

Aus der Klinik für Innere Medizin III,
Schwerpunkte Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin

Direktor: Prof. Dr. Norbert Frey

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Cofilin-2 in der dilatativen Kardiomyopathie – Implikationen für die molekulare Pathogenese

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Phillip Hoppe

aus Neumünster

Kiel, 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Derk Frank

2. Berichterstatter: Prof. Stefan Rose-John

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.03.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Herzkreislauferkrankungen.....	1
1.2 Dilatative Kardiomyopathie	1
1.2.1 Bedeutung der Sarkomere bei der Entstehung der DCM.....	2
1.2.2 Aktinstoffwechsel in der DCM.....	3
1.3 Remodeling bei der dilatativen Kardiomyopathie	4
1.3.1 Kardiale Hypertrophie.....	4
1.3.2 Pathologische kardiale Hypertrophie.....	5
1.4 Calcineurin Signalweg	6
1.4.1 Calcineurin bei kardialer Hypertrophie	7
1.4.2 Calsarcin-1	8
1.4.3 Calsarcin-1 defizientes Mausmodell im C57Bl/6 Hintergrund	9
1.5 MicroRNAs.....	9
1.5.1 Funktionsweise von microRNAs.....	10
1.5.2 Bedeutung von microRNAs in der Pathogenese der DCM.....	11
1.5.3 miR-301a-3p.....	12
1.6 Fragestellung dieser Arbeit.....	14
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.2 Chemikalien.....	17
2.1.3 Enzyme.....	18
2.1.4 Primärantikörper	19
2.1.5 Sekundärantikörper	19
2.1.6 Kits.....	19

2.1.7	Vektoren/Plasmide	20
2.1.8	Oligonukleotide	21
2.1.9	Puffer	24
2.1.10	Medien	26
2.1.11	Zelllinien	27
2.1.12	Versuchstiere	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	<i>In silico</i> Untersuchung nach Zielstrukturen der miR-301a-3p	28
2.2.2	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	28
2.2.3	Zellkultur Methoden	32
2.2.4	Klonierung	36
2.2.5	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	40
3	Ergebnisse	49
3.1	Suche nach Zielstrukturen der miR-301a	49
3.1.1	Ergebnisse der <i>in silico</i> Suche nach Zielstrukturen der miR-301a	49
3.1.2	Cofilin-2 als Zielstruktur der miR-301a	50
3.1.3	Regulation der Translation von Cofilin-2 durch miR-301a	52
3.1.4	Konservierung der miR-301a Bindestellen in verschiedenen Spezies	53
3.2	Heraufregulation von Cofilin-2 im Calsarcin-1 defizienten Mausmodell	55
3.3	Cofilin-2 und miR-301a in anderen Mausmodellen des Herzversagens	56
3.3.1	Cofilin-2 und miR-301a im Calcineurin transgenen Mausmodell	57
3.3.2	Cofilin-2 und miR-301a in MLP defizienten Mausmodell	58
3.4	Effekt der <i>in vitro</i> Herunterregulation von Calsarcin-1 Expression auf miR-301a	59
3.5	Vergleich der Expression von Cofilin-2 und miR-301a zwischen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten	59
3.6	Expressionsmuster der miR-301a in verschiedenen Geweben	61
3.7	Serum Response Faktor Aktivität in Abhängigkeit von Cofilin-2 und miR-301a	62
3.7.1	Generierung eines Cofilin-2 Überexpressionskonstrukts und „Knockdown“ von Cofilin-2 in C2C12-Zellen	62

3.7.2	Einfluss von Cofilin-2 und miR-301a auf die SRF-Aktivität in C2C12 Myoblasten	63
3.7.3	Veränderung der Expression von SRF abhängigen Genen in C2C12-Zellen ..	65
3.8	Einfluss von miR-301a/Cofilin-2 auf die Expression von fötalen Genen und Zelloberfläche in NRVCM	66
3.8.1	Heraufregulation von miR-301a führte zu erhöhter Expression von Rcan1-4 ..	66
3.8.2	Minderung von miR-301a führt zu keiner Veränderung Proteinexpression von Rcan1-4	67
3.8.3	Heraufregulation von Cofilin-2 führt zu vermehrter Expression von fötalen Genen und zu Reduktion der Zelloberfläche	68
4	Diskussion.....	70
4.1	Cofilin-2 und miR-301a in Mausmodellen kardialer Pathologien	70
4.2	Auswirkungen von miR-301a und Cofilin-2 auf Hypertrophie	73
4.3	Beeinflussung von SRF durch Cofilin-2 und miR-301a	75
4.4	Schlussfolgerung	78
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	81
7	Abkürzungsverzeichnis	90
8	Danksagung	92
9	Veröffentlichungen	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Therapie von kardialer Hypertrophie	6
Abbildung 2: Schema der microRNA Prozessierung und miR-301a Übersicht.....	11
Abbildung 3: Übersicht der vorhergesagten Zielstrukturen der miR-301a	50
Abbildung 4: Cofilin-2 (Cofilin-2) zeigte sich durch verminderte Luciferaseaktivität von miR-301a reguliert.....	51
Abbildung 5: Die Expression von Cofilin-2 ließ sich durch miR-301a beeinflussen	52
Abbildung 6: Übersicht der miR-301a Bindestellen in der 3'UTR von Cofilin-2	54
Abbildung 7: Cofilin-2 zeigte sich in Calsarcin-1 defizienten Mäusen heraufreguliert.....	56
Abbildung 8: Cofilin-2 und miR-301a sind im Calcineurin transgenen Mausmodell heraufreguliert.....	57
Abbildung 9: Cofilin-2 und miR-301a sind im MLP defizienten Mausmodell (MLP ^{-/-}) heraufreguliert	58
Abbildung 10: Verminderte Expression von Calsarcin-1 in vitro hat keinen Effekt auf die Expression von miR-301a in NRVCN	59
Abbildung 11: Cofilin-2 und miR-301a werden hauptsächlich in NRVCN und weniger in kardialen Fibroblasten exprimiert.....	60
Abbildung 12: Unterschiedliche Expression der miR-301a in verschiedenen Geweben	61
Abbildung 13 Generierung eines Cofilin-2 Überexpressionskonstrukts und „Knockdown“ von Cofilin-2 in C2C12-Zellen	63
Abbildung 14: Cofilin-2 führt zu einer Steigerung und miR-301a zu einer Senkung der SRF-Aktivität in C2C12 Myoblasten).....	64
Abbildung 15: Beeinflussung von Cofilin-2/miR-301a Überexpression auf SRF-abhängige Gene	65
Abbildung 16: Heraufregulation von miR-301a führt zu vermehrter Expression von Rcan1-4	67
Abbildung 17: Minderung der miR-301a Expression führt zu unveränderter Proteinexpression von Rcan1-4.....	68
Abbildung 18: Cofilin-2 Hochregulation führt zu verstärkter Expression fötaler Gene und Verringerung der Zellgröße	69
Abbildung 19: Schematische Übersicht der möglichen Interaktion von Cofilin-2.....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste von eingesetzten Primärantikörper. IF = Immunfluoreszenz, WB = Westernblot.	19
Tabelle 2: Liste von eingesetzten Sekundärantikörpern	19
Tabelle 3: Liste der eingesetzten Primer für die 3'UTR Klonierung	21
Tabelle 4: Liste der Primer für die Realtime-PCR (qRT) Analyse mittels SYBR Green.....	21
Tabelle 5: Liste der Primer und Sonden („probe“) für die Multiplex-PCR mit den zugehörigen Farbstoffen.....	22
Tabelle 6: Liste der eingesetzten Primer für die Mutagenese der durch microrna.org vorhergesagten Bindestellen in der 3'UTR von Cofilin-2	23
Tabelle 7: Liste der eingesetzten Primer für die Klonierung des offenen Leserasters (ORF) von Cofilin-2	23
Tabelle 8: Liste der eingesetzten Primer für die Kolonie PCR.....	24
Tabelle 9: C2C12-Zellen, verwendete Platten, Zellzahlen und Mediummenge	33
Tabelle 10: NRVCM, verwendete Platten, Zellzahlen und Mediummenge	35

1 Einleitung

1.1 Herzkreislaferkrankungen

Weltweit sind Herzkreislaferkrankungen 2013 ursächlich für 32% aller Todesfälle gewesen (1). Eine der dominierenden Erkrankungen aus dieser Gruppe ist die Herzinsuffizienz. So hat die Rotterdam-Studie eine Prävalenz der Herzinsuffizienz von ~7% ergeben (2) und die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit ungefähr 52% angegeben (3). Es wird vermutet, dass bis zu 30-40% der Fälle der Herzinsuffizienz durch die dilatative Kardiomyopathie (DCM) bedingt sein können (4). Wiederum gehört die DCM zur Gruppe der Kardiomyopathien, welche sich aus der DCM, der hypertrophen Kardiomyopathie, der restriktiven Kardiomyopathie, der arrhythmogenen rechtsventrikuläre Kardiomyopathie und den nicht klassifizierten Kardiomyopathien zusammensetzen. Dabei ist die DCM insgesamt die häufigste Erkrankung in dieser Gruppe (5, 6) und zusätzlich auch einer der häufigsten Gründe für Herztransplantationen (4). Da das Überleben mit dieser Krankheit immer noch schlecht ist (7), kann ein besseres Verständnis der Genetik und der pathophysiologischen Zusammenhänge der DCM zur Entwicklung neuer Therapien, Verbesserung der Prognose und Steigerung der Lebensqualität von betroffenen Patienten beitragen.

1.2 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) wird durch das Vorhandensein von Dilatation und Dysfunktion im linken Ventrikel charakterisiert, ohne durch eine koronare Herzkrankheit, Bluthochdruck oder Klappenerkrankungen entstanden zu sein (5). Die Symptome von Betroffenen sind die der Herzinsuffizienz sowie Herzrhythmusstörungen und mit einem hohen Risiko für den plötzlichen Herztod verbunden (8). Typische echokardiographische, diagnostische Befunde sind eine Reduktion der linksventrikulären Verkürzungsfraction (Fractional Shortening) auf <25% oder eine Erhöhung des linksventrikulären, enddiastolischen Durchmessers (LVEDD) auf >117% der Norm bezogen auf Alter und Körperoberfläche (7). Diese echokardiographischen Befunde stehen exemplarisch für die teils massive Dilatation des linken Ventrikels bei der DCM. Die Herzen zeigen teilweise beachtliche Hypertrophie der Kardiomyozyten, die sich in einem gesteigerten Herzgewicht und mikroskopischer Vergrößerung der Kardiomyozyten widerspiegelt. Dies wird häufig von einer myokardialen Fibrose begleitet, was zusammengekommen mit der Dilatation und Hypertrophie für eine verringerte Kontraktilität sorgen kann (9).

Die Prognose dieser verheerenden Erkrankungen ist dementsprechend schlecht und die Patienten entwickeln häufig Herzversagen mit einer Mortalität von circa 25% in einem Jahr und circa 50% über fünf Jahre (10), wenn nicht rechtzeitig ein Spender für eine Transplantation gefunden werden kann.

Ätiologisch gibt es vielfältige Ursachen der Dilatativen Kardiomyopathie. Hier kann in die Kategorien genetischer und nicht genetischer Gründe unterschieden werden. Die nicht genetischen Ursachen umfassen beispielsweise kardiotoxische Medikamente, Alkoholkonsum, Myokarditiden oder sind idiopathischer Genese (5, 11). Jedoch wird in bis zu 50% der Fälle von einer genetischen Kausalität ausgegangen. Weiterhin kann angenommen werden, dass viele Fälle sporadischer oder idiopathischer DCM ebenfalls einen genetischen Hintergrund haben könnten, der bislang lediglich nicht identifiziert worden ist (4). Typische Mutationen finden sich hier zum Beispiel bei 20-25% der familiären DCM im Titin (TTN) Gen oder bei 6% im Lamin A/C (LMNA) (11). Insgesamt gibt es Berichte über mehr als 50 verschiedene Genloci, die betroffen sein können (12). Des Weiteren existieren große Überschneidungen in Genen, deren Mutation eine DCM oder auch eine hypertrophe Kardiomyopathie auslösen können. In vielen Patienten kommt es aber auch zu kombinierten Mutationen an mehreren Genloci (4), wobei die genauen Mechanismen und das Zusammenspiel der verschiedenen Partner auf molekularer Ebene komplex sind und nach wie vor weiterer Forschung bedürfen.

1.2.1 Bedeutung der Sarkomere bei der Entstehung der DCM

Das Sarkomer in Kardiomyozyten ist für deren typische Querstreifung verantwortlich, welche lichtmikroskopisch beobachtet werden kann. Vereinfacht besteht ein Sarkomer aus Z-Scheibe, welche als Ansatzpunkt für filamentöses Aktin, Nebulin und Titin dient, sowie der M-Bande, die als Ausgangspunkt des Myosins dient und mit der Z-Scheibe indirekt über die Myosinköpfe verbunden ist, indem sie an dem Aktin binden können. Das Rückgrat der Z-Scheibe wird aus α -Actinin gebildet und ist unter anderem für die Verankerung des Aktin zuständig. Die einzelnen Sarkomere, welche in einer parallelen Form angeordnet sind, werden durch Intermediärfilamente miteinander verbunden und übertragen ihre Kraft über sogenannte Costamere an das Sarkolemm (13-15). Mutationen im Sarkomer können häufig für eine DCM verantwortlich sein (16-18). Oft kommen Mutationen, die eine DCM auslösen beispielsweise im bereits erwähnten Titin (TTN) (19) oder Myosin (20) vor. Neben Bestandteilen des Sarkomers an sich führen auch Mutationen in Z-Scheiben assoziierten Genen wie dem Muscle-LIM-Protein (MLP) (21) oder Cypher/ZASP zur DCM (22). Es wird vermutet, dass 35%-40% der genetischen Fälle der DCM durch Mutation in Sarkomer-Proteinen hervorgerufen werden (17), was die außerordentliche Rolle des Sarkomers und ihrer Bestandteile bei der Entstehung der DCM anzeigt

(23). Insbesondere die Z-Scheibe ist hier hervorzuheben, da kürzlich eine wachsende Zahl von Bindungspartner und Interaktionen hier entdeckt worden sind, die Einfluss auf die Entstehung einer DCM nehmen können (15). Somit haben solche hier wirkenden Proteine eine hohe Wahrscheinlichkeit an der molekularen Pathogenese der DCM beteiligt zu sein.

1.2.2 Aktinstoffwechsel in der DCM

Ein essenzieller Bestandteil der Sarkomere ist das filamentöse Aktin (F-Aktin), welches die vom Myosin ausgehende Kraft überträgt. Zusätzlich ist es ein wichtiger Bestandteil des Zytoskelettes der Zellen und wird aus monomerem G-Aktin gebildet. Im Herzen werden zwei Isoformen exprimiert, nämlich das kardiale α -Aktin (ACTC1) und das muskuloskelettale α -Aktin (ACTA1) (24). Die Verteilung der α -Aktin-Isoformen ist je nach Spezies, Alter und Beanspruchung des Herzens unterschiedlich. So findet sich in Nagern generell weniger ACTA1 im Herzen als im Menschen, wohingegen es dort im adulten Herzen die vorherrschende Isoform ist (25). Dabei zeigt sich eine stetige Heraufregulation von ACTA1 während der Entwicklung und Alterung des Herzens (25, 26). Außerdem wird davon ausgegangen, dass sich ACTA1 und ACTC1 in ihrer Funktion unterscheiden, da ACTA1 mit einer verstärkten Kontraktilität des Herzmuskels einhergeht (27). Weiterhin kommt es bei Herzinsuffizienz mit kardialer Hypertrophie und Fibrose generell zur Steigerung der ACTA1 Expression. Diese finden sich vor allem in den fibrotischen Arealen mit hoher mechanischer Belastung (28), was Rückschlüsse auf den funktionellen Unterschied zwischen den einzelnen Isoformen erlauben kann (29). Darüber hinaus können Mutationen im ACTC1 Gen, die mit einer gestörten Kraftübertragung im Sarkomer einhergehen, zu einer DCM führen (30). ACTA1 Mutation resultieren wiederum hauptsächlich in einer Myopathie der Skelettmuskeln (31).

Die Regulierung des Aktinstoffwechsels wird auch als Aktindynamik bezeichnet, da es sich nicht um ein starres System handelt, sondern viele verschiedene Faktoren dynamisch auf es einwirken, sodass ein komplexes System mit vielen regulatorisch wirksamen Partnern gebildet wird. Es wird vermutet, dass Aktin das Protein mit den meisten Protein-Protein-Interaktionen überhaupt sein könnte (32). Vereinfacht gesagt kommt Aktin in zwei Zuständen in den Zellen vor. Zum einen als monomeres G-Aktin und zum anderen als filamentöses F-Aktin. Obendrein hat das F-Aktin zwei Enden: das (-) Ende („pointed end“) und das (+) Ende („barbed end“). G-Aktin ist im Vorfeld mit ATP beladen, was im Filament allmählich zu ADP + Pi dissoziiert, sodass es als das „gealterte“ Aktin identifiziert werden kann und durch die ADF/Cofilin-Familie vom F-Aktin abgetrennt werden kann. Der An- und Abbau des F-Aktin erfolgt an beiden Enden, was allerdings nicht gleichförmig geschieht, sondern am (-) Ende langsamer als am (+) Ende. Dieser Mechanismus aus An- und Abbau wird auch als „Tretmühlenmechanismus“ bezeichnet

(33, 34). Die Regulierung des Aktinstoffwechsels unterliegt insbesondere dem Serum Response Faktor (SRF), da SRF abhängig vom Aktinhalt der Zelle die Transkription von Aktin sowie von weiteren regulatorisch beteiligten Genen anregt und somit entscheidend für die Aktindynamik ist (35). Im Herzen geschieht dies zusammen mit dem Koaktivator Myokardin (36). Mutationen von SRF an sich (37-40) oder in mit ihm assoziierte Proteine (41) sind auch an der Entstehung einer DCM beteiligt, was die zentrale Rolle von SRF und Aktin in der Pathogenese der DCM anzeigt.

1.3 Remodeling bei der dilatativen Kardiomyopathie

Die pathologischen Veränderungen des Herzens bei der DCM und auch bei weiteren kardialen Erkrankungen werden unter dem Begriff des kardialen Remodelings zusammengefasst. Dazu zählen die bereits erwähnte Dilatation und Ausdünnung des linken Ventrikels, aber auch myokardiale Fibrose, funktionelle Mitralklappeninsuffizienz, dyssynchrone Ventrikelkontraktion und die Vergrößerung von anderen Herzhöhlen. Auf zellulärer Ebene ist unter anderem eine vermehrte Apoptose sowie eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zu beobachten (42, 43). Zudem sind häufig unterschiedliche Phänotypen in der DCM aufzufinden, da die Patienten die unterschiedlichen Teilaspekte des Remodelings in individueller Ausprägung präsentieren (42).

Die Umkehr dieses Prozesses, welcher auf lange Sicht prognoseverschlechternd wirkt, stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar (44). Bei der Therapie der DCM steht vor allem die Behandlung der aus ihr resultierenden Herzinsuffizienz im Vordergrund. Doch wird somit auch pharmakologisch auf das Remodeling eingewirkt, um ein Vorschreiten der pathologischen Veränderungen zu unterbinden (9). So hat beispielsweise der Einsatz von einem β -Blockers einen förderlichen Einfluss auf die Umkehr des ventrikulären Remodelings, indem es zu einem verminderten linksventrikulären, endsystolischen Volumen und einem erhöhten Fractional Shortening kommt (45). Aus der Erforschung weiterer Aspekte des Remodelings könnten sich so neue Therapieansätze finden lassen.

1.3.1 Kardiale Hypertrophie

Die kardiale Hypertrophie stellt einen Teil des Remodelings und einen Baustein in der Pathologie der DCM dar. Sie beschreibt einen Adaptionsprozess des Herzens und seines zellulären Apparates gegenüber verschiedenen Stimuli wie biomechanischem Stress, um die Wandspannung im Herzen zu normalisieren (46). Dabei ist die Hypertrophie durch das Vorhandensein

folgender Charakteristika definiert. Zum einen kommt es zur Vergrößerung der Kardiomyozyten, die in einer Steigerung des Herzgewichtes resultieren kann. Zum anderen zeigt sich ein typisches Genprofil als vermehrt exprimiert. Diese Gene werden wegen ihrer Rolle in der Embryonalperiode des Herzens auch als fötale Gene bezeichnet. Dazu gehören neben weiteren Mitgliedern die Gene *Nppa*, das für das Atriale natriuretische Peptid (ANF) codiert und *Nppb*, welches für das natriuretische Peptid Typ B (BNP) codiert (46-48). Ursächlich kann zwischen extrinsischen und intrinsischen Auslösern der Hypertrophie differenziert werden. Typische extrinsische Ursachen sind Klappenerkrankungen und arterielle Hypertonie, die mit einer Druck- und/oder Volumenbelastung des Herzens einhergehen. Zu den intrinsischen Ursachen werden die Kardiomyopathien gezählt (46).

Bei der Hypertrophie handelt es sich um einen Anpassungsprozess, der im Herzen als Reaktion auf eine veränderte Belastung auftritt. Allerdings führt eine überschießende Hypertrophie zu einer Maladaptation, die dann das Gegenteil bewirken kann, sodass die reibungslose Funktion des Herzens nicht mehr gewährleistet ist. Dies wird dann auch als pathologische Hypertrophie bezeichnet (49). Diese unterscheidet sich von der durch körperliche Betätigung ausgelöste physiologische Hypertrophie unter anderem in der Expression der Myosin-Isoformen (50) und einer höheren Expression Hypertrophie assoziierter Marker wie beispielsweise BNP (51). Insgesamt scheint die Aktivierung anderer Signalwege den Unterschied zwischen pathologischer und physiologischer Hypertrophie auszumachen (49, 52).

1.3.2 Pathologische kardiale Hypertrophie

In einem initial von Meerson vorgestellten Modell wird von verschiedenen Phasen der Hypertrophie ausgegangen (53). Dabei soll die Hypertrophie als kurzzeitige Reaktion auf pathologischen Stress von Vorteil für das Herz sein, wohingegen die länger andauernde Hypertrophie mit einer schlechteren Funktion der Ventrikel und Prognose assoziiert ist und die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigen kann (Abbildung 1) (54). Darüber hinaus kann gesagt werden, dass kardiale Hypertrophie kompensatorisch nicht immer gebraucht wird, da bei kurzzeitiger Druckbelastung eine Inhibition der hypertrophen Antwort keine Verschlechterung des Zustandes des Herzens ergibt (55). Dass es sich bei der Hypertrophie um eine Maladaptation handelt, zeigen die Auswirkungen auf den Menschen, wenn diese länger andauert. So geht die pathologische Hypertrophie des Herzens mit einer verschlechterten Prognose, erhöhter Mortalität und dem gesteigerten Auftreten von Herzinsuffizienz einher (56, 57). Zusätzlich haben Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie ein signifikant höheres Risiko für den plötzlichen Herztod (58). Die Therapie der Hypertrophie und Herzinsuffizienz beschränkt sich mitunter auf die vermuteten Auslöser wie die Behandlung von Klappenerkrankungen oder die Senkung der

chronischen Aktivierung neurohumoraler Faktoren und beinhaltet verschiedene pharmakologische Substanzen wie β -Blocker und ACE-Hemmer, um dem entgegenzuwirken (Abbildung 1). Hier könnte die Behandlung der Hypertrophie ein neuer Ansatz mit ähnlicher Wirkung sein (54), was gerade bei Kardiomyopathien vorteilhaft sein könnte, da diese meistens einen genetischen Hintergrund besitzen und somit ein behandelbarer Auslöser fehlt.

Die Entstehung der Hypertrophie auf molekularer Ebene ist hierfür ein wichtiger Ansatz, da ein tiefes Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge potentiell bei der Entwicklung von Therapien hilfreich sein könnte. Ein wichtiger Signalweg basiert hierbei auf der Phosphatase Calcineurin.

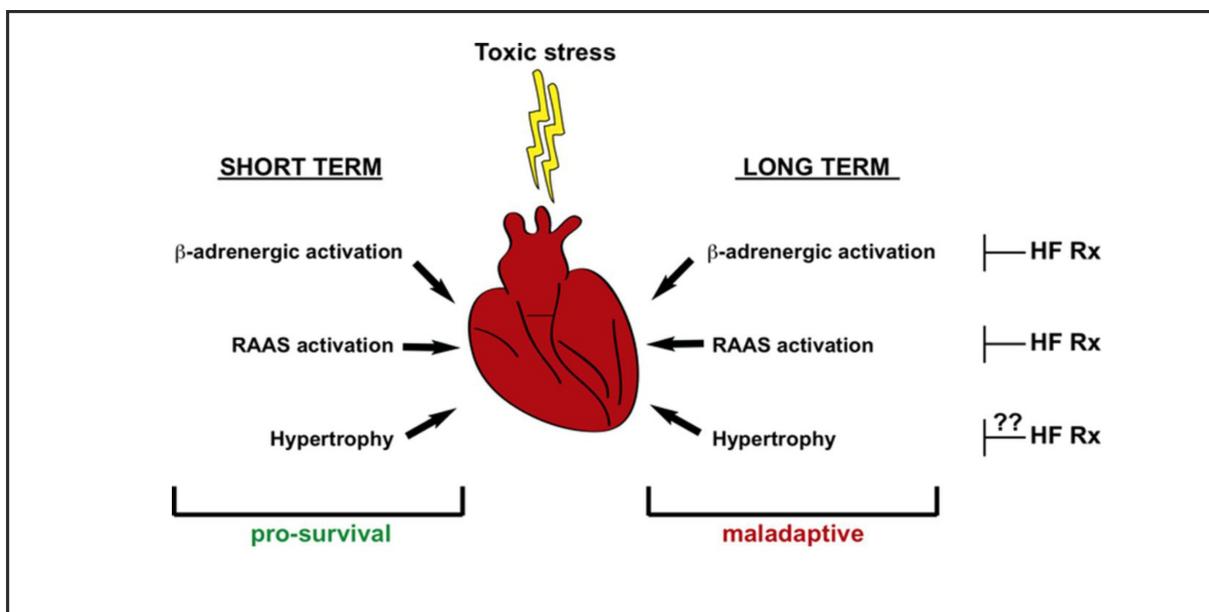


Abbildung 1: Modell der Therapie von kardialer Hypertrophie. Aus Schiattarella et al. 2015 (54). Stress führt im Herzen unter anderem zu β -adrenerger-Aktivierung und RAAS-Stimulation (Renin-Angiotension-Aldosteron-System) sowie zu Hypertrophie und ist im kurzen Zeitraum vorteilhaft. Auf lange Zeit betrachtet scheint es eher maladaptiv zu sein. Allerdings kann nur auf zwei Teilaspekte therapeutisch eingewirkt werden (HF Rx; Herzinsuffizienz-Medikation, β -Blocker und ACE-Hemmer). Eine direkte Medikation gegen die Hypertrophie fehlt noch.

1.4 Calcineurin Signalweg

Calcineurin ist eine ubiquitär vorkommende, Calcium/Calmodulin-abhängige Serin-/Threonin-Protein-Phosphatase. Bei ihr handelt es sich um einen Heterodimer, der aus einer katalytischen Untereinheit A (CnA) und einer regulatorischen Untereinheit (CnB) besteht (59). Für die Untereinheit A codieren drei Gene in Säugetieren, nämlich CnA α , CnA β und CnA γ , wovon nur

CnA α und CnA β im Herzen exprimiert werden und CnA β die stressensitive Isoform ist (60). Von der Untereinheit B gibt es zwei Isoformen CnB1 und CnB2, wobei im Herzen nur CnB1 exprimiert wird (61). Die Funktion von Calcineurin im Allgemeinen beläuft sich auf die Dephosphorylierung von Serinresten des Transkriptionsfaktors NFATc („*Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic*“), welcher daraufhin in den Nukleus translokalisiert und dort für die Transkription verschiedener Gene wie beispielsweise solche, die Hypertrophie fördern, verantwortlich ist. Die Aktivierung Calcineurins geschieht abhängig von Ca²⁺ und Calmodulin (62, 63). Bekannt ist Calcineurin hauptsächlich als Ziel von pharmakologischen Inhibitoren wie beispielsweise Ciclosporin A, welches durch Inhibition von Calcineurin in T-Zellen zu einer Immunmodulation führt und nach Transplantationen zur Immunsuppression oder zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen eingesetzt werden kann (64-66).

1.4.1 Calcineurin bei kardialer Hypertrophie

Eine Verbindung zwischen kardialer Hypertrophie und dem Calcineurin-Signalweg ist erstmalig von Molkentin und anderen 1998 beschrieben worden. Es ist gezeigt worden, dass Calcineurin im transgenen Mausmodell NFAT3 aktiviert. Wiederum interagiert NFAT3 nach seiner Translokation in den Nukleus dort mit GATA4 und führt zur Expression Hypertrophie fördernder Gene. Die Tiere entwickeln eine deutliche Hypertrophie mit Herzversagen, welche durch Einsatz von Calcineurin Inhibitoren wie Ciclosporin A aufgehoben werden kann, was die Bedeutung von Calcineurin bei der Entstehung von kardialer Hypertrophie verdeutlicht (67). Seitdem ist Calcineurin verstärkt in das Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt. Im Menschen ist unter anderem sowohl bei der hypertrophen, obstruktiven Kardiomyopathie als auch bei Druckbelastung des linken Ventrikels durch eine Aortenstenose eine vermehrte Calcineurin Aktivität nachweisbar (68). Das Fehlen von CnA β lässt im Mausmodell das Entwickeln einer Hypertrophie bei Druckbelastung (TAC, „*transverse aortic constriction*“) oder chronischer Angiotensin-II Infusion nicht zu, was die zentrale Rolle Calcineurins bei der Entstehung kardialer Hypertrophie weiter festigt (60). Ebenfalls führt die *in vitro* Inhibition von Calcineurin dazu passend zu aufgehobener Reaktion auf hypertrophe Stimuli wie Phenylephrin oder Angiotensin II (69). In verschiedenen Tiermodellen der Kardiomyopathien deutet sich *in vivo* ebenfalls durch Inhibition von Calcineurin eine Reduktion der Hypertrophie an (70). Eine Übersichtarbeit, die verschiedene Tiermodelle auf Calcineurin-Inhibition durch Ciclosporin A und FK506 sowie deren Auswirkungen auf kardiale Hypertrophie untersucht, kommt zu dem Schluss, dass Calcineurininhibition zwar potentiell hilfreich zur Prävention kardialer Hypertrophie sein könnte. Allerdings kommt es zu teils erheblichen intra- und extrakardialen Nebenwirkungen dieser Substanzen und aufgrund einiger widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Studien, bleibt die

exakte Wirkweise dieser Substanzen unklar. Zusammengenommen erschwert dies einen therapeutischen Nutzen der Calcineurin-Inhibition durch diese Substanzen (62).

Darüber hinaus kann moderate Überexpression von Calcineurin in einem Mausmodell der dilatativen Kardiomyopathie, *MLP^{-/-}* (71), das Herz auch vor Dysfunktion schützen (72). Die komplexe Position, die Calcineurin einnimmt, wird auch dadurch deutlich, dass sich vermehrte Calcineurin-Aktivität lediglich in pathologischer Hypertrophie und nicht bei physiologischer Hypertrophie findet (73). Weitere Arbeiten haben ergeben, dass es sogar eher zu reduzierter Calcineurin-Aktivität bei physiologischer Hypertrophie kommt (74). Die Regulierung des Calcineurin-Signalweges untersteht diversen Interaktionspartnern und Modulatoren. So wirkt exemplarisch *Lmcd1* (auch als Dyxin bekannt) als starker Koaktivator für Calcineurin, dessen Fehlen in verringerter Calcineurin-Aktivität resultiert und *in vivo* bei gleichzeitiger Überexpression von CnA und *Lmcd1* zu einer Exazerbation des kardialen Phänotyps führt (75). Ein weiterer Modulator ist *Rcan1-4*, dessen Proteinexpression die Calcineurin-Aktivität anzeigt (76). So sind *Rcan1-4* sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte auf Calcineurin zugewiesen worden (77, 78), die möglicherweise je nach Expressionsniveau von *Rcan1-4* hervorgerufen werden (79). Ein weiterer negativer Modulator der Calcineurin-Aktivität ist Calsarcin-1, dessen Verlust ebenso in einer Exazerbation der kardialen Veränderungen mündet (80, 81).

Zusammenfassend kann der Calcineurin-NFAT- Signalweg als ein obligater Regulator bei der Entwicklung von pathologischer, kardialer Hypertrophie zusammengefasst werden, der einer komplexen Regulierungskaskade unterliegt (74).

1.4.2 Calsarcin-1

Das bereits erwähnte Calsarcin-1 Protein ist auch unter dem Namen Myozenin-2 bekannt und wird von dem Gen *Myoz2* codiert. Bei Calsarcin-1 handelt es sich um ein ~30kDa großes Protein, welches herz- und skelettmuskelspezifisch exprimiert wird und an der Z-Scheibe lokalisiert ist. Dort interagiert es mit α -Actinin und zieht die katalytischen Untereinheit von Calcineurin dorthin (81). Calsarcin-1 agiert als negativer Modulator der Calcineurin-Aktivität. Im gemischten Hintergrund zeigen Calsarcin-1^{-/-} Tiere keinen Phänotyp unter Normalbedingungen. Allerdings sind fötale Gene wie *Nppa* und *Nppb* sowie *Rcan1-4* deutlich verstärkt exprimiert, ohne dabei wirkliche Hypertrophie zu zeigen. Doch lässt sich eine massive Zunahme der Hypertrophie und Dilatation des Herzens bei Druckbelastung durch TAC oder Kreuzung mit Calcineurin Transgenen Mäusen erreichen, die auf eine Enthemmung der Calcineurin Aktivität zurückgeführt werden kann (80). Auf der anderen Seite schützt Calsarcin-1 Überexpression *in vitro* vor Phenylephrin und Endothelin-1 induzierter Hypertrophie. *In vivo* lässt sich in einem

transgenen Mausmodell Angiotensin-II induzierte kardiale Hypertrophie abwenden (82). Weiterhin stellen bestimmte Mutationen von Calsarcin-1 auch Calcineurin unabhängige Auslöser einer hypertrophen Kardiomyopathie dar (83).

1.4.3 Calsarcin-1 defizientes Mausmodell im C57Bl/6 Hintergrund

Im gemischten Hintergrund zeigt das Calsarcin-1^{-/-}-Modell keinen grundsätzlichen Phänotyp, sondern erst dann, wenn ein bestimmter pathologischer Stress vorhanden ist (80). Dies ändert sich, wenn die Mäuse von einem gemischten in einen reinen C57BL/6-Hintergrund gekreuzt werden. Diese Mauslinie ist generell dafür bekannt, besonders sensitiv für kardiovaskuläre Veränderungen zu sein (84). So reagieren diese Mäuse im Vergleich zu anderen robusteren Mauslinien wie 129S1/SvImJ auf Druckbelastung durch TAC mit einem früheren Einsetzen exzentrischer Hypertrophie und Herzversagen (85). Hier zeigt Calsarcin-1 Defizienz nun einen rein dilatativen Phänotyp mit reduziertem Fractional Shortening und Anstieg des LVEDD, ohne weitere Begleiterscheinungen wie Hypertrophie und Fibrose zu präsentieren (86-88). Ausgehend von diesem Mausmodell ist nun in unserer Arbeitsgruppe genomweit nach differentiell regulierten microRNAs gesucht worden. Die Ergebnisse dieses Suchexperimentes sind in einem neuen, unabhängigen Kollektiv verifiziert worden und identifizieren die miR-301a-3p als solche, welche deutlich vermindert in Calsarcin-1^{-/-} Tieren exprimiert wird (86).

1.5 MicroRNAs

Erstmals sind microRNAs 1993 von Lee und anderen in den Fadenwürmern (*C. elegans*) beschrieben worden. Mit *lin-4* ist hier ein Gen beschrieben worden, welches für einen 61 Basenpaar (nt) langen Vorläufer einer microRNA codierte, welche dann zu einer 22nt microRNA gereift ist (89). Zusammen mit der gleichzeitig erschienenen Arbeit von Wrightman et al. kann ein posttranskriptioneller, inhibitorischer Effekt dieser microRNA auf das Protein LIN-14 beschrieben werden, sodass hier erstmalig die Regulation der Translation eines Proteins durch eine microRNA gezeigt worden ist (90). Anfangs ist die Regulierung durch microRNAs für eine Einmaligkeit in Fadenwürmern gehalten worden. Mit der Identifizierung von mehreren microRNAs in humanen Zellen kann von einem generellen Mechanismus auch in Säugetieren ausgegangen werden (91). Nachdem die Deletion von miR-15 und miR-16 bei Chronisch Lymphatischer Leukämie entdeckt worden ist, konnte erstmalig eine Verknüpfung zwischen einer Krankheit und microRNAs hergestellt werden (92). So hat Anfang der 2000er Jahre eine intensivere

Auseinandersetzung mit microRNAs begonnen, welches die Klärung der Frage nach einer Beteiligung der microRNAs in der molekularen Pathogenese von verschiedensten Erkrankungen zum Ziel hat.

Aktuell codieren mehr als 1000 Gensequenzen im menschlichen Genom für microRNAs, welche unter anderem in Introns von proteincodierenden Sequenzen oder auch zwischen Genen vorkommen können (93, 94). Die Datenbank miR2Disease zählt im Moment 349 microRNAs (Stand 10/17), die in der Pathogenese von 163 verschiedenen Erkrankungen involviert sind (95). Durch ein grundlegendes Verständnis ihrer Funktionsweise in An- und Abwesenheit von Krankheiten könnten sich so potentielle Therapieansätze finden lassen. Eine Möglichkeit der Therapie besteht beispielsweise in der Inhibition von microRNAs. Dafür ist ein wichtiges Werkzeug der *in vivo* Einsatz von AntagomiRs (96). Im Primaten ist so durch den Einsatz von microRNA-Inhibitoren gezeigt worden, dass sich bei einer chronischen Hepatitis C die Virämie senken lässt und sich die virusinduzierte Leberzellveränderung bessert (97). Dies verdeutlicht das enorme Potential, welches sich aus der Erforschung von microRNAs ergeben kann.

1.5.1 Funktionsweise von microRNAs

Die Biogenese von microRNAs (A, Abbildung 2) beginnt im Zellkern mit der Transkription. Dafür ist normalerweise die RNA Polymerase II zuständig, welche eine sogenannte primäre microRNA (Pri-miRNA) mit der charakteristischen Haarnadelstruktur erstellt (98). Diese besitzt wie eine proteincodierende mRNA ebenfalls eine 5'-Cap-Struktur und einen Poly-A-Schwanz und kann gleichzeitig als mRNA für ein Protein dienen, wenn die microRNA Struktur in der 3'UTR sitzt (99). Solch eine Pri-miRNA kann bei polycistronischen microRNAs auch mehrere Vorläufer und somit mehrere microRNAs enthalten (A, Abbildung 2) (98, 100). Durch die Haarnadelstruktur können microRNAs in der Pri-miRNA identifiziert und durch die nukleäre RNase Drosha herausgeschnitten werden, sodass eine kleinere Vorläufer-microRNA mit ~70 Basenpaaren und einem 2-nt starken Rest am 5'-Ende entsteht, nämlich die Pre-miRNA (101). Mit Hilfe des Proteins Exportin-5 wird die Pre-miRNA GTP abhängig aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert (102, 103). Durch den Überhang am 5'-Ende kann das zytoplasmatische Protein Dicer die Pre-miRNA erkennen (104) und erneut schneiden, sodass ein Komplex mit zwei reifen microRNAs von 21-24-nt Länge entsteht, indem sowohl das 5' und 3'-Ende als auch die Schlaufe entfernt werden (105). In diesem Komplex werden die microRNAs je nach ursprünglicher Position in der Haarnadelstruktur mit dem 3p oder 5p Suffix versehen (106). Im weiteren Verlauf werden die microRNAs zum Teil des sogenannten RISC („RNA-induced silencing complex“), welcher die Effekte der microRNA auf die mRNA vermittelt (107). Diese um-

fassen die posttranskriptionelle, hemmende Genregulation, indem es neben weiteren Mechanismen unter anderem zu einer Hemmung der Translation sowie eventuell zu einer Degradierung der mRNA kommt (108, 109).

Die Bindung der microRNA an die Ziel-mRNA erfolgt im Bereich der 3'-untranslatierten-Region (3'UTR) der mRNA. Dafür ist essenziell, dass die sogenannte "Seed"-Sequenz, welche sich von Base zwei bis sieben des 5'-Endes der microRNA erstreckt, exakt komplementär ist, wobei die restlichen Basen regelhaft nicht exakt übereinstimmen (110).

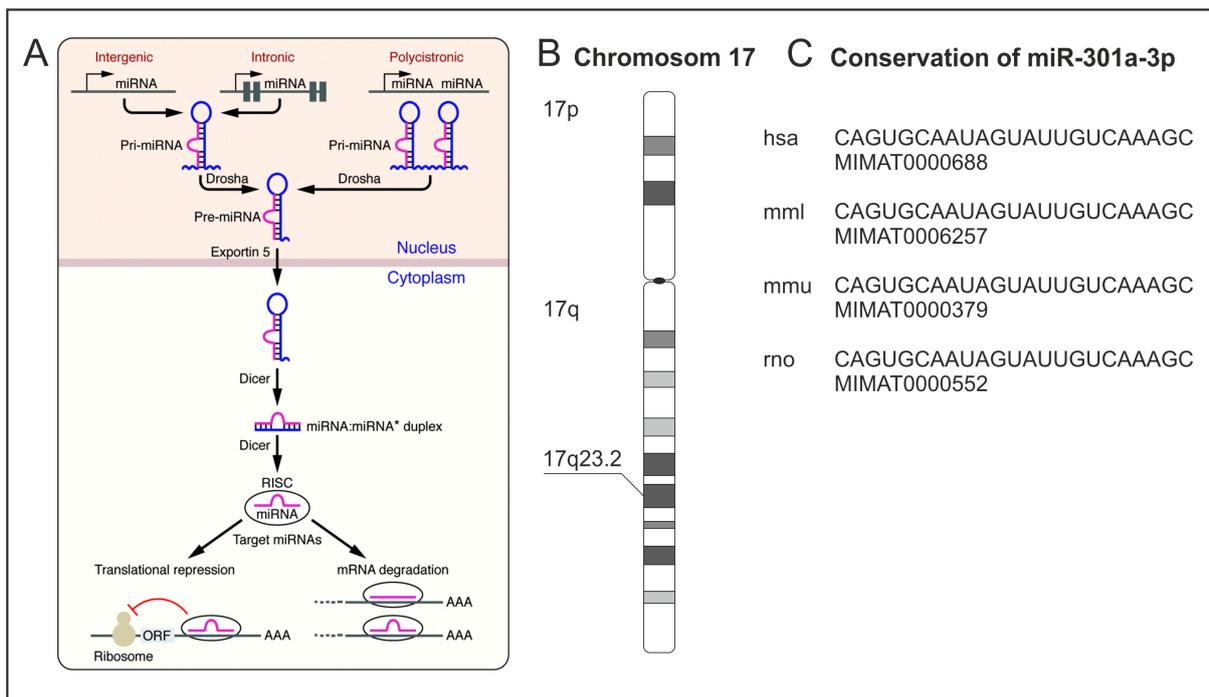


Abbildung 2: Schema der microRNA Prozessierung und miR-301a Übersicht. A; Vereinfachte, schematische Übersicht der allgemeinen microRNA-Prozessierung und Funktion. Quelle: van Rooij, 2011 (111). B; Darstellung des humanen Chromosom 17 (17p = kurzer Arm, 17q = langer Arm) mit Genlokus von miR-310a. C; Konservierung von miR-301a in Mensch (hsa), Rhesusaffe (mml), Hausmaus (mmu) und Wanderratte (rno) mit der jeweiligen miR-301a Sequenz und zugehöriger Identifikationsnummer (Accession number).

1.5.2 Bedeutung von microRNAs in der Pathogenese der DCM

MicroRNAs haben in der gegenwärtigen kardiovaskulären Forschung einen hohen Stellenwert mit einer steigenden Zahl von Arbeiten, die dazu jährlich publiziert werden. Die Relevanz eines funktionierenden microRNA-Apparates im Herzen wird durch ihr Fehlen deutlich. So hat der

herzspezifische Verlust von dem Protein Dicer, welches für die Reifung der microRNAs essenziell ist (105), während der pränatalen Entwicklung des Herzens letale Folgen (112). Ein weiteres Mausmodell mit herzspezifischem Verlust von Dicer zeigt bei Einsatz des α -MHC Promotors den Phänotyp einer DCM mit einer vollständigen Letalität bis Tag vier aufgrund Herzversagens (113). Auch die herzspezifische Deletion des Gens *dgcr8*, welches an der Biogenese der microRNAs in Zusammenarbeit mit Drosha beteiligt ist (114), zeigt das Bild einer DCM mit gestörter Herzfunktion bei Störung der microRNA Funktion im Allgemeinen (115). Diese Modelle verdeutlichen zusammen betrachtet die grundlegende Bedeutung der microRNAs als Regulatoren bei der Entstehung von kardialen Erkrankungen wie der DCM.

Des Weiteren sind microRNAs nicht nur in ihrer Gesamtheit beteiligt, sondern auch einzelne, spezielle microRNAs haben vielfältige Auswirkungen auf die verschiedenen Merkmale kardialer Erkrankungen. So führt zum Beispiel der „Doppelknockout“ von miR-133-1/2 zu einem dilatativen Phänotyp (116). Dass auch einzelne microRNAs an der Pathogenese der DCM beteiligt sind, zeigt sich an dem Beispiel der miR-208, welche herzspezifisch exprimiert wird und für die Signalübertragung in Kardiomyozyten bei der Induktion von Hypertrophie durch α -MHC bei kardialen Stress benötigt wird (117). Weiterhin gibt es gerade bezüglich der Hypertrophie in Kardiomyozyten sowohl Hypertrophie fördernde microRNAs wie miRNA-22, miRNA-23a, miRNA-212 und miRNA-132, als auch protektiv gegenüber Hypertrophie wirkende microRNAs wie miRNA-1, miRNA-133a und miRNA-378 (93). Die Identifizierung differentiell regulierter microRNAs stellt somit einen wichtigen Punkt dar, um deren Interaktionen in den verschiedenen Signalwegen zu erläutern, damit sich gegebenenfalls hieraus Therapien ableiten könnten. So sind schon einige microRNAs im Herzen identifiziert worden, die beispielsweise beim Herzversagen verändert exprimiert werden (118). Durch ein Suchexperiment sind nun neue differentiell regulierte microRNAs im Calsarcin-1^{-/-} Mausmodell identifiziert worden (88).

1.5.3 miR-301a-3p

Wie bereits erwähnt ist im Calsarcin-1^{-/-} Mausmodell die miR-301a-3p (kurz miR-301a) als vermindert exprimiert vorgefunden worden (86). Allgemein ist über die miR-301a bekannt, dass sie im ersten Intron des *Ska2*-Gens auf Chromosom 17q23.2 des Menschen (B, Abbildung 2) liegt und 23 Nukleotide besitzt (119, 120). Des Weiteren stimmen die Sequenzen der miR-301a nach miRBase.org (106, 121-124) in den Spezies Mensch, Ratte, Maus und Rhesusaffe exakt miteinander überein (C, Abbildung 2).

Der miR-301a wird aktuell vorwiegend eine Rolle in der Pathogenese von Tumorerkrankungen zugeschrieben. So soll sie als ein Onkogen in Prostatakarzinomzellen fungieren, da sie einerseits vermehrt exprimiert wird und andererseits über ihre Zielstruktur, p63, zu einem Verlust

von E-Cadherin führt. Es wird diskutiert, ob miR-301a als prädiktiver Marker für Prostatakrebsrezidive eingesetzt werden könnte (125). Eine weitere Studie untermauert die Funktion der miR-301a als potentieller Biomarker beim Prostatakarzinom, indem sie sie als Marker für Metastasierung beschreiben (126). Auch zeigt beim Prostatakarzinom die Hypoxie induzierte Hochregulation der miR-301a eine verbesserte Lebensfähigkeit der Zellen und eine Reduzierung der Apoptose durch ihr Ziel *NDRG2* (127). Ähnliche Ergebnisse finden sich auch beim Magenkarzinom, da miR-301a die Zellgrößenzunahme, die Invasion und Migration fördert sowie Apoptose vermindert, was durch die Zielstruktur *RUNX3* vermittelt werden soll (128). Im Übrigen gibt es in Gliomzellen eine Verknüpfung von miR-301a zum Wnt/ β -catenin Signalweg, da es Wnt/ β -catenin vermittelt zu einer Aktivierung von miR-301a kommt, welche wiederum zu einer Steigerung der Invasion führt (129).

Als weitere Hauptfunktion von miR-301a wird die proinflammatorische Wirkung durch die positive Beeinflussung des Stat3-Signalweges angegeben (130). Durch Kreation eines konstitutiven „Knockout“ Mausmodells der miR-301a (*miR-301a^{-/-}*) ist gezeigt worden, dass zum einen in den *miR-301a^{-/-}* Tieren die Tumorgenese bezüglich pulmonalen Malignitäten vermindert ist und dass zum anderen miR-301a Abstinenz vor Entzündung im Kolon schützt. Die Aktivität der proinflammatorischen Signalwege von NF- κ B und Stat3 ist in diesem Modell geringer, da die Aktivierung durch miR-301a wegfällt. Auffällig ist, dass bei den *miR-301a^{-/-}* Tieren kein offensichtlicher Phänotyp unter Normalbedingungen beobachtet wird. Somit kann angenommen werden, dass es für die Entwicklung nicht entscheidend ist (131). Die eben erwähnte Aktivierung von NF- κ B ist erstmalig in Pankreaskarzinomzellen beschrieben worden und stellt sich durch Regulation des auf die NF- κ B Aktivität inhibitorisch wirkenden NF- κ B-repressing factor, *Nkrf*, dar. Darüber hinaus kommt es zu gesteigerter Expression von miR-301a bei erhöhter NF- κ B Aktivität, was eine positive Rückkopplung darstellt und somit die proinflammatorische Wirkung von miR-301a unterstreicht (132).

Zusammenfassend belaufen sich die bislang bekannten Funktionen von miR-301a auf proinflammatorische, antiapoptotische sowie malignitätssteigernde Wirkungen mit Verknüpfungen zu diversen Signalwegen. Darüber hinaus scheint miR-301a für die Entwicklung keine essenzielle Rolle zu spielen und bislang ist keine Verbindung mit kardialen Erkrankungen beschrieben worden.

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Mit der Frage nach den Beteiligungen von microRNAs bei kardialen Erkrankungen ist sich besonders in den letzten Jahren intensiv beschäftigt worden. Doch bleiben nach wie vor Lücken bestehen, wenn es um microRNAs geht, die an der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie beteiligt sind. Deshalb ist es wichtig solche microRNAs zu identifizieren, die in Mausmodellen der DCM differentiell reguliert sind und so am ehesten in der molekularen Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt sind. Durch Vorarbeiten hat unsere Arbeitsgruppe die miR-301a als eine solche microRNA identifizieren können, die in einem Mausmodell der DCM, Calsarcin-1^{-/-}, signifikant herunter reguliert ist.

Darauf aufbauend ist das Ziel dieser Arbeit, die Funktionsweise der miR-301a zu verstehen. Nachdem durch *in silico* Suche potentielle Zielstrukturen identifiziert werden, steht im ersten Schritt die Auswahl potentieller vielversprechender Zielstrukturen der miR-301a an. Durch Einsatz von Luciferase-Reportern können die Interaktionen nun aufgedeckt werden. Dennoch sollte die Bindung durch Mutation der Bindestellen und *in vitro* Regulierung verifiziert werden. Folglich ergibt sich, nachdem die miR-301a und ihr Ziel-Gens auch in anderen Mausmodellen kardialer Erkrankungen grundlegend charakterisiert werden, dass die Funktion und das Zusammenspiel der beiden in Kardiomyozyten und Myoblasten untersucht werden sollte. Im Fokus stehen dabei unter anderem ihrer Wirkung durch Steigerung und Blockade der Expression auf kardiomyozytäre Hypertrophie, indem Zelloberfläche und Hypertrophie assoziierte Gene (*Nppa*, *Nppa*) sowie der Marker für Calcineurin-Aktivität (*Rcan1-4*) bestimmt werden. Je nach Zielstruktur sollten auch Wechselwirkungen mit weiteren Signalwege inspiziert werden, wie die Auswirkungen auf die Aktivität des Serum-Response-Faktors.

Somit soll diese Arbeit ein besseres Verständnis der miR-301a und ihrer Zielstrukturen im Herzen erzeugen, sodass sich Implikationen für die Pathogenese der verschiedenen Aspekte der dilatativen Kardiomyopathie erkennen lassen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

96 Fast PCR-Platte Vollrand	Sarstedt
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt
Agarplatten	Sarstedt
Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare
Cell Scraper, 25cm	Sarstedt
CFX Real-Time System	Bio-Rad
Combitips plus 5, 10ml	Eppendorf
Culture Flasche 75cm ² , 175cm ²	Sarstedt
Culture Plate cellstar 24/12/6 Well	greiner bio-one
Deckgläser	Marienfeld
Duomax 1030	Heidolph
Elektroporations-Küvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH
Filterpapier Whatman™	GE Healthcare
Fireboy IBS	Integra Biosciences
FlourChemQ	Alpha-Innotech
Galaxy Mini Star Centrifuge	VWR
Gefrierschrank -80° REVCO Ultima Plus	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank -80° REVCO Value Plus	Thermo Fisher Scientific
Hera safe™ KS	Thermo Fisher Scientific
Heracell 240i Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus PICO 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus PICO 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
High Performance Ultraviolett	UVP
Infinite M200Pro	Tecan
Inkubator 37°C	Heraeus Instruments
Inkubator steri cult 200	Labotect
MAX Q 8000 Orbitalschüttler	Thermo Fisher Scientific
Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific
Menzel-Gläser Superfrost®	Thermo Fisher Scientific

Micro Pulser	Bio-Rad
Mikroschraubröhre 2mp, PP	Sarstedt
Mikroskop Axiovert 40 CFL mit HBO50	Zeiss
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskop BZ-9000	Keyence
Mikrotestplatte 96-Well, farblos	greiner bio-one
Mikrotestplatte 96-Well, weiß	greiner bio-one
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad
Multimage® III	Alpha Innotech
Multipipette® plus	Eppendorf
My Cycler™ Thermocycler	Bio Rad
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth
Parafilm „M“	Bemis
Paramix (Vortexer)	InLabo
Paramix II (Vortexer)	Julabo Labortechnik GmbH
Pasteurpipetten 230mm	Carl Roth
Personal cycler	Biometra®
Pipette automatisch Research pro 5-100µl	Eppendorf
Pipette, serologische 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Pipetten, 2,5 manuell	Eppendorf
Pipetten, manuell	GILSON
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Power Pack Basic /HC	Bio-Rad
Power PackP25	Biometra®
RCT basic safety control	IKA®
Röhre 14 ml, PP	Sarstedt
Röhre 50 ml, PP	Sarstedt
Safe Seal microtube 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Spectrophotometer NanoDrop	peqLab Biotechnologie GmbH
Steril GARD Hood	The Baker Company, Inc.
Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Sub-Cell GT Wide Mini	Bio-Rad Laboratories
Systec DB-23 (Autoklav)	Systec
Systec VX-65 (Autoklav)	Systec
Thermal Cycler C1000™	Bio Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf

Titramax 100
Transilluminator
Vacusafe comfort
Variomag Poly
Vortex-Genie 2
Wasserbad GFL
Zentrifuge 5810

Heidolph
Peqlab Biotechnologie GmbH
IBS Integra Biosciences
Thermo Fisher Scientific
Scientific Industries
Polizin Laborbedarf
Eppendorf

2.1.2 Chemikalien

1 Kb Plus DNA Ladder
30% PEG/MgCl₂ Solution
Agarose
Albumin fraction V (bovin)
Ammonium persulfat (APS)
Bis-Tris
Carbenicillin
Chloramphenicol
Collagen Solution
Collagen, Bovine, Type1
Collagenase Type 2 Cell Systems
cOmplete™ Tablets, Protease Inhibitor
DAPI
Distilled Water, RNase/DNase free
DMEM
DNA Gel Loading Dye (6X)
DPBS
DreamTaq Green Buffer
Ethanol
Ethidiumbromid
FastDigest® Green Buffer
Fetal Bovine Serum
FluorPreserve™ Reagent Calbiochem®
Glycerin
Hexanukleotid Random Primer
Isopropanol
Kanamycin
L-Glutamine

Thermo Fisher Scientific
Thermo Fisher Scientific
Biozym Scientific GmbH
Merck-Millipore
Carl Roth
Carl Roth
Carl Roth
Sigma
Sigma
BD BioScience
Biotechnologie Vertrieb
Roche
Thermo Fisher Scientific
Carl Roth
Carl Roth
Thermo Fisher Scientific
Biochrom
Merck-Millipore
Carl Roth
Carl Roth
Carl Roth
Sigma
Thermo Fisher Scientific

Methanol ROTIPURAN®	Carl Roth
MgSO ₄	Thermo Fisher Scientific
Milchpulver	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Carl Roth
Natriumacetat	Carl Roth
New born calf serum	Thermo Fisher Scientific
Page Ruler™ Plus, Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Pancreatin	Sigma
Passive Lysis Buffer, 5x	Promega
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
Percoll	GE Healthcare
Phenylephrine Hydrochloride	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail II/III	Sigma-Aldrich
Ponceau Solution	Sigma-Aldrich
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
Qiazol®Lysis Reagent	Qiagen®
Roti® P/C/I	Carl Roth
Rotiphorese®Gel 30	Carl Roth
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
Tango Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Trypan blue Solution	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH

2.1.3 Enzyme

DNase I	Sigma-Aldrich
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
FastDigest® SbfI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest® XbaI	Thermo Fisher Scientific
Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific
Sall	Thermo Fisher Scientific
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Thermo Fisher Scientific
XhoI	Thermo Fisher Scientific

2.1.4 Primärantikörper

Tabelle 1: Liste von eingesetzten Primärantikörper. IF = Immunfluoreszenz, WB = Westernblot.

Anti-	Spezies	Klonalität	Hersteller	Zweck
α -Actinin	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich	IF
Cofilin-2	Kaninchen	polyklonal	Merck-Millipore	WB
Phospho-Cofilin (Ser3)	Kaninchen	polyklonal	Merck-Millipore	WB
GAPDH	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich	WB
α -Tubulin	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich	WB

2.1.5 Sekundärantikörper

Tabelle 2: Liste von eingesetzten Sekundärantikörpern. HRP = „Horseradish peroxidase“ („Meerrettichperoxidase“), AF = AlexaFluor®, IF = Immunfluoreszenz, WB = Westernblot.

Anti-	Spezies	Klonalität	Konjugat	Hersteller	Zweck
Maus	Ziege	polyklonal	HRP	Santa Cruz	WB
Kaninchen	Ziege	polyklonal	HRP	Santa Cruz	WB
Maus	Esel	polyklonal	AF546	Thermo Fisher Scientific	WB/IF

2.1.6 Kits

Amersham ECL Plus

IQ™ Multiplex Powermix

Lipofectamine® 2000 Reagent

Lipofectamine® 3000 Reagent

Lipofectamine® RNAiMAX Reagent

NucleoSpin® Plasmid

Phusion Hot Start II High-Fidelity Polymerase

Platinum® Pfx DNA Polymerase

QIAGEN® Plasmid *Plus* Midi Kit

QIAquick® Gel Extraction Kit

QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis

SuperScript III Reverse Transkriptase

SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix

GE Healthcare

Bio Rad

Thermo Fisher Scientific

Thermo Fisher Scientific

Thermo Fisher Scientific

Macherey-Nagel

Thermo Fisher Scientific

Thermo Fisher Scientific

Qiagen®

Qiagen®

Agilent Technologies

Thermo Fisher Scientific

Thermo Fisher Scientific

TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit

Thermo Fisher Scientific

2.1.7 Vektoren/Plasmide

Gateway® pcDNA™-DEST40

Thermo Fisher Scientific

Gateway® pDONR™221 Vector

Thermo Fisher Scientific

pGL4.34[*luc2P*/SRF-RE/Hygro] Vector

Promega

pGL4.74[hRluc/TK] Vektor

Promega

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Vector

Promega

RhoA Expression Vector Set

Cell Biolabs, Inc.

2.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 3: Liste der eingesetzten Primer für die 3'UTR Klonierung mit den integrierten Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme.

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
Acvr1-3'-Xball-F	ACTGTCTAGACCTTGTCAACCGGTGTCAAGAAGGA	Acvr1 3'UTR Primer
Acvr1-3'-SalI-R	ACTGGTCGACGACTTGAAAACAGTTTATTTAATTTATAC	
Cfl2-3'-XhoII-F	AGCTCTCGAGAATAATAGCCAAGTGCCATTTG	Cofilin-2 3'UTR Primer
Cfl2-3'-SbfI-R	AGCTCCTGCAGGCACTTATAATTTTGCAAGCTAGCAG	
Clcn3-3'-Xball-F	ACTGTCTAGAGTCCTGTAGATGAGGACAGA	Clcn3 3'UTR Primer
Clcn3-3'-SalI-R	ACTGGTCGACCACTTTTAAGTAGAGATTTTAATAGATC	
Qk-3'-XhoII-F	AGCTCTCGAGCTTGCTGGATGAAGGACTA	Quaking 3'UTR Primer
Qk -3'-SbfI-F	AGCTCCTGCAGGGCTTTTTCAATTATTCTATTTA- CAAACAAC	

Tabelle 4: Liste der Primer für die Realtime-PCR (qRT) Analyse mittels SYBR Green.

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
RPL32mr_165_R	CCGCACCCTGTTGTCAATGC	RPL32 qRT Primer für Maus und Ratte
RPL32mr_165_F	GGTGGCTGCCATGTGTTTTACG	
Cofilin-2_m_F	CCGACCCCTCCTTCTTCTCG	Cofilin-2 qRT Primer für Maus
Cofilin-2_m_R	GTA ACTCCAGATGCCATAGTGC	
Cofilin-2_r_F	GCAGATCTTGGTGGGTGACA	Cofilin-2 qRT Primer für Ratte und ORF
Cofilin-2_r_R	CACTTTCAGGAGCCCAGAATATAA	
Acta1_F	ACACAGCCCTGGGGGCATCA	Acta1 qRT Primer für Maus
Acta1_R	GGCCAGAGTCAGAGCAGCAGAAAC	
Actc1_F	AGCTGAATCCAGCCCCTA	Actc1 qRT Primer für Maus
Actc1_R	GGGCGCCCACGATGGACG	
c-fos_F	AGTCTGGGGCTTACGCCAGA	c-fos qRT Primer für Maus
c-fos_R	CTTCCGATTCCGGCACTTGGC	

Tabelle 5: Liste der Primer und Sonden („probe“) für die Multiplex-PCR mit den zugehörigen Farbstoffen.

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
<i>Nppa_F</i>	GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG	Multiplex Primer und Sonde mit Farbstoff und Quencher für <i>Nppa</i>
<i>Nppa_R</i>	ACCTCATCTTCTACCGGCAT	
<i>Nppa_probe</i>	FAM-TGATGGATTCAAGAACCTGCTAG-ACCA-BHQ1	
<i>Nppb_F</i>	ACAAGATAGACCGGATCGGA	Multiplex Primer und Sonde mit Farbstoff und Quencher für <i>Nppb</i>
<i>Nppb_R</i>	AGCCAGGAGGTCTTCCTACA	
<i>Nppb_probe</i>	HEX-TCAGTGCGTTACAGCCCAAACGA-BHQ1	
<i>Rcan1-4_F</i>	TAGCTCCCTGATTGCTTG TG	Multiplex Primer und Sonde mit Farbstoff und Quencher für <i>Rcan1-4</i>
<i>Rcan1-4_R</i>	GGATTCAAATTTGGCCCTGG	
<i>Rcan1-4_probe</i>	Cy5.5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGT-GAGAC-Eclipse	
<i>Rpl32_F</i>	CTGCTGATGTGCAACAAATCT	Multiplex Primer und Sonde mit Farbstoff und Quencher für <i>Rpl32</i> (zur Normalisierung)
<i>Rpl32_R</i>	GCTGTGCTGCTCTTTCTACAAT	
<i>Rpl32_probe</i>	Texas Red-ACTGTGCTGAGATTGCTCACAAT-GTGT-BHQ2	

Tabelle 6: Liste der eingesetzten Primer für die Mutagenese der durch microrna.org vorhergesagten Bindestellen in der 3'UTR von Cofilin-2. Pos. = Position in der 3'UTR

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
Cofilin-2_pos_370_F	CAGTATTATTTATAGTTTACAGTGATTACCGTTCTCT-GAGGCACTGG	Oligonukleotid für Pos. 370
Cofilin-2_pos_370_R	CCAGTGCCTCAGAGAACGGTAATCACTG-TAAACTATAAATAATACTG	
Cofilin-2_pos_890_F	GGGTAACGGTGATTAAGCTCTTACAGGGTATTTG-GAATTTTTTTTTCC	Oligonukleotid für Pos. 890
Cofilin-2_pos_890_R	GGAAAAAAAAATTCCAAATACCCTGTAAGAGCTTAAT-CACCGTTACCC	
Cofilin-2_pos_1030_F	GGAGATCAGAAAAAAAAATTCTTTTTTACAGTT-GGCCTATCCAGTATC	Oligonukleotid für Pos. 1030
Cofilin-2_pos_1030_R	GATACTGGATAGGCCAACTGTAAAAAAGAATTTTTT-CTGATCTCC	
Cofilin-2_pos_1717_F	GACTTGGGATCTTTTTTATACAGAAGGAATTTGATTT-CAGCCTTCC	Oligonukleotid für Pos. 1717
Cofilin-2_pos_1717_R	GGAAGGCTGAAATCAAATTCCTTCTGTATAAAAA-GATCCCAAGTC	

Tabelle 7: Liste der eingesetzten Primer für die Klonierung des offenen Leserasters (ORF) von Cofilin-2. Jeweils am Vorwärts und Rückwärts Primer sind die attB Sequenzen zur Gewährleistung der Gateway®-Kompatibilität angeheftet.

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
attB_Cofilin-2_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGG AGATAGAACCATGGCATCTGGAGTTACAGTGAATG	Cofilin-2 Primer für offenes Leseraster von Cofilin-2
attB_Cofilin-2_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTACAG TGGCTTTCCTTCCAGGGA	

Tabelle 8: Liste der eingesetzten Primer für die Kolonie PCR. Dabei flankieren die Primer die Multiple Klonierungsstelle („MCS“).

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
pmirGLO_F	GTTACAACCGCCAAGAAGC	Kolonie-PCR Primer für pmiRGLO Vektor
pmirGLO_R	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	
M13 uni (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT	Kolonie-PCR Primer für pDONR™221 Vektor
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	
Dest40_F	TAATACGACTCACTATAGGG	Kolonie-PCR Primer für pcDNA™-DEST40 Vektor
Dest40_R	ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT	

Cofilin 2 siRNA (m): sc-37026
miRCURY LNA Inhibitor Negative Control A
miRCURY LNA Inhibitor, hsa-miR-301a
mirVana™ miRNA Mimic, miR-301a-3p
mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control #1
Myoz 2 Silencer® Select siRNA (Calsarcin-1)
Negative Control siRNA
TaqMan™ MicroRNA Assay hsa-miR-301
TaqMan™ microRNA Control Assays U6 snRNA

Santa Cruz Biotechnology
Exiqon
Exiqon
Thermo Fisher Scientific
Thermo Fisher Scientific
Thermo Fisher Scientific
Qiagen®
Thermo Fisher Scientific
Thermo Fisher Scientific

2.1.9 Puffer

ADS-Puffer (10x konzentriert)

1,16 M NaCl
197 mM HEPES
94 mM NaH₂PO₄·H₂O
55,5 mM Glukose
53,6 mM KCL
8,3 mM MgSO₄
pH 7,4

Kernlysepuffer

1 M Tris

5 M NaCl

1 M MgCl₂

1 % Triton x

Vor Gebrauch Zugabe von: Phosphatase Inhibitor II & III, Proteinase Inhibitor 25x, 1µl 1M DTT

Laufpuffer für SDS-PAGE (10x konzentriert)

Tris Base 30,3 g

Glycin 144,2 g

1 % SDS 10 g

pH 8,3 ad 1l

Protein-Ladepuffer nach Laemmli (4x konzentriert)

Tris Base 4,844 g

Glycerin 20 g

SDS 12 g

0,5 M EDTA 0,8 ml

Bromphenol blue 0,04 g

pH 6,8 ad 100 ml

Sammelgelpuffer

500 nM TRIS

0,4 % SDS

pH 6,8

TAE-Puffer

2 M Tris Base 242 g

Essigsäure 57,1 ml

0,5 M EDTA 100 ml

pH 8,0 ad 1l

10x TBS

0,25 M Tris Base

1,5 M NaCl

25 % HCl

pH 7,5

1x TBST

10x TBS 100 ml

Tween 20 0,1 % 1 ml

H₂O ad 1l

Transferpuffer für Western Blotting (für 3 Liter)

17,4 g Tris Base

87,0 g Glycin

3 g 10 % SDS-Lösung

600 ml Methanol

Trenngelpuffer für Polyacrylamidgele

1,5 M TRIS

0,4 % SDS

pH 8,8

2.1.10 Medien

2.1.10.1 Medien zur Bakterienkultur

Bakterienkulturmedien wurden bei 4°C gelagert und nach der Herstellung autoklaviert.

2YT-Medium

0,5 % (w/v) NaCl

1,6 % (w/v) Trypton

1 % (w/v) Hefeextrakt

pH 7,0

LB-Medium

1,0 % (w/v) NaCl

1,0 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

pH 7,0

2.1.10.2 Medien zur Zellkultur

Die Medien wurden bei 4°C gelagert und im Wasserbad für den Gebrauch auf 37°C erwärmt.

Serumfreies Medium

DMEM High Glucose (4,5 g/l)
100 U/l Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin
10 % FCS Gold (Fetal bovine Serum)

Serumhaltiges Medium

DMEM High Glucose (4,5 g/l)
100 U/l Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
2 mM L-Glutamin

Transfektionsmedium

DMEM High Glucose (4,5 g/l)
2 mM L-Glutamin

2.1.11 Zelllinien

Die murinen C2C12 Myoblasten wurden bei ATCC® erworben (Linie: C3H).

2.1.12 Versuchstiere

Die Calsarcin-1 defizienten Mäuse im genetischen C57Bl/6-Hintergrund wurden in Dallas (USA) von Prof. Dr. N. Frey und seiner Arbeitsgruppe generiert. Ebenfalls wurden die MLP^{-/-} und die Calcineurin transgenen Mäuse im Labor für Molekulare Kardiologie Kiel unter Prof. Dr. N. Frey erworben. Die adulten Wistar Ratten wurden von bei Charles-River erworben und in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel gehalten.

2.2 Methoden

2.2.1 *In silico* Untersuchung nach Zielstrukturen der miR-301a-3p

Die Suche nach potentiellen Zielstrukturen der miR-301a-3p wurde mithilfe von verschiedenen Prognosewerkzeugen durchgeführt. Diese online verfügbaren Programme suchen nach möglichst hoher Übereinstimmung zwischen potentiellen Zielstrukturen und der zu erforschenden microRNA. Normalerweise sind microRNAs und ihre Ziele nicht exakt komplementär, sodass es zu mehreren Basenabweichungen kommt. Allerdings muss die sogenannte "Seed"-Sequenz, welche sich auf den Basen zwei bis sieben am 5' Ende der microRNA befindet, komplementär sein (110). Je nach Affinität zwischen Zielstruktur und microRNA berechnen die Programme unterschiedliche Werte („Scores“) bezüglich der Affinität der microRNA zu der Zielstruktur, die eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen Bindung zulassen.

In diesem Fall wurde mit folgenden Programmen gearbeitet.

<http://www.microna.org> (133)

<http://www.targetscan.org> (Version 6.2) (134)

http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index (135)

<http://www.pictar.org/> (136)

Dabei wurden mehrere hundert potentielle Zielstrukturen vorhergesagt. Um die Auswahl einzugrenzen, wurden nur solche weiterverfolgt, die gleichzeitig von allen vier Programmen vorhergesagt wurden oder zu den oberen zehn Plätzen nach „Score“ eines Programmes gehörten. Mittels des online verfügbaren Programmes DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) (137, 138) wurde die Auswahl der Zielstrukturen auf solche begrenzt, die kardiale Bezugspunkte haben. Auf dieser Bewertungsgrundlage wurden vier vielversprechende Gene ausgewählt.

2.2.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.2.2.1 Herstellung der Agarplatten

Die Agarplatten wurden mit LB-Agar (Luria/Miller) von Roth in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 40 g/l hergestellt. Nach Vermengung mit ddH₂O ist die Agarlösung autoklaviert worden, um nach Abkühlung auf ungefähr 60°C unter einer Sterilwerkbank mit Antibiotika

versetzt zu werden. Dabei wurde Carbenicillin in einer Konzentration von 100µg/ml und Kanamycin mit 50µg/ml eingesetzt. Daraufhin wurde der Agar auf 10cm² Agarplatten von Sarstedt verteilt und nach Aushärtung bei 4°C kopfüber gelagert, um eine Ansammlung von Kondenswasser zu vermeiden.

2.2.2.2 Herstellung der elektrokompetenten Bakterien

Zur Transformation wurden elektrokompetente *E. coli*/DH10B verwendet. Aus einer 30ml über Nacht bei 37°C und 250rpm inkubierten Vorkultur in LB-Medium wurden jeweils 7ml in 500ml auf 37°C vorgewärmten 2xYT Medium gegeben und bei 37°C sowie 250rpm mit einer initialen OD₆₀₀ (optische Dichte) von 0.1 inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,4-0,8 konnte mit der Weiterverarbeitung begonnen werden. Die Kulturen wurden in 500ml Zentrifugenbehälter gegeben und für zehn Minuten auf Eis gelagert, um im Anschluss für 15 Minuten bei 4000rpm und 4°C in der Zentrifuge sedimentiert zu werden. Die Pellets wurden in 250ml eisgekühltem, autoklaviertem ddH₂O resuspendiert und erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Wiederum wurde das Pellet nun in 20ml glycerinhaltiger (10%), eisgekühlter Lösung resuspendiert, in ein 50ml Falconröhrchen überführt und zentrifugiert, um im Anschluss in 3ml Glycerinlösung (10%) resuspendiert zu werden. Es wurden Aliquots von je 50µl in einem sterilem 0,2ml Tube angefertigt und durch Eintauchen in Flüssigstickstoff gefroren, um bei -80°C gelagert zu werden.

2.2.2.3 Transformation von Plasmiden in elektrokompetente DH10B Bakterien

Mittels Elektroporation soll die Membran der eingesetzten Bakterien zeitweise permeabilisiert werden, um eine Aufnahme des zu überführenden Vektors zu gewährleisten. Dafür wurden elektrokompetente DH10B Bakterien verwendet. Zuerst wurden zwei bis vier µl des Ligationsansatz mit 50µl der gekühlten *E. coli* Bakterien vermengt und daraufhin in die auf -20°C vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Mit dem Micropulser von BioRad wurde ein ungefähr 2ms langer elektrischer Impuls mit 1,8kV durch die DH10B geleitet, welche daraufhin in 1000µl LB-Medium resuspendiert und für 60 Minuten bei 37°C und 300rpm geschüttelt wurden.

2.2.2.4 Anzucht von Klonen auf Agarplatten

Mittels vier bis sechs sterilen Glaskugeln wurden 50µl bis 400µl je nach Ansatz vom Elektroporationsprodukt auf die antibiotikahaltigen Agarplatten verteilt und über Nacht für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Solche Klone, die das Plasmid und somit das Resistenzgen aufgenommen haben, wurden sichtbar und jene, die isoliert ohne Verbindungen zu anderen Klonen wuchsen,

wurden mittels steriler Pipettenspitze selektiert, im PCR-Ansatz geschwenkt und in 6ml LB-Medium mit einer Konzentration von 50µM Antibiotikum überführt.

2.2.2.5 Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von positiven Klonen

Durch die DreamTaq DNA Polymerase von Thermo Scientific und dem dazugehörigen DreamTaq Green Buffer konnten Klone nachgewiesen werden, indem mit zwei Primern, welche außerhalb der Klonierungsstelle binden, eine PCR gefahren wurde. Dadurch konnte in einer anschließenden Gelelektrophorese kontrolliert werden, ob sich das eingefügte DNA-Fragment in dem Plasmid befand, indem die Länge des Fragmentes kontrolliert wurde. Für jeden ausgewählten Klon wurde ein PCR-Ansatz erstellt, welcher 2,5µl Dreamtaq Buffer, 0,25µl Polymerase, 1µl 10mM Desoxynukleosidtriphosphatgemisch (dNTP), 20,25µl ddH₂O und je 0,5µl 10µM Primer enthielt. Die Pipettenspitze mit dem Klon wurde kurz in dem Ansatz geschwenkt und dann in das LB-Medium überführt. Im My Cycler™ Thermocycler von Bio-Rad wurde die PCR durchgeführt. Nach fünf Minuten bei 95°C zur initialen Denaturierung folgten 35 weitere Zyklen, welche aus 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 55°C zur Primerhybridisierung und je nach Produktlänge (1min/1000nt) bei 70°C zur Elongation bestanden. Abschließend wurden durch eine Gelelektrophorese die Klone identifiziert, welche sich für eine Sequenzierung eigneten.

2.2.2.6 Kultur der Bakterien in Flüssigmedium

Für die Mini- und Midi-Präparation zur Plasmidgewinnung in unterschiedlicher Menge wurden Kulturen entweder mit 6ml oder 50ml und einer 50µM/100µM Kanamycin-/Carbenicillinkonzentration angelegt. Diese wurden für 16 Stunden bei 37°C und 225 rpm inkubiert, damit die Bakterien ausreichend Zeit zur Vermehrung hatten.

2.2.2.7 Mini-Präparation zur Gewinnung kleinerer Mengen Plasmid DNA

Die Mini-Präparation zur Gewinnung von geringen Mengen Plasmides zur Sequenzierung wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Dafür wurden 4ml Kultur benötigt, welche im ersten Schritt 30 Sekunden bei 11.000g zentrifugiert wurden. Das so entstandene Pellet wurde in 500µl Resuspensionspuffer A1 aufgenommen und mit 500µl SDS-haltigem (Natriumdodecylsulfat) Lysepuffer A2 invertiert und für maximal fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt folgte die Zugabe des Neutralisationspuffers A3 zur Inaktivierung des Lysepuffers. Daraufhin wurde bei Raumtemperatur für zehn Minuten bei 11.000g erneut zentrifugiert, um den durch die Lyse entstanden Überstand mit der DNA von den ausgefallenen Zell- und Pufferbestandteilen zu trennen. Die zum Kit zugehörigen DNA

bindenden Säulen wurden in die dafür vorgesehenen 2ml-Auffangbehälter gesteckt und mit 750µl Überstand Portionen befüllt. Folgend wurden die Säulen erneut bei 11.000g für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nachdem der gesamte Überstand über die Säule geleitet wurde, schloss sich die Zugabe von 500µl des auf 50°C vorgewärmten Waschpuffers AW mit erneuter Zentrifugation an. Anschließend wurden 600µl des ethanolhaltigen Waschpuffers A4 hinzugegeben und erneut für drei Minuten bei 11.000g zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Im letzten Schritt wurden 30-50µl von auf 70°C erwärmtem Elutionspuffer AE zur Lösung der gebundenen DNA hinzugegeben und für zwei Minuten bei 70°C inkubiert. Die Säule wurde in ein neues 1.5ml-Tube überführt und bei 11.000g für eine Minute zentrifugiert. Daraufhin folgte die Messung der Plasmid-DNA Konzentration und die Lagerung auf Eis.

2.2.2.8 Midi-Präparation zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiagen® Plasmid *Plus* Midi Kit verwendet. Benötigt wurden 50ml Flüssigkultur, welche in einem 50ml Falconröhrchen bei 4700g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugierten. Das so entstandene Pellet wurde in 4ml Resuspensionspuffer P1 aufgenommen und anschließend mit 4ml Lysepuffer P2 durch vorsichtiges Invertieren vermennt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4ml Neutralisationspuffer S3 hinzugegeben und jede Probe auf eine *QIAfilter cardridge* gegeben. Nachdem das Lysat zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubierte, wurde mittels eines Stempels das Lysat durch den Filter in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt. Anschließend wurde das gefilterte Lysat mit 2ml Bindepuffer BB versetzt und auf die vorbereiteten DNA bindenden Säulen gegeben, welche sich in der *QIAvac 24 plus*, einem Vakuumapplikator, befanden. Mittels eines Vakuums von -300mbar wurde das Lysat durch die Säule geleitet und mit je 700µl Waschpuffer ETR sowie dem alkoholhaltigem Waschpuffer PE gewaschen. Im Anschluss wurden die Säulen in saubere 2ml Auffangbehälter gesteckt und für eine Minute bei 10.000g und Raumtemperatur zur Reinigung von Rückständen zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Säule in ein neues 1.5ml Tube überführt und die gebundene Plasmid-DNA mittels 200µl EB Elutionspuffer extrahiert, indem erneut bei 10.000g für eine Minute zentrifugiert wurde. Danach war die Messung der Plasmid-DNA Konzentration und Lagerung auf Eis möglich.

2.2.2.9 Sequenzierung der Plasmide

Für die Sequenzierung wurden zwischen 400ng und 500ng Plasmid-DNA in 7,5µl Wasser benötigt. In einem 1,5 ml Tube wurden 2,5µl eines 10µM Sequenzierprimers hinzugegeben und die Proben zur Sequenzierung zur Firma GATC Biotech geschickt.

2.2.2.10 Kryokonservierung von hergestellten Klonen

Zur Konservierung und Lagerung wurden je Klon 4ml einer Übernachtskultur für fünf Minuten bei 4000rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurden in 1ml einer Lösung bestehend zur Hälfte aus Glycerin (60%) und LB-Medium resuspendiert, sodass 30% Glycerin enthalten waren. In einem 2ml Schraubgefäß konnten die Klone so bei -20°C gelagert werden.

2.2.3 Zellkultur Methoden

2.2.3.1 C2C12-Zellen allgemein

Bei C2C12-Zellen handelt es sich um eine murine, immortalisierte Myoblasten Zelllinie, die bei vollständiger Konfluenz in dem geeigneten Differenzierungsmedium rapide differenzieren und kontraktile Myotuben formen. Die kryokonservierten Zellen wurden mit 10% Glycerin in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Kultivierung der Zellen wurden sie in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in 1ml vorgewärmtem Wachstumsmedium aufgenommen, um in einer 75cm² Flasche kultiviert zu werden

2.2.3.2 Kultivierung der C2C12-Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C und 5%CO₂ im Inkubator in 75cm² Flaschen von Sarstedt in einer Zelllage auf reiner Plastikoberfläche kultiviert. Damit die Zellen keine vollständige Konfluenz zeigten, wurden sie bei ungefähr 80% Konfluenz in neue 75cm² Flaschen passagiert. Dafür wurde das Wachstumsmedium (DMEM von Merck-Millipore mit Penicillin/Streptomycin, 10% FCS und L-Glutamin) abgesaugt und mit 10ml 37°C warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden 3ml Trypsin/EDTA in PBS auf die Zellen gegeben und für fünf Minuten bei 37°C inkubiert, damit die adhärennten Zellen sich voneinander und von der Oberfläche lösen. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 9ml serumhaltigem Medium inaktiviert und die Zellen vorsichtig unter Vermeidung von Schaumbildung resuspendiert. Von dieser Zelllösung wurden 100µl abgenommen und mit 100µl Trypanblau von Sigma-Aldrich vermischt und in die Neubauer-Zählkammer zur Berechnung der Zellzahl gegeben und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Intakte Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und nur solche, die nicht blau erschienen, wurden mitgezählt. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten bei 1000rpm und RT zentrifugiert und in 12ml antibiotikafreiem Medium resuspendiert. Nun konnten die Zellen auf die geforderten Platten (Tabelle 9) und neuen 75cm² (im Verhältnis 1:10-12) zur weiteren Kultivierung verteilt werden.

Tabelle 9: C2C12-Zellen, verwendete Platten, Zellzahlen und Mediummenge

Plattengröße	Art des Versuches	Zellen/Well	ml Medium/Well
6-Well	Proteinisolation	200.000	2
12-Well	RNA-Isolation	50.000	1
24-Well	Luciferaseversuch	30.000	0,5

2.2.3.3 Transfektion der C2C12-Zellen

Nach Aussaat wurde 24 Stunden später bei ungefähr 60% Konfluenz ohne Mediumwechsel transfiziert. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen in DMEM mit L-Glutamin und 10% FCS. Für die Transfektion von Plasmiden sowie die Ko-Transfektion von Plasmiden mit microRNA-Mimics, microRNA-Inhibitoren oder siRNAs wurde Lipofectamine® 2000 von Thermo Scientific verwendet und für die alleinige Transfektion von microRNA-Mimics, microRNA-Inhibitoren oder siRNAs wurde dagegen Lipofectamine® RNAiMAX genutzt. Die Transfektion wurde nach Herstellerprotokoll in Serum- und Antibiotikafreien DMEM angesetzt. Je nach Bedingung wurde ein Ansatz mit Lipofectamine® und einer mit den übrigen Bestandteilen (Plasmide, Mimics, siRNA etc.) vorbereitet. Der DNA/RNA-Ansatz wurde nun in den Lipofectamine® Ansatz überführt und vorsichtig durch leichtes Schütteln des Tubes vermischt sowie für fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100µl auf jedes Well gegeben und durch Schwenken der Platten in Form einer Acht wurde der Ansatz im Medium verteilt. Nach weiteren 24 Stunden im Inkubator wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und frisches DMEM mit Serum ohne Antibiotika auf die Zellen gegeben. Die Ernte erfolgte schließlich 48 Stunden nach Transfektion in dem jeweils für den Versuch benötigten Lysereagenz.

2.2.3.4 C2C12 Luciferasereporter Versuche

Für den Nachweis der Regulierung der 3'-untranslatierten Regionen (3'UTR) durch die miR-301a wurde der pmiRGLO-Vektor mit den jeweiligen klonierten Zielstrukturen eingesetzt. Es wurde im 24-Well-Format mit 20ng pmiRGLO je Well gearbeitet.

Um eine Veränderung der SRF-Aktivität in C2C12 zu detektieren wurde ebenfalls im 24-Well Format gearbeitet und der pGL4.34[*luc2P*/SRF-RE/Hygro] Vector von Promega (20ng/Well) verwendet. Dieser Vektor enthält ein SRF sensibles Element, welches die Transkription der Luciferase (*luc2P*) in Anwesenheit von SRF hochtreibt, sodass eine vermehrte oder verminderte SRF-Aktivität nachgewiesen werden kann. Zur Normalisierung wurde mit dem pGL4.74[hRluc/TK] Vektor von Promega (5ng/Well) gearbeitet. Zur Steigerung der Aktivität von SRF wurde RhoA von Cell Biolabs in konstitutiv aktivierter Form (Q63L) sowie im Wildtyp (je 20ng/Well) eingesetzt.

2.2.3.5 Kollagenisierung der Zellkulturplatten mit bovinem Kollagen I

Damit die NRVCM sich auf den Zellkulturplatten vermehren können, ist es nötig diese im Vorfeld mit bovinem Kollagen Typ I zu beschichten. Dafür wurde die Stammlösung (3mg/ml) mit 0,01 M HCL Lösung auf 50µg/ml verdünnt, sodass 5-10µg/cm² Kollagen auf die Platten gegeben wurde. Diese wurden für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenlösung abgesaugt, zweimal mit sterilem ddH₂O gewaschen und daraufhin luftgetrocknet. Bei Bedarf konnten die Platten so für eine Woche bei 4°C gelagert werden.

2.2.3.6 Präparation und Kultur der neonatalen, ventrikulären Rattenkardiomyozyten

Für die Gewinnung der neonatalen, ventrikulären Kardiomyozyten wurden 1-3 Tage alte Ratten vom Wistar Stamm verwendet. Nachdem diese kurz in 75% Ethanol getaucht wurden, wurden die Ratten zügig dekapitiert und es wurde ein circa 2cm langer Schnitt von der Wirbelsäule ausgehend links parasternal mit einer Schere gesetzt, um den Thorax zu eröffnen. Durch leichten Druck auf Abdomen und Thorax kam das Herz hervor und konnte mit der Schere vorsichtig abgelöst werden. Die Herzen wurden in eisgekühltem ADS-Puffer gelagert. Unter der Sterilwerkbank wurden die Ventrikel von den Vorhöfen und großen Gefäßen befreit und in neuen eisgekühlten ADS-Puffer überführt. Mit einer kleinen Schere wurden die Ventrikel nun zerkleinert, sodass nur noch sehr feine Gewebestücke sichtbar waren. In einer 75cm² Flasche wurde das zerkleinerte Herzgewebe aus 25-30 Herzen in 1ml Verdauungslösung pro Herz aufgenommen, welche im Vorwege steril gefiltert und auf 37°C vorgewärmt wurde. Die Verdauungslösung bestand aus ADS-Puffer, welcher mit 0,6ml/ml Pankreatin und 0,5mg/ml Collagenase Typ 2 angereichert war. Die Verdauung fand bei 37°C für 20 Minuten bei 40rpm im Schüttler statt. Danach wurden die Flaschen aus dem Wasserbad genommen, desinfiziert und auf die Kante gestellt. Dadurch sammelte sich das Gewebe in einer Ecke, sodass der Überstand entfernt werden konnte. Erneut wurde 1ml/Herz Verdauungslösung zu dem Gewebe gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Flaschen unter die Sterilwerkbank genommen, um mit einer 25ml Pipette durch auf und ab zu pipettieren die Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband zu lösen. Der Überstand wurde nun abgenommen und weiterverarbeitet. Das restliche Gewebe wurde solange weiter mit frischer Verdauungslösung versetzt und inkubiert, bis sich das gesamte Gewebe gelöst hat. Der Überstand wurde durch einen Sterilfilter in eine 50ml Röhre überführt und durch Zugabe von 8ml NBSCS (new born calf serum) wurde das Pankreatin und die Collagenase deaktiviert. Die Zellen wurden bei RT für fünf Minuten bei 1000g zentrifugiert und das Zellpellet in 5ml NCBS resuspendiert und bis zum Abschluss der Verdauungsvorgänge im Inkubator bei 37°C und 5%CO₂ mit offenem Deckel gelagert. Nachdem

das gesamte Gewebe verdaut war, wurden die einzelnen Zellsuspensionen zusammengeführt, erneut zentrifugiert bei RT und in ADS Puffer aufgenommen.

Da sich in der Zellsuspension nicht nur Kardiomyozyten, sondern auch Fibroblasten, Erythrozyten und weitere im Herz vorkommende Zellen befanden, mussten die Kardiomyozyten aufgereinigt werden. Dafür wurden die Zellen ihrer Dichte nach mittels eines Percoll Gradienten aufgetrennt (139). Während des letzten Verdauschritts wurden die Gradienten pipettiert, welche aus drei Schichten bestehen. Im Vorfeld wurde die Grundlösung aus 27ml Percoll-Medium mit 3ml 10xADS Puffer hergestellt. Aus dieser Grundlösung wurden zwei Ansätze mit unterschiedlicher Menge an Percoll-Medium und dementsprechend unterschiedlicher Dichte hergestellt. Dafür wurde für die obere Schicht zu 9ml Grundlösung 11ml 1xADS mit Phenolrot gegeben. Für die untere Schicht wurden 13ml Grundlösung mit 7ml 1xADS Puffer vermengt. Ein Gradient bestand aus 4ml oberer und 3ml unterer Lösung in einer 14ml Röhre, die vorsichtig nach der oberen Schicht durch diese pipettiert wurde. Die Gradienten wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert und für sieben Herzen wurde ein Gradient benötigt. Zu jedem Gradienten wurden 2ml der Kardiomyozytensuspension gegeben und für 30 Minuten in der auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 2400rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren drei Schichten sichtbar. Die Kardiomyozyten sammelten sich hauptsächlich zwischen der mittleren, roten und unteren Schicht. Die oberste Schicht und der obere Teil der mittleren Schicht, welche hauptsächlich Fibroblasten enthält, wurden abgesaugt. Anschließend wurde der untere Teil der Interphase mit den Kardiomyozyten in eine 50ml Röhre überführt, zweimalig mit ADS Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei 1000g für fünf Minuten in 37°C warmen DMEM von Thermo Fisher Scientific mit 10%FCS resuspendiert. Mit einer Neubauer Zählkammer wurde die Anzahl der lebenden Zellen berechnet und die benötigte Menge mit Medium (Tabelle 10) auf die vorbereiteten Platten verteilt.

Tabelle 10: NRVCM, verwendete Platten, Zellzahlen und Mediummenge

Plattengröße	Art des Versuches	Zellen/Well	ml Medium/Well
6-Well	RNA-/Proteinisolation	750.000/1.000.000	2
12-Well	Immunfluoreszenz	180.000	1

2.2.3.7 Transfektion und Behandlung der NRVCM mit Phenylephrin

Nach der Aussaat wurden die NRVCM im Inkubator von Thermo Fisher Scientific bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und für 24 Stunden in DMEM mit 10%FCS, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin bis zur Transfektion kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmalig mit 37°C warmen PBS gewaschen, um Antibiotikaresten zu entfernen. Im Anschluss daran wurde frisches, warmes DMEM ohne Serum und Antibiotika auf die Zellen gegeben. Für die

Transfektion von DNA wurde Lipofectamine® 3000 von Thermo Scientific und für microRNA-Mimics, microRNA-Inhibitoren oder siRNAs Lipofectamine® RNAiMAX verwendet. Die Transfektion lief analog zu den C2C12-Zellen wie oben beschrieben ab. Zu erwähnen ist, dass beim Lipofectamine® 3000 zu dem DNA Ansatz noch das P3000™ Reagent in einer Konzentration von 2µl/µg DNA hinzugegeben werden muss. Vier bis sechs Stunden nach Transfektion wurde zur Verringerung der Toxizität das Transfektionsmedium abgesaugt und durch antibiotikafreies, serumfreies DMEM ersetzt. 24 Stunden nach Transfektion wurden die NRVCN mit Phenylephrin als hypertropher Stimulus behandelt. Dafür wurde das Phenylephrin in einer Konzentration von 5µM eingesetzt und damit verbunden ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurden die NRVCN je nach Versuch in dem benötigten Lysepuffer geerntet.

2.2.4 Klonierung

2.2.4.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zur Amplifikation von Nukleinsäuren

Die gewünschten DNA-Abschnitte von Interesse wurden mit zwei unterschiedlichen Polymerasen extrahiert und amplifiziert. Zum Einsatz kamen die Phusion Hot Start II High-Fidelity-DNA-Polymerase und die Platinum® Pfx DNA Polymerase, beide von Thermo Fisher Scientific. Für die Klonierung von den 3'-untranslatierten Regionen von Acvr1 und CLCN3 sowie dem ORF von Cofilin-2 wurde die Platinum® Pfx DNA Polymerase verwendet, welche über eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität verfügt, um Synthesefehler zu korrigieren. Bei jeder PCR mit einem gesamten Reaktionsansatz von 25µl wurde den Herstellerangaben folgend die Menge des im Kit enthaltenen „Enhancers“ (0µl - 6µl je Ansatz) zur Vergrößerung des Temperaturbereiches der Primerhybridisierung und des Puffers (einfach/zweifach konzentriert) im vorgegeben Rahmen variiert. Die My Cyclers™ Thermocycler Bedingungen wurden durch den Hersteller vorgegeben. Die Primerhybridisierungstemperatur lag 3°C über der Schmelztemperatur der Primer und die Zeit für die Elongation wurde der Länge der Matrize angepasst (1min/kb).

Mit der Phusion Hot Start II High-Fidelity-DNA-Polymerase wurden die GC-reichen 3'-untranslatierten Regionen von Cofilin-2 und Qk kloniert. Bei dieser handelt es sich um eine hitzestabile Polymerase mit ebenfalls 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Hier wurde der HF Puffer in einfacher Konzentration und eine herstellerkonform variable Menge von DMSO (0%-5%) sowie der Polymerase selbst (0,25µl - 1µl) in einem Gesamtvolumen von 50µl je Ansatz verwendet. Auch hier wurden die Thermocycler-Bedingungen dem Herstellerprotokoll folgend verwendet, sowie Primerhybridisierungstemperatur und Elongationszeit angepasst.

Anschließend wurden nach jeder PCR 4µl je Ansatz in 20µl ddH₂O zusammen mit 6µl DNA Loading Dye zusammen pipettiert und mittels Gelelektrophorese auf Vorhandensein eines Amplikons überprüft.

2.2.4.2 Gelelektrophorese

Damit verschiedene DNA-Stränge der Basenlänge aufgetrennt und falls erforderlich bestimmte Banden aus dem Gel extrahiert werden konnte, wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein Gel mit 1% Agarose von Biozym in TAE Puffer hergestellt. Die Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben mit dem TAE Puffer vermengt, in der Mikrowelle bei 800W unter Beobachtung kurz aufgekocht und geschwenkt, sodass keine Agarose mehr im Gel sichtbar war. Das Gel kühlte auf ungefähr 60°C ab und wurde in den fixierten Schlitten gegossen. Zur Identifizierung der DNA Banden im UV-Licht wurden 50µg Ethidiumbromid je 100ml Gel hinzugegeben. Ein je nach Anzahl der benötigten Taschen großer Kamm wurde eingelegt und das Gel polymerisierte bei RT für 30 Minuten. Danach wurde der Schlitten mit dem Gel in die TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese Kammer von Bio-Rad überführt und der Kamm gezogen. Die Taschen wurden befüllt und zur Bestimmung der Laufhöhe wurde zusätzlich die 1kb Plus Ladder von Thermo Fisher Scientific verwendet. Es wurde eine Spannung von 100V angelegt und die negativ geladenen DNA wanderte umso langsamer je länger sie war in dem elektrischen Feld zur Anode. Durch Interkalation mit Nukleinsäuren verändert sich das Absorptionsspektrum von Ethidiumbromid, sodass es proportional zur vorhandenen Nukleinsäurekonzentration unter UV-Licht fluoresziert. Dadurch konnten die DNA-Proben im Transilluminator identifiziert und fotografiert werden.

2.2.4.3 Gelextraktion mittels Kit

Die Gelextraktion wurde für die Gewinnung bestimmter Banden aus dem Gel durchgeführt. Dafür wurde die Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell rausgeschnitten und in ein 2ml Tube überführt. Für die DNA Extraktion wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit von QIAGEN® benutzt. Das Gelstück wurde gewogen und mit drei Volumina QG-Puffer bei 55°C für zehn Minuten inkubiert, bis sich das Gel aufgelöst hatte. Die Probe wurde in 500µl Portionen auf die im Kit enthaltenen DNA bindenden Säulen gegeben und jeweils bei 11.000g für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde mit weiteren 500µl frischem QG-Puffer die Säule gewaschen und erneut zentrifugiert. Daraufhin wurde mit 600µl Alkoholhaltigem PE-Puffer gewaschen und zentrifugiert, damit abschließend mit 22µl EB-Puffer in einem neuen 1,5ml Tube die gebundene DNA eluiert sowie abzentrifugiert werden konnte.

2.2.4.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach der Kontrolle des PCR Produktes in der Gelelektrophorese wurden für die Aufreinigung des PCR-Produktes die Säulen und Puffer aus dem Macherey & Nagel Minipräp Kit verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit zwei Volumina Puffer A3 gemischt und auf eine Säule mit einem 2ml Auffangbehälter gegeben, um anschließend für eine Minute bei RT und 11.000g zentrifugiert zu werden. Der Durchfluss wurde verworfen. Es wurde nacheinander mit 500µl vorgewärmtem AW Puffer (50°C) sowie 600µl Ethanol haltigem Puffer A4 gewaschen und bei oben genannten Einstellungen zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5ml Tube überführt und 30µl vorgewärmter Elutionspuffer AE (70°C) wurde zum Lösen der DNA auf die Säule gegeben. Nach einer Minute Inkubation bei RT wurde wieder zentrifugiert und die DNA-Konzentration im NanoDrop bestimmt.

2.2.4.5 3'UTR Klonierung in pmiRGLO Vektor von Promega

Bei dem *pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* von Promega handelt es sich um einen Vektor, welcher zwei Luciferasen enthält. An die Reporterluciferase, Glühwürmchenluciferase (*luc2P*, „firefly luciferase“), schließt sich die Klonierungsstelle für die 3'UTR der gewünschten Zielstruktur an. Es wurde die gesamte 3'UTR der jeweiligen Zielstrukturen mit den jeweiligen vorhergesagten Bindestellen extrahiert und hinter die Luciferase kloniert. Die konstante Expression dieses Fusionsproduktes in C2C12-Zellen wurde durch den enthaltenen PGK Promotor sichergestellt. Bei einer Bindung der microRNA an der eingefügten 3'UTR würde es durch Hemmung der Translation zu einer verminderten Luciferaseaktivität kommen. Zusätzlich enthält der Vektor zur Normalisierung der Lumineszenz die Korallenluciferase (*hRluc*, „*renilla luciferase*“).

Für die Klonierung wurden die Zielstrukturen durch die oben genannten Primer aus muriner, genomischer DNA entweder mit der Phusion Hot Start II High-Fidelity-DNA-Polymerase oder der Platinum® Pfx DNA Polymerase von Thermo Fisher Scientific extrahiert. Durch Gelelektrophorese wurden die PCR-Ansätze mit dem optisch höchsten Nukleinsäuregehalt identifiziert und wie oben beschrieben aufgereinigt. Für den Restriktionsverdau wurden die benötigten Puffer- und Enzymmengen mit dem Online verfügbaren „Double Digest“ Programm von Thermo Scientific ermittelt. *Acvr1* und *CLCN3* wurden mit 20U *Sall* und 20U *XbaI* in zweifach konzentriertem Tango Puffer verdaut. Von dem pmiRGLO Vektor wurden 3µg mit den gleichen Enzymen mitverdaut. Insgesamt wurden die Ansätze für eine Stunde bei 37°C im Thermocycler inkubiert und die Enzyme für zehn Minuten bei 65°C inaktiviert. Zu dem Vektor wurde 1µl Shrimp-Alkaline-Phosphatase von Thermo Scientific hinzugegeben und erneut für eine Stunde bei 37°C und zehn Minuten bei 65°C inkubiert. *Cofilin-2*, *Qk* und pmiRGLO wurden mit den FastDigest® Restriktionsenzymen FastDigest® *XbaI* und *SbfI* nach Herstellerangaben mit

FastDigest® Green Buffer für 40 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 80°C im Thermocycler deaktiviert. Anschließend wurde der pmiRGLO Vektor mit der Shrimp-Alkaline-Phosphatase dephosphoryliert. Die verdauten Ansätze wurden durch die Gel-elektrophorese von den Spaltprodukten gereinigt und aus dem Gel extrahiert. Für die Ligation wurde äquivalent zur Anzahl der Basenpaare pmiRGLO und PCR-Produkt im gleichen Verhältnis eingesetzt. Es wurde 1U der T4 Ligase von Thermo Scientific in dem dazugehörigen Puffer in 20µl Gesamtvolumen genutzt und über Nacht bei RT inkubiert, um anschließend für zehn Minuten bei 65°C inaktiviert zu werden. Der Ligationsansatz wurde nun in DH10B Bakterien mittels Elektroporation eingebracht und das Fehlen von Mutationen in positiven Klonen durch Sequenzierung verifiziert. Für den Einsatz in den Luciferasereporter-Versuchen wurde für eine ausreichende Menge Plasmid die Midipräp von QIAGEN® benutzt.

2.2.4.6 Mutagenese der microRNA Bindestellen

Um die Bindung der miR-301a an den vorhergesagten Bindestellen zu verifizieren, wurde eine Mutagenese der Cofilin-2 3'UTR in pmiRGLO mit dem QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies durchgeführt. Die Primer wurden nach dem vom Hersteller vorgegebenen Algorithmus designt. Dabei wurden die ersten fünf Basen der "Seed"-Sequenz auf Seiten der 3'UTR ausgetauscht. Hier wurde 5'GCACT-3' zu 5'-TACAG-3', indem Guanin mit Thymin und Cytosin mit Adenosin ausgewechselt wurden (140). Diese veränderte Sequenz wurde von jeweils ca. 20 Basen flankiert und bildete so den Primer für die Mutagenese. Bei mehreren Bindestellen in einer 3'UTR wurde erst, nachdem die Sequenzierung die Richtigkeit einer Mutation ergeben hat, eine weitere hinzugefügt.

Zu den Primern kamen 5µl des mitgelieferten 10x Reaktionspuffer, 25ng der pmiRGLO Vorlage sowie 1µl dNTPs zusammen und es wurde mit ddH₂O auf ein Reaktionsvolumen von 50µl aufgefüllt. Zu jedem Ansatz wurde nun 1µl der *Pfu*Ultra HF DNA Polymerase (2,5U/µl) pipettiert und die Ansätze in den ThermoCycler überführt. Nach initialer Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden folgten 18 Zyklen bestehend aus 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, Primerhybridisierung für eine Minute bei 55°C und Elongation für zehn Minuten bei 68°C. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 1µl des Restriktionsenzym DpnI hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die methylierte nicht mutierte pmiRGLO Vorlage zu verdauen. Die Transformation des Amplikons erfolgte in die im Kit enthaltenen XL-1 Blue Supercompetent Cells mittels eines Hitzeschocks. Dabei werden 50µl der XL-1 Bakterien in eine eisgekühlte 14ml Röhre vorlegt und 1µl des verdauten PCR-Ansatzes hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 45 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad inkubiert, um anschließend erneut für zwei Minuten auf Eis zu liegen. Die Bakterien wurden in 500µl 42°C warmen LB-Medium resuspendiert und für eine Stunde bei 37°C

und 250rpm geschüttelt. Daraufhin wurden sie auf einer Carbenicillin-haltigen Agarplatte ausplattiert, um für 16 Stunden bei 37°C zu inkubieren. Die Richtigkeit der Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt.

2.2.4.7 Cofilin-2 pDEST40 (Gateway™)

Das offene Leseraster (ORF, „open reading frame“) von Cofilin-2 wurde von cDNA aus NRVCM mit oben genannten Primern durch eine PCR mit der Platinum® Pfx DNA Polymerase von Thermo Fisher Scientific extrahiert und amplifiziert. Diese Primer enthielten am 5'-Ende die für die Gateway™-Klonierung benötigten attB-Sequenzen. Bei der Gateway™-Klonierung wird sich das Rekombinationssystem der Bakteriophage λ zunutze gemacht, wobei es sich ursprünglich um ein System zur Integration von DNA in das Bakteriengenom von E.Coli handelt. Darauf basierend ist die Gateway™-Klonierung ein reversibles und sequenzspezifisches System zum Integrieren von DNA in unterschiedliche Vektoren.

Die hergestellten attB flankierten PCR Produkte wurden in den Gateway® pDONR™221 von Thermo Fisher Scientific („entry vector“) durch Einsatz der BP Clonase® II überführt. Dafür wurden 150ng pDONR™221 zusammen mit 80fmol PCR-Produkt in einem Reaktionsvolumen von 8 μ l eingesetzt. Zu diesem Ansatz wurden 2 μ l BP Clonase® II hinzugegeben und für eine Stunde bei 25°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 μ l Proteinase K wurde die Reaktion bei 37°C für zehn Minuten terminiert. Die in der BP Clonase® II enthaltenen Enzyme erkennen das attB flankierte PCR Produkt und ersetzen es an der attP haltigen Stelle im Vektor. Die so entstandenen Stellen werden attL genannt, welche wiederum im späteren Schritt äquivalent zur BP Clonase® II durch die LR Clonase® II erkannt werden und im Zielvektor („destination vector“, pDEST40) mit den attR tragenden Abschnitten getauscht werden.

Durch das Einfügen der PCR Produkte wurde das in den Leervektoren vorhandenen attP/attR-flankierte ccdB-Gen entfernt. Hierbei handelt es sich um ein „Selbstmordgen“, welche die bakterielle Gyrase hemmt und somit toxisch auf die Bakterien wirkt, wenn es exprimiert wird. Somit wird sichergestellt, dass nur solche Plasmide mit der korrekten, eingefügten Sequenz und dementsprechend entfernten ccdB-Gen zu einer Vermehrung eines Klons führen können. Nach der BP-/LR- Reaktion wurde jeweils das entstandene Produkt in DH10B transformiert, positive Klone selektiert und mit Sequenzierung auf Abwesenheit von Mutation kontrolliert.

2.2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA wurde das NanoDrop 2000 Photometer von Thermo Scientific verwendet. Durch Messung der Extinktion eines Mikroliters Probe bei 260nm und 280nm wurde basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz die DNA/RNA-Konzentration der untersuchten Probe errechnet. Im Vorfeld wurde das Gerät mit der Pufferlösung geeicht, in dem sich die Nukleinsäuren befanden, um die optische Dichte der selbigen in die Berechnung mit einzubeziehen. Jede Probe wurde zweifach gemessen und der Mittelwert verwendet.

2.2.5.2 Totale RNA Extraktion aus C2C12-Zellen und NRVCN

Zur RNA-Gewinnung wurde das Medium von Zellen abgesaugt und mit 2ml PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurde zur Lyse der Zellen und Freisetzung der RNA auf jedes Well 1ml QIAzol™ gegeben. Durch vorsichtiges Invertieren mittels RNase-freier, gestopfter Pipettenspitzen wurden alle Zellen vom Boden gelöst und in ein RNase und DNase-freies 1,5ml Tube überführt. Optional konnte die Zellsuspension bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert werden. Im nächsten Schritt wurden zu jeder Probe 200µl Chloroform hinzugegeben. Um die wässrige, RNA haltige Phase von der Phenolphase und Interphase zu trennen, wurden die Proben nun nach zwei bis drei minütiger Inkubation bei RT für 15 Minuten bei 4°C und 12.000g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde nun, in ein neues 1,5ml RNase und DNase-freies Tube pipettiert. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass der Überstand nicht durch die Proteinhaltige Interphase kontaminiert wurde. Weiterhin wurden zu jeder Zeit die RNA Proben auf Eis gelagert.

Um die RNA zu fällen, wurden 500µl Isopropanol hinzugegeben und nach vorsichtigem Schütteln für eine Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA bei 4°C für eine Stunde bei 12.000g zentrifugiert. Ein weißes Pellet wurde sichtbar und mit 1ml 75% Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen und erneut für fünf Minuten bei 7500g und 4°C zentrifugiert. Folgend wurden die Proben im Tube nun kopfüber auf Zellstoff getrocknet und das Pellet im Anschluss in 40µl DEPC-Wasser gelöst. Optional konnte die RNA an diesem Punkt bei -80°C gelagert werden.

2.2.5.3 DNase Verdau der RNA

Der DNase Verdau der extrahierten RNA wurde durchgeführt, um Verunreinigungen durch DNA zu entfernen. Zu der RNA in 40µl DEPC-Wasser wurden 5µl des „10xReaction Puffer for DNase I“ sowie 5µl DNase I von Sigma-Aldrich hinzugegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit 50µl DEPC-Wasser auf 100µl aufgefüllt und 100µl Phenol-Chlo-

roform-Isoamylalkohol Gemisch von Roth zur Inaktivierung der DNase I hinzu pipettiert. Anschließend wurde für zehn Minuten bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 1.5ml RNase-freies Tube transferiert. Dazu wurde noch 300µl absoluter Ethanol von Roth und 10µl 3M Natrium-Acetat zur RNA gegeben, um die RNA für eine Stunde bei -20°C zu fällen. Danach wurde für 60 Minuten bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert, um das Pellet daraufhin mit 500µl Ethanol zu waschen. Nach weiteren fünf Minuten bei 14.000rpm und 4°C in der Zentrifuge wurde der Überstand abgenommen, das Pellet im Tube getrocknet und in 11µl DNase und RNase-freiem DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration konnte nun mittels NanoDrop bestimmt werden.

2.2.5.4 cDNA Synthese mit SuperScript® III

Für die cDNA-Synthese wurde je Probe 1µg RNA in 12µl DEPC-Wasser in einem RNase und DNase-freien 0,5ml Tube benötigt und mit 0,5µl Hexanukleotid Random Primer (50-250ng) von Roth sowie 1µl 10mM dNTPs versetzt. Nach Inkubation für fünf Minuten bei 65° zur Primerhybridisierung wurde, nachdem die Proben auf Eis abkühlten, 4µl 5xFirst Strand RT-Buffer, 1µl Dithiothreitol (DTT 0,1M), 1µl RNase Inhibitor (RNaseOUT 40Uµl) und 0,5µl SuperScript® III Reverse Transkriptase (200U/µl) dazu pipettiert. Anschließend wurden die Ansätze für zehn Minuten bei 25°C inkubiert. Danach folgten zur Elongation 60 Minuten bei 50°C und zehn Minuten bei 70°C zur Inaktivierung. Hiernach wurde die cDNA mit 180µl DEPC-Wasser auf 5ng/µl verdünnt.

2.2.5.5 Synthese von microRNA-cDNA

Bei den microRNAs handelt es sich um sehr kurze (22nt) RNA-Fragmente, dessen Nachweis mit konventioneller cDNA Synthese nicht gelingt. Hier wurde das TaqMan®MicroRNA Assay von Thermo Scientific sowohl für die cDNA Synthese als auch für die qRT-PCR Analyse verwendet. Für die Umschreibung werden spezielle Sonden von TaqMan® verwendet, die spezifisch für zu untersuchende microRNA sind. Zur Normierung wurde die U6 (RNU6B) verwendet (141). Je Probe wurden 0,15 µl 100mM dNTP, 1µl MultiScribe™ RT 50U/µl, 1,5µl 10x RT Puffer, 0,19µl RNase Inhibitor 20U/µl und 4,16µl RNase freies ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 7µl zusammen pipettiert. Zur Vereinfachung wurde ein gemeinsamer Ansatz für mehrere Proben erstellt und dann verteilt. Zu jedem Ansatz kamen noch 3µl der spezifischen, reversen Transkriptionssonde sowie 5µl der umzuschreibenden RNA (entsprechend 10ng RNA). Die reverse Transkription wurde im My Cycler™ für 30 Minuten bei 16°C, gefolgt von 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 85°C durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und mit 7,5µl RNase und DNase-freiem Wasser 1:1,5 verdünnt.

2.2.5.6 Realtime-PCR Analyse mittels SYBR Green

Zum Nachweis von einzelnen differentiell regulierten Transkripten wurden quantitative Echtzeit-PCR-Analysen mittels des CFX Real-Time Systems von Bio-Rad und des Universalmixes SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die quantitative Echtzeit-PCR basiert auf dem Prinzip, dass der im Universalmix enthaltene Farbstoff, SYBR Green, an DNA bindet und proportional zum DNA Gehalt bei Anregung Licht emittiert. Jedes Well wurde mit 10µl Universalmix und 7,2µl RNase freiem Wasser, sowie jeweils 0,4µl eines Vorwärts und Rückwärts Primers mit einer Konzentration von 10µM beladen. Sämtliche Primer wurden im Vorfeld auf fehlende Amplifikation eines Produktes von genomischer DNA und Vorhandensein einer adäquaten Schmelzkurve mit cDNA getestet. Die Einzelmengen für jedes Well wurden in einem gemeinsamen Ansatz für das jeweilige Primerpaar angesetzt und im Anschluss mittels automatischer Pipette Pro von Eppendorf auf die einzelnen Wells einer 96-Well Platte von Sarstedt unter Kühlung im Kühlblock verteilt. Die aufbereitete cDNA wurde auf eine Konzentration von 5ng/µl verdünnt und 2µl (10ng) cDNA je Well verwendet. Jede Probe wurde im Triplikat gemessen und zur internen Normalisierung wurde RPL32 benutzt (142). Zusätzlich lief für jedes Primerpaar eine Probe ohne cDNA („no template control“, NTC) mit. Jeder Durchlauf begann mit 50°C für zwei Minuten gefolgt von 95°C für 30 Sekunden zur anfänglichen Denaturierung. Anschließend folgten erneut 95° für fünf Sekunden und danach 60°C für 30 Sekunden, was einen gemeinsamen Schritt für Primerhybridisierung und Elongation darstellte. Danach wurde gemessen und die vorherigen Schritte für 39 weitere Zyklen wiederholt. Nach diesen Zyklen wurde eine Schmelzkurve angefertigt, indem nach initialer Denaturierung bei 95° für 10 Sekunden und anschließend für 60°C bei fünf Sekunden die Temperatur unter Messung um je 0,5°C bis auf 95°C steigt.

2.2.5.7 Multiplex Realtime PCR

Zur Überprüfung der Expression von *Rcan1-4*, *Nppa* und *Nppb* wurde eine Multiplex Echtzeit PCR durchgeführt. Dabei werden sequenzspezifische Sonden, die an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, benutzt. In diesem Fall wurde für RPL32 Texas Red, für *Rcan1-4* Cy5.5, für *Nppa* FAM und für *Nppb* HEX eingesetzt. Je Probe kamen so 10µl iQ™ Multiplex Powermix von Bio-Rad und je 0,5µl der Primer mit den Sonden sowie 6µl DEPC-Wasser. Für die Gesamtzahl aller Wells wurde ein gemeinsamer Ansatz erstellt, womit jedes Well mit der elektrischen Pipette von Eppendorf mit 18µl befüllt wurde. Hinzu kamen 2µl cDNA (10ng) und eine Kontrolle ohne DNA (NTC). Jede Probe wurde im Triplikat gemessen. Das im CFX Real-Time System verwendete Programm startete mit zwei minütiger initialer Denaturierung bei 95°C mit erneuter Denaturierung für 15 Sekunden bei 95°C. Hiernach wurde

für 45 Sekunden bei 60°C in einem gemeinsamen Schritt für Primerhybridisierung und Elongation inkubiert. Diese beiden Temperaturstufen wurden für 39 Zyklen mit einer Messung am Ende jedes Zyklus wiederholt.

2.2.5.8 Detektion der microRNA mit quantitativer Realtime-PCR

Für die quantitative Realtime-PCR zum Nachweis differentiell regulierter microRNAs wurden ebenfalls die speziellen TaqMan®-Primer mit spezifischen Sonden verwendet, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM gekoppelt sind, der sich bei Amplifikation durch Bindung der Sonde an der umgeschriebenen microRNA-cDNA freisetzt. Das Gesamtvolumen von 20µl je Well bestand aus 2µl der verdünnten cDNA mit 10µl des TaqMan® 2xUniversal PCR Master Mixes und 1µl der TaqMan® Primer mit Nuklease freiem ddH₂O. Die qRT selbst wurden im CFX Real-Time System von Bio-Rad durchgeführt. Nach initialer Denaturierung bei 95°C für eine Dauer von zehn Minuten folgten 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden und 60 Sekunden bei 60°C für Hybridisierung und Extension.

2.2.5.9 Proteinernte und Aufbereitung

Für die Proteingewinnung wurden die NRVCM und C2C12-Zellen im 6-Well Format kultiviert. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, erfolgte ein Waschschrift mit 2ml PBS/Well. Nach erneuter Absaugung wurden je Well 180µl von oben genanntem Kernlysepuffer (KLP) inklusive Phosphatase Inhibitor II und III, Proteinaseinhibitor und DTT hinzugegeben und die Zellen auf Eis mittels eines Zellschabers von den Platten gelöst. Nach vorsichtigem Invertieren wurde das Lysat in ein 1,5ml Tube überführt. Zum schonenden Aufbrechen der Kerne durchlief das Lysat dreimal den Zyklus des Schockgefrierens in Flüssigstickstoff sowie des Auftauens bei RT. Daraufhin wurden die Proben bei 10.000rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um überflüssige Zellbestandteile von dem Proteinlysat zu trennen. Danach wurde der Überstand in ein neues 1,5ml Tube überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert.

2.2.5.10 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Protein Assay Dye Reagent Concentrate von Bio-Rad verwendet. Vor Anwendung musste das Konzentrat mit 1:5 mit ddH₂O verdünnt und filtriert werden. Zum Erstellen der benötigten Standardkurve zur Eichung wurden ausgehend von Bovinem Serum Albumin mit einer Konzentration von 2,56mg/ml drei weitere Verdünnungen (1,28mg/ml, 0,64mg/ml, 0,32mg/ml) hergestellt. Zusätzlich wurde noch eine Leerprobe mit Wasser mitbestimmt. Von jeder zu messenden Probe, auch Standard- und Leerprobe, wurden 2µl/Well eingesetzt und im Triplikat gemessen. Der lineare Messbereich lag bei

einer Konzentration von 0,05-0,5mg/ml Protein. Bei Überschreiten dieser Grenze konnte gegebenenfalls auch eine Verdünnung bestimmt werden. Zu jedem Well wurden nun 200µl des anfänglich angesetzten Protein Assay mithilfe der 8-Fach Mehrkanalpipette von Eppendorf hinzugegeben und für fünf Minuten bei RT inkubiert und vorsichtig geschüttelt. Die Messung der Extinktion bei 595nm sowie die Berechnung der Konzentration erfolgten im Spektrometer Infinite M200Pro von Tecan.

2.2.5.11 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zur Trennung der zu untersuchenden Proteine nach Molekulargewicht durchgeführt. Die Proben wurden gleichmäßig verdünnt, sodass gleichmäßige Proteinmengen (40µg) in einem Blot in jeder Tasche verwendet wurden. Durch Hinzugabe von 4xLaemmli Puffer im passenden Verhältnis (Endkonzentration 1x) wurden die Proben mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. SDS dient der Denaturierung der Proteine sowie der Demaskierung der negativen Ladungen der Proteine, sodass sie sich im elektrischen Feld in Richtung der Anode bewegen. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 95°C denaturiert.

Die Gele wurden in den dafür vorgesehenen Glasplatten mit einer Stärke von 1,5 mm gegossen. Die unteren Dreiviertel des Gels wurden aus dem oben genannten Trenngelpuffer, sowie entionisiertem Wasser und Polyacrylamid in einer Endkonzentration (10-12,5%) gegossen. Durch Hinzugabe von 60µl 10%igem APS und 30µl TEMED vor dem Gießen wurde die Polymerisierung durch Radikalbildung initiiert und katalysiert. Zur Verhinderung von Luftblasen wurden direkt nach dem Einfüllen des Trenngels 300µl Isopropanol auf das Gel gegeben. Nach Aushärtung wurde das Isopropanol abgegossen und Reste vorsichtig mit Filterpapier entfernt. Das weichere Sammelgel (5% Acrylamid) bestand aus Sammelgelpuffer, Wasser und Acrylamid, sowie 15µl TEMED und 30µl APS. Je nach Probenanzahl wurde nun entweder ein Zehner- oder Fünfzehnerkamm für die Taschenbildung verwendet. Nach Aushärtung wurde das Gel in die Haltevorrichtung der Kammer überführt und mit Laufpuffer befüllt. Nach Spülung der Taschen mit einer 50ml Spritze zum Entfernen von Gelresten wurden diese mit den Proben durch Einsatz der langen Pipettenspitzen von Biorad beladen. Die jeweils außenliegenden Taschen wurden mit 5µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder befüllt, welche in äquivalenten Mengen zum Volumen der Proteinproben Laemmli-puffer und Wasser enthielten. Der Deckel der Kammer wurde aufgesetzt und das elektrische Feld für 15 Minuten bei 100V zum Sammeln der Proteine im Sammelgel angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 140V erhöht, bis die gewünschte Laufweite erreicht worden ist.

2.2.5.12 Western Blotting

Für den Transfer der Proteine wurden PVDF-Membranen von GE Healthcare verwendet, welche vor Benutzung für zehn Sekunden zur Aktivierung der Membran in Methanol inkubiert werden mussten. Im Transferpuffer wurden die „Blotting-Kassetten“ zusammengelegt. Diese Kassette bestand von unten ausgehend aus dem unteren Rahmen, einem Schwamm, drei Schichten Filterpapier, dem vorsichtig aus den Glasplatten gelösten SDS-Gel, der PVDF Membran, drei Schichten Filterpapier, einem Schwamm und dem oberen Rahmen. Diese Kassette wurde in die Vorrichtung Kammer zusammen mit einem -20°C kalten Kühlakku überführt und die Kammer mit Transferpuffer vollständig aufgefüllt. Der Deckel wurde angebracht und das elektrische Feld mit einer Stromstärke von 350mA für 90 Minuten angelegt. Der Blotvorgang konnte durch das Übertragen der farblich markierten Leiter auf die Membran optisch verifiziert werden. Anschließend wurde die Membran in 5%ige Milch in TBST überführt und für mindestens zwei Stunden zum Binden von unspezifischen Bindestellen geblockt.

2.2.5.13 Detektion von spezifischen Proteinen auf der PVDF Membran

Zur Detektion von spezifischen Proteinen wurde die Membran mit dem Protein über Nacht mit dem Erstantikörper bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dann dreimal für 10 Minuten in TBST zur Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers gewaschen. Anschließend wurde speziesgerecht mit Zweitantikörper mit einer Konzentration von 1:10000 in 5%Milch-TBST für 60 Minuten bei RT inkubiert. Diese Antikörper sind mit HRP („Horseradish peroxidase“, „Meerrettichperoxidase“) konjugiert und dienen der Detektion der Proteine auf der Membran mittels Amersham ECL Plus von GE Healthcare. Hierbei handelt es sich um eine Luminol- und eine Peroxidlösung. Die HRP der gebundenen Zweitantikörper katalysiert dabei die Oxidation des Luminols in Anwesenheit von Peroxid, sodass Chemolumineszenz bei 425nm entsteht. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde erneut dreimal für zehn Minuten mit TBST gewaschen. Währenddessen wurden das Amersham ECL Plus angesetzt, indem jeweils 900µl Luminol- und Peroxidaseelösung vermischt wurden und für mindestens eine Membran verwendet werden konnte. Auf einer lipophilen Oberfläche wurde die Membran gelagert und das Amersham ECL Plus auf die Membran pipettiert. Im Dunkeln wurde nun für fünf Minuten inkubiert und direkt im Anschluss wurde die Membran im FlourChem Q von Alpha Innotech unter UV-Belichtung entwickelt. Nachträglich wurde noch die Proteinleiter zur Identifizierung der Banden in den Cy5/Cy3 Kanäle n aufgenommen. Mithilfe der Software Alphaview Q zur Detektion konnte nun die Proteinexpression densitometrisch quantifiziert werden.

2.2.5.14 Ernte und Durchführung der Luciferasereporter Assays

Das Medium der C2C12-Zellen in den 24-Well-Platten wurde 48 Stunden nach Transfektion abgesaugt und die Zellen einmalig mit kaltem PBS gewaschen. Ein Teil des 5x Passive Lysis Buffer wurde mit vier Teilen ddH₂O in einem 50ml Falconröhrchen vermengt, sodass jedes Well mit 100µl Lysepuffer befüllt werden konnte. Für eine gleichmäßige Verteilung wurde die Multipipette® von Eppendorf genutzt. Zur weiteren Lyse wurden die Zellen einmalig bei -80°C für 20 Minuten eingefroren, um bei RT und mit maximaler Geschwindigkeit auf einem horizontalen Plattenschüttler für 30 Minuten geschüttelt zu werden. Bei dem Dual-Glo® Luciferase Assay System von Promega werden zwei unterschiedliche Substrate für zwei verschiedene Luciferasen verwendet. Als Reporter wurde die Glühwürmchenluciferase (*luc2P*, „firefly luciferase“) und zur Normalisierung die Korallenluciferase (*hRluc*, „renilla luciferase“) verwendet. Die Substrate wurden aufgetaut und die Injektoren des Infinite M200Pro von Tecan befüllt, sodass keine Luft mehr im Schlauchsystem war. Von den Proben wurden 20µl in eine weiße, intransparente 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde eingelegt und das Messprotokoll gestartet. Durch die automatische Injektion wurde jedes Well einzeln gemessen. Zuerst wird durch Zugabe des ersten Substrates („Dual-Glo® Luciferase“) die Aktivität der Firefly Luciferase durch Messung der Chemolumineszenz bestimmt. Diese wurde durch Zugabe des zweiten Substrates („Dual-Glo® Stop & Glo®“) terminiert und die Aktivität der Renilla Luciferase bestimmt.

2.2.5.15 Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Zellgröße von NRVCN

Wie beschrieben wurden die NRVCN im 12-Well Format auf Coverslips mit Kollagenbeschichtung ausgesät. Das DMEM-Medium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um anschließend für fünf Minuten bei RT mit 1ml 4%-Paraformaldehyd fixiert zu werden. Hiernach wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde bei RT mit 2,5%BSA in PBS blockiert sowie mit 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Für die Inkubation mit dem Erstantikörper wurde Parafilm als lipophile Oberfläche über eine Glasplatte, welche sich in einer Kammer mit feuchtem Filterpapier befand, gezogen und jeweils 100µl des in PBS und 2.5% BSA verdünnten Erstantikörpers auf den Parafilm pipettiert. Die an den Coverslips anhaftenden Zellen wurden nun kopfüber auf den vorgelegten Antikörper gegeben und für eine Stunde bei RT in der geschlossenen Kammer inkubiert. Danach wurde dreimalig mit PBS gewaschen und mit den Zweitantikörpern nach selbigem Prinzip inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS und einmal mit ddH₂O gewaschen, um Verunreinigungen durch Kristallisation des PBS zu vermeiden. Die Coverslips wurden vom überschüssigem Wasser mittels Zellstoff befreit und mit 20µl FluorPreserve™ Medium auf die Objektträger mit der Zellseite nach unten gelegt. Die Objektträger mit den Coverslips wurden über Nacht bei 4°C getrocknet. Die Bilder wurden mit dem Keyence BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop

aufgenommen, welches mit einer 20x CFI Plan Apo λ Linse mit einem NA von 0,75 bei RT ausgestattet war und mit der zugehörigen BZ-II-Analyzer Software analysiert.

2.2.5.16 Zelloberflächenmessung

Zum Erstellen von Bildern für die Messung der Zellgröße wurden insgesamt 125 (x/y/z, 5x5x5) Bilder bei 20-facher Vergrößerung für jeden Fluoreszenzkanal (DAPI und α -Actinin) erstellt. Diese Einzelbilder haben eine Überlappung von 20% und wurden zu einem Großbild mit aus den z-Achsenbildern errechneten Fokus zusammengesetzt. Mittels der in der BZ-II Analyzer enthaltenen HybridCellCount-Software wurde die Zellgröße bestimmt. Die Einstellung für alle Bilder wurde an der Kontrolle festgelegt und galt dann für jede weitere Berechnung eines Versuches. Die Zelloberfläche wurde durch die α -Actinin-Färbung festgelegt und im zweiten Schritt wurde die DAPI-Färbung zum Bestimmen der Zahl der Zellkerne extrahiert. Es wurden nur Zellen in die Berechnung der Zelloberfläche eingeschlossen, die keine Zellkontakte sowie nur einen Kern aufweisen.

3 Ergebnisse

3.1 Suche nach Zielstrukturen der miR-301a

3.1.1 Ergebnisse der *in silico* Suche nach Zielstrukturen der miR-301a

Die Identifizierung von potentiellen Zielgenen der miR-301a-3p, im Folgenden miR-301a genannt, wurde mit einer *in silico* Suche mit den oben genannten (siehe 2.2.1) Datenbanken für die Spezies *Mus musculus* (Hausmaus) durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 3066 Gene als potentielle Bindungspartner der miR-301a genannt. Das Venn-Diagramm (A, Abbildung 3) zeigt die Schnittmengen der unterschiedlichen Vorhersagewerkzeuge.

Zur weiteren Eingrenzung wurden nur solche Gene weiterverfolgt, die entweder von vier Datenbanken vorhergesagt wurden (F; Abbildung 3) oder die sich nach „Score“ unter den oberen Zehn je Datenbank befanden (B, C, D, E; Abbildung 3). Es wurden so 75 verschiedene Gene gefunden, auf die diese Kriterien zutrafen.

Die in grau unterlegten Gene (*Acvr1*, *Cfl2*, *Qk* und *CLCN3*) wurden anschließend für die Versuche mit dem Luciferasereporter benutzt. Die Auswahl dieser vier Gene erfolgte durch Einsatz des Programmes DAVID und vorzugsweise wurden die ausgewählt, welche dort einen kardialen Bezugspunkt zeigten.

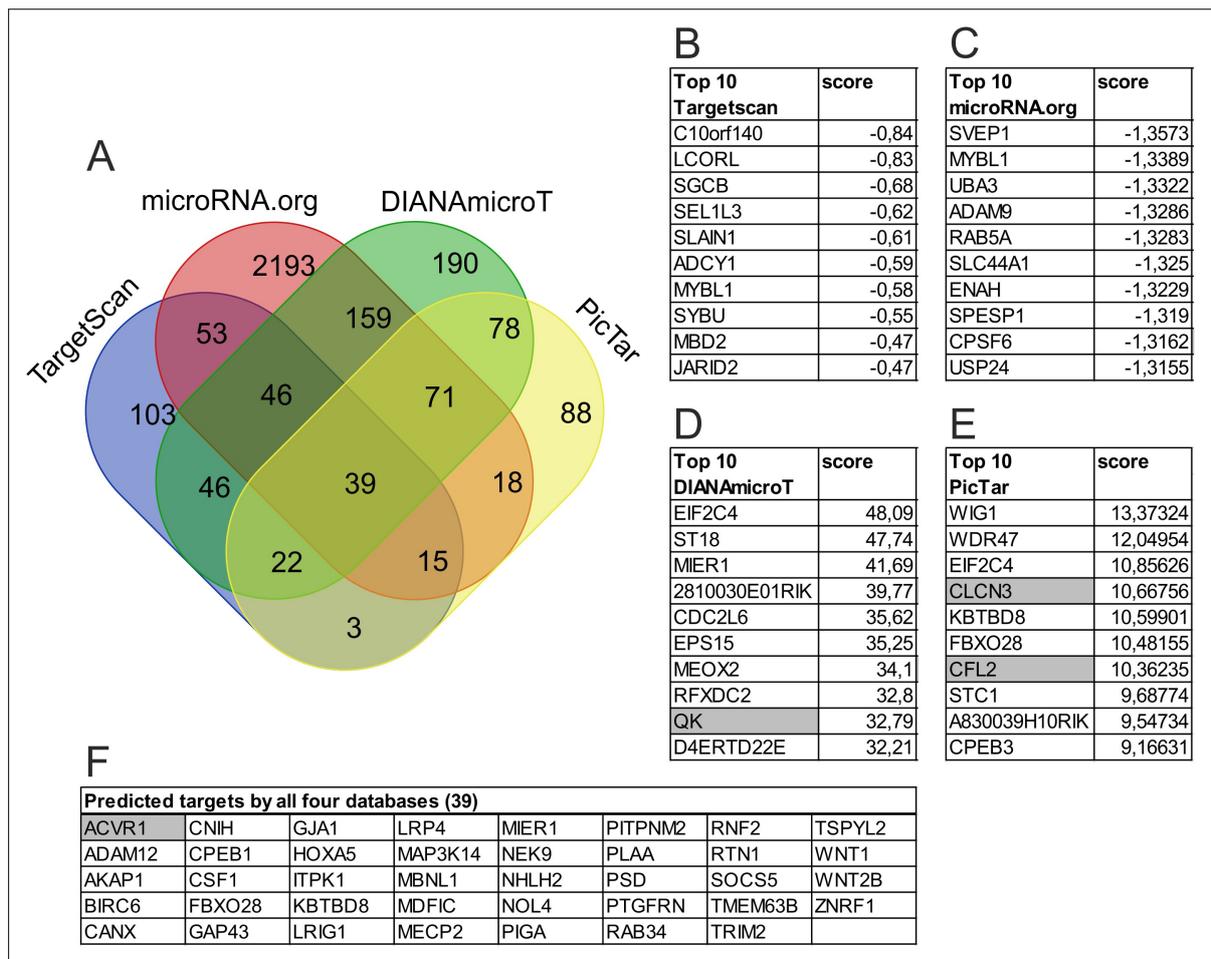


Abbildung 3: Übersicht der vorhergesagten Zielstrukturen der miR-301a. A; Venn-Diagramm mit den Ergebnissen, der Suche nach Zielstrukturen. Überschneidungen der einzelnen Formen geben die Schnittmenge der gleichen vorhergesagten Gene an. B, C, D, E; Die oberen Zehn („Top 10“) je Datenbank nach individuellem „score“. F; Liste der Gene aus der Schnittmenge aller Datenbanken. Grau unterlegt finden sich die Gene, die für die Luciferase-Reporter-Experimente verwendet wurden.

3.1.2 Cofilin-2 als Zielstruktur der miR-301a

MicroRNAs zeigen ihre Wirkung auf die Zielstrukturen bei Bindung an die 3' untranslatierte Region (3'UTR) des Transkriptes (mRNA) durch Hemmung der Translation. Somit kommt es bei einer Interaktion der 3'UTR mit einer microRNA zu verminderter Proteinexpression innerhalb der Zelle (143). Dieser Funktionsmechanismus wird zum qualitativen Nachweis der Bindung einer microRNA an eine 3'UTR verwendet, indem die 3'UTR der Gene von Interesse in einen geeigneten Vektor, pmiRGLO (A, Abbildung 4), kloniert wurde, welcher für eine stetige Transkription der Luciferase, *luc2*, sorgte. Durch Bindung der microRNA an das Transkript kommt es dann zu verminderter Translation und somit zu geringerer Luciferase-Aktivität, welche durch Messung der Lumineszenz (für Details siehe: 2.2.5.14) bestimmt werden kann. Für

die Überexpression von miR-301a in den C2C12-Zellen wurden microRNA-Mimics verwendet, die im Vergleich zur eingesetzten Negativkontrolle und der endogenen Expression zu einer deutlichen Steigerung des miR-301a Niveaus in den C2C12-Zellen führten (B, Abbildung 4). Mit Einsatz des Luciferasereporters wurde Cofilin-2 als Zielstruktur der miR-301a identifiziert, da sich eine deutliche Senkung der Luciferaseaktivität bei Exposition mit miR-301a zeigte. Um diese Bindung zu verifizieren, wurden die vorhergesagten Bindestellen mutiert, indem die "Seed"-Sequenz so verändert wurde, dass sie nicht mehr mit der miR-301a komplementär war, damit der durch sie vermittelte Effekt aufgehoben wurde (140). Die Positionen innerhalb der Abbildung 4 (370, 840, 1030, 1717) beziehen sich auf die Basen der 3'UTR nach dem Stopcodon des offenen Leserasters (D, Abbildung 4). Hier zeigte sich, dass die Mutation der Bindestellen an Position 370 und 1030 zu einer deutlichen Abschwächung der Inhibition durch miR-301a führte (D, Abbildung 4), wohingegen die Mutation der Bindestellen an Position 840 und 1717 keinen Effekt zu haben schien. Bei Mutation aller Bindestellen in einem Konstrukt wurde der Effekt der miR-301a komplett nivelliert. Insgesamt zeigte sich Cofilin-2 im Luciferasereporter als Zielstruktur von miR-301a mit zwei signifikanten Bindestellen (370 und 1030).

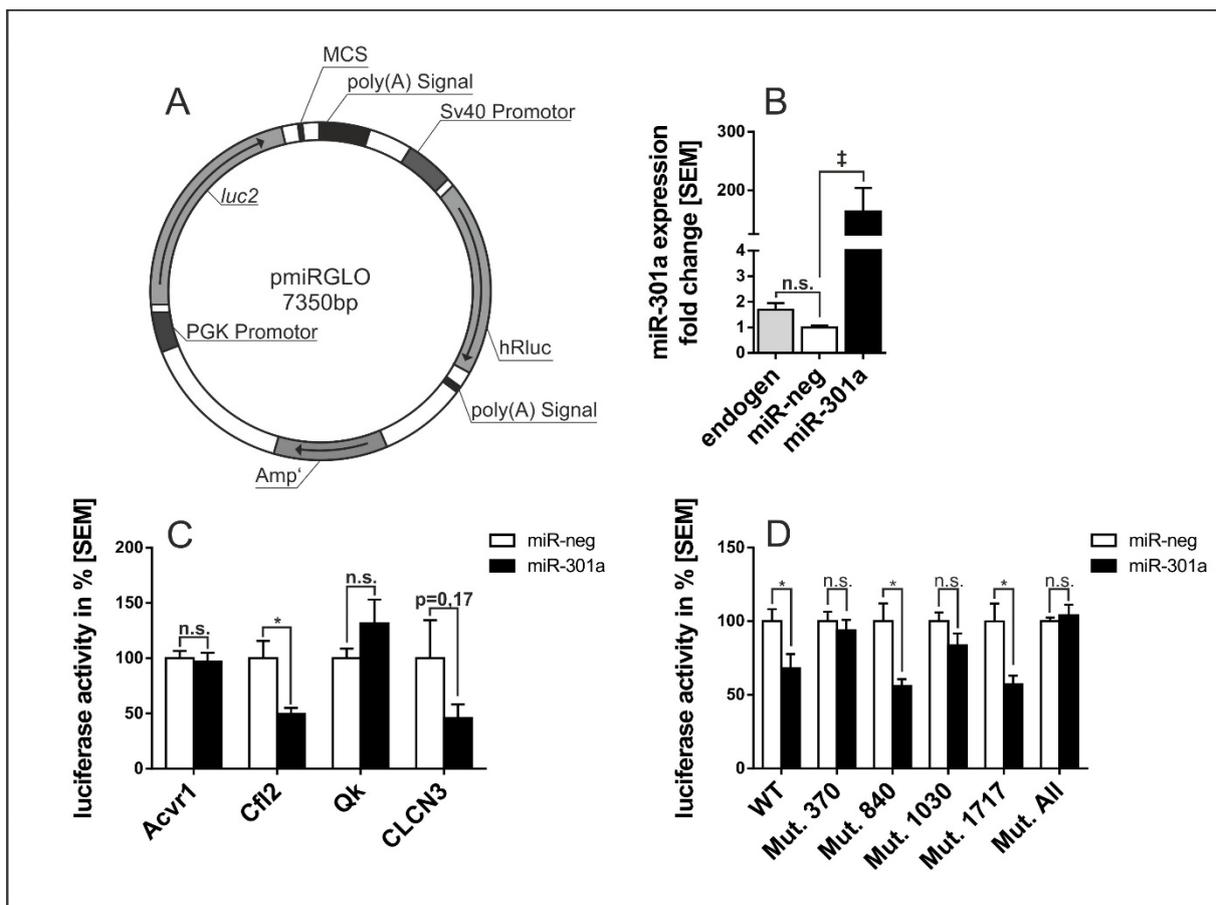


Abbildung 4: Cofilin-2 (Cofilin-2) zeigte sich durch verminderte Luciferaseaktivität von miR-301a reguliert. Die 3' untranslatierten Regionen von Acvr1, Cofilin-2, Qk und CLCN3 befanden sich in dem pmirGLO Vektor (A) hinter der Luciferase, *luc2*. Die zweite Luciferase, *hRluc*, diente als endogene

Kontrolle. B; Durch quantitative Echtzeit-PCR-Analyse wurde gezeigt, dass miR-301a mit Mimics überexprimiert werden konnte. Als Vergleich dienten Zellen, die mit einer Mimic-Negativkontrolle behandelt wurden sowie unbehandelte Zellen, wobei die Negativkontrolle im Vergleich zu diesen zu keiner statistisch signifikanten Regulation von miR-301a führte. C; Die Luciferaseaktivität zeigte sich im Cofilin-2 Konstrukt bei Einsatz von miR-301a-Mimics (20pmol) in C2C12 Myoblasten vermindert (n=6). D; Durch Mutation der Bindestellen konnte gezeigt werden, dass sich der Effekt inhibieren lässt (n=4). Mut.: Mutation der Bindestelle, an der Position in der 3'UTR. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, C, D) durchgeführt. Signifikanzniveaus n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; ‡: $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

3.1.3 Regulation der Translation von Cofilin-2 durch miR-301a

Die im Luciferasereporter nachgewiesene Regulierung der 3'UTR durch miR-301a sollte nun *in vitro* durch Hemmung der Translation überprüft werden. Durch Überexpression von miR-301a mit microRNA Mimics in NRVCM zeigte sich hier, dass Cofilin-2 vermindert exprimiert wurde (A, B, Abbildung 5). Dazu im Einklang stand, dass die Expression von Cofilin-2 durch Einsatz von miR-301a Inhibitoren anstieg, da durch Hemmung der selbst inhibitorisch wirkenden miR-301a eine vermehrte Translation erfolgen konnte (C, D, Abbildung 5).

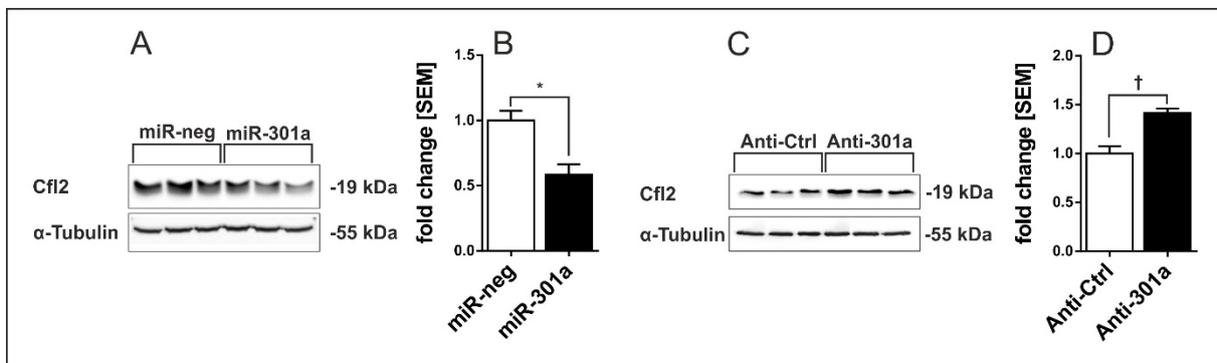


Abbildung 5: Die Expression von Cofilin-2 ließ sich durch miR-301a beeinflussen. A, B; Westernblotanalysen zeigten in NRVCM, dass Überexpression von miR-301a mit Mimics (30pmol/Well) zu verminderter Expression von Cofilin-2 führen (n=3). F, G Verminderung der Expression von miR-301a durch microRNA Inhibitoren (100pmol/Well) zeigten im Westernblot in NRVCM die Steigerung der Expression von Cofilin-2 (n=3). Zur Normalisierung wurde hier α -Tubulin verwendet. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, D) durchgeführt. Signifikanzniveaus *: $p < 0,05$; †: $p < 0,01$. Fehlerbalken: SEM.

3.1.4 Konservierung der miR-301a Bindestellen in verschiedenen Spezies

Beim Vergleich der miR-301a Bindestellen stellten sich vor allem die "Seed"-Sequenzen an den Positionen 370, 890 und 1030 als hoch konserviert unter den verglichenen Spezies dar (A, C, E, Abbildung 6). Allen voran Position 370 (A, Abbildung 6) schien insgesamt am höchsten konserviert zu sein. Lediglich bei Ratte und Mensch kommt es hier zu einer kleinen Differenz hinter der "Seed"-Sequenz, wohingegen Position 1717 (G, Abbildung 6) mit Basenabweichungen in der "Seed"-Sequenz selbst schwach konserviert ist.

Des Weiteren wurden hier die Bindestellen der murinen 3'UTR mit der Sequenz von miR-301a gegenübergestellt, damit die Übereinstimmungen in der "Seed"-Sequenz zwischen microRNA und Zielstruktur sichtbar wurden (B, D, F, H, Abbildung 6). Überdies wurden so weitere Basenpaarungen hinter der "Seed"-Sequenz kenntlich gemacht. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Mutation der Bindestellen (D, Abbildung 4) zeigte sich der essenzielle Einfluss der "Seed"-Sequenz auf die Funktion der Bindestelle, da die Positionen 370 und 1030 (B, F, Abbildung 6) die wenigsten weiteren Basenpaarungen außerhalb der "Seed"-Sequenz besaßen.

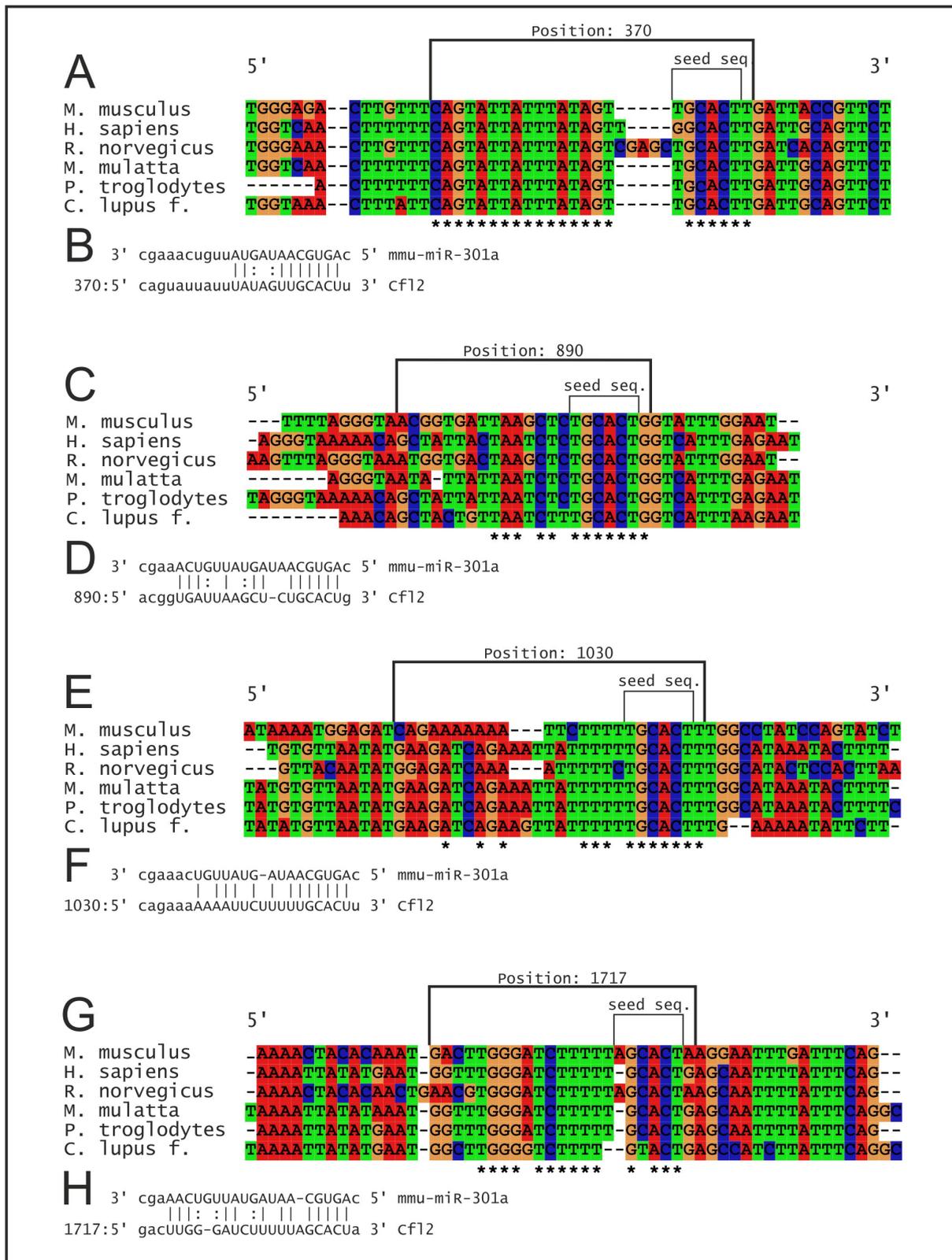


Abbildung 6: Übersicht der miR-301a Bindestellen in der 3'UTR von Cofilin-2. Als Ausgangspunkt für den Vergleich dienten die miR-301a Bindestellen, welche von microrna.org vorhergesagt wurden, in der 3'UTR von Cofilin-2 aus der Hausmaus (mmu). A, C, E, G; Sequenzabschnitte in 5' -> 3' Richtung der Spezies Hausmaus (*M. musculus*), Mensch (*H. sapiens*), Wanderratte (*R. norvegicus*), Rhesusaffe (*M. mulatta*), Schimpanse (*P. troglodytes*) und Haushund (*C. lupus familiaris*) wurden durch Einsatz der

Software ClustalX auf Homologie der Bindestellen mit jeweils 11-17 zusätzlichen Basen je Seite miteinander verglichen. *; homolog in allen Spezies. Die großen Rahmen fassen die gesamte Bindestelle zusammen und die kleinen Rahmen zeigen die "Seed"-Sequenz (seed seq.). Die Positionen beziehen sich auf die Anzahl der Basenpaare hinter dem offenen Leseraster von Cofilin-2 nach dem Stopcodon. B, D, F, H; Unterhalb der gepaarten Sequenzen finden sich die vorhergesagten Bindestellen in Paarung mit der miR-301a (mmu-miR-301a).

3.2 Heraufregulation von Cofilin-2 im Calsarcin-1 defizienten Mausmodell

Da sich miR-301a in den Calsarcin-1 defizienten Mäusen, $Cs1^{-/-}$, als weniger exprimiert darstellte, war es sinnvoll, auf die Expression von Cofilin-2 in diesen Tieren zu blicken. Hierbei stellte sich Cofilin-2 sowohl im Westernblot (A, B, Abbildung 7) als auch in der quantitativen Echtzeit PCR (C, Abbildung 7) als vermehrt exprimiert dar, was konkordant zu der Regulation von miR-301a war. Cofilin-2 ist nur in nicht phosphorylierter Form aktiv. Die Phosphorylierung findet an der dritten Aminosäure (Serin 3) statt und inaktiviert Cofilin-2 (144). Zur Evaluation, ob Cofilin-2 neben der erhöhten Gesamtexpression auch vermehrt als inaktive Form vorkommt, wurde die Menge des phosphorylierten Cofilin-2 ermittelt. Diese stellte sich als nicht signifikant reguliert dar (D, E, Abbildung 7). Schlussfolgernd zeigte dies, dass vermehrt aktives Cofilin-2 vorhanden war.

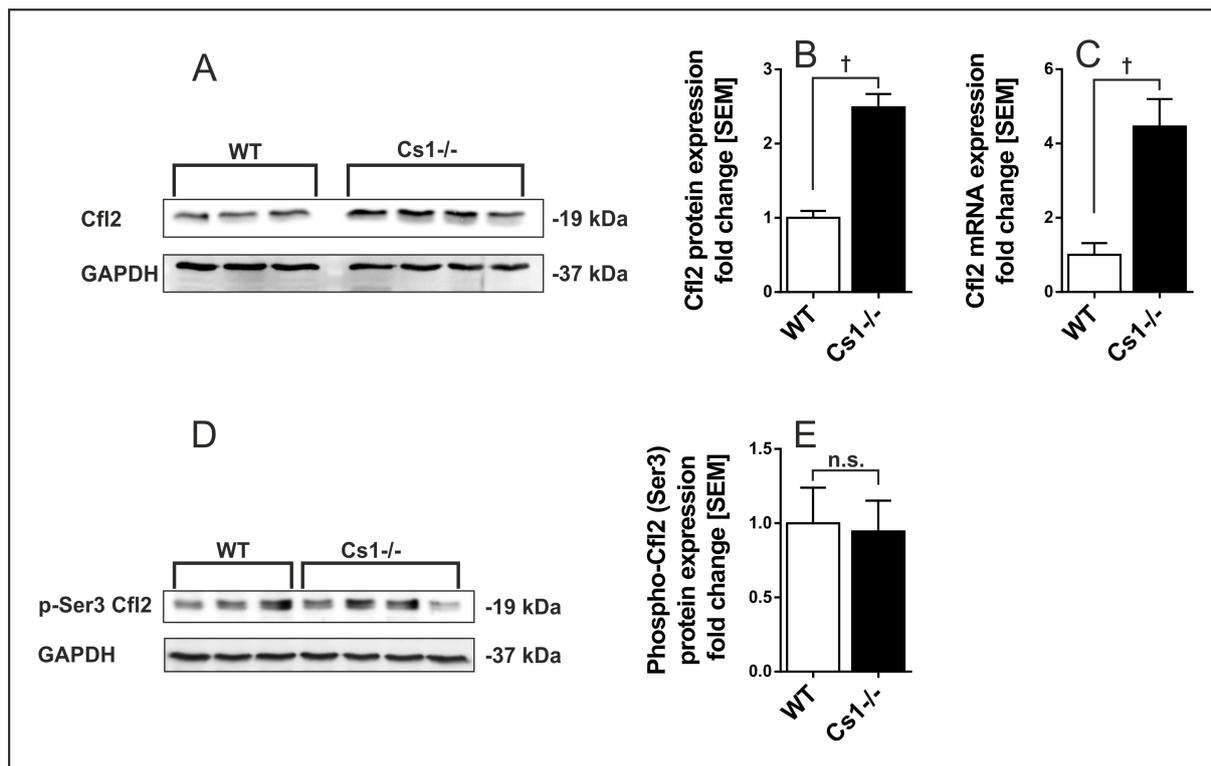


Abbildung 7: Cofilin-2 zeigte sich in Calsarcin-1 defizienten Mäusen heraufreguliert. A, B; Westernblotanalysen stellten Cofilin-2 als hochreguliert in den Calsarcin-1 defizienten Mäusen, Cs1^{-/-}, dar (n=3/4). C; Auch die mRNA-Expression zeigte sich in qRT Analysen erhöht. D, E; Die Phosphorylierung von Cofilin-2 schien im Westernblot unverändert (n=3/4). Densitometrische Daten wurden mit GAPDH als endogene Kontrolle berechnet. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, C, E) durchgeführt. Signifikanzniveaus n.s.: nicht signifikant; †: p<0,01. Fehlerbalken: SEM.

3.3 Cofilin-2 und miR-301a in anderen Mausmodellen des Herzversagens

In dem Cs1^{-/-} Mausmodell zeigte sich Cofilin-2 als herauf- und miR-301a als herunterreguliert. Zur weiteren Evaluierung der pathophysiologischen Relevanz sollte die Hypothese überprüft werden, ob auch andere Mausmodelle des Herzversagens ebenfalls differentielle Regulierungen aufweisen. Dafür wurden Proben von in unserer Arbeitsgruppe verfügbaren Modellen, nämlich dem Calcineurin transgenen Mausmodell (CnA TG) und dem MLP defizienten Mausmodell, MLP^{-/-}, verwendet und auf die jeweilige Expression von Cofilin-2/miR-301a hin untersucht.

3.3.1 Cofilin-2 und miR-301a im Calcineurin transgenen Mausmodell

Bei Calcineurin transgenen Tieren steht starke Hypertrophie im Vordergrund, welche dann zu Herzversagen führt (67). Die Proteinexpression von Cofilin-2 war in diesen Tieren im Vergleich zur Wildtypkohorte signifikant erhöht (A, B, Abbildung 8), was auch durch ein gesteigertes mRNA-Niveau (C, Abbildung 8) bestätigt wurde. Im Kontrast zu den *Cs1^{-/-}* Tieren zeigte sich hier allerdings eine Erhöhung der Expression von miR-301a (D, Abbildung 8).

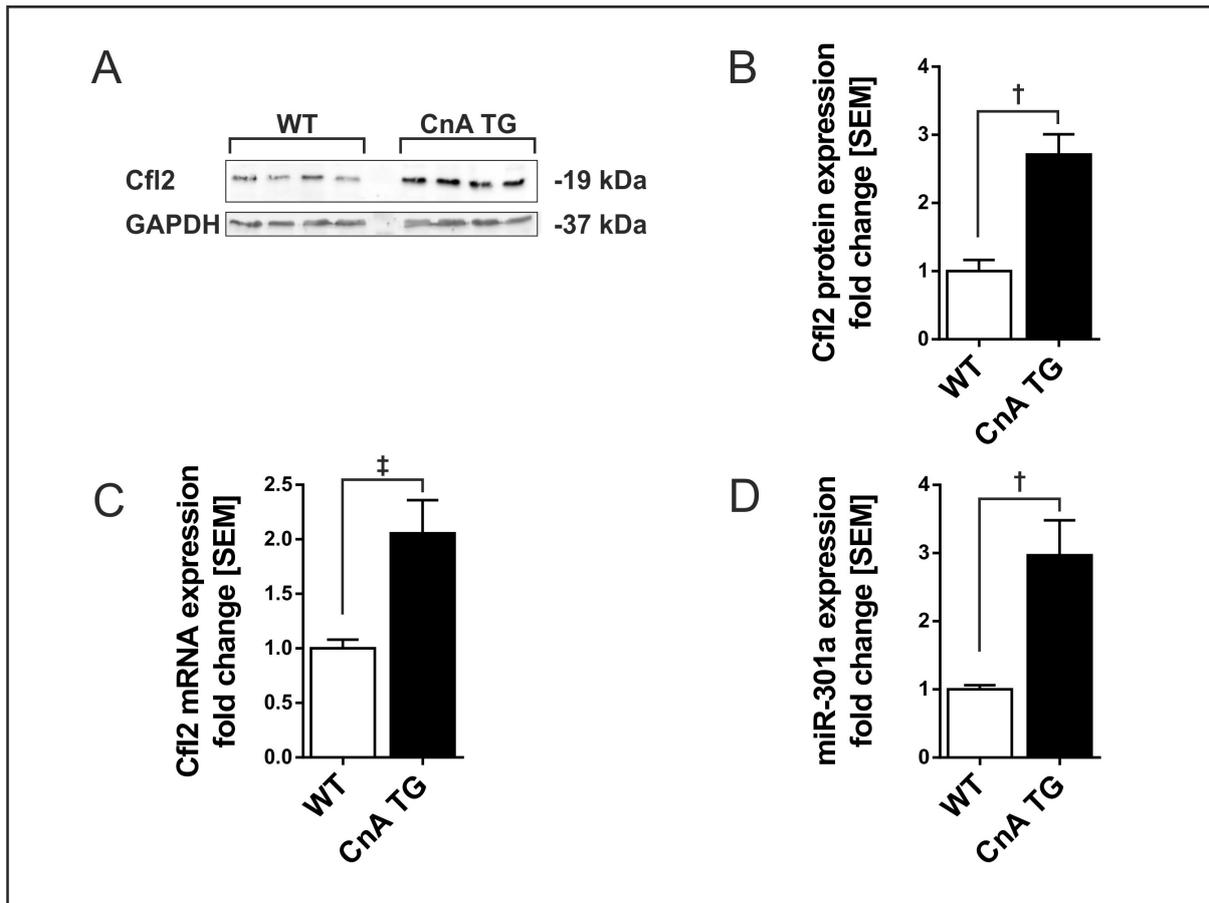


Abbildung 8: Cofilin-2 und miR-301a sind im Calcineurin transgenen Mausmodell heraufreguliert. A, B; Westernblotanalysen zeigten, dass Cofilin-2 in Calcineurin transgenen Mäusen (CnA TG, Alter: 18 Wochen) im Vergleich zur Wildtypkohorte (WT) heraufreguliert ist (n=4). Als endogene Kontrolle zur Normalisierung wurde GAPDH verwendet. C; Quantitative Echtzeit-PCR-Analysen konnten die Heraufregulation bestätigen (n=4). D; Ebenfalls zeigte sich in Echtzeit-PCR-Analysen, dass miR-301a vermehrt exprimiert wurde. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, C, D) durchgeführt. Signifikanzniveaus †: p<0,01; ‡: p<0,001. Fehlerbalken: SEM.

3.3.2 Cofilin-2 und miR-301a in MLP defizienten Mausmodell

Die Muscle LIM Protein defizienten Tiere, MLP^{-/-}, zeigen den Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie mit Hypertrophie und Herzversagen sowie veränderter Zellarchitektur (71). In diesem Mausmodell zeigte sich im Vergleich zu Wildtypwurfgeschwistern das gleiche Bild wie in den Calcineurin transgenen Tieren, bestehend aus Hochregulation von Cofilin-2 im Westernblot (A, B, Abbildung 9) und in der qRT (C, Abbildung 9) mit ebenfalls erhöhter Expression von miR-301a (D, Abbildung 9).

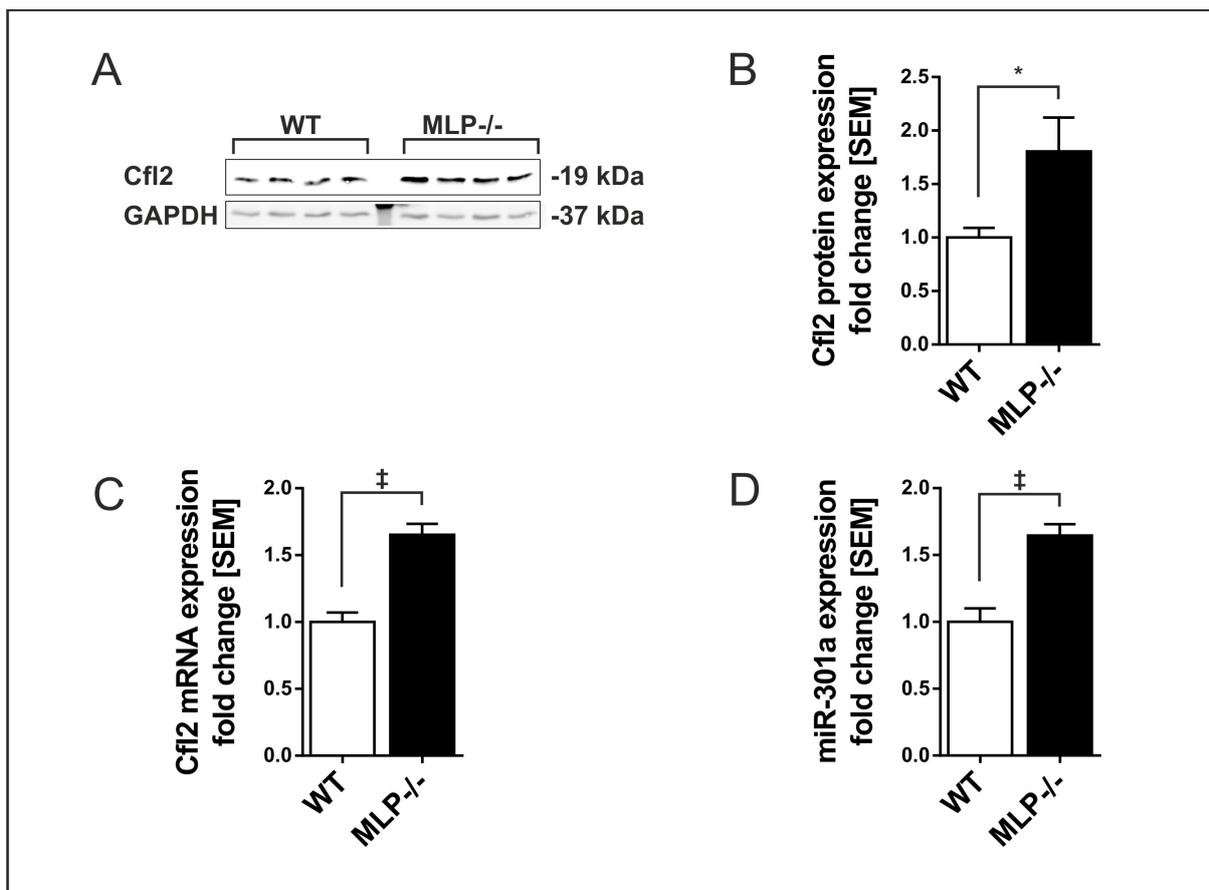


Abbildung 9: Cofilin-2 und miR-301a sind im MLP defizienten Mausmodell (MLP^{-/-}) heraufreguliert. A, B; Westernblotanalysen zeigten, dass Cofilin-2 in MLP^{-/-} Mäusen (Alter: 18 Wochen) im Vergleich zur Wildtypkohorte (WT) herauf reguliert ist (n=4). Als endogene Kontrolle zur Normalisierung der Densitometrieresultate diente GAPDH. C; Quantitative Echtzeit-PCR-Analysen konnten die vermehrte Expression von Cofilin-2 bestätigen (n=4). D; Auch hier zeigte sich in Echtzeit-PCR-Analysen miR-301a als erhöht exprimiert. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, C, D) durchgeführt. Signifikanzniveaus *: p<0,05; ‡: p<0,001. Fehlerbalken: SEM.

3.4 Effekt der *in vitro* Herunterregulation von Calsarcin-1 Expression auf miR-301a

Ausgehend davon, dass miR-301a lediglich in Cs1^{-/-} herunterreguliert war (88) und in den anderen untersuchten Mausmodellen heraufreguliert erschien (D, Abbildung 8; D, Abbildung 9), wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich um einen Calsarcin-1 spezifischen Effekt in diesem Mausmodell handeln könnte. Diese Hypothese sollte *in vitro* in NRVCM überprüft werden. Dafür wurde siRNA vermittelt, die Calsarcin-1 Expression in NRVCM gemindert (A, B, Abbildung 10). Dabei zeigte sich, dass die Minderung von Calsarcin-1 keinen signifikanten Effekt auf die Expression von miR-301a hatte (C, Abbildung 10).

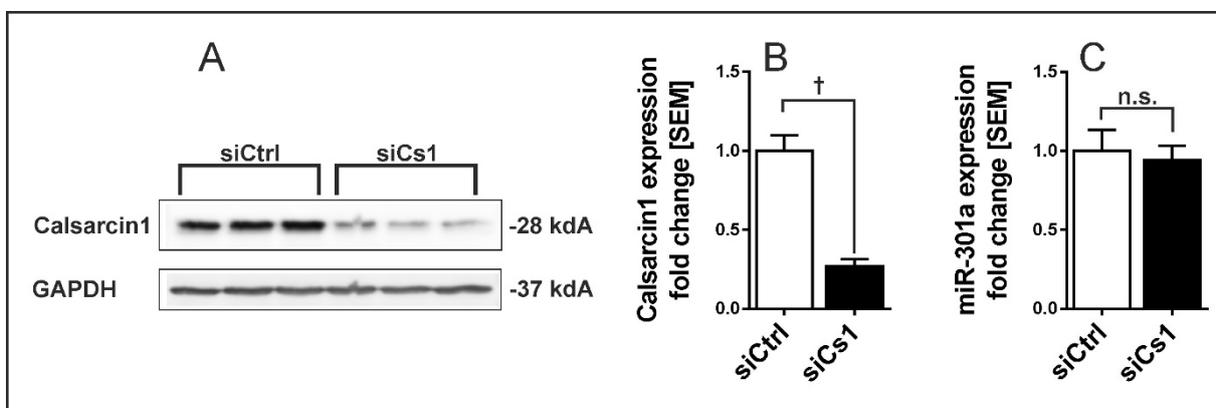


Abbildung 10: Verminderte Expression von Calsarcin-1 *in vitro* hat keinen Effekt auf die Expression von miR-301a in NRVCM. A, B; Westernblot, welcher die Herunterregulierung von Calsarcin-1 in NRVCM durch Einsatz einer siRNA (100pmol/Well) gegen Calsarcin-1 (siCs1) im Vergleich zur Kontroll-siRNA (siCtrl) zeigt. Zur Normalisierung der densitometrischen Daten wurde GAPDH verwendet (n=3). C; Quantitative Echtzeit-PCR, welche durch verminderte Expression von Calsarcin-1 keine Änderung der miR-301a Expression in NRVCM nachweisen konnte (n=6). Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, C) durchgeführt. Signifikanzniveaus n.s.: nicht signifikant; †: p<0,01. Fehlerbalken: SEM.

3.5 Vergleich der Expression von Cofilin-2 und miR-301a zwischen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

Da sich in Herzgewebe neben den Kardiomyozyten auch andere Zellen befinden, stellt sich die Frage nach der Verteilung von Cofilin-2 und miR-301a in diesen unterschiedlichen Zellen. Um dem nachzugehen und zu klären, welche kardialen Zellen Cofilin-2 vorwiegend exprimieren, wurden Kardiomyozyten mit kardialen Fibroblasten verglichen. Hier wurden bei der Prä-

paration der Kardiomyozyten nebst diesen auch Fibroblasten aus dem oberen Teil der Interphase im Percoll Gradienten gewonnen und für 72 Stunden gleichzeitig mit den Kardiomyozyten inkubiert. Zur Verifikation, dass die Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten ausreichend frei von der jeweils anderen Zellfraktion waren, wurde nach spezifischen Proteinen kontrolliert. Als spezifisches Protein für Kardiomyozyten wurde α -Actinin 2 (145) und für Fibroblasten Vimentin (146) verwendet. Damit zeigte sich, dass die Kardiomyozyten und die Fibroblasten jeweils frei von der anderen Fraktion war (A, B, Abbildung 11). Davon ausgehend zeigten sich Cofilin-2 und miR-301a vorwiegend in Kardiomyozyten exprimiert (C, D, E, Abbildung 11).

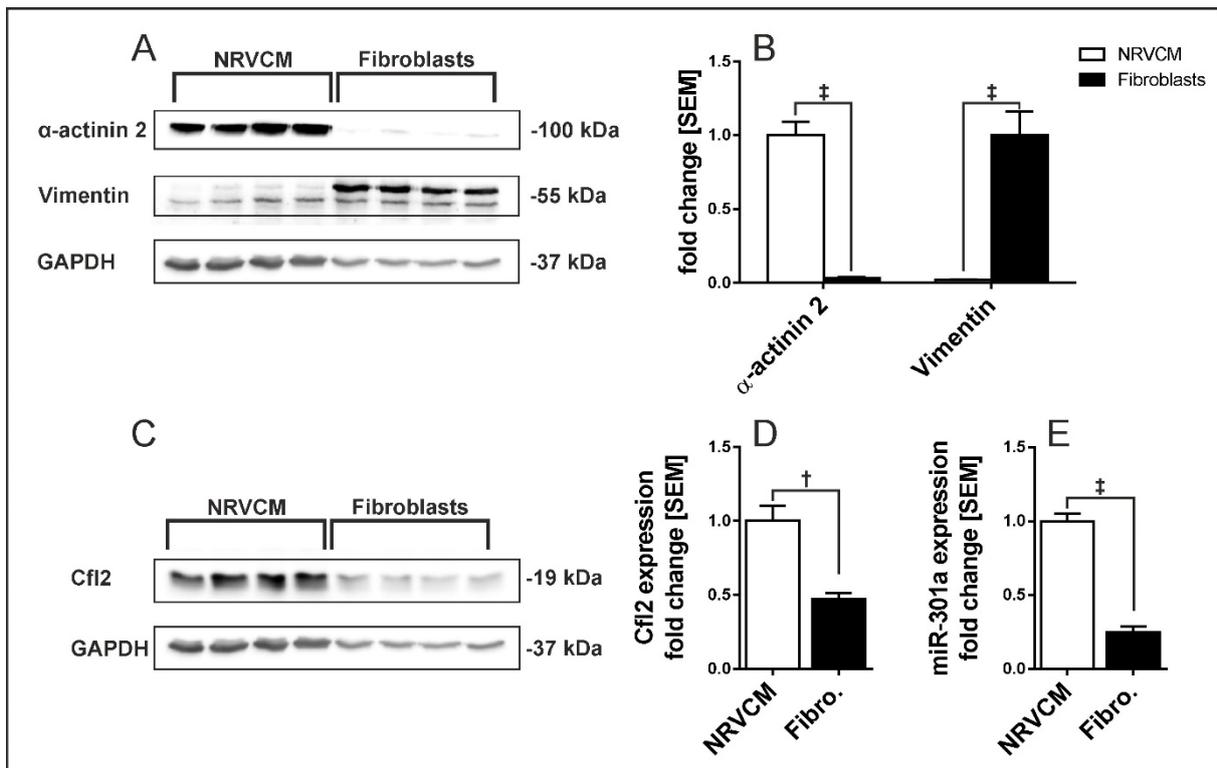


Abbildung 11: Cofilin-2 und miR-301a werden hauptsächlich in NRVCN und weniger in kardialen Fibroblasten exprimiert. A, B; Westernblot, welcher die Reinheit der NRVCN und der Fibroblasten Fraktion durch Darstellung eines Kardiomyozyten spezifisch exprimierten Proteins (α -Actinin 2) und eines Fibroblasten spezifischen Proteins (Vimentin) wiedergab. C, D; Cofilin-2 zeigte im Westernblot eine höhere Expression in NRVCN als in Fibroblasten (Fibro.) (n=4). GAPDH wurde als endogene Kontrolle zur Berechnung der Densitometrie verwendet. E; Echtzeit-PCR-Analyse, die zeigte, dass miR-301a hauptsächlich in NRVCN exprimiert wurde (n=4). Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, D, E) durchgeführt. Signifikanzniveaus †: p<0,01; ‡: p<0,001. Fehlerbalken: SEM.

3.6 Expressionsmuster der miR-301a in verschiedenen Geweben

Neben der Verteilung innerhalb der Zellfraktionen im Herzen, wurde die Verteilung der miR-301a in den verschiedenen Geweben betrachtet. Dafür wurden Proben aus verschiedenen Geweben von *Rattus norvegicus* in einer quantitativen Echtzeit PCR hinsichtlich den Expressionsniveaus der miR-301a miteinander verglichen. Die Expression im Herzen wurde zur Referenz erklärt und die Expression in den anderen Geweben relativ zu dieser berechnet. Es zeigte sich eine grundlegende Expression im Herzen sowie der Skelettmuskulatur (Abbildung 12), wobei sie hier vermehrt in den schnell kontrahierenden Typ 2 Muskelfasern des *M. vastus medialis* als im Vergleich zu den langsam kontrahierenden Typ 1 Muskelfasern des *M. soleus* nachgewiesen werden konnte. Wiederum ließ sich die höchste miR-301a Expression im Hirngewebe nachweisen. Weitere Gewebe mit nennenswerter Expression waren Ovar und Aorta, welche ähnliche Niveaus wie im Herzen zeigten.

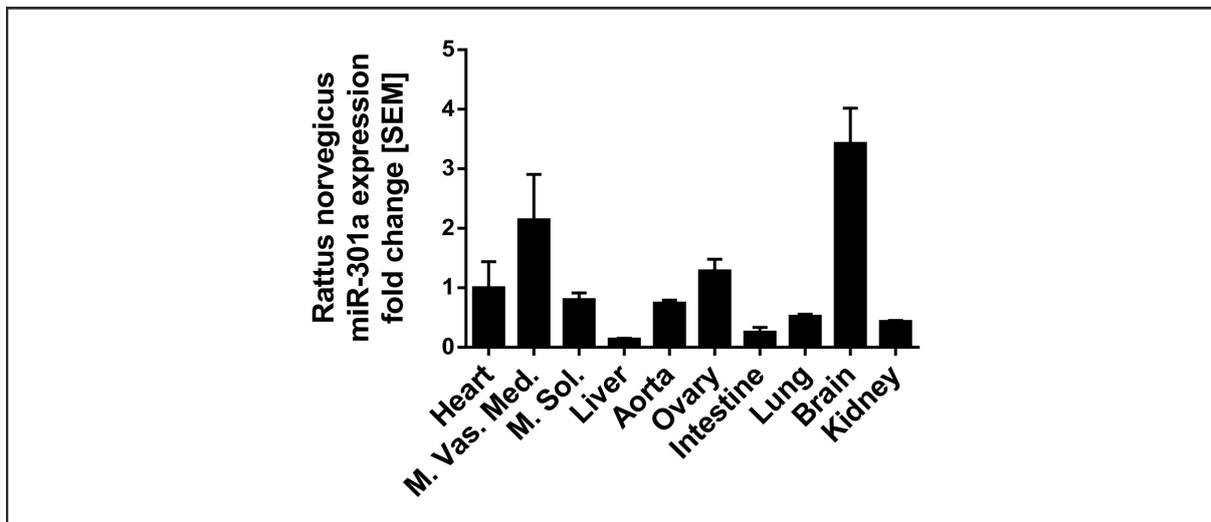


Abbildung 12: Unterschiedliche Expression der miR-301a in verschiedenen Geweben. Echtzeit-PCR-Analysen von verschiedenen Geweben (Herz, Musculus vastus medialis, Musculus soleus, Leber, Aorta, Ovarien, Darm, Lunge, Gehirn und Niere) von *Rattus norvegicus* zeigten, dass die miR-301a vorwiegend in Skelettmuskulatur und Gehirn exprimiert wird. Ebenfalls hohe Expression fand sich in Herz, Aorta und Ovar. Zur Normalisierung wurden die Herzdaten gewählt (n=3). Fehlerbalken: SEM.

3.7 Serum Response Faktor Aktivität in Abhängigkeit von Cofilin-2 und miR-301a

Über Cofilin-2 ist bekannt, dass es eine tragende Rolle im Aktinstoffwechsel einnimmt und dessen Dynamik beeinflusst, indem es beispielsweise die Filamentlänge der Sarkomere steuert oder für die Instandhaltung des sarkomerischen Aktins sorgt. Ebenfalls ein essentieller Beteiligter bei der Regulierung der Aktin Dynamik ist der Transkriptionsfaktor, Serum Response Faktor (SRF). Um zu klären, ob es eine Verbindung von Cofilin-2 mit SRF in Muskelzellen gibt, wurde die SRF-Aktivität in Abhängigkeit von Cofilin-2 und auch miR-301a in C2C12 Myoblasten untersucht.

3.7.1 Generierung eines Cofilin-2 Überexpressionskonstrukts und „Knockdown“ von Cofilin-2 in C2C12-Zellen

Damit die Wirkung von Cofilin-2 auf die SRF-Aktivität in C2C12-Zellen überprüft werden konnte, wurde eine Möglichkeit zur Regulierung der Expression von Cofilin-2 benötigt. Zur Überexpression wurde Cofilin-2 mittels Gateway™ Technologie in den pcDNA™-DEST40 Zielvektor eingebracht (siehe Methoden, 2.2.4.6). Dieser sorgt durch einen CMV Promotor für eine konstant hohe Expression. Mit diesem Vektor konnte Cofilin-2 in den C2C12-Zellen überexprimiert werden (A, B, Abbildung 13). Für die Minderung der Expression von Cofilin-2 wurden siRNAs gegen Cofilin-2 eingesetzt. Durch deren Transfektion konnte die Proteinexpression so gesenkt werden (C, D, Abbildung 13). Für die miR-301a Überexpression wurden die oben beschriebenen Mimics verwendet (siehe B, Abbildung 4; A, B, Abbildung 5) sowie für die Hemmung die microRNA Inhibitoren (C, D, Abbildung 5).

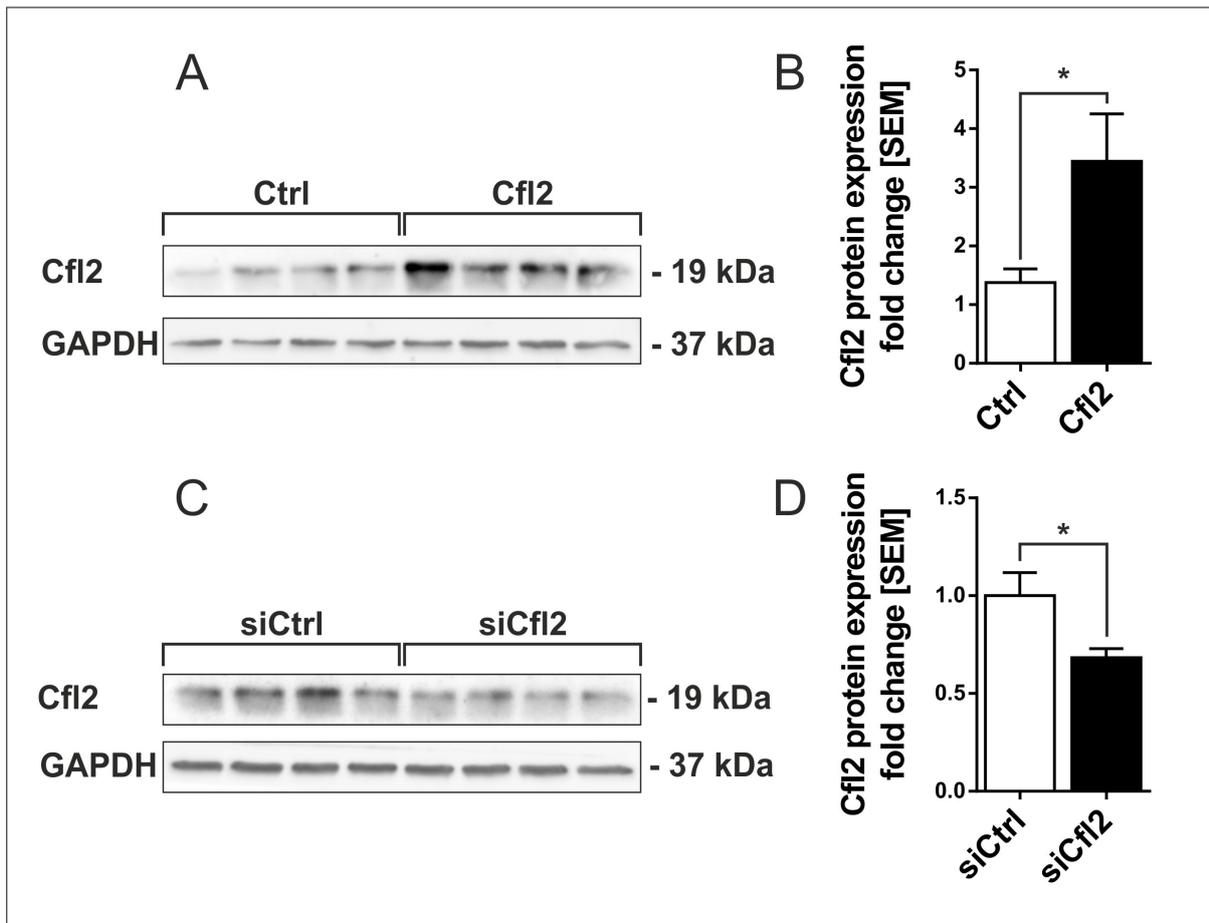


Abbildung 13 Generierung eines Cofilin-2 Überexpressionskonstrukts und „Knockdown“ von Cofilin-2 in C2C12-Zellen. A, B; Westernblot, welcher die Überexpression von Cofilin-2 (Cofilin-2) durch pcDNA™-DEST40 (2µg/Well) im Vergleich zum Leervektor (Ctrl) in C2C12-Zellen zeigt (n=4). C, D; Westernblot, der die verringerte Expression von Cofilin-2 durch Einsatz einer siRNA gegen Cofilin-2 (siCofilin-2) im Vergleich zu einer Kontroll-siRNA (siCtrl; je 100pmol/Well) darstellt (n=4). Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, D) durchgeführt. Signifikanzniveaus *: $p < 0,05$. Fehlerbalken: SEM.

3.7.2 Einfluss von Cofilin-2 und miR-301a auf die SRF-Aktivität in C2C12 Myoblasten

Zur Quantifizierung der SRF-Aktivität wurde der Luciferasereporter, pGL4.34 mit einem SRF sensiblen Element verwendet (A, Abbildung 14). Dieser Vektor sorgte in Anwesenheit des Transkriptionsfaktors SRF für die Produktion einer Luciferase, *luc2P*, dessen Vorhandensein indirekt durch Bestimmung der von ihm ausgehenden Lumineszenz ermittelt werden konnte (siehe Methoden, 2.2.5.14), und diente somit zur Quantifizierung der SRF-Aktivität. Die C2C12-Zellen wurden zusammen mit dem pGL4.74 Vektor transfiziert, welcher für eine Renilla-Luciferase zur endogenen Kontrolle kodiert. Weiterhin wurde die kleine GTPase RhoA,

Ras homolog gene family, member A, als Stimulator der SRF-Aktivität kotransfiziert (147), um die Wirkung von Cofilin-2 und miR-301a auch innerhalb einer aktivierten SRF Kaskade überprüfen zu können.

Durch Überexpression von Cofilin-2 konnte unter Stimulation mit RhoA vermehrte SRF-Aktivität nachgewiesen werden (B, Abbildung 14), wohingegen die Verminderung von Cofilin-2 zu einer spiegelbildlichen Senkung der SRF-Aktivität führte, welche durch RhoA nicht ausgeglichen werden konnte (C, Abbildung 14). Konkordant dazu präsentierte sich bei dem Einsatz von microRNA Inhibitoren gegen miR-301a eine Steigerung der SRF-Aktivität ohne RhoA. Allerdings kam es nur unter konstitutiv aktivem RhoA zu einer weiteren Steigerung, die sich beim Wildtyp RhoA nicht darstellte (D, Abbildung 14). Übereinstimmende Ergebnisse mit dem „Knockdown“ von Cofilin-2 ließen sich durch Überexpression von miR-301a erzielen, da es auch hier zu einer deutlichen Verringerung der SRF-Aktivität sowohl mit als auch ohne RhoA kam (E, Abbildung 14). Zusammenfassend zeigte Cofilin-2 eine aktivierende und miR-301a eine inhibierende Wirkung auf die SRF-Aktivität in C2C12-Zellen.

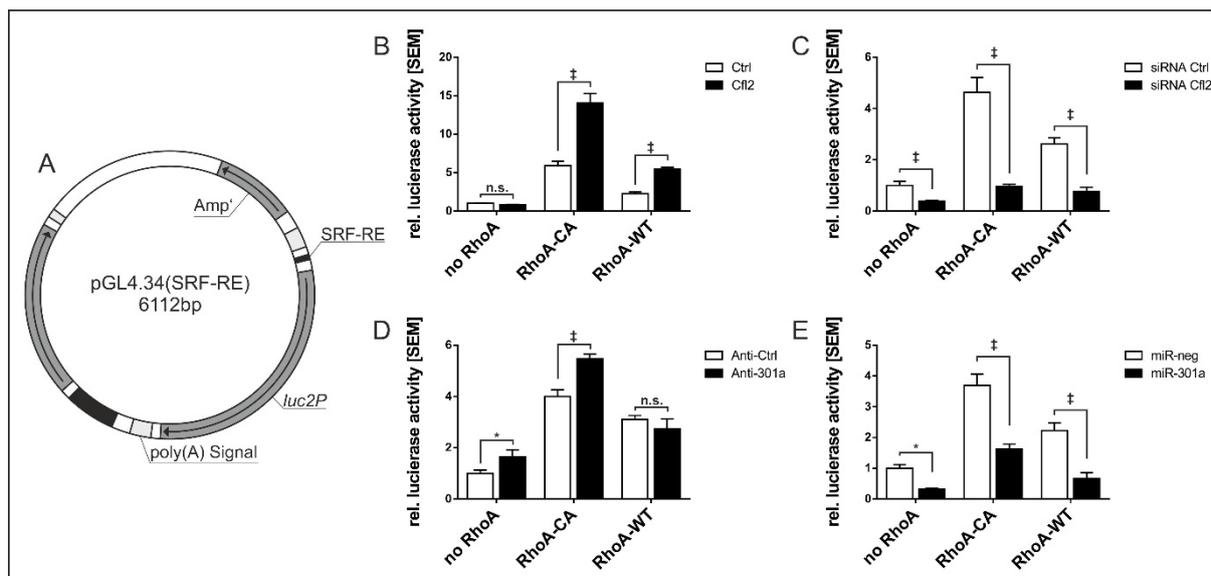


Abbildung 14: Cofilin-2 führt zu einer Steigerung und miR-301a zu einer Senkung der SRF-Aktivität in C2C12 Myoblasten. A; Schematische Übersicht des Luciferasereporters, pGL4.34, mit SRF sensiblen Element vor der Luciferase (*luc2P*) zur Detektion der Aktivität. B; Überexpression von Cofilin-2 (pcDNA™-DEST40, 0,5µg/Well) gegenüber Leervektor (Ctrl) zusammen mit RhoA (no : kein RhoA; CA: konstitutiv aktiv; WT: Wildtyp) führte zu gesteigerter SRF-Aktivität in C2C12 Myoblasten. C; Minderung der Expression von Cofilin-2 durch siRNA-Einsatz (25pmol/Well) gegenüber der Kontroll-siRNA (siRNA Ctrl) zeigten eine geringere SRF-Aktivität, sowohl mit als auch ohne RhoA. D; MicroRNA-Inhibitor (Anti-301a; 25pmol/Well) im Vergleich zur Kontrolle (Anti-Ctrl) vermittelte Senkung der Expression von miR-301a führte ebenfalls zu einer Steigerung der SRF-Aktivität auch bei Ko-Transfektion mit RhoA-CA. E; Durch microRNA Mimics hervorgerufene Überexpression von miR-301a (20pmol/Well) gegenüber der Negativ Kontrolle (miR-neg) zeigte eine Reduktion der SRF-Aktivität, gleichwohl ob

RhoA anwesend war oder nicht. Alle Versuche wurden im Hexaplikat durchgeführt und zur Normalisierung der Lumineszenz wurde mit Renilla Luciferase (pGL4.74) kotransfiziert. Statistische Analysen wurden mit Two-Way ANOVA (B, C, D, E) angefertigt. Signifikanzniveaus n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; ‡: $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

3.7.3 Veränderung der Expression von SRF abhängigen Genen in C2C12-Zellen

Da es sich bei dem Serum Response Faktor um einen Transkriptionsfaktor handelt, wurde auch die Expression von verschiedenen Genen untersucht, welche durch diesen reguliert werden. Dabei wurde die Expression in der quantitativen Echtzeit PCR von den SRF-abhängigen Genen Skelettmuskuläres α -Aktin, *Acta1*, Herzmuskel α -Aktin, *Actc1* und dem Protoonkogen *c-Fos* beobachtet. Bei Überexpression von Cofilin-2 zeigte sich die vermehrte mRNA-Expression von *Acta1* und *Actc1*, allerdings ohne signifikante Beeinflussung von *c-Fos* (A, Abbildung 15). Bei Überexpression von miR-301a zeigte sich auf der einen Seite eine Senkung der Expression von Cofilin-2 und *c-Fos*. Auf der anderen Seite kam es wiederum zu einer deutlichen Steigerung der *Actc1*-Expression bei unverändertem Niveau von *Acta1* (B, Abbildung 15).

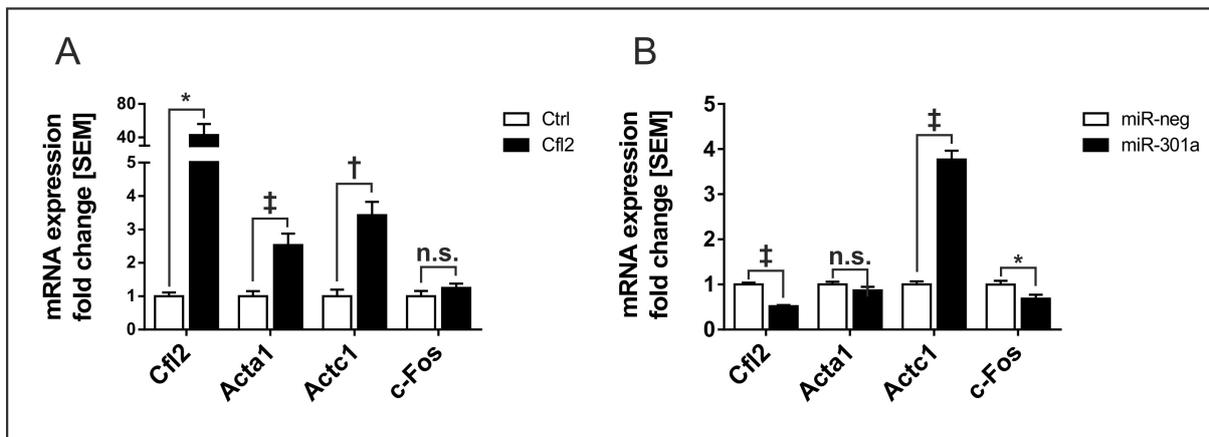


Abbildung 15: Beeinflussung von Cofilin-2/miR-301a Überexpression auf SRF-abhängige Gene.

A; Echtzeit-PCR-Analysen zeigten, dass durch Überexpression von Cofilin-2 (pcDNATM-DEST40, 1 μ g/Well) die SRF abhängigen Gene *Acta1* und *Actc1* heraufreguliert werden, wohingegen *c-fos* unbeeinflusst blieb. B; Bei erhöhter Expression von miR-301a durch microRNA Mimics zeigten sich Cofilin-2 und *c-fos* weniger exprimiert. Die Expression von *Acta1* erschien unverändert und *Actc1* erhöht. Beide Versuche wurden in C2C12 Myoblasten in Hexaplikaten durchgeführt. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (A, B) durchgeführt. Signifikanzniveaus n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; ‡: $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

3.8 Einfluss von miR-301a/Cofilin-2 auf die Expression von fötalen Genen und Zelloberfläche in NRVCM

Bei dem Cs1^{-/-} Mausmodell zeigte sich ein dilatativer Phänotyp ohne Zeichen einer DCM typischen Hypertrophie des linken Ventrikels, obgleich es zu einer deutlichen Hochregulierung der fötalen Gene *nppa*, *nppb* und dem Marker für Calcineurin Aktivität, *Rcan1-4*, kam (87, 88). Ausgehend hiervon sollte die Wirkung von Cofilin-2 und miR-301a auf ebendiese Variablen, fötale Genexpression und Zellgröße, *in vitro* in NRVCM untersucht werden. Die Expression der fötalen Gene wurde mit der oben erwähnten Multiplex PCR gemessen (siehe 2.2.5.7) und als Maß für die Zellgröße wurde die zweidimensionale Bestimmung der Zelloberfläche eingesetzt (siehe 2.2.5.15). Weiterhin wurde als pharmakologischer Stimulus zur Induktion von Hypertrophie in den Zellen Phenylephrin (PE) in einer Konzentration von 5µM eingesetzt. Bei PE handelt es sich um einen Agonisten am α_1 -Adrenorezeptor. Somit ist es ein Sympathomimetikum, welches in Kardiomyozyten zu einer Zunahme der Expression von Hypertrophie assoziierten Genen sowie einer Vergrößerung der Kardiomyozyten führt (148).

3.8.1 Heraufregulation von miR-301a führte zu erhöhter Expression von Rcan1-4

Die Überexpression von miR-301a wurde durch den Einsatz von microRNA Mimics durchgeführt, welche durch Transfektion mit Lipofectamine® RNAiMAX in die NRVCM eingebracht wurden (siehe 2.2.3.7). Dies führte zu einem deutlichen Anstieg der miR-301a Expression in den Kardiomyozyten (A, Abbildung 16). Für die weiteren Versuche wurde mit 5pmol miR-301a Mimic je Well gearbeitet, da sich so schon eine 963-fache Expression der miR-301a zeigte (A, Abbildung 16). Durch vermehrte Expression von miR-301a ließ sich das Rcan1-4 Proteinniveau zusätzlich zur PE Induktion heben (C, D, Abbildung 16).

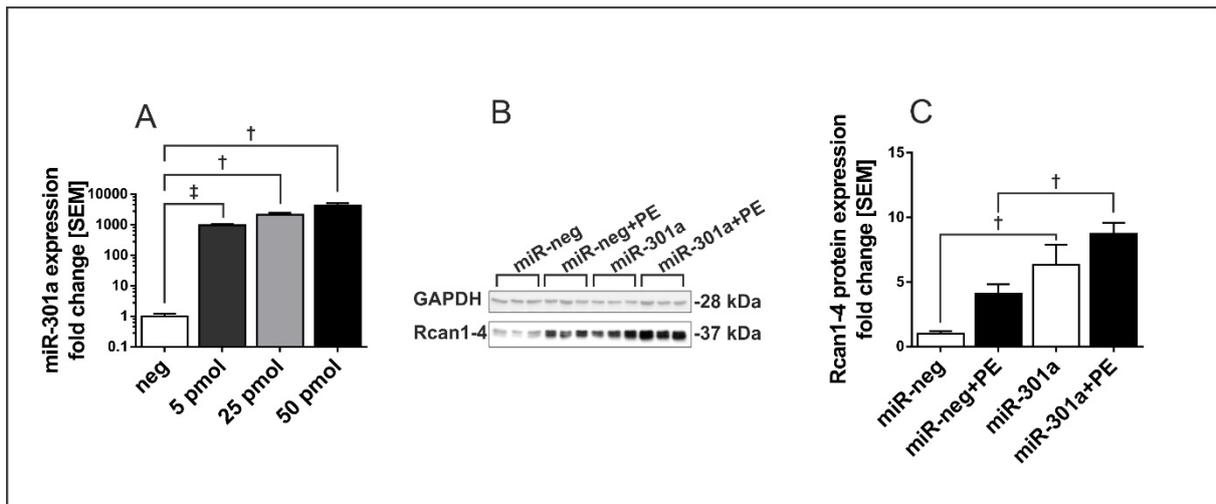


Abbildung 16: Heraufregulation von miR-301a führt zu vermehrter Expression von Rcan1-4. A; Echtzeit-PCR-Analyse, die zeigt, dass miR-301a suffizient im Vergleich zur Negativkontrolle (miR-neg) in NRVCN durch Transfektion der microRNA Mimics hochreguliert werden kann (n=3, logarithmische Skalierung). Bei den weiteren Versuchen wurde mit 5pmol Mimic/Well und 5µM Phenylephrin (PE) gearbeitet. B, C; Überexpression von miR-301a führt zu verstärkter Protein Expression von Rcan1-4. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (A) oder Two-Way ANOVA (C) angefertigt. Signifikanzniveaus n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; †: p<0,01; ‡: p<0,001. Fehlerbalken: SEM.

3.8.2 Minderung von miR-301a führt zu keiner Veränderung Proteinexpression von Rcan1-4

Für den „Knockdown“ der miR-301a in NRVCN wurden microRNA-Inhibitoren genutzt, welche Komplexe mit der endogenen microRNA bilden und sie so biologisch inaktivieren. Ihre Wirkung kann indirekt durch den Nachweis der Überexpression einer Zielstruktur (siehe C, D, Abbildung 5) erbracht werden. Rcan1-4 ließ sich hier in der Proteinexpression durch verringerte Expression von miR-301a nicht signifikant beeinflussen unabhängig von der PE Induktion (A, B, Abbildung 17).

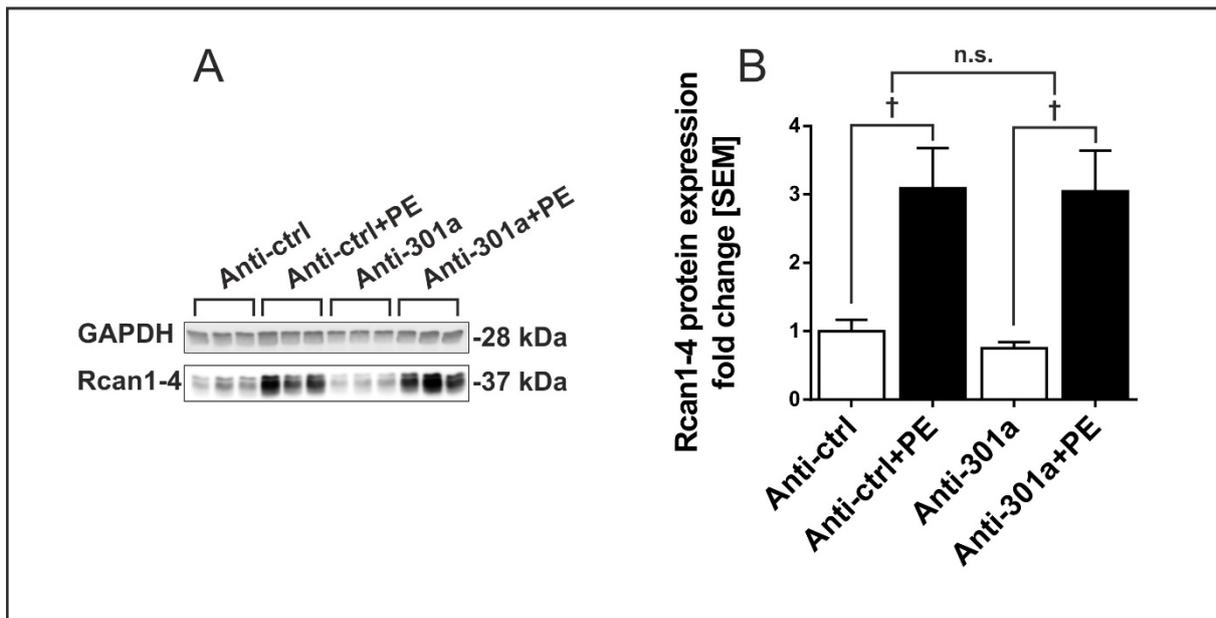


Abbildung 17: Minderung der miR-301a Expression führt zu unveränderter Proteinexpression von Rcan1-4. A, B; Die Proteinexpression von Rcan1-4 stellte sich als nicht signifikant reguliert dar, unabhängig ob Phenylephrin anwesend war oder nicht. Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Two-Way ANOVA (B) angefertigt. Signifikanzniveaus n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; †: $p < 0,01$. Fehlerbalken: SEM.

3.8.3 Heraufregulation von Cofilin-2 führt zu vermehrter Expression von fötalen Genen und zu Reduktion der Zelloberfläche

Um die *in vitro* Wirkung von Cofilin-2 in NRVCN zu untersuchen, wurde Cofilin-2 mithilfe des hergestellten pDEST40 Konstruktes (siehe 2.2.4.7) überexprimiert, indem die NRVCN mit Lipofectamine® 3000 transfiziert wurden. So konnte eine signifikante Überexpression im Westernblot in NRVCN (A, B, Abbildung 18) sowie in der quantitativen Echtzeit PCR (C, Abbildung 18) gezeigt werden. Bei Betrachtung der fötalen Gene, *nppa* und *nppb*, fiel auf, dass es zu einem starken Anstieg der Expression im Vergleich zur Kontrolle kam. Dies wurde durch den Einsatz von PE noch weiter verstärkt, sodass es bei *nppa* zu einer 20-fachen und bei *nppb* zu einer 19-fachen Steigerung der Expression gegenüber der Kontrolle ohne PE kam (D, Abbildung 18). Die Zellgrößenmessung dagegen ergab ein konträres Bild, da sich entgegen der Erhöhung der Hypertrophie assoziierten Gene hier eine Verkleinerung der Zelloberfläche in den Zellen mit Cofilin-2 Überexpression im Median um $50\mu\text{m}^2$ gegenüber den mit Leervektor behandelten Zellen zeigte. In der Gruppe der PE behandelten Zellen fand sich eine Verkleinerung im Median um $94\mu\text{m}^2$ gegenüber der Kontrolle mit PE. Des Weiteren wurde der Effekt von PE in den Zellen aufgehoben, welche Cofilin-2 überexprimieren (E, F, Abbildung 18).

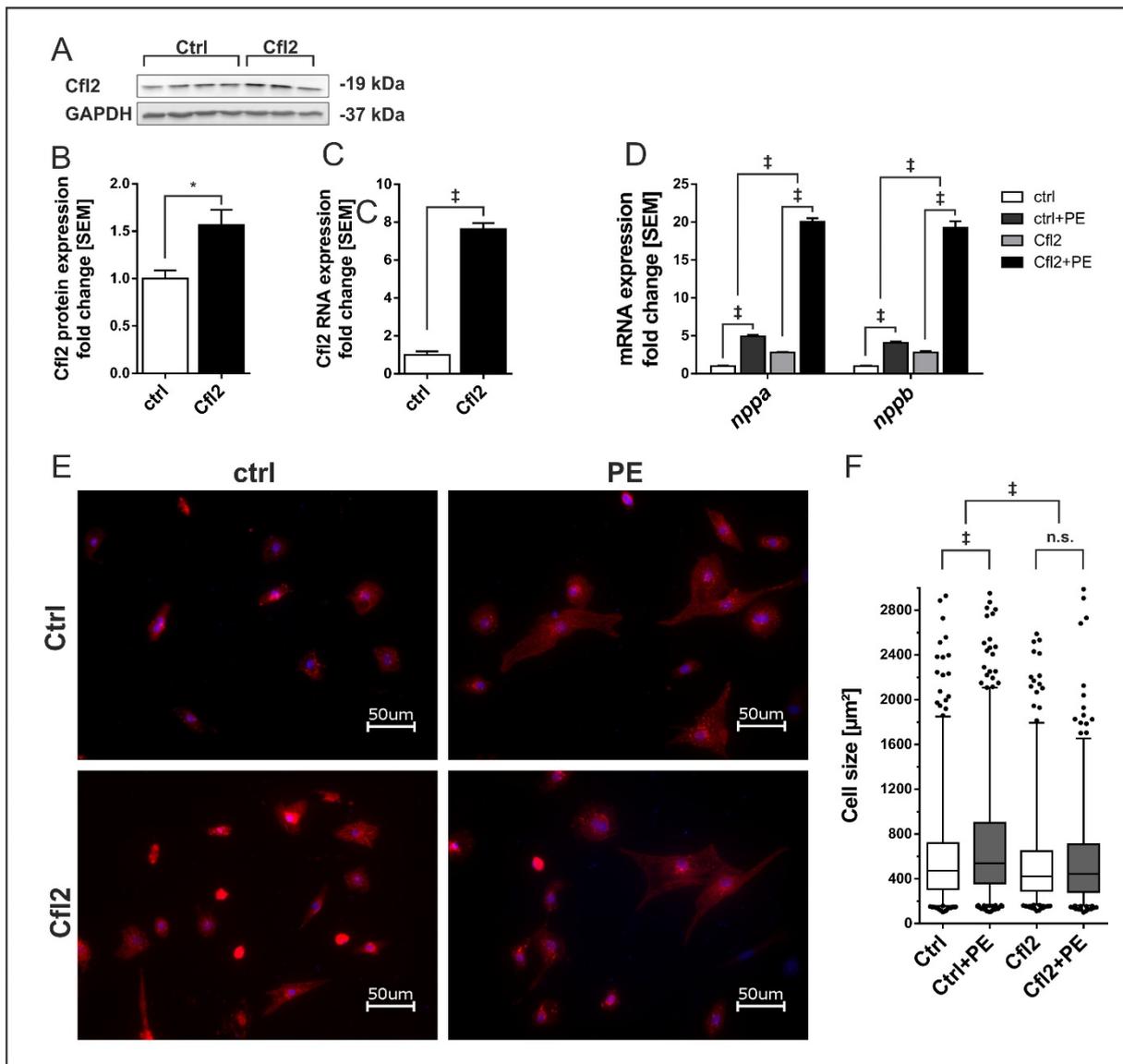


Abbildung 18: Cofilin-2 Hochregulation führt zu verstärkter Expression fötaler Gene und Verringerung der Zellgröße. A, B; Westernblot, der die Überexpression von Cofilin-2 (Cofilin-2) durch pcDNATM-DEST40 (2μg/Well) im Vergleich zum Leervektor (Ctrl) in NRVCN zeigt (n=4/3). Bei den weiteren Versuchen wurde ebenfalls mit 2μg/Well und 5μM Phenylephrin (PE) gearbeitet. C; Quantitative Echtzeit PCR, welche die Erhöhung der Cofilin-2 Expression zeigt (n=4). D; In der Multiplex PCR führte die Überexpression von Cofilin-2 zu verstärkten Expressionsniveaus der Hypertrophie assoziierten Gene *nppa*, *nppb*. Die durch PE induzierte, erhöhte Expression ließ sich so weiter steigern (n=3). E, F; Erhöhung von Cofilin-2 führte bei der Zellgrößenbestimmung zu einer Verkleinerung der Zellen auch unter PE Stimulation (n>600). Statistische Analysen wurden mit zweiseitigem Student's t-test (B, C), Two-Way ANOVA (D) oder One-Way ANOVA (F) angefertigt. Signifikanzniveaus n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; ‡: p<0,001. Fehlerbalken: SEM.

4 Diskussion

4.1 Cofilin-2 und miR-301a in Mausmodellen kardialer Pathologien

Die Organisation der Aktinfilamente ist ein komplexer Vorgang mit vielen Interaktionspartnern, die diesen Stoffwechsel beeinflussen. Die Vertreter der ADF/Cofilin Familie sind ubiquitär in Eukaryoten vorkommende, aktinbindende Proteine (149), die einen essentiellen Beitrag zur Aktindynamik leisten. In Säugetieren werden drei verschiedene Mitglieder dieser Familie exprimiert, nämlich das in allen Zellen vorkommende Cofilin-1, das auf Epithelien und Endothelien beschränkte ADF und Cofilin-2, welches hauptsächlich in Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert wird (150). Ihre Struktur ist in den vorkommenden Spezies hoch konserviert (151) und ihre Funktionen sind im Wesentlichen die Bindung und Spaltung von Aktin Filamenten am „gealterten“ ADP-haltigem, langsam wachsenden (-) Ende (33). Neben der Bindung von filamentösen F-Aktin gibt es im Cofilin-2-Protein auch eine Bindestelle für monomeres G-Aktin in einem 1:1 Verhältnis (152). Weiterhin interagiert die ADF/Cofilin-Familie mit Tropomyosinen, welche als physiologische Inhibitoren der ADF/Cofilin vermittelten Aktin Dynamik fungieren (153). Reguliert werden die Mitglieder dieser Familie durch Phosphorylierung am Serin-3-Rest, welches sie in ihrer aktinspaltenden Funktion inaktiviert und zu einer Stabilisierung der Aktin Filamente führt. Dies geschieht hauptsächlich durch die LIM Kinasen, LIMK1/2, und die verwandten Kinasen, TESK1/2 (144). Aktiviert wird die ADF/Cofilin-Familie dementsprechend durch Dephosphorylierung, welches durch Phosphatasen der Slingshotfamilie (SSH1/2/3) (154) und weiteren Proteinen wie CIN, PP1, PP2A geschieht (144). Die Regulierung der Kinasen und Phosphatasen selbst ist ebenfalls komplex, da unterschiedlichste Signalwege wie beispielsweise der ROCK Signalweg oder die Calcium abhängige Kinase, CaMKII β , über die Aktivierung der LIMK zu einer vermehrten Inaktivierung der Cofilin-Familie führen sowie F-Aktin und Calcineurin über die Aktivierung der SSH zu einer Aktivierung der Cofilin-Familie führen (155). Diese komplexe Regulierung der ADF/Cofilin-Familie deutet auf ihre bedeutende Rolle im Aktinstoffwechsel hin.

Cofilin-2 ist die Skelett- und Herzmuskelspezifische Isoform aus der ADF/Cofilin Familie und kann bei bestimmten Mutationen im Menschen zu einer Nemalinmyopathie führen, die sich durch Muskelschwäche und Nemalinkörperchen in den betroffenen Muskelfasern auszeichnet (156). Cofilin-2 liegt im Menschen auf Chromosom 14 (157) und hat neben seiner Aktin spaltenden Funktion die Aufgabe der Überwachung der Filamentlänge des F-Aktin in den Sarkomeren, indem es die unkontrollierte Verlängerung von F-Aktin verhindert und so für die korrekte Aktin Organisation im Sarkomer verantwortlich ist (158). Die Funktion der Instandhal-

tung des Aktinzytoskelettes scheint eine essenzielle Funktion von Cofilin-2 zu sein, da konstitutive Cofilin-2^{-/-} Mäuse eine normale Muskelentwicklung und Anordnung primärer Myofibrillen zeigen, aber dann aufgrund von Skelettmuskeldysfunktionen postnatal um Tag 8 herum versterben (159). Cofilin-2^{-/-} Tiere zeigen bei Geburt keinen kardialen Phänotyp mit einem unauffälligen Herzgewicht und normaler Funktion. Die Myopathie im Skelettmuskel stellt sich in diesem Modell unter anderem durch das Auftreten von Proteinaggregaten dar. Weiter zeigen sich Veränderungen in der α -Aktin Regulierung mit vermehrter Expression von ACTA2, der Isoform der glatten Muskelzellen, was vermuten lässt, dass Cofilin-2 an dem postnatalen Umbau der Sarkomere beteiligt ist (160).

Subramanian und andere haben gezeigt, dass Cofilin-2 eine Verbindung mit der idiopathischen DCM (iDCM) aufweist, indem es in phosphorylierter Form in vermehrt vorkommenden Aggregaten in humanen Herzgewebe von iDCM Patienten nachgewiesen werden konnte. Neben den erhöhten Cofilin-2-Werten in den Aggregaten war auch die Gesamtmenge an Phospho-Cofilin-2 erhöht. Weiterhin führt die erhöhte Phosphorylierung zur Bildung von Stressfasern innerhalb der Kardiomyozyten und hemmt so die normale Funktionsweise, sodass Dysregulation von Cofilin-2 mit vermehrter Phosphorylierung ein neuer Ansatz der Pathogenese der iDCM ist (161), zumal Verlust von Cofilin-2 im Mausmodell ebenfalls zur Akkumulation von filamentösen Aktin im Skelettmuskel führt (159). Dies wird dadurch unterstrichen, dass sich im herzspezifischen Heterozygoten Cofilin-2 „Knockout“ Mausmodell ein DCM Phänotyp mit reduziertem Fractional Shortening und Desorganisation von Aktin zeigt (161). Somit stellt die Cofilin-2 Inaktivierung durch Phosphorylierung eine Möglichkeit der Entwicklung einer DCM.

Hier konnte Cofilin-2 als Zielstruktur der miR-301a identifiziert werden. Sowohl die Luciferasereporterversuche zeigen, dass miR-301a die 3'UTR von Cofilin-2 reguliert, als auch die Mutation der Bindestellen, dass dort signifikante Positionen (Position 370 und 1030) in der 3'UTR zu finden sind, die durch miR-301a beeinflusst werden. Dem steht die funktionelle Regulierung in den NRVCN bei, die ebenfalls durch miR-301a vermittelt eine Verminderung von Cofilin-2 zeigt. Weiterführend werden auch die mRNA-Niveaus von Cofilin-2 durch miR-301a verringert, was auf eine Degradierung der Cofilin-2-mRNA durch Bindung von miR-301a schließen lässt (162). Ein ähnliches Bild findet sich in dem Calsarcin-1 „Knockout“ Mausmodell wieder, da sich passend zur Runterregulierung der miR-301a eine Enthemmung von Cofilin-2 findet, die in einer vermehrten Proteinexpression mündet.

In Betracht der Beeinflussung der DCM Entstehung durch Cofilin-2 Inaktivität, könnte dies den Schluss nahelegen, dass die Heraufregulierung von Cofilin-2 in den Calsarcin-1^{-/-} Tieren, welche durch die Herabregulierung der miR-301a mitbeeinflusst wird, eine Art Schutz gegen diesen Mechanismus bieten könnte, da Phospho-Cofilin-2 unverändert exprimiert blieb und somit

bei erhöhtem Gesamt-Cofilin-2 vermehrt die aktive Form vorhanden ist, um somit der Entstehung von Aktinakkumulationen entgegenwirken zu können.

Neben der Regulierung in dem $Cs1^{-/-}$ Modell stellte sich Cofilin-2 auch in den Calcineurin transgenen und $MLP^{-/-}$ -Modell als heraufreguliert dar. Da bei diesen Modellen die Phosphorylierung nicht untersucht wurde, kann keine Aussage über die Aktivität von Cofilin-2 getroffen werden.

Beim Calcineurin transgenen Mausmodell zeigen die Tiere durch Überexpression der Phosphatase Calcineurin eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT3. Dies führt zu kardialer Hypertrophie mit schwerer Fibrose und führt letztlich zu Herzversagen (67). Wang und andere haben gezeigt, dass Cofilin-1 in HeLa und HEK293T durch induzierten Calcium Einstrom vermehrt durch die Slingshotphosphatase, SSH1L, Calcineurin abhängig dephosphoryliert und somit aktiviert wird (163). Dieser Mechanismus konnte unter anderem auch in weiteren Zelltypen wie Neuronen bestätigt werden (164, 165). Die Übertragbarkeit auf Cofilin-2 ist zwar dahingehend limitiert, dass es sich um andere Zelltypen sowie um Cofilin-1 und nicht Cofilin-2 handelt. Allerdings ist die Regulierung der beiden generell sehr ähnlich und das Aufkommen dieser Regulierung in den verschiedensten Zellsystemen könnte für einen generellen Mechanismus sprechen. Somit ist eine theoretische Verbindung von Calcineurin induzierter Cofilin-2 Aktivität auch in Kardiomyozyten gegeben. Ob dies wirklich so stattfindet, bedarf weiterer Versuche. Allerdings lässt sich so die vermehrte Expression von Cofilin-2 und vermutlich vermehrte Aktivität auch durch die erhöhte Calcineurin-Aktivität, wie im $Calsarcin-1^{-/-}$ oder Calcineurin transgenen Model demonstriert, erklären.

Bei dem $MLP^{-/-}$ Mausmodell findet sich eine gestörte Zytoarchitektur nach der Geburt, welches mit dem Bild einer DCM mit Hypertrophie, Fibrose und Herzversagen einhergeht (71). Die Funktion von MLP umfassen verschiedene Bereiche. Unter anderem arbeitet es als mechanosensitiver Stresssensor in Kardiomyozyten (166). Des Weiteren haben Papalouka und andere gezeigt, dass MLP direkt mit Cofilin-2 interagiert und einen Komplex bildet, der an der Z-Scheibe lokalisiert ist. Zusammen mit MLP im Verhältnis von 2:1 ist Cofilin-2 im sauren Milieu (pH 6,8) in der Lage Aktin effektiver als ohne MLP zu spalten (167). Somit wirkt MLP synergistisch auf die Cofilin-2 Aktivität, sodass die vermehrte Expression beim $MLP^{-/-}$ Modell ein Versuch sein kann, das Fehlen von MLP zu kompensieren. Außerdem soll MLP ebenfalls Calcineurin an der Z-Scheibe binden (168). So könnte es zu einer Komplexbildung von Cofilin-2, MLP und Calcineurin an der Z-Scheibe kommen, indem MLP als verbindendes Element dient.

Wenn diese beiden Mausmodelle betrachtet werden, zeigt sich, dass Cofilin-2 zum einen durch die Heraufregulation und zum anderen durch die direkten Verbindungen mit diesen Signalkaskaden bei diesen Modellen eine gewisse pathophysiologische Relevanz besitzt, obgleich es für das genaue Verständnis weiterer Versuche bedarf.

Ein Widerspruch zeigt sich bei der Heraufregulierung der miR-301a in diesen beiden Modellen, da in den Cs1^{-/-} eine Herunterregulation der miR-301a vorherrscht. Dieses Dilemma kann auch nicht gelöst werden, indem es auf einen Calsarcin-1 spezifischen Effekt zurückzuführen ist, da der *in vitro* „Knockdown“ von Calsarcin-1 keine Veränderung der miR-301a Expression zeigt. Dementsprechend lässt dies weiterhin die Frage offen, warum sich die miR-301a lediglich in dem Calsarcin-1^{-/-}-Modell als vermindert exprimiert findet. Gegebenenfalls könnte die verringerte miR-301a auch eine Langzeitfolge der Calsarcin-1-Depletion sein, die in einem kurzen *in vitro* Versuch nicht abgebildet werden kann. Nichtsdestotrotz kann die erhöhte Expression von Cofilin-2 in diesem Mausmodell durch die verringerte miR-301a Expression mit bedingt sein, da die miR-301a vermittelte Inhibition der Cofilin-2 Expression wegfällt. Im Umkehrschluss könnte so die erhöhte Cofilin-2 Expression in den CnA TG und MLP^{-/-} Tieren durch miR-301a Heraufregulierung begrenzt werden, um eine noch aggressivere Expressionssteigerung von Cofilin-2 zu verhindern.

4.2 Auswirkungen von miR-301a und Cofilin-2 auf Hypertrophie

Bei microRNAs handelt es sich um ubiquitär vorkommende mRNA Regulatoren mit vielfältigen biologischen Funktionen (169). In Bezug auf kardiale Pathologien wie Herzversagen und Hypertrophie sind mehrere microRNAs bekannt, die daran maßgeblich beteiligt sind (170). Ausgehend von dem Calsarcin-1^{-/-} Mausmodell konnte die miR-301a als differentiell regulierte microRNA identifiziert werden und so erstmalig der Bezug von miR-301a zur DCM hergestellt werden (86).

Um die Auswirkungen von miR-301a und Cofilin-2 auf die Regulation von Hypertrophie sowie Zellgröße in NRVCN zu bestimmen, wird zum einen die Messung der Zelloberfläche als Maß für eine zelluläre Hypertrophie genutzt und zum anderen auf die Expression der Transkripte von *nppa* und *nppb* geachtet. Diese beiden Gene kodieren für die Proteine ANF, Atrialer natriuretischer Faktor und BNP, B-natriuretisches Peptid, welche essenziell für die Entwicklung des Herzens sind und somit als Teil des fötalen Genprogrammes bezeichnet werden. Bei pathologischem Stress wie beispielsweise Hypertrophie oder Herzversagens kommt es im Herzen zur Heraufregulierung dieser Gene, sodass sie sich als Marker für die Hypertrophie etabliert haben (52, 171). Als weiterer Marker wird hier *Rcan1-4* verwendet, welcher als NFAT sensitiver Marker für Calcineurin Aktivität dient (59). Wie aus vorherigen Arbeiten hervorgeht, ist gezeigt worden, dass miR-301a sowohl unter dem Induktor von Hypertrophie, Phenylephrin (PE) (148), als auch ohne eine Steigerung der Expression von *nppa*, *nppb* und *Rcan1-4* hervorruft, obgleich es zu keiner Veränderung der Zellgröße kommt (88). Dazu passend kommt es bei Inhibition von miR-301a zur genau entgegengesetzten Regulation von *nppa*, *nppb* und

Rcan1-4 (88), was wiederum zeigt, dass miR-301a zwar die Expression von fötalen Genen induzieren sowie die Calcineurin-Aktivität steigern kann, was durch die *Rcan1-4*-Proteinexpression repräsentiert wird (76). Doch scheint der Effekt nicht stark genug zu sein oder lange genug wirken können, um wirklich eine Vergrößerung der Zellen auszulösen. Eine Erklärung könnte sich daraus entwickeln, dass miR-301a als Aktivator der NF- κ B Aktivität durch Inhibition des NF- κ B-repressing factor, *Nkrf*, dient (132). In der Induktion der fötalen Gene durch miR-301a Überexpression kommt es zur Übereinstimmung, da auch vermehrte NF- κ B Aktivität in Kardiomyozyten zur gesteigerten Expression fötaler Gene führt (172). Interessanterweise kommt es im db/db Mausmodell, welches einen Modellorganismus für Fettleibigkeit, Diabetes und Dyslipidämie mit der Entwicklung einer diabetischen, kardialen Dysfunktion darstellt, zu einer erhöhten miR-301a Expression im Ventrikel, ähnlich wie im Calcineurin transgenen und *MLP^{-/-}* Modell. Darüber hinaus ist ebenfalls der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv4.2 als Zielstruktur der miR-301a identifiziert worden (173). Über Kv4.2 ist wiederum bekannt, dass es bei Überexpression in NRVCN zu einer Verringerung der Zellgröße, ANF Expression und NFAT Aktivierung bei Phenylephrin induzierter Hypertrophie führt (174). Dieser inhibitorische Effekt von Kv4.2 lässt sich somit gut mit den Effekten der miR-301a in Einklang bringen, da es bei Kv4.2 Überexpression sowie bei miR-301a „Knockdown“ zu konkordanten Ergebnissen kommt.

Hier wurde die Überexpression von Cofilin-2 in NRVCN mittels Transfektion untersucht. Dabei führte Cofilin-2 zu einer erhöhten Expression von *nppa* und *nppb* vor allem unter PE Induktion in den Kardiomyozyten. Demgegenüber stand eine Verkleinerung der Zellen und die aufgehobene Wirkung von PE bei der Messung der Zellgröße. Diese Ergebnisse bezüglich der Zellgröße können durch die für Kardiomyozyten spezifischere, adenovirale Überexpression von Cofilin-2 in NRVCN nicht bestätigt werden, da es dort zu keiner signifikanten Veränderung der Zellgröße kommt (86). Trotz der unterschiedlichen Resultate lässt sich dieser Trend mit einer ähnlichen Regulierung *in vivo* in dem *Calsarcin-1^{-/-}* Modell vergleichen, welche durch eine starke Aktivierung der fötalen Gene und das Fehlen von Hypertrophie gekennzeichnet ist, was an unverändertem Herzgewicht und gleichbleibender Zellgröße festgemacht wird (86). Die hier gemessene Verkleinerung der Zellen könnte auch ein Zeichen von vermehrtem Zelluntergang und Apoptose sein. So ist für das strukturell ähnliche Cofilin-1 beschrieben worden, dass vermehrte Cofilin-1-Aktivität zu verstärkter Translokation des proapoptotisch wirkenden Protein Bax zu den Mitochondrien führt (175). Ob es bei Cofilin-2 Überaktivität auch zur Förderung der Apoptose kommt, ist ungeklärt.

Kritisch muss beachtet werden, dass sowohl die Überexpression von Cofilin-2 als auch die Überexpression und Inhibition von miR-301a durch Transfektion hervorgerufen worden ist. Diese methodischen Unterschiede zwischen adenoviraler Infektion (86) und Transfektion bieten eine Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse, da bei der unspezifischen Transfektion

zwar die Kardiomyozyten transfiziert werden. Allerdings finden sich, wie hier gezeigt, auch kardiale Fibroblasten bei den NRVCN in Kultur, welche somit ebenfalls transfiziert werden und den Vektor beziehungsweise die microRNA aufnehmen. Die Interaktion zwischen kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten ist komplex und noch nicht zufriedenstellend verstanden, was auch durch die methodisch anspruchsvolle Arbeit der Erforschung ihrer Interaktionen bedingt ist (176). In diesem Zusammenhang wird die Induktion von Hypertrophie in Kardiomyozyten durch Fibroblasten beschrieben. Dabei können parakrin sezernierte microRNA in Exosomen, welche von den Fibroblasten abgegeben werden, eine tragende Rolle spielen, da die neben weiteren microRNA enthaltene miR-21* die mRNA von SORBS2 und PDLIM5 in den Kardiomyozyten inhibiert und somit Hypertrophie induziert. Dies kann therapeutisch nutzbar gemacht werden, da die pharmakologische Inhibition der miR-21* *in vivo* vor einer Angiotensin-II induzierten kardialen Hypertrophie schützen kann (177). Ob diese Art der Signalübertragung überhaupt und wenn in welchem Ausmaß hier involviert ist, bleibt unklar, zumal die Zellkontakte durch die Präparation aufgetrennt werden und die Zellen sich in einem artifiziiellen Umfeld befinden, welches nicht mit den Bedingungen im Herzgewebe vergleichbar ist. Dennoch zeigt es, dass die Mitbeeinflussung von kardialen Fibroblasten erhebliche Auswirkungen haben kann und die Ergebnisse somit unter Vorsicht betrachtet werden müssten.

Die unterschiedlichen Regulationen von NRVCN durch miR-301a und Cofilin-2 lassen sich dadurch lösen, dass microRNAs im Allgemeinen mehr als eine Zielstruktur haben. Bei miR-301a sind mehrere Zielgene mit Assoziationen zu Hypertrophie fördernden Signalwegen wie oben beschreiben identifiziert worden, sodass die Regulation die durch Überexpression und „Knockdown“ hervorgerufen werden, selten monokausal auf einen beteiligten Partner zurückgeführt werden kann. Somit kommt es durch microRNAs gleichzeitig zu unterschiedlichen Regulierungen verschiedenster Signalwege durch Beeinflussung mehrerer Zielstrukturen, deren Auswirkungen sich dann als Summe aller Beteiligten präsentiert.

4.3 Beeinflussung von SRF durch Cofilin-2 und miR-301a

Die Zusammenführung der Effekte von Cofilin-2 und miR-301a gestaltet sich nach wie vor schwierig, weil es oft zu Ergebnissen mit mangelnder Konkordanz zwischen Zielstruktur und microRNA gekommen ist. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit liegt auf der Beeinflussung des Serum Response Faktors. Hier zeigt sich eine gleichförmige Regulierung der Beiden, da Cofilin-2 aktivierend und miR-301a inhibierend auf die SRF-Aktivität wirken. Dies ist deshalb gleichförmig, da miR-301a antagonistisch auf Cofilin-2 wirkt. So zeigt sich der Cofilin-2 „Knockdown“ ein ähnliches Bild wie die miR-301a Überexpression und umgekehrt. Ob der Effekt von

miR-301a jetzt ausschließlich auf die Cofilin-2 Wirkung zurückzuführen ist oder ob noch andere von ihr beeinflusste Faktoren involviert sind, kann nicht sicher gesagt werden. Zusätzlich ist auch in NRVCN eine konkordante Regulierung von SRF durch miR-301a und Cofilin-2 zu beobachten (86).

Beim Serum Response Faktor, SRF, handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor aus der MADS Familie (178). Er ist für die Regulierung einer Vielzahl unterschiedlicher Gene durch die Bindung an die sogenannte CarG Box verantwortlich (179). Seine einwandfreie Funktion ist entscheidend für eine normale Herzentwicklung und Differenzierung, da ein konditionales Fehlen mit einer Letalität zwischen dem embryonischen Tag 10,5 und 13,5 aufgrund von kardialen Defekten einhergeht (180). Die herzspezifische Inaktivierung von SRF zeigt bei ähnlicher Letalität, dass die kardialen Sarkomere und Z-Scheiben hoch desorganisiert sind, was die ausschlaggebende Rolle von SRF bei der Gestaltung des kontraktiles Apparates unterstreicht (37). In Kontrast dazu scheint sowohl das Fehlen von miR-301a als auch von Cofilin-2 keinen entscheidenden Effekt auf die Entwicklung zu haben (131, 159). Zusätzlich wird Cofilin-2 erst in adulten Myozyten quergestreifter Muskulatur produziert und nicht während der Entwicklungsphase (181). Die Wichtigkeit der Funktionsfähigkeit von SRF lässt sich in einem Mausmodell mit herzspezifischer durch Tamoxifen induzierbarer Cre Rekombinase zur Deaktivierung von SRF zeigen. Bei Behandlung mit Tamoxifen in den adulten Tieren wird der Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie mit eingeschränkter Funktion des linken Ventrikels und reduzierter Kontraktilität ausgelöst, allerdings ohne das Auftreten kompensatorischer konzentrischer Hypertrophie (38). Wiederum kann durch das Expressieren einer dominant negativen Form im transgenen Mausmodell ein ähnlicher Phänotyp mit Dilatation und ohne offensichtliche Hypertrophie erzeugt werden (40). Jedoch kommt es bei Überexpression in einem transgenen Mausmodell zu einer Kardiomyopathie mit deutlicher Hypertrophie (39). In Anbetracht dessen können Veränderungen in dieser Signalkaskade zu schwerwiegenden kardialen Veränderungen führen, was durch Cofilin-2 und miR-301a mitbeeinflusst sein kann. Im heterozygoten, herzspezifischen Cofilin-2 „Knockout“ Mausmodell kommt es wie bereits erwähnt ebenfalls zu einem DCM Phänotyp (161), der sich ähnlich präsentiert wie in den adulten Mäusen mit Tamoxifen induzierbarer SRF-Depletion (38). Da der *in vitro* Cofilin-2 „Knockdown“ zu einer deutlich verminderten SRF-Aktivität führt, könnte dieser Mechanismus pathophysiologisch grundlegend für die Entwicklung dieses Phänotyps sein. Auf der anderen Seite steht der hypertrophe Phänotyp des CnA transgenen und des MLP^{-/-} Modells, bei denen vermehrte Cofilin-2 Expression gezeigt werden konnte, welche wiederum zu erhöhter SRF-Aktivität geführt hat und somit an der Entstehung der Hypertrophie beteiligt sein könnte, wie sie das SRF transgene Mausmodell gezeigt hat. Im Widerspruch dazu steht die Regulierung im Calsarcin-1^{-/-} Modell, welches zwar eine Erhöhung von Cofilin-2 aber keine Hypertrophie zeigt. Zusätzlich kommt es passend zur *in vitro* Regulierung von SRF durch Cofilin-2 und miR-301a auch in den

Calsarcin-1^{-/-} Tieren selbst zu einer gesteigerten kardialen Expression von SRF und RhoA (86). Somit führt eine vermehrte Aktivierung der SRF-Kaskade nicht automatisch zu einem hypertrophen Phänotyp, was das komplexe Zusammenspiel von miR-301a, Cofilin-2 und SRF in der Pathophysiologie der DCM verdeutlicht.

Calsarcin-1^{-/-} Tiere zeigen erst im reinen C57/BL6 Hintergrund den dilatativen Phänotyp (86), wohingegen im gemischten Hintergrund kein Phänotyp sichtbar wird. Doch zeigt sich in diesen Tieren eine gesteigerte Antwort bei Druckbelastung (80). Von Nelson und anderen ist dargestellt worden, dass SRF für die Induktion der Hypertrophie assoziierten Gene *nppa*, *nppb*, *c-fos*, der α -Aktine und weiteren zwingend benötigt wird. Somit ist es maßgeblich bei der Entwicklung pathologischer Hypertrophie beteiligt (182). Dies könnte die Rolle dieser Beziehung zwischen miR-301a, Cofilin-2 und SRF vor allem bei kardialen Stress hervorheben. Bei Betrachtung der Expression der SRF abhängigen Gene fällt auf, dass Cofilin-2 vor allem *Actc1* und *Acta1* induziert, was somit die vermehrte SRF-Aktivität anzeigt. In Kontrast dazu zeigt auch miR-301a eine erhöhte Expression von *Actc1*, obwohl es zu einer Verminderung der SRF-Aktivität kommen sollte. Dies könnte durch die weiterreichenden Interaktionen von miR-301a bedingt sein. Ob und inwiefern Cofilin-2 und miR-301a an der Differenzierung der Kardiomyozyten durch Veränderung der Expression der SRF abhängigen Gene beteiligt sind, bedarf weitergehender Versuche.

Für eine generelle Aktivierung der SRF-Signalkaskade wurde RhoA genutzt (147). Bei RhoA handelt es sich um eine kleine GTPase der Rho-Familie mit vielfältigen, fundamentalen Beteiligungen bei diversen Zellfunktionen (183). Dabei ist es insbesondere auch an der Entwicklung von pathologischer Hypertrophie mit Herzversagen und am Aktinstoffwechsel beteiligt (184). Über eine Interaktion von Cofilin-2 mit RhoA ist bekannt, dass RhoA über seinen Effektor ROCK zu einer Aktivierung von LIMK-1 führt, welches in einer vermehrten Phosphorylierung von Cofilin-2 mündet (185). Dies kann in Kardiomyozyten zur Bildung von „Stress-Fasern“ führen, da durch Inhibierung von Cofilin-2 unter Aktivierung von RhoA die Polymerisierung von Aktin vorangetrieben wird (161). Außerdem kann bei Leptin induzierter Hypertrophie in NRVCN eine vermehrte Aktivierung von RhoA und somit eine vermehrte Phosphorylierung von Cofilin-2 beobachtet werden, die zur Abnahme des G-Aktin zu F-Aktin Verhältnisses führt (186). Bei Betrachtung der Daten aus den C2C12 Myoblasten fällt auf, dass die Aktivierung von SRF in diesen Zellen in hohem Maße von dem Vorhandensein des Cofilin-2 abhängig war. So lässt sich durch Inhibierung von Cofilin-2 die von RhoA vermittelte Steigerung der SRF-Aktivität sehr stark mindern. Hier kann abgeleitet werden, dass Cofilin-2 sich in der Signalübertragung hinter RhoA befindet, da ein Fehlen von Cofilin-2 auch durch vermehrte RhoA Aktivität nicht ausgeglichen werden kann. Um die Frage der Phosphorylierung weiter auszuleuchten,

bedarf es weitergehender Experimente in Bezug auf Phospho-Cofilin-2 und dessen Auswirkungen auf die SRF-Aktivität. Hier sollte geklärt werden, ob Phospho-Cofilin-2 oder Cofilin-2 der Grund für eine vermehrte Aktivität unter RhoA ist. Weiter könnte sich der Schluss ergeben, dass Phospho-Cofilin-2 vor allem bei RhoA vermittelter Aktivierung von SRF als dessen Kofaktor dient und seine ausreichende Expression essentiell für eine ungestörte Signaltransduktion ist. Darüberhinausgehend wird postuliert, dass die SRF-Aktivität in sich regenerierenden Axonen von Cofilin-1 abhängig sei und sie sich gegenseitig in ihrer Phosphorylierung beeinflussen, sodass sie eine gemeinsame regulatorische Einheit bilden (187). Zwar handelt es sich wieder um Cofilin-1 und ein anderes Zellsystem aber es verstärkt den Eindruck der Wichtigkeit von Cofilin-2 auf die SRF-Aktivität und somit dessen pathophysiologischen Einfluss.

4.4 Schlussfolgerung

Die verschiedenen Funktionen und Interaktionen von Cofilin-2 in Einklang zu bringen gestaltet sich mitunter als schwierig. Obwohl die ADF/Cofilin Familie Gegenstand intensiver Forschung ist, sind ihre Rollen nicht gänzlich aufgeklärt. Vor allem der Phosphorylierungsstatus ist aktuell ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt und zeigt mit seinen Verbindungen zur Pathogenese der DCM auf die pathologische Relevanz von Cofilin-2 (158, 161).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Funktionen von Cofilin-2 könnte sich aus der Lokalisation von Cofilin-2 ergeben, da diese nicht einheitlich beschrieben ist. Einige Arbeiten lokalisieren es an der Z-Scheibe in Skelettmuskelzellen (167), andere an der M-Linie in Kardiomyozyten (158). Daraus kann entwickelt werden, dass es je nach Lokalisation in der Zelle mit daraus resultierenden variierenden und teils noch unbekanntem Bindungspartnern zu unterschiedlichem Wirken kommt (160). Cofilin-2 stellt sich somit als funktioneller Knotenpunkt dar, auf welchen vielfältige Signalwege konvergieren (149).

Nichtsdestotrotz bleiben Fragen bezüglich der vermehrten Aktivität von Cofilin-2 und deren Auswirkungen auf die Zellfunktion im Herzen nicht ausreichend geklärt. Hier konnte die Cofilin-2 Expression mit vermehrter Aktivierung von Hypertrophie assoziierten Genen und einer entscheidenden Bedeutung für die SRF Signalkaskade in Zusammenhang gebracht werden (Abbildung 19). Auch dass Cofilin-2 in den getesteten Mausmodellen vermehrt vorkam, untermauert den Verdacht, dass Cofilin-2 in der Pathogenese kardialer Myopathien eine tragende Rolle spielen könnte. Gleichwohl steht die Klärung der Frage aus, ob Cofilin-2 hier als Auslöser kardialer Pathologien gilt oder kompensatorisch wirksam ist. Außerdem konnte mit der

miR-301a die erste microRNA beschrieben werden, welche Cofilin-2 als wichtigen Knotenpunkt in Kardiomyozyten reguliert. Zusammengefasst impliziert dies eine Rolle sowohl von miR-301a als auch von Cofilin-2 bei der Pathogenese der DCM.

Für ein weitergehendes Verständnis der Funktionen von aktivem Cofilin-2 in Zusammenspiel mit miR-301a sind noch weitere *in vivo* Versuche unabdinglich. Hier könnte der Ansatz eines transgenen Tiermodells beispielsweise für konstitutiv aktives Cofilin-2 gerade in Verbindung mit pathologischen Stimuli wie transaortaler Konstriktion angedacht werden. Für miR-301a könnte zum Beispiel ein „Knockdown“ mit microRNA Inhibitoren herbeigeführt werden, was im Tiermodell als weitestgehend etabliertes Verfahren gilt (188).

Abschließend lässt sich sagen, dass natürlich der potentielle therapeutische Nutzen das höchste Ziel ist. Hier stellen sich mit Cofilin-2 und miR-301a zwei potentiell vielversprechende Angriffspunkte dar, die allerdings noch weiterer Bemühungen bedürfen, um als potentiell therapeutisches Ziel verstanden zu werden.

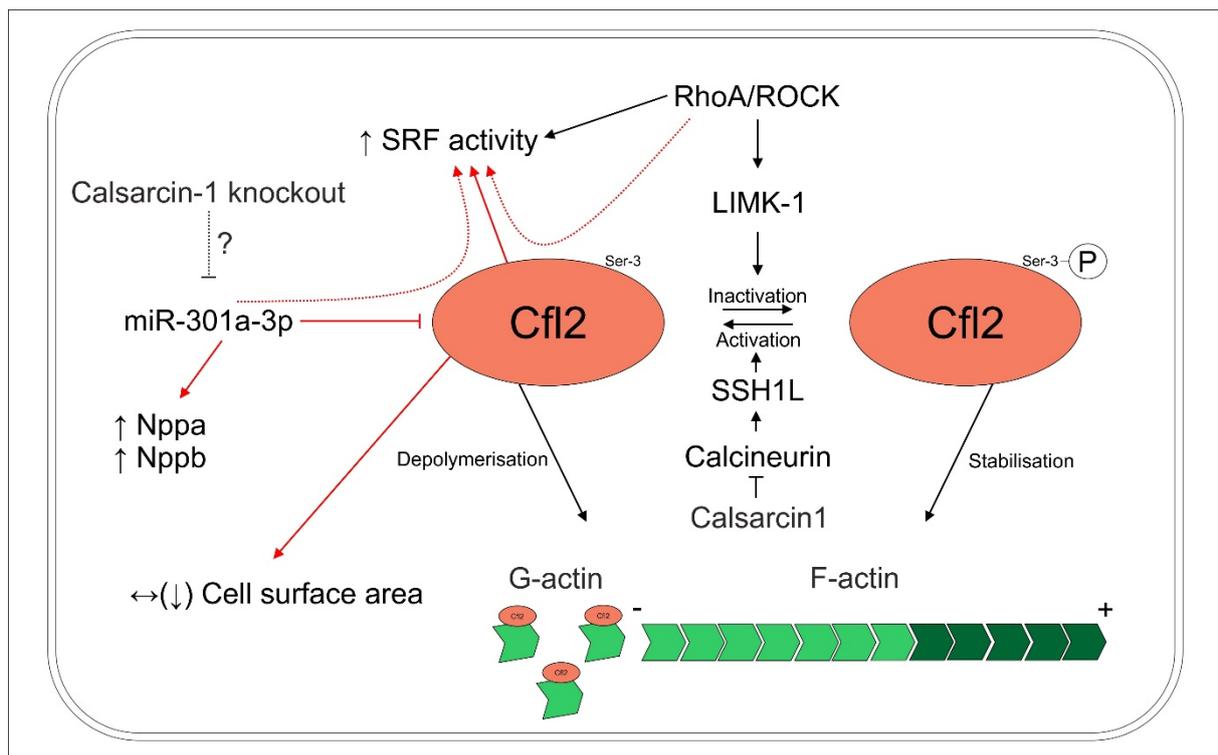


Abbildung 19: Schematische Übersicht der möglichen Interaktion von Cofilin-2. Pfeile bedeuten eine Stimulation oder Aktivierung. Die Pfeile mit stumpfem Ende zeigen eine Inhibition an. Die roten Pfeile deuten auf Ergebnisse im Rahmen dieses Projektes hin. P; Phosphorylierung. Dunkelgrünes Aktin: ATP haltig. Hellgrünes Aktin: ADP haltig.

5 Zusammenfassung

Eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist die dilatative Kardiomyopathie. Deren Entstehung liegt in bis zu 50% eine genetische Ursache zugrunde. Die dabei wirkenden molekularen Mechanismen in der Pathogenese sind nach wie vor nicht zufriedenstellend verstanden. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe ist mit dem Calsarcin-1 defizienten Mausmodell gearbeitet worden, welche eine dilatative Kardiomyopathie mit Dilatation des linken Ventrikels und Induktion der Hypertrophie assoziierten fötalen Gene ohne Hypertrophie der Kardiomyozyten entwickeln. Ausgehend von diesem Modell ist die microRNA, miR-301-3p, als herunterreguliert identifiziert worden. Ziel dieser Studie war nun die Identifizierung kardialer, bislang unbekannter Zielstrukturen der miR-301a und die Charakterisierung ihrer Funktion im Herzen.

Im Verlauf ist Cofilin-2, welches als aktinspaltendes Protein bekannt ist, als Zielstruktur der miR-301a entdeckt worden, was durch Mutation der Bindestellen und Nachweis der *in vitro* Regulation verifiziert worden ist. Passend zu der verminderten Expression der miR-301a in den Calsarcin-1 defizienten Tieren zeigt sich eine verstärkte Cofilin-2 Expression bei gleichbleibendem Phosphorylierungsstatus, welcher auf eine vermehrte Cofilin-2-Aktivität in diesem Modell hindeuten könnte. Weitere Mausmodelle des Herzversagens haben ebenfalls erhöhte Expressionsniveaus von Cofilin-2 gezeigt. Im Widerspruch zu den Calsarcin-1^{-/-} Tieren ist hier aber auch miR-301a vermehrt exprimiert, was sich *in vitro* nicht durch einen Calsarcin-1 spezifischen Effekt erklären lässt. Die hauptsächliche Expression sowohl von miR-301a als auch von Cofilin-2 findet sich dabei in Kardiomyozyten und weniger in kardialen Fibroblasten. Funktionell zeigen miR-301a und Cofilin-2 eine Übereinstimmung in der Regulierung des Serum Response Faktors, da miR-301a inhibierend und Cofilin-2 stimulierend auf die Aktivität des Serum Response Faktors wirken. In neonatalen Kardiomyozyten führt Cofilin-2 zu einer Induktion der Hypertrophie assoziierten Gene mit gleichzeitiger, fraglicher Verkleinerung der Zellen.

Zusammenfassend implizieren die erhobenen Daten eine Beteiligung der miR-301a und Cofilin-2 in der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie. Die größte Konkordanz zeigt sich hier vor allem in der Regulierung des Serum Response Faktors. Allerdings bleiben die Ursachen bezüglich der unterschiedlichen Regulation in den untersuchten Mausmodellen oder der Dissoziation zwischen Zellgröße und Induktion des fötalen Genprogramms weiter unklar. Somit sollten weitere Versuche die Klärung der Signifikanz der Beteiligung von miR-301a und Cofilin-2 bei kardialen Pathologien zum Ziel haben.

6 Literaturverzeichnis

1. Mortality G.B.D., Causes of Death C. (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet*;385:117-71.
2. Bleumink G.S., Knetsch A.M., Sturkenboom M.C., Straus S.M., Hofman A., Deckers J.W., Witteman J.C., Stricker B.H. (2004). Quantifying the heart failure epidemic: Prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure the rotterdam study. *Eur Heart J*;25:1614-9.
3. Roger V.L., Weston S.A., Redfield M.M., Hellermann-Homan J.P., Killian J., Yawn B.P., Jacobsen S.J. (2004). Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA*;292:344-50.
4. Haas J., Frese K.S., Peil B., Kloos W., Keller A., Nietsch R., Feng Z., Muller S., Kayvanpour E., Vogel B., Sedaghat-Hamedani F., Lim W.K., Zhao X., Fradkin D., Kohler D., Fischer S., Franke J., Marquart S., Barb I., Li D.T., Amr A., Ehlermann P., Mereles D., Weis T., Hassel S., Kremer A., King V., Wirsz E., Isnard R., Komajda M., Serio A., Grasso M., Syrris P., Wicks E., Plagnol V., Lopes L., Gadgaard T., Eiskjaer H., Jorgensen M., Garcia-Gustiniani D., Ortiz-Genga M., Crespo-Leiro M.G., Deprez R.H., Christiaans I., van Rijsingen I.A., Wilde A.A., Waldenstrom A., Bolognesi M., Bellazzi R., Morner S., Bermejo J.L., Monserrat L., Villard E., Mogensen J., Pinto Y.M., Charron P., Elliott P., Arbustini E., Katus H.A., Meder B. (2015). Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*;36:1123-35a.
5. Elliott P., Andersson B., Arbustini E., Bilinska Z., Cecchi F., Charron P., Dubourg O., Kuhl U., Maisch B., McKenna W.J., Monserrat L., Pankuweit S., Rapezzi C., Seferovic P., Tavazzi L., Keren A. (2008). Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*;29:270-6.
6. Rakar S., Sinagra G., Di Lenarda A., Poletti A., Bussani R., Silvestri F., Camerini F. (1997). Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies. The heart muscle disease study group. *Eur Heart J*;18:117-23.
7. Taylor M.R., Carniel E., Mestroni L. (2006). Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis*;1:27.
8. Lakdawala N.K., Winterfield J.R., Funke B.H. (2013). Dilated cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*;6:228-37.
9. Luk A., Ahn E., Soor G.S., Butany J. (2009). Dilated cardiomyopathy: A review. *J Clin Pathol*;62:219-25.
10. Dec G.W., Fuster V. (1994). Idiopathic dilated cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*;331:1564-75.
11. Pinto Y.M., Elliott P.M., Arbustini E., Adler Y., Anastasakis A., Bohm M., Duboc D., Gimeno J., de Groot P., Imazio M., Heymans S., Klingel K., Komajda M., Limongelli G., Linhart A., Mogensen J., Moon J., Pieper P.G., Seferovic P.M., Schueler S., Zamorano J.L., Caforio A.L., Charron P. (2016). Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: A position statement of the esc working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*;37:1850-8.
12. Morales A., Hershberger R.E. (2013). Genetic evaluation of dilated cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep*;15:375.
13. Clark K.A., McElhinny A.S., Beckerle M.C., Gregorio C.C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*;18:637-706.
14. Ervasti J.M. (2003). Costameres: The achilles' heel of herculean muscle. *J Biol Chem*;278:13591-4.
15. Frank D., Frey N. (2011). Cardiac z-disc signaling network. *J Biol Chem*;286:9897-904.
16. Kamisago M., Sharma S.D., DePalma S.R., Solomon S., Sharma P., McDonough B., Smoot L., Mullen M.P., Woolf P.K., Wigle E.D., Seidman J.G., Seidman C.E. (2000). Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*;343:1688-96.
17. McNally E.M., Golbus J.R., Puckelwartz M.J. (2013). Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*;123:19-26.
18. Moller D.V., Andersen P.S., Hedley P., Ersboll M.K., Bundgaard H., Moolman-Smook J., Christiansen M., Kober L. (2009). The role of sarcomere gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet*;17:1241-9.
19. Herman D.S., Lam L., Taylor M.R., Wang L., Teekakirikul P., Christodoulou D., Conner L., DePalma S.R., McDonough B., Sparks E., Teodorescu D.L., Cirino A.L., Banner N.R., Pennell D.J., Graw S., Merlo M., Di Lenarda A., Sinagra G., Bos J.M., Ackerman M.J., Mitchell R.N., Murry C.E.,

- Lakdawala N.K., Ho C.Y., Barton P.J., Cook S.A., Mestroni L., Seidman J.G., Seidman C.E. (2012). Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*;366:619-28.
20. Schmitt J.P., Debold E.P., Ahmad F., Armstrong A., Frederico A., Conner D.A., Mende U., Lohse M.J., Warshaw D., Seidman C.E., Seidman J.G. (2006). Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*;103:14525-30.
21. Mohapatra B., Jimenez S., Lin J.H., Bowles K.R., Coveler K.J., Marx J.G., Chrisco M.A., Murphy R.T., Lurie P.R., Schwartz R.J., Elliott P.M., Vatta M., McKenna W., Towbin J.A., Bowles N.E. (2003). Mutations in the muscle lim protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab*;80:207-15.
22. Vatta M., Mohapatra B., Jimenez S., Sanchez X., Faulkner G., Perles Z., Sinagra G., Lin J.H., Vu T.M., Zhou Q., Bowles K.R., Di Lenarda A., Schimmenti L., Fox M., Chrisco M.A., Murphy R.T., McKenna W., Elliott P., Bowles N.E., Chen J., Valle G., Towbin J.A. (2003). Mutations in cypher/zasp in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol*;42:2014-27.
23. Morimoto S. (2008). Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*;77:659-66.
24. Vandekerckhove J., Bugaisky G., Buckingham M. (1986). Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J Biol Chem*;261:1838-43.
25. Boheler K.R., Carrier L., de la Bastie D., Allen P.D., Komajda M., Mercadier J.J., Schwartz K. (1991). Skeletal actin mRNA increases in the human heart during ontogenic development and is the major isoform of control and failing adult hearts. *J Clin Invest*;88:323-30.
26. Suurmeijer A.J., Clement S., Francesconi A., Bocchi L., Angelini A., Van Veldhuisen D.J., Spagnoli L.G., Gabbiani G., Orlandi A. (2003). Alpha-actin isoform distribution in normal and failing human heart: A morphological, morphometric, and biochemical study. *J Pathol*;199:387-97.
27. Hewett T.E., Grupp I.L., Grupp G., Robbins J. (1994). Alpha-skeletal actin is associated with increased contractility in the mouse heart. *Circ Res*;74:740-6.
28. Clement S., Chaponnier C., Gabbiani G. (1999). A subpopulation of cardiomyocytes expressing alpha-skeletal actin is identified by a specific polyclonal antibody. *Circ Res*;85:e51-8.
29. Chaponnier C., Gabbiani G. (2004). Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol*;204:386-95.
30. Olson T.M., Michels V.V., Thibodeau S.N., Tai Y.S., Keating M.T. (1998). Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science*;280:750-2.
31. Kaindl A.M., Ruschendorf F., Krause S., Goebel H.H., Koehler K., Becker C., Pongratz D., Muller-Hocker J., Nurnberg P., Stoltenburg-Didinger G., Lochmuller H., Huebner A. (2004). Missense mutations of acta1 cause dominant congenital myopathy with cores. *J Med Genet*;41:842-8.
32. Dominguez R. (2004). Actin-binding proteins--a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci*;29:572-8.
33. Pollard T.D., Borisy G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*;112:453-65.
34. Vavylonis D., Yang Q., O'Shaughnessy B. (2005). Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *Proc Natl Acad Sci U S A*;102:8543-8.
35. Sotiropoulos A., Gineitis D., Copeland J., Treisman R. (1999). Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell*;98:159-69.
36. Wang D., Chang P.S., Wang Z., Sutherland L., Richardson J.A., Small E., Krieg P.A., Olson E.N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*;105:851-62.
37. Miano J.M., Ramanan N., Georger M.A., de Mesy Bentley K.L., Emerson R.L., Balza R.O., Jr., Xiao Q., Weiler H., Ginty D.D., Misra R.P. (2004). Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A*;101:17132-7.
38. Parlakian A., Charvet C., Escoubet B., Mericskay M., Molkenkin J.D., Gary-Bobo G., De Windt L.J., Ludosky M.A., Paulin D., Daegelen D., Tuil D., Li Z. (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the srf gene in adult heart. *Circulation*;112:2930-9.
39. Zhang X., Azhar G., Chai J., Sheridan P., Nagano K., Brown T., Yang J., Khrapko K., Borrás A.M., Lawitts J., Misra R.P., Wei J.Y. (2001). Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;280:H1782-92.
40. Zhang X., Chai J., Azhar G., Sheridan P., Borrás A.M., Furr M.C., Khrapko K., Lawitts J., Misra R.P., Wei J.Y. (2001). Early postnatal cardiac changes and premature death in transgenic mice overexpressing a mutant form of serum response factor. *J Biol Chem*;276:40033-40.
41. Ho C.Y., Jaalouk D.E., Vartiainen M.K., Lammerding J. (2013). Lamin a/c and emerin regulate mkl1-srf activity by modulating actin dynamics. *Nature*;497:507-11.

42. Burchfield J.S., Xie M., Hill J.A. (2013). Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation*;128:388-400.
43. Japp A.G., Gulati A., Cook S.A., Cowie M.R., Prasad S.K. (2016). The diagnosis and evaluation of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*;67:2996-3010.
44. Jaiswal A., Nguyen V.Q., Carry B.J., le Jemtel T.H. (2016). Pharmacologic and endovascular reversal of left ventricular remodeling. *J Card Fail*.
45. Doughty R.N., Whalley G.A., Walsh H.A., Gamble G.D., Lopez-Sendon J., Sharpe N., Investigators C.E.S. (2004). Effects of carvedilol on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: The capricorn echo substudy. *Circulation*;109:201-6.
46. Frey N., Olson E.N. (2003). Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*;65:45-79.
47. Dorn G.W., 2nd, Robbins J., Sugden P.H. (2003). Phenotyping hypertrophy: Eschew obfuscation. *Circ Res*;92:1171-5.
48. Tham Y.K., Bernardo B.C., Ooi J.Y., Weeks K.L., McMullen J.R. (2015). Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: Signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*;89:1401-38.
49. Frey N., Katus H.A., Olson E.N., Hill J.A. (2004). Hypertrophy of the heart: A new therapeutic target? *Circulation*;109:1580-9.
50. Scheuer J., Malhotra A., Hirsch C., Capasso J., Schaible T.F. (1982). Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *J Clin Invest*;70:1300-5.
51. Iemitsu M., Miyauchi T., Maeda S., Sakai S., Kobayashi T., Fujii N., Miyazaki H., Matsuda M., Yamaguchi I. (2001). Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*;281:R2029-36.
52. Pikkarainen S., Tokola H., Majalahti-Palviainen T., Kerkela R., Hautala N., Bhalla S.S., Charron F., Nemer M., Vuolteenaho O., Ruskoaho H. (2003). Gata-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. *J Biol Chem*;278:23807-16.
53. Meerson F.Z. (1962). Compensatory hyperfunction of the heart and cardiac insufficiency. *Circ Res*;10:250-8.
54. Schiattarella G.G., Hill J.A. (2015). Inhibition of hypertrophy is a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload. *Circulation*;131:1435-47.
55. Hill J.A., Karimi M., Kutschke W., Davissou R.L., Zimmerman K., Wang Z., Kerber R.E., Weiss R.M. (2000). Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation*;101:2863-9.
56. 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*;322:1561-6.
57. Lorell B.H., Carabello B.A. (2000). Left ventricular hypertrophy: Pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*;102:470-9.
58. Haider A.W., Larson M.G., Benjamin E.J., Levy D. (1998). Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol*;32:1454-9.
59. Vega R.B., Bassel-Duby R., Olson E.N. (2003). Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem*;278:36981-4.
60. Bueno O.F., Wilkins B.J., Tymitz K.M., Glascock B.J., Kimball T.F., Lorenz J.N., Molkentin J.D. (2002). Impaired cardiac hypertrophic response in calcineurin abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*;99:4586-91.
61. 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*;187:537-43.
62. 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*;53:806-21.
63. Hogan P.G., Chen L., Nardone J., Rao A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and nfat. *Genes Dev*;17:2205-32.
64. Chighizola C.B., Ong V.H., Meroni P.L. (2016). The use of cyclosporine a in rheumatology: A 2016 comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*.
65. Starzl T.E., Klintmalm G.B., Porter K.A., Iwatsuki S., Schroter G.P. (1981). Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N Engl J Med*;305:266-9.
66. Yamashita M., Katsumata M., Iwashima M., Kimura M., Shimizu C., Kamata T., Shin T., Seki N., Suzuki S., Taniguchi M., Nakayama T. (2000). T cell receptor-induced calcineurin activation regulates t helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *J Exp Med*;191:1869-79.

67. Molkentin J.D., Lu J.R., Antos C.L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S.R., Olson E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*;93:215-28.
68. Ritter O., Hack S., Schuh K., Rothlein N., Perrot A., Osterziel K.J., Schulte H.D., Neyses L. (2002). Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation*;105:2265-9.
69. Taigen T., De Windt L.J., Lim H.W., Molkentin J.D. (2000). Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*;97:1196-201.
70. Sussman M.A., Lim H.W., Gude N., Taigen T., Olson E.N., Robbins J., Colbert M.C., Gualberto A., Wiecek D.F., Molkentin J.D. (1998). Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*;281:1690-3.
71. Arber S., Hunter J.J., Ross J., Jr., Hongo M., Sansig G., Borg J., Perriard J.C., Chien K.R., Caroni P. (1997). Mip-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*;88:393-403.
72. Heineke J., Wollert K.C., Osinska H., Sargent M.A., York A.J., Robbins J., Molkentin J.D. (2010). Calcineurin protects the heart in a murine model of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*;48:1080-7.
73. Wilkins B.J., Dai Y.S., Bueno O.F., Parsons S.A., Xu J., Plank D.M., Jones F., Kimball T.R., Molkentin J.D. (2004). Calcineurin/nfat coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*;94:110-8.
74. Molkentin J.D. (2013). Parsing good versus bad signaling pathways in the heart: Role of calcineurin-nuclear factor of activated t-cells. *Circ Res*;113:16-9.
75. Frank D., Frauen R., Hanselmann C., Kuhn C., Will R., Gantenberg J., Fuzesi L., Katus H.A., Frey N. (2010). Lmcd1/dyxin, a novel z-disc associated lim protein, mediates cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *J Mol Cell Cardiol*;49:673-82.
76. Yang J., Rothermel B., Vega R.B., Frey N., McKinsey T.A., Olson E.N., Bassel-Duby R., Williams R.S. (2000). Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins mcip1 and mcip2 in striated muscles. *Circ Res*;87:E61-8.
77. Sanna B., Brandt E.B., Kaiser R.A., Pfluger P., Witt S.A., Kimball T.R., van Rooij E., De Windt L.J., Rothenberg M.E., Tschop M.H., Benoit S.C., Molkentin J.D. (2006). Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*;103:7327-32.
78. Vega R.B., Rothermel B.A., Weinheimer C.J., Kovacs A., Naseem R.H., Bassel-Duby R., Williams R.S., Olson E.N. (2003). Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*;100:669-74.
79. Shin S.Y., Yang H.W., Kim J.R., Heo W.D., Cho K.H. (2011). A hidden incoherent switch regulates rcan1 in the calcineurin-nfat signaling network. *J Cell Sci*;124:82-90.
80. Frey N., Barrientos T., Shelton J.M., Frank D., Rutten H., Gehring D., Kuhn C., Lutz M., Rothermel B., Bassel-Duby R., Richardson J.A., Katus H.A., Hill J.A., Olson E.N. (2004). Mice lacking calstabin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med*;10:1336-43.
81. Frey N., Richardson J.A., Olson E.N. (2000). Calstabin, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*;97:14632-7.
82. Frank D., Kuhn C., van Eickels M., Gehring D., Hanselmann C., Lippl S., Will R., Katus H.A., Frey N. (2007). Calstabin-1 protects against angiotensin-ii induced cardiac hypertrophy. *Circulation*;116:2587-96.
83. Ruggiero A., Chen S.N., Lombardi R., Rodriguez G., Marian A.J. (2013). Pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy caused by myozenin 2 mutations is independent of calcineurin activity. *Cardiovasc Res*;97:44-54.
84. 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:H397-402.
85. Barrick C.J., Rojas M., Schoonhoven R., Smyth S.S., Threadgill D.W. (2007). Cardiac response to pressure overload in 129s1/svjm and c57bl/6j mice: Temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;292:H2119-30.
86. Rangrez A.Y., Hoppe P., Kuhn C., Zille E., Frank J., Frey N., Frank D. (2017). MicroRNA mir-301a is a novel cardiac regulator of cofilin-2. *PLoS One*;12:e0183901.
87. Schoensiegel F., Bekeredjian R., Schrewe A., Weichenhan D., Frey N., Katus H.A., Ivandic B.T. (2007). Atrial natriuretic peptide and osteopontin are useful markers of cardiac disorders in mice. *Comp Med*;57:546-53.
88. Zille E. (2015). Die rolle von kardialen micromnas in der pathogenese der dilatativen kardiomyopathie. *Med Diss, Kiel*:urn:nbn:de:gbv:8-diss-179638.
89. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993). The c. *Elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14. *Cell*;75:843-54.

90. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*;75:855-62.
91. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed rnas. *Science*;294:853-8.
92. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- rna genes *mir15* and *mir16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*;99:15524-9.
93. Deng J., Zhong Q. (2016). Advanced research on the microRNA mechanism in heart failure. *Int J Cardiol*;220:61-4.
94. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*;14:1902-10.
95. Jiang Q., Wang Y., Hao Y., Juan L., Teng M., Zhang X., Li M., Wang G., Liu Y. (2009). *Mir2disease*: A manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res*;37:D98-104.
96. Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev K.G., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*;438:685-9.
97. Lanford R.E., Hildebrandt-Eriksen E.S., Petri A., Persson R., Lindow M., Munk M.E., Kauppinen S., Orum H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis c virus infection. *Science*;327:198-201.
98. Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.H., Lee S., Baek S.H., Kim V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by rna polymerase ii. *EMBO J*;23:4051-60.
99. Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*;10:1957-66.
100. Altuvia Y., Landgraf P., Lithwick G., Elefant N., Pfeffer S., Aravin A., Brownstein M.J., Tuschl T., Margalit H. (2005). Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res*;33:2697-706.
101. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.N. (2003). The nuclear rnaase iii *drosha* initiates microRNA processing. *Nature*;425:415-9.
102. Bohnsack M.T., Czaplinski K., Gorlich D. (2004). Exportin 5 is a rangtp-dependent dsrna-binding protein that mediates nuclear export of pre-mirnas. *RNA*;10:185-91.
103. Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin rnas. *Genes Dev*;17:3011-6.
104. Park J.E., Heo I., Tian Y., Simanshu D.K., Chang H., Jee D., Patel D.J., Kim V.N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of rna for efficient and accurate processing. *Nature*;475:201-5.
105. Lund E., Dahlberg J.E. (2006). Substrate selectivity of exportin 5 and dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*;71:59-66.
106. Kozomara A., Griffiths-Jones S. (2014). *Mirbase*: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*;42:D68-73.
107. Rana T.M. (2007). Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small rnas. *Nat Rev Mol Cell Biol*;8:23-36.
108. Hawkins P.G., Morris K.V. (2008). Rna and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle*;7:602-7.
109. Morozova N., Zinovyev A., Nonne N., Pritchard L.L., Gorban A.N., Harel-Bellan A. (2012). Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA*;18:1635-55.
110. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*;120:15-20.
111. van Rooij E. (2011). The art of microRNA research. *Circ Res*;108:219-34.
112. Zhao Y., Ransom J.F., Li A., Vedantham V., von Drehle M., Muth A.N., Tsuchihashi T., McManus M.T., Schwartz R.J., Srivastava D. (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking *mirna-1-2*. *Cell*;129:303-17.
113. Chen J.F., Murchison E.P., Tang R., Callis T.E., Tatsuguchi M., Deng Z., Rojas M., Hammond S.M., Schneider M.D., Selzman C.H., Meissner G., Patterson C., Hannon G.J., Wang D.Z. (2008). Targeted deletion of *dicer* in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*;105:2111-6.
114. Han J., Lee Y., Yeom K.H., Kim Y.K., Jin H., Kim V.N. (2004). The *drosha-dgcr8* complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*;18:3016-27.
115. Rao P.K., Toyama Y., Chiang H.R., Gupta S., Bauer M., Medvid R., Reinhardt F., Liao R., Krieger M., Jaenisch R., Lodish H.F., Blalock R. (2009). Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*;105:585-94.

116. Liu N., Bezprozvannaya S., Williams A.H., Qi X., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. (2008). MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev*;22:3242-54.
117. van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Hill J., Olson E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*;316:575-9.
118. Thum T., Galuppo P., Wolf C., Fiedler J., Kneitz S., van Laake L.W., Doevendans P.A., Mummery C.L., Borlak J., Haverich A., Gross C., Engelhardt S., Ertl G., Bauersachs J. (2007). MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*;116:258-67.
119. Cao G., Huang B., Liu Z., Zhang J., Xu H., Xia W., Li J., Li S., Chen L., Ding H., Zhao Q., Fan M., Shen B., Shao N. (2010). Intronic mir-301 feedback regulates its host gene, *ska2*, in a549 cells by targeting *meox2* to affect erk/creb pathways. *Biochem Biophys Res Commun*;396:978-82.
120. Lee E.J., Gusev Y., Jiang J., Nuovo G.J., Lerner M.R., Frankel W.L., Morgan D.L., Postier R.G., Brackett D.J., Schmittgen T.D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*;120:1046-54.
121. Griffiths-Jones S. (2004). The microRNA registry. *Nucleic Acids Res*;32:D109-11.
122. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J. (2006). Mirbase: MicroRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*;34:D140-4.
123. Griffiths-Jones S., Saini H.K., van Dongen S., Enright A.J. (2008). Mirbase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*;36:D154-8.
124. Kozomara A., Griffiths-Jones S. (2011). Mirbase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*;39:D152-7.
125. Nam R.K., Benatar T., Wallis C.J., Amemiya Y., Yang W., Garbens A., Naeim M., Sherman C., Sugar L., Seth A. (2016). Mir-301a regulates e-cadherin expression and is predictive of prostate cancer recurrence. *Prostate*;76:869-84.
126. Damodaran C., Das T.P., Papu John A.M., Suman S., Kolluru V., Morris T.J., Faber E.N., Rai S.N., Messer J.C., Alatassi H., Ankem M.K. (2016). Mir-301a expression: A prognostic marker for prostate cancer. *Urol Oncol*;34:336 e13-20.
127. Guo Y.J., Liu J.X., Guan Y.W. (2016). Hypoxia induced upregulation of mir-301a/b contributes to increased cell autophagy and viability of prostate cancer cells by targeting *ndrg2*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*;20:101-8.
128. Wang M., Li C., Yu B., Su L., Li J., Ju J., Yu Y., Gu Q., Zhu Z., Liu B. (2013). Overexpressed mir-301a promotes cell proliferation and invasion by targeting *runx3* in gastric cancer. *J Gastroenterol*;48:1023-33.
129. Yue X., Cao D., Lan F., Pan Q., Xia T., Yu H. (2016). Mir-301a is activated by the wnt/beta-catenin pathway and promotes glioma cell invasion by suppressing *sept7*. *Neuro Oncol*.
130. Mycko M.P., Cichalewska M., Machlanska A., Cwiklinska H., Mariasiewicz M., Selmaj K.W. (2012). MicroRNA-301a regulation of a t-helper 17 immune response controls autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*;109:E1248-57.
131. Ma X., Yan F., Deng Q., Li F., Lu Z., Liu M., Wang L., Conklin D.J., McCracken J., Srivastava S., Bhatnagar A., Li Y. (2015). Modulation of tumorigenesis by the pro-inflammatory microRNA mir-301a in mouse models of lung cancer and colorectal cancer. *Cell Discov*;1:15005.
132. Lu Z., Li Y., Takwi A., Li B., Zhang J., Conklin D.J., Young K.H., Martin R., Li Y. (2011). Mir-301a as an nf-kappab activator in pancreatic cancer cells. *EMBO J*;30:57-67.
133. Betel D., Wilson M., Gabow A., Marks D.S., Sander C. (2008). The microRNA.Org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Res*;36:D149-53.
134. Garcia D.M., Baek D., Shin C., Bell G.W., Grimson A., Bartel D.P. (2011). Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of *Isy-6* and other microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*;18:1139-46.
135. Reczko M., Maragkakis M., Alexiou P., Grosse I., Hatzigeorgiou A.G. (2012). Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics*;28:771-6.
136. Krek A., Grun D., Poy M.N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E.J., MacMenamin P., da Piedade I., Gunsalus K.C., Stoffel M., Rajewsky N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*;37:495-500.
137. Huang da W., Sherman B.T., Lempicki R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. *Nat Protoc*;4:44-57.
138. Huang da W., Sherman B.T., Lempicki R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*;37:1-13.
139. Iwaki K., Sukhatme V.P., Shubeita H.E., Chien K.R. (1990). Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. Fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J Biol Chem*;265:13809-17.

140. Rasheed S.A., Teo C.R., Beillard E.J., Voorhoeve P.M., Casey P.J. (2013). MicroRNA-182 and microRNA-200a control g-protein subunit alpha-13 (gna13) expression and cell invasion synergistically in prostate cancer cells. *J Biol Chem*;288:7986-95.
141. Roa W., Brunet B., Guo L., Amanie J., Fairchild A., Gabos Z., Nijjar T., Scrimger R., Yee D., Xing J. (2010). Identification of a new microRNA expression profile as a potential cancer screening tool. *Clin Invest Med*;33:E124.
142. Rangrez A.Y., Bernt A., Poyanmehr R., Harazin V., Boomgaarden I., Kuhn C., Rohrbeck A., Frank D., Frey N. (2013). Dysbindin is a potent inducer of rhoa-srf-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol*;203:643-56.
143. He L., Hannon G.J. (2004). MicroRNAs: Small rnas with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*;5:522-31.
144. Mizuno K. (2013). Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal*;25:457-69.
145. Luther P.K. (2000). Three-dimensional structure of a vertebrate muscle z-band: Implications for titin and alpha-actinin binding. *J Struct Biol*;129:1-16.
146. Camelliti P., Borg T.K., Kohl P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*;65:40-51.
147. Hill C.S., Wynne J., Treisman R. (1995). The rho family gtpases rhoa, rac1, and cdc42hs regulate transcriptional activation by srf. *Cell*;81:1159-70.
148. LaMorte V.J., Thorburn J., Absher D., Spiegel A., Brown J.H., Chien K.R., Feramisco J.R., Knowlton K.U. (1994). Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem*;269:13490-6.
149. Bernstein B.W., Bamburg J.R. (2010). Adf/cofilin: A functional node in cell biology. *Trends Cell Biol*;20:187-95.
150. Vartiainen M.K., Mustonen T., Mattila P.K., Ojala P.J., Thesleff I., Partanen J., Lappalainen P. (2002). The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol Biol Cell*;13:183-94.
151. Ono S. (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol*;258:1-82.
152. Bamburg J.R. (1999). Proteins of the adf/cofilin family: Essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*;15:185-230.
153. Ono S., Ono K. (2002). Tropomyosin inhibits adf/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J Cell Biol*;156:1065-76.
154. Ohta Y., Kousaka K., Nagata-Ohashi K., Ohashi K., Muramoto A., Shima Y., Niwa R., Uemura T., Mizuno K. (2003). Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells*;8:811-24.
155. Ohashi K. (2015). Roles of cofilin in development and its mechanisms of regulation. *Dev Growth Differ*;57:275-90.
156. Agrawal P.B., Greenleaf R.S., Tomczak K.K., Lehtokari V.L., Wallgren-Pettersson C., Wallefeld W., Laing N.G., Darras B.T., Maciver S.K., Dormitzer P.R., Beggs A.H. (2007). Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the cfl2 gene encoding the skeletal muscle actin-binding protein, cofilin-2. *Am J Hum Genet*;80:162-7.
157. Gillett G.T., Fox M.F., Rowe P.S., Casimir C.M., Povey S. (1996). Mapping of human non-muscle type cofilin (cfl1) to chromosome 11q13 and muscle-type cofilin (cfl2) to chromosome 14. *Ann Hum Genet*;60:201-11.
158. Kremneva E., Makkonen M.H., Skwarek-Maruszczyńska A., Gateva G., Michelot A., Dominguez R., Lappalainen P. (2014). Cofilin-2 controls actin filament length in muscle sarcomeres. *Dev Cell*;31:215-26.
159. Agrawal P.B., Joshi M., Savic T., Chen Z., Beggs A.H. (2012). Normal myofibrillar development followed by progressive sarcomeric disruption with actin accumulations in a mouse cfl2 knockout demonstrates requirement of cofilin-2 for muscle maintenance. *Hum Mol Genet*;21:2341-56.
160. Gurniak C.B., Chevessier F., Jokwitz M., Jonsson F., Perlas E., Richter H., Matern G., Boyl P.P., Chaponnier C., Furst D., Schroder R., Witke W. (2014). Severe protein aggregate myopathy in a knockout mouse model points to an essential role of cofilin2 in sarcomeric actin exchange and muscle maintenance. *Eur J Cell Biol*;93:252-66.
161. Subramanian K., Gianni D., Balla C., Assenza G.E., Joshi M., Semigran M.J., Macgillivray T.E., Van Eyk J.E., Agnetti G., Paolocci N., Bamburg J.R., Agrawal P.B., Del Monte F. (2015). Cofilin-2 phosphorylation and sequestration in myocardial aggregates: Novel pathogenetic mechanisms for idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*;65:1199-214.
162. Wong L.L., Wang J., Liew O.W., Richards A.M., Chen Y.T. (2016). MicroRNA and heart failure. *Int J Mol Sci*;17:502.

163. Wang Y., Shibasaki F., Mizuno K. (2005). Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by slingshot via calcineurin. *J Biol Chem*;280:12683-9.
164. Zhang X.F., Hyland C., Van Goor D., Forscher P. (2012). Calcineurin-dependent cofilin activation and increased retrograde actin flow drive 5-HT-dependent neurite outgrowth in aplasia bag cell neurons. *Mol Biol Cell*;23:4833-48.
165. Zhao J.W., Gao Z.L., Ji Q.Y., Wang H., Zhang H.Y., Yang Y.D., Xing F.J., Meng L.J., Wang Y. (2012). Regulation of cofilin activity by camkii and calcineurin. *Am J Med Sci*;344:462-72.
166. Buyandelger B., Ng K.E., Miocic S., Piotrowska I., Gunkel S., Ku C.H., Knoll R. (2011). Mlp (muscle lim protein) as a stress sensor in the heart. *Pflugers Arch*;462:135-42.
167. Papalouka V., Arvanitis D.A., Vafiadaki E., Mavroidis M., Papadodima S.A., Spiliopoulou C.A., Kremastinos D.T., Kranias E.G., Sanoudou D. (2009). Muscle lim protein interacts with cofilin 2 and regulates f-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol*;29:6046-58.
168. Heineke J., Ruetten H., Willenbockel C., Gross S.C., Naguib M., Schaefer A., Kempf T., Hilfiker-Kleiner D., Caroni P., Kraft T., Kaiser R.A., Molkentin J.D., Drexler H., Wollert K.C. (2005). Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle lim protein-calcineurin signaling at the sarcomeric z-disc. *Proc Natl Acad Sci U S A*;102:1655-60.
169. Ambros V. (2004). The functions of animal miRNAs. *Nature*;431:350-5.
170. van Rooij E., Sutherland L.B., Liu N., Williams A.H., McAnally J., Gerard R.D., Richardson J.A., Olson E.N. (2006). A signature pattern of stress-responsive miRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*;103:18255-60.
171. Sergeeva I.A., Christoffels V.M. (2013). Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochim Biophys Acta*;1832:2403-13.
172. Purcell N.H., Tang G., Yu C., Mercurio F., DiDonato J.A., Lin A. (2001). Activation of nf-kappa b is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*;98:6668-73.
173. Panguluri S.K., Tur J., Chapalamadugu K.C., Katnik C., Cuevas J., Tipparaju S.M. (2013). MicroRNA-301a mediated regulation of kv4.2 in diabetes: Identification of key modulators. *PLoS One*;8:e60545.
174. Zobel C., Kassiri Z., Nguyen T.T., Meng Y., Backx P.H. (2002). Prevention of hypertrophy by overexpression of kv4.2 in cultured neonatal cardiomyocytes. *Circulation*;106:2385-91.
175. Posadas I., Perez-Martinez F.C., Guerra J., Sanchez-Verdu P., Cena V. (2012). Cofilin activation mediates bax translocation to mitochondria during excitotoxic neuronal death. *J Neurochem*;120:515-27.
176. Fujii K., Nagai R. (2014). Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*;70:64-73.
177. Bang C., Batkai S., Dangwal S., Gupta S.K., Foinquinos A., Holzmann A., Just A., Remke J., Zimmer K., Zeug A., Ponimaskin E., Schmiedl A., Yin X., Mayr M., Halder R., Fischer A., Engelhardt S., Wei Y., Schober A., Fiedler J., Thum T. (2014). Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*;124:2136-46.
178. Shore P., Sharrocks A.D. (1995). The mads-box family of transcription factors. *Eur J Biochem*;229:1-13.
179. Miano J.M. (2010). Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Lab Invest*;90:1274-84.
180. Parlakian A., Tuil D., Hamard G., Tavernier G., Hentzen D., Concordet J.P., Paulin D., Li Z., Daegelen D. (2004). Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol Cell Biol*;24:5281-9.
181. Mohri K., Takano-Ohmuro H., Nakashima H., Hayakawa K., Endo T., Hanaoka K., Obinata T. (2000). Expression of cofilin isoforms during development of mouse striated muscles. *J Muscle Res Cell Motil*;21:49-57.
182. Nelson T.J., Balza R., Jr., Xiao Q., Misra R.P. (2005). Srf-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: Regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*;39:479-89.
183. Loirand G., Guerin P., Pacaud P. (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*;98:322-34.
184. Brown J.H., Del Re D.P., Sussman M.A. (2006). The rac and rho hall of fame: A decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res*;98:730-42.
185. Yang N., Higuchi O., Ohashi K., Nagata K., Wada A., Kangawa K., Nishida E., Mizuno K. (1998). Cofilin phosphorylation by lim-kinase 1 and its role in rac-mediated actin reorganization. *Nature*;393:809-12.
186. Zeidan A., Javadov S., Karmazyn M. (2006). Essential role of rho/rock-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*;72:101-11.

187. Stern S., Haverkamp S., Sinske D., Tedeschi A., Naumann U., Di Giovanni S., Kochanek S., Nordheim A., Knoll B. (2013). The transcription factor serum response factor stimulates axon regeneration through cytoplasmic localization and cofilin interaction. *J Neurosci*;33:18836-48.
188. Gladka M.M., van Rooij E. (2015). Antimir-34a to enhance cardiac repair after ischemic injury. *Circ Res*;117:395-7.

7 Abkürzungsverzeichnis

-/-	„Knockout“ Mausmodell
3'UTR	3' untranslatierte Region
ADS	Puffer für Präparation der NRVCM
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
Cfl2	Cofilin 2
CnA	katalytische Untereinheit A von Calcineurin
Cs1 ^{-/-}	Calsarcin 1 „Knockout“
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
FCS	fetal calf serum
FS	Fractional Shortening
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
LV	Linker Ventrikel
LVEDD	linksventrikulären, enddiastolischen Durchmessers (LVEDD)
miR	microRNA
MLP	Muscle LIM Protein
NCBS	Newborn Calf Serum
NFATc	Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic
Nppa	Gen für ANF, Atrialer natriuretischer Faktor
Nppb	Gen für BNP, B-natriuretisches Peptid
NRVCM	Neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten von Ratten
nt	Basenpaare
OD600	Optische Dichte bei 600nm
PBS	Phosphated buffered saline
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT	quantitative Realtime PCR (Echtzeit PCR)
Rcan1-4	Regulator Of Calcineurin 1, Isoform 4
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium lauryl sulfate)
SRF	Serum-Response-Faktor
TAC	transverse aortic constriction
TBST	„Tris-buffered saline“ mit Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin

8 Danksagung

Eine Doktorarbeit anzufertigen ist ein langer und anstrengender Weg, währenddessen mitunter viele Fragen und Probleme aufkommen. Hiermit möchte ich all denen Danken, die mir bei diesem Projekt zur Seite gestanden und dies ermöglicht haben.

Der größte Dank gebührt Prof. Dr. Derk Frank, der mir sowohl als Doktorvater und gleichzeitig als Betreuer die ganze Zeit zur Seite gestanden hat. Vielen Dank für die Überlassung des Themas, die tolle Betreuung und dass du dir immer Zeit genommen hast, um meine Fragen und Probleme zu diskutieren, unabhängig davon wie viel in der Klinik gerade zu tun war. Es war mir eine Freude mit dir zusammenzuarbeiten.

Ebenfalls möchte ich Prof. Dr. Norbert Frey für die Nutzung des Labors und als Leiter der Arbeitsgruppe für molekulare Kardiologie danken.

Ashraf Rangrez danke ich für die Hilfe bei der Fertigstellung dieses Projekts. Natürlich möchte ich auch all den Mitarbeitern aus dem Labor danken, die ich namentlich nicht erwähnt habe. Es hat mir immer großen Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Ebenfalls hervorheben möchte ich Alexander Bernt, der mir so oft geholfen hat, wenn ich mal wieder eine Frage hatte. Auch geht besonderer Dank an Katharina Stiebeling für ihre Hilfe bei diesem Projekt.

Zu allerletzt möchte ich natürlich meiner Familie und meiner Frau Fee für eure Unterstützung danken. Vor allem danke ich meiner Schwester Carolin, die sich mühsam durch die frühen Versionen dieser Arbeit wühlen durfte und mir mit ihren Tipps und Verbesserungen unfassbar geholfen hat.

9 Veröffentlichungen

Hoppe P., Zille E., Gantenberg J., Eden M., Kuhn C., Frey N., Frank D. (2015). V1316: Cofilin-2 ist heraufreguliert in Mausmodellen der Dilatativen Kardiomyopathie und führt zu einer Steigerung der SRF-Aktivität in Kardiomyozyten. Clin Res Cardiol 104, Suppl. 1, April 2015. Vortrag auf der 81. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim

Hoppe P., Zille E., Gantenberg J., Eden M., Kuhn C., Frey N., Frank D. (2015). Abstract 19449: Upregulation of Cofilin-2 in Mouse Models Of DCM – Implications for SRF Signaling. Circulation. 2015; 132: A19449. Poster bei den Scientific Sessions der American Heart Association 2015 in Orlando, Florida

Hoppe P., Zille E., Rangrez A., Bernt A., Frey N., Frank D. (2016). miR-301 Regulates Cofilin-2 in Calsarcin-1 deficient mice, a mouse model of dilated cardiomyopathy. Poster beim e:Med Meeting 2016 on Systems Medicine in Kiel

Rangrez A.Y., Pott J., Kluge A., Frauen R., Stiebeling K., Hoppe P., Sossalla S., Frey N., Frank D. (2017). Myeloid leukemia factor-1 is a novel modulator of neonatal rat cardiomyocyte proliferation. Biochim Biophys Acta;1864:634-44.

Rangrez A.Y., Hoppe P., Kuhn C., Zille E., Frank J., Frey N., Frank D. (2017). Microna mir-301a is a novel cardiac regulator of cofilin-2. PLoS One;12:e0183901.