Herzbildung. Die PKC λ wird als wichtiger Modulator der embryonalen Herzbildung beschrieben. PKC λ -Knockout-Mäuse bilden keine sichtbaren Trabekel aus und zeigen den Anhalt für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms (Farese et al., 2007; Habets et al., 2012; Passer, van de Vrugt, Atmanli, & Domian, 2016). Leitges et al. zeigten in einem Knockout-Mausmodell der PKC ζ , dass sich phänotypisch keine Herzanomalien ausbilden. Sie konnten jedoch auf molekularer Ebene eine Beeinträchtigung der hypertrophen Signalübertragung beobachten (Garcia-Hoz et al., 2012; Leitges et al., 2001). Li et al. zeigten durch eine Aktivierung der PKC ζ in Kardiomyozyten, dass durch die Aktivierung des STAT3-Signalwegs eine kardiale Hypertrophie ausgebildet wird (J. Li et al., 2016).

Die PKN1 und PKN2 zeigen eine erhöhte Konzentration als Kardiomyozyten-Überlebensfaktoren bei menschlichen Herzpathologien (Heinig et al., 2017; P. Zhang et al., 2013; Zohnhofer et al., 2008). Jensen et al. wiesen nach, dass ein Verlust des PKN1-Gens zu

angeborenen Herzanomalien und Herzrhythmusstörungen führten. Zum aktuellen Zeitpunkt sind die genauen molekularen Mechanismen noch nicht geklärt (Archer et al., 2005; Jensen et al., 2009).

1.2.5 Gp130-Rezeptor, Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)

Glykoprotein 130 (Gp130) ist ein Rezeptor, an den Zytokine, wie Interleukin 6/1 (IL-6/1), Leukämiehemmender Faktor (LIF) und Cardiotrophin-1 (CT-1), binden. In vitro konnte CT-1 eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Kardiomyozyten und vorteilhaften Remodellings zeigen (Abdul-Ghani et al., 2017; Pennica et al., 1995).

Die Induktion des prohypertrophischen Peptids Angiotensin führt dabei zu einer erhöhten Konzentration von leukämiehemmendem Faktor (LIF), Cardiotrophin-1 (CT-1) und Interleukin-6 (IL-6) (Sano et al., 2000). Auch eine Hochregulation von IL-6 und IL-6-Rezeptoren in transgenen Mäusen führte zu einer Aktivierung von Gp130. Eine kardiale Hypertrophie konnte durch die Aktivierung von MAPK und Janus Kinase (JAK)-Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)-Signalwege induziert werden (Hirota, Yoshida, Kishimoto, & Taga, 1995; Hoshijima & Chien, 2002). Durch die Aktivierung von Gp130 wird eine Translokation von STAT in den Zellkern ausgelöst. Die Überexpression von STAT induziert kardiale Hypertrophie in vitro und in vivo (Fischer & Hilfiker-Kleiner, 2007; Kunisada et al., 2000; Kunisada et al., 1998; Yamauchi-Takahara & Kishimoto, 2000). Als Inhibitor des JAK-assoziierten Gp130-Signalwegs wirkt der Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS 3). Die durch CT-1-induzierte, Calcineurin/NFAT-abhängige kardiale Hypertrophie kann durch SOCS3 gehemmt werden (Banerjee, Banks, Nawijn, Chen, & Rothman, 2002; Yasukawa et al., 2001).

1.2.6 Calcineurin-NFAT

Eine zentrale Rolle in der kardialen Hypertrophie spielt der Calcineurin-NFAT-Signalweg. Eine Aktivierung erfolgt im erwachsenen Herz vor allem durch einen pathologischen Stimulus, so im Rahmen einer Nachlasterrhöhung, als Folge eines Myokardinfarktes oder bei einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz (Haq et al., 2001; Lim & Molkentin, 1999; Ritter et al., 2002; Wilkins et al., 2004). Calcineurin ist eine Calcium-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase. Sie gehört zur PPP-Familie der Proteinphosphatasen (Barford, Das, & Egloff, 1998) und wird auch als Proteinphosphatase 2B (PP2B) bezeichnet (Rusnak & Mertz, 2000). Calcineurin (Cn) besteht aus der katalytischen Untereinheit A und der kleineren, regulatorischen Untereinheit B. In Säugetieren existieren drei verschiedene Isoformen der Calcineurin A-Untereinheit: CnA α , CnA β und CnA γ . Die Isoformen CnA α und CnA β findet man im Herzen exprimiert (Bueno, Wilkins, et al., 2002; Taigen, De Windt, Lim, & Molkentin, 2000). Die regulatorische Calcineurin-Untereinheit besteht aus den Isoformen CnB1 und CnB2, wobei nur die erste im Herzen exprimiert ist (Ueki, Muramatsu, & Kincaid, 1992). Die N-terminale katalytische Untereinheit von CnA besitzt eine regulatorische Untereinheit bestehend aus einer Calcineurin-B-bindenden Domäne (CnB), einer Calmodulin-bindenden Domäne (CaM) und einer Auto-Inhibitorische Domäne (AI). Die präzise regulierte Calcineurin-Aktivierung durch Calcium ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Calcium in Zytoplasma bindet Calmodulin an der CaM-Domäne des Calcineurins. Eine Aktivierung des Calcineurins erfolgt in Abhängigkeit der Calmodulin-Calcium-Konzentrationsverhältnissen. Bei einer geringen Calmodulin-Konzentration kann auch eine erhöhte Calciumkonzentration zu einer Aktivierung des Calcineurins führen (Dewenter, von der Lieth, Katus, & Backs, 2017; Stemmer & Klee, 1994). Bei der Bindung von Calcium mit Calmodulin an Calcineurin kommt es zu einer Konformationsänderung mit konsekutiver Dephosphorylierung und dadurch zur Aktivierung des Calcineurins (Bueno, van Rooij, Molkentin, Doevendans, & De Windt, 2002; Burkard et al., 2005). Calcineurin bindet an zytoplasmatische NFAT-Transkriptionsfaktoren und transloziert in den Zellkern. Hier bindet es an verschiedene Transkriptionsfaktoren, u.a. GATA4, Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) und Aktivatorprotein-1 (AP-1). Diese bewirken eine gesteigerte Expression des spezifischen Hypertrophie-assoziierten Genprogramms (Dewenter et al., 2017; Hogan, Chen, Nardone, & Rao, 2003; Wilkins & Molkentin, 2004). Hierzu gehören unter anderem das Natriuretische Peptid Typ A (NPPA) und Typ B (NPPB) sowie Calcineurin-abhängiges RCAN1-4 (RCAN1-4) (Crabtree, 1999; Leenders, Pinto, & Creemers, 2011). Calcineurin-Inhibitoren, wie Cyclosporine A (CsA) und Tacrolimus (FK506), hemmen pharmakologisch die Induktion einer kardialen Hypertrophie im Maus- und Rattenmodell in vivo (Leinwand, 2001; Molkentin, 2000) und in vitro (Olson & Williams, 2000).

Endogene Inhibitoren für Calcineurin sind u.a. AKAP79, Cabin/Cain, MCIP und Calsarcin. Die genauen Interaktionsmuster für AKAP79 und Calsarcin werden weiter unten beschrieben. Der nicht-kompetitive Calcineurin-Inhibitor Cabin/Cain konnte in vitro eine Phenylephrin- und Angiotensin II-induzierte Hypertrophie, sowie in vivo eine TAC-Hypertrophie reduzieren (Lai, Burnett, Wolosker, Blackshaw, & Snyder, 1998; L. Sun et al., 1998; Taigen et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit verwenden wir ein etabliertes transgenes Mausmodell der kardialen Hypertrophie. Die konstitutive Überexpression der katalytischen Untereinheit Calcineurin A unter Kardiomyozyten-spezifischer Kontrolle des kardialen α -MHC (Myosin heavy chain)-Promotors bewirkt in neugeborenen und adulten Mäusen eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie mit begleitender schwerer Fibrose und Aktivierung des molekularen hypertrophen Genprogramms. Histologisch zeigen sich Kardiomyozyten desorganisiert und vergrößert mit einer Verdopplung der Querschnittsfläche im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten (Heineke & Molkentin, 2006; Molkentin et al., 1998). In anderen Mausmodellen, nach Beendigung der konstitutiven Überexpression, sind Hypertrophie und kardiale Dysfunktion reversibel (Ueki et al., 1992). Isoform-CnA β -defiziente Mäuse zeigten nur eine reduzierte Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie, auch nach transverser Aortenkonstriktion oder pharmakologischer Stimulation mit Angiotensin II oder Phenylephrin (Bueno, Wilkins, et al., 2002).

1.2.6.1 Die Rolle von Calsarcin, MLP, CIB und Calciumkanälen im Calcineurin/NFAT-Signalweg

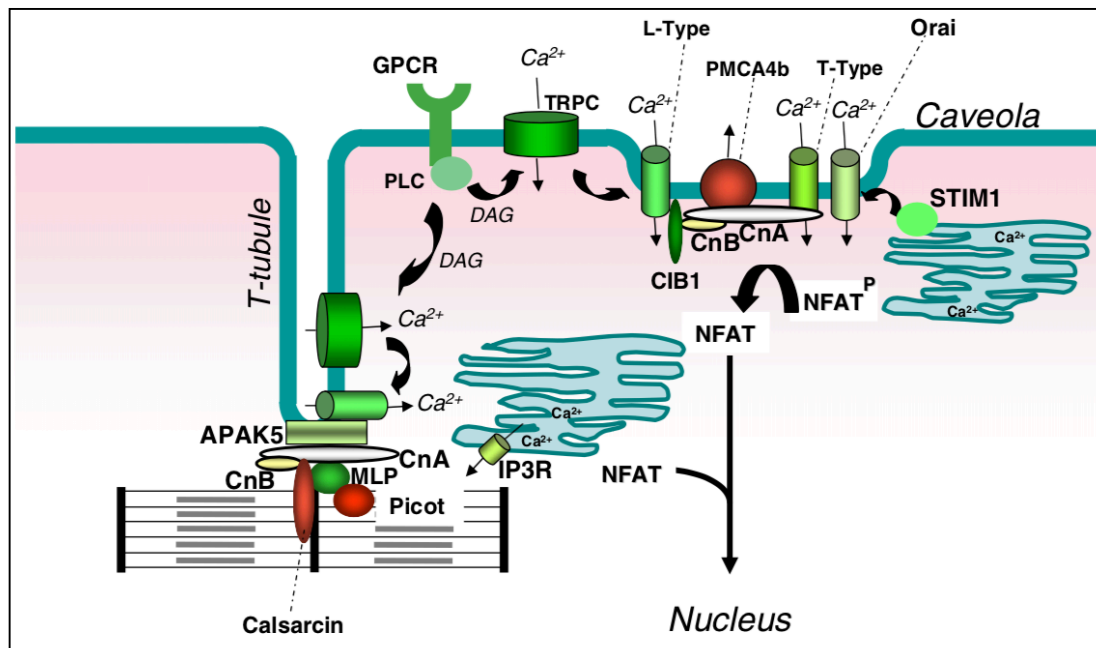


Abbildung 5: Die Calcineurin-Signalkaskade, (Heineke & Ritter, 2012)

Calcineurin ist in den T-Tubuli des Sarkolemms, der Zellmembran der Muskelzelle, lokalisiert (Frey, Katus, Olson, & Hill, 2004; Heineke et al., 2010). Hier liegen sie entweder dem Sarkolemm abgewandt oder den Z-Scheiben der Sarkomere zugewandt. Calcineurin kann so direkt über seine CnB-Untereinheit mit Sarkolemm-assoziierten Proteinen wie CIB1, PMCA4b, MLP, L-Typ und T-Typ Calciumkanälen sowie Z-Scheibenproteinen wie Calsarcin interagieren (Heineke & Ritter, 2012). Calcineurin und NFAT-Transkriptionsfaktoren sind im inaktiven Zustand an der Z-Scheibe lokalisiert (Y. Liu, Cseresnyes, Randall, & Schneider, 2001). Die genaue funktionelle Bedeutung der direkten Calcineurin/L-Typ-Calciumkanal-Aktivierung ist im Zusammenhang mit Calcineurin-abhängigem Kardiomyozytenwachstum noch nicht entschlüsselt. Ein Forward-loop könnte hierbei eine Rolle spielen, indem Calcineurin den L-Typ-Kanal aktiviert und die Calcineurin-Aktivierung verstärkt, um ein Kardiomyozytenwachstum zu initiieren (Heineke & Ritter, 2012).

1.3 Long Noncoding RNAs (lncRNAs)

Die Forschungsgeschichte der nicht kodierenden RNAs beginnt mit der Entdeckung der DNA am Ende des 19. Jahrhunderts. Viele Entdeckungen unterstützten die erstmals 1950 entwickelte Messenger-RNA Hypothese durch die Entdeckung der „House-keeping“-RNAs, wie rRNA und tRNA zur Informationsweitergabe und Katalyse (Jarroux, Morillon, & Pinskaya, 2017; Willingham & Gingeras, 2006). Als die Sequenz des gesamten menschlichen Genoms erstmalig veröffentlicht wurde, zeigten sich überraschenderweise ein Großteil des Genoms, auch ehemals als nicht-proteinkodierend klassifizierte Regionen, transkribiert. Eine große Anzahl dieser neuen Transkripte zeigten hierbei ein sehr geringes Potential Proteine zu kodieren. So existieren etwa 2% Proteinkodierende und über 90% aktiv transkribierte Gene, welche protein-kodierende und nicht-proteinkodierende RNA produzieren (Scheuermann & Boyer, 2013; Wilusz, Sunwoo, & Spector, 2009). Die nicht-Protein-kodierenden RNAs (ncRNA) werden arbiträr in kleine und lange nicht-proteinkodierende Klassen unterteilen. Kleine ncRNAs (sncRNA) entsprechen weniger als 200 Basenpaaren. Sie umfassen Ribosomale RNA (rRNA) zur Bildung von Ribosomen, Transfer RNA (tRNA) zum Transport von Aminosäuren, Messenger RNA (mRNA) für die Translation in Proteine, kleine nukleäre RNA (SnRNA) zum Spleißen der prä-mRNA, Small Nukleolar RNA (snoRNA) für die RNA-Modifikation, Piwi-Interacting RNA(piRNA) zum Binden von PIWI-Proteinen bei der Spermatogenese, MicroRNA (miRNA) zur posttranskriptionalen Genregulation, Circular RNA (circRNA) zur Transkriptregulation mit Regulierung des Spleißens sowie Small Interfering RNAs (siRNA) zum posttranskriptionalen Gen-Silencing (Derrien, Guigo, & Johnson, 2011; Grivna, Beyret, Wang, & Lin, 2006; Neguembor, Jothi, & Gabellini, 2014; Vicens & Westhof, 2014; Wilusz et al., 2009). Lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) umfassen alle nicht-kodierenden Transkripte mit mehr als 200 Basenpaaren als arbiträre Grenze. (Derrien et al., 2012; Mercer, Dinger, & Mattick, 2009).

1.3.1 Charakteristika der Long Noncoding RNAs

Lange nicht-kodierende RNAs werden durch die RNA-Polymerase II (RNAP2) transkribiert und können post-transkriptionell mittels 5'-Cap und 3'-Polyadenylierung modifiziert werden (Wilusz et al., 2009). Sie werden ähnlich wie die protein-kodierenden Gene durch Histon-Modifikationsprofile, Spleißsignale und Exon- bzw. Intron-Längen erzeugt. Etwa 98 % der lncRNAs liegen gespleißt vor und etwa 42% besitzen zwei Exons oder mehr. Exon- und Intron-lncRNA-Transkripte zeigen sich im Vergleich geringfügig länger als protein-kodierende Transkripte. Die Gesamtlänge der Transkripte ist jedoch wesentlich kürzer als die von protein-kodierenden Transkripten (Derrien et al., 2012). Systematische und genomweite Analysen von RNA-

Sequenzierungsdaten haben gezeigt, dass lncRNAs im Gegensatz zu mRNAs ein wesentlich geringeres Expressionslevel, eine geringere Anreicherung durch Exons und eine stärkere Gewebespezifität aufweisen (Cabili et al., 2011; Derrien et al., 2011). Als Grund hierfür werden unter anderem eine weniger effiziente Transkription von lncRNA-Genen oder das Fehlen eines offenen Leserahmens (ORF) im Rahmen der Translation und die dadurch stärkere Anfälligkeit für Zerfallsmechanismen diskutiert (Ulitsky & Bartel, 2013).

1.3.2 Long Noncoding RNA Transkriptklassen

Basierend auf der Lokalisation relativ zu Protein-kodierenden Genen lassen sich lncRNAs in verschiedene Transkriptklassen unterteilen: Sense, Antisense, Bidirectional, Intronic und Intergenic (Abbildung 6):

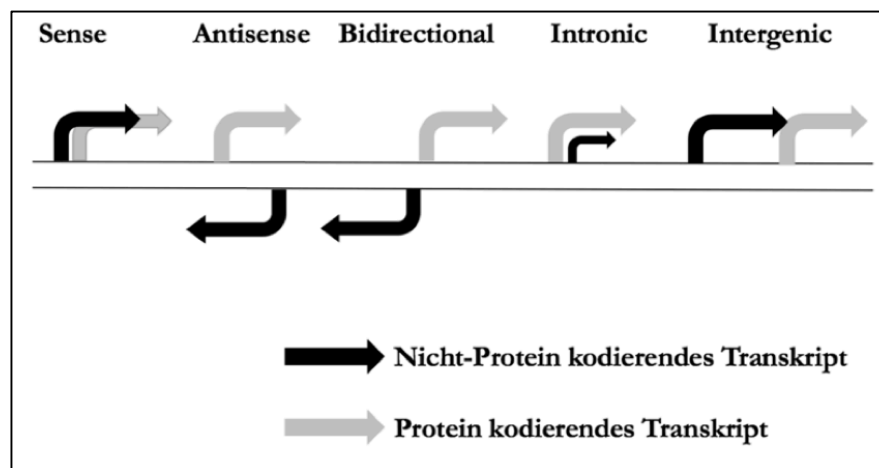


Abbildung 6: Einteilung lncRNA Transkriptklassen in abgewandelter Darstellung, (Ounzain, Micheletti, Arnan, et al., 2015; Scheuermann & Boyer, 2013)

Sense-Transkripte sind nicht-kodierende Gene, die mit protein-kodierenden Genen in gleicher Richtung überlappen. Antisense-Transkripte, auch „Natural Antisense Transcripts“ (NATS) genannt, beschreiben nicht-kodierende Gene auf demselben oder gegenüberliegenden Strang, die mit protein-kodierenden Genen in gegenüberliegender Richtung überlappen und häufig von einem gemeinsamen Promoter ausgehen. Werden nicht-kodierende und benachbarte kodierende Gene auf gegenüberliegenden Strängen jedoch in räumlicher genomischer Nähe zueinander transkribiert, handelt es sich um bidirektionale Transkripte. Erfolgt die Transkription der lncRNA aus intronischen Sequenzen, handelt es sich um Intronic-Transkripte. Long intergenic nicht-kodierende RNAs (lincRNA) liegen zwischen protein-kodierenden und nicht-protein-kodierenden Transkripten und überlappen nicht mit anderen Genen (Derrien et al., 2012; Ponting, Oliver, &

Reik, 2009). Zusätzlich können lncRNAs mit regulatorischen Elementen wie Promotern und Enhancern assoziiert sein (Scheuermann & Boyer, 2013). Diese RNAs besitzen häufig nur ein Exon und werden in geringerem Maße polyadenyliert (S. Frank, Aguirre, Hescheler, & Kurian, 2016).

1.3.3 Mechanismen der Genregulation durch Long Noncoding RNAs

LncRNAs sind in ihrer Funktion eine heterogene Klasse von Molekülen. Sie übernehmen regulatorische Aufgaben durch molekulare Protein-, DNA- und RNA-Interaktionen (Rinn & Chang, 2012). Je nach Aufgabe befinden sich lncRNAs in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten und können eine Kombination aus mehreren Funktionstypen aufweisen (Djebali et al., 2012). Im Folgenden werden die wichtigsten Aufgaben beschrieben. (Abbildung 7).

Die Transkription von lncRNAs ist zellspezifisch im Vergleich zu kodierenden Transkripten. Erste Berichte über die Funktionalität einer nicht kodierenden RNA reichen ins Jahr 1996 zurück und beschreiben die Regulationsmechanismen der ubiquitär exprimierten lncRNA X-Inactive Specific Transcript (XIST) bei der Inaktivierung des X-Chromosom (Penny, Kay, Sheardown, Rastan, & Brockdorff, 1996). Im Rahmen der weiblichen Embryogenese wird die lncRNA XIST aus dem inaktiven X-Chromosom exprimiert, sodass es zu einer chromosomenweiten Unterdrückung kommt. XIST wird dabei von zwei weiteren lncRNAs parallel gesteuert. Die lncRNA Antisense-X-Inactive-Specific Transcript (TSIX) führt zu einer X-Aktivierung, ihre Gegenspielerin XIST-Activator Non-Protein Coding (JPX) initiiert eine X-Inaktivierung (Deuve, Bonnet-Garnier, Beaujean, Avner, & Morey, 2015; Tian, Sun, & Lee, 2010).

LncRNAs die an regulatorische Faktoren wie Transkriptionsfaktoren, Chromatin modifizierende Enzyme und microRNAs binden, um deren Funktion zu modifizieren werden auch „Decoy“-lncRNAs genannt (D. Han et al., 2017). Ein Beispiel für eine solche ist die lncRNA Metastasis-associated Lung-Adenocarcinoma Transcript 1 (MALAT1). In den Interchromatin-Granula des Zellkerns liegend, reguliert und interagiert MALAT1 mit pre-mRNA-Spleißfaktoren (Tripathi et al., 2010). Clemson et al. zeigten, dass MALAT1-depletierte Zellen unveränderte Spleißfaktoren aufweisen. MALAT1 interagiert mit Serin/Arginin-Spleißfaktoren (SF), sodass es zu einer Phosphorylierung von sarkoplasmatischen Retikulum-Proteinen kommt. Ein geringeres Vorkommen von MALAT1 führt zu einem Vermehrten Vorkommen von dephosphorylierten SR-Proteinen. Hierbei kommt es zu einer Fehllokalisation mit Veränderung des alternativen Spleißens von pre-mRNA. Darüber hinaus ist MALAT1 in posttranskriptionellen Genregulationsmechanismen eingebunden, die mit SR-Proteinen verknüpft sind. Dies schließt Aufgaben des RNA-Exportes, des RNA Abbaus im Sinne eines „Nonsense-mediated

Decays“(NMD) und der Translation ein (Clemson et al., 2009; Long & Caceres, 2009; Stamm, 2008).

Das Lenken (engl. „Guide“) von Proteinkomplexen zu bestimmten subzellulären Lokalisationen ist ebenso eine wichtige Funktion von lncRNAs (S. Frank et al., 2016). Eine Komplexbildung in Cis-Stellung adressiert benachbarte Gene der lncRNA, eine in Trans-Stellung hingegen entfernter gelegene Zielgene (Guttman & Rinn, 2012; Scheuermann & Boyer, 2013).

Ein Beispiel für Cis-Regulation ist die lncRNA XIST: (Tsai et al., 2010). Die Interaktion von XIST mit dem Protein Chromatin-interagierenden Scaffold-Attachement-Factor A (SAF-A) führt zu einer Bindung an das X-Chromosom (Fackelmayer, Dahm, Renz, Ramsperger, & Richter, 1994). Hierbei kommt es zu einer Komplexbildung zwischen SMART/HDAC1-associated Repressor Protein (SHARP) und Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor (SMRT). Dies führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung der Histon-Deacetylase 3 (HDAC3), sodass die Histonacetylierung des Chromatins eine Inaktivierung des X-Chromosoms bewirkt. (Kuo & Allis, 1998; Z. Wang et al., 2009). Ein Beispiel für eine Trans-Translokation ist die lncRNA Homeotic Genes Transcript Antisense RNA (HOTAIR). HOTAIR liegt auf dem HOXC-Lokus und unterdrückt die Transkription am HOXD-Lokus (Rinn et al., 2007). HOTAIR rekrutiert den Proteinkomplex Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) und initiiert die Histon3-Lysin37 (H3K27) -Trimethylierung, sodass es zu einer Stummschaltung von Metastasen assoziierten Suppressorgenen kommt. Diese Prozesse spielen unter anderem bei der Tumormetastasierung von Brustkrebs eine zentrale Rolle (Gupta et al., 2010).

Eine weitere Rolle von lncRNA besteht in einer Struktur-bildenden Funktion (engl.: „Scaffold“) für die Verbindung verschiedener Protein-Untereinheiten. (S. Frank et al., 2016). Als solche besitzen diese lncRNAs Bindungs-Domänen für Proteine, RNA oder DNA, auf welche sie unterschiedlich regulatorisch einwirken: Die lncRNA HOTAIR interagiert am 5'-Terminus mit dem PRC2-Komplex, am 3'-Ende bindet HOTAIR mit einem Protein-Komplex aus Lysine-specific Demethylase-1 (LSD1), Corepressor to REST (CoREST) und RE1 Silencing Transcription Factor/Neural Restrictive Silencing Factor (REST). Über diesen Komplex können viele zusätzliche lncRNAs in verschiedenen Zelltypen miteinander interagieren (K. C. Wang & Chang, 2011).

Ein geringer Anteil der lncRNAs wird zu kleineren RNA-Fragmenten wie miRNA, piRNA, siRNA weiterverarbeitet (Wilusz et al., 2009). Die Breite an beteiligten Mechanismen verdeutlicht eine fundamentale Rolle von lncRNAs bei zentralen molekulare Mechanismen, wie der embryonalen Entwicklung, Stammzellendifferenzierung, Zellzyklusregulation, Aufrechterhaltung der zellulären Pluripotenz und des Chromatin-Remodellings. Bereits zum aktuellen Zeitpunkt wurde eine große Anzahl an lncRNAs identifiziert, welche in der Regulation zentraler Aspekte des

Herzkreislaufsystems eine Rolle spielen: bei der Atherosklerose, Myokardinfarkten, chronischer Herzinsuffizienz und diabetischer Kardiomyopathie (Fernandes, Acuna, Aoki, Floeter-Winter, & Muxel, 2019; Geisler & Coller, 2013; Mercer et al., 2009; K. C. Wang & Chang, 2011).

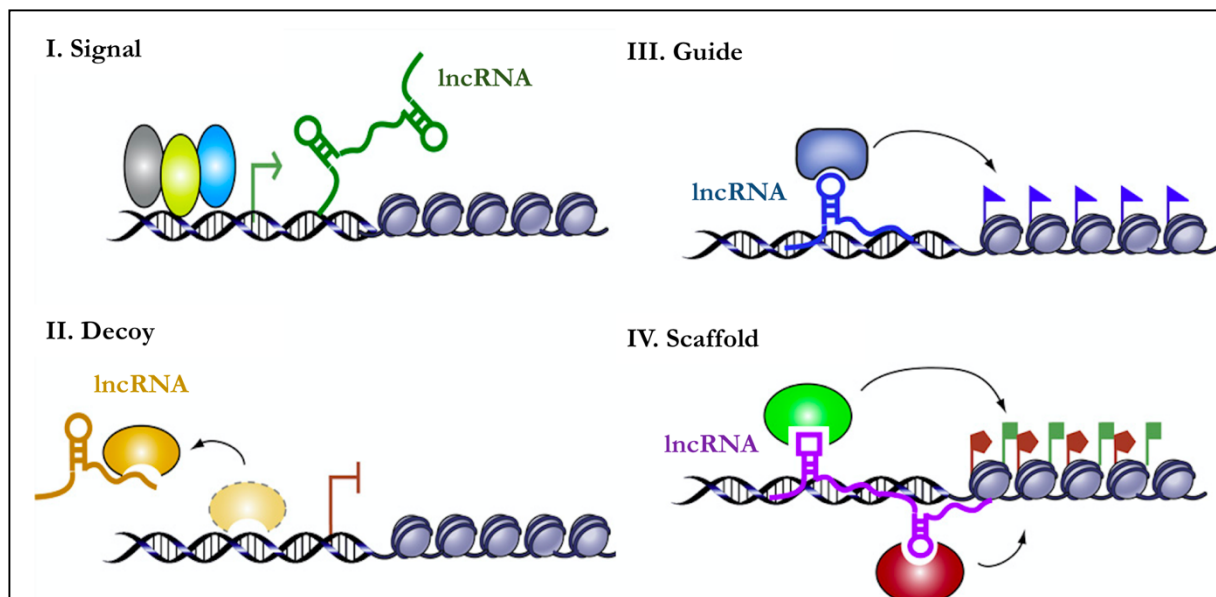


Abbildung 7: Molekulare Mechanismen der lncRNA, (K. C. Wang & Chang, 2011)

1.3.4 Kardiale Long Noncoding RNAs

Die Forschung an Tiermodellen der embryonalen Herzentwicklung, kardialer Hypertrophie, kardialer Ischämie und Untersuchungen humaner Proben belegt eine Rolle von lncRNAs als potente epigenetische Regulatoren der kardialen Genexpression und der Chromatinmodifikation (S. Frank et al., 2016). Dabei konnte gezeigt werden, dass tausende lncRNAs spezifisch nur während der Entwicklung des Herzens und im Rahmen von spezifischen Erkrankungen exprimiert sind (Ounzain, Micheletti, Beckmann, et al., 2015; Ounzain et al., 2014).

1.3.4.1 Long Noncoding RNAs in der Entwicklung des Herzens

Die lncRNA Braveheart (BVHT) ist eine der ersten lncRNAs, für die eine entscheidende Rolle in der kardialen Differenzierung embryonaler Stammzellen beschrieben wurde (Klattenhoff et al., 2013). Bvht ist in der Entwicklung des Mesoderms zu kardialen Myozyten erforderlich und interagiert hierbei direkt mit einem Kernkomponenten des PRC2, dem Polycomb Repressive Complex 2 Subunit (SUZ12). Hierbei kommt es zu einer direkten Chromatininteraktion mit konsekutiver Induktion kardialer Transkriptionsfaktoren, wie des Mesoderm Posterior Transkriptionfaktor 1 (MESP1), GATA Binding Protein 6 (GATA6), Heart And Neural Crest Derivated-Expressed Protein 1 (HAND1), Heart and Neural Crest Derivated-Expressed

Protein 2 (HAND2) und NK2-Homeobox 5 (NKX2-5). Der Knockdown von BVHT in neonatalen Mausmyozyten führt zu einer Störung der myofibrillären Struktur und einer verminderten Expression kardialer Strukturproteinen. Der genomische Locus von BVHT ist spezifisch für die Maus. In Mensch und Ratte konnten bisher keine orthologen Sequenzen identifiziert werden. (S. Frank et al., 2016; Klattenhoff et al., 2013; Scheuermann & Boyer, 2013).

Die lncRNA *Foxf1* adjacent Noncoding developmental regulatory RNA (Fendrr) ist ein weiterer Regulator der Herzentwicklung (Grote et al., 2013): Die Deletion von Fendrr in der murinen Embryonalentwicklung führt zu ventralen Körperwanddefekten mit hypoplastischen kardialen Ventrikeln, einem Phänotyp mit embryonaler Letalität. Der Knockdown von Fendrr führt zu erhöhter Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren NKX2-5 und GATA6, andere zentrale Transkriptionsfaktoren wie GATA Binding Protein 4 (GATA4) und T-Box 5 (TBX5) waren unverändert. Fendrr reguliert in der Entwicklung des Herzens das Gleichgewicht zwischen unterdrückenden und aktivierenden Effekten auf Schlüsselgene der kardialen Differenzierung und Ontogenese. Diese lncRNA ist zwischen Mäusen und Menschen evolutionär konserviert und spielt daher mutmaßlich auch eine Rolle in der Entwicklung des menschlichen Herzens (Grote et al., 2013; Scheuermann & Boyer, 2013).

1.3.4.2 Long Noncoding RNAs in der kardialen Hypertrophie

Long noncoding RNAs haben eine zentrale Rolle in der Modulation der kardialen Hypertrophie und assoziiertem Remodelling: Myosin Heavy Chain associated RNA Transcript (MHRT) ist eine antisense lncRNA des Myosin Heavy Chain 7 (MYH7) -Lokus und nimmt eine wichtige Rolle in der Modulation der kardialen Hypertrophie ein. (P. Han et al., 2014). Die Hemmung von MHRT hemmt die Entwicklung von Hypertrophie durch die Aktivierung des Brahma-Related Gene 1 (BRG1) -HDAC-PARP-Chromatin Repressor Complex. Die kardiale Überexpression von MHRT moduliert die kardiale Hypertrophie in vivo nach Transverser Aortenkonstriktion. MHRT bindet an Brahma-Related Gene 1 (BRG1) und blockiert eine DNA-Bindungsstelle und bewirkt so eine Änderung der Chromatin-Struktur. Auch bei Patienten mit Kardiomyopathien konnte so eine reduzierte MHRT-Expression nachgewiesen werden (S. Frank et al., 2016; P. Han et al., 2014; Shen et al., 2017).

Weitere Schlüsselfunktionen in der kardialen Hypertrophie nehmen die beiden lncRNAs Cardiac Hypertrophy-associated Epigenetic Regulator (CHAER) und Cardiac Hypertrophy-associated Transcript (CHAST) ein. Auch die lncRNA CHAER interagiert direkt mit der katalytischen Untereinheit des Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2) und hemmt hierdurch die Methylierung Hypertrophie-assoziiierter Gene am Histon 3-Lysin 27 (H3K27), sodass es zu einer epigenetischen

Neuprogrammierung und der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie kommt (Z. Wang et al., 2016).

Viereck et al. konnten die lncRNA CHAST als weitere prohypertrophe lncRNA identifizieren. In vitro- und in vivo konnte dargestellt werden, dass durch eine Aktivierung des prohypertrophen Transkriptionsfaktors NFAT eine CHAST-Überexpression induziert werden konnte. Durch eine Cis-regulatorische Wirkung von CHAST konnte das Gen Peckstrin Homology Domain Containing Family M (PELKHM) auf dem gegenüberliegenden genomischen Strang inhibiert werden (McEwan et al., 2015), sodass durch diesen Mechanismus die Autophagie von Kardiomyozyten gehemmt und eine Hypertrophie induziert wurde. Der Knockdown von CHAST bewirkt nach transverser Aortenkonstriktion die Hemmung pathologischen kardialen Remodelling. Ebenso hat CHAST eine starke Wirkung auf die Herzmuskelmorphogenese und Entwicklung von Kardiomyopathien (Viereck et al., 2016).

Die lncRNA Cardiac Hypertrophy-Related Factor (CHRF) ist sowohl in hypertrophierten Mausherzen, als auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz hochreguliert. CHRF bewirkt einer Hemmung der miRNA miR-589 in vitro und induziert Hypertrophie über ihr Zielgen Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) (K. Wang, Liu, et al., 2014).

Die lncRNA Regulator of Reprogramming (ROR) ist auch bei der Entstehung der Hypertrophie beteiligt, sie bindet die miRNA miR-133. ROR und miR-133 bilden zusammen einen transkriptionellen Regelkreis, dieser hemmt in Kardiomyozyten die Entwicklung einer Hypertrophie (Jiang, Zhou, & Huang, 2016).

Kardiale Fibrose ist ein zentraler Bestandteil des pathologischen Remodelling im Rahmen fortgeschrittener kardialer Hypertrophie. In der Entwicklung einer Fibrose zeigt sich eine Induktion der lncRNA H19. Dabei wirkt die lncRNA H19 protektiv im Rahmen kardialer Umbauprozesse (L. Liu et al., 2016).

Durch den relativen Sauerstoffmangel des Herzens bei kardialer Hypertrophie werden reaktive Sauerstoffradikale freigesetzt, dies führt zu Entzündungsprozessen mit einer konsekutiven Störung des Energiestoffwechsels und Autophagie, Apoptose und Nekrose von Kardiomyozyten (Shen et al., 2017). Die lncRNA Necrosis-related factor (Nrf) bewirkt eine Verstärkung des Effektes eines relativen Sauerstoffmangels bei Mäusen nach Induktion eines Myokardinfarktes (LAD-Ligation) und führt zu einer gesteigerten Nekrose von Kardiomyozyten (K. Wang et al., 2016). Die lncRNA Autophagy Promoting Factor (APF) wirkt als ein Enhancer des miR-1883p/ATG7-Komplexes in vitro und in vivo. Der Knockdown führt zur Entwicklung vergrößerter Myokardinfarkte im Mausmodell (K. Wang et al., 2015). Wang et al. konnten zeigen, dass die lncRNA Cardiac

Apoptosis-Related lncRNA (CARL) die mitochondriale Spaltung und Apoptose in Kardiomyozyten hemmt, über eine Herunterregulation der miR-539 (K. Wang, Long, et al., 2014). Die lncRNA Noncoding Repressor of NFAT (NRON) ist ein zentraler Regulator der NFAT-Dephosphorylierung. Die Überexpression hemmt die Proliferation von Endothelzellen durch eine NFAT-Expression, dies führt zu einer verminderten Migration und Angiogenese (Kumar & Goyal, 2017). Die Expression-Level der lncRNAs MHRT und NRON konnten bei Patienten als unabhängige Prädiktoren einer Herzinsuffizienz identifiziert werden (Xuan et al., 2017).

1.3.5 Long Noncoding RNA als diagnostisches und therapeutisches Ziel

Herzinsuffizienz ist weiterhin eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität weltweit. Das Überleben von Patienten mit Herzinsuffizienz kann mittels Medikamenten, wie Renin-Angiotensin-/Aldosteron-Antagonisten und β -Blockern verbessert werden. Neue pharmakologische Therapiekonzepte basieren beispielsweise auf der Hemmung des Abbaus des vasoaktiven natriuretischen Peptids (BNP) durch Sacubitril/Valsartan in der PARADIGM-HF-Studie oder Hemmung des natriumabhängigen Glukosetransporters Sodium Dependent Glucose Cotransporter 2 (SGLT-2) durch Gliflozine (McMurray, Packer, Desai, Gong, Lefkowitz, Rizkala, Rouleau, Shi, Solomon, Swedberg, Zile, & Investigators, 2014; Verma & McMurray, 2018). Weitere Optionen bestehen in der Therapie mittels Ivabradin zur Senkung der Herzfrequenz im Sinusrhythmus. Bei darüber hinaus fortgeschrittener Herzinsuffizienz verbleibt als aktuelle Therapieoption die Implantation eines linksventrikulären Unterstützungssystems (LVAD) oder die Herztransplantation (Metra & Teerlink, 2017; Ponikowski et al., 2016). Aufgrund hoher Komplikationen, häufigen Hospitalisierungen und Mangel an Spenderorganen werden alternative Therapieansätze gesucht (Pocock et al., 2013).

In den letzten Jahren konnten durch die Entwicklung von RNA-Sequenzierungsmethoden große Fortschritte bei der Erforschung der Beteiligung von lncRNAs in der kardiovaskulären (Patho-) Physiologie gemacht werden. Auf Grund der im Vergleich zu Protein-kodierenden genomischen Regionen geringeren evolutionären Sequenzkonservierung von long noncoding RNAs der unterschiedlichen Spezies, ist es schwierig von präklinischen Tiermodellen auf die Rolle in der humanen Biologie zu schließen (Johnsson, Lipovich, Grander, & Morris, 2014). Zur Hemmung der Expression von lncRNAs lassen sich unter anderem Antisense-Oligonukleotide (ASOs) und kleine interferierende RNAs (siRNAs) verwenden, sowohl in vitro als auch in vivo. Vor einem eventuellen Einsatz beim Menschen müssen jedoch umfangreiche weitere Untersuchungen in Hinblick auf Toxizität und Wirkdauer erfolgen (Hermans-Beijnsberger, van Bilsen, & Schroen, 2018).

Die biologische Relevanz von lncRNAs in kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz hat ein enormes Forschungs-Interesse in Hinblick auf eine Anwendung als diagnostische Biomarker, therapeutische Zielstrukturen und Forschung in der Differenzierung und Programmierung von Stammzellen generiert. (D. Han et al., 2017; Hou et al., 2016).

Li et al. analysierten mittels Microarray in einem Mausmodell der akuten Herzinsuffizienz die Expression von lncRNAs in Vollblut, Gewebe und Plasma. Hierbei fanden sich 518 hoch- und 908 herunterregulierte lncRNAs mit großen Expressionsunterschieden zwischen Herzgewebe, Vollblut und Plasma. Aufgrund dieser ausgeprägten Gewebespezifität wird lncRNAs eine große potentielle Relevanz in der Verwendung als diagnostischer Biomarker zugesprochen (D. Li et al., 2013). Die mitochondriale lncRNA Long Intergenic Noncoding RNA Predicting Cardiac Remodelling (LIPCAR) korreliert im akuten Myokardinfarkt mit dem Überleben der Patienten und linksventrikulären Umbauprozessen (Kumarswamy et al., 2014).

lncRNAs stellen interessante therapeutische Ziele in der Herzinsuffizienz dar. Hierbei zeigten sich die lncRNAs CARL, APF und NRF als therapeutische Ziele bei ischämischen Herzkrankheiten. Während des Fortschreitens einer Hypertrophie und Herzinsuffizienz konnten die lncRNAs MHRT, H19, CHRF, CHAST und ROR als therapeutische Ziele identifiziert werden und durch eine Herunterregulation eine Herzinsuffizienz im Mausmodell verzögert werden. Auch Angiogenese-assoziierte lncRNAs bieten eine Vielzahl von Angriffspunkten, um bei einer Herzinsuffizienz zu einer Verbesserung des Sauerstoffbedarfs durch Neovaskularisation beizutragen (Fiedler et al., 2015; D. Han et al., 2017; Hou et al., 2016).

Die Regeneration des Herzmuskels durch Differenzierung kardialer Vorläuferzellen oder Stammzellen unter Verwendung von lncRNA stellt einen weiteren interessanten wissenschaftlichen Ansatzpunkt dar, da lncRNAs eine zentrale Rolle in der Regulation von Transkription und Differenzierung von Stammzellen einnehmen. Mittels Hochdurchsatz-Screening in embryonalen Stammzellen und einem shRNA-vermittelten lncRNA-Knockdown, konnten 26 lncRNAs identifiziert werden, die für die Erhaltung der Pluripotenz essentiell sind. Der Knockdown der lncRNA H19 fördert die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu funktionellen Kardiomyozyten (K. C. Wang & Chang, 2011). Die lncRNA Bvhr ist ein wichtiger Modulator in der Spezifikation der kardialen Linie in Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten (Klattenhoff et al., 2013). Die lncRNA Cardiac Mesoderm Enhancer-associated Noncoding RNA (CARMEN) gehört zu den am stärksten exprimierten lncRNA in kardialen Progenitorzellen. (Ounzain, Micheletti, Arnan, et al., 2015). Vor einer eventuellen klinischen Nutzung einer kardialen Stammzelltherapie sind jedoch noch viele zentrale Hindernisse zu beseitigen. (Z. Zhang et al., 2013; Z. Zhang et al., 2014).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die kardiale Hypertrophie ist ein zentraler Anpassungsmechanismus des Herzens auf hämodynamische Belastung. LncRNAs sind eine neue Klasse regulativer RNA-Moleküle, deren Bedeutung bisher insbesondere in der Embryogenese des Herzens und bei epigenetischen Prozessen beschrieben ist. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren weitere, zentrale Mechanismen in der Regulation der kardialen Hypertrophie durch LncRNAs aufgedeckt (D. Han et al., 2017).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die systematische Identifikation von Long Noncoding RNAs in Calcineurin-transgenen Mäusen als klassischem Modell der kardialen Hypertrophie. Durch RNA-Sequenzierung erfolgt die Charakterisierung des murinen Transkriptoms im Vergleich zwischen Herzen aus Calcineurin-transgenen Mäusen und Wildtypen. Die aussichtsreichsten LncRNAs aus diesem Experiment sollen unter Verwendung komplementärer molekularbiologischer Methoden in isolierten Kardiomyozyten (neonatale und adulte Maus), sowie Myoblasten (C2C12-Zelllinie) charakterisiert werden, um Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten. Die Bestätigung der Expression von LncRNAs soll mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgen. Durch Amplifikation können die Primärstruktur, die Transkriptvarianten und das Polyadenylierungsmuster identifiziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Adhesive clear qPCR seals	Biozym Scientific GmbH
Becherglas	DURAN ChemoLine
Branson 2200 Ultrasonic Cleaner	Polzin Laborbedarf
Chirurgisches Besteck	KLS Martin
Deckgläser 18 mm Durchmesser	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Erlenmeyerkolben 20 ml	Schott Duran
Fireboy	IBS Integra Biosciences
Galaxy Mini Star Centrifuge	VWR
Gefrierschrank -80 °C Revco Ultima Plus	Thermo Scientific
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr Comfort
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Horizon 11-14 Gelelektrophorese	Life Technologies
High Performance UV-Transilluminator	UVP
Inkubator 37 °C	Heraeus Instruments
Inkubator steri cult 200	Labotect
Keramik Perlen 1,4 mm, 2,8 mm	Peqlab - Bertin Tech
Mikroskop Axiovert 40C Mikroskop	Carl Zeiss
Mikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss
Mikrowelle Sharp R 204	Sharp
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth
Objektträger 76x26x1 mm	Superior Marienfeld
Paramix Vortexer	InLabo
qRT-PCR Platte, 96-Well, farblos	Bio-Rad
Personal cyclor	Biometra
Pipette Eppendorf-Reference	Eppendorf
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	Sarstedt

Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Präzisionsschiebelehre	WIHA
Precellys 24 Homogenizer	Peqlab –Bertin Tech
Precellys-Regiergefäße	Peqlab –Bertin Tech
Real Time-PCR Detection Sys CFX96	Bio-Rad Laboratories
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Röhrchen 15 ml, 50 ml	BD Falcon
Spectrophotometer Nanodrop 2000	Thermo Scientific
SterilGard Hood	The Baker Company
Steril-Cult 200 Inkubator	Labotect
Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Sub-Cell GT Wide Mini	Bio-Rad Laboratories
Systec VX-65 (Autoklav)	Systec
Systec DB-23 (Autoklav)	Systec
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Vacusaft Absaugsystem	Integra Bioscience
Vivid 7 Pro Ultraschallgerät	Dräger
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad GFL	Polizin Laborbedarf
Zellkulturflasche 175 cm ²	Sarstedt
Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-Well	Greiner Bio one
Zellschaber 16 cm 2-position blade	Sarstedt
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Zentrifuge Fresco 21	Thermo Scientific
Zentrifuge Pico 21	Thermo Scientific
Zentrifuge Galaxy Mini star	VWR
Zentrifuge Multifuge X3R	Thermo Scientific

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH
ddH ₂ O	Gibco Life Technologies
DMEM	Gibco Life Technologies
DEPC	Carl Roth
DNA Loading Dye 6x	Fermentas

DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Scientific
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
Fetal Calf Serum	PAA-Laboratories
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Fermentas
Isopropanol	Carl Roth
Isofluran	Forene–Abbott
IQ™ PowerMix Reagent, Multiplex	Bio-Rad Laboratories
Kollagen I Lösung	BD Biosciences
L-Glutamin	Invitrogen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Methanol	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
QIAzol®Lysis Reagent	Qiagen
Roti®Phenol/Choloform/Isoamylalcohol	Carl Roth
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Trypanblau-Färbung	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.3 Enzyme

Desoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma-Aldrich
Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen

2.1.4 Kits

IQ™ Multiplex Powermix	Bio Rad
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Neonatal Heart Dissociation Kit mouse/ rat	Miltenyi Biotec
Express SYBR GreenEr qPCR Supermix Master Mix	Invitrogen
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen
Tissue Dissociation Kit	MACS Miltenyi Biotec

2.1.5 Oligonukleotide

2.1.5.1 RT-PCR Primer-Sequenzen der Hypertrophie-assoziierten Gene und endogene Kontrolle

Primer	Sequenz
mRpl32_F	5'-CTG-CTG-ATG-TGC-AAC-AAA-TCT-3'
mRpl32_R	5'-GCT-GTG-CTG-CTC-TTT-CTA-CAA-T-3'
mRpl32_Probe	Texas Red-ACT-GTG-CTG-AGA-TTG-CTC-ACA-ATG-TGT-BHQ2
mNPPA_F	5'-GGA-GCA-AAT-CCT-GTG-TAC-AGT-G-3'
mNPPA_R	5'-ACC-TCA-TCT-TCT-ACC-GGC-AT-3'
mNPPA_Probe	FAM-TGA-TGG-ATT-TCA-AGA-ACC-TGC-TAG-ACC-A-BHQ
mNPPB_F	5'-ACA-AGA-TAG-ACC-GGA-TCG-GA-3'
mNPPB_R	5'-AGC-CAG-GAG-GTC-TTC-CTA-CA-3'
mNPPB_Probe	HEX-TCA-GTG-CGT-TAC-AGC-CCA-AAC-GA-BHQ1
mRCAN1_F	5'-TAG-CTC-CCT-GAT-TGC-TTG-TG-3'
mRCAN1_R	5'-GGA-TTC-AAA-TTT-GGC-CCT-GG-3'
mRCAN1_Probe	Cy5.5-ACG-ATG-ATG-TCT-TCA-GCG-AAA-GTG-AGA-C-Eclipse

2.1.5.2 qRT-PCR Primer-Sequenzen

Primer	Sequenz
Rn18s_F	5'-GCA CGG CCG GTA CAG TGA AA -3'
Rn18s_R	5'-GCG CCC GTC GGC ATG TAT TA -3'
Rpl32_F	5'-CTG-CTG-ATG-TGC-AAC-AAA-TCT-3'
Rpl32_R	5'-GCT-GTG-CTG-CTC-TTT-CTA-CAA-T-3'
mNRON_F	5'-CTA-CAA-GCT-GGT-CAC-GGT-GT-3'
mNRON_R	5'-TGG-AAG-CAG-GAG-CCA-TTC-TG-3'
mBVHT_F	5'-CTG-TAA-GCC-GGG-AAG_CAT-CT-3'
mBVHT_R	5'-AGC-CAT-TCA-TCT-CCG-TTG-GA-3'
mMALAT1_F	5'-TGC-AGT-GTG-CCA-ATG-TTT-CG-3'
mMALAT1_R	5'-GGC-CAG-CTG-CAA-ACA-TTC-AA-3'
mSNRP70_F	5'-CGC-GAT-TTG-GCA-AGA-TGA-CA-3'

mGAPDH_F	5'-AGG-TCG-GTG-TGA-ACG-GAT-TTG-3'
mGAPDH_R	5'-TGT-AGA-CCA-TGT-AGT-TGA-GGT-CA-3'
mGm12295-001_F	5'-TGC-AGA-TGG-CAC-CAG-TCA-AA-3'
mGm12295-001_R	5'-GAC-CCT-CAG-GAA-GGG-TGG-TG-3'
mGm12295-002_F	5'-TCA-CAA-CCA-CCT-GAC-ACT-CC-3'
mGm12295-002_R	5'-GGG-AAG-GGA-ATA-GAA-CGC-GA-3'
mGm15328_F	5'-CAC-CCG-ATG-GCT-TCA-GTA-GG-3'
mGm15328_R	5'-TTA-GCC-GGA-GCT-TTA-GGC-TG-3'
mGm20619_F	5'-GAG-GGC-CTT-CAC-TTT-CCA-CT-3'
mGm20619_R	5'-TGT-GCT-GCT-CTA-CGG-TTC-AC-3'
mGm26722_F	5'-ACA-GTA-ACT-TTG-CTA-AGC-TGG-GT-3'
mGm26722_R	5'-GTT-ATT-TGG-GTC-GGG-GGT-GT-5'
mGm5532-001_F	5'-TCA-CGG-ACA-CTT-TCC-CAT-CA-3'
mGm5532-001_R	5'-CCC-TCT-GAG-AAG-CCA-CAC-ATT-3'
mGm9917-004_F	5'-ATC-CCA-CTG-GAA-AGG-GCA-GA-3'
mGm9917-004_R	5'-AAT-GTC-AGG-AGC-GCA-GAC-CT-3'
mGm9917-004_F	5'-GGC-TGG-ATT-GGA-GCC-TCA-TC-3'
mGm9917-004_R	5'-TTC-TTC-CAC_GGA-GAA-CGC-AC-3'
mGm9917-003_F	5'-AGT-TGG-TCT-ACA-GAA-CCG-CA-3'
mGm9917-003_R	5'-ACG-TTT-CTC-TCA-AGG-GTC-GCC-TA-3'
mGm9917-002_F	5'-CGG-AAA-CCT-CAC-TTC-CGC-TT-3'
mGm9917-002_R	5'-ACC-ACA-GAC-TGA-CGA-GAC-CT-3'
mGm9917-001_F	5'-GAC-CCT-CCT-CCA-AGA-CT-GGT-3'
mGm9917-001_R	5'-AAG-GAG-GTA-ATG-TCA-GGA-GCG
mTusc2_F	5'-GCA-GTG-CCT-CCC-TTC-GTA-TT-3'
mTusc2_R	5'-CAC-GAT-GCC-CCT-GAG-GAA-TCA-3'
mRassf_Tv1_F	5'-AAC-TAC-CG-AGC-TGG-ACA-C-3'
mRassf_Tv1_R	5'-GTA-ATG-GCA-GGT-GAA-CTT-GCA-G-3'
mRassf_Tv2_F	5'-GTC-GGG-CTG-TCT-ACG-TTT-CA-3'
mRassf_Tv2_R	5'-CGA-AGG-AAG-GTG-TTT-GAG-CC-3'
mRassf_Tv2_F	5'-GGC-TGT-CTA-CGT-TTC-AGT-CCT-3'
mRassf_Tv2_R	5'-TGC-TGC-TCC-AGG-TCA-TTT-CG-3'
m1110019D14Rik_F	5'-AAT-GTA-TCA-AAT-CCA-TTT-TGT-AAG-G-3'

m1110019D14Rik_R	5'-ACA-AAT-CAC-ACA-ACC-AGA-TA-3'
m6430562O15Rik_F	5'-TGA-CTC-AGC-GGT-GAC-TTT-CC-3'
m6430562O15Rik_R	5'-CCG-GGA-CGC-TGA-TGT-AAG-AA-3'
m4921504A21Rik_F	5'-ACG-ACA-AGA-CAG-CTA-CAA-GGA-3'
m4921504A21Rik_R	5'-GGT-CGG-TTT-GCC-CAG-ATC-AT-3'
mRmst001_F	5'-GGT-TGA-TGG-AGT-CAG-GGA-CG-3'
mRmst001_R	5'-GGC-ACC-TGT-AGA-AAC-AGC-CT-3'

2.1.5.4 LNA GapmeR-Sequenzen

Bezeichnung	Hersteller
LNA longRNA GapmeR negative control A	Exiqon
LNA longRNA GapmeR negative control B	Exiqon
LNA longRNA GapmeR MALAT1-as1	Exiqon
LNA longRNA GapmeR MALAT1-as2	Exiqon
LNA longRNA GapmeR Gm9917	Exiqon

2.1.6 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer

2 M Tris Base 242 g

Eisessig 57,1 ml

0,5 M EDTA 100 ml

pH 8,0 ad 1 l

PBS (Dublecoo's PBS von PAA)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na₂HPO₄

1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4, autoklaviert

Trypsin-EDTA- Lösung

0,25 % Trypsin

0,53 mM EDTA

in PBS

2.1.7 Medien

Die Lagerung der Zellkulturmedien geschah bei 4°C. Vor Gebrauch werden alle Medien im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.1.7.1 Medium zur Kultur von Kardiomyozyten aus neugeborenen Mäusen (NMVCM)

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

10 % FCS Gold

100 U/I Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

2.1.7.2 Medium zur Kultivierung von murinen Myoblasten (C2C12-Zellen)

DMEM High Glucose (4,5 g/l)

10 % FCS Gold

100 U/I Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

2.1.8.1 C2C12-Zelllinie

C2C12 ist eine murine Skelettmuskelvorläuferzelllinie, die ein etabliertes Zellmodellsystem zur Untersuchung der Myogenese darstellt.

2.1.8 Versuchstiere

2.1.9.1 Mäuse (*Mus musculus*)

Die in den Versuchen beschriebenen Wildtypmäuse der C57Bl/6-Mauslinie stammen aus den Charles River Laboratories und wurden vor Ort verpaart. Die transgene Mauslinie zeigt eine dauerhaft aktive Form von Calcineurin, sodass hier eine Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz entsteht (Molkentin et al., 1998).

2.1.9.2 NMVCM (Neonatale Maus-Kardiomyozyten aus dem linken Ventrikel)

Die C57Bl/6-Mauslinie wurde in der Tierversuchseinrichtung der Universitätsklinik Kiel verpaart. Im Durchschnitt entstanden aus 3-4 Muttertieren etwa 15-35 Mäuse, die in einem Alter von 24 Stunden zur Isolation von primären Kardiomyozyten verwendet werden konnten.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur von Säugetierzellen

Jede Zellkulturarbeit fand unter einer sterilen Werkbank statt. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurde jede Zelllinie einzeln behandelt. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C mit 5 % CO₂.

2.2.2 Beschichtung von Kulturgefäßen mit Kollagen

Um später eine gute Anheftung der Zellen zu gewährleisten, wurden Kulturplatten in 6 bzw. 12 Well-Größen 24 Stunden vor Gebrauch kollagenisiert. Dabei verwendete man Kollagen-Typ 1 als Stammlösung (3,1 mg/ml) mit 0,01M Salzsäure in einem Verhältnis von 60:1. Nach 24 Stunden wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, um die Kulturgefäße anschließend, nach zweimaliger Spülung mit PBS-Puffer, für eine weitere Stunde bei 37 °C zu trocknen. Die kollagenisierten Platten wurden maximal eine Woche bei 2-8 °C gelagert.

2.2.3 Primärkultur von neonatalen Mauscardiomyozyten

Nach der Vorbereitung des Arbeitsplatzes erfolgte die Präparation der neonatalen Mäuse. Nach rascher Dekapitation konnte der Brustkorb entlang des Sternums mit Hilfe von chirurgischem Besteck geöffnet werden. Mit leichtem Druck auf den Thorax wurde das Herz zwischen Lunge und Thymus sichtbar. Nach vorsichtiger Entfernung konnte dieses, in 5-7 ml HBSS-Puffer (4 °C) in 10 cm Schalen gefüllt, auf Eis gelegt werden.

Unter einer sterilen Werkbank wurde das überschüssige nicht-kardiale Gewebe entfernt und die Herzen in jeweils 2-4 Stücke zerkleinert.

In 10 ml frischem 4 °C-HBSS-Puffer wurde die Zellsubstanz gesammelt und sanft gewaschen. Für den Gewebeverdau mussten zu der Zellsuspension 10 ml Enzymmix (Mix 1+2 vermischt, Tabelle 1) aus dem „Tissue Dissociation Kit“ hinzugefügt werden. Dazu wurde ein steriler 20 ml-Erlenmeyerkolben verwendet.

Tabelle 1: Reagenzien für den Enzymmix

		10 ml für 16-40 Herzen
Enzym Mix 1:	Enzym P	250 µl
	Puffer X	9200 µl
Enzym Mix 2:	Enzym A	50 µl
	Enzym D	400 µl
	Puffer Y	100 µl

Der Erlenmeyerkolben mit Zellsuspension wurde im Wasserbad bei 37 °C und 160 rpm für 45 Minuten inkubiert. Das restliche unverdaute Gewebe pipettierte man mit einer 10 ml-Pipette mehrfach auf und ab. Durch einen 70 µl-Cellstainer filtrierte man dieses in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß und stoppte den Verdau durch zweimalige Zugabe von 10 ml DMEM-Wachstumsmedium mit 10-prozentigem FCS ab.

Danach musste die Zellsuspension für 5 Minuten bei 600 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert werden. Der Überstand konnte in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt werden und wurde nochmals 5 Minuten bei 600 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Das erste und zweite entstandene Pellet resuspendierte man vorsichtig in 12 ml DMEM-Wachstumsmedium. Beide vereint konnten auf ein Volumen von 24 ml aufgefüllt werden und in eine Zellkulturflasche mit dem Volumen von 175 cm² überführt werden.

Um die Kardiomyozyten von den Fibroblasten zu trennen, inkubierte man die Zellkulturflasche 75 Minuten bei 37 °C mit 5-prozentigem CO₂. Die Fibroblasten hafteten am Boden der Flasche an und die NMVCMs konnten als Überstand vorsichtig in eine neue Flasche überführt werden. Diese inkubierte man weitere 75 Minuten bei 37 °C mit 5-prozentigem CO₂.

Die nun als Zellsuspension befindlichen Kardiomyozyten überführte man in ein 50 ml-Reaktionsgefäß. Um das Endergebnis zu verbessern, wurden die beiden Zellkulturflaschen noch einmal vorsichtig mit 10 ml 37 °C-warmen Vollmedium ausgespült und zur Suspension gegeben.

Man zentrifugierte nun die etwa 45 ml ausmachende Zellsuspension für 5 Minuten bei 600 rpm und Raumtemperatur, um das erste Zellpellet entstehen zu lassen. Der Überstand konnte in ein neues 50 ml-Regiergefäß überführt werden und wurde erneut bei gleichen Konditionen zentrifugiert. So entstand das zweite Zellpellet. Beide wurden in 4-10 ml 37 °C-warmen Vollmedium resuspendiert. Um das Fibroblastenwachstum zu hemmen, wurde zusätzlich Cytosine-β-D-Arabinofuranosid (1:1000 verdünnt) mit in das Vollmedium gegeben. Anschließend erfolgte die Zellzählung in einer Neubauerkammer mit Trypanblaufärbung: Die Zellsuspension wurde mit

0,4-prozentiger Trypanblaulösung versetzt, in die Zählkammer eingebracht und unter dem Lichtmikroskop untersucht. Vier Großquadrate mit jeweils 16 Einzelquadraten wurden ausgezählt und mit der unten aufgeführten Formel konnte die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen} \times 10^4}{\text{Anzahl gezählter Quadrate [4]}}$$

Die Aussaat der Zellen erfolgte mit unterschiedlicher Zelldichte für die jeweilige Platte.

Tabelle 2: Aufteilung von NMVCM-Zellen und Medium bei 6-/12-Well Platte

Platte	Experiment	Zellen/Well	ml Medium/Well
6-Well Platte	RNA Isolation	1x10 ⁶	2
12-Well Platte	RNA Isolation	1,8 x 10 ⁵	1

Das Medium blieb beim bereits verwendeten DMEM-Wachstumsmedium mit 10-prozentigem FCS, L-Glutamin und mit Cytosin-β-D-Arabinofuranosid.

Nach 24 Stunden wurden die Platten einmalig mit PBS-Puffer gewaschen und abgestorbene Zellen dadurch entfernt. Bei einer angestrebten Konfluenz von 70-80 % änderte man das Wachstumsmedium je nach geplantem Experiment.

2.2.4 Kultur von Säugetierzelllinien

2.2.4.1 Kultur von C2C12-Skelettmuskelvorläuferzellen

Bei C2C12-Zellen handelt es sich um Myoblasten der Maus. Das serumhaltige Kulturmedium DMEM lässt die Zellen unter Zusatz von 10-prozentigem FCS proliferieren. Wenn der Serumanteil begrenzt wird, beginnen die C2C12-Zellen sich zu Myotuben zu differenzieren und verschmelzen zu funktionellen Muskelfasern.

Alle 3-4 Tage wurde die Zelllinie bei einer Konfluenz von 70-90 % passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit 37 °C-warmem PBS-Puffer gewaschen. Dann folgte eine Beschichtung mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei 37 °C konnte man einzelne Skelettmuskelzellen unter dem Mikroskop erkennen. Um die Trypsinaktivität zu stoppen, wurde 10 ml des FCS-haltigen Mediums hinzugefügt. Die Zellsuspension konnte in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt werden. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen konnten in warmem Nährmedium resuspendiert werden.

Die Zellzählung wurde in einer Neubauerkammer, wie oben schon für NMVCM, mit Trypanblaufärbung durchgeführt. Die Aussaat der C2C12-Zellen wurde in verschiedenen Zellkulturformaten, Zelldichten und Mediumvolumina vorgenommen.

Tabelle 3: Aufteilung von C2C12-Zellen und Medium

Zellkulturformat	Experiment	Zellen/Well	ml Medium/Well
6-Well Platte	RNA Isolation	2×10^6	2
12-Well Platte	RNA Isolation	5×10^3	1
10 cm Schale	RNA Isolation	1×10^6	10

Bis zur Aufarbeitung der behandelten Zellen konnten diese bei -80°C gelagert werden.

2.2.4.2 Auftauen und Einfrieren von C2C12-Skelettmuskelvorläuferzellen

Die C2C12-Muskelvorläuferzellen wurden in einem 37°C -warmen Wasserbad aufgewärmt und tropfenweise in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Mit 10 ml Wachstumsmedium befüllt, wurde das Falcon-Röhrchen für 5 Minuten bei 100 rpm zentrifugiert. Das neuentstandene Zellpellet konnte mit 6 ml frischem Medium versetzt und resuspendiert werden. So wurde die damit entstandene Zellsuspension auf drei T75-Zellkulturflaschen verteilt. Die Lagerung erfolgte bei 37°C und 5 prozentigem CO_2 .

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Zellkulturflaschen zunächst mit PBS-Puffer gewaschen und dann mit Trypsin abgelöst. Mit dem Wachstumsmedium konnten die Zellen aufgenommen werden und wurden daraufhin zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet konnte in einer filtrierten Lösung aus 9 ml FCS und 1 ml DMSO resuspendiert und danach in Kryokonservierungsgefäße verteilt werden. Bei -80°C wurde diese zunächst für 24 h in einer Kryobox mit Isopropanol und später in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.5 Transfektion mit LNA GapmeRs

Mittels Transfektion wird genetisches Material in die eukaryotische Zelle eingebracht, ein solches Verfahren wird genutzt, um Plasmide, Antisense-Oligonukleotide oder siRNA einzuschleusen.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Locked Nucleic Acid (LNA) GapmeRs in C2C12-Vorläufermuskelzellen und später in NMVCMs etabliert.

Hierbei handelt es sich um einen zirka 16 Aminosäuren langen Einzelstrang. Durch eine Methyl-Bindung zwischen dem 2'-O und 4'-C- Atom der Ribose ist diese in einer idealen Konformation für die komplementäre Watson-Crick-Bindung, sogenannte „Locked Nucleic Acid“ (LNA) Sequenzen, bindet das Antisense-Oligonucleotid mit einer hohen Affinität komplementär zu der RNA-Ziel-Sequenz. Die zentral liegende DNA aktiviert eine RNase-H abhängige Spaltung der

Zielsequenz auf dem gegenüberliegenden Strang, sodass es zu einem Funktionsverlust dieser Sequenz kommt (Quiagen Antisense LNA Gapmers Handbook, Oktober 2017).

2.2.5.1 Transfektion von neonatalen Mauskardiomyozyten mit LNA GapmeRs

Das Wachstumsmedium der neonatalen Mauskardiomyozyten wurde nach dem Ausplattieren und Waschen nach 24 h auf DMEM-Wachstumsmedium mit L-Glutamin und Cytosine- β -D-Arabinofuranosid gewechselt.

Für die Transfektion bereitete man ein Ansatz mit LNA GapmeRs und ein weiterer mit der Lipofectamin-Reagenz vor. Diese wurden in Serum- und Antibiotikum-freiem Medium mit Cytosine- β -D-Arabinofuranosid angesetzt.

Die Menge der eingesetzten LNA GapmeR-Sequenz und der Transfektionsreagenz richtete sich nach den Zellkulturformaten.

Tabelle 4: Transfektionsansatz 1: LNA GapmeR

Platte	Experiment	LNA GapmeR Konzentration	ml Medium/Well
6-Well Platte	Ansatz 1 (Transfektion)	150 pmol/3 μ l	200 μ l
12-Well Platte	Ansatz 1 (Transfektion)	50 pmol/1 μ l	100 μ l

Tabelle 5: Transfektionsansatz 2: Lipofectamin

Platte	Experiment	Lipofectamin Konzentration	ml Medium/Well
6-Well Platte	Ansatz 2 (Transfektion)	4 μ l	200 μ l
12-Well Platte	Ansatz 2 (Transfektion)	2 μ l	100 μ l

Beide Ansätze wurden nach Fertigstellung zusammen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten konnte das Gemisch zu gleichen Teilen auf die Platte aufgetragen werden. Die Platten wurden bei 37 °C und 5-prozentigem CO₂ bis zum nächsten Tag inkubiert. Es folgte ein Wechsel des Mediums auf Vollmedium mit Cytosine- β -D-Arabinofuranosid. Nach weiteren 24 h konnte mit der Ernte durch Trizol begonnen werden.

2.2.5.2 Transfektion von C2C12-Zellen mit LNA GapmeRs

Für eine Transfektion von C2C12-Zellen wurden die Zellen auf ein Antibiotika- und L-Glutamin-freies Medium ausgesät. Die Transfektion erfolgte, wie schon im *Kapitel 2.2.5.1* für neonatale Mauscardiomyozyten beschrieben, jedoch ohne den Zusatz von Cytosine-β-D-Arabinofuranosid zum Medium.

2.2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit RNA

2.2.6.1 RNA-Extraktion aus Herzgewebe

Der Umgang mit RNA erforderte einen gereinigten Arbeitsplatz an dem grundsätzlich nur mit RNase-freien Materialien und gestopften Pipetten gearbeitet werden durfte. Um ubiquitär-vorkommende RNasen aus der Umwelt zu entfernen, wurde zur Herstellung von Chemikalien nur DEPC-behandeltes, doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) benutzt.

Das Ernten von RNA aus Mausherzen beinhaltete das Zerkleinern durch einen Precellys-24-Homogenisier. Die Herzen lagerte man in Precellys-Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss und gab 1ml Trizol-Reagenz hinzu. Keramikperlen in den Größen 1,4 mm und 2,8 mm wurden zusätzlich in die Reaktionsgefäße gegeben. Mit dem Homogenisatorprogramm 2x20s bei einer Geschwindigkeit von 5000 rpm konnte das Gewebe komplett zerkleinert werden. Im Anschluss zentrifugierte man die Reaktionsgefäße für 20 Minuten bei 12000 g. Den Überstand überführte man in ein neues 1,5 ml-RNase-freies Reaktionsgefäß. Mit der RNA-Extraktion konnte nun begonnen werden.

2.2.6.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus neonatalen Mauscardiomyozyten und C2C12-Zellen erfolgte mit Trizol. Die Zellen wurden zweifach mit PBS-Puffer gespült und anschließend 1 ml Trizol in jedes Well gegeben. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute, unter Schwenken der Platte, lösten sich die Zellen vom Boden. Zusätzlich konnte ein Zellkratzer zur Hilfe genommen werden. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml-RNase-freies Reaktionsgefäß überführt werden. Zur RNA-Isolierung wurde in jedes Reaktionsgefäß 200 µl Chloroform hinein pipettiert und alle Reaktionsgefäße für 15 Sekunden vorsichtig ausgeschüttelt. Daraufhin inkubierte die Suspension bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten.

Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugieren für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 rpm. Während die obere klare Phase zu 60 % RNA enthielt, befanden sich in der Interphase die Proteine und in der unteren roten Phase die DNA. Nur die farblose, wässrige Phase überführte man mit einem Volumen von etwa 500 µl in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß.

Um die RNA zu fällen, wurden 500 µl Isopropanol in einem Verhältnis von 1:1 hinzugefügt und die Suspension gut gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei -20 °C. Das Isopropanol-Gemisch wurde anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert, sodass ein weißes Pellet am Boden sichtbar wurde. Nachdem der Überstand verworfen werden konnte, wusch man das Pellet mit 1 ml 75-prozentigem Ethanol.

Das Reaktionsgefäß zentrifugierte nochmals bei 4 °C und 7500 rpm für 5 Minuten. Der Überstand konnte abpipettiert werden und das Pellet trocknete über Kopf für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur. Hierbei ist es wichtig, dass Pellet nicht komplett austrocknen zu lassen. Mit 30 µl DEPC-Wasser konnte schließlich das Pellet aufgenommen werden. Anschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert. Die Konzentration bestimmte man anschließend photometrisch mittels Nanodrop.

2.2.6.3 DNase-Verdau und RNA-Aufreinigung

Für den DNase-Verdau füllte man 5 µg RNA und 1 µg DNase mit DEPC-H₂O auf 12 µl Gesamtvolumen und inkubierte den Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Fällung der gereinigten RNA mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) in einem Verhältnis 1:1 und leichtes Vortexen. Nachdem 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde, wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Für die Fällung wurden 300 µl Ethanol und 10 µl 3M Natriumacetat in DEPC-Wasser gemischt. Die beste RNA-Ausbeute an lncRNAs konnte durch eine Fällung über Nacht bei -20 °C erlangt werden. Nun zentrifugierte man den Ansatz 30 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet nochmals mit 500 µl 75-prozentigem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 5 Minuten, 14000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 12 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

2.2.6.4 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Superscript III First Strand cDNA Synthese-Kit nach Protokoll des Herstellers. Hierbei wurde 1 µg der DNase-freien RNA in cDNA transkribiert. Zu dem Ansatz wurden je 0,5 µl Random-Hexamer Primer (250 ng/µl) und 1 µl dNTPs (10 mM) pipettiert. Es erfolgte die initiale Denaturierung des Reaktionsansatzes für 5 Minuten bei 65°C. Nach einer Minute auf Eis wurde dieser abzentrifugiert. Zu dem Ansatz wurde ein Mastermix aus 4 µl 5x First Strand RT-Puffer, 1 µl DTT (0,1 mM), 1 µl RnaseOUT RNase Inhibitor (40 U/µl) und 0,5 µl SuperScript III Reverse Transkriptase (200 Units/µl) hinzugefügt. Die cDNA-Synthese

erfolgte im Biometra Cycler mit dem folgenden Programm: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 50 °C und 15 Minuten bei 70 °C, anschließend wurden die Proben kurz auf Eis inkubiert. Die fertige cDNA wurde mit DEPC-Wasser auf 100 µl verdünnt (10 ng/µl) und für die Realtime-PCR nochmals 1:2 verdünnt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.6.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Mit dem Photometer Nano Drop wurde Absorptionskurven von RNA bei 230 nm, 260 nm und 280 nm zur Qualitätskontrolle gemessen, nach entsprechender Eichung, gemessen. Es wurden nur Proben für weiterführende Realtime-PCR-Experimente weiterverwendet, die ein A260/A280-Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 aufwiesen.

2.2.6.6 Primer-Design der quantitativen Realtime-PCR

Die Entwicklung von Primern für Realtime-PCR erfolgte mit Sequenzen aus Ensembl und NCBI Primer-BLAST. Hierfür wurden die folgenden Ziel-Einstellungen verwendet: Primer-Länge 70 bis 100 Nukleotide. Cytosin/Guanin-Gehalt bei rund 50 % festgelegt, um Fehlhybridisierungen zu minimieren. Schmelztemperatur bei 55-60 °C. Differenz der Schmelztemperatur der Primer weniger als 2 °C. Die Primer wurden erneut mittels NCBI BLAST auf Sequenzspezifität im Genom der Maus kontrolliert.

2.2.6.7 Quantitative Realtime-PCR

Die Realtime-PCR wurde zur quantitativen Bestimmung der Genexpression/Transkription genutzt. Die zu untersuchende RNA-Probe wurde in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Realtime-PCR-Reaktion mittels Transkript-spezifischer Primer. Durch Interkalation des SYBR-Fluoreszenzfarbstoffes in doppelsträngige DNA im Rahmen der PCR-Reaktion kann im Vergleich der Fluoreszenz-Kurven zwischen einem Ziel-Transkript und einem Kontroll-Transkript (sog. „Housekeeping“-Gen, z.B. GAPDH, 18S-rRNA) die relative Expression bestimmt werden.

Quantitative Realtime-PCR

Wir verwendeten für die quantitative Realtime-PCR den Express SYBR GreenEr qPCR Supermix. Der Mastermix beinhaltet: 10 µl Express SYBR GreenEr qPCR Supermix, 0,4 µl Vorwärts-/Rückwärts-Primen (10 µM) und 7,6 µl DNase-freies Wasser. Das entgültige Reaktionsvolumen betrug 20 µl pro Well. 2 µl cDNA (4 ng) wurden in jedes Well der Realtime-PCR-Platte pipettiert und 18 µl PCR-Mastermix hinzugeführt. Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen und kurz zentrifugiert. Die PCR-Reaktion erfolgte mittels CFX96 Real Time-PCR Detection System.

Das folgende standardisierte PCR-Programm wurde verwendet: Inkubation von Uracil-DNA-Glycolylase (UDG), welche den Abbau kontaminierender PCR-Produkte sicherte (3 Minuten, 50 °C), Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, anschließend 40 PCR-Zyklen mit 95 °C für 5 Sekunden und 60 °C für 30 Sekunden zur Amplifikation. Anschließend erfolgte eine Analyse der Schmelzkurven zur Überprüfung der Spezifität der Primer und des PCR-Produktes.

Quantitative Multiplex-PCR mittels TaqMan-System

Die Messung der Transkripte des hypertrophen Genprogramms NPPA, NPPB und RCAN1-4 erfolgte mittels TaqMan-Realtime-PCR als Multiplex-PCR, durch Kombination spezifischer Sonden mit mehreren Fluorophoren in einem Reaktionsansatz.

Der Mastermix bestand aus 10 µl iQ Powermix und jeweils 0,5 µl des Rpl32 (Texas Red)-, NPPA (FAM)-, NPPB (HEX)- und RCAN1-4 (Cy5-Maus)-Mixes. Zusätzlich füllte man die Suspension noch mit 6 µl DNase-freiem Wasser auf. Zu dem 18 µl Mastermix wurden 2 µl cDNA (4 ng) in jedes Well der Realtime-PCR-Platte pipettiert.

Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen und kurz abzentrifugiert. Die Realtime-PCR-Reaktion wurde mittels Real Time-PCR Detection Sys CFX96 durchgeführt und Verwendung der folgenden Reaktionsbedingungen: Denaturierung von zwei Minuten bei 95 °C. 40 Zyklen DNA-Amplifizierung mit 15 Sekunden bei 95 °C und 30 Sekunden bei 55 °C beziehungsweise 70 °C. Der letzte Zyklus von fünf Sekunden bei 65 °C auf 95 °C zur Schmelzkurvenanalyse gewährleistete die Überprüfung der Spezifität der Primer und der Reinheit der Proben.

Quantifizierung der Expression

Die relative Quantifizierung der differentiellen Expression erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ -Methode durch Vergleich der Schwellen-Zyklen von Ziel-Transkript und Normalisierung auf Kontroll-Transkripte (Housekeeping-Gen). Als interner Standard zur relativen Quantifizierung wurde in dieser Arbeit Primer für Rpl32 (Ribosomal Protein L32) verwendet.

2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Generation eines 2-prozentigen Agarosegels löste man Agarose (6 g) in TAE-Puffer (300 ml), dies wurde aufgeköcht und anschließend 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugemischt. Die abgekühlte Lösung wurde in der Gelapparatur gegossen. Nach auspolymerisieren des Gels wurde dieses in die Gelelektrophore-Apparatur eingesetzt und mit TAE-Puffer gefüllt.

Die RNA-Proben wurden zusammen mit 5 µl Ladepuffer in die Taschen pipettiert. Als Größenmarker verwendeten wir die Fermentas GeneRuler Ladder, zur Beurteilung des

Molekulargewichtes der RNA-Fragmente zu erhalten. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 30 Minuten bei 100 V und 200 mA. Durch das elektrische Feld bewegt sich die negativgeladene RNA zum Pluspol der Anode. Die Visualisierung und Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

2.2.7 Tierversuche

Unter standardisierten Bedingungen wurde die C57Bl/6-Mauslinie in der Tierversuchseinrichtung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 24 °C und die Tiere hatten ständig Zugang zu Trockenfutter und Trinkwasser.

2.2.7.1 Echokardiographie

Die Echokardiographie der bei Mäusen erfolgte zusammen mit Dr. Matthias Eden. Die Mäuse wurden mittels Isofluran narkotisiert und verblieben spontanatmend, anschließend wurde das Brustfell rasiert. Wir verwendeten ein Echokardiographiegerät GE Vivid 7 Pro mit einem 15 MHz Sektorschallkopf im M-Mode. In der parasternalen Längsachse erfolgte die Vermessung des linken Ventrikels, es wurden die folgenden Parameter erhoben: Diastolische Dicke des Interventrikulären Septums (IVSd), Diastolischer Durchmesser der Posterioren Wand des Linken Ventrikels (LVPWd). Daraus errechnete sich die Verkürzungsfraction (FS%, Fractional Shortening) als:

Tabelle 6: Verkürzungsfraction (FS %):

$$\text{FS\%} = \frac{\text{LVIDd} - \text{LVIDs}}{\text{LVIDd}} \times 100$$

2.2.7.2 Organentnahme und Morphometrie

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und sofort der Brustkorb durch zwei senkrechte Schnitte eröffnet. Nach Durchtrennung des Zwerchfells konnte das Herz von den Gefäßen abgesetzt werden und in PBS-Puffer von Blut freigespült. Vorhöfe und rechter Ventrikel wurden entfernt und der linke Ventrikel gewogen. Für weitere Experimente wurde der linke Ventrikel in drei gleichgroße Fragmente geteilt und bei -80 °C aufbewahrt. Für die morphometrische Bestimmung der kardialen Hypertrophie wurden das Herzgewicht, das Gesamtgewicht und die Tibia-Länge bestimmt. Mit den hierdurch gebildeten Quotienten konnte das Herzgewicht ins Verhältnis zur Größe und zum Gewicht der Maus gesetzt werden. Das Herz-

und das Gesamtgewicht wurden mit einer Präzisionswaage ermittelt. Die Tibia-Länge jeder Maus wurde mit einer Präzisionsschiebelehre gemessen.

2.2.8 Statistische Auswertung

Bei allen Ergebnissen wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler der Mittelwerte von mindestens drei Einzelmessungen gebildet. Mit Hilfe des zweiseitigen t-Testes wurden die Ergebnisse auf ihre Signifikanz getestet. Zur Visualisierung und statistischen Auswertung wurden Sigmaplot und GraphPad Prism genutzt. Die Signifikanzaufschlüsselung zeigte sich wie folgt:

Tabelle 7: Signifikanzaufschlüsselung

n.s.	$p > 0,05$
*	$p < 0,05$
†	$p < 0,01$
‡	$p < 0,001$

Die Variable „n“ bezeichnet die Anzahl biologischer Replikate, Zahl der verwendeten Mäuse oder unabhängiger Experimente. Der Standardfehler des Mittelwertes ist im Text durch die Kennzeichnung (\pm) aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer kardialen Hypertrophie in Calcineurin-Transgen-Mäusen

Ziel der Arbeit ist es, die differenzielle Regulierung transgener lncRNAs im Rahmen der kardialen Hypertrophie systematisch zu analysieren. Dazu wurde durch Calcineurin-Überexpression in C57Bl/6-Mäusen eine kardiale Hypertrophie mit sekundärer Dilatation und Herzinsuffizienz generiert.

3.1.1 Echokardiographie der Calcineurin-Transgen-Tiere

Um die linksventrikuläre Myokardfunktion von acht Wildtyp- und sechs Transgen-Tieren in einem Alter von 30-42 Tagen zu untersuchen, wurden folgende Parameter echokardiographisch ermittelt: der Durchmesser der Linksventrikulären Hinterwand Enddiastolisch (LVPWd), die Dicke des Interventrikulären Septums in der Diastole (IVSd) und die Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS%).

Der Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand enddiastolisch zeigte sich um $0,44 (\pm 0,06, p < 0,001)$ Millimeter in der Transgen-Mauslinie vergrößert. Ebenso wurde ein, um $0,35 (\pm 0,05, p < 0,001)$ Millimeter vergrößertes interventrikuläres Septum in der Diastole in der Transgen-Mauslinie gemessen. Auch die linksventrikuläre Verkürzungsfraction deckte in transgenen Tieren eine um 5,9 Prozent ($\pm 1,75, p < 0,01$) verminderte kardiale Kontraktilität des linken Ventrikels auf. Diese echokardiographischen Ergebnisse belegen eine Herzhypertrophie in den untersuchten Calcineurin-transgenen Tieren. Siehe hierfür in Abbildung 8 (A-C).

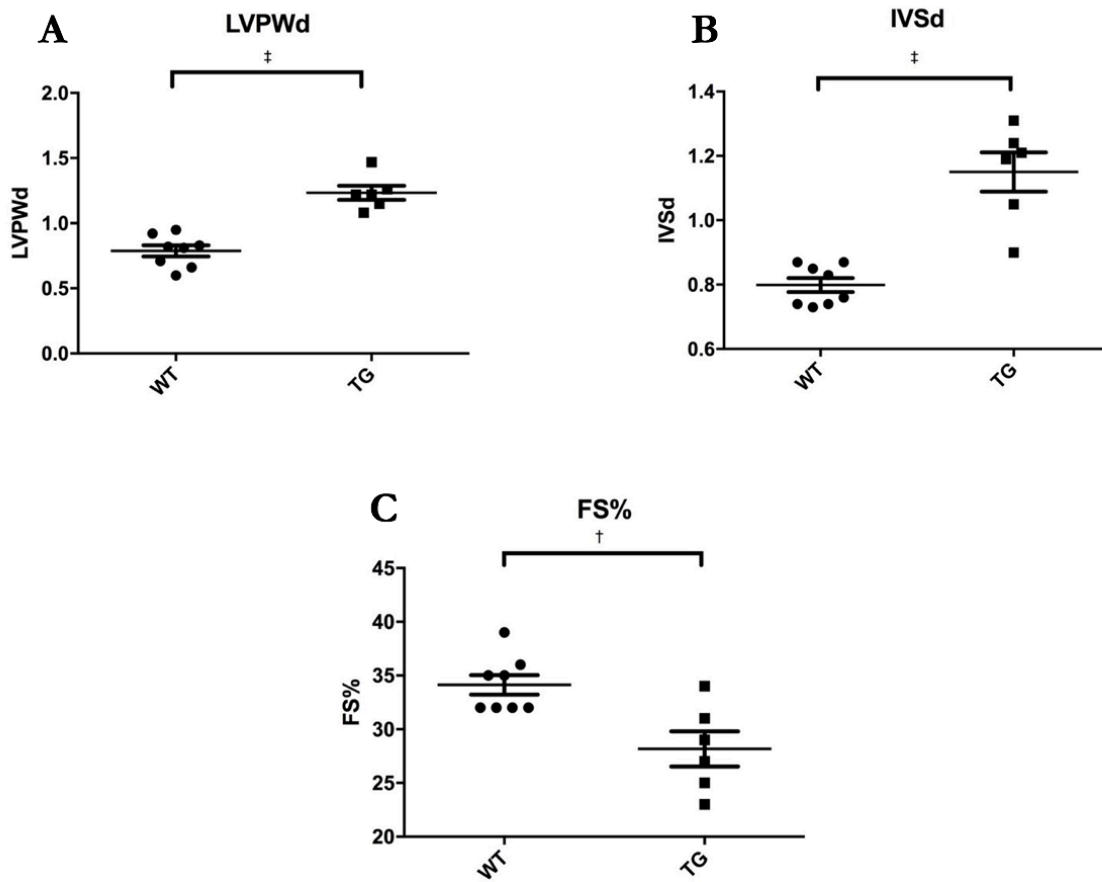


Abbildung 8 (A-C): Echokardiographische Charakterisierung Calcineurin-transgener Mäuse (n=6) und Wildtypen (n=8),
 A: Diastolischer Diameter der Posterioren Wand des Linken Ventrikels (LVPWd),
 B: Interventrikuläres Septum in der Diastole (IVSd),
 C: Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS%).

3.1.2 Morphometrische Untersuchung der Calcineurin-transgenen Mäuse

In sechs Calcineurin-Transgen- und acht Wildtyp-Mäusen vom C57Bl/6-Stamm im Alter von 30-45 Tagen wurden Herzen isoliert und die kardiale Hypertrophie untersucht. Hierfür verglich man die Calcineurin-Knockout-Tiere anhand der Herzgewicht/Körpergewicht- und Herzgewicht/Tibia Länge-Quotienten mit Wildtypen. Die Knockout-Tiere präsentieren einen um 0,008 ($\pm 0,00083$, $p < 0,001$) bzw. um 280% erhöhten Quotienten in Relation zum Gesamtgewicht und einen um 0,009 ($\pm 0,0011$, $p < 0,001$) bzw. um einen 260% erhöhten Quotienten in Relation zu der Tibia Länge. Die Abbildung 9 (A, B) stellt die morphometrische Untersuchung dar.

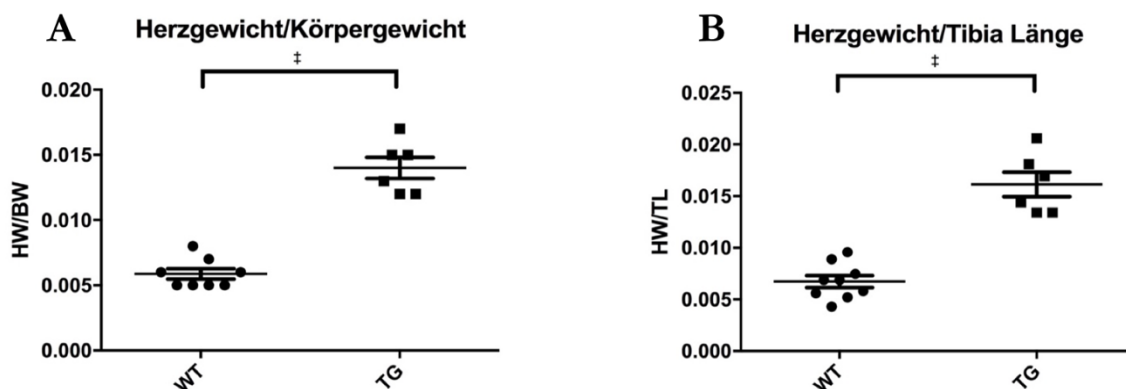


Abbildung 9 (A, B): Morphometrische Charakterisierung der kardialen Hypertrophie in Calcineurin-transgenen Mäusen (n=6) und Wildtypen (n=8), A: Herzgewicht/Körpergewicht, B: Herzgewicht/Tibia Länge.

3.1.3 Charakterisierung der kardialen Hypertrophie in Calcineurin-transgenen Mäusen

Zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps der kardialen Hypertrophie erfolgte mittels quantitativer Realtime-PCR die Analyse der Expression des hypertrophen Genprogramms: Calcineurin-transgene Tieren weisen, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, eine auf das 5,63-fache ($\pm 0,90$, $p < 0,001$) erhöhte Expression des Natriuretischen Peptids Typ B (NPPB) und eine auf das 6,2-fache ($\pm 1,12$, $p < 0,001$) erhöhte Expression des Calcineurin-abhängigen RCAN1-4 (RCAN1-4). Für das Natriuretische Peptid Typ A (NPPA) zeigte sich keine differenzielle Regulation (Abbildung 10).

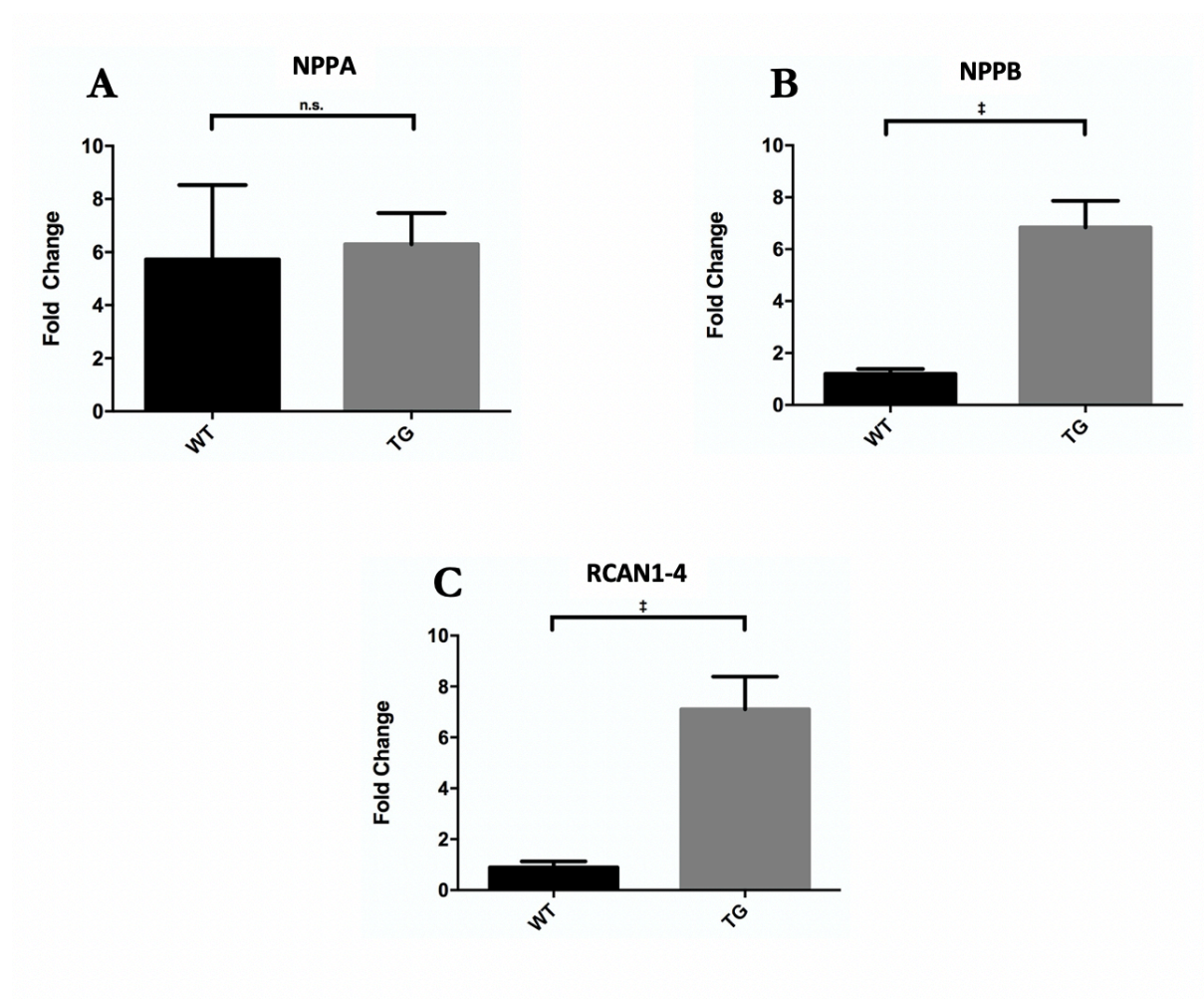


Abbildung 10 (A-C): Quantitative Realtime-PCR der Hypertrophiemarker
A: NPPA, B: NPPB, C: RCAN1-4
in Calcineurin-transgenen Mäusen (n=6) und Wildtypen (n=8),
Housekeeping Gen Rpl32.

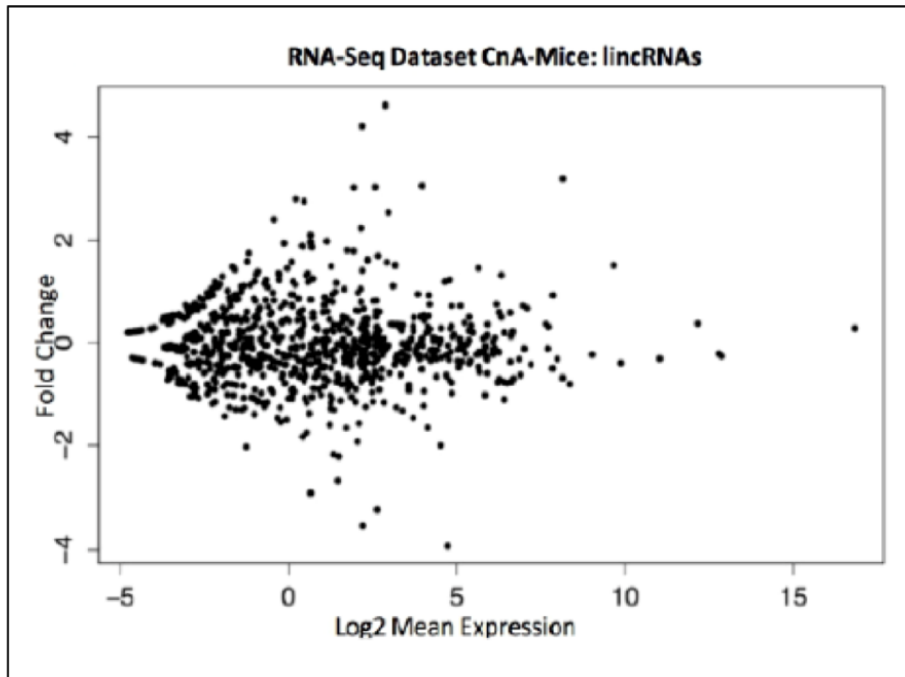
3.2 Identifizierung von Long Noncoding RNA-Sequenzen in kardialer Hypertrophie

3.2.1 RNA-Sequenzierung und differentielle Expression

In Kooperation mit dem Institut für klinische Molekularbiologie (IKMB, Prof. Dr. Franke/Prof. Dr. Rosenstiel) erfolgte die RNA-Sequenzierung aus Herzproben von Calcineurin-transgenen Mäusen und Wildtyp-Kontrollen. Die RNA-Sequenzierungen, inklusive Qualitätskontrolle und bioinformatischer Analyse der Rohdaten (Qualität, Genom-Alignement, differentielle Expression, Allokation kodierender und nicht-kodierender Sequenzen) erfolgte durch das IKMB.

Für die differentielle Regulation (Fold Change) zwischen Calcineurin-Transgen- und Wildtyp-Mäusen wurde ein Grenzwert von 1,5 bei einem p-Wert von $<0,05$ festgelegt, korrigiert für multiples Testen. Zur Identifikation neuer lncRNAs in der Modulation der kardialen Hypertrophie verglichen wir differentiell exprimierte lncRNAs mit der genomischen Lokalisation bekannter kardial-spezifischer Transkripte. Auch bereits publizierte Datensätze aus RNA-Sequenzierungsexperimenten und Datenbanken (Ensembl GRCm38, NONCODE v4, Cardiac enhancer datasets) wurden abgeglichen, um lncRNAs zu identifizieren, die spezifisch im Myokard, bei der Differenzierung oder bei relevanten Signaltransduktionswegen exprimiert waren. Es erfolgte eine bevorzugte Charakterisierung evolutionär konservierter Spezies wie Mensch, Maus, Ratte und Zebrafisch.

A



B

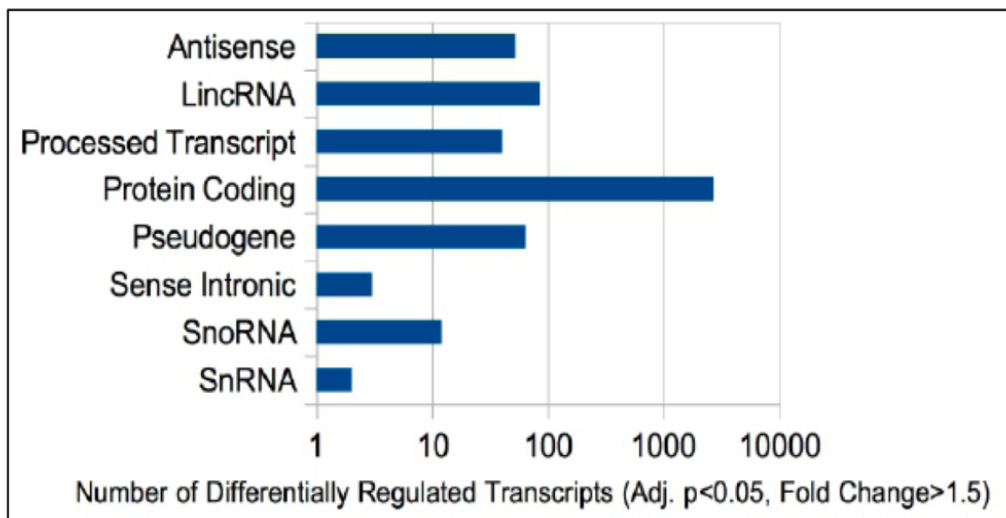


Abbildung 11 (A, B): Bioinformatische Analyse von Hypertrophie-assoziierten Sequenzen,
 A: MA-Plot der lincRNA-Sequenzierungsdaten in Calcineurin-transgenen Mäusen,
 logarithmische Expression vs. Fold Change; B: Anzahl differentiell regulierter Transkripte,
 Aufschlüsselung nach Klassen.

3.2.2 Validierung der differentiellen Regulation ausgewählter lncRNAs in Calcineurin-transgenen Mäusen

Mit Hilfe von quantitativer Realtime-PCR wurden aussichtsreiche lncRNA-Sequenzen aus der bioinformatischen Analyse in der Calcineurin-Transgen- und Wildtyp-Mauskohorte validiert. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde die Expression der ribosomalen 60S-rRNA Rpl32 verwendet. Hierbei zeigten sich unterschiedlich differenziell regulierte lncRNA-Sequenzen. Die lncRNAs 4921504A21Rik, 1110019D14Rik, 6430562O15Rik, Gm15328 und Gm26722 waren im Calcineurin-Transgen-Modell, im Vergleich zur Wildtyp-Mauskohorte, nicht signifikant reguliert. Die lncRNA 4921504A21Rik zeigte eine 0,31-fache ($\pm 0,36$, $p > 0,05$) Hochregulation. Die lncRNA 1110019D14Rik war in transgenen Mäusen nur um das 0,36-fache ($\pm 0,57$, $p > 0,05$) hochreguliert. Um das 0,03-fache ($\pm 0,21$, $p > 0,05$) herunterreguliert zeigte sich die lncRNA 6430562O15Rik. Auch die lncRNA Gm15328 war in transgenen Tieren nur um das 0,67-fache ($\pm 0,30$, $p > 0,05$) herunterreguliert. Die lncRNA Gm26722 war um das 0,07-fache ($\pm 0,12$, $p > 0,05$) nicht signifikant herunterreguliert. Die spezifischen Expressionsmuster sind in Abbildung 12 (A-D), sowie Abbildung 13 (E) dargestellt.

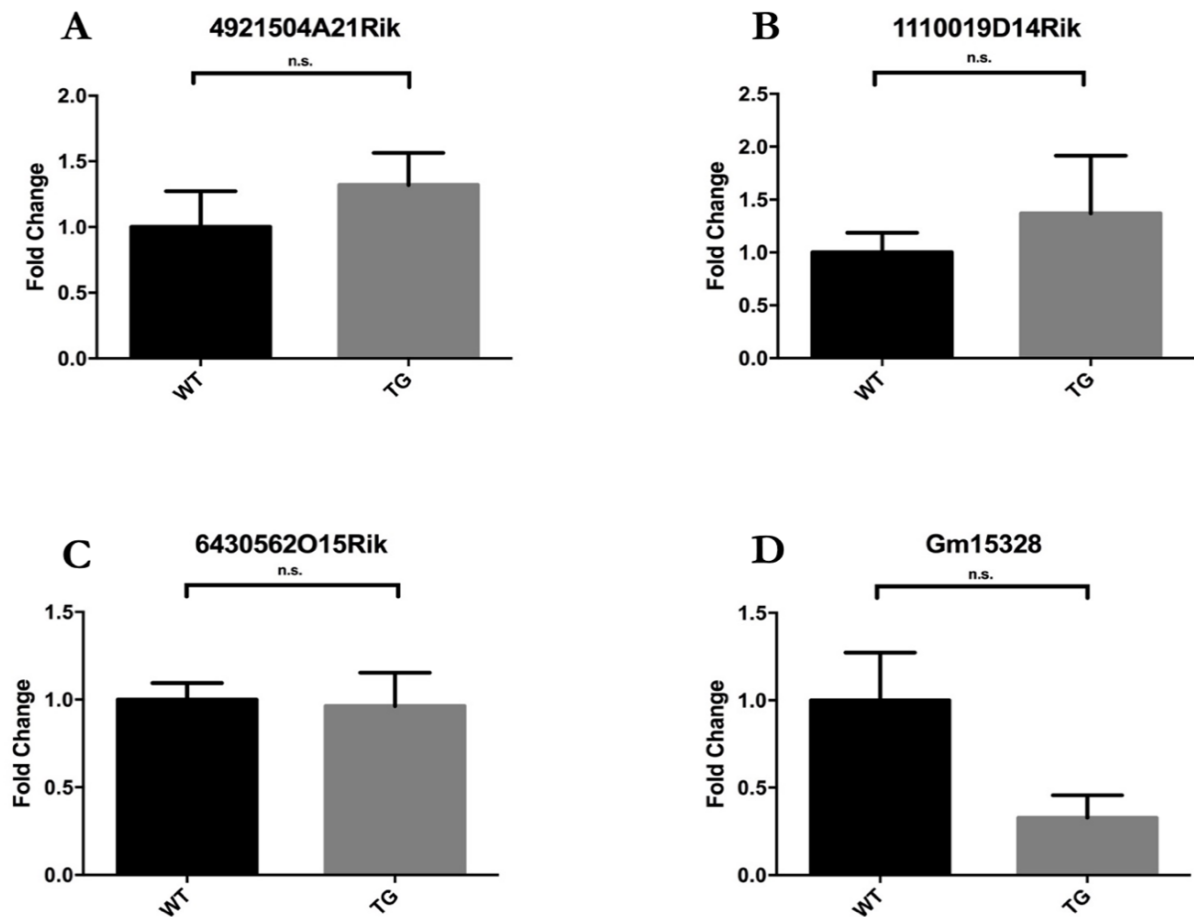


Abbildung 12 (A-D): Quantitative Realtime-PCR der lncRNA-Sequenzen
A: 4921504A21Rik, B: 1110019D14Rik,
C: 6430562O15Rik, D: Gm15328,
in Calcineurin-transgenen Mäusen (n=4) und Wildtypen (n=4),
Housekeeping Gen Rpl32.

Die lncRNAs Rhabdomyosarcoma 2 associated Transcript (Rmst) ergab eine signifikante 0,9-fache ($\pm 0,39$, $p < 0,05$) und die lncRNA Gm5532 eine signifikante 0,51-fache ($\pm 0,14$, $p < 0,05$) Herunterregulierung in Calcineurin-Transgen- im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Abbildung 13 (F, G) stellt die spezifischen Expressionsmuster dar.

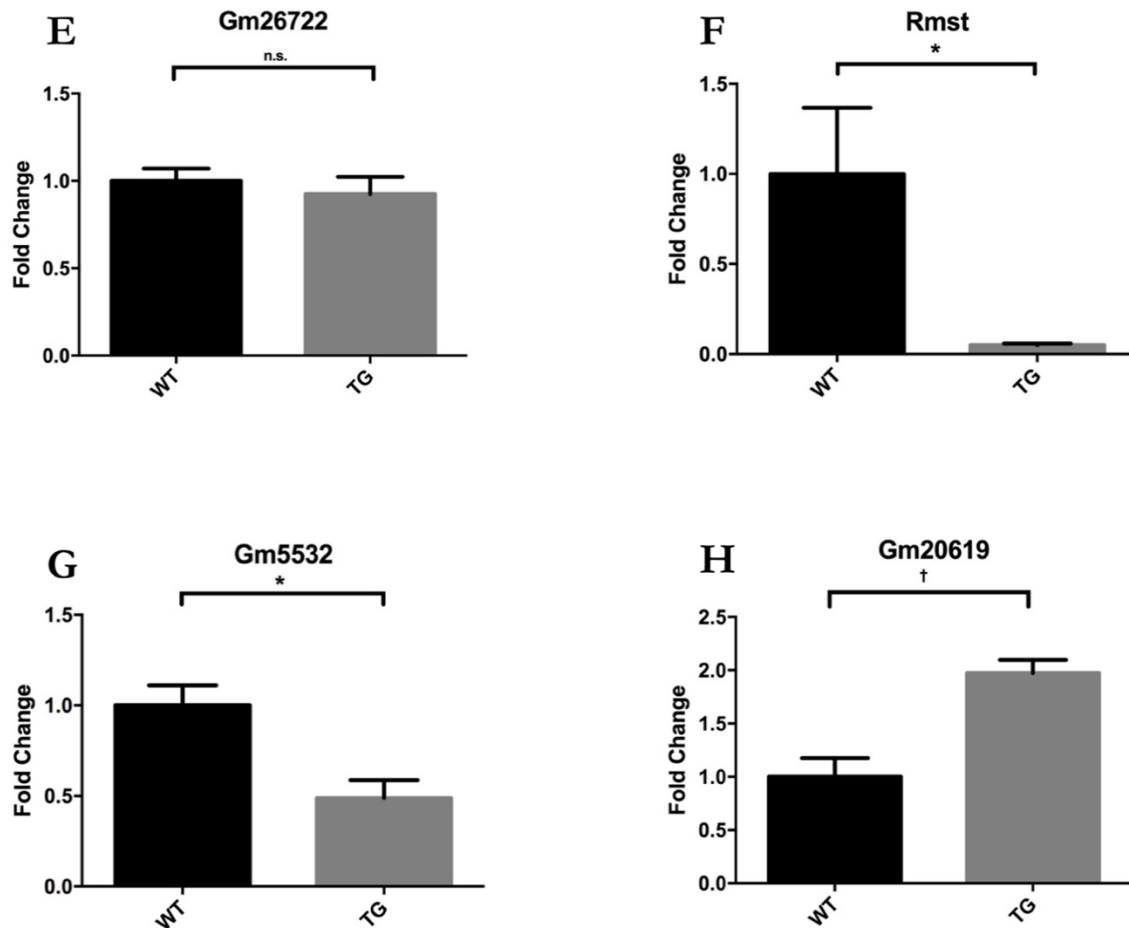


Abbildung 13 (E-H): Quantitative Realtime-PCR der lncRNA-Sequenzen
E: Gm26722, F: Rmst, G: Gm5532, H: Gm20619
in Calcineurin-transgenen Mäusen (n=4) und Wildtypen (n=4),
Housekeeping Gen Rpl32.

Die lncRNA-Sequenzen Gm20619, Gm9917 und Gm12295 waren hochsignifikant exprimiert in Calcineurin-transgenen Mäusen. Gm20619 ergab eine um das 0,97-fache ($\pm 0,21$, $p < 0,01$) und Gm9917 eine um das 1,8-fache ($\pm 0,39$, $p < 0,01$) Hochregulation im Vergleich zum Wildtyp.

Siehe für die genaue Darstellung der Expressionsmuster in Abbildung 13 (H) und in Abbildung 14 (I –K). Die lncRNA Gm12295 zeigte zwei verschiedene Transkriptvarianten. Gm12295_1 war in Calcineurin-transgenen Mäusen um das 14,7-fache ($\pm 3,15$, $p < 0,01$) und Gm12295_2 um das 12,5-fache ($\pm 3,11$, $p < 0,01$) signifikant exprimiert. (Abbildung 14 (I-K)).

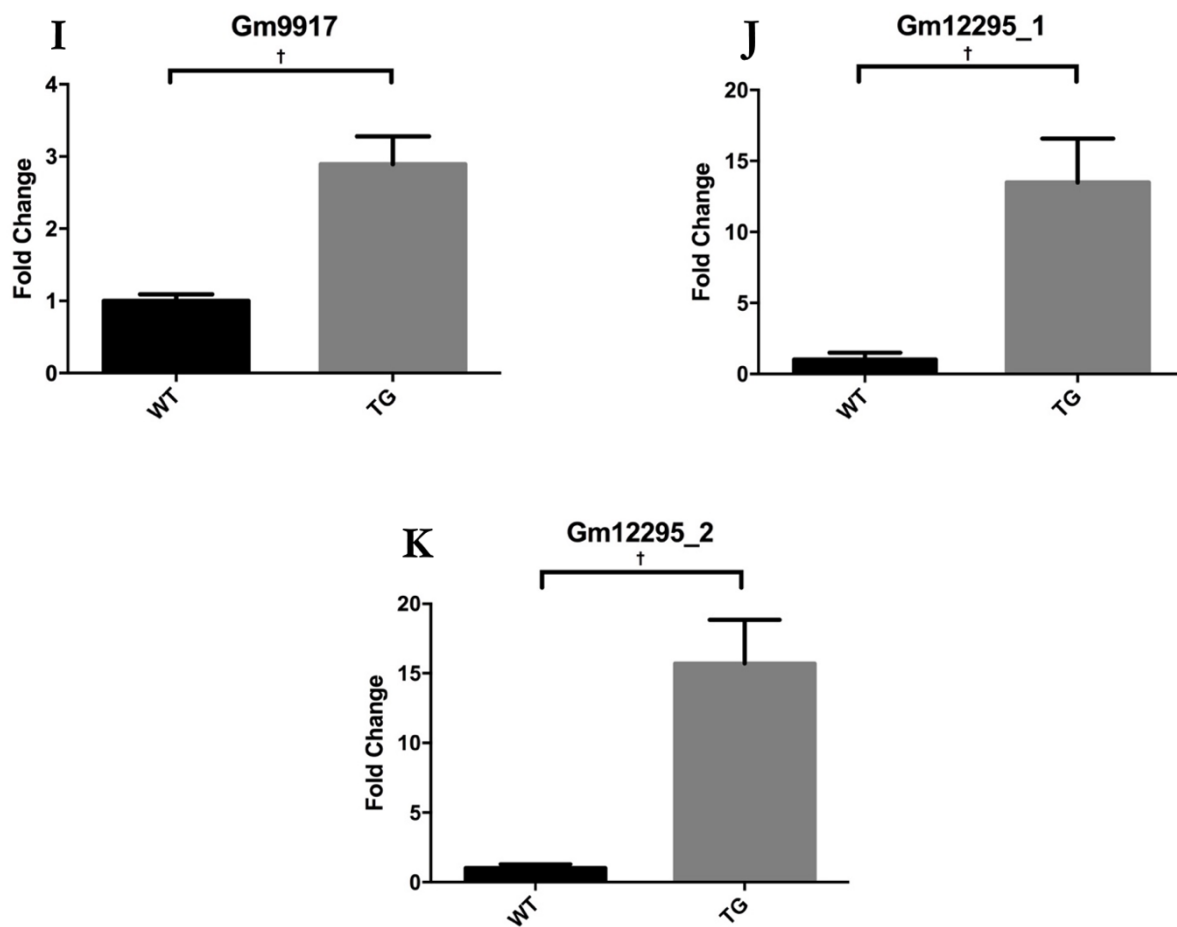


Abbildung 14 (I-K): Quantitative Realtime-PCR der lncRNA-Sequenzen
I: Gm9917, J: Gm12295_1, K: Gm12295_2, in Calcineurin-transgenen Mäusen (n=4)
und Wildtypen (n=4),
Housekeeping Gen Rpl32.

3.3 Untersuchung bekannter lncRNAs im Calcineurin-transgenen Mausmodell

Zusätzlich identifizierten wir kardiale lncRNAs aus der Literatur, deren Expression wir spezifisch mittels Realtime-PCR untersuchten: BVHT, NRON und MALAT1.

Die lncRNA-Sequenzen BVHT, NRON und MALAT1 waren im Calcineurin-transgenen Mausmodell exprimiert, jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nicht differentiell reguliert. BVHT zeigte sich in transgenen Tieren, um 0,1-fach ($\pm 0,33$, $p > 0,05$) herunterreguliert. NRON war um das 0,1-fache ($\pm 0,26$, $p > 0,05$) herunterreguliert. Die lncRNA MALAT1 war um das 0,04-fache ($\pm 0,28$, $p > 0,05$) stärker exprimiert im Calcineurin-transgenen Mausmodell. Siehe für die Darstellung der Expressionsmuster in Abbildung 15 (A-C).

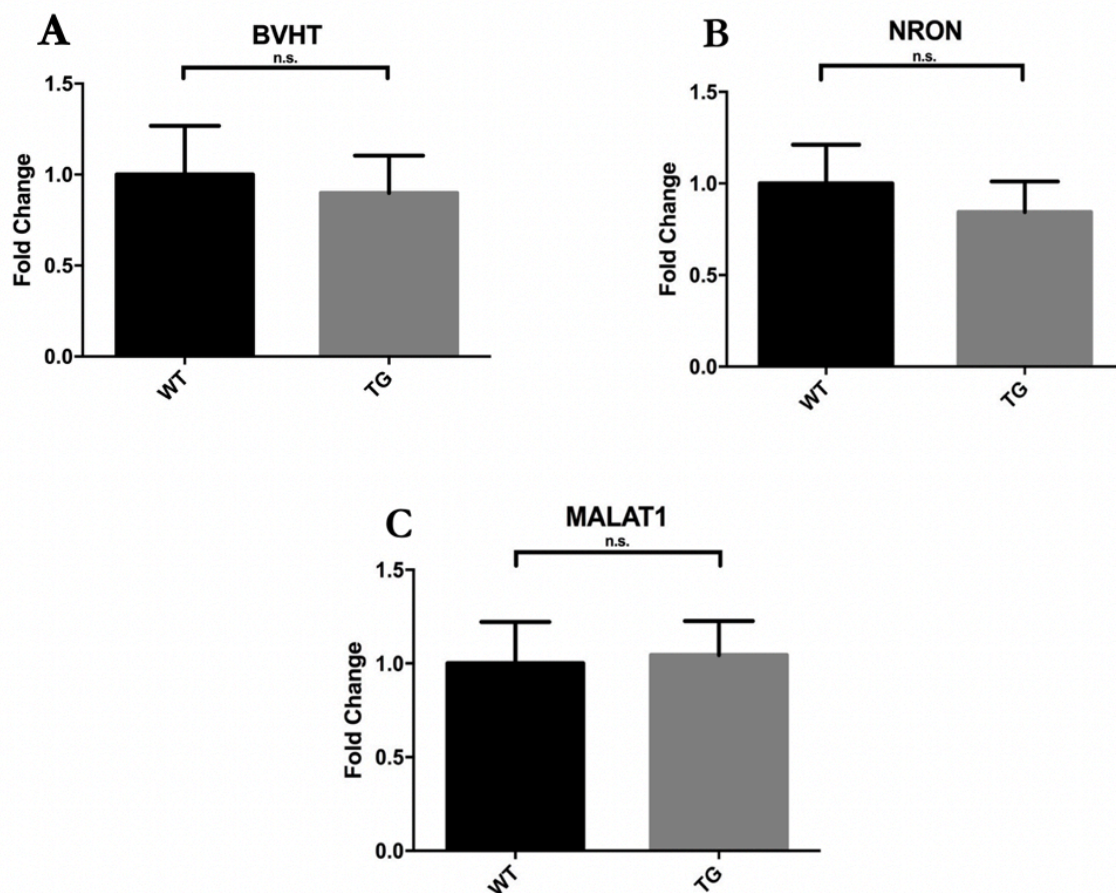


Abbildung 15 (A-C): Quantitative Realtime-PCR bekannter Sequenzen
A: BVHT, B: NRON, C: MALAT1
in Calcineurin-transgenen Mäusen (n=4) und Wildtypen (n=4),
Housekeeping Gen Rpl32.

3.4 Knockdowns der Long Noncoding RNA MALAT1 in C2C12-Zellen

Zur Hemmung der Expression der lncRNA MALAT1 wurde ein Knockdown mittels modifizierter Antisense-Oligonukleotide in murinen Myoblasten (C2C12-Zellen) etabliert (GapmeR). Zum suffizienten Knockdown wurden zwei unterschiedliche GapmeRs gegen MALAT1 erstellt (as1/as2), zur Kontrolle wird eine Kontroll-GapmeR mit einer inerten Zufallssequenz transfiziert. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion (24/48/72/96 Stunden) geerntet. Die Expression von MALAT1 wurde auf unbehandelte Zellen normalisiert. Der Versuch wurde vier Mal wiederholt. Zu allen vier Zeitpunkten zeigte sich eine hochsignifikante Inhibierung der lncRNA MALAT1 mit beiden Transkriptvarianten. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden war die Antisense-Nukleotid-Variante MALAT1 as1 um das 0,67-fache ($\pm 0,08$, $p < 0,001$) und die Antisense-Nukleotid-Variante MALAT1 as2 um das 0,64-fache ($\pm 0,07$, $p < 0,001$) herunter reguliert. Innerhalb von 48 Stunden war MALAT1 as1 um das 0,51-fache ($\pm 0,12$, $p < 0,001$) und MALAT1 as2 um das 0,66-fache ($\pm 0,07$, $p < 0,001$) herunter reguliert. Eine Inkubationszeit von 72 Stunden bewirkte eine Herunterregulation von MALAT1 as1 um das 0,60-fache ($\pm 0,13$, $p < 0,001$) und MALAT1 as2 um das 0,63-fache ($\pm 0,11$, $p < 0,001$). Auch eine Inkubation von 96 Stunden zeigte, dass MALAT1 as1 um das 0,48-fache ($\pm 0,15$, $p < 0,001$) und MALAT1 as2 um das 0,52-fache ($\pm 0,11$, $p < 0,001$) herunterreguliert waren (Abbildung 16).

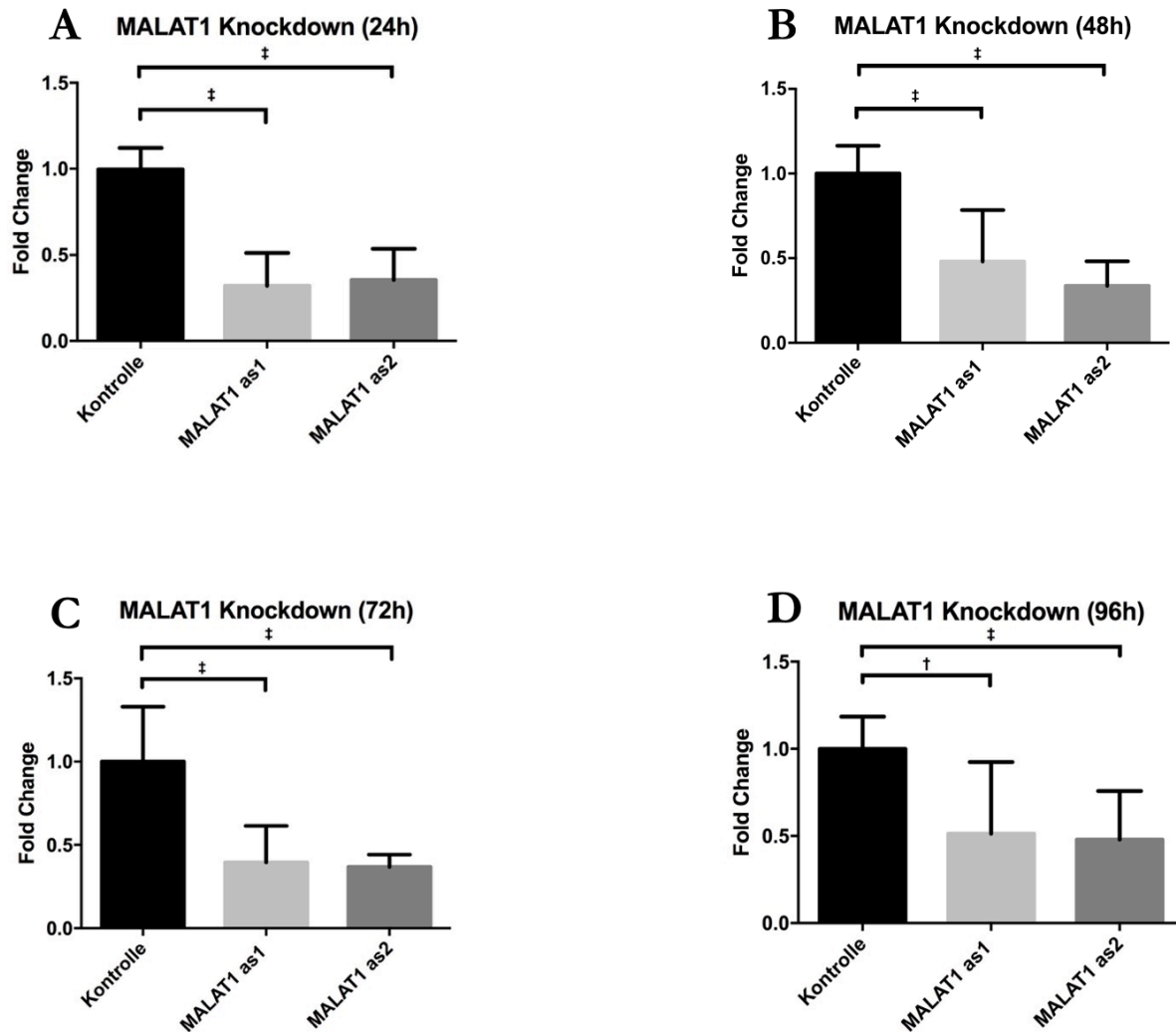


Abbildung 16 (A-D): Quantitative Realtime-PCR eines LNA-GapmeRs Knockdowns mit MALAT1 as1 und as2, Inkubationszeiten von A: 24h, B: 48h, C: 72h, D: 96h in C2C12-Zellen (n=4), Housekeeping Gen Rpl32.

3.5 Charakterisierung der Long Noncoding RNA Gm9917

Zur weiteren experimentellen Charakterisierung wurde in dieser Arbeit ein spezieller Fokus auf die lncRNA Gm9917 gelegt. In Herzen Calcineurin-transgener Mäuse zeigte sich Gm9917 um das 1,8-fache ($\pm 0,39$, $p < 0,01$) gesteigert, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren.

3.5.1 Identifizierung der Long Noncoding RNA Gm9917 und ihrer Transkriptvarianten

Die lncRNA Gm9917 ist bekannt als eine Antisense-lncRNA auf Chromosom 9 mit vier verschieden langen Transkriptvarianten: Gm9917-004, Gm9917-003, Gm9917-002, Gm9917-001. Die Expression von Gm9917 zeigt sich im Herzen und vielen anderen organspezifischen Geweben der Maus. Eine homologe Sequenz im menschlichen Genom ist nicht beschrieben (Ensembl.org).

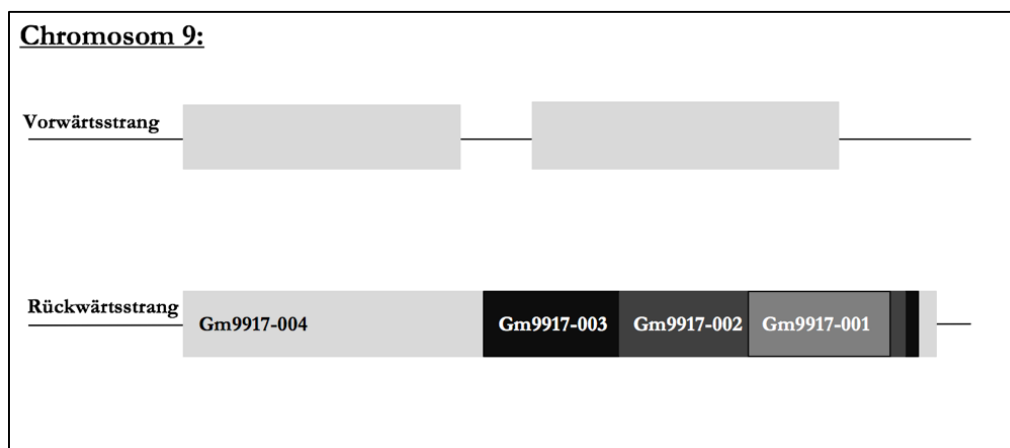


Abbildung 17: Darstellung der Gm9917-Transkriptvarianten

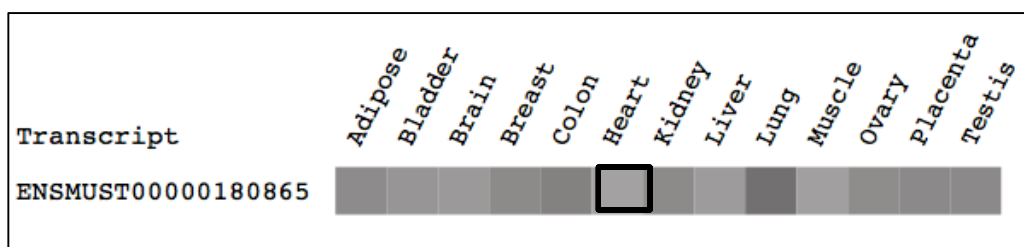


Abbildung 18: Expressionsmuster der lncRNA Gm9917 in der Maus

Zur Expressionsanalyse der Transkriptvarianten wurden spezifische PCR-Primer-Sequenzen generiert und durch eine quantitative Realtime-PCR in der C57Bl/6-Mauslinie untersucht. Zur Verdeutlichung der Expressionsstärke wurde die Expression auf Rpl32 normalisiert dargestellt. Der Versuch zeigte, dass die lncRNA Transkriptvariante Gm9917-001 die vorherrschende Variante ist und am stärksten ($0,04 \pm 0,01$) in Wildtyp-Tieren exprimiert ist.

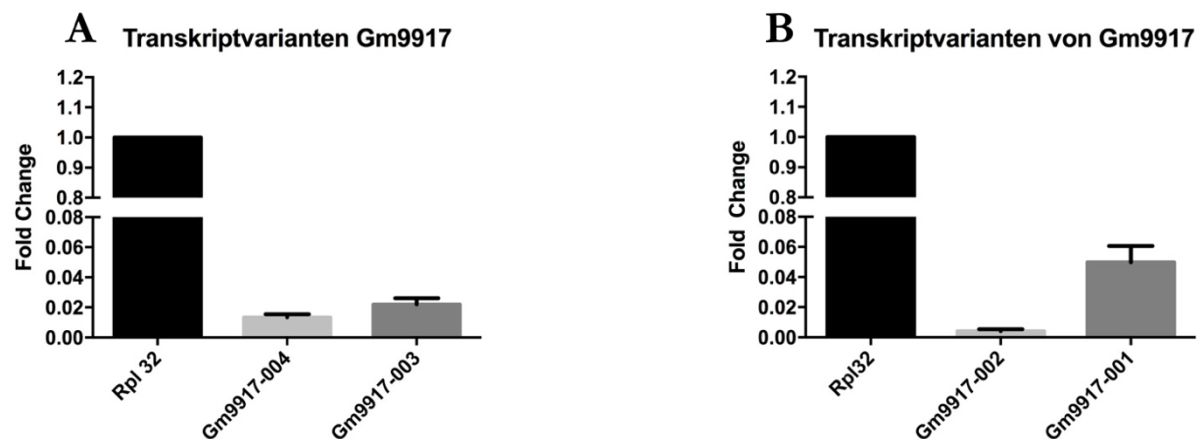


Abbildung 19: Quantitative Realtime-PCR von Gm9917 Transkriptvarianten
A: Gm0017-004, Gm9917-003, B: Gm0017-002, Gm9917-001
in der C57Bl/6-Mauslinie, Housekeeping Gen Rpl32.

3.5.2 Polyadenylierung der Long Noncoding RNA Gm9917

Im Rahmen der post-transkriptionellen Modifikation von RNAs spielen vor allem 5'-Capping und 3'-Polyadenylierung eine Rolle im Rahmen der Translation und zur Erhöhung der RNA-Stabilität. Mittels RNA-Polymerase II werden Adenin-Nukleotide an das 3'-Ende der Vorläufer RNA-Sequenz angehängt (Baralle & Giudice, 2017). Die Funktion des Poly-A-Schwanzes ist noch nicht vollständig erforscht, jedoch zeigt sich für die RNA eine Erhöhung der Stabilität sowie ein Schutz vor Abbau und eine verbesserte Translatierbarkeit (Proudfoot, 2011). LncRNA-Transkripte können sowohl polyadenyliert oder nicht-polyadenyliert in der Zelle vorliegen (Yang, Duff, Graveley, Carmichael, & Chen, 2011; Y. Zhang, Yang, & Chen, 2014).

Zur Evaluation der lncRNA Gm9917 wurde zunächst eine RNA-Isolation aus NMVCM-Zellen mit DNase-Verdau und cDNA-Synthese durchgeführt. Bei der cDNA-Synthese wurde jeweils ein Random-Hexamer-Primer und ein Oligo-Hexamer-Primer verwendet. Hiermit konnte sichergestellt werden, dass der Random-Hexamer-Primer willkürliche RNA-Sequenzen duplizieren würde, der Oligo-Hexamer-Primer jedoch nur eine potentielle 3'-Poly-A- Kopie herstellen konnte. Da das Referenzgen Rpl32 selbst polyadenyliert auftritt (Dabeva & Warner, 1987), konnte die Quantifizierung der so entstandenen cDNA nicht durch

eine Realtime-PCR gezeigt werden. Alternativ applizierten wir das PCR-Produkt der Random-Hexamer-Primer (RHP) und Oligo-Hexamer-Primer (OHP) auf ein Elektrophoresegel. Hier zeigten sich Produktbanden entsprechend der Transkriptlänge in der Größe von zirka 100 Basenpaaren. Die PCR-Produktbanden des Oligo-Hexamer-Primers zeigten sich für beide Sequenzen wesentlich stärker, als für das PCR-Produkt aus Random-Hexamer-Primern. Die lncRNA Gm9917 liegt sowohl polyadenyliert, als auch nicht-polyadenyliert vor (Abbildung 20).

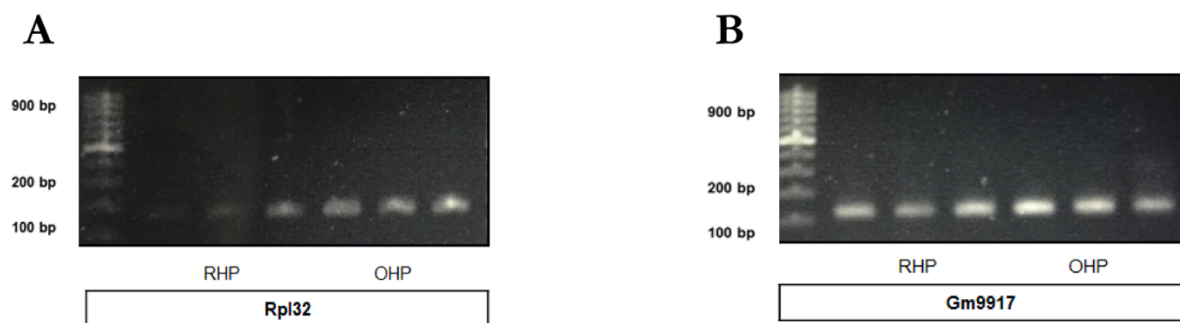


Abbildung 20 (A, B): Gelelektrophorese von Realtime PCR Produkten, A: Rpl32 -und B: Gm9917 und cDNA aus RHP und OHP.

3.5.3 Knockdown der Long Noncoding RNA Gm9917 in neonatalen Kardiomyozyten der Maus

Basierend auf der Etablierung des lncRNAs-Knockdowns in murinen Myoblasten (C2C12-Zellen) mittels GapmeRs erfolgte zur weiteren Untersuchung der Rolle der lncRNA Gm9917 der Knockdown in neonatalen Maus-Kardiomyozyten. Neonatalen Maus-Kardiomyozyten wurden mit GapmeR gegen Gm9917 vs. Kontroll-GapmeR transfiziert und die Zellen nach 48h geerntet (n=3). Das Ergebnis zeigte eine Reduktion der Expression von Gm9917 auf 0,54-fach ($\pm 0,21$, $p < 0,05$) als signifikanter Knockdown (Abbildung 21).

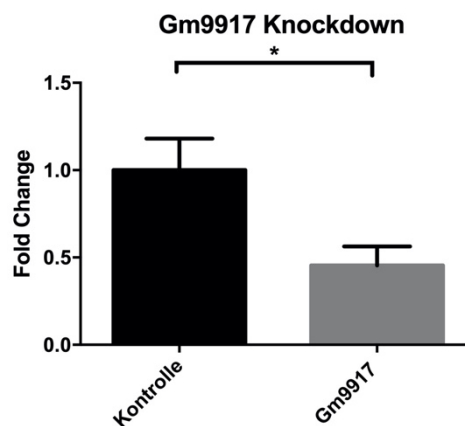


Abbildung 21: Quantitative Realtime-PCR eines LNA-GapmeRs Knockdowns mit Gm9917, in NMVCM-Zellen (n=3), Inkubationszeit von 48h, Housekeeping Gen Rpl32.

3.5.4 Die Hemmung der lncRNA Gm9917 induziert das hypertrophe Genprogramm in neonatalen Maus-Kardiomyozyten

Mittels quantitativer Realtime-PCR untersuchten wir in neonatalen Maus-Kardiomyozyten nach Knockdown der lncRNA Gm9917 die Expression des hypertrophen Genprogramms. NPPA war um das 2,0-fache ($\pm 1,05$, $p < 0,05$) und RCAN1-4 um das 0,21-fache ($\pm 0,27$, $p < 0,05$) signifikant exprimiert. Der Hypertrophiemarker NPPB war sogar um das 1,9-fache ($\pm 0,39$, $p < 0,001$) signifikant exprimiert. Dies belegt eine Induktion der kardialen Hypertrophie auf transkriptioneller Ebene durch Inaktivierung der lncRNA Gm9917 (Abbildung 22).

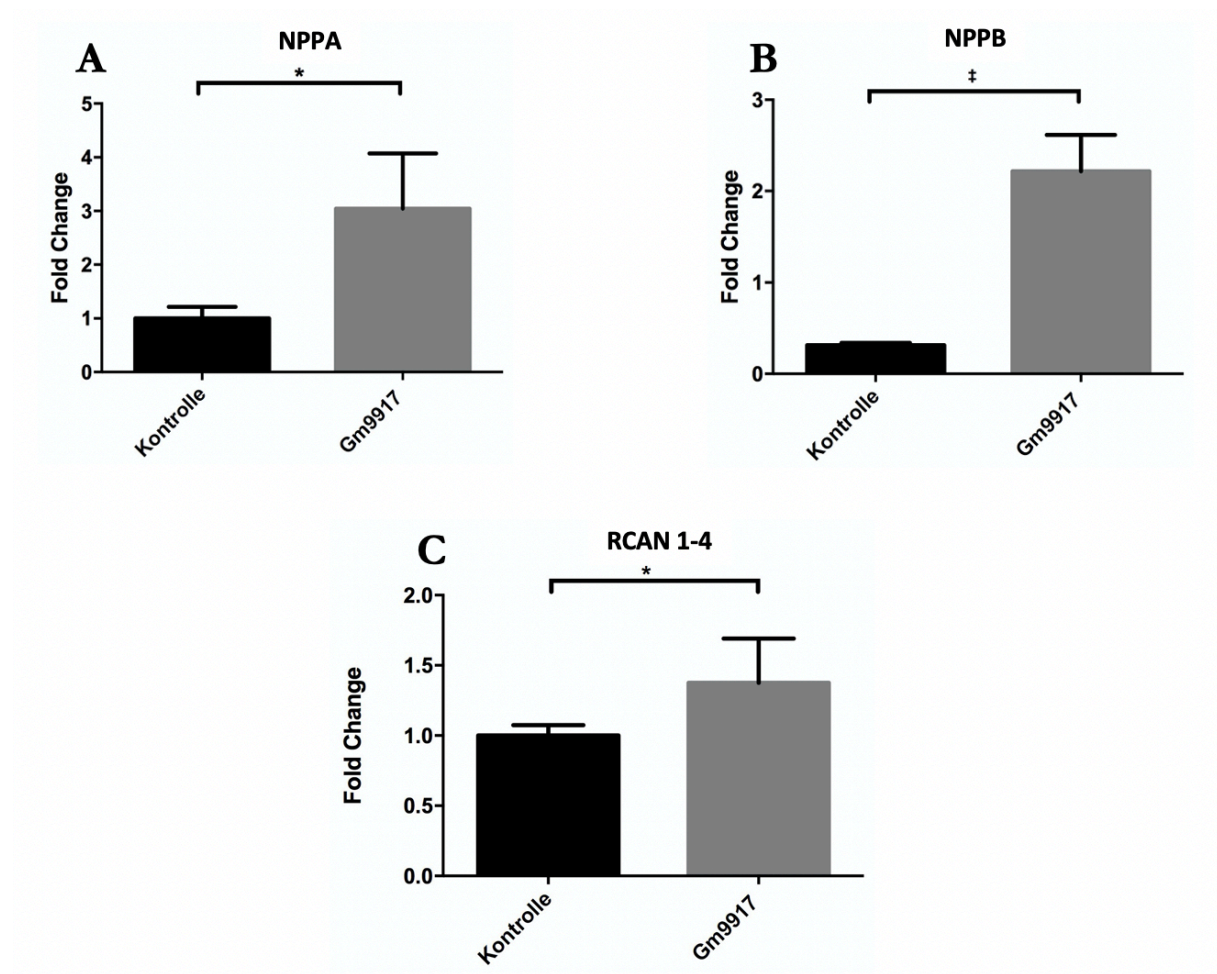


Abbildung 22 (A-C): Quantitative Realtime-PCR der Hypertrophiemarker, A: NPPA, B: NPPB, C: RCAN1-4 im Knockdown der lncRNA Gm9917 in NMVCM-Zellen, Housekeeping Gen Rpl32.

4 Diskussion

4.1 Kardiale Hypertrophie im Tiermodell

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war es, die Rolle von lncRNAs in der Regulation der kardialen Hypertrophie zu untersuchen. Studien mit Tiermodellen zur experimentellen Induktion kardialer Pathomechanismen, wie eines Myokardinfarktes, einer Herzinsuffizienz, einer Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) oder kardialen Hypertrophie sind fester Forschungsbestandteil seit den neunziger Jahren. Seitdem erfolgten viele Experimente abhängig von Tierspezies und Prozedur *in vivo* oder *in vitro*. Kleintiermodelle werden für Forschungsarbeiten bevorzugt, da sie kostengünstiger sind und hier bereits eine große Anzahl an wissenschaftlicher Literatur zur Verfügung steht (Cohen, Yang, Liu, Snell, & Downey, 1994). Im Folgenden wird kurz ein Überblick häufig verwendeter Tiermodelle verschiedener kardialer Pathomechanismen gegeben.

Eine Induktion eines Myokardinfarktes im *in vivo* Tiermodell erfolgt über die vollständige oder unvollständige Verengung der Koronararterie, sodass es zu einer Ischämie kommt. Hier stehen sowohl chirurgische, als auch medikamentöse Verfahren zur Verfügung (Ou et al., 2010). Die chirurgische Intervention erfolgt über eine Thorakotomie mit direkter Schädigung des Gefäßes oder des kardialen Gewebes durch eine Ligation, Hitze-/Kälte-Ablation oder eine Ballon-Okklusion. (Johns & Olson, 1954; Ou et al., 2010; van den Bos, Mees, de Waard, de Crom, & Duncker, 2005).

Ein pharmakologisch induzierter Myokardinfarkt kann durch die tägliche Überstimulation von Isoproterenol (β -adrenerger Agonist), Adriamycin (Zytostatikum) und Ergonovin (Alkaloid des Mutterkornpilzes) erfolgen. Die Behandlung mit diesen Agenzien führt durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch des Myokards zu einem Spasmus der Koronararterien, sodass ein Herzinfarkt entsteht (Arnolda, McGrath, Cocks, Sumithran, & Johnston, 1985; Arteaga de Murphy et al., 2002; Chagoya de Sanchez et al., 1997; Ou et al., 2010; Singal, Kapur, Dhillon, Beamish, & Dhalla, 1982). Abhängig von der Dosis, Art und Dauer der Verabreichung von β -adrenergen Agonisten, sowie Geschlecht und Alter des Lebewesens, können sich unterschiedliche kardiale Phänotypen ausbilden: Mögliche Ausprägungen sind ebenso eine kardiale Hypertrophie und eine darauf folgende Herzinsuffizienz (Nieto-Lima, Cano-Martinez, Rubio-Ruiz, Perez-Torres, & Guarner-Lans, 2018; G. X. Zhang et al., 2007), (Nieto-Lima et al., 2018; Ou et al., 2010).

Ähnliche praktische Methoden der *in vivo* Myokardinfarkt-Tiermodelle kommen auch in den Herzinsuffizienz-Tiermodellen zur Verwendung. Durch die Anwendung von multiplen

Koronarligaturen, hydraulischen Koronar-Occludern und intrakoronarer Mikrokugel-Embolisation wird eine Ischämie mit darauffolgender Herzinsuffizienz simuliert. Solche Tiermodelle ahmen die klinische Situation einer Herzinsuffizienz oder eines akuten Koronarsyndroms nach, jedoch besteht auch hier wieder die Schwierigkeit, die Lage und Länge des Verschlusses genau zu kontrollieren (Ou et al., 2010).

Im Rahmen einer Dilatativen Kardiomyopathie kommt es zur Dilatation des linken Ventrikels, einer systolischen Dysfunktion mit reduzierter Ejektions-Fraktion, sowie Anomalien der diastolischen Füllung mit normaler bzw. reduzierter Wanddicke im Rahmen einer exzentrischen Hypertrophie (Beltrami et al., 1994; Beltrami et al., 1995). Trotz variabler primärer und sekundärer Ätiologien einer Dilatativen Kardiomyopathie, zeigen sich Ähnlichkeiten in den strukturellen, funktionellen, biochemischen und molekularen Phänotypen in Bezug auf die langfristige kardiotoxische Wirkung bei erhöhter mechanischer Belastung und neurohormoneller Aktivierung (Hunt et al., 2009; Jessup & Brozena, 2003; Mann & Bristow, 2005; Maron et al., 2006; Prabhu, 2005). Es existieren hier bereits Antikörper-Immunisierungsmodelle und Coxsackie-Virusinfektionsmodelle, jedoch zeigt sich die Anwendbarkeit im klinischen Alltag sehr begrenzt (Kawai, 1999; Magnusson et al., 1989). Das Auftreten einer durch Genmutation induzierten Dilatativen Kardiomyopathie liegt bei 20 Prozent des Patientenkollektivs (Ou et al., 2010). Vor allem der Calcineurin-Signalweg an der Z-Scheibe spielt hier eine zentrale Rolle. Das Bindeprotein Calsarcin-1 ist die einzige Isoform im erwachsenen Herzen, das Calcineurin an Actinin an der Z-Scheibe bindet und eine pathologische kardiale Hypertrophie durch Calcineurin hemmt. Calsarcin-1-Knockout Mäuse bilden deshalb im reinen C57Bl/6-Hintergrund phänotypisch eine Dilatative Kardiomyopathie aus, ohne dass sich eine Hypertrophie oder Fibrose manifestiert (D. Frank & Frey, 2011; Frey, Barrientos, et al., 2004; Frey & Olson, 2002; Frey, Richardson, & Olson, 2000). Die Mauslinie gilt als besonders sensitiv für kardiovaskuläre Veränderungen (Garcia-Menendez, Karamanlidis, Kolwicz, & Tian, 2013).

In-vivo Mausmodelle der Herzhypertrophie können durch eine chirurgische Intervention oder auf durch genetischer Modifikation zentraler Signaltransduktionskaskaden induziert werden. Das bekannteste chirurgische in vivo-Modell zur Induktion von Hypertrophie beruht auf chronischer Drucküberlastung mit Entstehung einer erhöhten Nachlast (Transverse Aortenkonstriktion, TAC). Neurohumorale Faktoren induzieren eine linksventrikuläre Myokardhypertrophie durch eine Konstriktion der Aorta ascendens. Durch Transverse Aortic Constriction (TAC)-Tiermodelle wird die humane Situation einer Aortenstenose imitiert (H. L. Li et al., 2007; Toischer et al., 2010).

Die hierdurch generierten Stadien der kardialen Hypertrophie, vor allem auch subklinische Zustände, in denen die Herzfunktion noch erhalten ist, können auf molekularer Ebene untersucht werden (Rudebusch et al., 2017). Abhängig von der Positionierung des Aortenbandes, Dauer und Schwere der Konstriktion weichen jedoch die funktionellen Ergebnisse einer Herzhypertrophie ab. Eine langsam fortschreitende Nachlasterhöhung, wie beim Menschen, kann hier nicht simuliert werden (Frey & Olson, 2003; Houser et al., 2012).

Wie bereits in dieser Arbeit dargestellt, spielt der Calcineurin-NFAT-Signalweg eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie. Da sich dieser Signalweg mit anderen Signalwegen wie der Proteinkinase C, der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der AKT-Induktion überschneidet, besteht mit dem Calcineurin-Knockout Mausmodell ein besonders großes Interesse die molekularen Zusammenhänge in Bezug auf eine kardiale Hypertrophie zu ergründen (Molkentin, 2004).

Zusammenfassend kann mit dem Einsatz von Kleintiermodellen in der präklinischen Forschung eine große Menge an Informationen über das Fortschreiten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und zur Unterstützung der Entwicklung effektiver Behandlungsmöglichkeiten generiert werden (Ou et al., 2010).

4.1.1 Das Calcineurin-transgene Mausmodell entwickelt eine kardiale Hypertrophie

Die konstitutive Überexpression von aktiviertem Calcineurin A in neugeborenen und adulten Mäusen bewirkt eine Herzhypertrophie mit schwerer Fibrose und Aktivierung des molekularen hypertrophen Genprogramms (Molkentin et al., 1998).

Mit Hilfe von echokardiographischer, morphometrischer Analysen und Hypertrophie-assoziierten Markern konnte zur initialen Charakterisierung unserer Tiere die Herzhypertrophie vor RNA-Sequenzierung der Herzen bestätigt werden.

Die transthorakale M-Mode-Echokardiographie ermöglicht einen nicht-invasiven Ansatz zur Identifizierung des morphologischen und funktionellen Phänotyps einer Linksherzhypertrophie (Devereux & Reichek, 1977; Tanaka et al., 1996). Die Diameter Calcineurin-transgener Mäuse zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht und bestätigten eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie.

Auch der Quotient aus Herzgewicht/Körpergewicht soll auf makroskopischer Ebene einen Rückschluss auf die kardiale Hypertrophie der Calcineurin-transgenen Tiere zulassen. Der Quotient aus Herzgewicht/Tibia-Länge repräsentiert, anders als das Körpergewicht, einen unabhängigen Parameter zur Mausgröße, da anzunehmen ist, dass das Körpergewicht vom Alter weiblicher und männlicher Mäuse variiert. Tiemann et al. beschrieben, dass der Quotient Herzgewicht/Tibia-Länge ab einem Alter von 50 Tagen keinen geschlechtsspezifischen

Veränderungen mehr unterliegt (Tiemann et al., 2003). Er gilt als ein in der Literatur beschriebener Parameter, der mit dem Herzgewicht verglichen, eine Hypertrophie des linken Ventrikels im Tiermodell bestimmt (Yin, Spurgeon, Rakusan, Weisfeldt, & Lakatta, 1982). In den eigenen Messungen setzte sich das Herzgewicht der Calcineurin-Transgen-Mäuse signifikant von der Kontrollgruppe ab, sodass phänotypisch eine Herzhypertrophie bestätigt werden konnte.

Zur Quantifizierung der kardialen Hypertrophie im Calcineurin-Knockout-Mausmodell, wurde die Analyse des hypertrophen Genprogrammes ((Dorn, Robbins, & Sugden, 2003), (Molkentin et al., 1998; Sadoshima & Izumo, 1993)) mit Hilfe des Multiplex-qRT-PCR-Verfahrens durchgeführt. In diesem Verfahren können drei Hypertrophie-assoziierte Gene gleichzeitig gemessen werden. Zu diesen zählen das Natriuretische Peptid Typ A (NPPA), Typ B (NPPB) und das Calcineurin-abhängige RCAN1-4 (RCAN1-4). (Crabtree, 1999; Leenders et al., 2011). In unseren Transgen-Tieren zeigte sich, im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren, eine hochsignifikante kardiale Hypertrophie, die durch die Expression des Natriuretischen Peptids Typ B (NPPB) und des Calcineurin-abhängigen RCAN1-4 (RCAN1-4) bestätigt werden konnte.

4.2 Identifizierung differentiell regulierter lncRNAs in kardialer Hypertrophie

RNA-Sequenzierungen, Microarrays und Mausmodelluntersuchungen haben lncRNAs als potente epigenetische Regulatoren der kardialen Genexpression und der Chromatinmodifikation erkennen lassen (S. Frank et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass tausende lncRNAs während der Entwicklung und Störung des Herzens exprimiert sind (Ounzain, Micheletti, Beckmann, et al., 2015; Ounzain et al., 2014).

Viele Veröffentlichungen zu lncRNA-induzierter Hypertrophie beruhen auf vorheriger Priorisierung von RNA-Sequenzierungsdaten und Microarrays (Lee et al., 2011; Matkovich, Edwards, Grossenheider, de Guzman Strong, & Dorn, 2014). Mit Hilfe von RNA-Sequenzierung der Sequenzierungsplattform des Instituts für Klinische Molekularbiologie zeigte sich nach Untersuchung unterschiedlicher Zellpopulationen eine besonders hohe Expression der lncRNAs im murinen Transkriptom von Calcineurin-transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Nach anschließender Priorisierung durch den Einsatz bioinformatischer Methoden wurden eine Reihe vielversprechender lncRNA-Sequenzen identifiziert.

Zur Validierung dieser lncRNAs erfolgte die Analyse der differentiellen Expression mittels quantitativer Realtime-PCR, hierbei konnten einige neue kardiale lncRNAs im Calcineurin-transgenen Mausmodell identifiziert werden. Von zehn priorisierten lncRNAs zeigten sich fünf differentiell reguliert. Die lncRNA-Sequenzen Rmst und Gm5532 konnten sich signifikant

herunterreguliert in Calcineurin-Transgen-Tieren, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigen. Signifikant hochreguliert präsentierten sich dagegen die lncRNA-Sequenzen Gm20619, Gm12295 und Gm9917 in Calcineurin-transgenen Mäusen. Ebenso wurden schon in der Literatur beschriebene lncRNA-Transkripte, die während der Entwicklung und Störung des Herzens exprimiert sind, untersucht. Bvht wurde von Klattenhoff et al. als eine lncRNA beschrieben, die als Hauptregulator zur Differenzierung von Herzzellen eine Rolle spielt und in frühen Entwicklungsstadien bei embryologischen Mausstammzellen und des adulten Herzens vorkommt (Klattenhoff et al., 2013). Die lncRNA NRON ist als potentieller Biomarker für Herzversagen beschrieben (Xuan et al., 2017). Eine Überexpression hemmt die Proliferation von Endothelzellen durch NFAT-Expression und es kommt zu einer verminderten Migration und Angiogenese (Kumar & Goyal, 2017). Die lncRNA MALAT1 ist in Säugetieren evolutionär konserviert und zeigt eine wichtige Rolle für das Überleben, die Migration und Angiogenese der vaskulären Endothelzelle (K. C. Wang & Chang, 2011). Die lncRNA-Sequenzen Bvht, NRON und MALAT1 zeigten im Calcineurin-transgenen Mausmodell eine Expression, die jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nicht differentiell reguliert ist. Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses kann das hohe Alter der in vitro-untersuchten Tiere und die spezifische Hypertrophieinduktion durch Calcineurin sein. Braveheart ist vor allem in der Herzentwicklung beschrieben, NRON und MALAT1 bei vaskulären Adaptionsmechanismen, die in diesem Mausmodell eventuell eine geringere Relevanz auf Grund der Calcineurin-bedingten Hypertrophie haben.

4.3 Charakterisierung spezifischer Long Noncoding RNAs

Um die Funktion bestimmter langer nicht-kodierender RNAs zu untersuchen, kann eine Hoch- oder Herunterregulation weitere Informationen bereitstellen. Beispiele in der Literatur sind bereits durch lncRNAs MALAT1, NRON, APF, CARL, H19 oder ROR beschrieben worden (Jiang et al., 2016; Kumar & Goyal, 2017; J. Y. Liu et al., 2014; K. Wang et al., 2015; K. Wang, Liu, et al., 2014). Viele lncRNAs zeigen durch hohe Expressionslevel, permanente oder temporäre Lokalisation im Zellkern und der Initialisierung von Transkriptionen, einen schwierigen Angriffspunkt, um eine experimentelle Herunterregulation spezifischer lncRNA-Sequenzen zu generieren (Gagnon, Li, Chu, Janowski, & Corey, 2014). LNA GapmeRs haben hierbei eine hohe Wirkung auf nukleäre und neu generierte lncRNA-Transkript-Produkte (Goyal et al., 2017; Luo et al., 2016; Vickers et al., 2003). LNA GapmeRs bestehen aus 5 bis 8 synthetisch modifizierten RNA-Nukleotiden, die durch die Aktivierung von Ribonuklease H die Fähigkeit besitzen, bestimmte Abschnitte eines mRNA- oder lncRNA-Abschnittes zu spalten (Monia et al., 1993). An ihren Enden besitzen sie

modifizierte RNA-Nukleotide, die eine höhere Resistenz zu thermodynamischen Instabilitäten und zellulären Nukleasen aufweisen. Methylenbrückenfragmente der LNA GapmeRs verbessern die chemische und thermische Stabilität der Bindung spezifischer mRNA- oder lncRNA- Fragmente (Kurreck, Wyszko, Gillen, & Erdmann, 2002; Magner, Biala, Lisowiec-Wachnicka, Kierzek, & Kierzek, 2015). Matkovich et al. und Michalik et al. zeigten mit Hilfe von LNA GapmeRs gute Knockdown-Ergebnisse spezifischer lncRNA-Sequenzen in C2C12- und HUVEC-(human endothelial cells) Zellen (Matkovich et al., 2014; Michalik et al., 2014).

So wurde auch in dieser Arbeit ein Knockdown mittels LNA GapmeRs generiert. Um eventuelle zeitliche Variablen zu erkennen und für zukünftige Versuche zu verbessern, wurde in dieser Arbeit ein Knockdown der in vielen Spezies sehr gut konservierten lncRNA MALAT1 in verschiedenen zeitlichen Abständen generiert (Lennox & Behlke, 2016). Es zeigte sich zu allen vier Zeitpunkten eine hochsignifikante Inhibierung der lncRNA MALAT1 mit beiden Transkriptvarianten, sodass es für weitere Knockdown-Versuche keine Einschränkungen in der Zeit der Ernte der Zellen oder Wahl der Transkriptvarianten gab.

4.3.1 Gm9917 als neues Modulator der kardialen Hypertrophie

Im Rahmen der fünf differentiell regulierten lncRNAs zeigte die Antisense-lncRNA Gm9917 ein starkes Überexpressionsmuster in Calcineurin-transgenen Mäusen. Mit einer Transkriptlänge von 5192 Basenpaaren und zwei nicht-proteinkodierenden Exonen liegt die lncRNA mit vier verschiedenen Transkriptvarianten auf dem Chromosom 9. Auf Grund der benachbarten Proteinkodierenden Sequenzen *Rassf1* und *Tusc2* sahen wir die lncRNA als vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen. Expressionsanalysen in der C57Bl/6-Mauslinie zeigten die Variante Gm9917-001 als am stärksten exprimiert.

Eine Identifizierung der Polyadenylierung von fragmentierten RNA-Segmenten wurde durch eine Analyse der Realtime-PCR-Produkte, mittels Oligo-Hexamer-Primern bei Yang et al. beschrieben (Yang et al., 2011). In dieser Arbeit untersuchte man die Größe der PCR-Produkte zwischen Oligo-Hexamer-Primern und Random-Hexamer-Primern mittels Gelelektrophorese. Das Ergebnis zeigte eine Polyadenylierung der lncRNA Gm9917.

Nach Hemmung der Expression der lncRNA Gm9917 in NMVCM zeigte sich das fetale Genprogramm NPPA, NPPB und RCAN1-4 signifikant induziert, dies spricht für eine Rolle der lncRNA Gm9917 in der Modulation der kardialen Hypertrophie auf transkriptioneller Ebene.

4.4 Schlussfolgerung

In einem in vivo- und in vitro-bestätigten Calcineurin-vermittelten Hypertrophie Mausmodells konnten fünf differentiell regulierte lncRNAs identifiziert werden. Eine dieser lncRNAs zeigte sich als die Antisense-lokalisierte Gm9917 lncRNA, die nukleär exprimiert wird und bei Transkription einen Poly-A-Schwanz aufweist. Ein Knockdown dieser bewirkte eine Induktion der kardialen Hypertrophiemarker in neonatalen Maus-Kardiomyozyten. Diese Daten belegen einen Einfluss von lncRNAs auf zelluläre Veränderungen in der kardialen Hypertrophie der Maus und werden weiterer Forschungsschwerpunkt neuer in vivo Versuche der Arbeitsgruppe sein, um in Zukunft mehr Einblick in die molekularen Mechanismen der Herzhypertrophie zu bekommen und einen Schritt näher auf eventuelle lncRNA-gerichtete Therapien für Herzinsuffizienz im Menschen gehen zu können.

5 Zusammenfassung

Ein zentraler Anpassungsmechanismus des Herzens auf hämodynamische Belastung ist die kardiale Hypertrophie. Sie beschreibt einen eigenständigen Risikofaktor zur Entstehung von Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz und des plötzlichen Herztodes (Kannel et al., 1969; Levy et al., 1990).

Zahlreiche klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass molekulare Mechanismen der lncRNA eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion der Herzhypertrophie spielen. Die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin nimmt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie ein. Am Modell Calcineurin A-transgener Mäuse mit dem Phänotyp einer ausgeprägten kardialen Hypertrophie und sekundärem Remodellings, mit beginnender, reduzierter Funktion des linken Ventrikels wurde systematisch mittels RNA-Sequenzierung die genomweite Transkription untersucht und neue, differentiell regulierte long noncoding RNA charakterisiert.

Mittels quantitativer Realtime-PCR aus Myokard der Calcineurin-Transgen-Tiere, wurde die differentielle Expression der lncRNAs Rmst, Gm5532, Gm20619, Gm12295 und Gm9917 bestätigt.

Zur Hemmung der Expression von lncRNAs in vitro erfolgte die Transfektion von modifizierten Antisense-Oligonukleotiden (GapmeRs), zunächst in C2C12-Zellen, zum Knockdown der ubiquitär exprimierten lncRNA MALAT1. In einem weiteren Schritt erfolgte der Knockdown der lncRNA Gm9917 in neonatalen Kardiomyozyten der Maus. Hierbei zeigte sich eine systematische Induktion des hypertrophen Genprogramms.

Zusammenfassend konnte die systematische Analyse der Transkription neue long noncoding RNAs in einem etablierten Modell der kardialen Hypertrophie identifizieren. Für die lncRNA Gm9917 konnten erste Ergebnisse in vitro generiert werden, die einen Einfluss auf die Modulation der kardialen Hypertrophie belegen. Künftige Experimente müssen diese Zusammenhänge in vivo überprüfen.

6 Veröffentlichungen

Zitierbare Abstracts

Kühl C, **Schepers S**, Dierck F, Eden M, Kuhn C, Barann M, Rosenstiel P, Frey N: „Eine neue antisense long Noncoding RNA (“Lnc_CnA_5”) moduliert die Expression des hypertrophischen Genprogramms in Kardiomyozyten“. 82nd Spring Meeting of the German Cardiac Society, April 2016, Mannheim, Germany. Clin Res Cardiol 105, Suppl 1, March 2016, P1676 - Eine neue antisense long noncoding RNA (“Lnc_CnA_5”) moduliert die Expression des hypertrophischen Genprogramms in Kardiomyozyten.

Kühl C, **Schepers S**, Eden M, Kuhn C, Barann M, Rosenstiel P, Backs J, Frey N: „Long Noncoding RNAs in Calcineurin-mediated cardiac hypertrophy “. 81th Spring Meeting of the German Cardiac Society, April 2015, Mannheim, Germany. Clin Res Cardiol 104, Suppl. 1, April 2015, V134 - Long Noncoding RNAs in Calcineurin-mediated cardiac hypertrophy.

Weitere Poster- und Vortrags-Abstracts

Kühl C, **Schepers S**, Kuhn C, Eden M, Barann M, Rosenstiel P, Frey N: “Cardiac Hypertrophy Associated Regulation of Long Noncoding RNAs in Calcineurin-Transgenic Mice.” Poster presented at Keystone Symposia Conference: “Long Noncoding RNAs: From Evolution to Function”, March 2015, Keystone, Colorado, USA.

Kühl C, **Schepers S**, Dierck F, Eden M, Kuhn C, Barann M, Rosenstiel P, Frey N: “Long Noncoding RNAs in Calcineurin-mediated Cardiac Hypertrophy”. DZHK Symposium “The Noncoding Genome in Cardiovascular Diseases”, October 2015, Berlin, Germany.

Kühl C, **Schepers S**, Dierck F, Eden M, Kuhn C, Barann M, Rosenstiel P, Frey N: “Antisense long Noncoding RNA Gm9917 is a modulator of hypertrophic gene expression in mouse cardiac myocytes”. Poster presented at Keystone Symposia Conference: ”Heart Failure: Genetics, Genomics and Epigenetics”, April 2016, Snowbird, Utah, USA.

7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Ghani, M., Suen, C., Jiang, B., Deng, Y., Weldrick, J. J., Putinski, C., . . . Megeney, L. A. (2017). Cardiotrophin 1 stimulates beneficial myogenic and vascular remodeling of the heart. *Cell Res*, 27(10), 1195-1215. doi:10.1038/cr.2017.87
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, 7(4), 261-269.
- Antos, C. L., Frey, N., Marx, S. O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J. A., . . . Olson, E. N. (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res*, 89(11), 997-1004.
- Archer, H. L., Gupta, S., Enoch, S., Thompson, P., Rowbottom, A., Chua, I., . . . Pilz, D. T. (2005). Distinct phenotype associated with a cryptic subtelomeric deletion of 19p13.3-pter. *Am J Med Genet A*, 136(1), 38-44. doi:10.1002/ajmg.a.30774
- Arnolda, L., McGrath, B., Cocks, M., Sumithran, E., & Johnston, C. (1985). Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit: an animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms. *Cardiovasc Res*, 19(6), 378-382. doi:10.1093/cvr/19.6.378
- Arteaga de Murphy, C., Ferro-Flores, G., Villanueva-Sanchez, O., Murphy-Stack, E., Pedraza-Lopez, M., Melendez-Alafort, L., & Molina-Trinidad, E. (2002). 99mTc-glucarate for detection of isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Int J Pharm*, 233(1-2), 29-34. doi:10.1016/s0378-5173(01)00922-x
- Bacher, N., Zisman, Y., Berent, E., & Livneh, E. (1991). Isolation and characterization of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin, and heart. *Mol Cell Biol*, 11(1), 126-133. doi:10.1128/mcb.11.1.126
- Backs, J., & Olson, E. N. (2006). Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ Res*, 98(1), 15-24. doi:10.1161/01.RES.0000197782.21444.8f
- Banerjee, A., Banks, A. S., Nawijn, M. C., Chen, X. P., & Rothman, P. B. (2002). Cutting edge: Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits activation of NFATp. *J Immunol*, 168(9), 4277-4281.
- Baralle, F. E., & Giudice, J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(7), 437-451. doi:10.1038/nrm.2017.27
- Barford, D., Das, A. K., & Egloff, M. P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27, 133-164. doi:10.1146/annurev.biophys.27.1.133
- Beltrami, C. A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G. A., Puricelli, C., Cigola, E., . . . Anversa, P. (1994). Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation*, 89(1), 151-163. doi:10.1161/01.cir.89.1.151
- Beltrami, C. A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G. A., Puricelli, C., Cigola, E., . . . Anversa, P. (1995). The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol*, 27(1), 291-305. doi:10.1016/s0022-2828(08)80028-4
- Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A., & Hill, J. A. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(1), H8-H16. doi:10.1152/ajpheart.01303.2004
- Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L., & McMullen, J. R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*, 128(1), 191-227. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.04.005
- Bisognano, J. D., Weinberger, H. D., Bohlmeier, T. J., Pende, A., Raynolds, M. V., Sastravaha, A., . . . Port, D. J. (2000). Myocardial-directed overexpression of the

-
- human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*, 32(5), 817-830. doi:10.1006/jmcc.2000.1123
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., . . . Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3(11), 1014-1019. doi:10.1038/ncb1101-1014
- Bogoyevitch, M. A., Gillespie-Brown, J., Ketterman, A. J., Fuller, S. J., Ben-Levy, R., Ashworth, A., . . . Sugden, P. H. (1996). Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res*, 79(2), 162-173.
- Bohm, M., Gierschik, P., Knorr, A., Schmidt, U., Weismann, K., & Erdmann, E. (1993). Cardiac adenylyl cyclase, beta-adrenergic receptors, and G proteins in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 22(5), 715-727.
- Bowling, N., Walsh, R. A., Song, G., Estridge, T., Sandusky, G. E., Fouts, R. L., . . . Vlahos, C. J. (1999). Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation*, 99(3), 384-391. doi:10.1161/01.cir.99.3.384
- Bowman, J. C., Steinberg, S. F., Jiang, T., Geenen, D. L., Fishman, G. I., & Buttrick, P. M. (1997). Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest*, 100(9), 2189-2195. doi:10.1172/JCI119755
- Braz, J. C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., . . . Molkentin, J. D. (2004). PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med*, 10(3), 248-254. doi:10.1038/nm1000
- Bueno, O. F., De Windt, L. J., Lim, H. W., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., & Molkentin, J. D. (2001). The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ Res*, 88(1), 88-96.
- Bueno, O. F., De Windt, L. J., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., Klevitsky, R., . . . Molkentin, J. D. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*, 19(23), 6341-6350. doi:10.1093/emboj/19.23.6341
- Bueno, O. F., van Rooij, E., Molkentin, J. D., Doevendans, P. A., & De Windt, L. J. (2002). Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res*, 53(4), 806-821.
- Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Tymitz, K. M., Glascock, B. J., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., & Molkentin, J. D. (2002). Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(7), 4586-4591. doi:10.1073/pnas.072647999
- Burkard, N., Becher, J., Heindl, C., Neyses, L., Schuh, K., & Ritter, O. (2005). Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation*, 111(8), 1045-1053. doi:10.1161/01.CIR.0000156458.80515.F7
- Bursi, F., Weston, S. A., Redfield, M. M., Jacobsen, S. J., Pakhomov, S., Nkomo, V. T., . . . Roger, V. L. (2006). Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA*, 296(18), 2209-2216. doi:10.1001/jama.296.18.2209
- Cabili, M. N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., & Rinn, J. L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev*, 25(18), 1915-1927. doi:10.1101/gad.17446611
- Cannavo, A., Liccardo, D., & Koch, W. J. (2013). Targeting cardiac beta-adrenergic signaling via GRK2 inhibition for heart failure therapy. *Front Physiol*, 4, 264. doi:10.3389/fphys.2013.00264

-
- Cao, D., Wang, Z., Zhang, C. L., Oh, J., Xing, W., Li, S., . . . Olson, E. N. (2005). Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Mol Cell Biol*, 25(1), 364-376. doi:10.1128/MCB.25.1.364-376.2005
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83. doi:10.1128/MMBR.00031-10
- Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Lopez-Barrera, F., Yanez, L., Vidrio, S., Suarez, J., . . . Cruz, D. (1997). Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Can J Physiol Pharmacol*, 75(12), 1300-1311.
- Chang, S., McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Richardson, J. A., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2004). Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol Cell Biol*, 24(19), 8467-8476. doi:10.1128/MCB.24.19.8467-8476.2004
- Chen, Y., Du, J., Zhao, Y. T., Zhang, L., Lv, G., Zhuang, S., . . . Zhao, T. C. (2015). Histone deacetylase (HDAC) inhibition improves myocardial function and prevents cardiac remodeling in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*, 14, 99. doi:10.1186/s12933-015-0262-8
- Choukroun, G., Hajjar, R., Fry, S., del Monte, F., Haq, S., Guerrero, J. L., . . . Force, T. (1999). Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH(2)-terminal kinases. *J Clin Invest*, 104(4), 391-398. doi:10.1172/JCI6350
- Choukroun, G., Hajjar, R., Kyriakis, J. M., Bonventre, J. V., Rosenzweig, A., & Force, T. (1998). Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*, 102(7), 1311-1320. doi:10.1172/JCI3512
- Churchill, E. N., & Mochly-Rosen, D. (2007). The roles of PKCdelta and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5), 1040-1042. doi:10.1042/BST0351040
- Clapham, D. E., & Neer, E. J. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37, 167-203. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.167
- Clemson, C. M., Hutchinson, J. N., Sara, S. A., Ensminger, A. W., Fox, A. H., Chess, A., & Lawrence, J. B. (2009). An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell*, 33(6), 717-726. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.026
- Clerk, A., & Sugden, P. H. (2004). Signaling through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade in cardiac myocytes. *Biochem Cell Biol*, 82(6), 603-609. doi:10.1139/o04-110
- Cohen, M. V., Yang, X. M., Liu, Y., Snell, K. S., & Downey, J. M. (1994). A new animal model of controlled coronary artery occlusion in conscious rabbits. *Cardiovasc Res*, 28(1), 61-65. doi:10.1093/cvr/28.1.61
- Colyer, J. (1998). Phosphorylation states of phospholamban. *Ann N Y Acad Sci*, 853, 79-91. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08258.x
- Crabtree, G. R. (1999). Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell*, 96(5), 611-614.
- D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B., & Dorn, G. W., 2nd. (1997). Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(15), 8121-8126.
- Dabeva, M. D., & Warner, J. R. (1987). The yeast ribosomal protein L32 and its gene. *J Biol Chem*, 262(33), 16055-16059.
- Dai, Y. S., & Markham, B. E. (2001). p300 Functions as a coactivator of transcription factor GATA-4. *J Biol Chem*, 276(40), 37178-37185. doi:10.1074/jbc.M103731200

-
- Dai, Y. S., Xu, J., & Molkentin, J. D. (2005). The DnaJ-related factor Mrj interacts with nuclear factor of activated T cells c3 and mediates transcriptional repression through class II histone deacetylase recruitment. *Mol Cell Biol*, 25(22), 9936-9948. doi:10.1128/MCB.25.22.9936-9948.2005
- David, M., Macias, A., Moreno, C., Prieto, A., Martinez-Marmol, R., Vicente, R., . . . Valenzuela, C. (2012). Protein kinase C (PKC) activity regulates functional effects of Kvbeta1.3 subunit on KV1.5 channels: identification of a cardiac Kv1.5 channelosome. *J Biol Chem*, 287(25), 21416-21428. doi:10.1074/jbc.M111.328278
- Davis, F. J., Gupta, M., Camoretti-Mercado, B., Schwartz, R. J., & Gupta, M. P. (2003). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy. *J Biol Chem*, 278(22), 20047-20058. doi:10.1074/jbc.M209998200
- de Simone, G., Gottdiener, J. S., Chinali, M., & Maurer, M. S. (2008). Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J*, 29(6), 741-747. doi:10.1093/eurheartj/ehm605
- Dean, J. L., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal*, 16(10), 1113-1121. doi:10.1016/j.cellsig.2004.04.006
- Derrien, T., Guigo, R., & Johnson, R. (2011). The Long Non-Coding RNAs: A New (P)layer in the "Dark Matter". *Front Genet*, 2, 107. doi:10.3389/fgene.2011.00107
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., . . . Guigo, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22(9), 1775-1789. doi:10.1101/gr.132159.111
- Deuve, J. L., Bonnet-Garnier, A., Beaujean, N., Avner, P., & Morey, C. (2015). Antagonist Xist and Tsix co-transcription during mouse oogenesis and maternal Xist expression during pre-implantation development calls into question the nature of the maternal imprint on the X chromosome. *Epigenetics*, 10(10), 931-942. doi:10.1080/15592294.2015.1081327
- Devereux, R. B., & Reichek, N. (1977). Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation*, 55(4), 613-618.
- Dewenter, M., von der Lieth, A., Katus, H. A., & Backs, J. (2017). Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circ Res*, 121(8), 1000-1020. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310355
- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., . . . Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101-108. doi:10.1038/nature11233
- Dorn, G. W., 2nd, Robbins, J., & Sugden, P. H. (2003). Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*, 92(11), 1171-1175. doi:10.1161/01.RES.0000077012.11088.BC
- Dorn, G. W., 2nd, Tepe, N. M., Lorenz, J. N., Koch, W. J., & Liggett, S. B. (1999). Low- and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6400-6405.
- Dzau, V. J., Colucci, W. S., Hollenberg, N. K., & Williams, G. H. (1981). Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation*, 63(3), 645-651.

-
- Eisenhofer, G., Friberg, P., Rundqvist, B., Quyyumi, A. A., Lambert, G., Kaye, D. M., . . . Esler, M. D. (1996). Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation*, 93(9), 1667-1676.
- Engelhardt, S., Hein, L., Keller, U., Klambt, K., & Lohse, M. J. (2002). Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res*, 90(7), 814-819.
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., . . . Jacinto, E. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J*, 27(14), 1932-1943. doi:10.1038/emboj.2008.120
- Fackelmayer, F. O., Dahm, K., Renz, A., Ramsperger, U., & Richter, A. (1994). Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur J Biochem*, 221(2), 749-757.
- Fanger, G. R., Johnson, N. L., & Johnson, G. L. (1997). MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J*, 16(16), 4961-4972. doi:10.1093/emboj/16.16.4961
- Farese, R. V., Sajan, M. P., Yang, H., Li, P., Mastorides, S., Gower, W. R., Jr., . . . Leitges, M. (2007). Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *J Clin Invest*, 117(8), 2289-2301. doi:10.1172/JCI31408
- Federmann, M., & Hess, O. M. (1994). Differentiation between systolic and diastolic dysfunction. *Eur Heart J*, 15 Suppl D, 2-6.
- Fernandes, J. C. R., Acuna, S. M., Aoki, J. I., Floeter-Winter, L. M., & Muxel, S. M. (2019). Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Noncoding RNA*, 5(1). doi:10.3390/ncrna5010017
- Fiedler, J., Breckwoldt, K., Remmele, C. W., Hartmann, D., Dittrich, M., Pfanne, A., . . . Thum, T. (2015). Development of Long Noncoding RNA-Based Strategies to Modulate Tissue Vascularization. *J Am Coll Cardiol*, 66(18), 2005-2015. doi:10.1016/j.jacc.2015.07.081
- Fischer, P., & Hilfiker-Kleiner, D. (2007). Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic Res Cardiol*, 102(4), 279-297. doi:10.1007/s00395-007-0658-z
- Flynn, P., Mellor, H., Casamassima, A., & Parker, P. J. (2000). Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 275(15), 11064-11070. doi:10.1074/jbc.275.15.11064
- Flynn, P., Mellor, H., Palmer, R., Panayotou, G., & Parker, P. J. (1998). Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the Hr1 repeat motif. *J Biol Chem*, 273(5), 2698-2705. doi:10.1074/jbc.273.5.2698
- Frank, D., & Frey, N. (2011). Cardiac Z-disc signaling network. *J Biol Chem*, 286(12), 9897-9904. doi:10.1074/jbc.R110.174268
- Frank, S., Aguirre, A., Hescheler, J., & Kurian, L. (2016). A lncRNA Perspective into (Re)Building the Heart. *Front Cell Dev Biol*, 4, 128. doi:10.3389/fcell.2016.00128
- Freeley, M., Volkov, Y., Kelleher, D., & Long, A. (2005). Stimulus-induced phosphorylation of PKC theta at the C-terminal hydrophobic-motif in human T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(2), 619-630. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.136
- Frey, N., Barrientos, T., Shelton, J. M., Frank, D., Rutten, H., Gehring, D., . . . Olson, E. N. (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. doi:10.1038/nm1132

-
- Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N., & Hill, J. A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*, 109(13), 1580-1589. doi:10.1161/01.CIR.0000120390.68287.BB
- Frey, N., & Olson, E. N. (2002). Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem*, 277(16), 13998-14004. doi:10.1074/jbc.M200712200
- Frey, N., & Olson, E. N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*, 65, 45-79. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243
- Frey, N., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2000). Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14632-14637. doi:10.1073/pnas.260501097
- Fuller, S. J., Gillespie-Brown, J., & Sugden, P. H. (1998). Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem*, 273(29), 18146-18152.
- Gagnon, K. T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B. A., & Corey, D. R. (2014). RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Rep*, 6(1), 211-221. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.013
- Gallo, S., Vitacolonna, A., Bonzano, A., Comoglio, P., & Crepaldi, T. (2019). ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *Int J Mol Sci*, 20(9). doi:10.3390/ijms20092164
- Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R. E., Martin, R. J., Lefevre, M., . . . Ye, J. (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, 58(7), 1509-1517. doi:10.2337/db08-1637
- Garcia-Hoz, C., Sanchez-Fernandez, G., Garcia-Escudero, R., Fernandez-Velasco, M., Palacios-Garcia, J., Ruiz-Meana, M., . . . Ribas, C. (2012). Protein kinase C (PKC)zeta-mediated Galphaq stimulation of ERK5 protein pathway in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*, 287(10), 7792-7802. doi:10.1074/jbc.M111.282210
- Garcia-Menendez, L., Karamanlidis, G., Kolwicz, S., & Tian, R. (2013). Substrain specific response to cardiac pressure overload in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(3), H397-402. doi:10.1152/ajpheart.00088.2013
- Geisler, S., & Collier, J. (2013). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(11), 699-712. doi:10.1038/nrm3679
- Gerber, Y., Weston, S. A., Redfield, M. M., Chamberlain, A. M., Manemann, S. M., Jiang, R., . . . Roger, V. L. (2015). A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med*, 175(6), 996-1004. doi:10.1001/jamainternmed.2015.0924
- Gerits, N., Kostenko, S., & Moens, U. (2007). In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res*, 16(3), 281-314. doi:10.1007/s11248-006-9052-0
- Glennon, P. E., Kaddoura, S., Sale, E. M., Sale, G. J., Fuller, S. J., & Sugden, P. H. (1996). Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 78(6), 954-961.
- Gould, C. M., Kannan, N., Taylor, S. S., & Newton, A. C. (2009). The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *J Biol Chem*, 284(8), 4921-4935. doi:10.1074/jbc.M808436200
- Goyal, A., Myacheva, K., Gross, M., Klingenberg, M., Duran Arque, B., & Diederichs, S. (2017). Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res*, 45(3), e12. doi:10.1093/nar/gkw883

-
- Grivna, S. T., Beyret, E., Wang, Z., & Lin, H. (2006). A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 20(13), 1709-1714. doi:10.1101/gad.1434406
- Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., Koch, F., Wahrlich, S., Beisaw, A., . . . Herrmann, B. G. (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. doi:10.1016/j.devcel.2012.12.012
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., . . . Chang, H. Y. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071-1076. doi:10.1038/nature08975
- Gusterson, R., Brar, B., Faulkes, D., Giordano, A., Chrivia, J., & Latchman, D. (2002). The transcriptional co-activators CBP and p300 are activated via phenylephrine through the p42/p44 MAPK cascade. *J Biol Chem*, 277(4), 2517-2524. doi:10.1074/jbc.M104626200
- Gusterson, R. J., Jazrawi, E., Adcock, I. M., & Latchman, D. S. (2003). The transcriptional co-activators CREB-binding protein (CBP) and p300 play a critical role in cardiac hypertrophy that is dependent on their histone acetyltransferase activity. *J Biol Chem*, 278(9), 6838-6847. doi:10.1074/jbc.M211762200
- Guttman, M., & Rinn, J. L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 482(7385), 339-346. doi:10.1038/nature10887
- Habets, D. D., Luiken, J. J., Ouwens, M., Coumans, W. A., Vergouwe, M., Maarbjeerg, S. J., . . . Glatz, J. F. (2012). Involvement of atypical protein kinase C in the regulation of cardiac glucose and long-chain fatty acid uptake. *Front Physiol*, 3, 361. doi:10.3389/fphys.2012.00361
- Hambleton, M., Hahn, H., Plegler, S. T., Kuhn, M. C., Klevitsky, R., Carr, A. N., . . . Molkentin, J. D. (2006). Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Calpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure. *Circulation*, 114(6), 574-582. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.592550
- Han, A., He, J., Wu, Y., Liu, J. O., & Chen, L. (2005). Mechanism of recruitment of class II histone deacetylases by myocyte enhancer factor-2. *J Mol Biol*, 345(1), 91-102. doi:10.1016/j.jmb.2004.10.033
- Han, D., Gao, Q., & Cao, F. (2017). Long noncoding RNAs (LncRNAs) - The dawning of a new treatment for cardiac hypertrophy and heart failure. *Biochim Biophys Acta*, 1863(8), 2078-2084. doi:10.1016/j.bbadis.2017.02.024
- Han, P., Li, W., Lin, C. H., Yang, J., Shang, C., Nuernberg, S. T., . . . Chang, C. P. (2014). A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*, 514(7520), 102-106. doi:10.1038/nature13596
- Haq, S., Choukroun, G., Lim, H., Tymitz, K. M., del Monte, F., Gwathmey, J., . . . Molkentin, J. D. (2001). Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation*, 103(5), 670-677.
- Hasking, G. J., Esler, M. D., Jennings, G. L., Burton, D., Johns, J. A., & Korner, P. I. (1986). Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*, 73(4), 615-621.
- Hayashi, M., & Lee, J. D. (2004). Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med (Berl)*, 82(12), 800-808. doi:10.1007/s00109-004-0602-8
- Heineke, J., Auger-Messier, M., Correll, R. N., Xu, J., Benard, M. J., Yuan, W., . . . Molkentin, J. D. (2010). CIB1 is a regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 16(8), 872-879. doi:10.1038/nm.2181
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 589-600. doi:10.1038/nrm1983

-
- Heineke, J., & Ritter, O. (2012). Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond. *J Mol Cell Cardiol*, 52(1), 62-73. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.10.018
- Heinig, M., Adriaens, M. E., Schafer, S., van Deutekom, H. W. M., Lodder, E. M., Ware, J. S., . . . Hubner, N. (2017). Natural genetic variation of the cardiac transcriptome in non-diseased donors and patients with dilated cardiomyopathy. *Genome Biol*, 18(1), 170. doi:10.1186/s13059-017-1286-z
- Henagan, T. M., Stefanska, B., Fang, Z., Navard, A. M., Ye, J., Lenard, N. R., & Devarshi, P. P. (2015). Sodium butyrate epigenetically modulates high-fat diet-induced skeletal muscle mitochondrial adaptation, obesity and insulin resistance through nucleosome positioning. *Br J Pharmacol*, 172(11), 2782-2798. doi:10.1111/bph.13058
- Henrich, C. J., & Simpson, P. C. (1988). Differential acute and chronic response of protein kinase C in cultured neonatal rat heart myocytes to alpha 1-adrenergic and phorbol ester stimulation. *J Mol Cell Cardiol*, 20(12), 1081-1085.
- Hermans-Beijnsberger, S., van Bilsen, M., & Schroen, B. (2018). Long non-coding RNAs in the failing heart and vasculature. *Noncoding RNA Res*, 3(3), 118-130. doi:10.1016/j.ncrna.2018.04.002
- Hill, J. A., & Olson, E. N. (2008). Cardiac plasticity. *N Engl J Med*, 358(13), 1370-1380. doi:10.1056/NEJMra072139
- Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T., & Taga, T. (1995). Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11), 4862-4866.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 17(18), 2205-2232. doi:10.1101/gad.1102703
- Hoshijima, M., & Chien, K. R. (2002). Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest*, 109(7), 849-855. doi:10.1172/JCI15380
- Hou, J., Zhou, C., Long, H., Zheng, S., Guo, T., Wu, Q., . . . Wang, T. (2016). Long noncoding RNAs: Novel molecules in cardiovascular biology, disease and regeneration. *Exp Mol Pathol*, 100(3), 493-501. doi:10.1016/j.yexmp.2016.05.006
- Houser, S. R., Margulies, K. B., Murphy, A. M., Spinale, F. G., Francis, G. S., Prabhu, S. D., . . . Translational, B. (2012). Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res*, 111(1), 131-150. doi:10.1161/RES.0b013e3182582523
- Huang, L., Wolska, B. M., Montgomery, D. E., Burkart, E. M., Buttrick, P. M., & Solaro, R. J. (2001). Increased contractility and altered Ca(2+) transients of mouse heart myocytes conditionally expressing PKCbeta. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(5), C1114-1120. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.5.C1114
- Hunt, S. A., Abraham, W. T., Chin, M. H., Feldman, A. M., Francis, G. S., Ganiats, T. G., . . . American Heart, A. (2009). 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Am Coll Cardiol*, 53(15), e1-e90. doi:10.1016/j.jacc.2008.11.013
- Hunter, J. J., Tanaka, N., Rockman, H. A., Ross, J., Jr., & Chien, K. R. (1995). Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem*, 270(39), 23173-23178.
- Hutchinson, C. L., Lowe, P. N., McLaughlin, S. H., Mott, H. R., & Owen, D. (2013). Differential binding of RhoA, RhoB, and RhoC to protein kinase C-related kinase (PRK) isoforms PRK1, PRK2, and PRK3: PRKs have the highest affinity for RhoB. *Biochemistry*, 52(45), 7999-8011. doi:10.1021/bi401216w

-
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., & Guan, K. L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J*, 27(14), 1919-1931. doi:10.1038/emboj.2008.119
- Inagaki, K., Chen, L., Ikeno, F., Lee, F. H., Imahashi, K., Bouley, D. M., . . . Mochly-Rosen, D. (2003). Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation*, 108(19), 2304-2307. doi:10.1161/01.CIR.0000101682.24138.36
- Jarroux, J., Morillon, A., & Pinskaya, M. (2017). History, Discovery, and Classification of lncRNAs. *Adv Exp Med Biol*, 1008, 1-46. doi:10.1007/978-981-10-5203-3_1
- Jensen, D. R., Martin, D. M., Gebarski, S., Sahoo, T., Brundage, E. K., Chinault, A. C., . . . Lesperance, M. M. (2009). A novel chromosome 19p13.12 deletion in a child with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet A*, 149A(3), 396-402. doi:10.1002/ajmg.a.32691
- Jessup, M., & Brozena, S. (2003). Heart failure. *N Engl J Med*, 348(20), 2007-2018. doi:10.1056/NEJMra021498
- Jiang, F., Zhou, X., & Huang, J. (2016). Long Non-Coding RNA-ROR Mediates the Reprogramming in Cardiac Hypertrophy. *PLoS One*, 11(4), e0152767. doi:10.1371/journal.pone.0152767
- Johns, T. N., & Olson, B. J. (1954). Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*, 140(5), 675-682. doi:10.1097/00000658-195411000-00006
- Johnson, D. S., & Chen, Y. H. (2012). Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, 12(4), 458-463. doi:10.1016/j.coph.2012.02.003
- Johnsson, P., Lipovich, L., Grander, D., & Morris, K. V. (2014). Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochim Biophys Acta*, 1840(3), 1063-1071. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.035
- Kaab, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Nabauer, M., Beuckelmann, D. J., . . . Tomaselli, G. F. (1998). Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation*, 98(14), 1383-1393.
- Kakita, T., Hasegawa, K., Morimoto, T., Kaburagi, S., Wada, H., & Sasayama, S. (1999). p300 protein as a coactivator of GATA-5 in the transcription of cardiac-restricted atrial natriuretic factor gene. *J Biol Chem*, 274(48), 34096-34102.
- Kannel, W. B., Gordon, T., & Offutt, D. (1969). Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. *Ann Intern Med*, 71(1), 89-105.
- Kawai, C. (1999). From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation*, 99(8), 1091-1100. doi:10.1161/01.cir.99.8.1091
- Kehat, I., & Molkentin, J. D. (2010a). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci*, 1188, 96-102. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05088.x
- Kehat, I., & Molkentin, J. D. (2010b). Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*, 122(25), 2727-2735. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268
- Klattenhoff, C. A., Scheuermann, J. C., Surface, L. E., Bradley, R. K., Fields, P. A., Steinhauer, M. L., . . . Boyer, L. A. (2013). Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 152(3), 570-583. doi:10.1016/j.cell.2013.01.003
- Koch, W. J., Rockman, H. A., Samama, P., Hamilton, R. A., Bond, R. A., Milano, C. A., & Lefkowitz, R. J. (1995). Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic

-
- receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science*, 268(5215), 1350-1353. doi:10.1126/science.7761854
- Komuro, I., Kudo, S., Yamazaki, T., Zou, Y., Shiojima, I., & Yazaki, Y. (1996). Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J*, 10(5), 631-636.
- Kook, H., Lepore, J. J., Gitler, A. D., Lu, M. M., Wing-Man Yung, W., Mackay, J., . . . Epstein, J. A. (2003). Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest*, 112(6), 863-871. doi:10.1172/JCI19137
- Kranias, E. G., & Solaro, R. J. (1982). Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature*, 298(5870), 182-184. doi:10.1038/298182a0
- Kumar, M. M., & Goyal, R. (2017). LncRNA as a Therapeutic Target for Angiogenesis. *Curr Top Med Chem*, 17(15), 1750-1757. doi:10.2174/1568026617666161116144744
- Kumarswamy, R., Bauters, C., Volkmann, I., Maury, F., Fetisch, J., Holzmann, A., . . . Thum, T. (2014). Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res*, 114(10), 1569-1575. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303915
- Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Funamoto, M., Osugi, T., Yamada, S., . . . Yamauchi-Takahara, K. (2000). Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(1), 315-319.
- Kunisada, K., Tone, E., Fujio, Y., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., & Kishimoto, T. (1998). Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation*, 98(4), 346-352.
- Kuo, M. H., & Allis, C. D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, 20(8), 615-626. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H
- Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., & Erdmann, V. A. (2002). Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 1911-1918.
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81(2), 807-869. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.807
- Lai, M. M., Burnett, P. E., Wolosker, H., Blackshaw, S., & Snyder, S. H. (1998). Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem*, 273(29), 18325-18331.
- Lavoie, H., & Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(5), 281-298. doi:10.1038/nrm3979
- Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M., & Cohen, P. (1998). Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol*, 8(25), 1387-1390. doi:10.1016/s0960-9822(98)00019-0
- Lee, J. H., Gao, C., Peng, G., Greer, C., Ren, S., Wang, Y., & Xiao, X. (2011). Analysis of transcriptome complexity through RNA sequencing in normal and failing murine hearts. *Circ Res*, 109(12), 1332-1341. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.249433
- Leenders, J. J., Pinto, Y. M., & Creemers, E. E. (2011). Tapping the brake on cardiac growth-endogenous repressors of hypertrophic signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 51(2), 156-167. doi:10.1016/j.jmcc.2011.04.017
- Leinwand, L. A. (2001). Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: a matter of balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6), 2947-2949. doi:10.1073/pnas.051033698

-
- Leitges, M., Sanz, L., Martin, P., Duran, A., Braun, U., Garcia, J. F., . . . Moscat, J. (2001). Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell*, 8(4), 771-780. doi:10.1016/s1097-2765(01)00361-6
- Lemercier, C., Verdel, A., Galloo, B., Curtet, S., Brocard, M. P., & Khochbin, S. (2000). mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. *J Biol Chem*, 275(20), 15594-15599. doi:10.1074/jbc.M908437199
- Lennox, K. A., & Behlke, M. A. (2016). Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 44(2), 863-877. doi:10.1093/nar/gkv1206
- Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B., & Castelli, W. P. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 322(22), 1561-1566. doi:10.1056/NEJM199005313222203
- Li, D., Chen, G., Yang, J., Fan, X., Gong, Y., Xu, G., . . . Geng, B. (2013). Transcriptome analysis reveals distinct patterns of long noncoding RNAs in heart and plasma of mice with heart failure. *PLoS One*, 8(10), e77938. doi:10.1371/journal.pone.0077938
- Li, H. L., Yin, R., Chen, D., Liu, D., Wang, D., Yang, Q., & Dong, Y. G. (2007). Long-term activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biochem*, 100(5), 1086-1099. doi:10.1002/jcb.21197
- Li, J., Gao, H., Huang, J., Wang, P., Huang, Y., Luo, W., . . . Liu, P. (2016). PKCzeta interacts with STAT3 and promotes its activation in cardiomyocyte hypertrophy. *J Pharmacol Sci*, 132(1), 15-23. doi:10.1016/j.jphs.2016.03.010
- Li, X., Shang, E., Dong, Q., Li, Y., Zhang, J., Xu, S., . . . Zhang, Z. (2018). Small molecules capable of activating DNA methylation-repressed genes targeted by the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 293(19), 7423-7436. doi:10.1074/jbc.RA117.000757
- Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E., & Molkentin, J. D. (2001). The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 276(32), 30245-30253. doi:10.1074/jbc.M102174200
- Liang, Q., Wiese, R. J., Bueno, O. F., Dai, Y. S., Markham, B. E., & Molkentin, J. D. (2001). The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*, 21(21), 7460-7469. doi:10.1128/MCB.21.21.7460-7469.2001
- Lim, H. W., & Molkentin, J. D. (1999). Calcineurin and human heart failure. *Nat Med*, 5(3), 246-247. doi:10.1038/6430
- Liu, J. Y., Yao, J., Li, X. M., Song, Y. C., Wang, X. Q., Li, Y. J., . . . Jiang, Q. (2014). Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis*, 5, e1506. doi:10.1038/cddis.2014.466
- Liu, L., An, X., Li, Z., Song, Y., Li, L., Zuo, S., . . . Wang, J. (2016). The H19 long noncoding RNA is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 111(1), 56-65. doi:10.1093/cvr/cvw078
- Liu, Q., Chen, X., Macdonnell, S. M., Kranias, E. G., Lorenz, J. N., Leitges, M., . . . Molkentin, J. D. (2009). Protein kinase C{alpha}, but not PKC{beta} or PKC{gamma}, regulates contractility and heart failure susceptibility: implications for ruboxistaurin as a novel therapeutic approach. *Circ Res*, 105(2), 194-200. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.195313

-
- Liu, Y., Cseresnyes, Z., Randall, W. R., & Schneider, M. F. (2001). Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers. *J Cell Biol*, 155(1), 27-39. doi:10.1083/jcb.200103020
- Long, J. C., & Caceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J*, 417(1), 15-27. doi:10.1042/BJ20081501
- Lu, G., Kang, Y. J., Han, J., Herschman, H. R., Stefani, E., & Wang, Y. (2006). TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *J Biol Chem*, 281(9), 6087-6095. doi:10.1074/jbc.M507610200
- Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L., & Olson, E. N. (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8), 4070-4075. doi:10.1073/pnas.080064097
- Lu, J., McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2000). Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell*, 6(2), 233-244.
- Luo, S., Lu, J. Y., Liu, L., Yin, Y., Chen, C., Han, X., . . . Shen, X. (2016). Divergent lncRNAs Regulate Gene Expression and Lineage Differentiation in Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell*, 18(5), 637-652. doi:10.1016/j.stem.2016.01.024
- Ma, Q., Liu, Y., & Chen, L. (2018). JIP3 deficiency attenuates cardiac hypertrophy by suppression of JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 503(1), 1-7. doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.208
- Maggioni, A. P., Dahlstrom, U., Filippatos, G., Chioncel, O., Crespo Leiro, M., Drozd, J., . . . Heart Failure Association of the European Society of, C. (2013). EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur J Heart Fail*, 15(7), 808-817. doi:10.1093/eurjhf/hft050
- Magner, D., Biala, E., Lisowiec-Wachnicka, J., Kierzek, E., & Kierzek, R. (2015). A Tandem Oligonucleotide Approach for SNP-Selective RNA Degradation Using Modified Antisense Oligonucleotides. *PloS One*, 10(11), e0142139. doi:10.1371/journal.pone.0142139
- Magnusson, Y., Hoyer, S., Lengagne, R., Chapot, M. P., Guillet, J. G., Hjalmarson, A., . . . Hoebeke, J. (1989). Antigenic analysis of the second extra-cellular loop of the human beta-adrenergic receptors. *Clin Exp Immunol*, 78(1), 42-48.
- Mann, D. L., & Bristow, M. R. (2005). Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*, 111(21), 2837-2849. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.500546
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., . . . Prevention. (2006). Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113(14), 1807-1816. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287
- Marrocco, V., Bogomolovas, J., Ehler, E., Dos Remedios, C. G., Yu, J., Gao, C., & Lange, S. (2019). PKC and PKN in heart disease. *J Mol Cell Cardiol*, 128, 212-226. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.01.029
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., & Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer*, 2(3), 232-260. doi:10.1177/1947601911407323
- Matkovich, S. J., Edwards, J. R., Grossenheider, T. C., de Guzman Strong, C., & Dorn, G. W., 2nd. (2014). Epigenetic coordination of embryonic heart transcription by

- dynamically regulated long noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(33), 12264-12269. doi:10.1073/pnas.1410622111
- Matsui, T., Li, L., Wu, J. C., Cook, S. A., Nagoshi, T., Picard, M. H., . . . Rosenzweig, A. (2002). Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem*, 277(25), 22896-22901. doi:10.1074/jbc.M200347200
- Mayr, M., Metzler, B., Chung, Y. L., McGregor, E., Mayr, U., Troy, H., . . . Xu, Q. (2004). Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(2), H946-956. doi:10.1152/ajpheart.00878.2003
- McCain, J. (2013). The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T*, 38(2), 96-108.
- McEwan, D. G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., . . . Dikic, I. (2015). PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell*, 57(1), 39-54. doi:10.1016/j.molcel.2014.11.006
- McIntyre, R. L., Daniels, E. G., Molenaars, M., Houtkooper, R. H., & Janssens, G. E. (2019). From molecular promise to preclinical results: HDAC inhibitors in the race for healthy aging drugs. *EMBO Mol Med*, 11(9), e9854. doi:10.15252/emmm.201809854
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev*, 11(5), 497-504.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2002a). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci*, 27(1), 40-47.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2002b). Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol*, 14(6), 763-772.
- McMullen, J. R., Sherwood, M. C., Tarnavski, O., Zhang, L., Dorfman, A. L., Shioi, T., & Izumo, S. (2004). Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*, 109(24), 3050-3055. doi:10.1161/01.CIR.0000130641.08705.45
- McMurray, J. J., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M., Rizkala, A. R., . . . Investigators, P.-H. C. (2014). Baseline characteristics and treatment of patients in prospective comparison of ARNI with ACEI to determine impact on global mortality and morbidity in heart failure trial (PARADIGM-HF). *Eur J Heart Fail*, 16(7), 817-825. doi:10.1002/ehf.115
- McMurray, J. J., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M. P., Rizkala, A. R., . . . Committees. (2014). Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*, 371(11), 993-1004. doi:10.1056/NEJMoa1409077
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 10(3), 155-159. doi:10.1038/nrg2521
- Metra, M., & Teerlink, J. R. (2017). Heart failure. *Lancet*, 390(10106), 1981-1995. doi:10.1016/S0140-6736(17)31071-1
- Michalik, K. M., You, X., Manavski, Y., Doddaballapur, A., Zornig, M., Braun, T., . . . Dimmeler, S. (2014). Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res*, 114(9), 1389-1397. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303265
- Miska, E. A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S. J., Pines, J., & Kouzarides, T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J*, 18(18), 5099-5107. doi:10.1093/emboj/18.18.5099
- Molkentin, J. D. (2000). Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res*, 87(9), 731-738.
- Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res*, 63(3), 467-475. doi:10.1016/j.cardiores.2004.01.021

-
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., . . . Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, *93*(2), 215-228.
- Monia, B. P., Lesnik, E. A., Gonzalez, C., Lima, W. F., McGee, D., Guinasso, C. J., . . . Freier, S. M. (1993). Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(19), 14514-14522.
- Morin, S., Charron, F., Robitaille, L., & Nemer, M. (2000). GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J*, *19*(9), 2046-2055. doi:10.1093/emboj/19.9.2046
- Morisco, C., Seta, K., Hardt, S. E., Lee, Y., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2001). Glycogen synthase kinase 3 β regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, *276*(30), 28586-28597. doi:10.1074/jbc.M103166200
- Morisco, C., Zebrowski, D., Condorelli, G., Tsiachlis, P., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2000). The Akt-glycogen synthase kinase 3 β pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, *275*(19), 14466-14475.
- Mosterd, A., Hoes, A. W., de Bruyne, M. C., Deckers, J. W., Linker, D. T., Hofman, A., & Grobbee, D. E. (1999). Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J*, *20*(6), 447-455.
- Mudd, J. O., & Kass, D. A. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, *451*(7181), 919-928. doi:10.1038/nature06798
- Mukai, H., & Ono, Y. (1994). A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*, *199*(2), 897-904. doi:10.1006/bbrc.1994.1313
- Naga Prasad, S. V., Esposito, G., Mao, L., Koch, W. J., & Rockman, H. A. (2000). Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J Biol Chem*, *275*(7), 4693-4698.
- Neguembor, M. V., Jothi, M., & Gabellini, D. (2014). Long noncoding RNAs, emerging players in muscle differentiation and disease. *Skelet Muscle*, *4*(1), 8. doi:10.1186/2044-5040-4-8
- Neumann, J., Schmitz, W., Scholz, H., von Meyerinck, L., Doring, V., & Kalmar, P. (1988). Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet*, *2*(8617), 936-937.
- Newton, A. C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J*, *370*(Pt 2), 361-371. doi:10.1042/BJ20021626
- Newton, A. C., Antal, C. E., & Steinberg, S. F. (2016). Protein kinase C mechanisms that contribute to cardiac remodelling. *Clin Sci (Lond)*, *130*(17), 1499-1510. doi:10.1042/CS20160036
- Nicol, R. L., Frey, N., & Olson, E. N. (2000). From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *1*, 179-223. doi:10.1146/annurev.genom.1.1.179
- Nicol, R. L., Frey, N., Pearson, G., Cobb, M., Richardson, J., & Olson, E. N. (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J*, *20*(11), 2757-2767. doi:10.1093/emboj/20.11.2757
- Nieto-Lima, B., Cano-Martinez, A., Rubio-Ruiz, M. E., Perez-Torres, I., & Guarner-Lans, V. (2018). Age-, Gender-, and in Vivo Different Doses of Isoproterenol Modify in Vitro Aortic Vasoreactivity and Circulating VCAM-1. *Front Physiol*, *9*, 20. doi:10.3389/fphys.2018.00020
- O'Neil, J. D., Ammit, A. J., & Clark, A. R. (2018). MAPK p38 regulates inflammatory gene expression via tristetraprolin: Doing good by stealth. *Int J Biochem Cell Biol*, *94*, 6-9. doi:10.1016/j.biocel.2017.11.003

-
- Ochoa, W. F., Garcia-Garcia, J., Fita, I., Corbalan-Garcia, S., Verdaguer, N., & Gomez-Fernandez, J. C. (2001). Structure of the C2 domain from novel protein kinase Cepsilon. A membrane binding model for Ca(2+)-independent C2 domains. *J Mol Biol*, 311(4), 837-849. doi:10.1006/jmbi.2001.4910
- Offermanns, S., Zhao, L. P., Gohla, A., Sarosi, I., Simon, M. I., & Wilkie, T. M. (1998). Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J*, 17(15), 4304-4312. doi:10.1093/emboj/17.15.4304
- Olson, E. N., & Williams, R. S. (2000). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell*, 101(7), 689-692.
- Ooi, J. Y., Tuano, N. K., Rafehi, H., Gao, X. M., Ziemann, M., Du, X. J., & El-Osta, A. (2015). HDAC inhibition attenuates cardiac hypertrophy by acetylation and deacetylation of target genes. *Epigenetics*, 10(5), 418-430. doi:10.1080/15592294.2015.1024406
- Ou, L., Li, W., Liu, Y., Zhang, Y., Jie, S., Kong, D., . . . Ma, N. (2010). Animal models of cardiac disease and stem cell therapy. *Open Cardiovasc Med J*, 4, 231-239. doi:10.2174/1874192401004010231
- Ounzain, S., Micheletti, R., Arnan, C., Plaisance, I., Cecchi, D., Schroen, B., . . . Pedrazzini, T. (2015). CARMEN, a human super enhancer-associated long noncoding RNA controlling cardiac specification, differentiation and homeostasis. *J Mol Cell Cardiol*, 89(Pt A), 98-112. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.09.016
- Ounzain, S., Micheletti, R., Beckmann, T., Schroen, B., Alexanian, M., Pezzuto, I., . . . Pedrazzini, T. (2015). Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. *Eur Heart J*, 36(6), 353-368a. doi:10.1093/eurheartj/ehu180
- Ounzain, S., Pezzuto, I., Micheletti, R., Burdet, F., Sheta, R., Nemir, M., . . . Pedrazzini, T. (2014). Functional importance of cardiac enhancer-associated noncoding RNAs in heart development and disease. *J Mol Cell Cardiol*, 76, 55-70. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.08.009
- Owan, T. E., Hodge, D. O., Herges, R. M., Jacobsen, S. J., Roger, V. L., & Redfield, M. M. (2006). Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*, 355(3), 251-259. doi:10.1056/NEJMoa052256
- Palaniyandi, S. S., Sun, L., Ferreira, J. C., & Mochly-Rosen, D. (2009). Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? *Cardiovasc Res*, 82(2), 229-239. doi:10.1093/cvr/cvp001
- Paoletti, R., Maffei, A., Madaro, L., Notte, A., Stanganello, E., Cifelli, G., . . . Bouche, M. (2010). Protein kinase Ctheta is required for cardiomyocyte survival and cardiac remodeling. *Cell Death Dis*, 1, e45. doi:10.1038/cddis.2010.24
- Passer, D., van de Vrugt, A., Atmanli, A., & Domian, I. J. (2016). Atypical Protein Kinase C-Dependent Polarized Cell Division Is Required for Myocardial Trabeculation. *Cell Rep*, 14(7), 1662-1672. doi:10.1016/j.celrep.2016.01.030
- Pearse, S. G., & Cowie, M. R. (2016). Sleep-disordered breathing in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 18(4), 353-361. doi:10.1002/ejhf.492
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), 153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428
- Pennica, D., Shaw, K. J., Swanson, T. A., Moore, M. W., Shelton, D. L., Zioncheck, K. A., . . . Wood, W. I. (1995). Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem*, 270(18), 10915-10922.
- Penny, G. D., Kay, G. F., Sheardown, S. A., Rastan, S., & Brockdorff, N. (1996). Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, 379(6561), 131-137. doi:10.1038/379131a0

-
- Petrich, B. G., & Wang, Y. (2004). Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. *Trends Cardiovasc Med*, 14(2), 50-55. doi:10.1016/j.tcm.2003.11.002
- Pocock, S. J., Ariti, C. A., McMurray, J. J., Maggioni, A., Kober, L., Squire, I. B., . . . Meta-Analysis Global Group in Chronic Heart, F. (2013). Predicting survival in heart failure: a risk score based on 39 372 patients from 30 studies. *Eur Heart J*, 34(19), 1404-1413. doi:10.1093/eurheartj/ehs337
- Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., . . . van der Meer, P. (2016). 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 69(12), 1167. doi:10.1016/j.rec.2016.11.005
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 136(4), 629-641. doi:10.1016/j.cell.2009.02.006
- Prabhu, S. D. (2005). Post-infarction ventricular remodeling: an array of molecular events. *J Mol Cell Cardiol*, 38(4), 547-550. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.01.014
- Proudfoot, N. J. (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev*, 25(17), 1770-1782. doi:10.1101/gad.17268411
- Raake, P. W., Schlegel, P., Ksienzyk, J., Reinkober, J., Barthelmes, J., Schinkel, S., . . . Muller, O. J. (2013). AAV6.betaARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *Eur Heart J*, 34(19), 1437-1447. doi:10.1093/eurheartj/ehr447
- Raake, P. W., Vinge, L. E., Gao, E., Boucher, M., Rengo, G., Chen, X., . . . Koch, W. J. (2008). G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res*, 103(4), 413-422. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.168336
- Raake, P. W., Zhang, X., Vinge, L. E., Brinks, H., Gao, E., Jaleel, N., . . . Koch, W. J. (2012). Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca²⁺ handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction. *Circulation*, 125(17), 2108-2118. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044255
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22), 3100-3112. doi:10.1038/sj.onc.1210392
- Ramirez, M. T., Zhao, X. L., Schulman, H., & Brown, J. H. (1997). The nuclear deltaB isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem*, 272(49), 31203-31208.
- Redfern, C. H., Degtyarev, M. Y., Kwa, A. T., Salomonis, N., Cotte, N., Nanevich, T., . . . Conklin, B. R. (2000). Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4826-4831.
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*, 81, 145-166. doi:10.1146/annurev-biochem-051410-092902
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Brugmann, S. A., . . . Chang, H. Y. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 129(7), 1311-1323. doi:10.1016/j.cell.2007.05.022
- Ritter, O., Hack, S., Schuh, K., Rothlein, N., Perrot, A., Osterziel, K. J., . . . Neyses, L. (2002). Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation*, 105(19), 2265-2269.
- Rockman, H. A., Chien, K. R., Choi, D. J., Iaccarino, G., Hunter, J. J., Ross, J., Jr., . . . Koch, W. J. (1998). Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 7000-7005.

-
- Rockman, H. A., Koch, W. J., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, *415*(6868), 206-212. doi:10.1038/415206a
- Roger, V. L. (2013). Epidemiology of heart failure. *Circ Res*, *113*(6), 646-659. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300268
- Rudebusch, J., Benkner, A., Poesch, A., Dorr, M., Volker, U., Grube, K., . . . Felix, S. B. (2017). Dynamic adaptation of myocardial proteome during heart failure development. *PLoS One*, *12*(10), e0185915. doi:10.1371/journal.pone.0185915
- Rusnak, F., & Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*, *80*(4), 1483-1521. doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1483
- Sabbah, H. N., & Sharov, V. G. (1998). Apoptosis in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*, *40*(6), 549-562.
- Sadoshima, J., & Izumo, S. (1993). Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*, *73*(3), 413-423.
- Sadoshima, J., Montagne, O., Wang, Q., Yang, G., Warden, J., Liu, J., . . . Vatner, S. F. (2002). The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, *110*(2), 271-279. doi:10.1172/JCI14938
- Sala, V., Gallo, S., Leo, C., Gatti, S., Gelb, B. D., & Crepaldi, T. (2012). Signaling to cardiac hypertrophy: insights from human and mouse RASopathies. *Mol Med*, *18*, 938-947. doi:10.2119/molmed.2011.00512
- Sano, M., Fukuda, K., Kodama, H., Pan, J., Saito, M., Matsuzaki, J., . . . Ogawa, S. (2000). Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem*, *275*(38), 29717-29723. doi:10.1074/jbc.M003128200
- Sartorelli, V., Huang, J., Hamamori, Y., & Kedes, L. (1997). Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol Cell Biol*, *17*(2), 1010-1026.
- Scheuermann, J. C., & Boyer, L. A. (2013). Getting to the heart of the matter: long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *EMBO J*, *32*(13), 1805-1816. doi:10.1038/emboj.2013.134
- Schlegel, P., Reinkober, J., Meinhardt, E., Tscheschner, H., Gao, E., Schumacher, S. M., . . . Raake, P. W. (2017). G protein-coupled receptor kinase 2 promotes cardiac hypertrophy. *PLoS One*, *12*(7), e0182110. doi:10.1371/journal.pone.0182110
- Segura, A. M., Frazier, O. H., & Buja, L. M. (2014). Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev*, *19*(2), 173-185. doi:10.1007/s10741-012-9365-4
- Shen, S., Jiang, H., Bei, Y., Xiao, J., & Li, X. (2017). Long Non-Coding RNAs in Cardiac Remodeling. *Cell Physiol Biochem*, *41*(5), 1830-1837. doi:10.1159/000471913
- Shikama, N., Lutz, W., Kretzschmar, R., Sauter, N., Roth, J. F., Marino, S., . . . Eckner, R. (2003). Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *EMBO J*, *22*(19), 5175-5185. doi:10.1093/emboj/cdg502
- Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P. S., Hampe, J., Yballe, C. M., Lawitts, J., . . . Izumo, S. (2000). The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J*, *19*(11), 2537-2548. doi:10.1093/emboj/19.11.2537
- Shioi, T., McMullen, J. R., Kang, P. M., Douglas, P. S., Obata, T., Franke, T. F., . . . Izumo, S. (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, *22*(8), 2799-2809.
- Shioi, T., McMullen, J. R., Tarnavski, O., Converso, K., Sherwood, M. C., Manning, W. J., & Izumo, S. (2003). Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*, *107*(12), 1664-1670. doi:10.1161/01.CIR.0000057979.36322.88
- Simonis, G., Briem, S. K., Schoen, S. P., Bock, M., Marquetant, R., & Strasser, R. H. (2007). Protein kinase C in the human heart: differential regulation of the isoforms in aortic

- stenosis or dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*, 305(1-2), 103-111. doi:10.1007/s11010-007-9533-3
- Singal, P. K., Kapur, N., Dhillon, K. S., Beamish, R. E., & Dhalla, N. S. (1982). Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol*, 60(11), 1390-1397. doi:10.1139/y82-207
- Slepek, T. I., Webster, K. A., Zang, J., Prentice, H., O'Dowd, A., Hicks, M. N., & Bishopric, N. H. (2001). Control of cardiac-specific transcription by p300 through myocyte enhancer factor-2D. *J Biol Chem*, 276(10), 7575-7585. doi:10.1074/jbc.M004625200
- Smyrniak, I., Goodwin, N., Wachten, D., Skogestad, J., Aronsen, J. M., Robinson, E. L., . . . Roderick, H. L. (2018). Contractile responses to endothelin-1 are regulated by PKC phosphorylation of cardiac myosin binding protein-C in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 117, 1-18. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.02.012
- Song, M., Matkovich, S. J., Zhang, Y., Hammer, D. J., & Dorn, G. W., 2nd. (2015). Combined cardiomyocyte PKCdelta and PKCepsilon gene deletion uncovers their central role in restraining developmental and reactive heart growth. *Sci Signal*, 8(373), ra39. doi:10.1126/scisignal.aaa1855
- Soni, S., Anand, P., & Padwad, Y. S. (2019). MAPKAPK2: the master regulator of RNA-binding proteins modulates transcript stability and tumor progression. *J Exp Clin Cancer Res*, 38(1), 121. doi:10.1186/s13046-019-1115-1
- Sparrow, D. B., Miska, E. A., Langley, E., Reynaud-Deonauth, S., Kotecha, S., Towers, N., . . . Mohun, T. J. (1999). MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. *EMBO J*, 18(18), 5085-5098. doi:10.1093/emboj/18.18.5085
- Stamm, S. (2008). Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem*, 283(3), 1223-1227. doi:10.1074/jbc.R700034200
- Stemmer, P. M., & Klee, C. B. (1994). Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry*, 33(22), 6859-6866.
- Sun, L., Youn, H. D., Loh, C., Stolow, M., He, W., & Liu, J. O. (1998). Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*, 8(6), 703-711.
- Sun, W., Vincent, S., Settleman, J., & Johnson, G. L. (2000). MEK kinase 2 binds and activates protein kinase C-related kinase 2. Bifurcation of kinase regulatory pathways at the level of an MAPK kinase kinase. *J Biol Chem*, 275(32), 24421-24428. doi:10.1074/jbc.M003148200
- Taigen, T., De Windt, L. J., Lim, H. W., & Molkenstein, J. D. (2000). Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(3), 1196-1201.
- Takeishi, Y., Chu, G., Kirkpatrick, D. M., Li, Z., Wakasaki, H., Kranias, E. G., . . . Walsh, R. A. (1998). In vivo phosphorylation of cardiac troponin I by protein kinase Cbeta2 decreases cardiomyocyte calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts. *J Clin Invest*, 102(1), 72-78. doi:10.1172/JCI2709
- Takeishi, Y., Huang, Q., Abe, J., Glassman, M., Che, W., Lee, J. D., . . . Walsh, R. A. (2001). Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol*, 33(9), 1637-1648. doi:10.1006/jmcc.2001.1427
- Tanaka, N., Dalton, N., Mao, L., Rockman, H. A., Peterson, K. L., Gottshall, K. R., . . . Ross, J., Jr. (1996). Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation*, 94(5), 1109-1117.
- Tanno, M., Bassi, R., Gorog, D. A., Saurin, A. T., Jiang, J., Heads, R. J., . . . Marber, M. S. (2003). Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ Res*, 93(3), 254-261. doi:10.1161/01.RES.0000083490.43943.85

-
- Thebault, S., & Ochoa-Garay, J. (2004). Characterization of TCR-induced phosphorylation of PKC θ in primary murine lymphocytes. *Mol Immunol*, 40(13), 931-942. doi:10.1016/j.molimm.2003.10.014
- Thorburn, A. (1994). Ras activity is required for phenylephrine-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cardiac muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(2), 1417-1422. doi:10.1006/bbrc.1994.2823
- Tian, D., Sun, S., & Lee, J. T. (2010). The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell*, 143(3), 390-403. doi:10.1016/j.cell.2010.09.049
- Tiemann, K., Weyer, D., Djoufack, P. C., Ghanem, A., Lewalter, T., Dreiner, U., . . . Fink, K. B. (2003). Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(2), H464-474. doi:10.1152/ajpheart.00540.2002
- Toischer, K., Rokita, A. G., Unsold, B., Zhu, W., Kararigas, G., Sossalla, S., . . . Hasenfuss, G. (2010). Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation*, 122(10), 993-1003. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943431
- Torrado, M., Lopez, E., Centeno, A., Medrano, C., Castro-Beiras, A., & Mikhailov, A. T. (2003). Myocardin mRNA is augmented in the failing myocardium: expression profiling in the porcine model and human dilated cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl)*, 81(9), 566-577. doi:10.1007/s00109-003-0470-7
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., . . . Prasanth, K. V. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 39(6), 925-938. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.011
- Tsai, M. C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., . . . Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 329(5992), 689-693. doi:10.1126/science.1192002
- Turner, N. A. (2011). Therapeutic regulation of cardiac fibroblast function: targeting stress-activated protein kinase pathways. *Future Cardiol*, 7(5), 673-691. doi:10.2217/fca.11.41
- Turner, N. A., & Blythe, N. M. (2019). Cardiac Fibroblast p38 MAPK: A Critical Regulator of Myocardial Remodeling. *J Cardiovasc Dev Dis*, 6(3). doi:10.3390/jcdd6030027
- Ueki, K., Muramatsu, T., & Kincaid, R. L. (1992). Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochem Biophys Res Commun*, 187(1), 537-543.
- Ueyama, T., Kawashima, S., Sakoda, T., Rikitake, Y., Ishida, T., Kawai, M., . . . Yokoyama, M. (1999). Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase via endothelin-A receptor in rat myocardial cells. *Mol Cell Biochem*, 199(1-2), 119-124.
- Ulitsky, I., & Bartel, D. P. (2013). lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 154(1), 26-46. doi:10.1016/j.cell.2013.06.020
- van den Bos, E. J., Mees, B. M., de Waard, M. C., de Crom, R., & Duncker, D. J. (2005). A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(3), H1291-1300. doi:10.1152/ajpheart.00111.2005
- Verma, S., & McMurray, J. J. V. (2018). SGLT2 inhibitors and mechanisms of cardiovascular benefit: a state-of-the-art review. *Diabetologia*, 61(10), 2108-2117. doi:10.1007/s00125-018-4670-7
- Vermeulen, L., Vanden Berghe, W., Beck, I. M., De Bosscher, K., & Haegeman, G. (2009). The versatile role of MSKs in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 34(6), 311-318. doi:10.1016/j.tibs.2009.02.007
- Vicens, Q., & Westhof, E. (2014). Biogenesis of Circular RNAs. *Cell*, 159(1), 13-14. doi:10.1016/j.cell.2014.09.005

-
- Vickers, T. A., Koo, S., Bennett, C. F., Crooke, S. T., Dean, N. M., & Baker, B. F. (2003). Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem*, 278(9), 7108-7118. doi:10.1074/jbc.M210326200
- Viereck, J., Kumarswamy, R., Foinquinos, A., Xiao, K., Avramopoulos, P., Kunz, M., . . . Thum, T. (2016). Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling. *Sci Transl Med*, 8(326), 326ra322. doi:10.1126/scitranslmed.aaf1475
- Vo, U., Vajpai, N., Flavell, L., Bobby, R., Breeze, A. L., Embrey, K. J., & Golovanov, A. P. (2016). Monitoring Ras Interactions with the Nucleotide Exchange Factor Son of Sevenless (Sos) Using Site-specific NMR Reporter Signals and Intrinsic Fluorescence. *J Biol Chem*, 291(4), 1703-1718. doi:10.1074/jbc.M115.691238
- Wakasaki, H., Koya, D., Schoen, F. J., Jirousek, M. R., Ways, D. K., Hoit, B. D., . . . King, G. L. (1997). Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(17), 9320-9325. doi:10.1073/pnas.94.17.9320
- Walsh, M. E., Bhattacharya, A., Sataranatarajan, K., Qaisar, R., Sloane, L., Rahman, M. M., . . . Van Remmen, H. (2015). The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Aging Cell*, 14(6), 957-970. doi:10.1111/acel.12387
- Wang, K., Liu, C. Y., Zhou, L. Y., Wang, J. X., Wang, M., Zhao, B., . . . Li, P. F. (2015). APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by targeting miR-188-3p. *Nat Commun*, 6, 6779. doi:10.1038/ncomms7779
- Wang, K., Liu, F., Liu, C. Y., An, T., Zhang, J., Zhou, L. Y., . . . Li, P. F. (2016). The long noncoding RNA NRF regulates programmed necrosis and myocardial injury during ischemia and reperfusion by targeting miR-873. *Cell Death Differ*, 23(8), 1394-1405. doi:10.1038/cdd.2016.28
- Wang, K., Liu, F., Zhou, L. Y., Long, B., Yuan, S. M., Wang, Y., . . . Li, P. F. (2014). The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circ Res*, 114(9), 1377-1388. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302476
- Wang, K., Long, B., Zhou, L. Y., Liu, F., Zhou, Q. Y., Liu, C. Y., . . . Li, P. F. (2014). CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 downregulation. *Nat Commun*, 5, 3596. doi:10.1038/ncomms4596
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6), 904-914. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018
- Wang, X., Finegan, K. G., Robinson, A. C., Knowles, L., Khosravi-Far, R., Hinchliffe, K. A., . . . Tournier, C. (2006). Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death Differ*, 13(12), 2099-2108. doi:10.1038/sj.cdd.4401969
- Wang, Y. (2007). Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation*, 116(12), 1413-1423. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589
- Wang, Y., Huang, S., Sah, V. P., Ross, J., Jr., Brown, J. H., Han, J., & Chien, K. R. (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*, 273(4), 2161-2168.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W., & Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, 138(5), 1019-1031. doi:10.1016/j.cell.2009.06.049
- Wang, Z., Zhang, X. J., Ji, Y. X., Zhang, P., Deng, K. Q., Gong, J., . . . Wang, Y. (2016). The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 22(10), 1131-1139. doi:10.1038/nm.4179

-
- Watanabe, K., Towatari, M., Ozawa, Y., Miyata, Y., Okamoto, M., Abe, A., . . . Saito, H. (2003). Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene*, 22(57), 9176-9184. doi:10.1038/sj.onc.1206902
- Wettschureck, N., Rutten, H., Zywiets, A., Gehring, D., Wilkie, T. M., Chen, J., . . . Offermanns, S. (2001). Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nat Med*, 7(11), 1236-1240. doi:10.1038/nm1101-1236
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79(1), 143-180. doi:10.1152/physrev.1999.79.1.143
- Wilkins, B. J., Dai, Y. S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., Xu, J., Plank, D. M., . . . Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 94(1), 110-118. doi:10.1161/01.RES.0000109415.17511.18
- Wilkins, B. J., & Molkentin, J. D. (2004). Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 322(4), 1178-1191. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.121
- Willingham, A. T., & Gingeras, T. R. (2006). 'TUF love for "junk" DNA. *Cell*, 125(7), 1215-1220. doi:10.1016/j.cell.2006.06.009
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., & Spector, D. L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*, 23(13), 1494-1504. doi:10.1101/gad.1800909
- Xuan, L., Sun, L., Zhang, Y., Huang, Y., Hou, Y., Li, Q., . . . Yang, B. F. (2017). Circulating long non-coding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure. *J Cell Mol Med*, 21(9), 1803-1814. doi:10.1111/jcmm.13101
- Yamauchi-Takahara, K., & Kishimoto, T. (2000). A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med*, 10(7), 298-303.
- Yanazume, T., Hasegawa, K., Morimoto, T., Kawamura, T., Wada, H., Matsumori, A., . . . Kita, T. (2003). Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol Cell Biol*, 23(10), 3593-3606.
- Yancy, C. W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D. E., Jr., Drazner, M. H., . . . American Heart Association Task Force on Practice, G. (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*, 62(16), e147-239. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.019
- Yang, L., Duff, M. O., Graveley, B. R., Carmichael, G. G., & Chen, L. L. (2011). Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. *Genome Biol*, 12(2), R16. doi:10.1186/gb-2011-12-2-r16
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S. I., Morrow, J. P., Rybin, V. O., Steinberg, S. F., & Marx, S. O. (2005). Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*, 280(1), 207-214. doi:10.1074/jbc.M410509200
- Yano, M., Kim, S., Izumi, Y., Yamanaka, S., & Iwao, H. (1998). Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ Res*, 83(7), 752-760.
- Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., . . . Eckner, R. (1998). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell*, 93(3), 361-372.
- Yasukawa, H., Hoshijima, M., Gu, Y., Nakamura, T., Pradervand, S., Hanada, T., . . . Chien, K. R. (2001). Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest*, 108(10), 1459-1467. doi:10.1172/JCI13939

-
- Yin, F. C., Spurgeon, H. A., Rakusan, K., Weisfeldt, M. L., & Lakatta, E. G. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol*, 243(6), H941-947. doi:10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941
- Yokota, T., & Wang, Y. (2016). p38 MAP kinases in the heart. *Gene*, 575(2 Pt 2), 369-376. doi:10.1016/j.gene.2015.09.030
- Yoshinaga, C., Mukai, H., Toshimori, M., Miyamoto, M., & Ono, Y. (1999). Mutational analysis of the regulatory mechanism of PKN: the regulatory region of PKN contains an arachidonic acid-sensitive autoinhibitory domain. *J Biochem*, 126(3), 475-484. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022476
- Youn, H. D., Grozinger, C. M., & Liu, J. O. (2000). Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J Biol Chem*, 275(29), 22563-22567. doi:10.1074/jbc.C000304200
- Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Chang, S., Antos, C. L., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2002). Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*, 110(4), 479-488.
- Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Lu, J. R., & Olson, E. N. (2001). Association of COOH-terminal-binding protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor. *J Biol Chem*, 276(1), 35-39. doi:10.1074/jbc.M007364200
- Zhang, D., Gaussin, V., Taffet, G. E., Belaguli, N. S., Yamada, M., Schwartz, R. J., . . . Schneider, M. D. (2000). TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nat Med*, 6(5), 556-563. doi:10.1038/75037
- Zhang, G. X., Ohmori, K., Nagai, Y., Fujisawa, Y., Nishiyama, A., Abe, Y., & Kimura, S. (2007). Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 42(4), 804-811. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.01.012
- Zhang, P., Wang, W., Wang, X., Wang, X., Song, Y., Han, Y., . . . Zhao, H. (2013). Protein analysis of atrial fibrosis via label-free proteomics in chronic atrial fibrillation patients with mitral valve disease. *PLoS One*, 8(4), e60210. doi:10.1371/journal.pone.0060210
- Zhang, Y., Yang, L., & Chen, L. L. (2014). Life without A tail: new formats of long noncoding RNAs. *Int J Biochem Cell Biol*, 54, 338-349. doi:10.1016/j.biocel.2013.10.009
- Zhang, Z., Li, S., Cui, M., Gao, X., Sun, D., Qin, X., . . . Cao, F. (2013). Rosuvastatin enhances the therapeutic efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells for myocardial infarction via PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. *Basic Res Cardiol*, 108(2), 333. doi:10.1007/s00395-013-0333-5
- Zhang, Z., Liang, D., Gao, X., Zhao, C., Qin, X., Xu, Y., . . . Cao, F. (2014). Selective inhibition of inositol hexakisphosphate kinases (IP6Ks) enhances mesenchymal stem cell engraftment and improves therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 109(4), 417. doi:10.1007/s00395-014-0417-x
- Zohlhofer, D., Nuhrenberg, T. G., Haas, F., Bengel, F., Schomig, A., Baeuerle, P. A., & Schwaiger, M. (2008). Myocardial gene expression of matched hibernating and control tissue from patients with ischemic left ventricular dysfunction. *Heart Vessels*, 23(4), 230-242. doi:10.1007/s00380-007-1035-4