

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

(Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DIE ROLLE VON KARDIALEN MICRORNAS IN DER PATHOGENESE DER DILATATIVEN KARDIOMYOPATHIE

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ELISA ZILLE

aus Hamburg

Kiel 2015

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Derk Frank, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie
2. Korreferent: Prof. Dr. Hans-Heiner Kramer, Klinik für Kinderkardiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2015

Zum Druck genehmigt, Kiel den 15.12.2015

gez:

Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Herzerkrankungen	8
1.1.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)	8
1.2 Molekulare Organisation der Z-Scheibe	9
1.2.1 Rolle der Z-Scheibe bei der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie	10
1.3 Kardiale Hypertrophie und Remodeling	11
1.3.1 Physiologische kardiale Hypertrophie	12
1.3.2 Hypertrophie- und Remodeling-assoziiertes Genexpressionsprofil	13
1.4 Der Calcineurin/Calsarcin-Signalweg	14
1.4.1 Die Phosphatase Calcineurin	14
1.4.2 Die Auswirkung von <i>RCAN1-4</i> auf die Calcineurin-Aktivität	15
1.4.3 Die Calsarcin-Familie	15
1.5 MicroRNAs (miRs)	16
1.5.1 Die biologische Funktion der microRNAs	17
1.5.2 Kardiale microRNAs	18
1.5.3 Rolle der microRNAs bei der Entstehung einer DCM	20
1.5.4 AntagomiRs/AntimiRs	21
1.5.5 Therapeutische Ansätze mit microRNAs	21
1.6 Fragestellung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
2.1.2 Chemikalien	26
2.1.3 Enzyme	27
2.1.4 Antikörper	27
2.1.5 Kits	27
2.1.6 Oligonukleotide	28
2.1.7 Vektoren/ Plasmide	30
2.1.8 Puffer und Lösungen	30
2.1.9 Medien	33
2.1.10 Zelllinien	34

2.1.11 Versuchstiere.....	34
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	36
2.2.2 Kultur und Behandlung von neonatalen Kardiomyozyte.....	37
2.2.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit RNA.....	40
2.2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit DNA.....	45
2.2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit Proteinen.....	48
2.2.6 Arbeitsmethoden mit Adenoviren.....	51
2.2.7 Tierversuche.....	54
2.2.8 Histologie/Immunhistologie.....	55
2.2.9 Statistische Auswertung.....	57
3. Ergebnisse.....	58
3.1 Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) in Calsarcin1- „knockout“-Mäusen im genetischen C57Bl/6-Hintergrund.....	58
3.1.1 Echokardiographie der Calsarcin1-„knockout“-Tieren.....	58
3.1.2 Morphometrische Untersuchung der Calsarcin1-„knockout“-Herzen.....	62
3.1.3 Genexpressionsprofil im Myokard von Calsarcin1-„knockout“-Mäusen.....	67
3.1.4 Aktivierung des Calcineurin-Signalwegs in Calsarcin1-„knockout“-Herzen	69
3.1.5 Genomweite microRNA-Microarray-Untersuchung in Calsarcin1-„knockout“-Mäusen und anschließende Validierung mittels TaqMan-qPCR-Analyse.....	71
3.1.6 Differenziell regulierte microRNAs im Myokard der Calsarcin1- „knockout“-Mäuse: miR-298-5p und miR-301a.....	72
3.2 <i>In vitro</i> Experimente zur Analyse der Wirkung von microRNAs in neonatalen Kardiomyozyten.....	73
3.2.1 Generierung von Adenovirus-Konstrukten zur Überexpression von miR-298-5p und miR-301a.....	73
3.2.2 Einfluss der Überexpression von miR-301a <i>in vitro</i> auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm.....	76
3.2.3 Einfluss des „Knockdowns“ von miR-301a <i>in vitro</i> auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm.....	79

3.2.4	Einfluss der Überexpression von miR-298-5p <i>in vitro</i> auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm.....	83
3.2.5	Einfluss des „Knockdowns“ von miR-298-5p <i>in vitro</i> auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm.....	87
4.	Diskussion.....	91
4.1	„Knockout“ von Calsarcin1 vermittelt eine dilatative Kardiomyopathie <i>in vivo</i>	91
4.1.1	Mechanismen für die Regulation und Funktion von Calsarcin1.....	92
4.2	Die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs durch Calsarcin1.....	93
4.3	MiR-298-5p und miR-301a als differentiell regulierte microRNAs in der dilatativen Kardiomyopathie.....	94
4.4	Heraufregulation von miR-298-5p in Calsarcin1-„knockout“-Mäusen.....	95
4.5	Herunterregulation von miR-301a in Calsarcin1-„knockout“-Mäusen.....	96
4.6	Einfluss der veränderte microRNA-Expression auf Kardiomyozyten <i>in vitro</i>	98
4.7	Die Relevanz des therapeutischen Einsatzes von microRNAs.....	98
4.8	Schlussfolgerung.....	100
5.	Zusammenfassung.....	101
6.	Literaturverzeichnis.....	104
7.	Veröffentlichung.....	115
8.	Lebenslauf.....	116
9.	Danksagung.....	117

II. Abkürzungen

Ad	Adenovirus
ALP	actinin-associated LIM protein
ANF	Atrial natriuretic factor
BNP	Brain natriuretic peptide
Calsarcin	Calcineurin-associated sarcomeric protein
DCM	Dilated cardiomyopathy, dilatative Kardiomyopathie
DCR	Dicer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dgr	Allatostatin Receptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
Dyrk	dually-specificity tyrosine-(y)-phosphorylation regulated kinase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion, Maß für linksventrikuläre Pumpfunktion
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FHL	four-and-a-half LIM domain protein
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
FS	Fractinal Shortening
HCM	Hypertrophic cardiomyopathy, hypertrophische Kardiomyopathie
H&E	Hämatoxylin&Eosin
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzelllinie
HRP	Horseradish peroxidase/ Meerrettich-Peroxidase
Hsa	Homo sapiens
ICM	idiopathic cardiomyopathy, idiopathische Kardiomyopathie
Ifu	Infectious unit (s)
Ivd	diastolische Wandstärke des interventrikulären Septums
Ivs	systolische Wandstärke des interventrikulären Septums
KHK	Koronare Herzerkrankung
Ko	Knockout
LB	lysogeny broth
LIM	Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Akronym LIN-11, Is11, MEC-3)
LNA	locked nucleid acid
LV	linker Ventrikel

LVEDD	left ventricular end diastolic diameter, linksventrikulärer diastolischer Durchmesser
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCIP	modulatory calcineurin-interacting protein
MFM	myofibrillar myopathy, myofibrilläre Myopathie
MHC	myosin heavy chain
miR	MicroRNA
MLP	muscle LIM protein
Mmu	Mus musculus
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NRVCM	neonatal rat ventricular cardiac myocytes, neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte
PE	Phenylephrin
PBS	Phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pwd	diastolische Wandstärke der Hinterwand
pws	systolische Wandstärke der Hinterwand
RCAN	Regulator of calcineurin (früher MCIP, Calcipressin)
Rno	Rattus norvegicus
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
SERCA	sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Acetat EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume per volume
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume
ZASP	Z-band Alternatively Spliced PDZ-motif protein

1. Einleitung

1.1 Herzerkrankungen

Führend bei den Todesursachen in Deutschland und in der westlichen Welt sind die kardiovaskulären Erkrankungen. In der Dritten Welt hingegen versterben die Menschen meistens an Infektionserkrankungen. In den industrialisierten Ländern ist jeder zweite Todesfall mit einer pathologischen Störung des Herz-Kreislauf-Systems assoziiert. Aufgrund des demographischen Wandels und des Anstiegs von Risikofaktoren, wie Adipositas, Dislipidämie, Hypertonie und Nikotinkonsum in unserer Gesellschaft, nimmt die Inzidenz dieser Erkrankungen ständig zu (Bonneux et al., 1994). Die Herzinsuffizienz ist für den größten Teil dieser Erkrankungen verantwortlich. In der Rotterdam-Studie wurde ermittelt, dass die Prävalenz der Herzinsuffizienz 3,9% bei 55-95 jährigen Studienteilnehmern beträgt (Mosterd et al., 1999). Trotz der besseren Behandlungsmethoden in den letzten Jahren liegt die mittlere Überlebensdauer lediglich bei 1,7-3,2 Jahren (Jhund et al., 2009). Die häufigste Ätiopathologie für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist die Hypertonie und die Koronare Herzerkrankung (KHK), aber auch andere kardiale Erkrankungen wie die Kardiomyopathien führen zum Bild der Herzinsuffizienz und sind mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (Ho et al., 1993). Um die Lebensqualität und Prognose dieser Patienten zu verbessern, ist ein frühzeitiges Erkennen, Prävention und die richtige Therapie von höchster Bedeutung.

1.1.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die DCM ist einer der relevantesten Ursachen bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, und nach dem Einfluss von Bluthochdruck und KHK auch verantwortlich für die meisten Herztransplantationen. Die DCM ist bereits im Kindesalter keine Seltenheit. Die jährliche Inzidenz liegt bei 0.57 per 100.000 Kinder unter 18 Jahren (Towbin et al., 2006).

Die häufigste Form der Kardiomyopathie ist die DCM, wobei das männliche Geschlecht öfter betroffen ist als das weibliche (Towbin et al., 2006). Die DCM ist eine myokardiale Erkrankung, die mit einer Dilatation des linken Ventrikels und einer systolischen Pumpfunktionseinschränkung einhergeht. Die diagnostischen Kriterien für die DCM beinhalten eine eingeschränkte Ejektionsfraktion (EF) < 45% (Normwert > 55%) und LVEDD > 117% ohne das Vorhandensein einer signifikanten koronaren Herzerkrankung (KHK). Die Ursache der DCM ist in 35-50% der Fälle eine genetische Mutation, wobei fünf Phänotypen der familiären DCM identifiziert sind (Grunig et al., 1998). Andere wichtige Gründe für die Entwicklung der DCM sind toxischer (C2-Abusus) oder infektiöser Genese, wie z.B. bei Myokarditis nach Virusinfekten (Fuster et al., 1981, Towbin et al., 2006). Klinisch macht sich die DCM durch eine Linksherzinsuffizienz und Rhythmusstörungen bemerkbar.

1.2 Molekulare Organisation der Z-Scheibe

Da die Pathogenese der DCM am Herzmuskel stattfindet, ist es wichtig den Aufbau und die Strukturen zu kennen.

Herzmuskulatur und Skelettmuskulatur werden zur quergestreiften Muskulatur zusammengefasst. Verantwortlich für die Kontraktion der Muskulatur sind Myofibrillen (Au, 2004). Die kleinste kontraktile Einheit ist das Sarkomer, das in eine Z-I-A-(H)- und M-Bande aufgeteilt wird. Die Banden haben durch die Eigenschaften im linear polarisierten Licht (anisotrop und isotrop) ihren Namen erhalten. Die I-Bande besteht überwiegend aus Actin, wohingegen die A-Bande hauptsächlich aus Myosin besteht. Die Z-Scheibe ist die laterale Begrenzung des Sarkomers. Die M-Bande ist als Region definiert, in der sich Actin und Myosin nicht überlappen. Weitere sarkomerische Filamente sind das dehnungsfähige Titin und Nebulette (Au, 2004, Clark et al., 2002, Frank and Frey, 2011).

Die Hauptaufgabe der Z-Scheibe schien die Kraftübertragung zwischen dem kontraktilem Apparat und dem Zytoskelett zu sein. Heutzutage weiß man, dass die Z-Scheibe ein Multiproteinkomplex ist und in der Pathogenese der primären Kardiomyopathie eine bedeutende Rolle spielt (Frank and Frey, 2011).

Der größte Vertreter und das Rückgrat an der Z-Scheibe ist das α -Actinin, welches ca. 20% der Masse der Z-Scheibe ausmacht (Robson et al., 1970). Actinin, ein ubiquitär exprimiertes Protein, ist von größter Bedeutung bei der Organisation des Actin-Zytoskelettes, in der Zellmortalität und der Muskelkontraktion (Otey and Carpen, 2004, Herman, 1993).

Das α -Actinin ist wiederum durch eine PDZ-Domäne (Postsynaptic density 95, Discs large and Zonula occludens-1) ein wichtiger Bindungspartner von Cypher/Oracle/ZASP. Das Z-Scheibenprotein Cypher/Oracle/ZASP ist ein Bindungspartner von Calsarcin-1 und ein wichtiger Mediator der kardialen Hypertrophie (Faulkner et al., 1999, Zhou et al., 1999, Passier et al., 2000). PDZ-Domänen sind wichtige Schlüsselemente für die Bildung von Proteinkomplexen (Nourry et al., 2003). Es hat sich gezeigt, dass der 5 C-Terminus von den Aminosäuren der Z-Scheibenproteine Calsarcin-1, Calsarcin-2, Calsarcin-3, Myotilin, Myopalladin und Palladin eine hohe Ähnlichkeit aufweist. So ist es nicht verwunderlich, dass die Calsarcin Familie, Myotilin und α -Actinin-2 Liganden für die PDZ Domäne von Enigma Familien Mitglieder wie Cypher/Oracle/ZASP, CLP-36 und ALP sind.

Diese erwähnten Bindungspartner sind alle an der Z-Scheibe lokalisiert und ihre Expression wurde in Kardiomyozyten nachgewiesen (von Nandelstadh et al., 2009). Darüber hinaus gehören sie auch zu den LIM-Domänen Proteinen. LIM-Domänen vermitteln auch Protein-Protein-Interaktionen und sind hochkonservierte Tandem-Zinkfingerdomänen, die reich an Cystein sind. Interessanterweise haben viele Z-Scheibenproteine gleiche Interaktionsdomänen und strukturieren so den komplexen Aufbau der Z-Scheibe.

MLP ist ein weiteres wichtiges Z-Scheibenprotein mit zwei LIM-Domänen, das mit α -Actinin, Telethonin/T-cap, Calcineurin/NFAT und β -Spektrin Bindungen eingehen kann. Für die Verankerung von Calcineurin an der Z-Scheibe scheint MLP sogar essentiell zu sein (Heineke et al., 2005, Flick and Konieczny, 2000).

In einem unabhängigen Experiment wurde eine molekulare Interaktion zwischen Z-Scheibe und Sarkomer durch Filamine beschrieben, was äußerst aufschlussreich ist, da die C-Terminale Region von Filaminen auch Bindungspunkt für Calsarcine und Myotilin ist (Gontier et al., 2005).

1.2.1 Rolle der Z-Scheibe bei der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie

Einige von den genannten Interaktionspartnern an der Z-Scheibe spielen in der Pathogenese der Kardiomyopathie eine Rolle, wodurch die Bedeutung der komplexen Organisation der Z-Scheibe als Prädilektionsstelle für kardiale Erkrankungen in den Vordergrund gestellt wird. Für die hypertrophische Kardiomyopathie sind nahezu alle Mutationen an den sarkomerischen Proteinen lokalisiert (Spirito et al., 1997). Anderes verhält es sich mit der DCM. Für die Erkrankungen der DCM, die mit Mutationen assoziiert sind, sind die verursachenden Defekte an Z-Scheibenproteinen, Calcium-assoziierten Interaktionspartnern, sarkomerischen Proteinen und Kernmembranproteinen wie den Laminen lokalisiert. So wurden genetische Polymorphismen von Nebulette (im Skelettmuskel Nebulin), einem Z-Scheiben-Protein, in Patienten mit nicht familiärer DCM entdeckt (Arimura et al., 2000). Verschiedenste Mutationen in Z-Scheibenproteinen sind bekannt, wie z.B. die Q9R Mutation im α -Actinin-2-Gen, die vermehrt in Patienten mit DCM gefunden wurde. Mutationen im α -cardiac-Actin gehen mit der idiopathischen Form der DCM einher (Olson et al., 1998) und Telethonin/T-Cap Veränderungen sind auch verantwortlich für die Entwicklung einer DCM und HCM (Hayashi et al., 2004); Mutationen im MLP sind mit einem verminderten Auftreten von Lysin 69 und der W4R Mutation assoziiert (Mohapatra et al., 2003). Dies bestätigt nochmals die prägnante Rolle der Z-Scheibe im Hinblick auf die Entwicklung einer DCM. Auffallend ist auch, dass jeder Calsarcin-Interaktionspartner an der Entstehung der Kardiomyopathie beteiligt sein kann (Frank et al., 2006).

Auch bei anderen Muskelerkrankungen ist bekannt, dass Mutationen an der Z-Scheibe ein großes Risiko darstellen. Sogenannte „Missense“ Mutationen in der Dimerisierungszone von γ -Filamin lösen eine autosomal-dominante myofibrilläre Myopathie (MFM) aus (Vorgerd et al., 2005), das Fehlen von Cypher im Mausmodell führt zu kongenitalen Myopathien und Kardiomyopathien (Zhou et al., 2001) und Mutationen im Zytoskelett von Actininfibrillen sind assoziiert mit humanen Myopathien (Clark et al., 2002).

Das Cystein-reiche Z-Scheibenprotein MLP ist signifikant herunterreguliert im humanen Myokard von DCM-Patienten (Zolk et al., 2000) und MLP-knockout-Mäuse entwickeln

passend dazu innerhalb der ersten Lebensmonate einen Phänotyp der DCM (Minamisawa et al., 1999). Eine Verminderung des MLP/Calcineurin-Signalwegs steigert das Risiko für ungünstiges Remodeling und Mortalität nach Myokardinfarkt (Heineke et al., 2005).

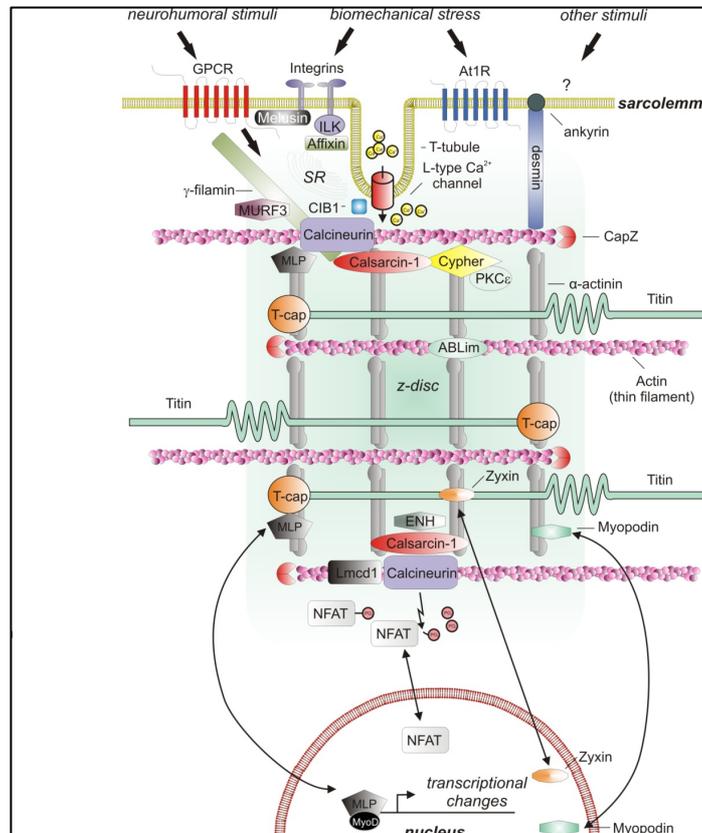


Abbildung 1-1: Signalwege an der kardialen Z-Scheibe (Frank and Frey, 2011)

1.3 Kardiale Hypertrophie und Remodeling

Kardiale Hypertrophie ist die Antwort auf extrinsische und intrinsische Stresstimuli. So reagiert das Herz z.B. bei arterieller Hypertonie (Scheuer et al., 1982), Myokardinfarkt oder Klappenvitien mit der Entwicklung einer Myokardhypertrophie (Frey and Olson, 2003). Diabetes mellitus und Kardiomyopathien sind Risikofaktoren für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und kardialer Hypertrophie (Boudina and Abel, 2007). Dabei ist gerade die linksventrikuläre Hypertrophie unabhängig vom Bluthochdruck assoziiert mit kardiovaskulärer Mortalität, Schlaganfällen und Herzinfarkten (Devereux et al., 2004, Bolognese et al., 1994). Es wird morphologisch generell zwischen konzentrischer und exzentrischer Hypertrophie unterschieden. Bei der konzentrischen Hypertrophie kommt es zu einer Zunahme der Wanddicke und des Herzgewichtes, nicht aber zu einer Zunahme des Kammervolumens. Dieser Verlauf tritt bei einer chronischen Druckbelastung auf. Die Signalwege, die zu einer konzentrischen Hypertrophie führen, laufen durch die extrazelluläre signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) ab, welche ein Zweig der *greater mitogen-activated protein kinases* (MAPKs)

ist (Kehat and Molkentin, 2010). Die exzentrische Form der Hypertrophie zeichnet sich durch eine Zunahme des Herzgewichts sowie einer Vergrößerung des Kammervolumens aus. Im Gegensatz dazu kann bei der konzentrischen Hypertrophie das Kammervolumen jedoch auch verkleinert oder normal sein. Die exzentrische Hypertrophie ist eine Antwort auf chronische Volumenbelastung, wie sie bei Aorten- oder Mitralklappeninsuffizienz auftreten kann.

Die Cardiovascular Health Study von 2004 beschreibt die Größenzunahme des linken Ventrikels als unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung einer reduzierten Ejektionsfraktion (Drazner et al., 2004). Auch die Framingham Heart-Studie bestätigt, dass eine linksventrikuläre Hypertrophie, die in der Studie bei 16% der Männern und 19% der Frauen auftrat, ein bedeutsamer Risikofaktor für kardiale Erkrankungen ist (Levy et al., 1990). Ein wichtiger Faktor beim pathologischen Remodeling ist die kardiale Hypertrophie, die nach der kompensatorischen Phase beginnt und bis zur Entwicklung einer dilatativen Verlaufsform fortschreiten kann (Hill and Olson, 2008). Heutzutage wird die Hypertrophie nicht mehr als kompensatorische Anpassungsreaktion auf Veränderungen verstanden, sondern vielmehr als maladaptiver Prozess, den man unterbinden muss, um die Entwicklung einer kardialen Dysfunktion zu verhindern (Frey and Olson, 2003).

1.3.1 Physiologische kardiale Hypertrophie

Die physiologische Hypertrophie beruht im Gegensatz zur pathologischen kardialen Hypertrophie auf anderen biologischen Mechanismen, die nicht mit einer Veränderung des kardialen Myosins einhergehen (Scheuer et al., 1982). Physiologische Prozesse (z.B. Ausdauertraining wie Laufen und Schwimmen) führen zu einer Zunahme des Kammervolumens und zu einer proportionalen Abnahme der Wanddicke (Scheuer et al., 1982). Ein wichtiger Unterschied ist hierbei, dass physiologische Hypertrophie nicht mit Fibrose oder der Aktivierung des „fötalen“-hypertrophie-assoziierten Genprogramms vergesellschaftet ist. Die physiologische Hypertrophie stellt kein signifikantes Risiko für Arrhythmien, Herzinsuffizienz oder kardiale Dysfunktionen dar. Auch konnte kein Anstieg von Myokardinfarkten beobachtet werden, die mit einer Veränderung des Fettsäuremetabolismus einhergehen, zu denen es bei der physiologischen Hypertrophie nicht kommt (Beisvag et al., 2009).

Allerdings wurde in Tiermodellen beobachtet, dass langes exzessives Training zu einer gesteigerten Inzidenz von ventrikulären Tachykardien und Dysfunktionen führen kann, so scheint auch hier bei einer übermäßigen Belastung eine pathologische Komponente hinzuzukommen (Benito et al., 2011). In Studien mit rehabilitationsmedizinischen Patienten nach Herzinfarkten konnte wiederum kein Unterschied zwischen exzessivem und moderatem Training in Bezug auf neue kardiovaskuläre Ereignisse erkannt werden (Rognmo et al.,

2012). Der intrazelluläre Mechanismus der physiologischen Hypertrophie wird u.a. durch die Phosphoinositide-3-kinase (p110 α) gesteuert, wobei dieser Signalweg bei der pathologischen Hypertrophie keine relevante Rolle spielt (McMullen et al., 2003).

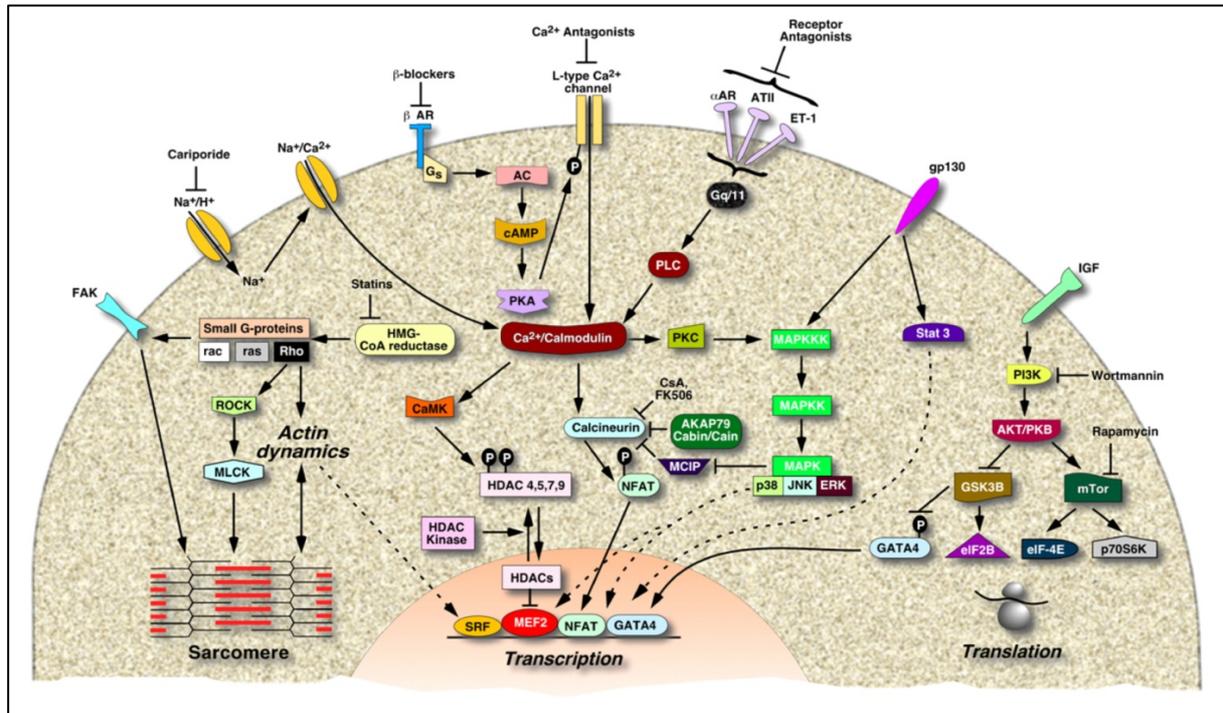


Abbildung 1-2: Mechanismen der Myokardhypertrophie (Frey & Olson, Annu Rev Physiol 2003)

1.3.2 Hypertrophie- und Remodeling-assoziiertes Genexpressionsprofil

Während des kardialen Wachstums und bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie kommt es zuerst zur Aktivierung des „fötalen“ Hypertrophie-assoziierten Genprogramms. Dabei kommt es zu einer Heraufregulation von *ANP* (*Nppa*), *BNP* (*Nppb*), β -MHC (β -Isoform of *Myosin heavy chain*) und α SA (α -skelatal muscle isoform of actinin) (Chien et al., 1991). Es ist bekannt, dass besonders die Druckbelastung mit einer gesteigerten Expression von β -MHC einhergeht (Litten et al., 1982). Es stellte sich aber heraus, dass viele biologische Marker, wie z.B. *BNP*, nicht nur bei Hypertrophie erhöht sind, sondern generell bei pathologischem kardialen Stress ansteigen (Maisel, 2001). Wichtig bei der Erfassung der Veränderung des „fötalen“ Genprogramms ist, dass immer mehrere dieser Gene gemessen werden, da man keine Schlussfolgerung aus dem Messen eines Gen ziehen kann, da die ablaufenden Prozesse miteinander zusammenhängen (Dorn et al., 2003).

Bei den molekularen Mechanismen der kardialen Hypertrophie spielen die Veränderungen des Calcium-Transportes, die auf einer veränderten Expression von SR-Genen beruhen, eine große Rolle. So kommt es zu einer verminderten Expression von Calcium cycling protein SERCA2 bei Herzinsuffizienz oder Hypertrophie (Arai et al., 1994).

Zur schnellen Beurteilung von kardiovaskulären Beeinträchtigungen werden gegenwärtig Biomarker eingesetzt. In der Humanmedizin wird vor allem *NT-proBNP* eingesetzt. Ein andere Biomarker ist das atriale natriuretische Peptid (*ANP*), das eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutvolumens und des Blutdruckes einnimmt (Nishikimi et al., 2006). *Nt-proANP* (*N-terminal propeptide of the atrial natriuretic peptide*), ein Vorläufermolekül von *ANP*, steigt in Mausexperimenten bei Herzinfarkten an und ist somit geeignet als frühzeitiger Marker bei kardialen Krankheitsbildern. Außerdem korreliert *Nt-proANP* mit dem FS und kann zur Beurteilung der Auswurfkapazität des Herzen erhoben werden (Schoensiegel et al., 2007). Auch zeigte sich *ANP* als Modulator der kardialen Hypertrophie in einem Mausmodell, in dem die *ANP*-„knockout“-Mäuse als Antwort auf eine Volumenbelastung eine Hypertrophie entwickelten (Mori et al., 2004). Es zeigte sich, dass die Entwicklung der Hypertrophie unabhängig vom Blutdruck auftrat, sodass von einem antihypertrophen Effekt des *ANPs* auszugehen ist (Feng et al., 2003), der aber nicht stark genug ist, eine Hypertrophie dauerhaft zu verhindern (Barry et al., 2008).

1.4 Der Calcineurin/Calsarcin-Signalweg

1.4.1 Die Phosphatase Calcineurin

Calcineurin ist eine ubiquitär vorkommende Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase, deren Aktivierung von großer Bedeutung in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie, der Herzinsuffizienz (Molkentin et al., 1998) und der Kardiomyopathie ist. Auch wurde eine erhöhte Calcineurinaktivität im humanen Myokard von Patienten mit diagnostizierter Kardiomyopathie ohne bestehende Herzinsuffizienz nachgewiesen (Ritter et al., 2002).

Die aktive Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin ist ein Heterodimer und besteht aus einer katalytischen Untereinheit Calcineurin A (CnA) und einer regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (CnB). Calcineurin A wiederum setzt sich aus den Isoformen A α , A β und A γ zusammen (Bueno et al., 2002), die im Myokard exprimiert werden. Es sei darauf verwiesen, dass Teile des Calcineurin-Pools an der Z-Scheibe lokalisiert sind (Frey et al., 2000). Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), der im Zellkern lokalisiert ist und dort das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm mit anderen Interaktionspartnern, wie zum Beispiel dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor GATA4, aktiviert (Molkentin et al., 1998). Calcineurin wird dabei durch intrazellulären Calcium-Einstrom aktiviert (Zou et al., 2001).

Ursprünglich wurde der Calcineurin/NFAT-Signalweg im Zusammenhang mit der Aktivierung verschiedener Interleukin-Genen, wie Interleukin-2 beschrieben, und es wurde belegt, dass der Wirkmechanismus der Immunsuppressiva Ciclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) auf einer Inhibition von Calcineurin beruht (Übersichtsarbeiten u.a. (Olson and Williams,

2000, Leinwand, 2001, Frey and Olson, 2003)). Vor einiger Zeit wurde eine neue Familie Calcineurin-bindender Proteine in der quergestreiften Muskulatur entdeckt, welche Calcineurin mit α -Actinin an der Z-Scheibe des Sarkomers verbinden - die Gruppe der Calsarcins. Die Interaktion zwischen dem muskelspezifischen Calsarcin-1 und Calcineurin A wurde mittels Yeast-two-hybrid-Screens detektiert (Frey et al., 2000).

Die Unterdrückung von Calcineurin durch den endogenen Inhibitor MCIP 1 in Mäusen unter „Aortic banding“ zeigte keine Hinweise auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Hill et al., 2002).

Im Gegensatz zur Aktivierung von Calcineurin bei pathologischen Hypertrophie-Stimuli, ist die Aktivierung bei physiologischer Stimulation, wie z.B. sportlicher Belastung, nicht gegeben (Wilkins et al., 2004).

1.4.2. Auswirkung von *RCAN1-4* auf die Calcineurin-Aktivität

Die Aktivität von *RCAN1-4* (*MCIP1*) und Calcineurin ist durch einen negativen Feedback-loop gekoppelt. So weist die Subform *RCAN1-4* in einem alternativen, intronisch gelegenen Promotor multiple NFAT-Bindungsstellen auf, über die *RCAN1-4* exprimiert wird und durch die seine inhibitorische Wirkung die enzymatische Aktivität von Calcineurin reduziert (Yang et al., 2000). *RCAN1* wird dabei von MAPK und der Gylkogenkinase-3 phosphoryliert (Vega et al., 2002). In *RCAN1*-transgenen Mäusen (mit einer durch den α MHC-Promotor gesteuerten herzspezifischen Expression) wurde beobachtet, dass es nach „Aortic banding“ im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen zu einer abgeschwächten Form der Hypertrophie kam, da die Calcineurin-Aktivität inhibiert wurde (Hill et al., 2002). Zusammenfassend ist *RCAN1* in der Lage, kardiale Hypertrophie und die konsekutive Progression in eine dilatative Verlaufsform abzuschwächen (Rothermel et al., 2001).

1.4.3 Die Calsarcin-Familie

Die Familie der Calsarcin-Isoformen (Calcineurin-binding sacromeric protein) wurde in einem Yeast-two-Hybrid Screen auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern von Calcineurin entdeckt. Dabei wurde gezeigt, dass Calsarcin-1 im Herzmuskel und in langsamer Skelettmuskulatur (Typ-1-Fasern) exprimiert wird und Calsarcin-2 und 3 ausschließlich in der Skelettmuskulatur (Frey et al., 2000). Calsarcin-3 hingegen wird in schnellen Muskelfasern exprimiert und interagiert auch mit Calcineurin und den Z-Scheiben Proteinen α -Actinin, γ -Filamin und Telethonin (Frey and Olson, 2002). Calsarcin-2 wird auch in schneller Muskulatur exprimiert. Es zeigte sich dabei in experimentellen Studien von Calsarcin-2-„knockout“-Mäuse ebenfalls als Inhibitor für Calcineurin (Frey et al., 2008). Synonym für Calsarcin-1 werden auch die Bezeichnungen FATZ-2 (Faulkner et al., 2000) oder Myozenin-2 (Myoz-2) verwendet (Takada et al., 2001). Calsarcine haben ein Molekulargewicht von

etwas mehr als 30 kDa und binden subzellulär an die Z-Scheibe (laterale Begrenzung des Sarkomers) in der quergestreiften Muskulatur. Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass die Z-Scheibe ein „hot spot“ für kardiale Signaltransduktion und genetische Herzerkrankungen ist (Frank et al., 2006, Frank and Frey, 2011, Frank et al., 2007a). So ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen in Calsarcin-1 Genen eine hypertrophe Kardiomyopathie verursachen können (Osio et al., 2007). Eigene, unpublizierte erhobene Daten aus unserer Arbeitsgruppe bestätigen ebenfalls eine kausale Rolle in der Pathogenese der genetisch vermittelten DCM. Calsarcin1-defiziente Mäuse (in einem gemischten genetischen Hintergrund) aktivieren das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm, ohne dabei einen hypertrophen kardialen Phänotyp zu entwickeln. Die Mäuse entwickeln durch pathologische Hypertrophie-Stimuli, wie eine erhöhte Druckbelastung durch sog. Aortales Banding, interessanterweise eine myokardiale Hypertrophie, nicht jedoch auf pharmakologische Hypertrophie-Stimulation, wie etwa Katecholamine (Isoproterenol). Das Fehlen von Calsarcin-1 sensibilisiert also gegenüber Calcineurin-vermittelter Myokardhypertrophie *in vivo* (Frey et al., 2004). In späteren Versuchen der Arbeitsgruppe wurden die Calsarcin1-„knockout“-Mäuse in einen reinen, genetischen C57/Bl6-Hintergrund gekreuzt und entwickelten daraufhin eine dilatative Kardiomyopathie (Schoensiegel et al., 2007), die (s.o.) in den vorigen Versuchen nicht nachweisbar war. Diese Ergebnisse gaben Anlass zur exakten Charakterisierung des Calsarcin1-„knockout“-Modells.

1.5 MicroRNAs (miRs)

Vor einigen Jahren publizierte die Arbeitsgruppe um V. Ambros die Entdeckung von kleinen RNA-Oligonukleotiden in *C. elegans*, die RNA-RNA-Interaktionen regulieren (Lee et al., 1993). Diese neue Familie von kleinen, nicht codierenden RNAs (microRNAs) mit einer Länge von ungefähr 22 Nukleotiden spielt eine wichtige Rolle in der negativen Genregulation und steuert die Expression von vielen Protein-codierenden Genen (Bartel, 2004). Zurzeit sind über 1000 humane microRNAs (miRs) identifiziert, welche mehr als 545 7-Nukleotid-„seed“-Sequenzen umfassen, die aufgrund ihrer Kürze je hunderte verschiedener mRNAs regulieren (Barringhaus and Zamore, 2009, Mendell and Olson, 2012). Funktionell binden miRs an Proteine der Argonaut-Familie (Ghildiyal and Zamore, 2009) und vermitteln den Translationsstopp von mRNAs auf posttranskriptioneller Ebene (Matranga and Zamore, 2007). Das Vorläufermolekül, die primary miR, wird im Nukleus durch die RNase Drosha zur pre-miR prozessiert, die einen „stem loop“ von ungefähr 100 Nukleotiden aufweist (Bartel, 2004). Die pre-miR wird aus dem Zellkern durch Exportin 5 ins Zytoplasma exportiert, wo sie durch DCR-1 modifiziert wird, um ein Duplex zu generieren, das zwei miRs enthält (Ghildiyal and Zamore, 2009). Die „mature“ oder reife miR wird als Teil eines RNA-induzierten silencing

complex (RISC) (Chendrimada et al., 2007) integriert und reguliert Zielgene durch das Binden an die 3'untranslatierte Region an die komplementäre mRNA.

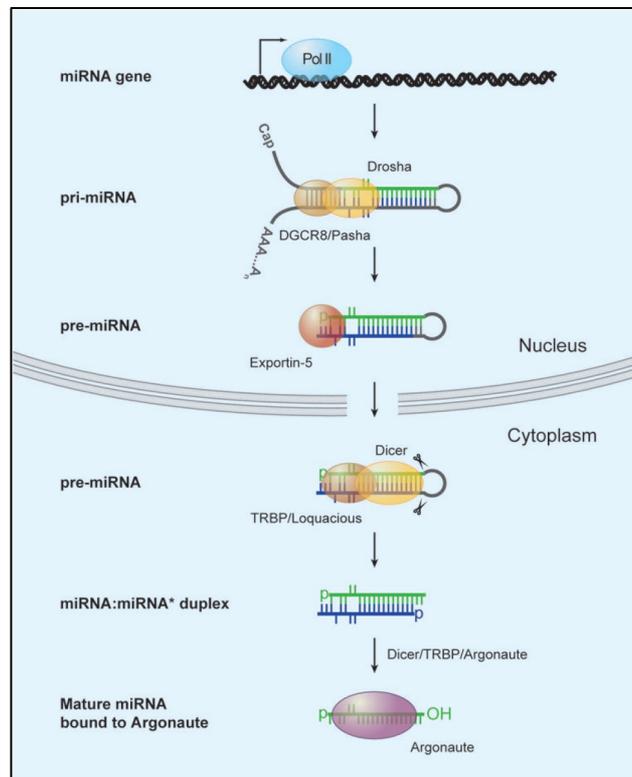


Abbildung 1-3: Reifung der microRNA (Bushati and Cohen, 2007)

1.5.1 Die biologische Funktion der microRNAs

In Säugetieren- und Invertebraten-Genen konnte durch eine TargetScan-Analyse (Identifikation der Ziel-mRNA für spezifische miRs durch Datenbanken) gezeigt werden, dass viele wesentliche Regionen durch miRs kontrolliert werden, und spezifischen miRs zuzuordnen sind (Lewis et al., 2005). Dabei ist für die Identifizierung von Zielgenen der miRs die „seed“-Region von größter Bedeutung (Lewis et al., 2003). MiRs können durch direkte und indirekte Effekte Einfluss auf die Proteinsynthese von tausenden Genen nehmen. Dabei ist sowohl die Hoch- als auch die Herunterregulation möglich. Bestätigt wurde dies durch die Überexpression und den „Knockdown“ von let-7b, welche signifikante Auswirkungen auf die Proteinsynthesen zeigte (Selbach et al., 2008). Auch konnte man bestätigen, dass miRs an kardialen Prozessen beteiligt sind. So ist es bekannt, dass einige miRs, wie die miR-208, Gene und Proteine regulieren, die einen großen Anteil an der Entstehung eines herzinsuffizienten Phänotyps haben (Mann, 2007, van Rooij et al., 2006). Außerdem führen Dysregulationen in miRs zu einer kompensatorischen hypertrophen Antwort, die die Herzleistung erhalten soll (van Rooij et al., 2006).

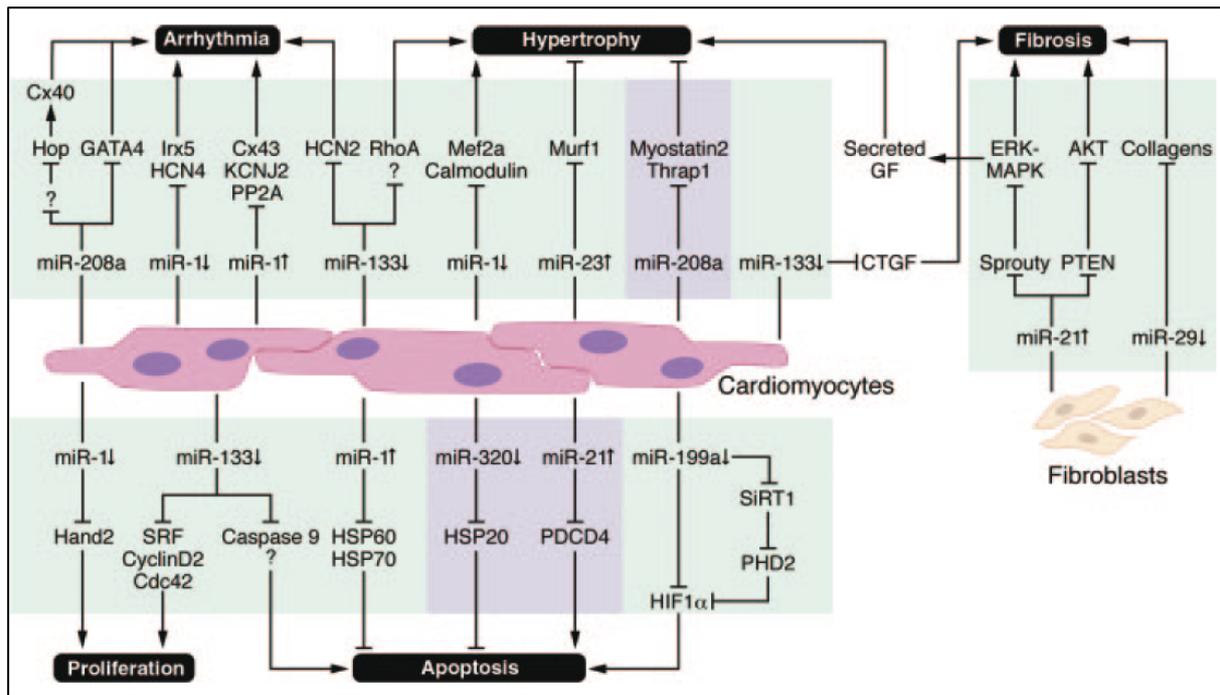


Abbildung 1-4: Bekannte microRNAs und Zielgene in Kardiomyozyten und Fibroblasten (Small et al., 2010)

1.5.2 Kardiale microRNAs

Die ersten Analysen zur differentiellen Regulation von miRs wurden in Tumorzellen durchgeführt. Auffallend ist dabei heutzutage, dass viele miRs, die an der Entstehung kardialer Krankheiten beteiligt sind, auch mit Tumor-Suppressor-Genen assoziiert sind (Kent and Mendell, 2006). 2005 isolierte die Arbeitsgruppe um Eric Olson eine miR aus Drosophila, die kardiale Proliferation und die Kardiogenese beeinflusst. MiR-1 ist mit 40% die am häufigsten exprimierte und identifizierte miR im Herzen (Kwon et al., 2005, Braunwald, 2013).

MiRs haben im Herzen vielfältige Aufgaben, sie beeinflussen Fibrose, Proliferation, Apoptose, Arrhythmien und Hypertrophie (Fiedler and Thum, 2013). Es ist bekannt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen durch Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes, Hyperlipidämie und Bluthochdruck begünstigt werden. MiRs spielen in diesem Krankheitsgeschehen als Modulatoren der Pathogenese dieser Erkrankungen eine große Rolle (Quiat and Olson, 2013). Die Daten der differentiellen Regulation von miRNAs bei kardialer Hypertrophie beruhen auf MicroRNA-Arrays, Sequenzierungen, Northern Blots und vielen anderen molekularbiologischen Methoden.

2007 ist eine hohe Konkordanz zwischen dem miR-Expressionsprogramm in fötalem und herzinsuffizientem kardialen Gewebe aufgefallen und förderte weitere experimentelle Versuche in dieser Richtung. Es wurde gezeigt, dass die fetale miR-Expression bei Herzinsuffizienz die Basis für die Veränderung eines Teils des kardialen Transkriptoms ist

(Thum et al., 2007). Nach aortaler Konstriktion (Aortic-Banding) und damit herbeigeführter kardialer Hypertrophie in einem Maus-Modell war die miR-1 signifikant runterreguliert (Sayed et al., 2007). Außerdem wurde beobachtet, dass die miR-133 in murinen und humanen Modellen der kardialen Hypertrophie vermindert exprimiert wird. Als spezifische Zielstrukturen der miR-133 wurden RhoA, ein Protein, das neben einer Vielzahl weiterer Prozesse kardiale Hypertrophie kontrolliert und Cdc42, eine Signaltransduktionskinase, die ebenfalls in den Prozess der Hypertrophie involviert ist, identifiziert (Care et al., 2007). Andere Quellen verweisen auf die Bedeutung der miR-198 bei der kardialen hypertrophen Entwicklung, die während stress-induzierter kardialer Hypertrophie und bei herzinsuffizienten transgenen Mäusen hochreguliert ist (van Rooij et al., 2006). Eingehend untersucht wurde auch die miR-21, die 7, 14 und 21 Tage nach „aortic Banding“, vierfach höher im Myokard exprimiert war, als in der Kontrollgruppe. Dies bestätigte sich nochmals in kultivierten hypertrophen neonatalen Kardiomyozyten, die durch Angiotensin-II oder Phenylephrin stimuliert wurden (Cheng et al., 2007). In einem anderen Experiment wurde gezeigt, dass die Inhibition von miR-21 und miR-18b das hypertrophe Wachstum steigert (Tatsuguchi et al., 2007). Es wurde festgestellt, dass die Inhibition von miR-21 mit Anti-miR-21 effektiv pulmonale und myokardiale Fibrose inhibiert und die miR-21 bei Herzinsuffizienz in Fibroblasten ansteigt (Thum et al., 2008, Liu et al., 2010). Andere Arbeitsgruppen publizierten kurz darauf, dass die miR-21 keine Rolle in der Entstehung kardialer Krankheiten einnimmt, da keine Veränderung beim Gebrauch der 8-Nukleotid-anti-miR-21 in Bezug auf myokardiale Hypertrophie oder Fibrose beobachtet werden konnte (Patrick et al., 2010). Daraufhin wurden die Unterschiede zwischen den verschiedenen langen chemischen Oligonukleotiden der Anti-miR-21 in einem gleichen Modell verglichen. Es zeigte sich eine bemerkenswerte therapeutische Diskrepanz in den Versuchen. So kam es nur bei der 22-mer anti-miR-21 zu einer 80%igen Hemmung der miR-21, nicht aber beim Einsatz der 8-Nukleotid-anti-miR-21 (Thum et al., 2011). Zusammenfassend scheint die miR-21 nach neuestem Forschungsstand eher in Fibroblasten vorzukommen und die Wirkung ist noch immer Bestandteil einer regen Diskussion.

Auch in der Entwicklung quergestreifter Muskulatur spielen miRs eine entscheidende Rolle. So kommt es durch eine Überexpression von miR-1 während der Herzentwicklung zur Proliferationshemmung in ventrikulären Kardiomyozyten (Zhao et al., 2005) und auch die miR-133, welche auf demselben Chromosomen-Locus liegt, reguliert die Proliferation und Differenzierung der Skelettmuskulatur in Xenopusembryos (Chen et al., 2006). Es stellte sich heraus, dass ein Fehlen der miR-1-2 eine Vielzahl von Funktionen im Herzen beeinflusst, was Reizleitungsdefekte und eine Dysregulation der Kardiogenese und des Zellzyklus zur Folge hat (Zhao et al., 2007). Auf der anderen Seite wirken miRs auch kardioprotektiv, wie u.a. unsere Arbeitsgruppe anhand der antiapoptotischen miR-20a, die ein Teil des miR17-92

Clusters ist, zeigen konnte. Die Überexpression der miR-20a reduziert Hypoxie-induzierte Apoptose in Kardiomyozyten, während der Knockdown von miR-20a Apoptose in NRVCs induziert. Der antiapoptotische Effekt von miR-20a beruht dabei auf der Herunterregulation des proapoptotischen Faktors EglN3 (Frank et al., 2012).

Eine miR-208a-Deletion im „knockout“-Mausmodell verursacht ein pathologisches kardiales Remodeling und eine Heraufregulation von *Myh7* als Antwort auf eine erhöhte Druckbelastung (Montgomery et al., 2011). Nach Myokardinfarkt ist die Familie der miR-29 im Narbengebiet runterreguliert und involviert bei der Codierung von Proteinen für fibrotische Veränderungen (van Rooij et al., 2008). Die Überexpression der miR-29 verringert das Ausmaß der Narbenbildung. Zusammenfassend haben miRs vielfältige Aufgabenbereiche am Herzen und bei der Entstehung von kardialen Erkrankungen. Deshalb ist auch eine Beteiligung von miRs an der Pathogenese der DCM denkbar.

1.5.3 Rolle der microRNAs bei der Entstehung einer DCM

Viele kardiale Erkrankungen haben eine gemeinsame Endstrecke - das apoptotische Absterben der Kardiomyozyten verbunden mit pathologischem Remodeling und wenigen Reparaturmechanismen. MiRs sind involviert in die Reparaturmechanismen und so ist es nicht verwunderlich, dass pathologische Prozesse auch Auswirkungen auf die Expression von miRs haben.

DGCR8 ist ein ds-RNA-bindendes Partnerprotein von der RNAse III (Drosha), welches eine wichtige Rolle bei der Prozessierung der pri-miR zur precursor miR im Zellkern einnimmt (Rao et al., 2009). Die Kardiomyozyten-spezifische Deletion von *dgcr8* zeigt z.B. die Entstehung eines kardialen Phänotyps mit linksventrikulärer Dysfunktion, einer DCM und frühzeitig auftretender Letalität.

Welche Bewandnis miRs in der Entwicklung der DCM haben kann, zeigt sich durch einige aktuelle Publikationen. So hat der herzspezifische „Knockdown“ der RNAse III Dicer, die essentiell für die Prozessierung von miRs ist, zur Folge, dass es zu einem raschen Verlauf von DCM und Herzinsuffizienz und dadurch zu einer hohen postnatalen Letalität kommt (Chen et al., 2008). Modifikationen in der Biogenese von miRs führen also zu Veränderungen der myokardialen Funktion und Morphologie (da Costa Martins et al., 2008). Aber nicht nur in Tier-Modellen konnte die differenzielle Regulierung bestätigt werden, sondern auch in klinischen Studien, in denen Patienten mit DCM (n=25) und ICM (n=19) Proben vom linken Ventrikel entnommen wurden und auf differenziell regulierte miRs untersucht wurden. Dabei wurden acht regulierte miRs gefunden. Die stärkste negative Regulation wurde bei der miR-19a/b detektiert (Ikeda et al., 2007). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Veränderungen von miRs am Herzen zu pathologischen Prozessen und der

Entwicklung einer DCM führen können. Des Weiteren müssen nun differentiell regulierte miRs detektiert werden, die hierbei eine Rolle spielen könnten.

1.5.4 AntagomiRs/AntimiRs

Derzeit gibt es mehrere Methoden miRs *in vivo* mit komplementären, synthetischen Oligonukleotiden, die gegen die jeweilige Seed-Sequenz gerichtet sind, zu inhibieren. Eine Möglichkeit zur Herunterregulation von miRs sind AntagomiRs, welche durch Cholesterin-Modifikationen eine hohe Stabilität aufweisen. Die chemisch modifizierten AntimiRs hingegen gehören der LNA-Familie an, weshalb die Stabilität durch eine thermodynamische Duplexformation mit der komplementären RNA gewährleistet wird (Thum, 2012).

Die Herstellung von chemisch modifizierten Oligonukleotiden, der sog. AntagomiRs im Jahr 2005 war ein großer Schritt hin zu therapeutischen Ansätzen im Feld der miRs.

Die AntagomiRs sind in der Lage effizient und spezifisch die Wirkung endogener miRs abzuschwächen. Die intravenöse Gabe der AntimiRs korreliert mit einer Reduktion der jeweiligen endogenen miR in diversen Organen, aber auch die subkutane Gabe führt zur nachweisbaren Senkungen der jeweiligen miR im Plasma und Organen (Krutzfeldt et al., 2005, Montgomery et al., 2011).

Die pharmakologische Methode der Anti-miRs basiert auf der Antagonisierung mittels seed-targeting-8-mer LNA Oligonukleotiden, die durch Transfektion in Zellen aufgenommen werden und dort zur Überexpression des dazugehörigen Targets führen. Auch gibt es Methoden mit längeren hochspezifischen 22- und 15-Nukleotid-anti-miRs (Thum et al., 2011).

Die endogene Hochregulation der tiny LNAs wurde in Brusttumoren von Mäusen beobachtet (Obad et al., 2011). Als Fazit kann formuliert werden, dass der Gebrauch von AntimiRs und AntagomiRs heutzutage effektiv und somit ein guter therapeutischer Ansatzpunkt ist.

1.5.5 Therapeutische Ansätze mit microRNAs

Viele Forschungsansätze zur Behandlung kardialer Erkrankungen werden zurzeit als neue therapeutische Behandlungsstrategien betrachtet, um die Versorgung durch die zunehmenden Risikofaktoren der heutigen Gesellschaft entstehenden kardialen Erkrankungen zu optimieren. So sind kardiale Regeneration durch Stammzellen/Progenitorzellen (Anversa et al., 2013), neue Medikamente zur Wiederherstellung eines normalen Calcium-Zyklus (Marks, 2013) und die Rolle der inflammatorischen Artherosklerose (Lichtman et al., 2013) nur wenige von neuen Behandlungsmöglichkeiten. Besondere Aufmerksamkeit wird den Therapieversuchen mit miRs bzw. AntimiRs gewidmet. Es bleibt festzuhalten, dass viele neue Therapieoptionen sich in der Klinik etablieren werden, um die kardialen Todesursachen einzudämmen (Braunwald,

2013). Da miRs von Zellen aufgenommen und abgegeben werden können, zirkulieren sie im Blut und werden interessant für die Diagnostik als Biomarker. Es gibt hierzu Studien mit KHK-Patienten, bei denen miR-126-Plasmaspiegel deutlich reduziert waren (Fichtlscherer et al., 2011). Auch andere Arbeitsgruppen zeigen, dass es veränderte Plasmaspiegel von miRs z.B. beim akuten Myokardinfarkt gibt (Vogel et al., 2013).

In vivo Beispiele für die funktionierende therapeutische Inhibition durch subkutane AntimiR-Gabe sind miR-208a (25mg/kg) und miR-199, die als therapeutische Targets bei Herzinsuffizienz die kardiale Funktion verbessern und die Überlebenszeit verlängern (da Costa Martins et al., 2010, Montgomery et al., 2011). Die miR-199 ist im operativ-induzierten kardialen hypertrophen Rattenmodell hochreguliert. MiR-199 ist positiv reguliert über den prohypertrophen Calcineurin/NFAT Signalweg und die Inhibition von Dyrk1. Die Inhibition dieser miR durch eine AntimiR steigert die Expression von Dyrk1 und wendet pathologisches Remodeling ab (da Costa Martins et al., 2010). Dies sind nur einige Beispiele für die Potenz der AntimiRs als Therapeutikum während der Progression von Herzerkrankungen.

Auch in die Entstehung von fibrotischen Veränderungen kann eingegriffen werden. Die Überexpression von miR-29 lässt Fibroblasten weniger Kollagen synthetisieren und ist somit eine Option zur therapeutischen Vermeidung von kardialen Umbauprozessen (van Rooij et al., 2008). Wegweisend ist auch der erste therapeutische Einsatz von AntimiR-122 bei Primaten. MiR-122 ist essentiell für die Akkumulation der Hepatitis-C-RNA und die Antagonisierung mit 3x tägl. 10mg/kg AntimiR bei chronisch infizierten Schimpansen zeigte eine effiziente Suppression der Viruslast und eine Abschwächung der „mature“ miR-122 ohne Resistenzbildung oder Nebenwirkungen (Elmen et al., 2008, Lanford et al., 2010). Insgesamt wird der Einsatz der miR-Applikationen als sehr vielversprechend eingestuft, auch wenn vorher unbedingt die vollständige Funktion der einzelnen miRs analysiert werden muss. Eine unerwünschte Wirkung ist bei AntimiR-15 aufgefallen, zwar hat sie eine positive Wirkung auf die kardialen Reparaturmechanismen nach Myokardinfarkt durch die Proliferation von Kardiomyozyten, fördert aber nach längerer Gabe auch die Entstehung von Neoplasien. Trotz allem sind die miRs beteiligt an der Entstehung kardiovaskulärer Risikofaktoren und somit überwiegen die Vorteile für die Therapie und Behandlung der Pathogenese der kardialen Erkrankungen (Quiat and Olson, 2013). Abschließend lässt sich sagen, dass es einige positive Beispiele beim therapeutischen Einsatz von miRs und AntimiRs gibt, sodass hier viel Potential für die Behandlung kardialer Erkrankungen besteht.

1.6. Fragestellung der Arbeit

Die angeborene DCM ist der häufigste Grund nach dem ersten Lebensjahr für die Durchführung einer Herztransplantation bei Kindern und neben der Koronaren Herzkrankheit und der arteriellen Hypertonie ein häufiger Grund für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz

in allen Altersgruppen (Alvarez et al., 2011). Zwar wurden in den letzten Jahren einige Mechanismen der Pathogenese der DCM aufgedeckt, trotz allem gibt es Lücken im vollständigen Verständnis dieser Vorgänge. Um die Signalwege, die zur fortschreitenden Dilatation des linken Ventrikels führen, besser zu verstehen, scheint es zielführend zu sein, die Rolle von miRs in diesem Prozess aufzuschlüsseln.

In Vorversuchen der Arbeitsgruppe entwickelten Calsarcin-1-„knockout“-Mäuse, die in einen genetischen C57Bl/6-Hintergrund gekreuzt wurden, eine dilatative Kardiomyopathie (Schoensiegel et al., 2007), die (s.o.) in einem gemischten genetischen Hintergrund nicht nachweisbar war. Ziel der vorgelegten Arbeit war es nun, diese Tiere einem genomweiten microRNA-microarray-Experiment zu unterziehen, um den Mechanismus der Entwicklung der DCM auf diesem Wege möglicherweise weiter aufklären zu können. Einige differentiell regulierte microRNAs sollten in einem neuen unabhängigen Mauskollektiv verifiziert werden. Der Arbeitsplan dieser Dissertation beinhaltet die Analyse der Morphometrie, der Echokardiographie, der Präparation von RNA und Proteinen aus Mäusemyokard und die Bestätigung differentiell regulierter miRs mittels TaqMan-Real-time-PCR. Anschließend sollen vielversprechende, in der DCM regulierte miRs, in entsprechende Expressionsvektoren von Adenoviren kloniert werden und *in vitro* zur Überexpression in neonatalen Kardiomyozyten experimentell genutzt werden. Untersuchungen dieser neonatalen Kardiomyozyten nach Überexpression und „Knockdown“ mittels LNA-antimiRs zur Herunterregulation endogener miRs sollen in Abhängigkeit hypertropher Stimuli, wie Phenylephrin, die biologischen Effekte dieser miRs nachvollziehbar machen. Zur Durchführung dieser Ziele werden morphologische Zellanalysen, molekulare Analysen auf RNA-Ebene für Hypertrophie-Marker (*ANF* und *BNP*) und molekulare Analysen auf Protein-Ebene untersucht. Wir erhoffen uns von dieser Arbeit ein besseres Verständnis für die Beteiligung der miRs bei der Entwicklung der DCM zu erlangen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Adhesive clear qPCR seals, Sheets	Biozym Scientific GmbH
Agarplatten	Sarstedt
Axiovert 40 CFL mit HBO50	Zeiss
Branson 2200 Ultrasonic Cleaner	Polzin Laborbedarf
BZ-9000	Keyence
Culture Flasche 75cm ² , 175cm ²	Sarstedt
Culture Platte cellstar 24/12/6 Well	greiner bio-one
Deckgläser	Menzel Gläser
Duomax 1030	Heidolph
Elektroporations-Küvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH
Fireboy	IBS Integra Biosciences
FlourChemQ	Alpha-Innotech
Galaxy Mini Star Centrifuge	VWR
Gefrierschrank -80° REVCO ULTIMA PLUS	Thermo Scientific
Heracell 240 i	Thermo Scientific
Heraus Multifuge X3R centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus PICO21 Centrifuge	Thermo Electron Corporation
Hera safe	Thermo Scientific
High Performance Ultraviolett- Transilluminator	UVP
Infinite M200	PRO-TECAN
Inkubator 37°C	Heraeus Instruments
Inkubator steri cult 200	Labotect
MAX Q 8000	Thermo Scientific
Megafuge 16R	Thermo Scientific
Micro Pulser	Bio-Rad
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskop MZ 6	Leica
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories
MultimagIII®	Alpha Innotech

Multipipette® plus	Eppendorf
My Cycler	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth
Objektträger	SUPE RIOR MARIENFELD
Paramix (Vortexer)	inlabo
Parafilm „M“	Laboratory Film
Paramix Labortechnik II	Julabo Labortechnik GmbH
Pasteurpipetten 230mm	ROTH
PCR Platte 96 well, farblos	Biozym Scientific GmbH
Personal cycler	Biometra®
Power Pack Basic /HC	Bio-Rad
Power PackP25	Biometra®
Pipette automatisch Research pro 5-100µl	Eppendorf
Pipetten, manuell	Eppendorf
Pipetten, manuell	GILSON
Pipette, serologische 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarsstedt
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
RCT basic safety control	IKA®
Röhrchen 14 ml, 50 ml	BD Falcon
Safe Seal microtube 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Spectrophotometer Nanodrop	peqLab Biotechnologie GmbH
Sterilm Gard Hood	The Baker Company
Stretcher Flexlink	SHEL-LAB
Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Sub-Cell GT Wide Mini	Bio-Rad Laboratories
Superfrost-Plus Menzel Gläser	Thermo Scientific
System VX-65 (Autoklav)	Systemc
System DB-23 (Autoklav)	Systemc
Tetramax 100	Heidolph
Thermal Cycler C1000™	Bio-Rad Laboratories
Thermomixer comfort	Eppendorf
Variomag Poly	Thermo Scientific
Vacunsafe comfort	IBS INTEGRA BIO SCIENCES
Vivid 7 pro	Dräger
Vortex-Genie2	Scientific Industries
Wasserbad GFL	Polizin Laborbedarf

Zentrifuge 5810	Eppendorf
Zentrifuge Fresco 21	Thermo scientific
Zentrifuge Galaxy Mini star	VWR

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym
Albumin fraction V	Merck
Ammonium persulfat (APS)	Carl Roth
Bis-Tris	Carl Roth
Collagenase Type 2	Cell Systems Biotechnologie Vertrieb
Collagen, Bovine, Type1	BD BioScience
Collagen Solution	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Carbenicillin	Carl Roth
Dapi	Invitrogen
DMEM	Invitrogen gibco
Endothelin1	Sigma
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Fetal Bovine Serum	Biochrom
Foetales Kälberserum	PAA-Laboratories
Glycerin	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Kanamycin	Sigma
L-Glutamine	Invitrogen gibco
Methanol ROTIPURAN	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
MgSO ₄	Thermo Scientific
NatriumAcetat	Carl Roth
New born calf serum	Invitrogen
Qiazol®Lysis Reagent	Qiagen
30% PEG/MgCl ₂ Solution	Invitrogen
Pancreatin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Gibco
Percoll	GE Healthcare
Phenylephrinehydrochloride	Sigma-Aldrich
Ponceau Solution	Sigma-Aldrich

Protein Assay	BioRad
Roti® P/C/I	Carl Roth
Rotiphorese®Gel 30	Carl Roth
Spectinomycin	Sigma
N,N,N,N-tetramethylethylenediamine	Carl Roth
Tissue-Tek Compound	Sakura
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Trypan blue Solution	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH

2.1.3 Enzyme

Dream Taq DNA Polymerase	Fermentas
Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
MscI (Restriktionsenzym)	Fermentas
PacI (Restriktionsenzym)	New England Biolabs
Proteinase K	Invitrogen
TaqDNA Polymerase	Invitrogen

2.1.4 Antikörper

Anti alpha Actinin (mouse)	Sigma-Aldrich
Anti-Ad.Virus (goat) FITC-konjugiert	Meridian
Anti-Calcipressin 1 Rabbit polyclonal	Abcam
Anti-Hexon-Antikörper (FITC-gekoppelt)	Sigma-Aldrich
Anti-mouse GAPDH	Sigma-Aldrich
Anti-goat IgG- HRP- konjugiert (donkey)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MCIP (rabbit)	nicht kommerziell
Anti-mouse IgG HRP-konjugiert (goat)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-mouse CY3	Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit IgG HRP-konjugiert (donkey)	Santa Cruz Biotechnology
Anti alpha Tubulin (mouse, monoklonal)	Sigma-Aldrich
Lectin from Tritium vulgaris FICT-konjugiert	Sigma-Aldrich

2.1.5 Kits

Amersham ECL Plus Western Blotting-Detection System	GE Healthcare
Express SYBER Green ER	Invitrogen

IQ™ Multiplex Powermix	Bio Rad
Lipofectamine LTX and Plus™ Reagent	Invitrogen
Lipofectamine RNAiMax	LifeTechnologies
NucleoSpin ^R Plasmid (DNA, RNA and protein purification)	Machery-Nagel
Plasmid Maxi Kit 25	Qiagen
Plasmid Midi Kit 100	Qiagen
Plasmid Mini Kit 100	Qiagen
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen
TaqMan® MICRO-RNA Reverse Transcription Kit	Invitrogen

2.1.6 Oligonukleotide

Primer für die Realtime-PCR (Eurofins MWG Operon)

qPCR_Rn18s_66_f	5'-GCA-CGG-CCG-GTA-CAG-TGA-AA-3'
qPCR_Rn18s_188_r	5'-GCG-CCC-GTC-GGC-ATG-TAT-TA-3'
RPL32mr_165_R	5'-CCG-CAC-CCT-GTT-GTC-AAT-GC-3'
RPL32mr_165_F	5'-GGT-GGC-TGC-CAT-GTG-TTT-TAC-G-3'
qPCR Myh7 f	5'-GCA-GCA-GTT-GGA-TGA-GCC-ACT-3'
qPCR Myh7 r	5'-TCG-GTG-CCT-GAA-GCT-CCT-TG-3'
qPCRmNppa109	5'-CCC-TGG-GCT-TCT-TCC-TCG-TCT-T-3'
qPCRmNppa229	5'-TCC-AGG-TGG-TCT-AGC-AGG-TTC-TTG-3'
qPCRmNppb635	5'-CAC-TTC-AAA-GGT-GGT-CCC-AGA-GC-3'
qPCRmNppb519	5'-GTC-GTT-TGG-GCT-GTA-ACG-CAC-T-3'
RCAN1m_32F	5'-TCC-AGC-TTG-GGC-TTG-ACT-GAG-3'
RCAN1m_273R	5'-TGC-TGA-AGT-TTA-TCC-GGA-CAC-GT-3'
MYH7r_135_F	5'-CAA-GCA-GCA-GTT-GGA-TGA-GCC-3'
MYH7r_135_R	5'-TCC-TCG-ATG-CGT-GCC-TGA-AG-3'
NPPAr_128_F	5'-AAA-CTG-AGG-GCT-CTG-CTG-GC-3'
NPPAr_128_R	5'-GGC-TGT-TAT-CTT-CGG-TAC-CGG-AAG-3'
NPPBr_124_F	5'-TCCGGA-TCC-AGG-AGA-GAC-TTC-G-3'
NPPBr_124_R	5'-TCC-TAA-AAC-AAC-CTC-AGC-CCG-TC-3'
RCAN1_124_F	5'-CCT-GTG-TGG-CAA-ACG-GTG-ATG-3'
RCAN1_124_R	5'-ATT-CGG-ACA-CGC-TTG-AAG-CTC-3'

Oligonukleotide für die Gateway Klonierungen (Eurofins MWG Operon)

Rno_298_5p_top 5'-TGC-TGG-GCA-GAG-GAG-GGC-TGT-TCT-
TCC-CGT-TTT-GGC-CAC-TGA-CTG-ACG-GGA-
AGA-AGC-CCT-CCT-CTG-CC-3'

Rno_298_5p_bottom 5'-CCT-GGG-CAG-AGG-AGG-GCT-TCT-TCC-CGT
-CAG-TCA-GTG-GCC-AAA-ACG-GGA-AGA-ACA-
GCC-CTC-CTC-TGC-CC-3'

Rno_31*_top 5'-TGC-TGT-GCT-ATG-CCA-ACA-TAT-TGC-CAT-
T-TTT-GGC-CAC-TGA-CTG-ACG-ATG-GCA-
ATG-TTG-GCA-TAG-CA-3'

Rno_31*_bottom 5'-CCT-GTG-CTA-TGC-CAT-TGC-CAT-CGT-CAG-
TCA-GTG-GCC-AAA-ACG-ATG-GCA-ATA-TGT-
TGG-CAT-AGC-AC-3'

Rno_742*_top 5'-TGC-TGT-ACT-CAC-ATG-GTT-GCT-AAT-CAG-
TTT-TGG-CCA-CTG-ACT-GAC-TGA-TTA-GCC-
CAT-GTG-AGT-A-3'

Rno_742*_bottom 5'-CCT-GTA-CTC-ACA-TGG-GCT-AAT-CAG-TCA-
GTC-AGT-GGC-CAA-AAC-TGA-TTA-GCA-ACC-
ATG-TGA-GTA-C-3'

Rno_872*_top 5'-TGC-TGT-GAA-CTA-TTG-CAG-TAG-CCT-CCT-
GTT-TTG-GCC-ACT-GAC-TGA-CAG-GAG-GCT-
TGC-AAT-AGT-TCA-3'

Rno_872*_bottom 5'-CCT-GTG-AAC-TAT-TGC-AAG-CCT-CCT-GTC-
AGT-CAG-TGT-CCA-AAA-CAG-GAG-GCT-ACT-
GCA-ATA-GTT-CAC-3'

Mh_362-3p_top 5'-TGC-TGA-ACA-CAC-CTA-TTC-AAG-GAT-
TCA-GTT-TTG-GCC-ACT-GAC-TGA-CTG-AAT-
CCT-AAT-AGG-TGT-GTT-3'

Mh_362-3p_bottom 5'-CCT-GAA-CAC-ACC-TAT-TAG-GAT-TCA-GTC-
AGT-CAG-TGG-CCA-AAA-CTG-AAT-CCT-TGA-
ATA-GGT-GTG-TTC-3'

Rno_miR-301a_t 5'-TGTGcagtgcaatagtattgtcaaagcGTTTTGGCCACT
GACTGACgctttgacaataactattgcactg-3'

Rno_mir-301a_b 5'-CCTGcagtgcaatagtattgtcaaagcGTCAGTCAGTG
GCCAAAACgctttgacaataactattgcactgC-3'

miRCURY LNA microRNA Power Inhibitor Control (Exiqon)
hsa-mir-301a (microRNA Inhibitor und Power Inhibitor)
mmu-mir-298
negative control

TaqMan Micro RNA Assays

Mmu-mir-298, mmu-mir-31*, hsa-mir-301, hsa-mir-19a, hsa mir-19b, mmu-mir-362-3p, mmu-mir-872*, mmu-mir-742*, hsa-mir-299-5p, mmu-mir-465-5p, hsa-mir-29b, hsa-mir-29c, hsa-mir-29a, mmu-mir-679, hsa-mir-296-3p

MiRNA mimics von LifeTechnologies für miR 301-a

2.1.7 Vektoren/ Plasmide

pAd/CMV/V5-Dest	Invitrogen
pcDNA6.2-GW/miR	Invitrogen
pDONR 201	Invitrogen
pDONR 221	Invitrogen

2.1.8 Puffer und Lösungen

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

DNA-Ladepuffer (6x konzentriert) von Fermentas

1kb DNA Ladder (Gene Ruler) von Fermentas

Plus DNA Ladder (Gene Ruler) von Fermentas

DreamTaq Green Buffer von Thermo Scientific

ELB-Puffer

50 mM HEPES pH 7,0

250 mM NaCl

5 mM EDTA

0,1 % (v/v) NP-40

1 mM DTT (Dithiothreitol)

1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

4 % (v/v) Protease-Inhibitor (Roche)

Kernlysepuffer

1 M Tris

5 M NaCl

1 M MgCl₂

1 % Triton x

Vor Gebrauch Zugabe von: Phosphatase Inhibitor 1

Phosphatase Inhibitor 2

Proteinase Inhibitor 25x

1 M 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

Page Ruler™ Plus, Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

PBS (Dublecco's PBS von PAA)

Pfu Buffer 10x von Fermentas

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

RIPA-Puffer

1 % (v/v) NP-40

1 % (w/v) Natriumdesoxycholat

0,1 % (w/v) SDS

150 mM NaCl

10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2

4 % (v/v) Protease-Inhibitor

1 mM DTT

Ggf. jeweils 1 % (v/v) Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1 und 2 hinzufügen

Sammelgelpuffer

500 nM TRIS

0,4 % SDS

pH 6,8

TAE-Puffer

2 M Tris Base 242 g

Eisessig 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

2.1.9 Medien

Medien zur Bakterienkultur

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

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

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

Medien zur Zellkultur

Die Medien für die Zellkultur wurden vor Gebrauch 30 min im Wasserbad bei 37°C warmgestellt und bei 4°C gelagert.

Serumfreies Medium

DMEM High Glucose (4,5 g/l) von PAA Laboratories

100 U/l Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

10 % FCS Gold (Fetal bovine Serum) von Biochrom

Serumhaltiges Medium

DMEM High Glucose (4,5 g/l) von PAA Laboratories

100 U/l Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

Transfektionsmedium

DMEM High Glucose (4,5 g/l) von PAA Laboratories

2 mM L-Glutamin

2.1.10 Zelllinien

HEK-Zellen 293A (Human Embryonic Kidney)

HEK-Zellen vom Typ 293A sind humane embryonale Nierenzellen. Diese Zelllinie wurde eingesetzt, da sie im Vergleich zu anderen Zellreihen leicht zu kultivieren ist. Durch Transformation mit einem humanen Adenovirus Typ 5 kann die Zelle Anteile des viralen Genoms aufnehmen. Es wurde ausschließlich mit HEK A gearbeitet. Diese Variante exprimiert adenovirale E1-Proteine, was besonders gut geeignet für die Amplifikation und Herstellung von rekombinanten Adenovirus-Konstrukten ist. Diese Zelllinie lässt sich am besten in serumfreiem Medium kultivieren.

2.1.11 Versuchstiere

Mäuse (*Mus musculus*)

Die Calsarcin1-„knockout“-Mäuse im genetischen C57Bl/6-Hintergrund wurden in Dallas (USA) von Prof. Dr. N. Frey und seiner Arbeitsgruppe generiert.

Ratten (*Rattus norvegicus*)

Zur Gewinnung der Kardiomyozyten wurden 1-3 Tage alte Ratten vom Wistar-Stamm genutzt. Ein normaler Wurf brachte 10-12 Tiere hervor. Die Tiere wurden bei Charles River Laboratories bestellt und im Tierstall der Universitätsklinik Kiel verpaart.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Transformation von elektrokompetenten E.coli Bakterien durch Elektroporation

Bei den elektrokompetenten Bakterienzellen (E.coli DH10B oder TOP10) wurde mittels Elektroporation die Zellmembran vorübergehend permeabilisiert, um gewünschte Plasmide in die Zellen einzuschleusen. Dafür wurden 3 µl Ligationsansatz mit enthaltenem Vektor mit 80 µl E.coli-Bakterien gemischt und in eine gekühlte Küvette gegeben. Die Küvette wurde in den Micro Pulser gestellt und erhielt einen Elektroschock für ca. 2 ms mit 4,2 V. Anschließend wurden die Bakterien in einem antibiotikahaltigen Flüssigmedium kultiviert.

Herstellung von Agarplatten

Zur Herstellung der Agar-Nährböden wurde LB-Medium mit 1,5 % Agarpulver angesetzt und nach ausreichender Durchmischung autoklaviert. Sobald das Medium auf 60°C abgekühlt war, wurde es unter einer sterilen Werkbank mit Antibiotika behandelt und in Petrischalen gegossen. Die Schalen kühlten bei Raumtemperatur aus und wurden anschließend bei 4°C kopfüber gelagert, damit das Kondenswasser abtropfen konnte.

Anzucht von Bakterien auf Agar-Nährböden

Zur Überprüfung der Plasmid-Aufnahme der transformierten Bakterien wurden diese auf Selektivnährböden mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen. So konnte gewährleistet werden, dass nur die Bakterien mit aufgenommenen Plasmiden, die demnach über Antibiotika-Resistenzen verfügten, in der Lage waren zu wachsen. Dafür wurden 50-250 µl des Transformationsansatzes der E.coli Bakterien durch Ausstreichen mit abgeflamten Glasstäben auf den Agarplatten verteilt. Die Nährböden wurden bei 37°C über Nacht inkubiert, damit ein optimales Bakterienwachstum stattfinden konnte. Am nächsten Morgen wurden die Bakterienklone mit einer Pipettenspitze geerntet und in 5 ml Flüssigmedium hochgezogen.

Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen

Zur Proliferation der transformierten Bakterien wurde eine Flüssigkultur aus LB-Medium verwendet, die mit entsprechendem Antibiotikum beimpft wurde. Ein Bakterienklon wurde in 5 ml Medium über Nacht bei 37°C und 225 U/min hochgezogen. Die Plasmid-Isolierung wurde am nächsten Tag durchgeführt.

2.2.2 Kultur und Behandlung von neonatalen Kardiomyozyten

Allgemeines

Die kultivierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es wurde mit den NRVCMS ausschließlich unter der Sicherheitswerkbank gearbeitet, um eine Kontamination zu vermeiden. Es wurden Kulturgefäße mit 75 cm² und 175 cm² Grundfläche verwendet sowie Kulturplatten mit 6, 12 oder 24 Wells. Die Gefäße wurden 24 h vor Gebrauch kollagenisiert (Ausnahme: bereits beschichtete Stretchplatten), um eine bessere Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Dafür wurde Kollagen-1 (10:1) in 1x ADS-Puffer verdünnt. Für eine sechs-Well-Platte wurde 1 ml Kollagenlösung benötigt. Die angesetzte Lösung konnte dreimal zum Einsatz kommen.

NRVCM-Präparation (Neonatal rat ventricular cardiac myocytes)

Für die NRVCM-Präparation wurden 1-3 Tage alte Ratten vom Wistar-Stamm verwendet. Zur Reinigung wurden Kopf und Brust der Ratten in Ethanol getaucht. Die Tiere wurden mit Hilfe einer Schere dekapitiert und der Brustkorb wurde entlang des Sternums eröffnet, um durch leichten Druck auf den Thorax das Herz zu entnehmen. Das Herz wurde dann schnell in ADS-Puffer in eine Petrischale auf Eis gegeben. Nun wurde mit den Herzen unter der sterilen Werkbank (Bench/Hood) weiter gearbeitet. Die Herzen wurden so präpariert, dass nur noch die Ventrikel übrig blieben (Gefäße, Vorhöfe, Lunge und Bindegewebe wurden entfernt), die in frische ADS-Lösung überführt wurden. Die Lösung wurde abgenommen und die Ventrikel wurden mit der Schere zerkleinert. Das Gewebe wurde in vorgewärmter, adäquater Menge Verdauungslösung aufgenommen. Für 100 ml Verdauungslösung benötigte man 0,6 mg/ml Pankreatin (gelagert bei -20°C) und 0,5 mg/ml Collagenase Type 2 (gelagert bei 4°C), die in 1x ADS-Puffer aufgelöst wurden. Die Lösung wurde unmittelbar vor der Präparation hergestellt und steril abfiltriert. 18-20 ml Verdauungslösung wurden für 24 Tiere verwendet. Ab 40 Tieren empfiehlt es sich den Verdauungsansatz auf zwei kleinere Zellkulturflaschen aufzuteilen. Bei 37°C wurden die Flaschen 20 Minuten im Wasserbad geschüttelt. Für die erste Abnahme des Verdauungsansatzes wurden die Flaschen desinfiziert, abgetrocknet und unter der sterilen Werkbank auf die Kante gestellt bis sich das Gewebe unten sammelte. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Frische Verdauungslösung wurde zu dem Gewebe gegeben und wieder für 20 Minuten ins Schüttelbad gestellt. Bei der zweiten Abnahme der Verdauungslösung wurde der Überstand mit einer sterilen Pipette abgenommen und durch einen sterilen Filter pipettiert. Der Filter wurde mit 10 ml NCS (New calf serum) durchgespült, um die restlichen Kardiomyozyten heraus zu waschen. Das Falcon-Tube (50 ml) mit dem Kardiomyozyten/NCS-Gemisch wurde bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 6 ml NCS resuspendiert und im CO₂-Brutschrank gesammelt. Der Verdauungsansatz wurde wiederholt bis sich das Gewebe vollständig

aufgelöst hatte. Am Ende wurden die Zellpellets zusammengegeben und wieder bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

Die isolierten Zellen wurden als nächstes durch einen Percoll-Gradienten der Dichte nach aufgetrennt, um die Kardiomyozyten noch von Verunreinigungen wie Fibroblasten und Erythrozyten zu trennen.

Während des letzten Verdauschrittes sollten die Gradienten pipettiert werden. Für die Herstellung von vier Percoll-Gradienten wurden 27 ml Percoll + 3 ml 10x ADS als Stock-Solution angesetzt. Um den Top-Layer herzustellen, wurden 9 ml Stock-Solution + 11 ml 1x ADS + Phenolrot gemischt. In 15 ml Falcon-Tubes wurden jeweils 4 ml Top-Layer vorgelegt. Der Bottom-Layer besaß eine größere Dichte. Für die Herstellung wurden 13 ml Stock-Solution zu 7 ml 1x ADS farblos gemischt. Der Bottom-Layer (3 ml) wurde in das 15 ml Falcon Tube auf den Boden durch die Top-Layer-Schicht hindurch gegeben. Bis zum Gebrauch sollten die Gradienten bei 4°C gelagert werden. Das Zellpellet wurde in 1x ADS resuspendiert (je Gradient 2 ml) und dann langsam auf den Gradienten gegeben. Der Gradient wurde 30 min bei 2400 rpm und 4°C zentrifugiert, ohne dass die Zentrifuge am Schluss abbremste. Nach dem Zentrifugieren befanden sich folgende Schichten von oben nach unten im Falcon-Tube:

1. Interphase mit Fibroblasten (Anfang der roten Phase)
2. Interphase mit Kardiomyozyten (Ende der roten Phase)
3. Erythrozytenpellet.

Die obere Phase mit den Fibroblasten wurde bis zur Hälfte der roten Phase abgesaugt und die Interphase mit den Kardiomyozyten wurde in zwei 50 ml Tubes überführt. Die Tubes mit den Kardiomyozyten wurden dann mit kaltem 1x ADS bis auf 50 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur mit 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden gepoolt (vereinigt) und nochmals mit 1x ADS gewaschen. Das Pellet wurde dann in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und auf 40 ml aufgefüllt. Nach der Methode von Neubauer wurden die Kardiomyozyten ausgezählt, indem von der Zellsuspension 25 µl entnommen und 1:1 mit Trypan Blue, welches avitale Zellen blau anfärbt, gemischt wurden. Tote Zellen wurden nicht mit ausgezählt. Zum Zählen wurden 15 µl der Zellsuspension zwischen einem Deckglas und der Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Kardiomyozyten wurden je nach Versuchsplanung in unterschiedlicher Zahl auf die kollagenisierten Platten gegeben und wuchsen für 24 Stunden an. Für Protein-Versuche auf 6-Well-Platten haben sich 1.000.000 Zellen/Well und für RNA-Versuche 750.000 Zellen/Well am besten bewährt.

Infizierung der NRVCs mithilfe von Adenoviren

Versuche mit Adenoviren wurden im S2-Labor durchgeführt. Je nach hergestelltem Virus wurde mit 20-80 ifu gearbeitet. Zuerst wurde der Virustiter bestimmt und verschiedene Testversuche mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden dann mit dem definierten Virusvolumen beimpft. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden

2 ml serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach 48h wurden die Zellen geerntet.

Transfizierung der NRVCMS mithilfe von Anti-micro-RNAs

Die Transfizierung der Kardiomyozyten mit Anti-micro-RNAs wurde mit serum- und antibiotikafreiem Medium durchgeführt. Nach 24h wurden die NRVCMS mit Lipofectamine unter Serumdeprivation transfiziert. Für die Transfektion wurden zwei Ansätze hergestellt. Ansatz 1 bestand aus dem serumfreien Medium mit einer Konzentration von 10 nM der entsprechenden Anti-miR. Im Protokoll der Firma wird eine Konzentration von 50 nM im gesamten Medium empfohlen, da diese Angaben sich aber nicht auf die Arbeit mit Muskelzellen beziehen, wurden die Konzentrationen angepasst. Die Versuche für die Anti-miR-301a wurden nicht mit dem Power-Inhibitor durchgeführt, sodass hier eine Konzentration von 100 pM/well verwendet wurde. Ansatz 2 enthielt serumfreies Medium und Lipofectamine. Für eine 6-Well-Platte wurden insgesamt 2 ml Flüssigkeit pro Well benötigt und 10 µl Lipofectamine eingesetzt. Ansatz 1 musste für 5 min bei RT inkubieren und wurde dann vorsichtig in Ansatz 2 getropft. Der gesamte Ansatz musste nochmals für 20 min inkubieren, bevor er auf die NRVCMS gegeben werden konnte. Nach 24h wurde das lipofectaminehaltige Medium abgesaugt und frisches serumfreies Medium mit Antibiotikum (Spektomycin) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach 48h geerntet.

Überexpression von miRs durch Transfektion mit miRNA mimics

Neben der adenoviralen Überexpression von miRs wurde auch eine andere Methode angewandt, indem die Überexpression durch Transfektion mit miRNA mimics hervorgerufen wurde.

Die verwendeten miRNA mimics wurden von LifeTechnologies hergestellt. Für diesen Versuchsreihe wurden neonatale Kardiomyozyten mittels Lipofectamine RNAiMax (7,5 µl für 6-well) und 5 pmol mimic/well transfiziert. Dieser Ansatz musste zuvor 5 min inkubieren. Die miRNA mimics wurden dann in antibiotikafreien und serumfreiem Medium auf die Kardiomyozyten gegeben und für 4 h transfiziert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und ein neues Medium mit Antibiotikum und ohne FCS auf die Kardiomyozyten gegeben. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Hypertrophiestimulus (5 µM PE) für 48 h behandelt. Darauf folgend wurden die Kardiomyozyten geerntet und die RNA isoliert.

Behandlung der NRVCMS mit Hypertrophie-erzeugenden Reizen

Die NRVCMS wurden mit unterschiedlichen pharmakologischen und mechanischen Methoden stimuliert, um eine Aktivierung des hypertrophen Genprogramms zu erreichen.

1. Pharmakologische Phenylephrin-Stimulation (PE)

Die NRVCMS wurden nach 24h auf serumfreies Medium mit Antibiotikum umgesetzt und je nach durchgeführtem Experiment nach weiteren 48h mit 5-100 μM PE behandelt. Es wurde serumfreies Medium verwendet, da Serum selbst einen Hypertrophie-Stimulus auslösen kann.

2. Pharmakologische Endothelin1-Stimulation

Die NRVCMS wurden nach 24h auf serumfreies Medium mit Antibiotikum umgestellt und nach weiteren 48h mit 200 nM Endothelin1 pharmakologisch behandelt.

3. Biomechanischer „Stretch“ (Dehnung von NRVCMS)

Nach 24h wurden die NRVCMS in serumfreien Medium mit Antibiotikum kultiviert und nach weiteren 24h in den „Stretcher“ gestellt, der die Zellen bei Temperaturen von 37°C und 5 % CO_2 auf 115 %, bei 1 hz über 24h dehnte. Das dazugehörige Computerprogramm heißt Fx5000 V 1.0.

2.2.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit RNA

RNA-Extraktion aus Herzgewebe

Bei dem Umgang mit RNA wurde immer zuerst der Arbeitsplatz mit 70%igem Alkohol gereinigt und grundsätzlich nur RNase (Ribonuklease) freie Materialien und gestopften Pipetten verwendet. Bei der Herstellung von Chemikalien wurde darauf geachtet, dass nur DEPC-behandeltes ddH_2O benutzt wurde. Diese Maßnahmen dienen dazu die ubiquitär vorkommenden RNasen zu entfernen.

Das Mäusemyokard befand sich in 15 ml Falcon Tubes, die bei -80°C gelagert wurden. Für die RNA-Isolierung aus Mäusemyokard wurde die Hälfte des linken Ventrikels (ca. 50 mg) in 1 ml Trizol „Quiazol“ mit Hilfe eines Häckslers (Ultra Turrax) homogenisiert. Danach wurden die Proben in ein 1,5 ml Tube überführt und 5 min bei Raumtemperatur oder 15 min auf Eis inkubiert. Nach jedem Tier wurde der Ultra Turrax mit Ethanol und ddH_2O gereinigt. Auf die homogenisierten Proben wurden 250 μl Chloroform gegeben und die weiteren Schritte der RNA-Isolierung durchgeführt, die denen der RNA-Extraktion aus NRVCMS entsprechen.

RNA-Extraktion aus NRVCMS

Für die RNA-Extraktion wurde das Medium auf den NRVCMS abgesaugt und die 6-Well-Platten zweimal mit PBS gewaschen. Pro Well wurde 1 ml Trizol hinzugegeben, welches 1 min einwirken sollte, um die Zellen vom Boden zu lösen. Die Zellsuspension wurde aufgenommen und in ein 1,5 ml RNase-freies Tube überführt. Optional konnte die Zellen auch bei -80°C eingefroren werden. Es wurden 200 μl Chloroform in jedes Tube gegeben. Wichtig war, dass man nur noch mit RNase-freien Materialien arbeitete. Die Tubes wurden 15 sec

ausgeschüttelt und inkubierten dann für 2-3 min bei Raumtemperatur. Durch die Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12000 rpm wurden die Phasen aufgetrennt. In der oberen klaren Phase befand sich die RNA (ca. 60 %), in der Interphase die Proteine und in der unteren roten Phase die DNA. Die farblose wässrige Phase wurde in ein neues RNase-freies Tube überführt (ca. 500 µl). Nach dieser Proteinentfernung wurde die RNA gefällt. Dazu wurde im Verhältnis 1:1 Isopropanol in die Tubes gegeben, die Flüssigkeiten gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Alternativ konnte die RNA auf für 20-40 min bei -20°C oder über Nacht gefällt werden. Das RNA-Isopropanol-Gemisch wurde für 10 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert, sodass ein weißes Pellet am Boden sichtbar wurde. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zu dem Pellet wurde 1 ml 75%iger Alkohol hinzugefügt und anschließend gevortext. Für die Salzfällung wurde das Tube nochmals für 5 min bei 4°C und 7500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet trocknete für 5-10 min bei Raumtemperatur, indem das Tube auf den Kopf gestellt wurde, bis das Pellet durchsichtig wurde (vorsichtig es sollte nicht austrocknen!). Das Pellet wurde am Schluss in ca. 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen und durch auf- und abpipettieren gelöst. Die RNA konnte bei -80°C gelagert oder photometrisch gemessen werden.

DNA-Verdau und RNA-Aufreinigung

Für den DNase-Verdau mit DNase I (Sigma) und die Phenol-Chloroform-Aufreinigung wurden 5 µg RNA + 1 µg DNase mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit DEPC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt und im Verhältnis 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth) durch Vortexen gemischt. Wichtig hierbei war, dass durch die obere Pufferschicht der Phenol-Chloroform-Lösung hindurchpipettiert und diese nicht mit aufgenommen wurde.

Der Ansatz wurde dann für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml Tube überführt. Zum Fällern wurden 300 µl Ethanol und 10 µl 3M Natriumacetat in DEPC hinzugefügt und gut gemischt. Die höchsten Konzentrationen wurden erreicht, wenn über Nacht bei -20°C gefällt wurde. Anschließend wurde der Ansatz bei 4°C bei und 14.000 rpm 30 min lang zentrifugiert. Das Waschen wurde mit 500 µl 75%igem Ethanol durchgeführt und dann wurde erneut zentrifugiert bei 14.000 rpm, 4°C und 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in einer adäquaten Menge DEPC-H₂O (meistens 10 µl) aufgenommen. Die Konzentration konnte mit 1 µl RNA-Lösung photometrisch bestimmt werden.

cDNA-Synthese mit SuperScriptIII First-Strand Synthesis System (Invitrogen)

Die Umschreibung (Reverse Transkription) der einsträngigen RNA zu doppelsträngiger cDNA wurde mit dem SuperScriptIII First-Strand Synthesis System von Invitrogen in 0,5 ml Tubes durchgeführt.

1. Ansatz

1 µg RNA	max. 12 µl
Random Hexamer Primer (50-250 ng)	0,5 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
mit DEPC-H₂O auffüllen	13,5 µl

Tabelle 2-1: Reaktionsansatz für den Mastermix der cDNA-Synthese mit SuperScriptIII First-Strand Synthesis System (Invitrogen)

Im Biometra Cycler wurde der erste Ansatz 5 min bei 65°C inkubiert, dann mindestens 1 min auf Eis stehengelassen und am Ende abzentrifugiert.

2. Ansatz Mastermix pro Reaktion:

5x First Strand RT-Buffer	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™ III RT (200 units/µl)	0,5 µl
Gesamter Reaktionsansatz	<u>12 µl</u>

Tabelle 2-2: Reaktionsansatz 2 für die cDNA-Synthese mit SuperScriptIII

First-Strand Synthesis System (Invitrogen)

Ansatz 2 wurde zu Ansatz 1 hinzugefügt und vorsichtig vermischt. Der gesamte Reaktionsansatz lief im Biometra Cycler für 10 min bei 25°C, 60 min bei 50°C, 15 min bei 70°C und wurde dann auf Eis inkubiert. Die cDNA wurde mit PCR- H₂O auf 100 µl aufgefüllt (= 10 ng/µl) und für die Realtime-PCR nochmals 1:2 verdünnt.

cDNA-Synthese (Reverse Transkription) für microRNAs (TaqMan)

Die RNA-Proben wurden in einem Extracup auf 10 ng/µl verdünnt. Es sollten ca. 2 µl der Probe eingesetzt werden. Die RNA-Proben wurden mit dem Primer für Reverse Transkription des TaqMan Assays in 0,5 ml Tubes umgeschrieben. Dafür wurden 10-40 ng RNA eingesetzt.

1. Mastermix für einen Reaktionsansatz

dNTP [100 mM]	0,15 µl
Reverse Transcriptase [50 U/µl]	1,00 µl
RT Buffer [10x]	1,50 µl
RNase Inhibitor [20 U/µl]	0,19 µl
Nuclease-freies H₂O	5,16 µl
Gesamter Reaktionsansatz	8,00 µl

Tabelle 2-3: Reaktionsansatz 1 für die cDNA-Synthese mit TaqMan für microRNAs

	10 ng
Mastermix 1	8 µl
Total RNA [10 ng/µl]	4 µl
Gesamter Reaktionsansatz	12 µl

Volumen pro Tube	12 µl
Reverse Transkriptions-Primer	3 µl
Gesamter Reaktionsansatz	15 µl

Tabelle 2-4: Reaktionsansatz 2 für die cDNA-Synthese mit TaqMan für microRNAs

Die microRNA TaqMan Proben der Reversen Transkription wurden im Thermocycler inkubiert: 16.0°C – 30 min, 42.0°C – 30 min, 85.0°C – 5 min und 4.0°C – endlos

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Bestimmung der wässrigen Nukleinsäurekonzentration konnte bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt werden. Die aromatischen Ringe der Basen sind für die Absorption verantwortlich. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Photometer NanoDrop durchgeführt, der die Absorption von Licht bestimmt. 1 µl der Probe wurde

aufgetragen und gemessen. Vor Benutzung des Gerätes wurde der NanoDrop mit 1 µl ddH₂O geblankt (geeicht). Zu beachten war hierbei, dass in der Bedienungssoftware eingestellt wird, ob es sich um RNA oder DNA handelte.

Zur Kontrolle des Reinheitsgrades in Bezug auf die Kontamination mit Proteinen wurde die Extinktion auch noch bei 280 nm gemessen und der Quotient E_{260 nm} / E_{280 nm} bestimmt. Werte unter 2 wurden als saubere Nukleinsäure gewertet.

Realtime-PCR

Die Realtime-PCR wurde für die quantitative Bestimmung der Genexpression auf RNA-Ebene genutzt. Für dieses Verfahren musste im Vorfeld die RNA eines zu untersuchenden Genes in cDNA umgeschrieben werden. Diese cDNA wurde dann amplifiziert und ein Fluoreszenzfarbstoff in die neu synthetisierte doppelsträngige DNA eingebaut, der durch seine Emissionen detektiert werden konnte. Die Stärke des Signals war dabei proportional zur vorliegenden DNA-Menge. Es wurden drei unterschiedliche Verfahren für die quantitative Realtime-PCR eingesetzt:

1. SYBER GreenER qPCR Supermix für Real-time-PCRs

Der SYBER Green Supermix wurde für quantitative Realtime-PCRs verwendet. Der Mastermix enthielt einen Puffer, dNTPs, eine thermostabile Polymerase und SYBER Green dye. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 2-5 zu entnehmen. Es wurden zwei Primer benutzt, die das Target flankierten. In unseren Experimenten waren das die typischen Vertreter des hypertrophen Genprogramms (*Nppa*, *Nppb*, *Myh7* und *RCAN1-4*). Der Mastermix mit den Primern wurde auf eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert (18 µl) und anschließend wurden 2 µl cDNA hinzu gegeben.

Mastermix (MM)	1x
2x SYBRGreenER MM	10 µl
RNase-freies H₂O	7,2 µl
Gesamter Reaktionsansatz	17,20 µl
	1x
MM	17,2 µl
Primer F [10 µM]	0,40 µl
Primer R [10 µM]	0,40 µl
Gesamter Reaktionsansatz	18 µl
	cDNA [5 ng/µl] +2.0 µl/well

Tabelle 2-5: Reaktionsansatz für die quantitative Realtime-PCR mit SYBER GreenER® qPCRSuperMix Universal (Invitrogen)

2. Taq Man microRNA

Die TaqMan®MicroRNA Assays wurden zur Detektion von reifen MicroRNAs entwickelt. Das Assay enthielt miR-spezifische Reverse Transkriptions-Primer (looped primer) forward/reverse (F/R). Nachdem der Reaktionsansatz (siehe Tabelle 2-6) mit den cDNA-Proben auf eine 96-Well-Platte pipettiert wurde, startete die Amplifikation durch die qPCR.

	1x
2x TaqMan Mastermix (MM)	10 µl
RNase-freies H₂O	5 µl
Gesamter Reaktionsansatz	15 µl
	1x
MM	15 µl
miRNA Assay Mix	1 µl
Gesamter Reaktionsansatz	16 µl
RT Produkt (1:1.5)	+4.0 µl/well

Tabelle 2-6: Reaktionsansatz für die quantitative Taq-Man Realtime-PCR

3. IQ™ Multiplex Powermix

Der BioRad iQ Multiplex Powermix wurde angewendet, um mehrere Targets (*Nppa*, *Nppb* und *RCAN1-4*) gleichzeitig in einem Durchlauf der quantitativen Realtime-PCR auswerten zu können. Dafür wurden pro Well 10 µl iQ Powermix (2x), 0.5 µl des Primermixes (10 µM) und 6 µl H₂O zusammen pipettiert. Nach Verteilung der 18 µl pro Well wurden 2 µl cDNA hinzugefügt. Das Cycler Programm lief dann bei 95°C 2 min (Initiale Denaturierung), 15 sec bei 95°C (Denaturierung) und 40 Zyklen für 45 sec bei 60°C (Annealing).

2.2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit DNA

Extraktion von Plasmid-DNA „Mini-Präp“

Die Extraktion von Plasmid-DNA erfolgte aus 2 ml gesättigter E.coli LB-Kultur mit dem Low-copy Protokoll von NucleoSpin®Plasmid. Nach der Kultivierung und Ernte der Bakterien wurde die Bakteriensuspension in ein 2 ml Tube überführt und bei 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Für die Zelllyse wurde der Überstand verworfen und 500 µl vom A1 Buffer durch Resuspension hinzugefügt. Daraufhin kamen 500 µl A2 Buffer hinzu. Es wurde vorsichtig gemischt ohne zu vortexen, um die DNA nicht zu zerstören. Der Ansatz inkubierte dann für 5 min bei RT bevor 600 µl A3 Buffer vorsichtig untergemischt wurden. Zur Reinigung des Lysats

wurde bei RT für 5 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand (700 µl) wurde auf eine Säule gegeben, um die DNA daran zu binden. Die Säule wurde in einem sauberen Tube für 1 min bei 11.000 rpm und RT zentrifugiert. Dieser Schritt konnte bei Bedarf mit dem restlichen klaren Überstand wiederholt werden. Optional wurde die Säule mit 500 µl AW Buffer gewaschen und erneut bei RT für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Als nächstes wurden 600 µl A4 Buffer (enthält Ethanol) auf die Säule gegeben und 1 min bei 11.000 rpm (RT) zentrifugiert. Zum Trocknen der Membran wurde die Säule in ein leeres Tube gestellt und nochmals für 2 min bei RT und 11.000 rpm zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurde ein frisches Tube unter die Säule gestellt und 40 µl AE Buffer, welcher für 1 min einwirken sollte, langsam auf die Membran in der Säule geträufelt. Nach der letzten Zentrifugation (1 min, 11.000 x g, RT) enthielt die aufgefangene Flüssigkeit (der Rückstand) die Plasmid-DNA und es konnte am Photometer die Konzentration bestimmt werden.

Extraktion von Plasmid-DNA „Midi-Präp“

Für die Extraktion von Plasmid-DNA in größerem Umfang wurde das Qiagen Maxi Kit verwendet. E.coli Bakterien mit gewünschtem Plasmid wurden über Nacht in Flüssigkulturen mit LB-Medium hochgezogen. 100 ml Bakterienkultur aus dem Erlenmeyerkolben wurden auf zwei 50 ml Falcon-Tubes aufgeteilt und bei 4°C und 4700 rpm für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit 2 ml 4°C kalten P1 Buffer resuspendiert. Danach wurden 2 ml P2 Buffer hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Inhalte der zwei Falcon-Tubes in ein autoklaviertes Carbon-Röhrchen überführt werden. In einem weiteren Schritt wurden 4 ml P3 Buffer (4°C) unter Schwenken hinzugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Röhrchen im Carbonrotator bei 14500 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Im Überstand befand sich die Plasmid-DNA, die in ein neues Röhrchen überführt wurde. Das neue Röhrchen wurde sofort wieder für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Qiagen-Tip100 pipettiert. Das Qiagen-Tip100 wurde vorher mit 4 ml QBT äquilibriert. Der Überstand im Qiagen-Tip100 tropft aufgrund der Schwerkraft in das darunter gestellte Glasröhrchen. Das Qiagen-Tip wurde danach zweimal mit 10 ml QC Buffer gewaschen und auf ein neues Carbon-Röhrchen gestellt. Die Plasmid-DNA wurde eluiert, indem 5 ml QF Buffer (65°C) auf das Qiagen-Tip100 pipettiert wurden. Es war darauf zu achten, dass vor der Eluierung ein sauberes, neues Carbon-Röhrchen unter das Qiagen-Tip100 gestellt wurde. Des Weiteren wurden 3,5 ml Isopropanol auf die Plasmid-DNA gegeben und für 30 min bei 4°C und 14500 rpm zentrifugiert. Alternativ konnte man hier eine Pause einlegen und das Plasmid bei -20°C wegfrieren. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet am Carbon-Röhrchen markiert und 2 ml 70 % Ethanol hinzugefügt. Erneut wurde das Pellet 10 min bei 14500 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Röhrchen zum Trocknen des Pellets auf den Kopf gestellt.

Das Pellet wurde in einer adäquaten Menge (100 µl) AE bzw. TE Puffer aufgenommen, wenn im nächsten Schritt ein PACI-Verdau folgte.

Nun konnte die Konzentration der Plasmid-DNA mithilfe vom NanoDrop-Photometer ermittelt werden. Bei dieser Methode sollten 500 µg DNA isoliert werden können.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde angewendet, um DNA zu amplifizieren. Zur Amplifizierung wurde ein hitzestabiles Enzym, die Taq-Polymerase eingesetzt. Bei der Herstellung des Reaktionsansatzes (Tabelle 2-7) war darauf zu achten, dass das Enzym die ganze Zeit über auf Eis gelagert wurde. Der Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 25 µl. Die genaue Zusammensetzung musste auf das jeweilige Template angepasst werden. Auch die Anzahl und Länge der Zyklen im ThermoCycler musste je nach Größe des Templates verändert werden. Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit der Primer optimiert (Tabelle 2-8).

H₂O	19,45 µl
10x konzentrierter PCR-Puffer	2,5 µl
dNTPs	1,25 µl
Primer R/F	0,75 µl (2x)
Taq-Polymerase	0,3 µl

Tabelle 2-7: Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	30x
Annealing	59°C	30 sec	30x
Elongation	72°C	30 sec	30x
Final Elongation	72°C	10 min	1x
Kühlung	4°C	∞	1x

Tabelle 2-8: ThermoCycler Programm für die Polymerase-Kettenreaktion

Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Da die DNA negativ geladen ist, kann man sie durch einen elektrischen Strom auftrennen. Zuerst wurde ein 1%iges Agarosegel gegossen, indem das Agarose-Pulver in

180 ml TAE-Puffer durch Erhitzen aufgelöst wurde. Dem Agarosegel wurden 10 µl Ethidiumbromid hinzugefügt, das sich in die DNA einlagerte und sie somit sichtbar machte. Es wurde unter einer Sicherheitswerkbank mit Nitrilhandschuhen gearbeitet, da Ethidiumbromid kanzerogen ist. Das Agarosegel wurde in eine Gelelektrophorese-Kammer gegossen und anschließend wurde ein Taschenkamm platziert. Daraufhin ließ man das Agarosegel 15 min ausgekühlt und dann wurde die Gelkammer mit TAE-Puffer gefüllt. Zu den DNA-Proben wurden 5 µl Ladepuffer hinzugefügt. Der Taschenkamm wurde entfernt und die Taschen mit 25 µl DNA beladen. Neben den DNA-Proben wurden auch 12 µl eines Ladders (100 bp DNA) aufgetragen. Hierbei handelt es sich um einen Größenmarker zur Beurteilung des Molekulargewichtes der DNA-Fragmente. Der elektrische Strom lief dann auf 110 V für ca. 30 min. Die DNA wanderte im elektrischen Feld zum Pluspol und das Ethidiumbromid interkalierte dabei in der DNA. Am Schluss wurde das Gel entnommen und auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

2.2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit Proteinen

Proteinextraktion aus Herzgewebe

Zur Extraktion von Proteinen aus Myokardgewebe von der Hälfte des linken Ventrikels (50-70 mg) wurde 1 ml Kernlysepuffer pro Well verwendet. Diesem wurden in einer Konzentration von 1:100 Phosphatase-Inhibitor I und II, 40 µl Proteinase-Inhibitor und 1 µl DTT (1 M) hinzugefügt. Die Myokardproben lagerten bei -80°C und wurden auch bei der Verarbeitung die ganze Zeit über auf Eis gelegt. Zu jeder Probe wurde 1 ml angesetzter Lysepuffer gegeben und anschließend wurde die Probe mit Hilfe des Ultra-Turrax zerkleinert bis eine homogene Masse entstand. Daraufhin wurden die Myokardproben bei 4°C, 1200 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen in ein neues 1,5 ml Tube überführt.

Proteinextraktion aus NRVCMS

Zur Extraktion von Proteinen aus NRVCMS wurde ein Kernlysepuffer nach internen Laborstandards angesetzt und wie bei der Proteinextraktion aus Myokardgewebe komplementiert. Das Kulturmedium wurde von den NRVCMS abgesaugt. Die Kulturplatten mit den NRVCMS lagerten auf Eis. Die NRVCMS wurden mit eisgekühltem PBS gewaschen und anschließend sehr trocken abgesaugt. Pro Well wurden 100 µl Kernlysepuffer auf die Zellen gegeben, welcher 1 min einwirken sollte. Die NRVCMS im Kernlysepuffer wurden dann mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt und in ein 1,5 ml Tube überführt. Zum Aufknacken der Zellmembran wurden die NRVCMS 15 min in flüssigen Stickstoff gestellt. Sie tauten dann 30 min in einem Thermomixer bei 37°C auf (freeze and thaw). Dieser Vorgang

wurde dreimal wiederholt. Die Proben wurden abzentrifugiert bei 4°C ,14000 rpm, 5 min und der Überstand mit den Proteinen in ein neues Tube überführt. Bis zur Verwendung der Proteinproben konnten diese bei -20°C gelagert werden.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde das BioRad Protein Reagenz 1:5 mit ddH₂O verdünnt und filtriert. Die Lösung konnte im Kühlschrank eine Woche gelagert werden. Von der BSA-Stocklösung wurden Verdünnungen für eine Standardreihe angesetzt, die Proteinkonzentrationen von 2.56, 1.28, 0.64 und 0.32 mg/ml enthielten. Pro Well wurden 2 µl der Proteinprobe vorgelegt und daraufhin 200 µl des verdünnte Bradford-Reagenz mit einer Mehrkanalpipette auf die Microtiterplatte gegeben. Im Platerader mit Schüttelfunktion wurden die Proben auf Stufe 6 für 10 min gemischt. Die Proteinproben wurden im Triplikat gemessen. Der Standard lineare Messbereich lag bei 0.05-0.5 mg/ml. Die Proben mussten manchmal für die Messung im jeweils verwendeten Puffer vorverdünnt werden, um im linearen Messbereich zu bleiben. Die Methode nach Bradford basiert auf einer Messung der Extinktionsveränderung bei 595 nm im Spektrometer. Die Messwerte der BSA-Verdünnungen bildeten den Eichgrad zur Errechnung der Probenkonzentrationen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht durch die Wanderung im elektrischen Feld. Dieses Verfahren beruht auf einer Denaturierung der Proteine durch Natriumdodecyl-Sulfat (SDS), welches an die Tertiärstruktur von Proteinen bindet und diese dadurch negativ lädt. Die negative Ladung der Proteine ist proportional zu ihrem Molekulargewicht. Der Acrylamidgehalt des Gels bestimmt die Ausdifferenzierung der Proteine bei bestimmtem Molekulargewicht. Die Polymerisation des Acrylamids wird durch die Verwendung von Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) hervorgerufen.

Zuerst wurde das Trenngel angesetzt und in die vorbereitete Gelgießkammer zwischen zwei Glasplatten gegossen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol beschichtet, damit es nicht austrocknete und für 20 min stehen gelassen, um auszuhärten. Anschließend wurde das Sammelgel angesetzt und nach Entfernung des Isopropanols durch H₂O auf das Trenngel gegossen. Es wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt und man ließ das Gel für 15 min aushärten. Daraufhin wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Kammer für die Elektrophorese gesteckt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Taschen des Gels mit den Proteinproben (40 µl) beladen. Die Proteinproben wurden vor Gebrauch mit vierfach-konzentrierten Laemmli-Puffer und H₂O verdünnt und bei 95°C für 5 min unter Schütteln denaturiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltene DTT wirkt reduzierend und löst die SH₂-

Brücken, sodass sich die Proteine nicht mehr entfalten können. Zusätzlich wurde 10 µl eines Protein-Ladders (PageRulerPlus von Fermentas) aufgetragen, der eine definierte Größe hat und zur Orientierung diente. Die Elektrophorese lief 1h bei 100 V.

	30% Acrylamid/ bis-acrylamide	Puffer	ddH₂O	TEMED	10 % APS
Sammelgel (5 ml)	0,8 ml	1,4 ml	1,8 ml	15 µl	30 µl
Trenngel (12,5 %)	4,2 ml	2,6 ml	3,0 ml	30 µl	60 µl

Tabelle 2-9: Herstellung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Western Blot

Das Blotten ist eine Methode, um ein gelaufenes Gel auf einer Membran zu fixieren. Es handelt sich um einen Western Blot, wenn eine Proteinauftrennung in der Gelelektrophorese stattgefunden hat. Zum Blotten wurde zuerst ein Transferpuffer angesetzt und dann ein „Gelsandwich“ in einer Transferkassette in folgender Reihenfolge vorbereitet: ein Schwamm, 2x Filterpapier, Gel (mit vorher abgetrennten Sammelgel) und Membran (PVDF), 2x Filterpapier und wieder ein Schwamm. Das Gelsandwich wurde in Puffer getränkt. Die Polivinylidinfourid (PVDF)-Membran wurde vorher in 100% Methanol equilibriert. Bei der Schichtung des „Gelsandwiches“ war darauf zu achten, dass Gel und Membran glatt lagen und sich keine Luftblasen dazwischen befanden. Die Transferkassette wurde dann in ein Elektrodenmodul eingesetzt, das sich in einem Tank mit Kühlakkus und Rührfisch befand. Der Tank wurde mit Transferpuffer gefüllt und an eine Stromquelle angeschlossen. Es wurde für 1h bei 80 V, konstant 500 mA geblottet. Die Reaktion wurde danach für 1h mit 5%igem Milchpulver in TBST abgebremst.

Immunchemischer Proteinnachweis mit Antikörpern

Nach der einstündigen Blockierung der Membran in 5%iger-Milchpulver-TBST-Lösung zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde ein spezifischer primärer Antikörper in frischer 5%iger-Milchpulver-TBST-Lösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler auf die PVDF-Membran gegeben. Der primäre Antikörper richtete sich gegen ein Protein auf der Membran. Anschließend wurde die PVDF-Membran dreimal 15 min mit einer TBST-Lösung gewaschen und der sekundäre Antikörper in 5%iger-Milchpulver-TBST-Lösung, der spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet war, für 1h bei RT aufgetragen. Durch den Sekundärantikörper entstand ein sichtbarer Farbstoff. Am Ende wurde wieder dreimal mit TBST-Lösung gewaschen bevor die PVDF-Membran fotografiert werden konnte.

ECL-Reaktion und Filmentwicklung

Zum Fotografieren der PVDF-Membran wurde das ECL-Advance-Detection-Kit verwendet. Diese Methode beruht auf dem Gebrauch einer Chemilumineszenz. Substrate mit dieser Eigenschaft produzieren Licht, das mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. So konnten immobilisierte Antigene, an die die Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierten Antikörper gebunden sind, detektiert werden. Dies ist eine sehr sensitive, starke Methode, die schnell abläuft. Solution A und B wurden in einem Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 sec im Dunkeln auf die PVDF-Membran gegeben. Das ELC-Advance abtropfen lassen, die Membran in den Multimagell® legen und mit dem Programm FlourChem Q fotografieren mit Belichtungszeiten von 0,5 sec - 4 min. Anschließend wurde noch ein Marker mit einer anderen Emission (Cy5) aufgenommen. Die Fotos wurden gespeichert und konnten nun noch quantitativ ausgewertet werden. Die PVDF-Membran wurde getrocknet und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

2.2.6 Arbeitsmethoden mit Adenoviren

Generierung von rekombinanten Adenoviren

Zur Klonierung rekombinanter Adenoviren verwendeten wir das GatewayBlockit-System, mit dem man multiple DNA-Fragmente in einen Destinationsvektor schleusen kann. Wir benutzten die generierten rekombinanten Adenoviren zur Überexpression von microRNAs in NRVCMS. Die Oligonukleotide (Oligos) für die microRNAs wurden bei Eurofins bestellt. Die Oligos wurden auf 200 pmol/μl mit ddH₂O verdünnt und für eine Annealing-Reaktion angesetzt, um die doppelsträngigen (ds) Oligos zu generieren.

200 μM Top Oligo	5 μl
200 μM Bottom Oligo	5 μl
10x Oligo Annealing Puffer	2 μl
DNase/RNase freies H₂O	8 μl
Gesamtes Volumen	20 μl

Tabelle 2-10: Annealing-Reaktion zur Generierung doppelsträngiger Oligonukleotide

Der Reaktionsansatz schüttelte für 4 min bei 95°C, kühlte für 10 min bei RT ab und wurde kurz mit Hilfe einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die dsOligos auf 10 nM

verdünnt. In einem nächsten Schritt wurden die dsOligos in den Vektor pcDNA6.2-GW/miR kloniert.

5x Ligationspuffer	4 µl
pcDNA6.2-GW/miR (5 ng/µl)	2 µl
dsOligo (10 nM)	4 µl
DNase/RNase freies H₂O	9 µl
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 µl
Gesamtes Volumen	20 µl

Tabelle 2-11: Reaktionsansatz zur Klonierung von Oligonukleotiden in einen Vektor

Der Ligationsansatz wurde gut geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Für die Transformation (Übertragung freier DNA) wurden elektrokompetente Bakterien mit Antibiotikaresistenz verwendet (E.coli TOP10). Die Bakterien wurden in einer Flüssigkultur hochgezogen und auf Agarplatten ausgestrichen. Nach 12h wurden Bakterienklone gepickt und mit passendem Antibiotikum in 5 ml LB-Medium hochgezogen. Nach der Plasmid-Gewinnung durch eine „Mini-Präp“ wurde eine PCR und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um Bakterien zu detektieren, die das passende Plasmid aufgenommen hatten. Von den in EB-Puffer gelösten Plasmiden wurde die Konzentration bestimmt und Proben zur Analyse der Sequenz mit passenden Primern zu Eurofins GmbH versandt. War das Sequenzierungsergebnis korrekt, wurde ein 60%iger Glycerolstock angelegt und bei -80°C eingefroren. Im nächsten Schritt führten wir die BP-Reaktion durch, in der es durch die katalytische Wirkung der BP-Clonase zu einer Rekombination zwischen *attB* und *attP* sites kam. Att sites sind definierte kurze Sequenzen von DNA, die eine Rekombinationsstelle bilden. Für den Reaktionsansatz benötigten wir 150 ng/µl pcDNA6.2-GW/miR, 150 ng/µl vom Vektor pDONR 221 (Entry clone), 8 µl EB-Puffer (pH 8.0) und 2 µl BP-Clonase. Der Reaktionsansatz wurde für 2-3h bei 37°C inkubiert und dann mit Proteinase K (1 µl) für 10 min bei 37°C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen. Es folgte eine Transformation mit elektrokompetenten Bakterien (E.coli DH10B), die eine Kanamycinresistenz besaßen. Es wurde so weiter verfahren, wie nach der ersten Transformation. Nach korrekt sequenzierter Plasmidsequenz (mit der enthaltenen microRNA) wurde die LR-Rekombination durchgeführt. Für die LR-Reaktion wurde der pAd/CMV/V5-DEST (34 kb) Vektor eingesetzt, der einen Cytomegalie-Virus (CMV) Promotor trägt, um eine starke Expression der inserierten Sequenz in den infizierten Zellen zu gewährleisten. Die LR-Reaktion war eine Rekombination zwischen *attL* und *attR* sites, katalysiert durch die LR-Clonase. Für den Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 10 µl) der Rekombination benötigte man 150 ng Entry clone, 2 µl (300 ng) Destinationsvektor, 8 µl EB-Puffer (pH 8.0) und 2 µl LR-Clonase. Der Ansatz wurde 2-3 h bei

37°C unter Schütteln inkubiert und dann mit Proteinase K (1 µl) für 10 min bei 37°C gestoppt. Wir führten wieder eine Transformation mit E.coli DH10B durch, zogen die Bakterien hoch, strichen Agarplatten aus, pickten Bakterienklone und zogen diese hoch. Um eine höhere Konzentration von DNA zu gewinnen, wurde eine „Midi-Prä“ durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde am Nanodrop bestimmt und die Proben zur Sequenzierung geschickt. Um jetzt die für das Adenovirus codierende DNA-Sequenz aus dem Vektor herauszuschneiden, wurde ein PacI-Verdau mit 30 µg des Expressionsvektors über Nacht bei 37°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde das Enzym für 10 min bei 65°C inaktiviert. Es folgte die Transfektion von HEK-293A-Zellen, um die Produktion des Adenovirus zu beginnen. Ansatz 1 (500 µl DMEM + 1 µg PacI-verdautes Plasmid) wurde nach 5 min Inkubation bei RT in Ansatz 2 (500 µl DMEM + 3 µl Lipofectamine) gegeben und 20 min bei RT inkubiert. 500 µl vom Transfektionsansatz wurden auf $7,5 \times 10^6$ HEK-293A pro Well verteilt, kurz geschwenkt und im S2-Labor für einen Tag in den Inkubator gestellt. Am Folgetag wurde das Transfektionsmedium durch Complete-Medium ersetzt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit einer Pipette aufgenommen und in T-75-Zellkulturflaschen mit 12 ml DMEM überführt. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel mit warmen DMEM durchgeführt, ohne die Zellen abzusaugen. Sobald sich die Zellen vom Flaschenboden ablösten und leuchtend rund unter dem Mikroskop aussahen, waren sie mit dem Adenovirus infiziert und konnten geerntet werden, indem sie in ein 15 ml Falcon-Tube pipettiert und für 10 min bei 1000 g zentrifugiert wurden. Das entstandene Pellet wurde mit 2 ml des Überstands vermischt. Die Zellen wurden durch dreimaliges freeze and thaw lysiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gesamten Zellüberstand gemischt (crude lysat) und für die nächste Infektion bei -80°C eingefroren.

Amplifikation von Adenoviren

Für die Vervielfältigung der Adenoviren wurden T-175cm² Kulturflaschen mit HEK-293A ausgesät bis sie eine Konfluenz von 90% aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt wurden 3 ml des Crude Lysats auf 25 ml mit Kulturmedium aufgefüllt und auf die HEK-298A-Zellen gegeben. Die Zellen inkubierten ungefähr zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂, bis sie mit dem Adenovirus infiziert waren und frei im Kulturmedium flottierten. Dann wurde der Inhalt der T-175cm² Kulturflasche in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit den Viren wurde aufbewahrt und das entstandene Pellet mit den Zellresten wurde in 1,5 ml PBS resuspendiert und durch freeze and thaw lysiert. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 1000 rpm konnte der Überstand in den ersten Überstand gegeben werden. Es wurden Aliquots von 50 µl abgefüllt und bei -80°C weggefroren.

Titerbestimmung von Adenoviren in HEK-293A

Für die adenovirale Titerbestimmung wurden auf einer 12-Well-Platte 500.000 HEK-293A-Zellen pro Well ausgesät und mit Verdünnungsreihen des Adenovirus in Kulturmedium von 10^{-2} bis 10^{-7} infiziert. Dafür wurden 100 µl virushaltige Verdünnung mit 0,9 ml Complete-Medium vermischt. Die infizierten Zellen inkubierten für 48h bei 37°C und 5% CO₂, daraufhin wurde das Medium abgenommen und die Zellen trockneten unter der sterilen Werkbank. Die Zellen wurden in einem nächsten Schritt mit 1 ml vorgekühlten Methanol pro Well fixiert und 10 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das Methanol abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS + 1% BSA gewaschen. Pro Well wurden 200 µl Anti-Hexon-Antikörper (FITC-gekoppelt) in PBS + 1% BSA 1:50 eingesetzt, um die Zellen anzufärben. Der Antikörper inkubierte 1h bei 37°C im Dunklen. Schließlich wurde der Antikörper abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS + 1% BSA gewaschen und mit PBS überschichtet. Das Auszählen der Zellen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurde im Dunkeln durchgeführt. Die markierten virushaltigen Zellen leuchteten blau. Zum Auszählen wurden fünf Gesichtsfelder mit einem 20x Objektiv betrachtet.

Titer (Ifu / ml) =

$$\frac{\text{Infizierte Zellen/Gesichtsfeld} \times \text{Gesichtsfelder/Well}}{\text{Virusvolumen [ml]} \times \text{Verdünnungsfaktor}} \quad (594)$$

2.2.7 Tierversuche

Allgemeines

Die Tiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel unter standardisierten Bedingungen, wie einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12h, bei einer Temperatur von 24°C, ständigem Zugang zu Trockenfutter und Trinkwasser, gehalten.

Echokardiographie

Die Untersuchungen erfolgten durch Dr. Matthias Eden an mit Isofluran narkotisierten Mäusen.

Für die Echokardiographie wurde den Mäusen der Brustkorb rasiert. Anschließend wurden sie mit dem Ultraschallgerät Vivid 7 Pro sonografiert.

Dabei wurden folgende Parameter erhoben: Herzfrequenz (HF), linksventrikulärer Durchmesser (LVD, left ventricular diameter), systolische und diastolische Wandstärke der Hinterwand (PW,

posterior wall), die Wandstärke des Septums (IVS, interventricular septum), enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels (LVEDD, left ventricular enddiastolic diameter) und als Parameter für die linksventrikuläre Pumpfunktion, die Verkürzungsfraktion (FS, *Fractional Shortening*).

Gewebeentnahme

Für die Entnahme der Herzen wurden die Tiere zuerst durch zervikale Dislokation getötet. Der Brustkorb wurde durch zwei Schnitte senkrecht zu den Rippen eröffnet und nach kranial geklappt, dann wurde das Zwerchfell durchtrennt und das Herz von den Gefäßen abgesetzt. Das Herz wurde sofort in PBS gelegt, damit es nicht zur Blutgerinnung kam, und nach Ausdrücken der Flüssigkeit gewogen. Die Vorhöfe und der rechte Ventrikel wurden abpräpariert, der linke Ventrikel wurde gewogen und bei -80°C für spätere Analysen aufbewahrt. Um weitere morphologische Analysen durchzuführen zu können, wurde jeder Maus die rechte Tibia entnommen.

2.2.8 Histologie/Immunhistologie

Herstellung von Gefrierschnitten

Das frische Myokardgewebe wurde in Tissue Tek auf Trockeneis eingebettet und bei -80°C als Block eingefroren. Das Myokardgewebe wurde bei -18°C in Kryoschnitte von $7\ \mu\text{m}$ Dicke geschnitten und dann auf Objektträger verteilt. Bis zum Gebrauch wurden die Objektträger bei -20°C eingefroren.

Immuncytochemie

Zur Bestimmung der Zellgrößen wurden die NRVCMS mit einem α -Actinin-Antikörper und einer DAPI-Färbung behandelt.

Von den mit Kardiomyozyten behafteten Coverslips wurde das Medium abgesaugt und eine 4%ige PFA-Fixierung für 5 min bei RT durchgeführt. Danach wurden die Coverslips 2-mal mit PBS gewaschen und 1h mit 2,5% BSA in PBS inkl. 0,1% Triton bei RT in einer feuchten Kammer geblockt. Über Nacht wurde der erste Antikörper, Anti-alpha-Actinin (Maus von Santa Cruz), 1:200 in 2,5% BSA bei 4°C auf die Zellen gegeben. Der Antikörper wurde dann 3-mal mit PBS abgewaschen, damit der zweite Antikörper, Anti-Mouse-CY3, für 1h bei RT einwirken konnte. Die Coverslips wurden noch einmal mit PBS gewaschen und dann wurde die PBS-DAPI-Färbung mit einer Verdünnung von 1:5000 für 15 min aufgetragen. Erneut wurde mit PBS und anschließend 2-mal mit ddH₂O gewaschen und je drei Coverslips wurden mit Mounting Medium auf einen Objektträger überführt. Die Objektträger mussten über Nacht bei

4°C trocknen, bevor sie mikroskopiert und mit dem BZ-9000 von Keyence fotografiert werden konnten. Zum Ausmessen der Zellgröße wurde die HybridCellCount Software (Keyence) benutzt (Rangrez et al., 2013).

Immunhistochemie

1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung beruht darauf, dass Hämatoxylin zu Hämalaun aufbereitet wird und alle basophilen Strukturen einer Zelle blau färbt (z.B. Zellkerne). Eosin hingegen färbt alle azophilen Strukturen der Zelle rot (z.B. Zellplasmaproteine) an. Diese histologische Färbung wurde an 7 µm dicken Kryoschnitten im Institut der Dermatologie des Uniklinikum Schleswig-Holstein in Kiel durchgeführt.

2. Lektin-Färbung

Lektine sind Glykoproteine, die in der Lage sind sich aufgrund ihrer speziellen Kohlenhydratstruktur an Zellmembranen anzulagern.

Die Lektin-Färbung wurde mit Lectin from Tritium vulgaris der Firma Sigma (FITC konjugiert) durchgeführt, um die Zellgröße zu bestimmen. Das Pulver wurde auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml in PBS verdünnt. Die zu färbenden Kryoschnitte, die bei -20°C lagerten, wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und anschließend 5 min mit PBS rehydriert. Die Inkubation mit 0,1 mg/ml Lektin in PBS erfolgte dann 2h bei RT unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer. Am Schluss wurden die Schnitte 3-mal mit PBS gewaschen und eingedeckelt.

3. Sirius Red Fast Green

Die Sirius Red Fast Green Färbung wurde zur Darstellung und Quantifizierung des Kollagengehaltes des Myokards auf den Kryoschnitten benutzt. Dabei wurde das Bindegewebe grün angefärbt und Kollagen stellte sich rot dar. Je älter die Färbelösung war, desto besser wurden die Kryoschnitte angefärbt. Die Lösung setzt sich aus 1,0 g Fast Green FCF + 0,5 g Sirius Red F3BA in 500 ml Pikrinsäure zusammen. Die Myokard-Kryoschnitte aus dem Gefrierschrank sollten zunächst bei 60°C eine Stunde zum Trocknen inkubiert werden. Danach wurden die histologischen Schnitte in die angesetzte Sirius Red Fast Green Lösung (vorher nochmals abfiltrieren) für mindestens 24h (besser 4 Tage) bei RT im Dunkeln gestellt. In einem weiteren Schritt wurden die Schnitte mit Leitungswasser abgespült, 3-mal in 70%igem Alkohol gedippt, nochmals 3-mal in frischem 70%igem Alkohol getunkt, abschließend kurz in 96%igem Alkohol geschwenkt, 2 min in 100%igem Alkohol stehen gelassen und dann 2-mal 5 min in Xylol-Ersatz gestellt. Die Kryoschnitte wurden mit Entellan eingedeckelt und trockneten über Nacht bei 4°C.

2.2.9 Statistische Auswertung

Von allen Resultaten wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte ausgerechnet und mit Hilfe von Graphen oder Tabellen dargestellt. Signifikanzen wurden durch den T-Test oder bei mehreren Variablen mit Hilfe des zweiseitigen studentischen Test Two Way ANOVA ausgerechnet, wobei dafür die Statistikprogramme SigmaPlot oder Graph pad benutzt wurden. P-Werte < 0.05 wurden als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) in Calsarcin1- „knockout“-Mäusen im genetischen C57/Bl6-Hintergrund

In der durchgeführten Arbeit wurden Herzen von Calsarcin1-„knockout“-Mäusen in einem reinen C57/Bl6-Hintergrund, die eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten, zunächst exakt morphologisch charakterisiert. Dies hatte zum Ziel, die Entwicklung der dilatativen Kardiomyopathie und die damit einhergehenden molekularen Veränderungen auf RNA- und Protein-Ebene zu analysieren. Dabei lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Rolle der miRs bei der Pathogenese der DCM. Aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Calsarcin1-„knockout“-Mäuse eine DCM und eine ausgeprägte systolische Dysfunktion entwickeln, wenn man sie in einen genetischen C57/Bl6-Hintergrund kreuzt (Schoensiegel et al., 2007).

Die Calsarcin-Familie ist ein muskelspezifisches Calcineurin-bindendes Protein, wobei nur die Isoform Calsarcin1 im Herzen exprimiert wird. Die Isoformen Calsarcin2 und Calsarcin3 werden hingegen nur in der Skelettmuskulatur exprimiert. Calsarcin bindet in der quergestreiften Muskulatur an der Z-Scheibe, welche eine wichtige Rolle in der kardialen Signaltransduktion einnimmt. An den Vorgängen der Signaltransduktion ist auch die Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin beteiligt, die eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie spielt. Calcineurin dephosphoryliert die Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie, die das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm im Zellkern aktiviert. Da unsere Arbeitsgruppe herausgefunden hat, dass Calsarcine nicht nur Calcineurin binden können, sondern es auch negativ modulieren, bestand der nächste Schritt darin, die Auswirkungen des Calsarcin1-„Knockouts“ im Hinblick auf Hypertrophie und eine kardiale Pathogenese zu analysieren.

3.1.1 Echokardiographie der Calsarcin1-„knockout“-Tieren

Zur Überprüfung der Myokardfunktion der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse wurden echokardiographische Untersuchungen an zuvor mit Isofluran sedierten Tieren durchgeführt. Hierfür wurden folgende Parameter ermittelt: linksventrikulärer Durchmesser (LVD, left ventricular diameter), systolische und diastolische Wandstärke der Hinterwand (PW, posterior wall) sowie die Wandstärke des Septums (IVS, interventricular septum). Wichtig zur Bestimmung der kardialen Funktion sind außerdem der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD, left ventricular end diastolic diameter) als Parameter für eine linksventrikuläre Dilatation und als Parameter für die systolische linksventrikuläre Pumpfunktion, die Verkürzungsfraction (FS, *Fractional Shortening*).

Wir untersuchten sieben Calsarcin1-„knockout“-Böcke und Weibchen im Vergleich mit den jeweiligen Wildtyp-Tieren. Der LVEDD ist höchst signifikant erhöht, was für eine linksventrikuläre Dilatation spricht, während die Reduktion der septalen Wandstärke ein dünnes Myokard der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse bestätigt. Das *Fractional Shortening*, das gemessen wird um die kardiale Kontraktilität zu beurteilen, ist in den Calsarcin1-„knockout“-Tieren im Vergleich zur Wildtypgruppe stark vermindert. Diese Daten entsprechen den diagnostischen Kriterien für eine dilatative Kardiomyopathie der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse (C57/Bl6).

	IVSD [mm]	LVEDD [mm]	PWD [mm]	IVSS [mm]	LVESD [mm]	PWS [mm]
WT	0,88 ± 0,12	3,16 ± 0,09	0,93 ± 0,04	1,54 ± 0,04	1,59 ± 0,07	1,47 ± 0,04
Calsarcin1-ko- Böcke	0,72 ± 0,03	3,94 ± 0,11	0,78 ± 0,04	1,01 ± 0,05	3,18 ± 0,14	1,03 ± 0,06
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,0006	0,0001	0,029	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 3-1: Echokardiographisch ermittelte Daten von Calsarcin1-„knockout“-Böcken (n=10) im Vergleich zu den Wildtyp-Böcken (WT n=7) im C57/Bl6-Hintergrund. Es wurden systolische und diastolische Wandstärke des interventrikulären Septums (IVSS und IVDD), endsystolischer und diastolischer Durchmesser des linken Ventrikels (LVESD und LVEDD) sowie endsystolische und diastolische Wandstärke der Hinterwand (PWS und PWD) aufgeführt. ±: SEM.

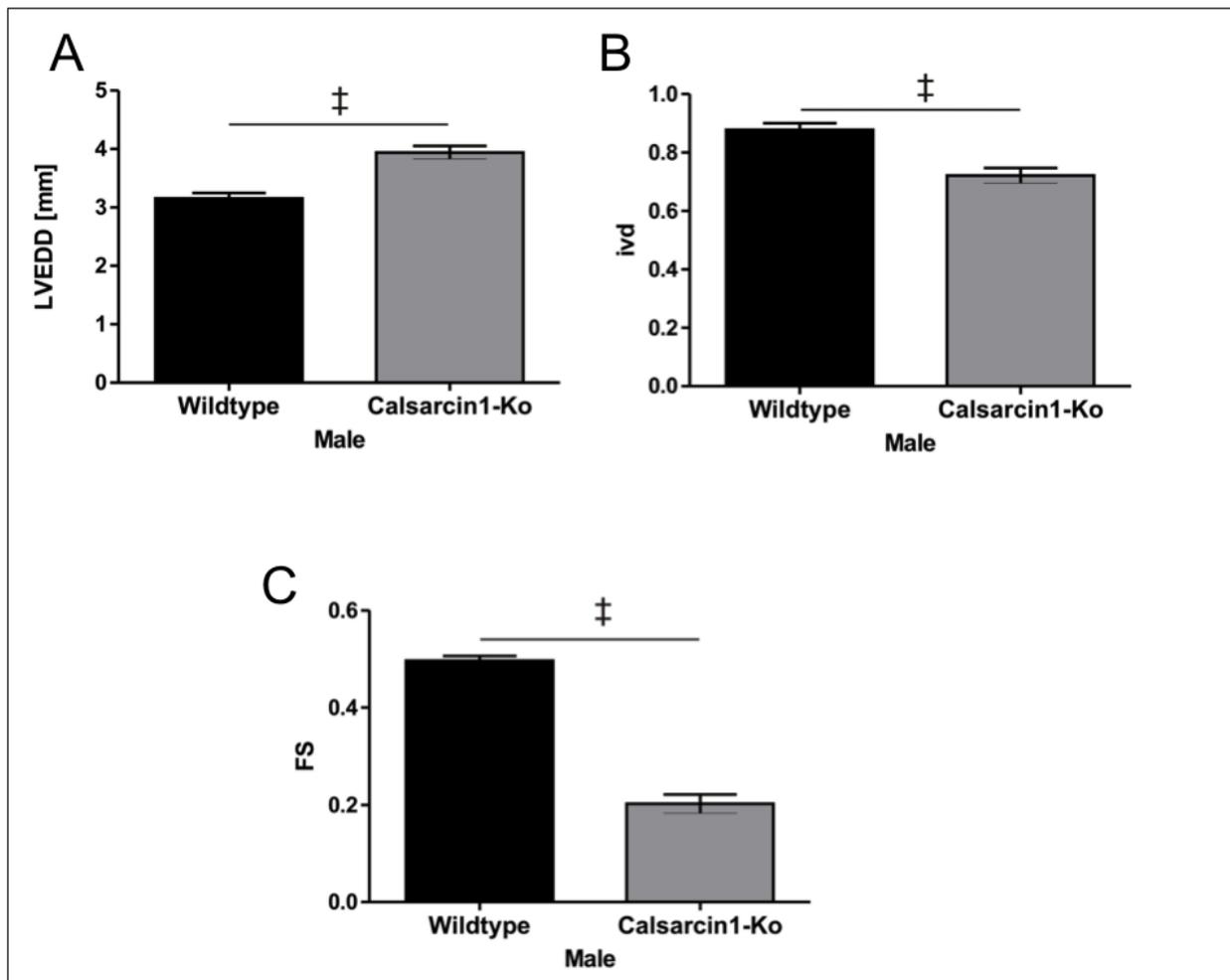


Abbildung 3-1 (A-C): Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (A), diastolischer septaler Durchmesser (B) und *Fractional Shortening* (C) von Calsarcin1-„knockout“-Böcken (n=10) im Vergleich zu Wildtyp-Böcken (n=7) im C57/Bl6-Hintergrund. Es zeigt sich eine höchst signifikante linksventrikuläre Dilatation, eine Verschmälerung des Myokards und eine Reduktion der systolischen Funktion auf ca. 40 % im Vergleich zum Wildtyp. Signifikanzniveaus: * p < 0,05, † p < 0,01, ‡ p < 0,001. Fehlerbalken: SEM.

	<i>IVSD</i> [mm]	<i>LVEDD</i> [mm]	<i>PWD</i> [mm]	<i>IVSS</i> [mm]	<i>LVESD</i> [mm]	<i>PWS</i> [mm]
WT	0,91 ± 0,04	2,97 ± 0,12	0,83 ± 0,03	1,62 ± 0,04	1,43 ± 0,10	1,47 ± 0,05
Calsarcin1-ko-Weibchen	0,70 ± 0,01	3,62 ± 0,06	0,89 ± 0,06	1,0 ± 0,02	2,91 ± 0,07	1,04 ± 0,05
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,0001	0,0001	0,3692	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 3-2: Echokardiographisch ermittelte Daten von Calsarcin1-„knockout“-Weibchen (n=9) im Vergleich zu den Wildtyp-Weibchen (WT n=8) im C57/Bl5-Hintergrund. Es wurden systolische und diastolische Wandstärke des interventrikulären Septums (IVSS und IVDD), endsystolischer und

diastolischer Durchmesser des linken Ventrikels (LVESD und LVEDD) sowie endsystolische und diastolische Wandstärke der Hinterwand (PWS und PWD) aufgeführt. \pm : SEM.

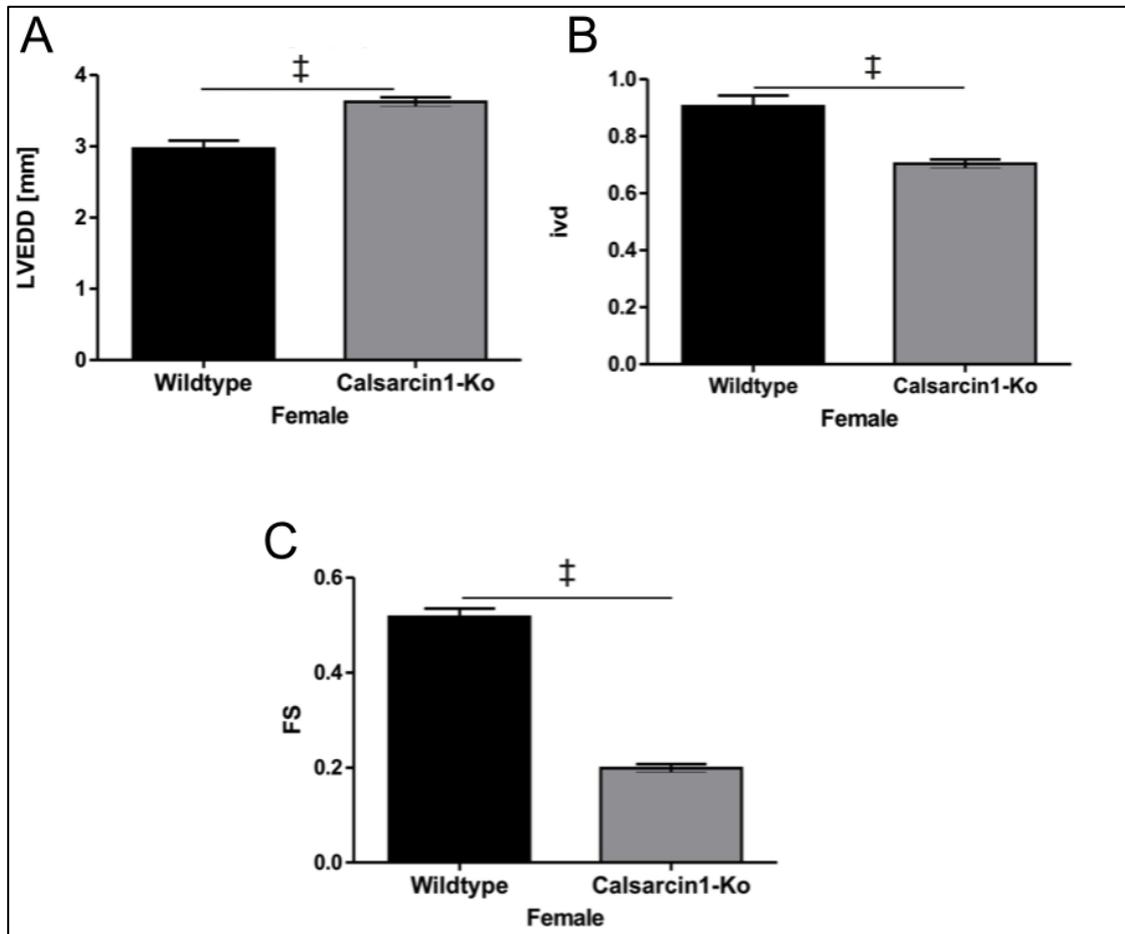


Abbildung 3-2 (A-C): Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter (A), diastolischer septaler Diameter (B) und *Fractional Shortening* (C) von Calsarcin1-„knockout“-Weibchen (n=9) im Vergleich zu Wildtyp-Weibchen (n=8) im C57/Bl6-Hintergrund. Es zeigt sich eine höchst signifikante linksventrikuläre Dilatation, eine Verschmälerung des Myokards und eine Reduktion der systolischen Funktion auf ungefähr 35% im Vergleich zum Wildtyp. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

3.1.2 Morphometrische Untersuchung der Calsarcin1-„knockout“-Herzen

Um den kardialen Phänotyp der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse in einem reinen C57/Bl6 genetischen Hintergrund zu bestimmen, wurden die morphometrischen Daten von 13 Wochen alten Tieren beider Geschlechter erhoben. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurde vor einigen Jahren ein unabhängiges Calsarcin1-„knockout“-Modell analysiert, das in einem gemischten genetischen Hintergrund gekreuzt worden war. Diese Untersuchung zeigte, dass das Fehlen von Calsarcin1 Hypertrophie-assoziierte Gene aktiviert, ohne dass ein hypertropher, kardialer Phänotyp nachzuweisen war. Auf pathologische Reize entwickelte sich jedoch eine kardiale Hypertrophie (Frey et al., 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse ist es nun interessant, die kardialen Auswirkungen des Calsarcin1-„Knockouts“ in einem reinen C57/Bl6 genetischen Hintergrund zu analysieren. Es wurden sieben Calsarcin1-„knockout“-Böcke und Weibchen (WT n=10) im C57/Bl6 genetischen Hintergrund mittels zervikaler Dislokation getötet und folgende Parameter ermittelt: Körpergewicht, Herzgewicht, Gewicht des linken Ventrikels (LV) und die Tibialänge. Aus den gemessenen Parametern wurden die Quotienten Herzgewicht zu Körpergewicht, LV-Gewicht zu Körpergewicht, Herzgewicht zu Tibialänge und LV-Gewicht zu Tibialänge gebildet. Die Tibialänge wurde als ein Parameter verwendet, da sie keinen wesentlichen krankheitsbedingten Schwankungen unterliegt wie z.B. das Körpergewicht bei Herzinsuffizienz. Diese vier erhobenen Quotienten sind typische Parameter zur Beurteilung der kardialen Hypertrophie, da sie die Größe und das Gewicht des Herzens, welche das Ausmaß einer Hypertrophie bestimmen, ins Verhältnis zur Größe und zum Gewicht der ganzen Maus setzen. Es wurde kein Unterschied zwischen den transgenen Calsarcin1-„knockout“-Mäusen und der Wildtyp-Kontrollgruppe beiderlei Geschlechter bestimmt. Zusammenfassend zeigte sich zunächst bei diesen Daten keine kardiale Hypertrophie der transgenen Tiere.

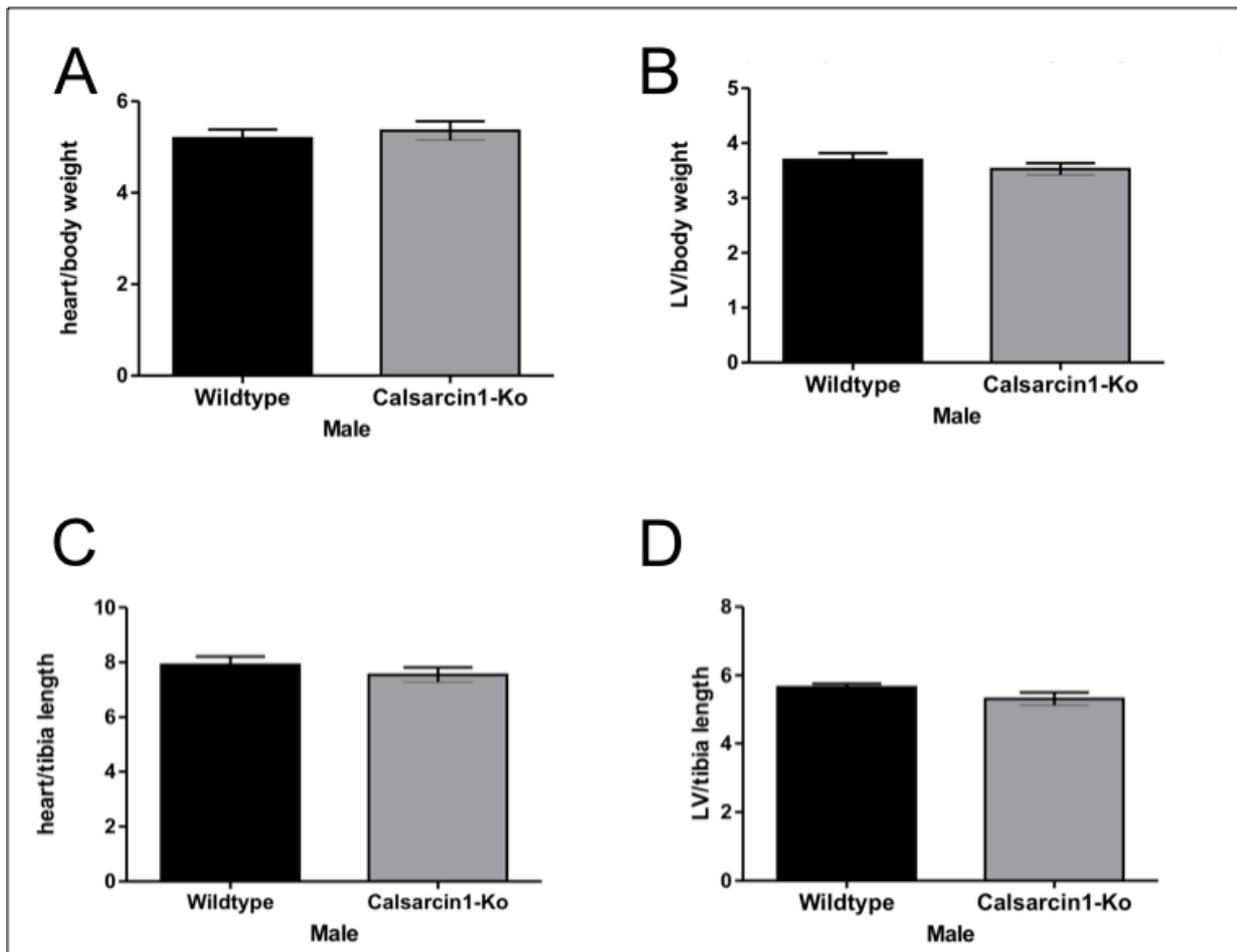


Abbildung 3-3 (A-D): Calsarcin1-transgene-„knockout“-Böcke im C57/Bl6-Hintergrund im Alter von 13 Wochen weisen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keine kardiale Hypertrophie auf. Als typische Maßzahlen der Hypertrophie sind weder Herzgewicht/Körpergewicht (A n=7-10), LV/Körpergewicht (B n=3-7), Herzgewicht/Tibialänge (C n=5-6) noch LV-Gewicht/Tibialänge (D n=2-5) signifikant erhöht. Fehlerbalken: SEM.

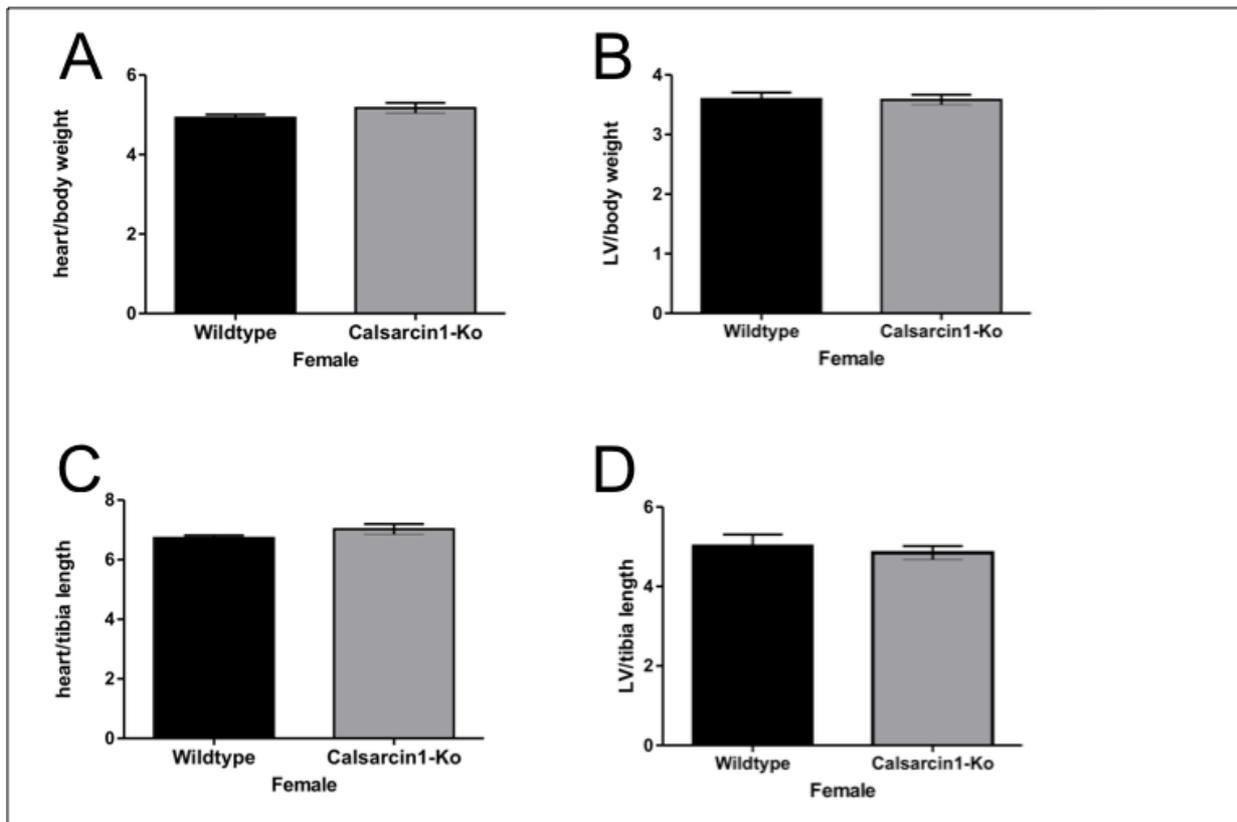


Abbildung 3-4 (A-D): Calsarcin1-transgene-„knockout“-Weibchen im C57/Bl6-Hintergrund im Alter von 13 Wochen weisen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keine kardiale Hypertrophie auf. Als typische Maßzahl der Hypertrophie sind weder Herzgewicht/Körpergewicht (A n=9), LV/Körpergewicht (B n=5-6), Herzgewicht/Tibiallänge (C n=5-6) noch LV-Gewicht/Tibiallänge (D n=2-3) signifikant erhöht. Fehlerbalken: SEM.

Zur weiteren Beurteilung und Charakterisierung der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse fertigten wir histologische Schnitte von den Calsarcin1-„knockout“-Herzen an. In den Hämatoxylin-Eosin (H&E)-gefärbten Kryoschnitten (n=3 Herzen) konnte eine Vergrößerung des linken Ventrikels erkannt werden (Abbildung 3-5 (A) und 3-6 (A)). Um die Zellquerschnittsfläche (in μm^2) zu ermitteln, wurden die Kryoschnitte auch mit einer Lectinfärbung behandelt. Es zeigte sich keine Veränderung der Zellgröße zwischen den Calsarcin1-„knockout“-Mäusen (100 Zellen pro Tier) und den Wildtyp-Tieren. Diese Ergebnisse bestätigen nochmals, dass die Calsarcin1-„knockout“-Mäuse keine kardiale Hypertrophie entwickelten, obwohl eine Vergrößerung des Herzens und eine Dilatation des linken Ventrikels in der H&E-Färbung zu sehen waren. Diese Veränderungen weisen auf eine dilatative Kardiomyopathie hin und geben Anlass für weitere Untersuchungen.

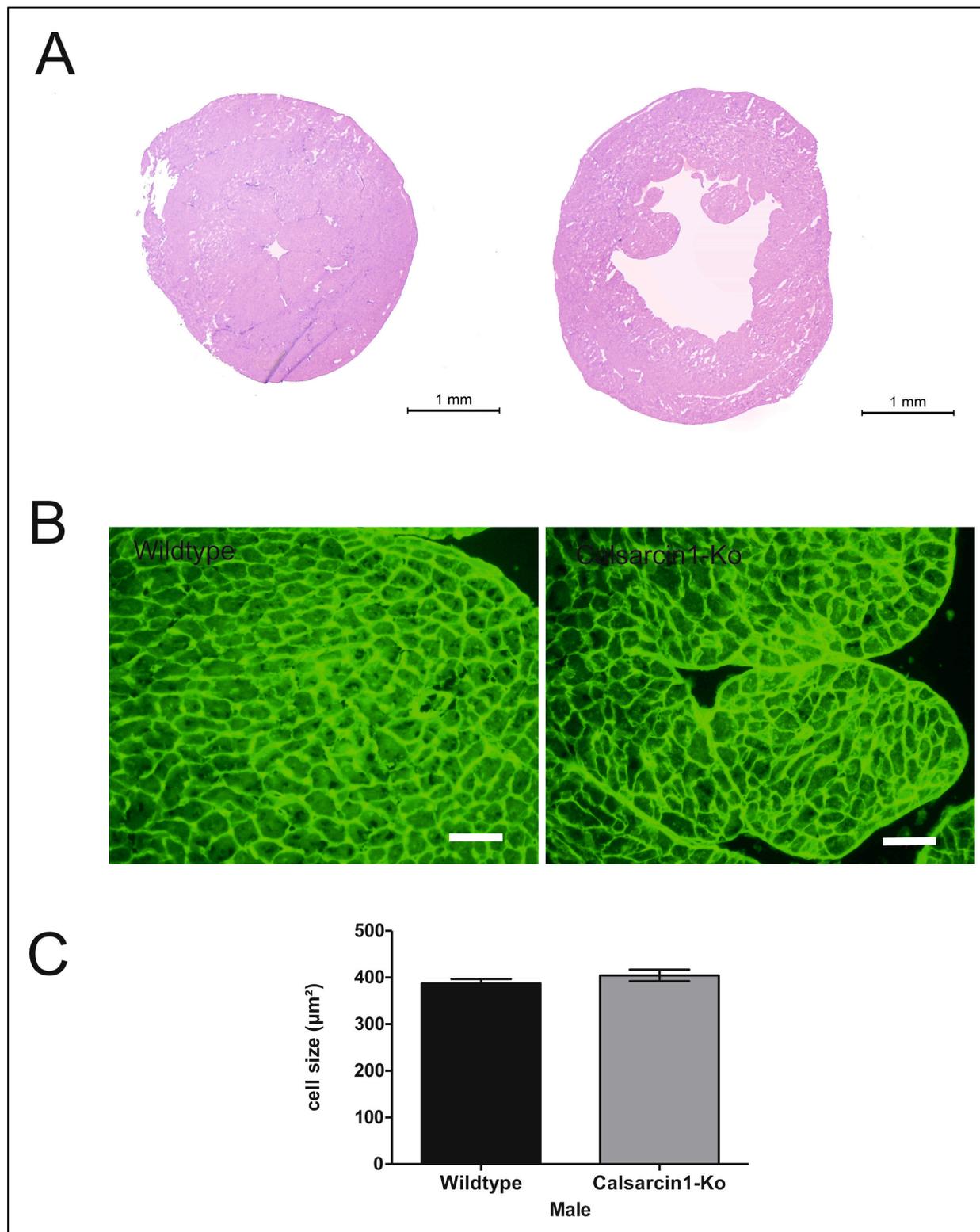


Abbildung 3-5 (A-C): In H&E-gefärbten histologischen Schnitten (A) ist eine Vergrößerung des linken Ventrikels der Calsarcin1-„knockout“-Herzen im C57/Bl6-Hintergrund zu sehen, wobei die Zellgröße (Bestimmung durch eine Lectinfärbung B) der Kardiomyozyten (WT n=156, Calsarcin1-Ko n=175) in der Quantifizierung unverändert ist (C). Maßstabballen (A): 1mm, Maßstabballen (B): 50μm und Fehlerballen (C): SEM.

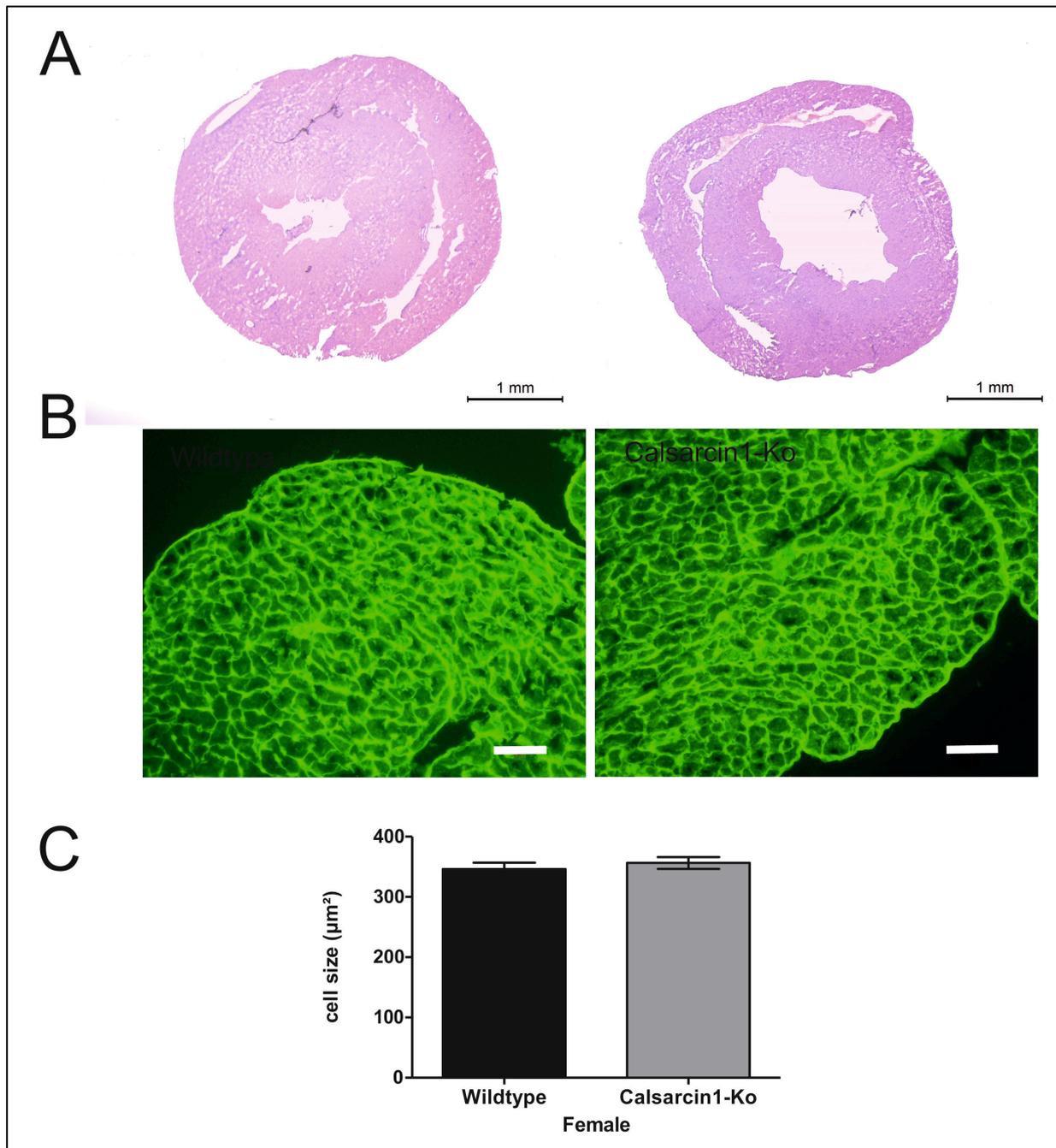


Abbildung 3-6 (A-C): In H&E-gefärbten histologischen Schnitten (A) ist eine Vergrößerung des linken Ventrikels der Calsarcin1-„knockout“-Herzen im C57/Bl6-Hintergrund zu sehen, wobei die Zellgröße (Bestimmung durch eine Lectinfärbung B) der Kardiomyozyten (WT n=144, Calsarcin1-Ko n=147) in der Quantifizierung unverändert ist (C). Maßstabbalken (A): 1mm, Maßstabbalken (B): 50µm und Fehlerbalken (C): SEM.

Zusätzlich färbten wir die Herzschnitte mit einer Kollagenfärbung (Sirius Red Fast Green Färbung) an (Abbildung 3-7), um eine mögliche Fibrose zu erkennen. Die histologischen Schnitten zeigten keine fibrotischen Veränderungen in den Calsarcin1-„knockout“-Mäusen. Somit entwickelten die Calsarcin1-„knockout“-Mäuse eine dilatative Kardiomyopathie ohne

eine Entwicklung von Fibrose oder Hypertrophie. Diese Ergebnisse sind sehr interessant, da somit typische sekundäre Begleitveränderungen wie z.B. Fibrose in den Calsarcin1-„knockout“-Mäusen fehlen.

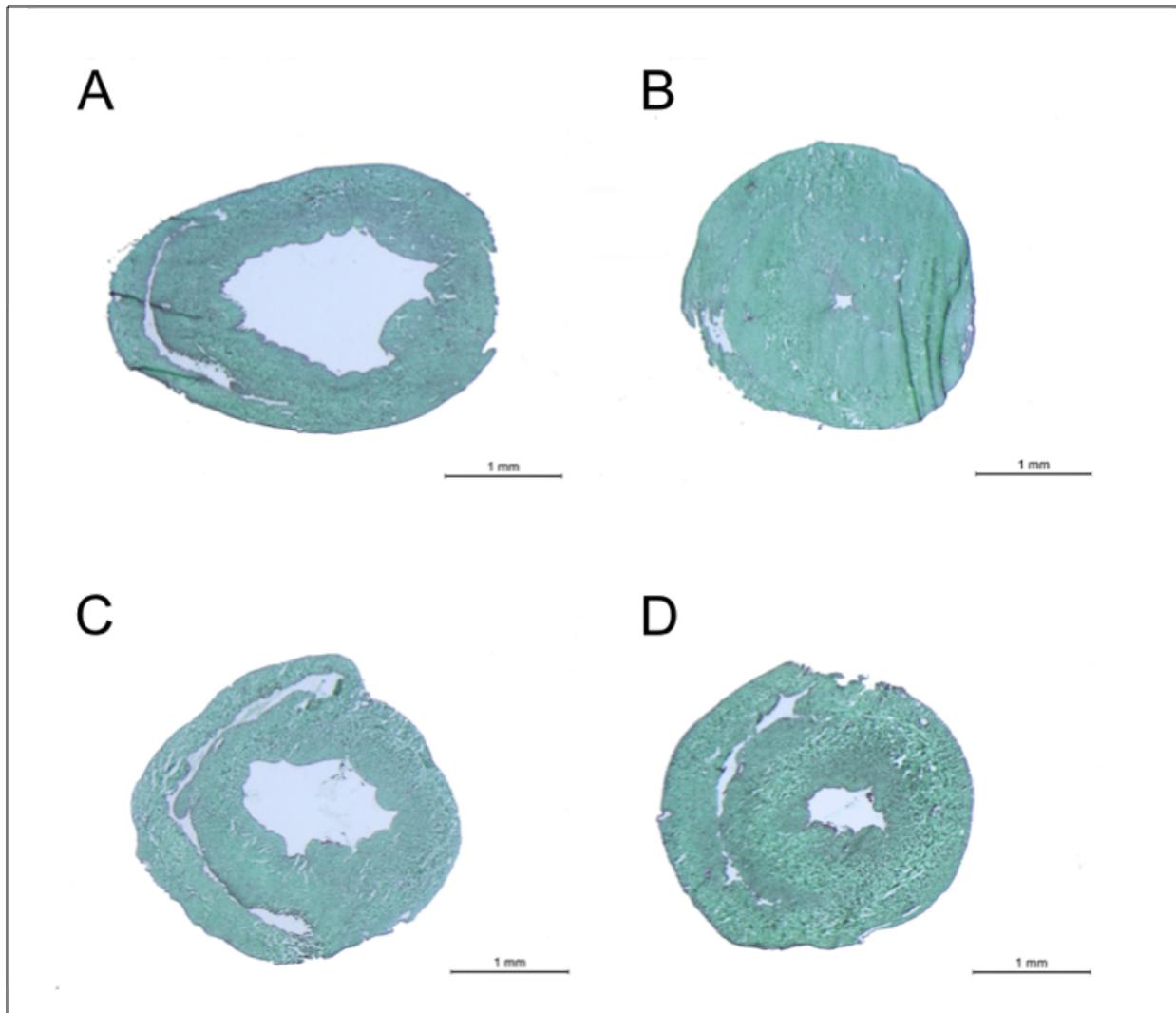


Abbildung 3-7 (A-D): Kryoschnitte (5µm) von einem Calsarcin1-„knockout“-Bock (A) und einem Calsarcin1-„knockout“-Weibchen (C) im Vergleich zum Wildtyp-Bock (B) und Wildtyp-Weibchen (D) im C57/Bl6-Hintergrund gefärbt mit Sirius Red Fast Green Färbung zur Darstellung des Kollagengehalts (rot). In diesen Schnitten ist keine Fibrose sichtbar, da das Gewebe grün angefärbt ist. Maßstabbalken: 1mm.

3.1.3 Genexpressionsprofil im Myokard von Calsarcin1-„knockout“-Mäusen

Um eine kardiale Hypertrophie zu detektieren, bevor ein makroskopisch sichtbarer hypertropher Phänotyp entsteht, ist es sinnvoll, Veränderungen der Genexpression zu ermitteln und Aktivierungen Hypertrophie-assoziiierter Signalwege aufzudecken. Mit Hilfe von quantitativer Realtime-PCR auf mRNA-Ebene wurden die typischen Vertreter des hypertrophen Genprogramms analysiert. Dazu zählen *ANP* (*Atrial Natriuretic Peptide*,

Transkript *Nppa*), *BNP* (*Brain Natriuretic Peptide*, Transkript *Nppb*) und *beta-Myosin Heavy Chain* (*Myh7*).

In der Tat entwickelten beide Geschlechter der *Calsarcin1*-„knockout“-Mäuse eine massive Hochregulation von *ANP* auf mindestens das 10-fache der Kontrollgruppe. Das gleiche ist bei der Expression von *BNP* zu beobachten, hier ist eine signifikante Steigerung von $p < 0.05$ bei den Böcken und $p < 0.001$ bei den Weibchen zu erkennen.

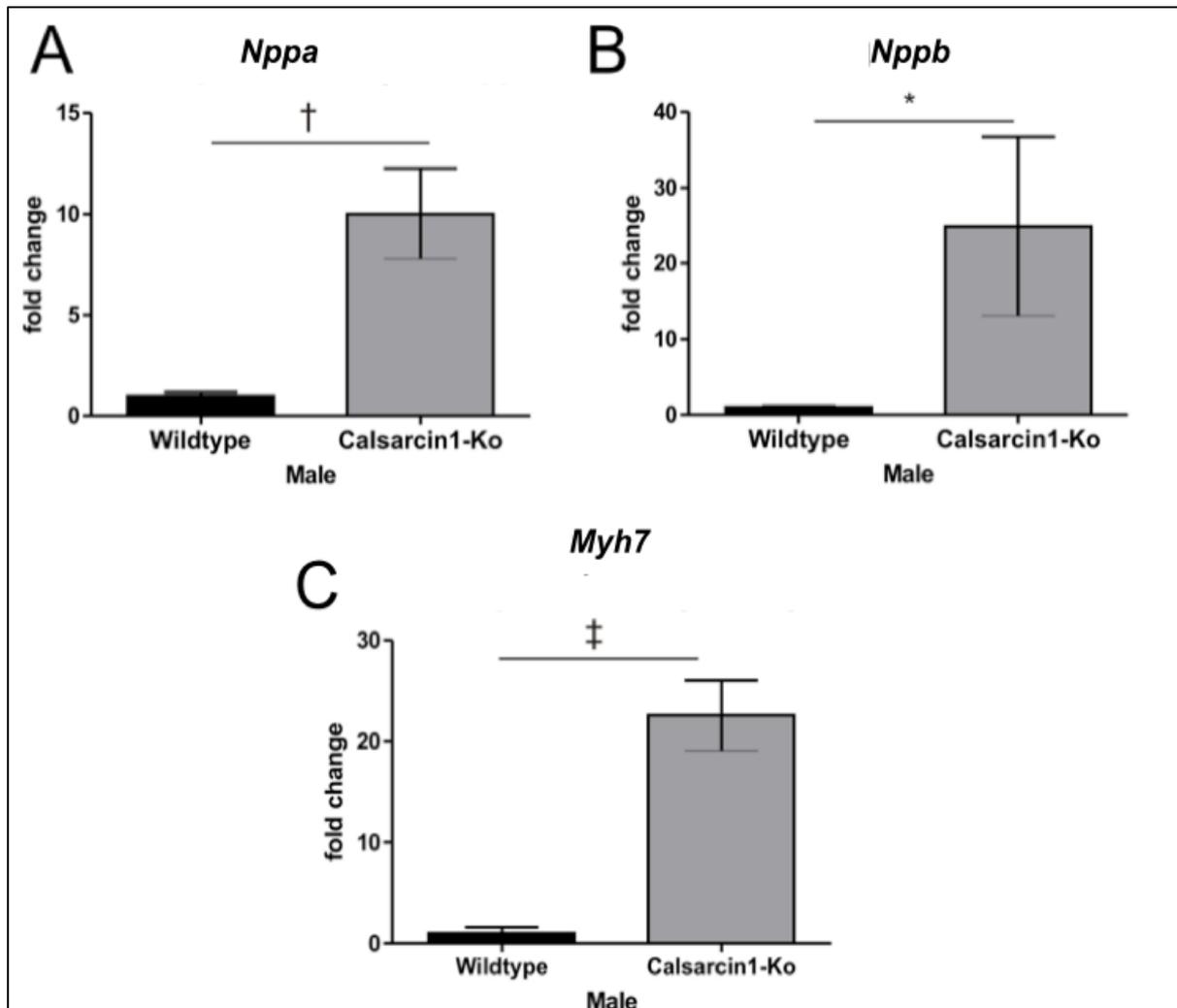


Abbildung 3-8 (A-C): Quantitative Realtime-PCR von *Nppa* (*ANP*), *Nppb* (*BNP*) und β -*Myh7* (kodiert für die schwere β -Myosin-Kette). Die untersuchten Parameter werden als typische Vertreter des hypertrophen Genexpressionsprofils im linken Ventrikel der *Calsarcin1*-„knockout“-Böcke ($n=3-7$) vermehrt exprimiert. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

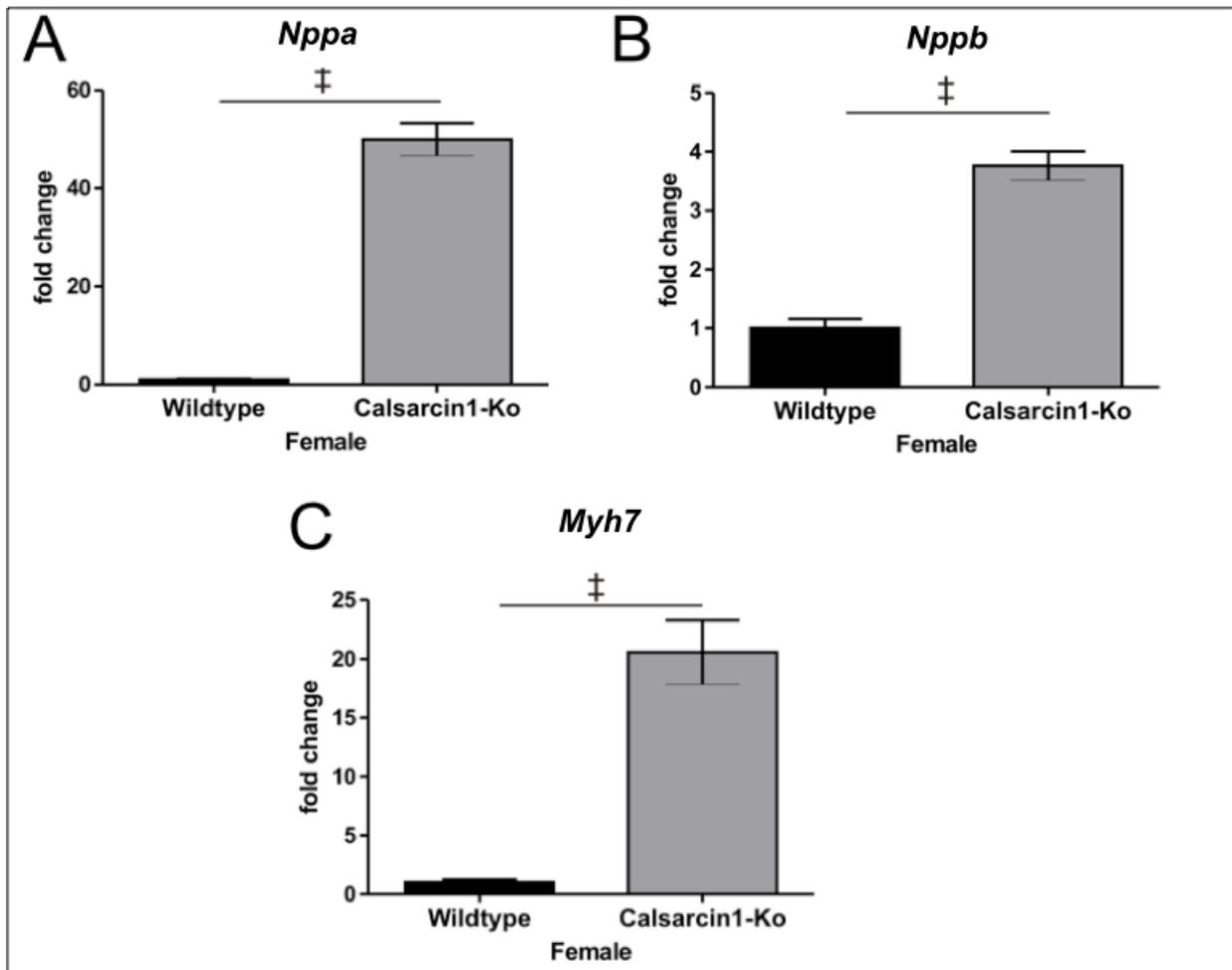


Abbildung 3-9 (A-C): Quantitative Realtime-PCR von *Nppa* (ANP), *Nppb* (BNP) und β -*Myh7* (kodiert für die schwere β -Myosin-Kette). Sie werden als typische Vertreter des hypertrophen Genexpressionsprofils im linken Ventrikel der Calsarcin1-„knockout“-Weibchen (n=4-6) vermehrt exprimiert. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

3.1.4 Aktivierung des Calcineurin-Signalwegs in Calsarcin1-„knockout“-Herzen

Die Phosphatase Calcineurin ist wichtig in der Vermittlung der kardialen Hypertrophie und stellt deswegen eine Schlüsselkomponente dar. Um die spezifische Regulation des Calcineurin-Signalwegs zu ermitteln, benutzten wir die Expression von *RCAN1-4*. *RCAN1-4* wird spezifisch Calcineurin-abhängig exprimiert und somit in Abhängigkeit von der Aktivität im Calcineurin-Signalweg gebildet. Die Isoform von *RCAN1-4* steht unter der Kontrolle eines Promotors, der 15 NFAT-Bindungsstellen aufweist (Yang et al., 2000). Um den Einfluss der kardialen Überexpression von *RCAN1-4* auf molekularer Ebene nachzuweisen, wurden Expressionsanalysen von *RCAN1-4* auf Protein- und RNA-Ebene durchgeführt. Im Western Blot (Abbildung 3-10) zeigte sich eine vermehrte Expression sowohl von *RCAN1-4* bei 28 kDa, als auch von *RCAN1-1* bei 36 kDa. In der Quantifizierung des Western Blots wurde eine

Zunahme von *RCAN1-4* um den Faktor 4,7 ($\pm 1,10$ n=4) und in der quantitativen Realtime-PCR um den Faktor 77,6 ($\pm 26,32$ n=4) bestimmt.

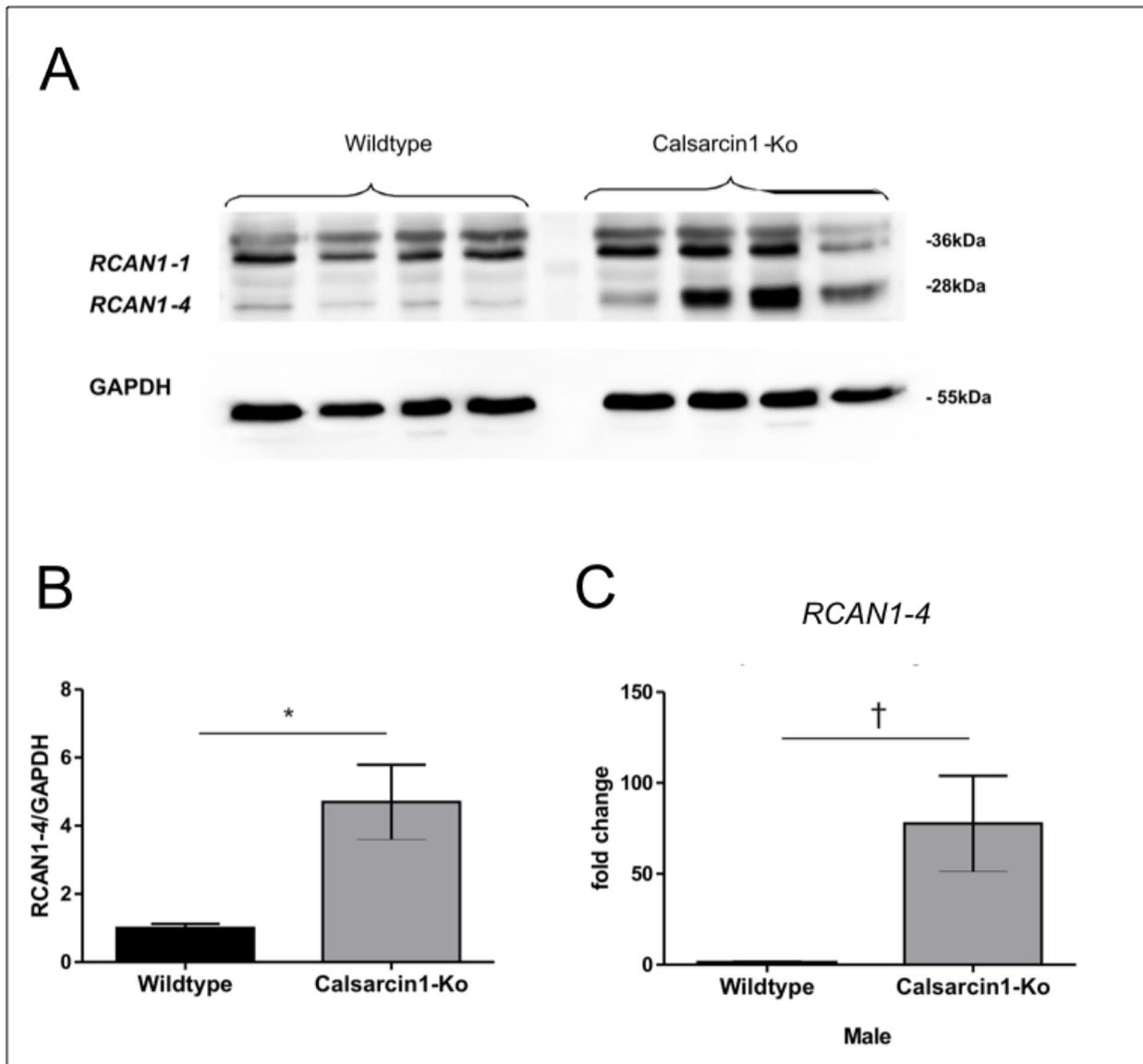


Abbildung 3-10 (A-C): Im Western Blot (A) zeigt sich eine signifikant vermehrte *RCAN1-4*-Expression in Calsarcin1-„knockout“-Böcken (je n=4) im Vergleich zur Kontrollgruppe im C57/Bl6-Hintergrund. Als Ladungskontrolle wird der Nachweis von GAPDH benutzt. Abbildung B stellt die Quantifizierung auf Proteinebene dar. Auch auf RNA-Ebene (C) zeigt sich eine höchst signifikante Verstärkung der Expression von *RCAN1-4* (zeigt die Aktivität des Calcineurin-Signalwegs an). Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

Zusammenfassend ergaben die *in vivo* Analysen der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse auf RNA- und Protein-Ebene eine Aktivierung des Calcineurin-Signalwegs. Der „Knockdown“ von Calsarcin1 in den transgenen Mäusen führt zu einer Zunahme der *RCAN1-4* Expression in den Kardiomyozyten der Tiere.

3.1.5 Genomweite microRNA-Microarray-Untersuchung in Calsarcin1-„knockout“-Mäusen und anschließende Validierung mittels TaqMan-qPCR-Analyse

Da man im kardialen makroskopischen Phänotyp der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse keine Entwicklung einer Hypertrophie sehen konnte, untersuchten wir andere Mechanismen, welche eine dilatative Kardiomyopathie auslösen könnten. Deswegen betrachteten wir eine MicroRNA-Microarray-Untersuchung, die an einer vorigen Calsarcin1-Mäusegruppe durchgeführt worden war, und sahen einige vielversprechend herauf- und herunterregulierte MicroRNAs.

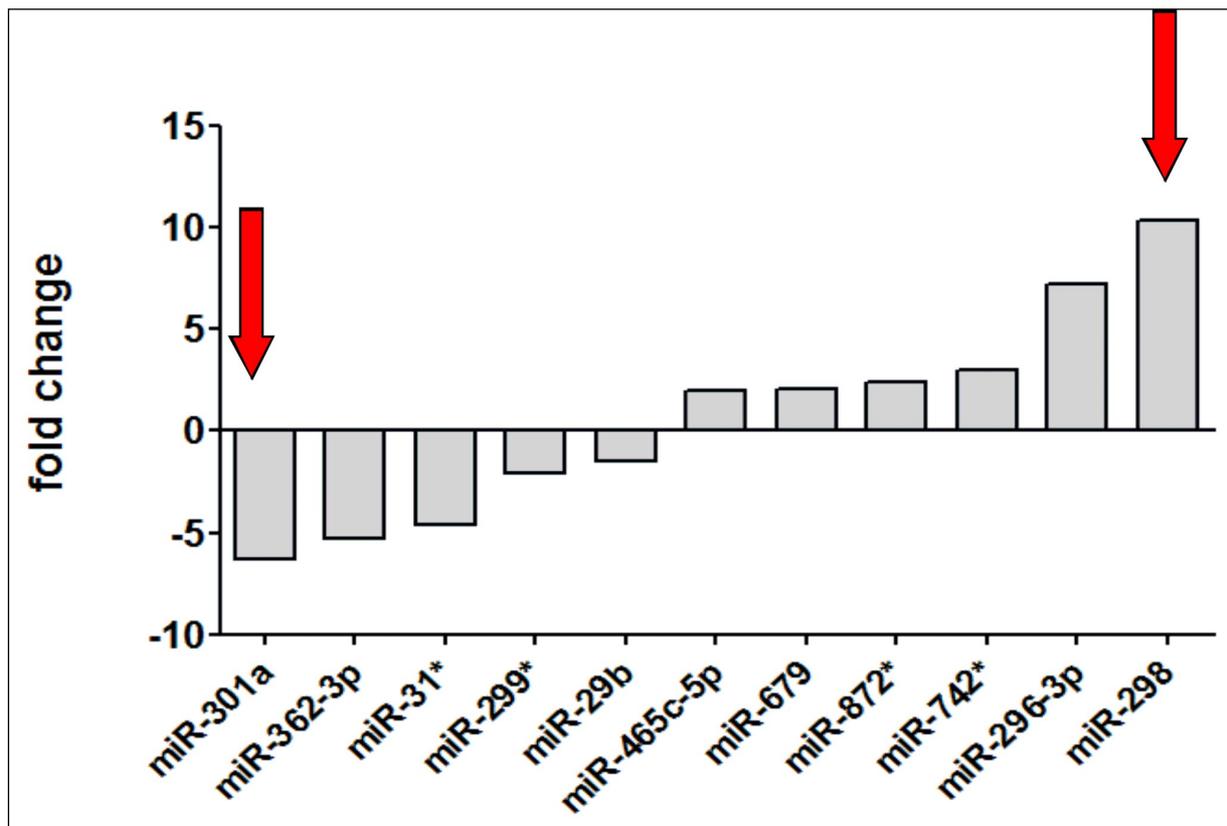


Abbildung 3-11: MicroRNA-Microarrays mit Calsarcin1-„knockout“-Tieren (n=4) im C57/Bl6-Hintergrund mit differenziell hoch - und herunterregulierten microRNAs.

Zur Validierung dieser Ergebnisse untersuchten wir die morphologisch charakterisierten Calsarcin1-„knockout“-Mäuse mittels quantitativer Realtime-PCR hinsichtlich verschiedener microRNAs. Es wurden folgende microRNAs mit Hilfe von TaqMan Assays analysiert: miR-298, miR-31*, miR-301, miR-19a, miR-19b, miR-362-3p, miR-872*, miR-742*, miR-299-5p, miR-465-5p, miR-29b, miR-29c, miR-29a, miR-679 und miR-296-3p.

3.1.6 Differenziell regulierte microRNAs im Myokard der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse: miR-298-5p und miR-301a

Von den 15 verschiedenen microRNAs, die hinsichtlich ihrer Expression in den Calsarcin1-„knockout“-Mäusen untersucht worden sind, waren die miR-298-5p und miR-301a in den männlichen Mäusen signifikant hoch- oder herunterreguliert.

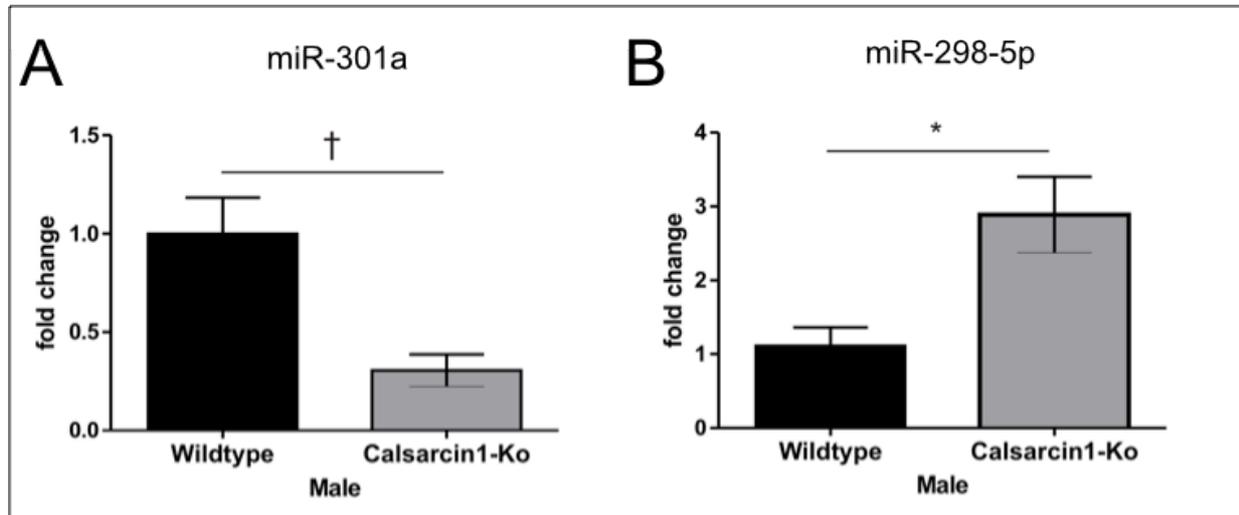


Abbildung 3-12 (A-B): Herunterregulation von miR-301a (A) und Hochregulation von miR-298-5p (B) in Calsarcin1-„knockout“-Böcken (n=6) im C57/Bl6-Hintergrund in einer quantitativen Realtime-PCR-Analyse. Als Kontrollgruppe dienen C57/Bl6-Wildtyp-Mäuse (n=5). Signifikanzniveaus: * p < 0,05, † p < 0,01, ‡ p < 0,001. Fehlerbalken: SEM.

Die miR-298-5p war in den Calsarcin1-„knockout“-Böcken um den Faktor 2,88 ($\pm 0,69$ n=6) mit einem p-Wert <0,05 signifikant heraufreguliert. Die Expression von miR-301a war auf das 0,31-fache ($\pm 0,08$ n=6, p <0,01) signifikant vermindert.

3.2. *In vitro* Experimente zur Analyse der Wirkung von microRNAs in neonatalen Kardiomyozyten

3.2.1 Generierung von Adenovirus-Konstrukten zur Überexpression von miR-298-5p und miR-301a

Bei der Suche nach auslösenden Mechanismen der dilatativen Kardiomyopathie in Calsarcin1-„knockout“-Mäusen waren die miR-298-5p und miR-301a als die wichtigsten microRNAs postuliert worden. Um auch *in vitro* den Einfluss von den microRNAs untersuchen zu können, generierten wir durch Klonierung rekombinante microRNA-Adenoviren. Zur Klonierung wurde das Blockit Gateway System für microRNAs von Invitrogen benutzt.

Um *in vitro* zu verifizieren, dass durch AdmiR-301a (Adenovirus-miR-301a) eine Überexpression der microRNA möglich ist, wurden neonatale Kardiomyozyten aus Ratten des Wistar-Stamms isoliert und mit AdmiR-301a und AdmiR-298-5p nach 24h unter Serumdeprivation infiziert. Die Serumdeprivation wurde durchgeführt, da Serum selbst eine starke hypertrophe Wirkung besitzt und die Effekte daher verwischen würde. Die Zellen lagerten dann für 48h bei 37°C und 5 % CO₂ und wurden danach geerntet. Zur Dosisfindung wurden die ventrikulären Kardiomyozyten mit 10-100 infektiösen Einheiten (ifu) pro Kardiomyozyt infiziert.

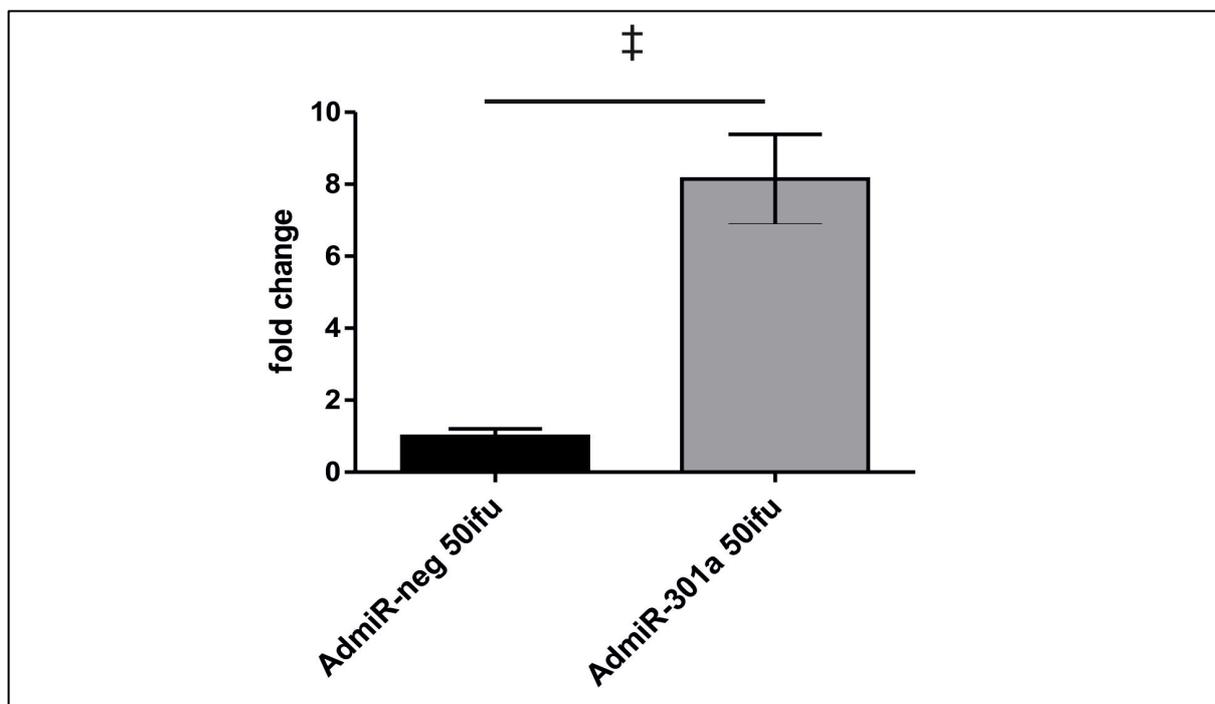


Abbildung 3-13: Nachweis der Überexpression mit dem generierten Adenovirus für miR-301a mit einem eingesetzten Virustiter von 50 ifu. Es zeigte sich eine höchst signifikante Überexpression von miR-301a. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

Die AdmiR-301a führt bei 50 ifu zur höchsten Überexpression der microRNA mit einem p-Wert von $<0,001$ um den Faktor $8,14 (\pm 1,24 n=4)$. Bei höherer Dosis des Virus ist ein Absterben der Kardiomyozyten zu beobachten, sodass alle weiterführenden Versuche mit 50 ifu durchgeführt worden sind.

Mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR konnte nachgewiesen werden, dass AdmiR-298-5p zu einer Überexpression der microRNA bei 40 ifu um den Faktor $3,65 (\pm 0,95 n=2)$ führt.

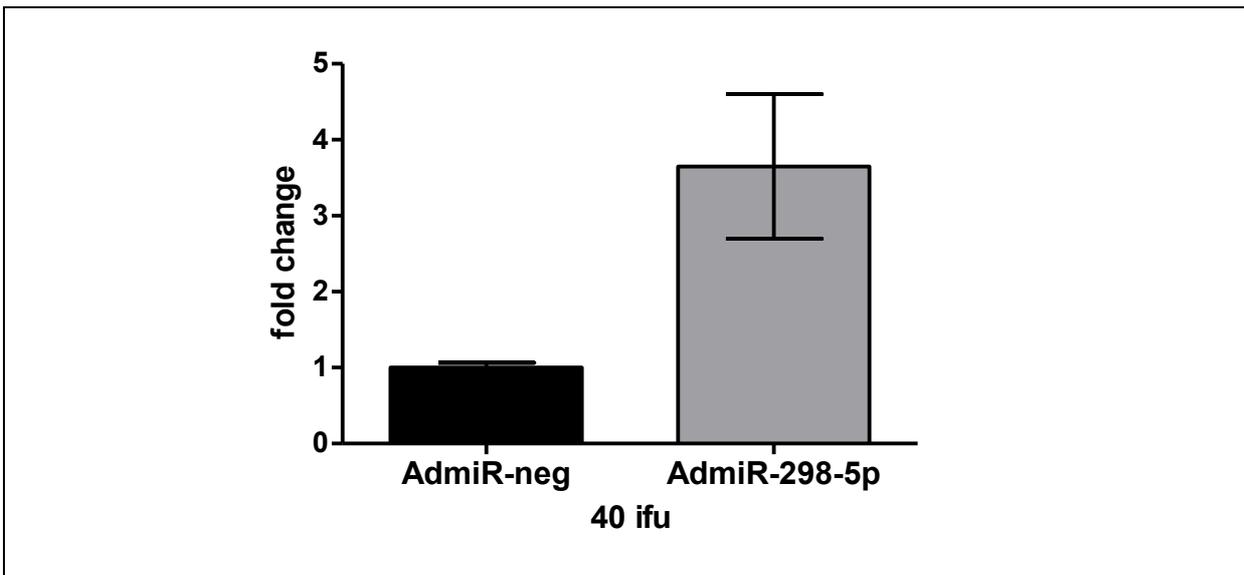


Abbildung 3-14: Nachweis der Überexpression von miR-298-5p mit dem generierten Adenovirus für miR-298-5p ($n=2$) mit einem eingesetzten Virustiter von 40 ifu. AdmiR-neg dient als Negativkontrolle und kodiert für eine nonsense-microRNA. Fehlerbalken: SEM.

Um die Effekte der adenoviralen Überexpression der microRNAs auf die ventrikulären Kardiomyozyten hinsichtlich des hypertrophen Genprogramms zu untersuchen, wurde mit verschiedenen hypertrophen Stimuli gearbeitet. Neben Versuchen mit biomechanischem Stress (Mechanischer Stress ist ein bekannter Auslöser von Hypertrophie (Frank et al., 2008)) und Endothelin1 wurden die besten Ergebnisse zur Aktivierung prohypertropher Signalwege durch den pharmakologischen Hypertrophiestimulus Phenylephrin (PE), einen alpha1-Adrenorezeptor-Agonisten, induziert. Die Kardiomyozyten wurden mit Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ PE behandelt und es wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, um die Zelldichte mit der stärksten Aktivierung der prohypertrophen Signale zu verifizieren. Nach 24-stündiger Inkubation mit serumhaltigem Medium wurden die Zellen 48h mit serumfreiem Medium behandelt, anschließend folgte bis zur Ernte der ventrikulären Kardiomyozyten ein 24-stündiger PE-Stimulus. Auf einer 6-Well-Platte erwies sich eine Zelldichte von 1.000.000

Zellen/Well als am besten geeignet und wurde bei weiteren Versuchen verwendet (Abbildung 3-15).

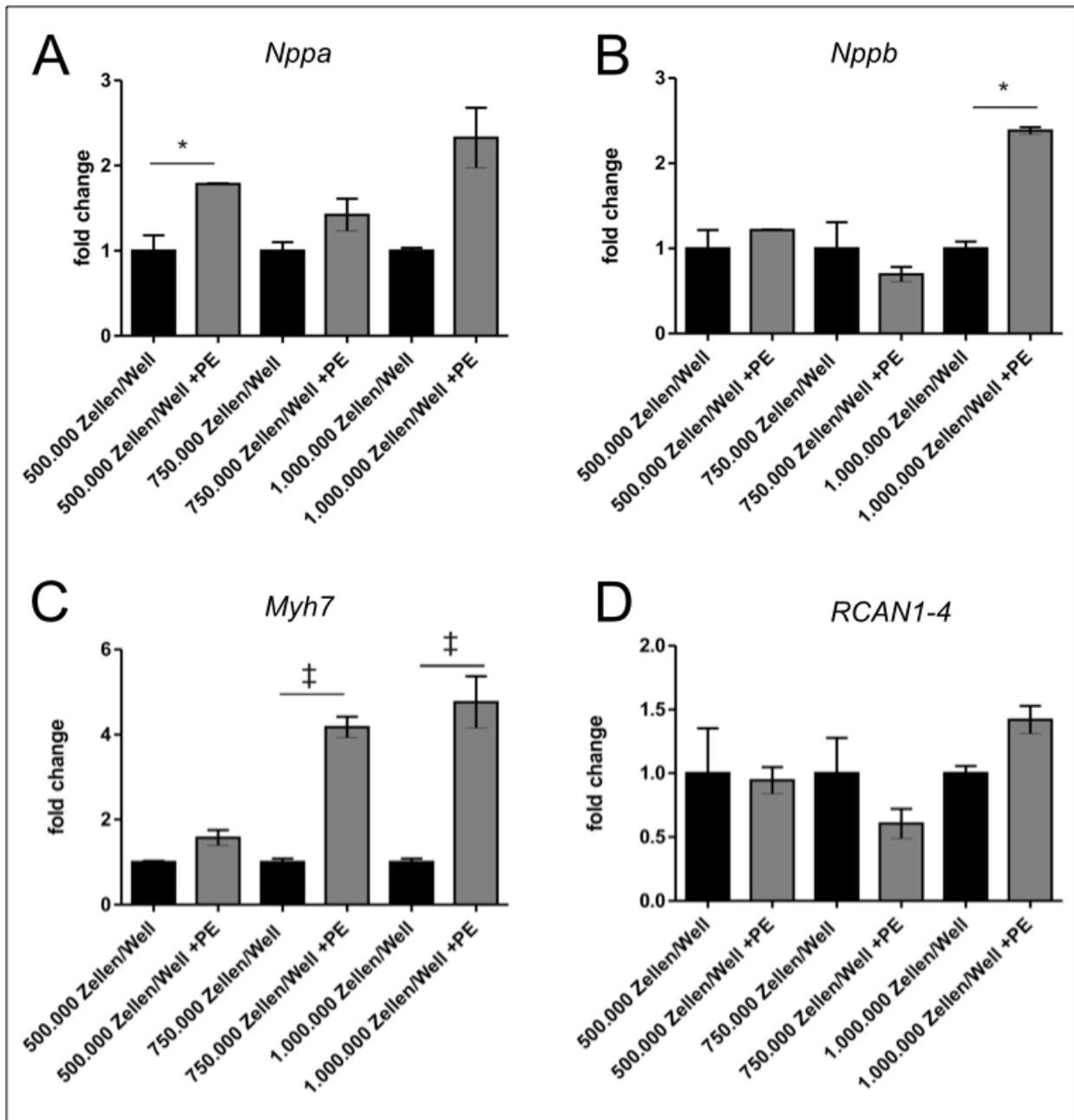


Abbildung 3-15 (A-D): Nachweis für die Aktivierung des hypertrophen Genexpressionsprofils bei Phenylephrin-Stimulation (PE) von neonatalen Kardiomyozyten (n=2) bei unterschiedlichen Zelldichten. Es zeigt sich die beste Aktivierung des hypertrophen Genprogramms bei 1.000.000 Zellen/Well und 100 μ M Phenylephrin. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

3.2.2 Einfluss der Überexpression von miR-301a *in vitro* auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm

Um die Hypothese zu evaluieren, dass die miR-301a einen Einfluss auf die Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie hat, führten wir *in vitro* Analysen hinsichtlich des hypertrophen Genprogramms auch mit miR mimics von LifeTechnologies durch. In den Versuchen wurden die ventrikulären Kardiomyozyten nach 24h unter Serumdeprivation mit 5 pmol mimic/well transfiziert und nach weiteren 24h pharmakologisch mit 5 μ M PE für 48 Stunden behandelt. Da wir diese Versuche mit einer Multiplex-PCR durchführten, wurden *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1-4* als typische Vertreter des hypertrophen Genprofils untersucht. In Abbildung 3-16 ist zu erkennen, dass PE (5 μ M) zu einer vermehrten Expression aller Transkripte führt, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den mit miR-301a mimic transfizierten Kardiomyozyten. Diese Ergebnisse zeigen, dass unser Hypertrophie-Stimulus, Phenylephrin, funktioniert. Des Weiteren zeigte sich ein additiver Effekt bei der Kombination von miR-301a und PE, welcher am besten beim Transkript *Nppb* zu sehen war ($p < 0,01$). Dieser Versuch bestätigt einen Einfluss von miR-301a auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm.

Die Aktivierung des hypertrophen Genprogramms durch PE war insgesamt in den Vorversuchen (nicht veröffentlicht) mit der AdmiR-301a schwierig, insbesondere *Myh7* und *RCAN1-4* ließen sich nicht optimal stimulieren. Die unterschiedliche Wirkung von PE auf die prohypertrophen Transkripte wurde schon öfters beobachtet. Beschrieben ist die erfolgreiche Stimulation hingegen für *Nppa*, welches auch in unseren Versuchen immer aktiviert wurde (Prasad et al., 2007, Gan et al., 2005). Dies spricht für eine korrekte Anwendung des Stimulus.

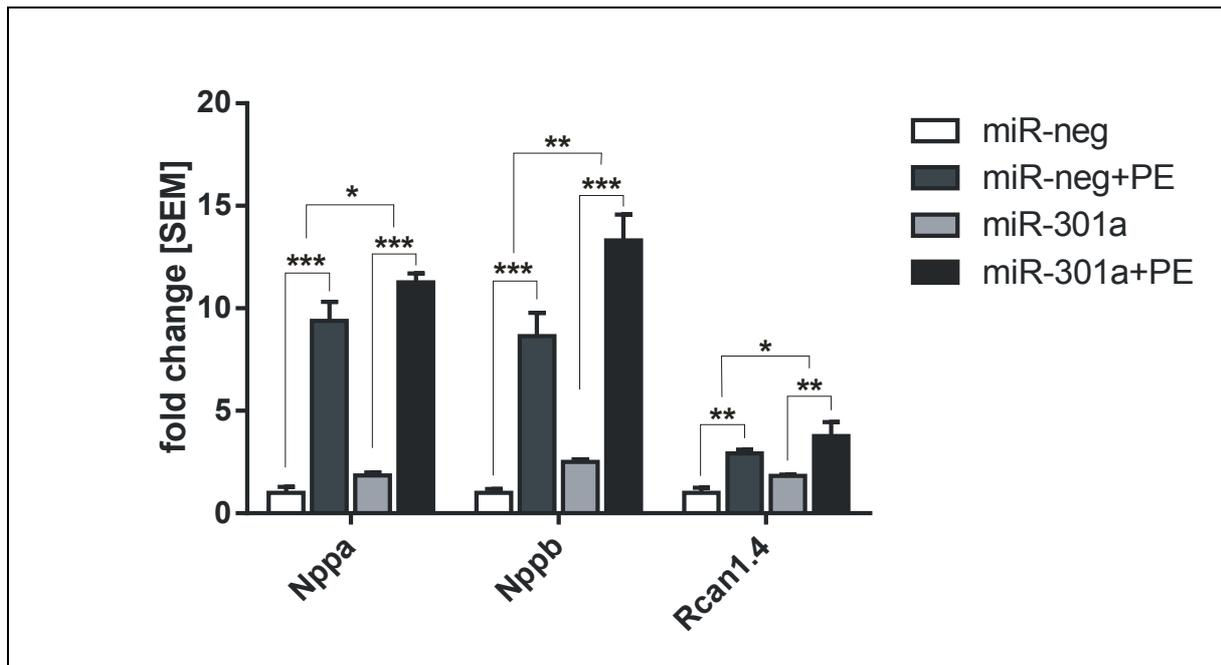


Abbildung 3-16: Multiplex-Realtime-PCR von *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1-4* von mit miR-301a transfizierten Kardiomyozyten (n=3) mit Phenylephrin-Stimulation (PE). Die Aktivierung des hypertrophen Genprogramms ließ sich durch Phenylephrin auslösen, wobei der Einsatz von miR-301a einen additiven Effekt zeigt. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

In der Immunzytochemie mit einem α -Actinin-Antikörper und einer DAPI-Färbung zeigte sich, dass die Überexpression von miR-301a mit miRNA Mimics zu keiner Veränderung der Zellgröße von Kardiomyozyten führt. Bei der Behandlung mit dem Hypertrophiestimulus Phenylephrin (5 μ M) hingegen kommt es zu einer Zunahme der Zellfläche in beiden Versuchsgruppen ($p < 0,05$).

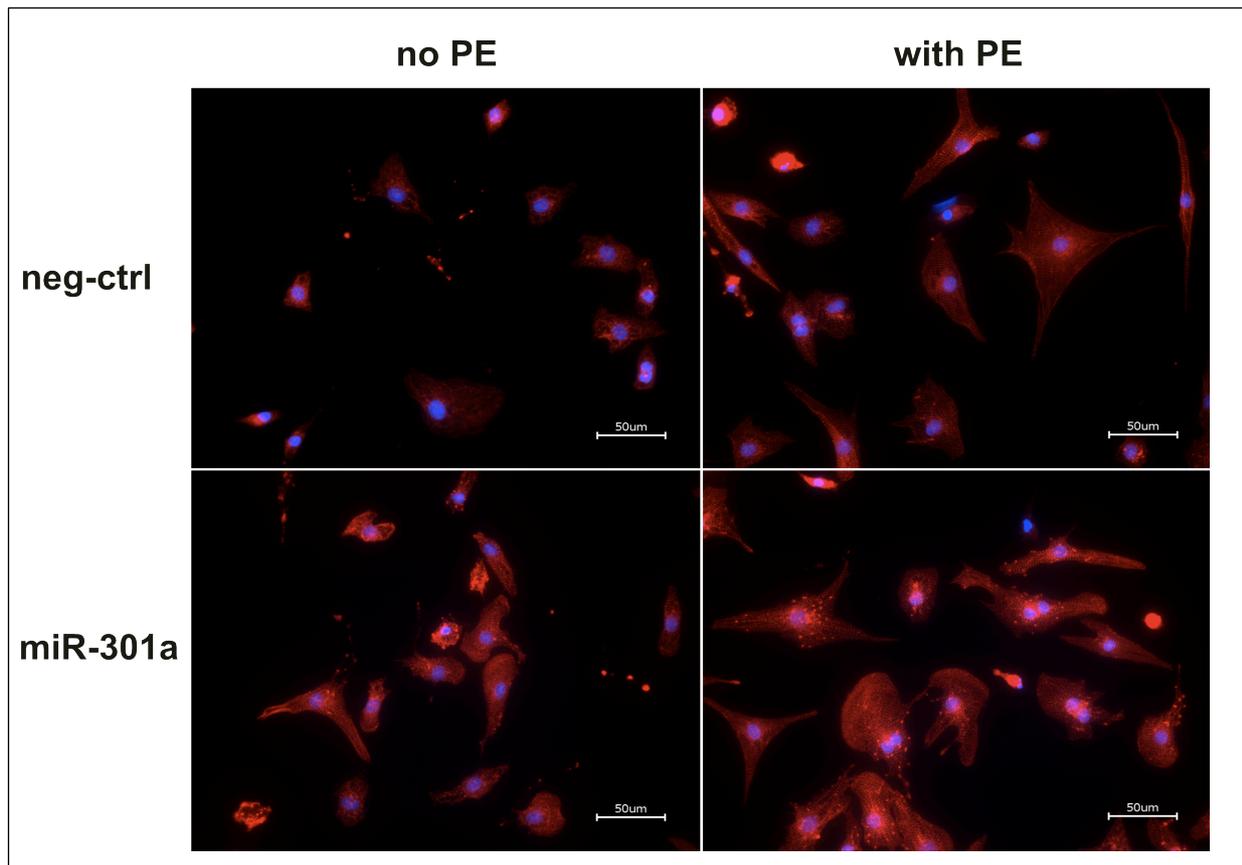


Abbildung 3-17: Zellgrößenbestimmung von mit miR-301a transfizierten Kardiomyozyten (n=1100) mit und ohne Phenylephrin-Stimulation (PE 5 μ M) im Vergleich zur Negativkontrolle durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit α -Actinin und DAPI. Maßstabballen: 50 μ m.

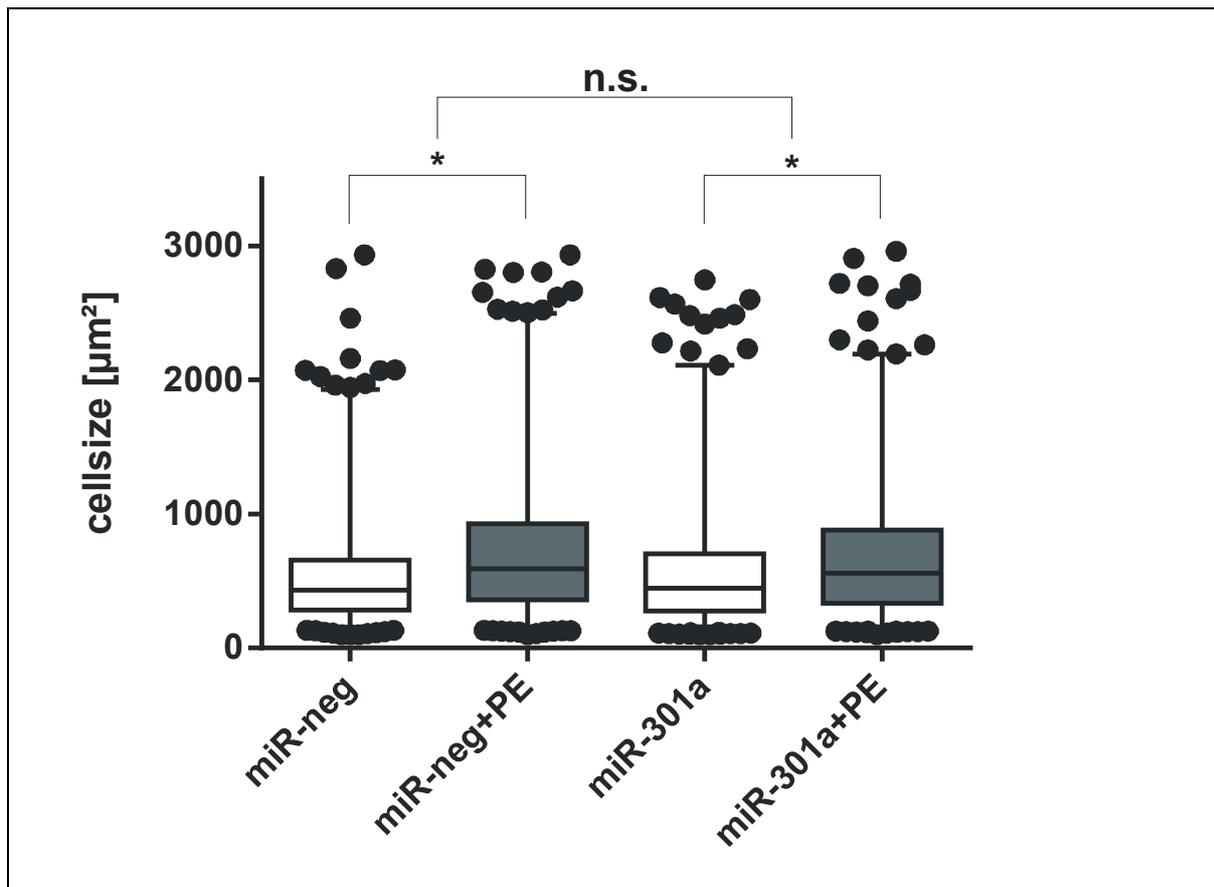


Abbildung 3-18: Darstellung der Zellgrößen im Box-Whiskers Blot für mit miR-301a transfizierte neonatale Kardiomyozyten mit und ohne Phenylephrin-Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigt sich keine Veränderung der Zellgröße durch die microRNA, jedoch durch die Phenylephrin-Stimulation beider Gruppen. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

3.2.3 Einfluss des „Knockdowns“ von miR-301a *in vitro* auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm

Nachdem wir die Wirkung der Überexpression von miR-301a mimics auf Kardiomyozyten *in vitro* überprüft hatten, wollten wir nun auch den „Knockdown“ von miR-301a mithilfe von Anti-micro-RNAs (microRNA Inhibitor von Exiqon) in Kardiomyozyten beobachten. Dazu führten wir am Anfang mehrere Testreihen mit verschiedenen Konzentrationen der Anti-micro-RNA-301a durch. Die neonatalen Kardiomyozyten wurden nach 24h unter Serumdeprivation mit der Anti-micro-RNA durch Lipofectaminetransfektion behandelt. Es war darauf zu achten, dass für die Transfektion Antibiotika-freies und serumfreies Medium benutzt wurde, damit die Zellen durch Antibiotikaaufnahme mittels Lipofectamine durch toxische Wirkung nicht abgetötet wurden. Die Zellen wurden nach weiteren 48h geerntet und der „Knockdown“ mittels quantitativer Multiplex-Realtime-PCR beurteilt. Im Konzentrationsbereich von 1 nM – 50 nM (siehe

Abbildung 3-19) ist ein höchst signifikanter „Knockdown“ zu sehen (10nM, $p < 0,001$). In allen weiteren Knockdown-Versuchen wurde mit 10 nM der Anti-micro-RNA weiter gearbeitet. Beim Gebrauch des microRNA Inhibitors von Exiqon wurde hingegen immer 100 pmol/well eingesetzt.

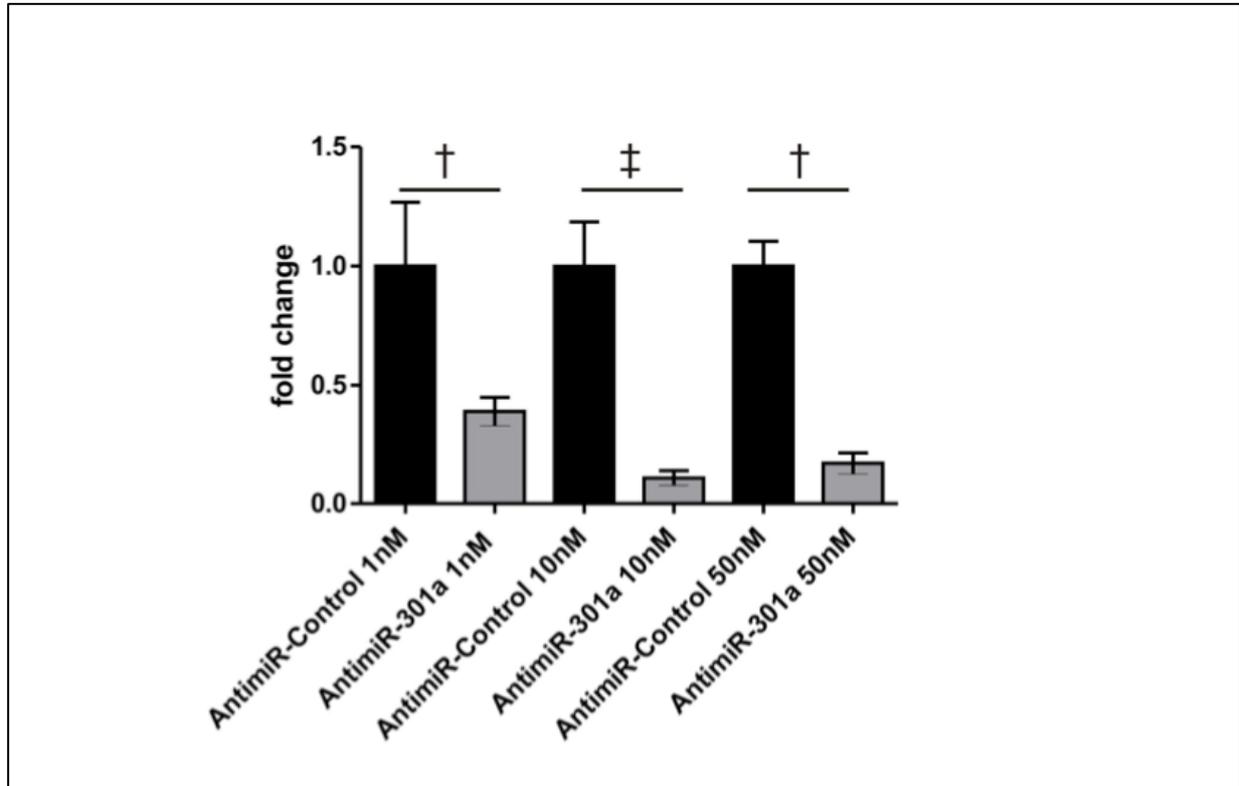


Abbildung 3-19: Quantitative Realtime-PCR für den „Knockdown“ der miR-301a durch die Anti-micro-RNA (miRCURY LNA microRNA Power Inhibitor von Exiqon) in neonatalen Kardiomyozyten (n=3) im Vergleich zur Anti-miR-Kontrolle, die für eine nonsense-anti-micro-RNA kodiert. Alle Konzentrationsbereiche (1 nM, 10 nM und 50 nM) führen zu einem hoch signifikanten „Knockdown“ der Anti-micro-RNA. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

In den „Knockdown-Versuchen“ mit der Anti-miR-301a mit dem microRNA Inhibitor von Exiqon wurden erneut die typischen Vertreter des hypertrophen Genprogramms *in vitro* mittels Multiplex-Realtime-PCR betrachtet. Hierbei führte der Gebrauch der AntimiR-301a zu einer verminderten Expression der untersuchten Transkripte. Am besten zeigte sich dies beim Transkript *Nppa* mit einem P-Wert von $< 0,001$. Der Einsatz des Hypertrophie-Stimulus PE mit 5 μM führte in den Kontrollgruppen zu einer starken Expression der Transkripte. Beim Versuch mit Anti-miR301a und PE zeigte sich nur ein verminderter Anstieg der Expression im Gegensatz zur alleinigen Beimpfung der neonatalen Kardiomyozyten mit PE.

In weiteren Versuchen mit Immunfärbungen zeigte sich keine Wirkung der Anti-micro-RNA-301a auf die Zellquerschnittsfläche der neonatalen Kardiomyozyten, die für 48h mit der Anti-

miR-301a behandelt wurden. Der Einsatz des Hypertrophie-Stimulus PE führte zu einer signifikanten Zunahme der Zellgröße. Die Zellquerschnittsflächen (μm^2) wurden immer unter 20-facher Vergrößerung bestimmt und mit dem BZ-9000 von Keyence wurden ca. 1000 Zellen pro Bedingung ausgemessen.

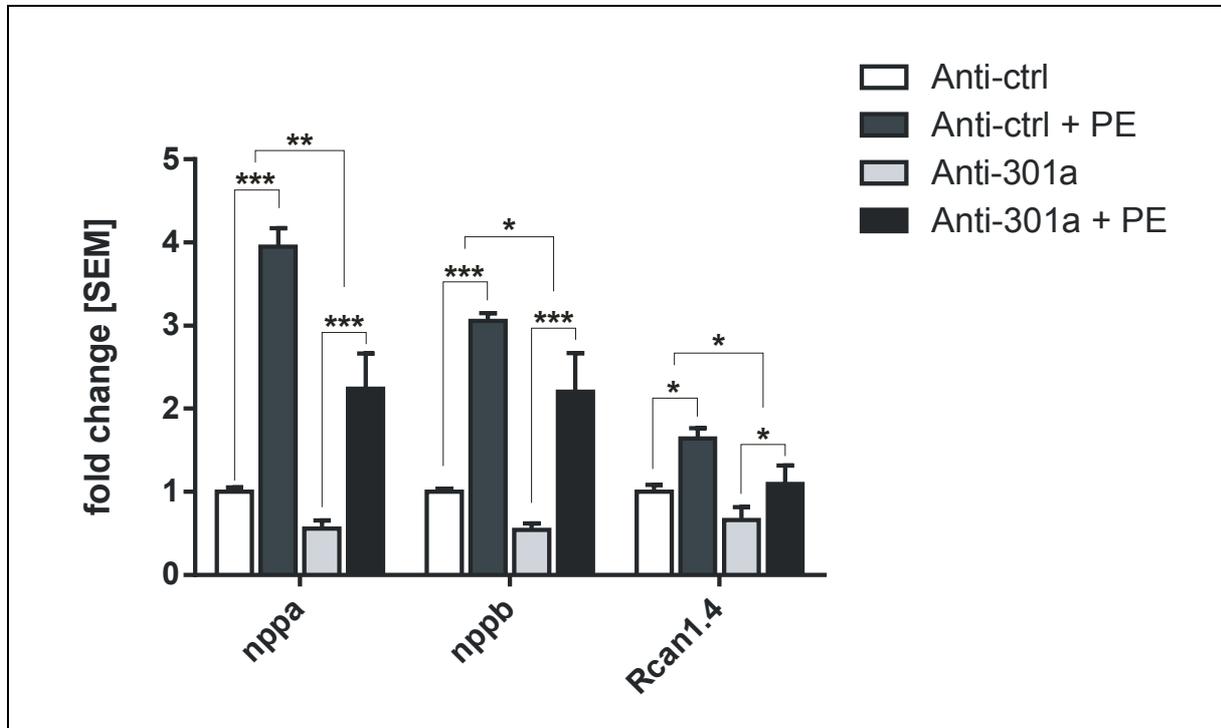


Abbildung 3-20: Multiplex-Realtime-PCR von *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1-4* mit Anti-miR-301a transfizierten Kardiomyozyten (n=3) mit und ohne Phenylephrin-Stimulation (PE 5 μM). Die Phenylephrin-Stimulation aktiviert *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1-4*. Beim zusätzlichen Einsatz von Anti-miR-301a kommt es zu einer verminderten Aktivierung der Transkripte. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

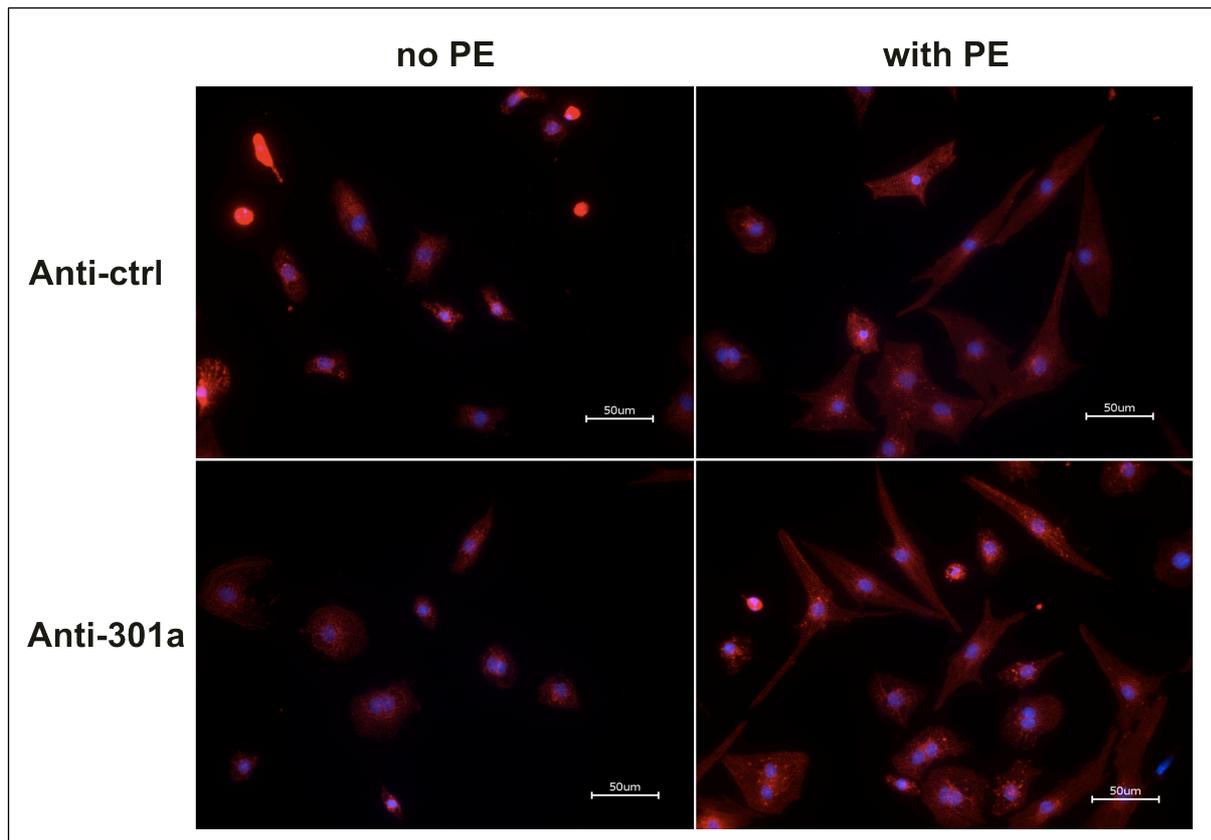


Abbildung 3-21: Zellgrößenbestimmung von mit Anti-miR-301a transfizierten Kardiomyozyten (n=979) und der Negativkontrolle durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit α -Actinin und DAPI mit und ohne Phenylephrin-Stimulation (PE 5 μ M). Maßstabballen: 50 μ m

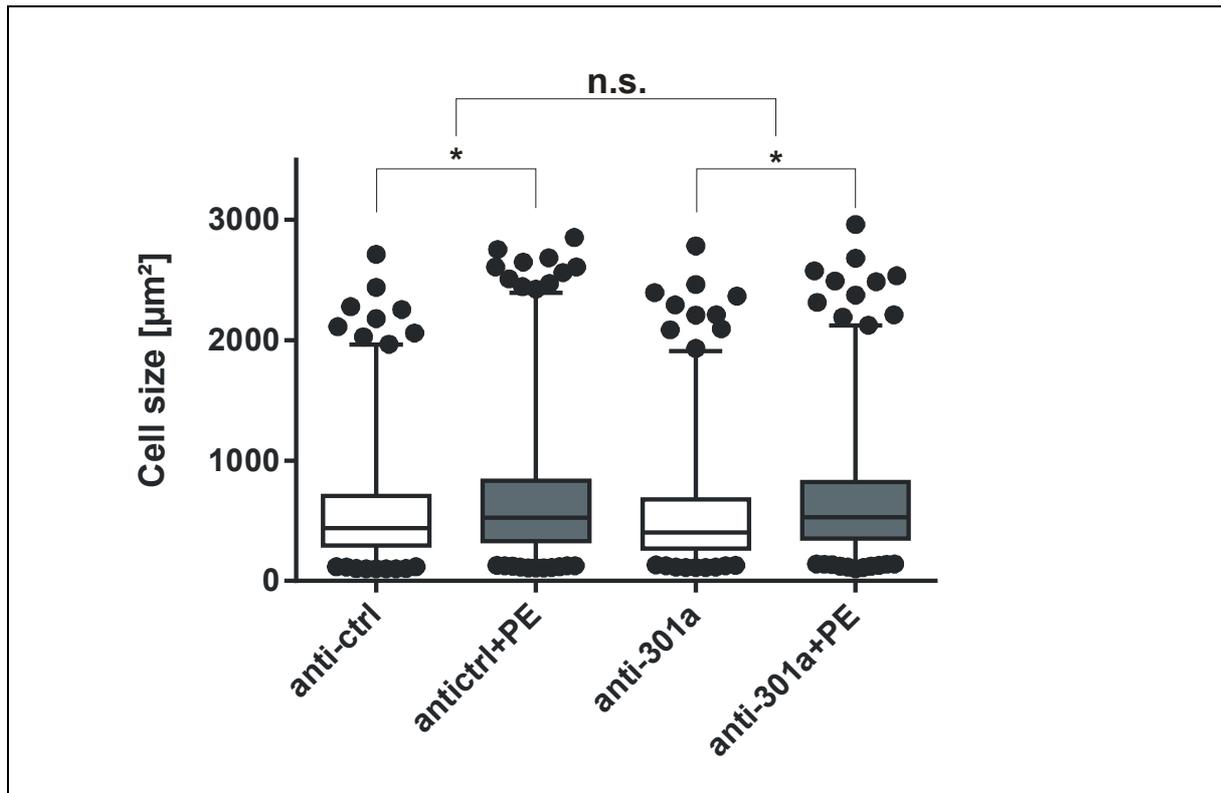


Abbildung 3-22: Darstellung der Zellgrößen im Box-Whiskers Blot für mit AntimiR-301a transfizierte neonatale Kardiomyozyten mit und ohne Phenylephrin-Stimulation (5 µM) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigt sich keine Veränderung der Zellgröße durch die Anti-microRNA, jedoch durch die Phenylephrin-Stimulation beider Gruppen. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

3.2.4 Einfluss der Überexpression von miR-298-5p *in vitro* auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm

Zur Evaluierung der Hypothese, dass die miR-298-5p einen Einfluss auf die Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie hat, wurden auch *in vitro* Versuche durchgeführt.

Um die Wirkung der adenoviralen Überexpression von miR-298-5p auf molekularer Ebene im Hinblick auf die Aktivierung des hypertrophen Genprogramms zu analysieren, betrachteten wir wieder die typischen Vertreter *Nppa*, *Nppb*, *Mhy7* und *RCAN1-4*. In den Versuchen wurden die ventrikulären Kardiomyozyten nach 24h unter Serumdeprivation mit dem AdmiR-298-5p infiziert und nach weiteren 24h pharmakologisch mit Phenylephrin (100 µM) behandelt. Nach der Ernte der Zellen und der Auswertung mittels quantitativer Realtime-PCR, zeigte sich eine deutliche Aktivierung des hypertrophen Genprogramms durch die microRNA. Vermehrt exprimiert wurden *Nppa* um den Faktor 5,69 ($\pm 0,76$ n=4), *Nppb* um den Faktor 6,70 ($\pm 1,37$ n=4), *Myh7* um den Faktor 2,17 ($\pm 0,21$ n=4) und *RCAN1-4* um 3,07 ($\pm 0,63$ n=4). Der additive Einsatz von Phenylephrin zeigte bei *Nppa* und *Nppb* einen zusätzlichen Effekt. Um nun zu

verifizieren, dass nicht nur auf molekularer Ebene eine Aktivierung der hypertrophen Gene, sondern auch sichtbare zelluläre Veränderungen in den Kardiomyozyten stattgefunden haben, wurde die Zellquerschnittsfläche (in μm^2) bestimmt. Als Vergleichsgruppe dienten über AdmiR-neg mit einer nonsense microRNA infizierte Kardiomyozyten. Schon mikroskopisch war eine Vergrößerung der Zellen nach immunzytologischer α -Actinin-Färbung zu erkennen. Um einzelne Zellen abgrenzen zu können, wurde auch eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. In der quantitativen Auswertung von 100 Zellen pro Bedingung konnte im Vergleich zur Kontrolle dann eine hoch signifikante Zellgrößenzunahme von ungefähr 38,5 % der AdmiR-298-5p behandelten Kardiomyozyten bestimmt werden. Die miR-298-5p führt also zu einer erheblichen zellulären Hypertrophie, wohingegen der additive Einsatz von PE keine Zunahme der Zellfläche auslöst. Warum die mit PE-behandelten Kardiomyozyten deutlich kleiner sind als die Zellen ohne PE-Stimulation, muss noch diskutiert werden. Vielleicht gibt es eine Wechselwirkung zwischen dem hypertrophen Stimulus PE und der miR-298-5p.

Da wir bezüglich der Genexpression *in vitro* signifikante Effekte auf RNA-Ebene detektieren konnten, sollten die Effekte auch auf Protein-Ebene überprüft werden. Für dieses Experiment wurden die Kardiomyozyten nach 24h unter Serumdeprivation mit der AdmiR-298-5p infiziert und dann auf Eis mit einem Kernlysepuffer geerntet. Der Western Blot (Abbildung 3-25 A) zeigte ein vermindertes Expressionsniveau von *RCAN1-4* in den mit AdmiR-298-5p infizierten Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch die quantitative Auswertung (Abbildung 3-25 B) bestätigte eine verminderte Expression auf den Faktor 0,33 ($\pm 0,04$ n=3). GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurde zusätzlich als Ladekontrolle benutzt, um die Proteinkonzentration in den unterschiedlich beladenen Spuren zu kontrollieren.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die Aktivierung des hypertrophen Genprogramms nicht nur auf RNA-Ebene zu sehen ist, sondern sich auch in der Zellgröße widerspiegelt, dieser Effekt jedoch noch nicht auf Protein-Ebene sichtbar war.

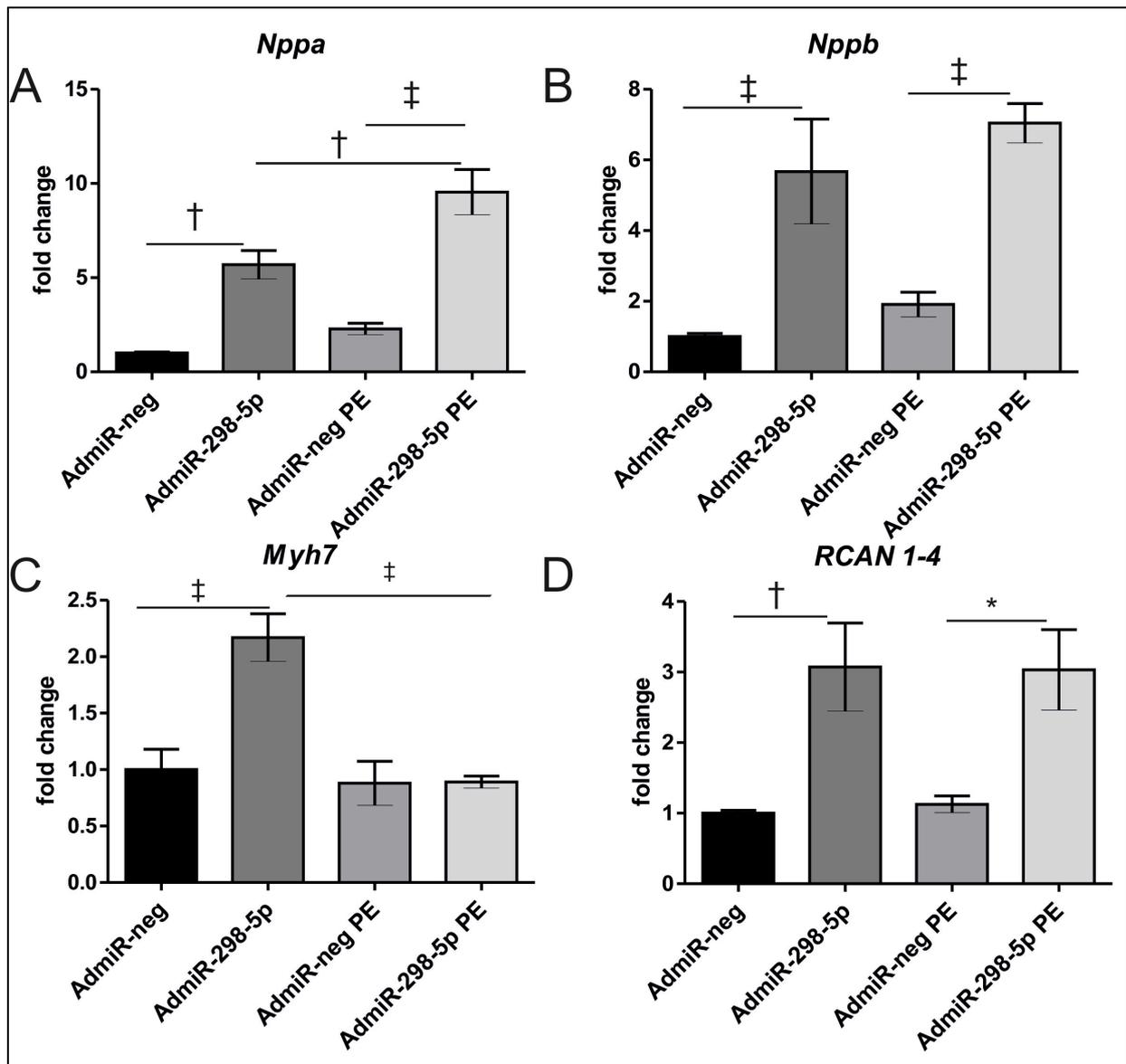


Abbildung 3-23 (A-D): Quantitative Realtime-PCR von *Nppa* (A), *Nppb* (B), *Myh7* (C) und *RCAN1-4* (D) von AdmiR-298-5p infizierten Kardiomyozyten (n=3) mit und ohne Phenylephrin-Stimulation (PE). Die microRNA-298-5p aktiviert die typischen Vertreter des hypertrophen Genprogramms. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

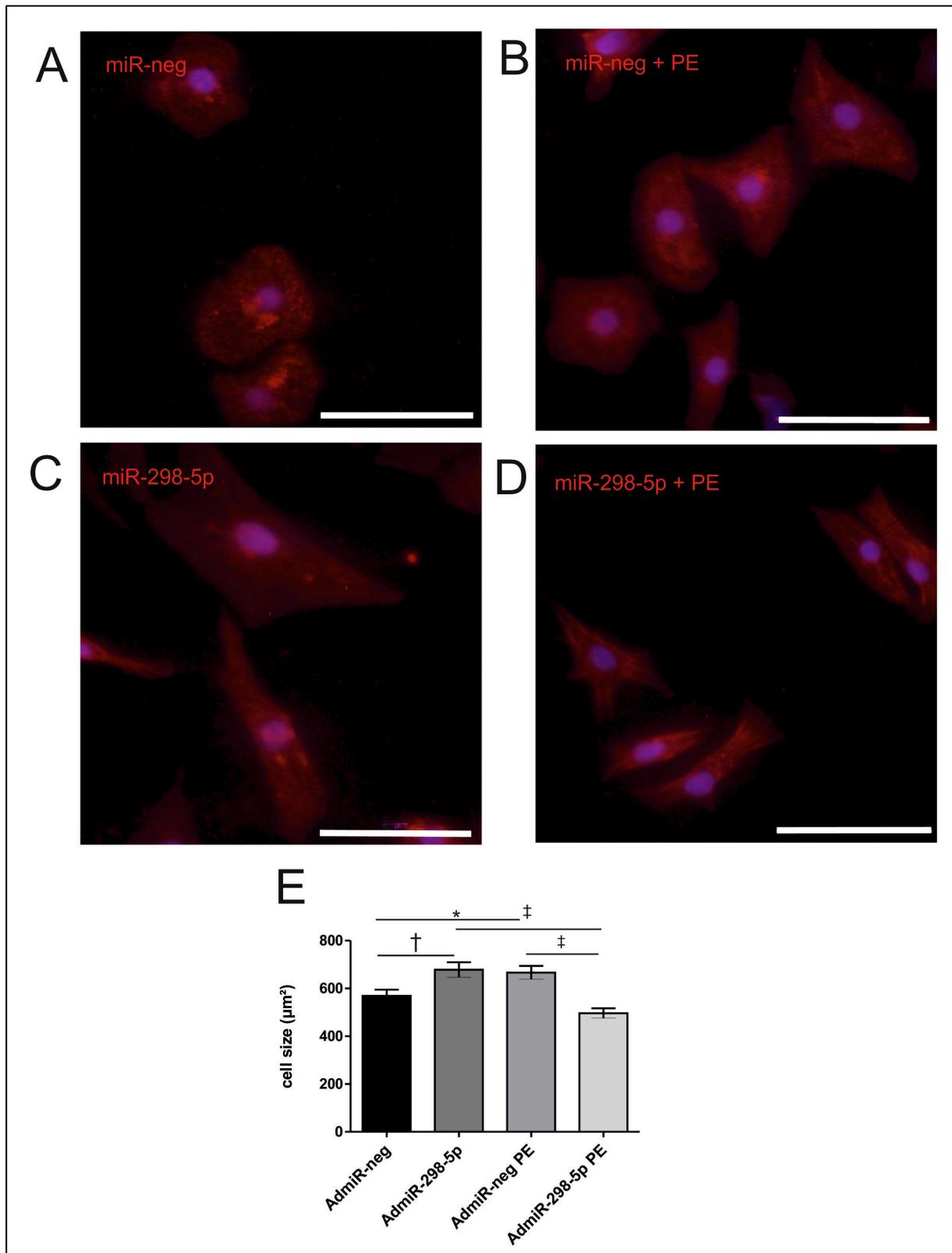


Abbildung 3-24 (A-E): Zellgrößenbestimmung von mit AdmiR-298-5p infizierten Kardiomyozyten (n=100) mit und ohne Phenylephrin-Stimulation (PE) im Vergleich zur Negativkontrolle durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit α -Actinin und DAPI. Die mit miR-298-5p behandelten Kardiomyozyten weisen eine hoch signifikante Vergrößerung auf. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM. Maßstabbalken: 50 μm .

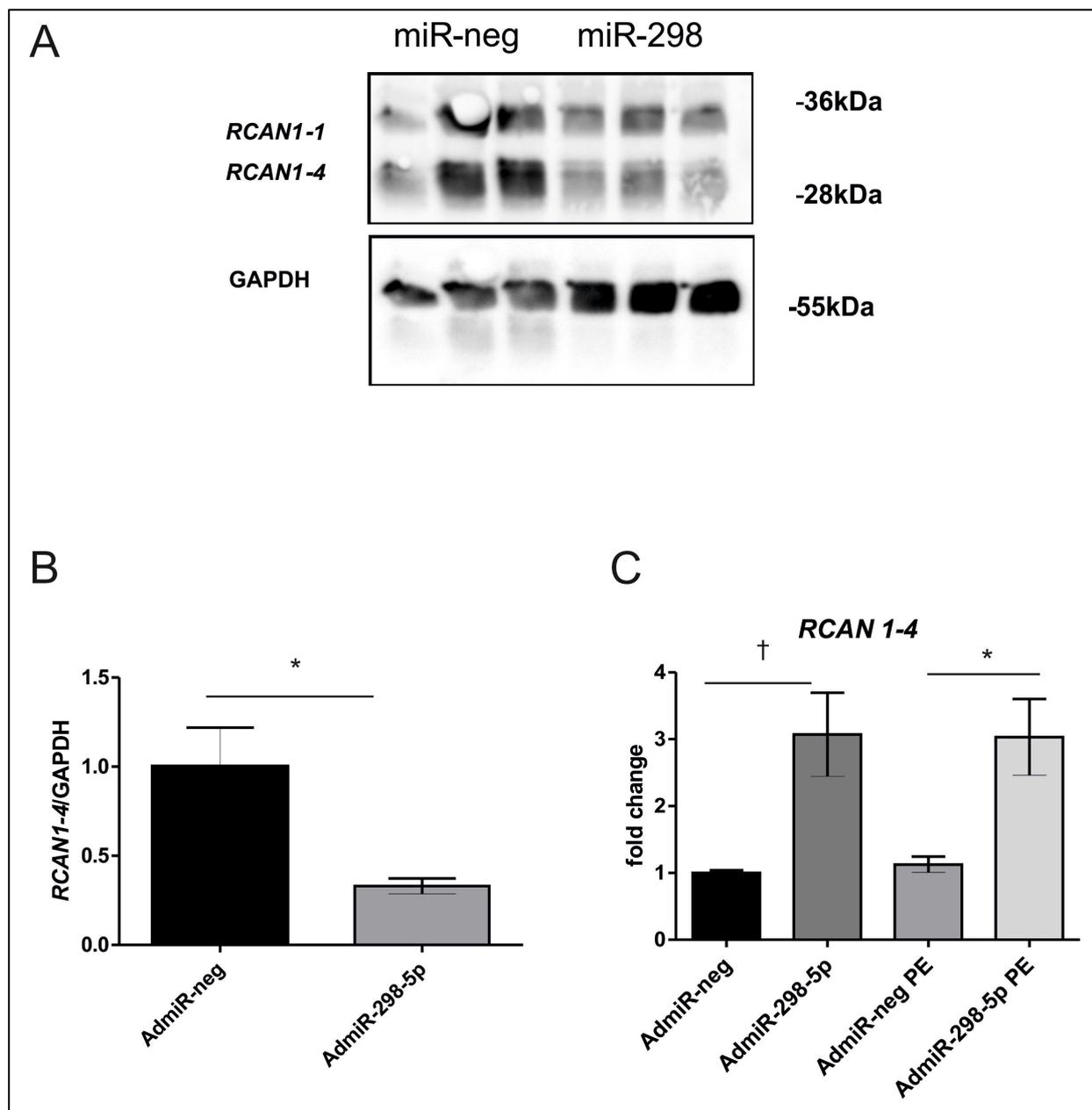


Abbildung 3-25 (A-C): Im Western Blot zeigt sich eine verminderte Expression von *RCAN1-4* (A) nach der Infizierung von Kardiomyozyten mit AdmiR-298-5p (n=3), wie man in der Quantifizierung durch GAPDH sehen kann (B). Auf RNA-Ebene (C) zeigt sich eine vermehrte Expression von *RCAN1-4* (n=4) mit und ohne Zugabe von Phenylephrin (PE) nach quantitativer Realtime-PCR. Signifikanzniveaus: * p < 0,05, † p < 0,01, ‡ p < 0,001. Fehlerbalken: SEM.

3.2.5 Einfluss des „Knockdowns“ von miR-298-5p *in vitro* auf das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm

Da durch die miR-298-5p eine Aktivierung des hypertrophen Genprogramms ausgelöst wird, wollten wir überprüfen, ob der Einsatz der Anti-micro-RNA (miRCURY LNA microRNA Power

Inhibitor von Exiqon) einen gegensätzlichen Effekt aufweist. Wir führten Versuche mit verschiedenen Konzentrationen der Anti-miR-298-5p durch, um zu prüfen, dass der „Knockdown“ in den Kardiomyozyten funktioniert. In Abbildung 26 kann man sehen, dass die Zellen nach der Transfektion von 1 nM, 10 nM und 50 nM Anti-micro-RNA die miR-298-5p vermindert exprimieren (auf Faktoren von 0,2-0,11). Da die besten Effekte mit 10 nM erreicht wurden, entschlossen wir uns mit dieser Konzentration in den folgenden Experimenten weiter zu arbeiten.

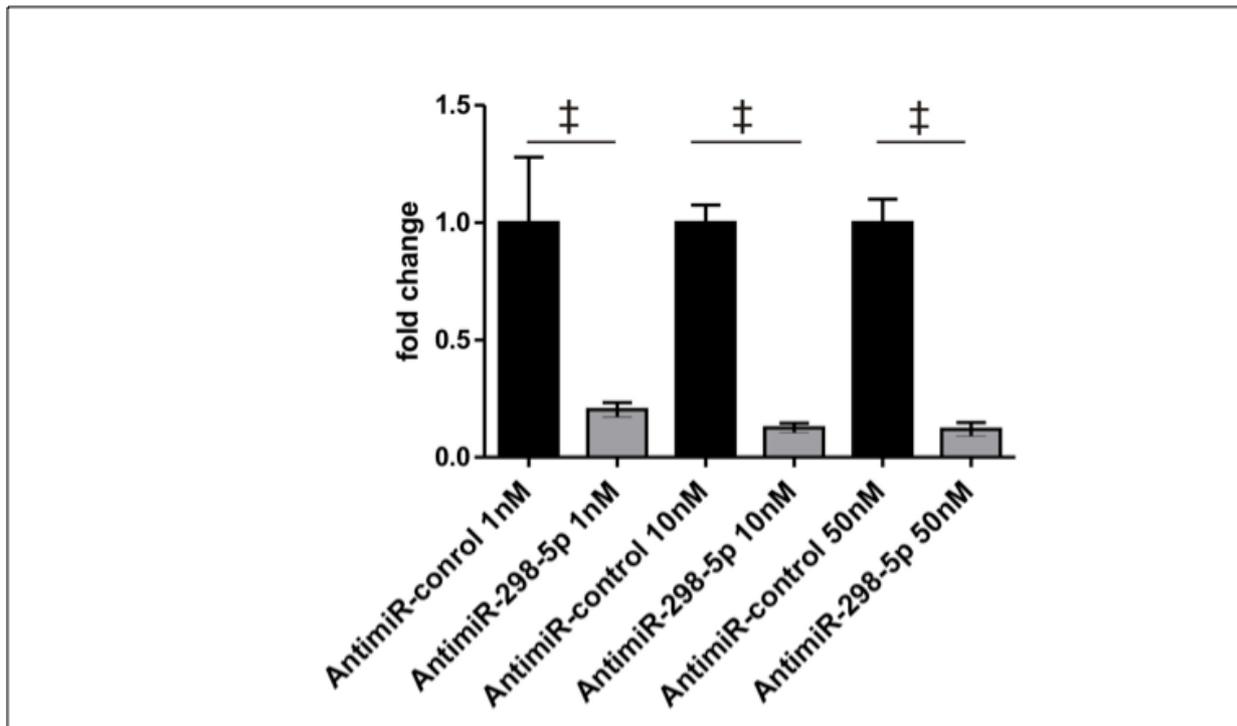


Abbildung 3-26: Quantitative Realtime-PCR für den „Knockdown“ der miR-298-5p durch die Anti-micro-RNA in neonatalen Kardiomyozyten im Vergleich zur Anti-miR-Kontrolle, welche für eine nonsense-anti-micro-RNA kodiert. Alle Konzentrationsbereiche (1 nM, 10 nM und 50 nM) führen zu einem höchst signifikanten Knockdown der Anti-micro-RNA. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

Die Analyse des Hypertrophie-assoziierten Genprogramms von mit Anti-miR-298-5p behandelten Zellen, löste keinen signifikanten Effekt auf die Kardiomyozyten aus, wie in Abbildung 3-27 A-D zu sehen ist. Passend zu diesen Ergebnissen hat die Anti-miR-298-5p auch keinen Einfluss auf die Zellgröße (Abbildung 3-28), obwohl sich ein nicht signifikanter Trend zur Reduktion der Zellgröße bei den Anti-miR-298-5p behandelten Kardiomyozyten zeigt.

So hat die miR-298-5p hinsichtlich des hypertrophen Genprogramms eine Wirkung auf ventrikuläre Kardiomyozyten. Die gegensätzliche Wirkung lässt sich aber durch die Anti-miR-298-5p in dieser Arbeit noch nicht bestätigen.

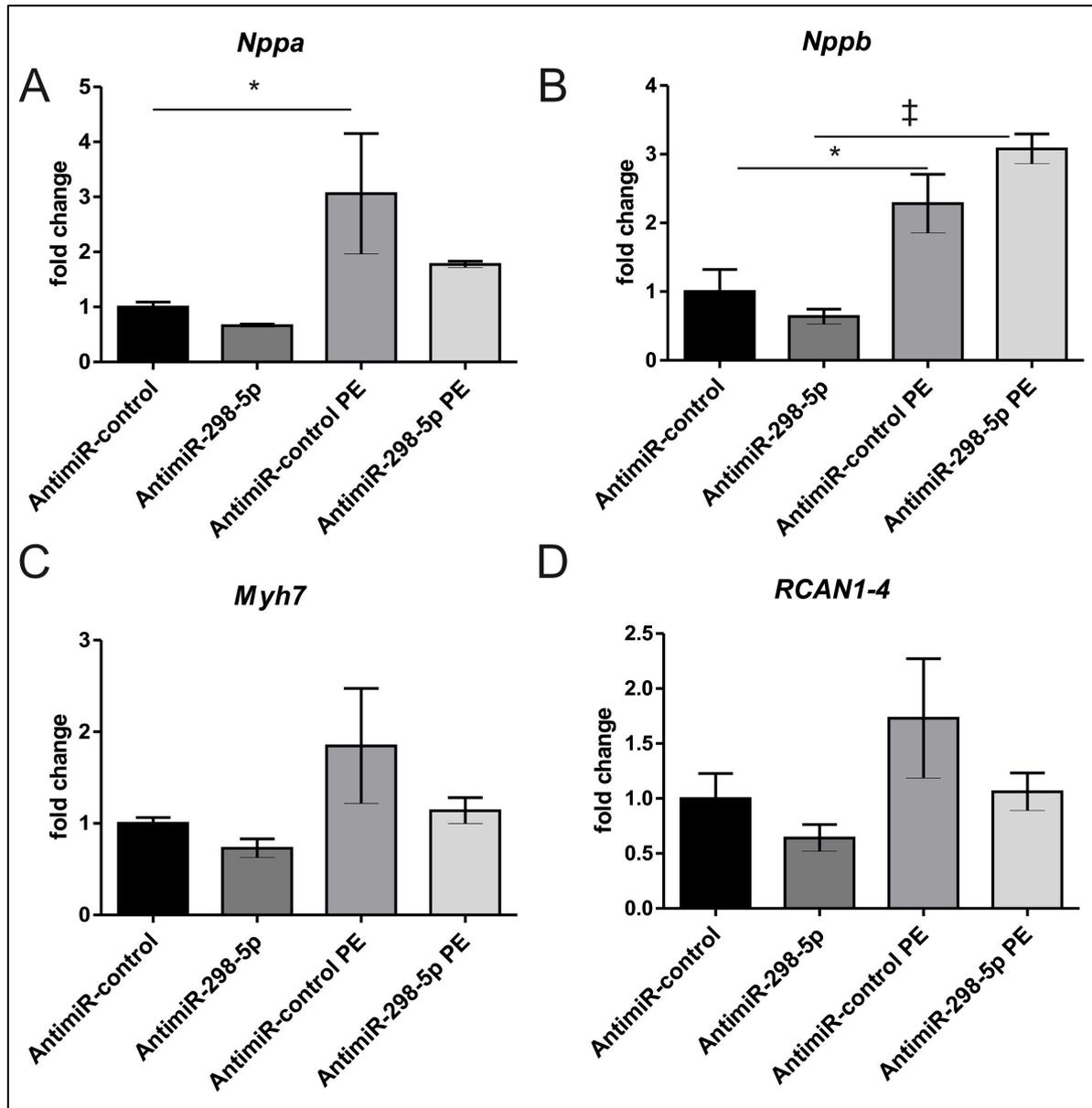


Abbildung 3-27 (A-D): Quantitative Realtime-PCR von *Nppa* (A), *Nppb* (B), *Myh7* (C) und *RCAN1-4* (D) von Anti-miR-298-5p transfizierten Kardiomyozyten (n=3) mit und ohne Phenylephrin-Stimulation (PE). Die Aktivierung des hypertrophen Genprogramms ließ sich durch die Phenylephrin-Stimulation auslösen, wohingegen die Anti-miR-298-5p keine signifikante Wirkung auf die typischen Vertreter des hypertrophen Genprogramms hat. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, † $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$. Fehlerbalken: SEM.

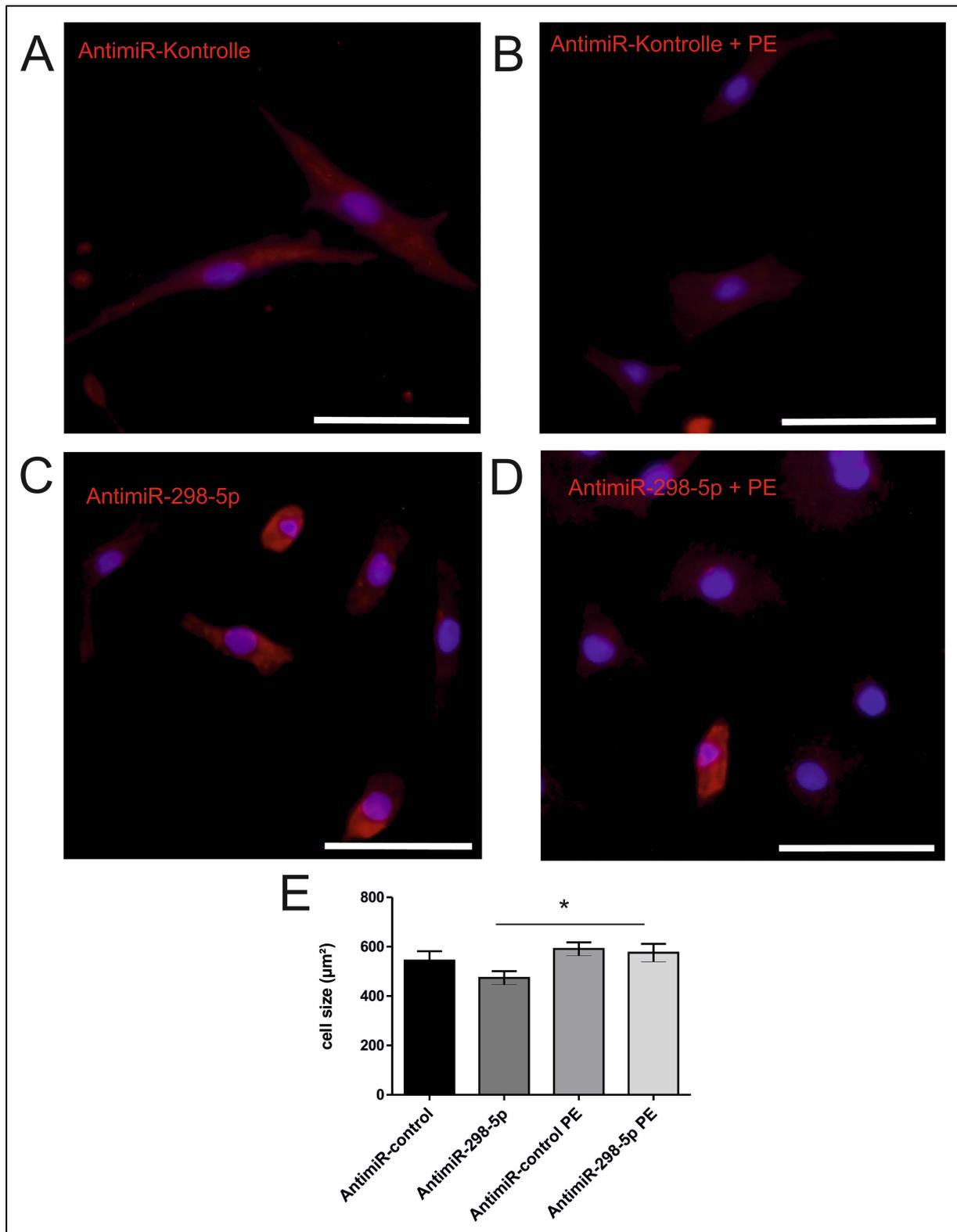


Abbildung 3-28 (A-E): Zellgrößenbestimmung von mit Anti-miR-298-5p transfizierten Kardiomyozyten (n=108-115) und der Negativkontrolle durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit α -Actinin und DAPI mit und ohne Phenylephrin-Stimulation (PE). Es zeigt sich keine Veränderung der Zellgröße durch die Anti-micro-RNA 298-5p. Fehlerbalken: SEM. Maßstabbalken: 50 μm .

4. Diskussion

4.1 „Knockout“ von Calsarcin1 vermittelt eine dilatative Kardiomyopathie *in vivo*

Die primäre dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist im Langzeitverlauf ein Risikofaktor für die Entwicklung einer ausgeprägten globalen Herzinsuffizienz und Arrhythmien (Taylor et al., 2006, George, 2013). Die DCM weist eine 5-Jahres-Sterblichkeit von 20% auf und erhöht das Risiko am plötzlichen Herztod zu versterben (Zipes et al., 2006). Die Patienten profitieren davon, wenn man die Vorlast senkt und das Remodeling damit versucht zu verhindern (Bonow et al., 2006). Die einzige Möglichkeit die DCM kurativ zu behandeln, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Herztransplantation. Deswegen ist es von größter Wichtigkeit andere Behandlungsstrategien zu erforschen.

Wie wir in dieser Arbeit zeigen konnten, ist das herzspezifische Calsarcin1 eine Schlüsselkomponente in der Entwicklung eines kardialen dilatativen Phänotyps. In unserer Studie entwickelten die Calsarcin1-„knockout“-Mäuse in einem reinen C57/Bl6-Hintergrund einen makroskopischen Phänotyp der DCM, jedoch weder eine phänotypische kardiale Hypertrophie, noch eine Zunahme der Zellgröße in histologischen Schnitten, obwohl eine Dilatation des linken Ventrikels in den H&E-Färbungen zu sehen war. Auch war keine Entwicklung von Fibrose in den Calsarcin1-„knockout“-Mäusen zu beobachten. Die Echokardiographie bestätigte die Entwicklung der DCM mit den diagnostischen Kriterien einer LVEDD-Erhöhung ($p < 0,001$), einer Reduktion der septalen Wandstärke ($p < 0,001$) und einem eingeschränkten *Fractional Shortening* ($p < 0,001$). So entwickeln die Calsarcin1-„knockout“-Mäuse kein pathologisches Herzmuskelwachstum, sondern ein Funktionsverlust mit Gefügedilatation auf dem Boden genetischer Veränderungen.

Auffällig ist die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs, die durch die verstärkte Expression von *RCAN1-4* mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ auf RNA-Ebene und Protein-Ebene im Maus-Modell nachgewiesen werden konnte. Die Pathogenese der DCM ist jedoch durch die Calcineurin-Aktivierung nicht hinreichend erklärt. Insbesondere fällt die fehlende Hypertrophie der einzelnen Kardiomyozyten auf, die in anderen Mausmodellen mit Calcineurin-Aktivierung (Molkentin et al., 1998) zu beobachten ist. Die Isoform von *RCAN1-4* steht unter der Kontrolle eines Promotors, der 15 NFAT-Bindungsstellen aufweist (Yang et al., 2000). Somit kann durch die Expression von *RCAN1-4* die Calcineurin-Aktivität beurteilt werden (Frey et al., 2004, van Rooij et al., 2004).

Auch andere typische Vertreter des „fötalen“ Genprofils wie *Nppa*, *Nppb* und *Myh7* waren in beiden Geschlechtern hochreguliert, ohne dass es dabei zur Entwicklung einer Hypertrophie kam, wie die morphologischen und mikroskopischen Daten zeigen. Besonders interessant ist dabei die verstärkte Expression von *Myh7* mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$, da Mutationen in diesem Gen als Grund für die familiäre DCM diskutiert werden (Heineke et al.,

2010). Dass dieses in den Calsarcin1-„knockout“-Mäusen nun verändert exprimiert wurde, kann den Zusammenhang nochmals verstärken. Aber auch andere Mutationen z. B. in Zypher/ZASP/Oracle wurden in DCM Patienten gehäuft entdeckt und sind Bestandteil aktueller Forschung (Vatta et al., 2003).

4.1.1 Mechanismen für die Regulation und Funktion von Calsarcin1

Vor einiger Zeit konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die herzspezifische Überexpression von Calsarcin1 die pharmakologische induzierte Hypertrophie verhindert. In einem Versuch der Arbeitsgruppe von Frank et al. entwickelten Calsarcin-1-transgenen Mäuse keinen kardialen pathologischen Phänotyp und keine kardiale Hypertrophie nach Angiotensingabe trotz eines Blutdruckanstiegs. Jedoch konnte eine Angiotensin-II-induzierte kardiale Hypertrophie durch die Überexpression von Calsarcin-1 *in vitro* vermindert werden. Auch im Mausmodell konnte die Induktion von *RCAN1-4* durch Angiotensin II durch Calsarcin1 verhindert werden. Diese Tatsache ist daher wahrscheinlich auf eine Inhibition des Calcineurin-Signalwegs zurückzuführen. So scheint die Überexpression von Calsarcin-1 ein möglicher Ansatz zu sein, um pathologische kardiale Hypertrophie abzuschwächen (Frank et al., 2007b).

In anderen Experimenten der Arbeitsgruppe aktivieren Calsarcin1-defiziente Mäuse in einem gemischten genetischen Hintergrund das Hypertrophie-assoziierte Genprogramm, ohne dabei einen hypertrophen oder dilatativen kardialen Phänotyp zu entwickeln. So scheint das Fehlen von Calsarcin1 *in vivo* den Calcineurin-NFAT-Signalweg zu aktivieren und das „fötale“ hypertrophe Genprogramm einzuschalten, aber nicht stark genug zu sein, um einen hypertrophen Phänotyp zu entwickeln (Heineke et al., 2005, Frey et al., 2000). Möglicherweise spielen auf weitere Signalwege eine Rolle, so entwickeln die Mäuse interessanterweise durch pathologische Hypertrophie-Stimuli, wie eine erhöhte Druckbelastung, durch sog. aortales Banding eine myokardiale Hypertrophie, nicht jedoch durch pharmakologische Hypertrophie-Stimulation wie zum Beispiel Katecholamine (Isoproterenol). Das Fehlen von Calsarcin-1 sensibilisiert also das Herz gegenüber Calcineurin-vermittelter Myokardhypertrophie *in vivo* (Frey et al., 2004).

Insgesamt konnten diese Ergebnisse durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden, da auch in diesem Modell das hypertrophe Genprogramm aktiviert worden ist ohne das Vollbild eines hypertrophen Phänotyps zum Vorschein zu bringen. Zusätzlich kam es jedoch zur Entwicklung eines dilatativen kardialen Phänotyps. Da es einige phänotypische Unterschiede innerhalb der B6-Unterstämmen gibt (Bryant et al., 2008), war es wichtig diese Veränderungen diesmal in einem reinen C57/Bl6 genetischen Hintergrund zu erfassen, um die Ergebnisse der Untersuchungen zu verifizieren. Ein interessanter Aspekt dabei ist, dass typische

Begleitveränderungen der DCM wie Hypertrophie einzelner Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene und Fibrose fehlen.

4.2 Die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs durch Calcicarin1

Im adulten Herzen reguliert der Calcineurin-NFAT-Signalweg das hypertrophe Wachstum von Kardiomyozyten bei Erkrankungen, die mit Veränderungen des Ca^{2+} -Spiegels einhergehen (Maillet et al., 2010, van Berlo et al., 2013). So wurde schon vor Jahren gezeigt, dass die Aktivierung von Calcineurin kardiale Hypertrophie induziert und der Einsatz von Calcineurin-Inhibitoren wie FK506 druckinduzierte Hypertrophie wie auch Fibrose verhindern kann, ohne hämodynamische Eigenschaften zu verändern (Shimoyama et al., 1999).

In Studien wurde belegt, dass das Fehlen von Calcineurin A β in transgenen Mäusen bei der Behandlung mit Hypertrophie-Stimuli, wie einer Angiotensin-Infusions-Minipumpe, keine kardiale Hypertrophie auslöst anders als in den Kontroll-Tieren. Auch eine erhöhte Druckbelastung, induziert durch aortale Konstriktion, führte nur zu einem Anstieg des Quotienten aus Herzgewicht/Tibiallänge von 13%, wobei die Wildtyp-Kontrollen einen Anstieg von 39% erreichten. Des Weiteren war auf RNA-Ebene der Hypertrophie-Marker α -Actin signifikant reduziert (Bueno et al., 2002). In neusten Publikationen wurde zusätzlich geschildert, dass das Fehlen von Calcineurin A β in Mäusen zur Entwicklung von metabolischen Komplikationen führt und es bei transplantierten Patienten, die mit dem Immunsuppressivum CyclosporinA, ein Inhibitor von Calcineurin, behandelt wurden, ebenfalls zur Entstehung von metabolischen Komplikationen kam. So scheint Calcineurin nicht nur in der Entwicklung von Hypertrophie und Fibrose, sondern auch im metabolischen Prozessen durch die Regulation der Phosphodiesterase 3B und 4D eine Rolle zu spielen (Suk et al., 2013). Andererseits gibt es experimentelle Studien in denen doppel-„knockout“-Mäuse mit einem Defizit an MLP (Muscle lim protein) und Calcineurin A β generiert wurden von denen 73% innerhalb der ersten 20 Tage mit Zeichen der Kardiomyopathie verstarben. Bei den entsprechenden Tieren kam es zu einer systolischen Dysfunktion und zur Entwicklung von Fibrosen und Nekrosen. Moderate Calcineurin Überexpression verbesserte hingegen die Pumpfunktion der MLP-„knockout“-Mäuse. Diese Ergebnisse sprechen eher für eine protektive Wirkung des endogenen Calcineurins im Myokard bei bestehender DCM (Heineke et al., 2010). So ist es möglich, dass die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs bei den Calcicarin1-„knockout“-Mäusen in unseren Experimenten einen positiven Effekt hat und die Mäuse deswegen keine typischen sekundären Veränderungen wie Hypertrophie und Fibrose entwickeln.

Die Arbeit von Maillet et al. zeigt allerdings zwar nicht im Kontext einer DCM im Umkehrschluss negative Aspekte bei der Deletion von Calcineurin auf. So geht die Deletion von Calcineurin mit erhöhter Letalität, Veränderungen der rechtsventrikulären Morphologie,

reduzierten ventrikulären Trabeklen, septalen Defekten und Klappenhypertrophie einher. Außerdem hat das Fehlen von Calcineurin direkten Einfluss auf die Zellproliferation (Maillet et al., 2010). Eine andere Publikation von 2005 beschäftigte sich mit der Deletion des CnA β -Promotors, welche die Reduktion von NFAT, GATA4 und die hypertrophe Aktivierung hervorruft. Im Gegensatz dazu war der CnA β -Promotor in anderen Versuchen bei hypertropher Stimulation durch einen positiven Feedback-Mechanismus von NFAT- und GATA4-Transkriptionsfaktoren aktiviert. Daraus lässt sich herleiten, dass die Calcineurin-Expression bei Wachstumsstimulation ansteigt (Oka et al., 2005). Die verstärkte Expression von *RCAN1-1* und *RCAN1-4* auf Protein- und RNA-Ebene in unserem Calsarcin1-„knockout“-Modell spricht für eine Aktivierung des Calcineurin-Signalwegs. So führt der „Knockdown“ von Calsarcin1 zur Aktivierung des Calcineurin-Signalwegs.

Die Wirkung von Calcineurin wird in der Literatur kontrovers diskutiert und gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit auch andere Mechanismen betrachtet, die einen DCM auslösen könnten.

4.3 MiR-298-5p und miR-301a als differentiell regulierte microRNAs in der dilatativen Kardiomyopathie

Im Rahmen von microRNA-Microarray-Analysen dieser Arbeit konnten einige miRs im Calsarcin1-„knockout“-Modell identifiziert werden, die bei der DCM differentiell reguliert zu sein scheinen. Von diesen miRs untersuchten wir 15 in dieser Arbeit anhand eines neuen Calsarcin1-„knockout“-Modells in einem reinen C57/Bl6 genetischen Hintergrund und fanden zwei differentiell regulierte miRs (miR-298-5p und miR-301a), die in der Pathogenese der DCM beteiligt sein könnten. Die miR-298-5p war in den Calsarcin1-„knockout“-Mäusen um den Faktor 2,88 mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ hochreguliert, während die miR-301a auf das 0,31-fache mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ herunterreguliert war. Um die genaue Funktion der miRs zu entschlüsseln und den Einfluss auf Kardiomyozyten *in vitro* zu analysieren, untersuchten wir die Effekte der Überexpression und des „Knockdowns“ mittels AntimiRs auf RNA- und Protein-Ebene sowie die mikroskopischen Veränderungen der Zellen.

Bei einer Datenbankanalyse von über 250 kurzen RNA-cDNA-Bibliotheken aus 26 unterschiedlicher Organsysteme und Zelltypen im Menschen wurde die gewebespezifische Expression von miR-301a im Bindegewebe und endokrinen Drüsen publiziert (Landgraf et al., 2007). Wir konnten auch die Expression der miR-301a im Herzen nachgeweisen.

Die miR-301 und miR-298 wurden auch in differenzierten und undifferenzierten embryonalen Mäusestammzellen nachgewiesen, allerdings wurde dies in den entsprechenden Northern-Blot-Analysen nicht bestätigt (Houbaviv et al., 2003). Die verstärkte Expression der miR-301a

und miR-298-5p in Mäuseembryonen (e12.5) und neugeborenen Mäusen verstärkt jedoch die Vermutung, dass diese miRs in der Embryogenese eine Rolle spielen (Chiang et al., 2010). Dass die Genexpression von miRs bei kardialen Veränderungen wie z. B. der Herzinsuffizienz differentiell reguliert ist, ist seit längerem bekannt, die exakten Gründe sind doch weiterhin unklar. In einer Studie mit DCM-Patienten wurden spezifische Veränderungen des microRNA-Expressionsprofils entschlüsselt. Es wurden damals neun differentiell regulierte miRs identifiziert (hsa-miR-001, hsa-miR-29b, hsa-miR-007, hsa-miR-378, hsa-miR-214, hsa-miR-342, hsa-miR-145, hsa-miR-125b, hsa-miR-181b). Diese Veränderungen des miR-Expressionsprofils bei DCM-Patienten ist ein Indikator für die große Rolle der miRs bei der Pathogenese der DCM (Naga Prasad et al., 2009).

4.4 Heraufregulation von miR-298-5p in Calsarcin1-„knockout“-Mäusen

Die miR-mmu-298-5p ist auf Chromosom 2 lokalisiert und wird in den Keimdrüsen exprimiert (Ahn et al., 2010). Kürzlich durchgeführte Studien mit der miR-298-5p zeigten, dass die Inhibition von miR-298-5p die Expression der Zielgene IGF 1R α und TNF β verändert und dies ein wichtiger Faktor bei der Resistenz gegen Apoptose bei Pankreaszellen in Säugetieren ist (Barbagallo et al., 2013). Somit scheint die miR-298-5p einen Einfluss auf die Zellvitalität zu haben.

Die vermehrte Expression von miR-298-5p in den Calsarcin1-„knockout“-Mäusen könnte im Zusammenhang mit der Pathogenese der DCM und den veränderten Zellfunktionen stehen. Bei der adenoviralen Überexpression von miR-298-5p *in vitro* war das „fötale“ Hypertrophie-assoziierte Genexpressionsprofil auf RNA-Ebene aktiviert. So waren *Nppa*, *Nppb*, *Myh7* und *RCAN1-4* signifikant erhöht, was für eine Calcineurin-Aktivierung durch miR-298-5p spricht. Durch den Einsatz von Phenylephrin kam es sogar zu einem additiven Effekt. Dass die miR-298-5p nicht nur auf molekularer Ebene, sondern auch auf zellulärer Ebene für Hypertrophie verantwortlich zu sein scheint, konnte durch eine starke Zunahme der Zellgröße um ca. 38,5% gezeigt werden. Die vermehrte Expression von miR-298-5p scheint somit eine wichtige Bedeutung im Zellwachstum zu haben. Auffallend ist das gegensätzlich verminderte Expressionsniveau auf Protein-Ebene von *RCAN1-4* in mit AdmiR-298-5p behandelten Kardiomyozyten. So wurde *RCAN1-4* auf RNA-Ebene vermehrt exprimiert und auf Protein-Ebene vermindert exprimiert. Dies ist überraschend, da wir im Calsarcin1-„knockout“-Modell sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene eine vermehrte Expression von *RCAN1-4* gesehen haben. Da mit dem Antikörper GAPDH, der als Ladekontrolle im Western Blot benutzt wurde, aber keine gleichmäßige Proteinkonzentration nachgewiesen werden konnte, müssen die Ergebnisse auf Protein-Ebene sehr kritisch betrachtet werden.

Die *in vitro* Versuche mit der Anti-miR-298-5p mit dem microRNA Power Inhibitor von Exiqon hatten keinen Effekt auf das Hypertrophie-assoziierte Genexpressionsprofil und auf die

Zellgröße der Kardiomyozyten in unseren Versuchen. So konnte ein vermuteter protektiver Effekt durch die Inhibition der miR-298-5p in dieser Arbeit noch nicht bestätigt werden. Diese Versuche sollten gegebenenfalls wie bei den Versuchen mit der Anti-miR-301a mit dem microRNA Inhibitor von Exiqon wiederholt werden. Bei der Nutzung von „Power Inhibitoren“ von Exiqon kann es in Muskel- und Nervenzellen schneller durch die phosphorothioate-modifizierten Oligonukleotide zu einem toxischen Effekt kommen.

Auch die durchgeführten Versuche zum Nachweis des „Knockdowns“ der miR-298-5p in den Kardiomyozyten, mit verschiedenen Konzentrationen der Anti-miR-298-5p mittels quantitativer Realtime-PCR (qRT), dürfen nur mit Vorsicht gewertet werden, auch wenn die qRT in der Literatur als Verfahren hierfür angewendet wird. Typischerweise wird die Anwendung der qPCR nicht empfohlen, da es durch die Anti-miR nur zu einer Inhibition, nicht aber zur Degradierung der miR kommt, und dieser Effekt durch die qRT aufgehoben werden kann.

Welche Signalkaskaden durch die miR-298-5p aktiviert werden und was die potentiellen Zielstrukturen dieser miRs sind wird Teil weiterer Studien sein.

4.5 Herunterregulation von miR-301a in Calsarcin1-„knockout“-Mäusen

Die miR-301 besteht aus 23 Nukleotiden und ist auf dem Chromosom 17q22 lokalisiert. Die Grundsequenz des homologen stem loops ist in Maus, Ratte, Kugelfisch und Menschen konserviert. Die miR-301a ist derzeit Bestandteil vieler experimenteller Studien, auch weil sie in humanen embryonalen Stammzellen exprimiert wird. Bei Untersuchungen humaner Stammzellen wurde zwar keine spezifische Expression in ES-Zellen nachgewiesen, wohl aber das reichliche Vorhandensein in HeLa-Zellen. Dies könnte ein Anhaltspunkt für die Rolle der miR-301a bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen sein (Suh et al., 2004).

Die miR-301a gehört zur Genfamilie der miR-103 und ist Vertebraten-spezifisch (miRbase). Das Zielgen der miR-103 ist PANK1/2, das verantwortlich für die Funktion der Pantothenatkinase ist, welche für die Biosynthese von CoenzymA benötigt wird. Somit scheint die miR-103-Genfamilie in Stoffwechselprozesse eingebunden zu sein (Weber, 2005).

Aufmerksam auf die miR-301a wurde man 2012, als die vermehrte Expression in Pankreaskarzinomen aufgedeckt und das Fehlen der miR-301a mit einer verminderten Zellproliferation in Zusammenhang gebracht wurde (Chen et al., 2012). Andere Arbeiten zeigten, dass die miR-301a direkt die 3'UTR des Bim-Gens reguliert und damit die Proteinexpression inhibiert. Auch wurde miR-301a als Aktivator von NFκB durch die Herunterregulation von *NF-κB-repressing factor (NKRF)* in Pankreas-Adenokarzinomen identifiziert (Lu et al., 2011). Im Rahmen von Untersuchungen bei Magenkarzinomen wurde die miR-301a auch mit Zellproliferation in Verbindung gebracht (Wang et al., 2013). Die Hochregulation der miR-301a wurde außerdem beim hepatozellulären Karzinom beobachtet

(Zhou et al., 2012). Diese Daten zeigen, dass die miR-301a eine entscheidende Rolle im Zellzyklus bei Karzinomen spielen könnte.

Andererseits gibt es einige Studien zur Rolle der miR-301a in Bezug auf autoimmune Erkrankungen. So geht die Myelin-Antigen-Stimulation mit einer Hochregulation von miR-301a einher und auch im Tiermodell wurde eine vermehrte Expression in T-Zellen bei autoimmuner Enzephalopathie beobachtet. Durch den Gebrauch von spezifischen AntimiRs und AntagomiRs der miR-301a konnte gezeigt werden, dass die miR in der Entwicklung von T-Helferzellen Typ 17 durch den IL-6/23–STAT3-Signalweg beteiligt ist. Der Einfluss von miR-301a auf die Regulation von Myelin-reaktiven T-Helferzellen vom Typ 17 lässt auf die Bedeutung als Therapeutikum zur Kontrolle autoimmuner Demyelinisierung schließen (Mycko et al., 2012). Auch wurde die reduzierte Expression von miR-301a in humanen pulmonaren Endothelzellen beim Einsatz von PIGF (plasminogen activator inhibitor-1 by placenta growth factor) beobachtet (Patel et al., 2011).

Im Herzen ist eine vermehrte Expression von miR-301a im Ventrikel aufgefallen, dabei reguliert miR-301a Kv4.2, einen Kaliumkanal, der auch in der Pathogenese von Diabetes eine Rolle spielt (Panguluri et al., 2013).

In unseren Calsarcin1-ko-Modell ist die miR-301a signifikant herunterreguliert.

Bei der Überexpression der miR-301a *in vitro* mit miR mimics bei Versuchen mit neonatalen Kardiomyozyten kommt es zu einer vermehrten Expression des Hypertrophie-assoziierten Genprofils. Diese zeigt eine Signifikanz beim zusätzlichem Einsatz des Hypertrophie-Stimulus PE für *RCAN1.4* (1,82-fach, 3,78-fach mit PE gegenüber 2,92-fach in der PE-Kontrolle, $p < 0,05$) und *Nppa* (1,85-fach, 11,28-fach mit PE gegenüber 9,39-fach in der PE-Kontrolle, $p < 0,05$) sowie bei *Nppb* (2,5-fach, 13,31-fach mit PE gegenüber 8,64-fach in der PE-Kontrolle, $p < 0,01$). Bei der Zellgröße konnten keine Veränderungen durch die Überexpression der miR-301a detektiert werden. So zeigte sich ein Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1.4* auf RNA-Ebene und dieser soll in einem nächsten Schritt in unserer Arbeitsgruppe auf Protein-Ebene bestätigt werden.

Die Inhibition mit der entsprechenden Anti-miR-301a zeigte einen Trend zur verminderten Expression des Hypertrophie-assoziierten Genprofils *in vitro*, der beim zusätzlichen Einsatz von PE signifikant wurde (*Nppa* 0,55-fach, 2,24-fach mit PE gegenüber 3,95-fach in der PE-Kontrolle, $p < 0,001$, *RCAN1.4* 0,66-fach, 1,10 mit PE gegenüber 1,6-fach in der PE-Kontrolle, $p < 0,05$, *Nppb* 0,54-fach, 2,2-fach mit PE gegenüber 3,06-fach in der PE-Kontrolle, $p < 0,05$). In Bezug auf die Zellgröße kam es zu keinen Veränderungen durch die Anti-miR-301a. Auch diese Ergebnisse werden in einem nächsten Versuch der Arbeitsgruppe auf Protein-Ebene betrachtet.

Die Wirkungen der AntimiRs wurden in einigen *in vivo* Experimenten untersucht. Der bei kardialer Hypertrophie im Rattenmodell hochregulierte miR-21, die den ERK-MAP Signalweg

reguliert, konnte durch die Inhibition mittels AntimiRs ein antihypertropher und antifibrotischer Effekt nachgewiesen werden. Dieser Effekt war jedoch nicht stark genug, um gegen die Stressstimuli standzuhalten. Diese Ergebnisse zeigen, dass es Unterschiede in der pathologischen Zellantwort und dem pharmakologischen Gebrauch der AntimiRs gibt (van Rooij et al., 2006, Thum et al., 2008, Patrick et al., 2010), was erklären könnte, warum wir mit den AntimiRs keine starken zellulären Veränderungen hervorrufen konnten.

4.6 Einfluss der veränderten microRNA-Expression auf Kardiomyozyten *in vitro*

Da MLP-Mutationen mit der Entwicklung der DCM assoziiert sind und der MLP/T-cap-Komplex eine Schlüsselrolle in der Stretch-Sensor-Maschinerie von Kardiomyozyten *in vivo* einnimmt, haben wir auch *in vitro* Stretch-Versuche durchgeführt (Knoll et al., 2002). Zudem scheint Calsarcin1 auch eine Rolle in der Muskeltransduktion zu spielen (Frey et al., 2004). Da Hypertrophie und verminderte Kontraktilität der Kardiomyozyten typische sekundäre Anzeichen der DCM sind, fokussierten wir auch diese Merkmale in den Experimenten. Biomechanischer Stress führt zur Aktivierung des Stretch-spezifischen Genprogramms, der mit typischen Veränderungen des „fötalen“ Hypertrophie-assoziierten Genprogramms einhergeht und mit ein Grund für die Entwicklung von Herzinsuffizienz ist (Frank et al., 2008). Die 24h-Stretch-Versuche mit adenoviraler Überexpression und AntimiR-induzierter Herunterregulation von miR-298-5p und miR-301a haben keinen Einfluss auf das Hypertrophie-assoziierte Genexpressionsprofil der Kardiomyozyten oder andere zelluläre Veränderungen gezeigt (Daten hier nicht gezeigt). So scheinen die miRs zumindest kurzfristig (24h) keinen direkten Einfluss auf das Stretch-spezifische Genprogramm zu haben. Um weiterführende Aussagen machen zu können, müsste man ggf. länger dauernde Experimente *in vivo* mit anderem biomechanischem Stress wie „Aortic banding“ durchführen.

4.7 Die Relevanz des therapeutischen Einsatzes von microRNAs

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eines der größten Gesundheitsprobleme in Europa und der westlichen Welt. So sind derzeit ungefähr 50 Millionen Menschen von Herzinsuffizienz betroffen, die eine gemeinsame Endstrecke für viele kardiale Erkrankungen, wie auch der dilatativen Kardiomyopathie darstellt. Dies zeigt die Notwendigkeit für die Entwicklung effektiver Therapien auf diesem Gebiet (Thum, 2012).

Die Forschung hat in den letzten Jahren viele Fortschritte bei der Behandlung von Herzerkrankungen gemacht (Degenhardt et al., 2013). So erlangten auch die miRs eine große Aufmerksamkeit, da man herausfand, dass manche im Blut zirkulieren und bei vielen Zellinteraktionen eine große Rolle spielen könnten. Es wurden verschiedene Expressionsniveaus in Mäusen unterschiedlichen Alters gemessen, sodass ein Zusammenhang zwischen altersbedingten Krankheiten, Stoffwechselprozessen und der

Expression von miRs vermutet wurde. Die miR-Expression in Mäuse konnten jedoch auch durch Kalorienrestriktion verändert werden (Dhahbi et al., 2013). Da die miRs in der Lage sind, mRNA-Expression zu verändern, reduzieren sie damit auch die Expression der jeweiligen Proteine (Guo et al., 2010). Der seit kurzem erfolgreiche Einsatz von Gentherapie-Optionen in Phase 2 Studien (Ca²⁺-ATPase-Pumpe SERCA2a) bei der Therapie von Herzinsuffizienz bestärkt die Vermutung, dass auch Genvektoren mit entsprechenden krankheitsmodifizierenden miRs bzw. AntimiRs positive Ergebnisse liefern könnten (Hajjar, 2013).

MiRs haben einen Einfluss auf die Entwicklung des Herzens, kardiale Erkrankungen und Remodeling, wobei Hypertrophie, Arrhythmien und Myokardinfarkte eingeschlossen sind. Außerdem konnten wir Veränderungen von miRs bei der Pathogenese der DCM verifizieren. Um jetzt herauszufinden, ob die gefundenen miRs z.B. bei der Diagnostik der DCM als Biomarker benutzt werden könnten, müsste man das Expressions-Niveau im Blut analysieren (Huang et al., 2010). Tendenziell wären weitere diagnostische Maßnahmen zur Identifizierung von Kardiomyopathien eine willkommene Hilfe auch bei der Früherkennung, da die Genanalyse durch die multiplen Mutationen, die eine Rolle bei der DCM spielen könnten, erschwert ist.

Ein Teil der aktuellen Forschung beschäftigt sich mit der Applikation von synthetischen miRs durch virale Vektoren. Eine Vielzahl von Studien belegt den effizienten und erfolgreichen Einsatz synthetischer miRs bei der adenoviralen Überexpression in unterschiedlichsten Geweben *in vitro* und *in vivo* (Naguibneva et al., 2006, Sehm et al., 2009, Zeng et al., 2009). Auch der Einfluss von miRs am Herzen konnte mehrfach nachgewiesen werden. Durch die adenovirale Überexpression von miR-98 reduziert sich zum Beispiel die Anzahl der apoptotischen Kardiomyozyten und die AngiotensinIII-induzierte Fibrose (Yang et al., 2011). Diesen erfolgreichen Einsatz von adenoviralen Vektoren konnten wir auch in unserer Arbeit bestätigen.

Der Einsatz von RNA-Interferenz (RNAi) zeigte, dass die Stilllegung von Genen eine nicht zu unterschätzende neue therapeutische Strategie in der Bekämpfung von Herzerkrankungen ist und der Einsatz von Gentechniken viele Optionen bietet (Suckau et al., 2009). Weitere Möglichkeiten zur Inhibition von miRs sind die AntimiRs und AntagomiRs. So wurden die ersten AntagomiRs *in vivo* unter anderem von Care et al. intravenös injiziert. Dabei führte die Inhibition von miR-133 zur kardialen Hypertrophie (Care et al., 2007). Auch andere Arbeitsgruppen zeigten den erfolgreichen Einsatz von AntagomiRs *in vivo*, so wurden in einer anderen Studie erfolgreich miR-122, miR-192, miR-194-Level durch korrespondierenden AntagomiR-Einsatz reduziert. Die miR-16 wurde sogar in allen Geweben – auch im Herzen – erfolgreich inhibiert mit Ausnahme des Gehirns (Krutzfeldt et al., 2005). Der Einsatz von AntagomiR-29 fördert die Entstehung von Fibrose (van Rooij et al., 2008, van Rooij and

Olson, 2007). Das therapeutische Spektrum im Gebrauch von AntagomiRs ist groß und es werden nicht nur kardiale Hypertrophie und Fibrose betrachtet, sondern auch kardiale Rhythmusstörungen. Die Publikation von Lu und seiner Arbeitsgruppe bewies, dass der Einsatz von AntagomiR-328 Vorhofflimmern stoppen kann und nach Myokardinfarkten die kardiale Pumpfunktion verbessert (Lu et al., 2010). Neben dem Einsatz von AntagomiRs spielen die AntimiRs (LNA-modifizierte Oligonukleotide) eine große Rolle bei der Inhibition von miRs. Beispielsweise verhindert die intravenöse Gabe von AntimiR-29 die Dilatation der Aorta im Zusammenhanf mit der Entstehung von aortalen Aneurysmen und stellt damit ein neuen Therapieansatz dar (Boon and Dimmeler, 2011, Boon et al., 2011). Die erfolgreiche Runterregulation von miR-21 gelang 2010, ohne jedoch einen Effekt auf kardiale Fibrose aufzuweisen (Patrick et al., 2010, Bonauer et al., 2009), was paradox ist, da der „Knockdown“ mit der AntagomiR-21 kardiales Remodeling und Fibrose nach aortaler Konstriktion verhindert. Die genetische Deletion der miR-21 hat wie die AntimiR keinen Einfluss auf kardiale Veränderungen. So scheint es noch einige Lücken im Verständnis der inhibitorischen Mechanismen von miRs zu geben (Small and Olson, 2011). Was vielleicht auch ein Erklärungsansatz dafür ist, dass wir in unseren *in vitro* Experimenten mit der miR-298-5p und miR-301a zelluläre Veränderungen hervorrufen konnten, uns es jedoch nur teilweise gelang mit entsprechenden AntimiRs gegenteilige Veränderungen zu erzielen, trotz des effizienten „Knockdowns“.

Aber nicht nur die AntagomiRs und AntimiRs sind nützliche Reagenzien, um endogene miRs zu supprimieren. So werden lentivirale Vektoren heutzutage zur Inhibition von miRs auch schon *in vivo* intravenös injiziert, um durch die Überexpression der miR-Zielsequenz durch Polymerase II Promotoren den „Knockdown“ der miR herbeizuführen (Gentner et al., 2009).

Die Hoffnung, dass diese neuen Entwicklungen es einmal möglich machen eine ungefährliche miR-basierte-Gentherapie einzusetzen, ist realistisch, wenn bestimmte Grundvoraussetzungen beachtet werden. So müssen die normalen miR-Expressionslevel erarbeitet werden und gewebspezifische miRs mit ihren jeweiligen Mechanismen identifiziert und analysiert werden. Außerdem müsste man entschlüsseln, ob der therapeutische Einsatz von miRs die Expression und Funktion anderer miRs beeinflussen kann. Wenn all diese Dinge ausreichend geklärt sind, hätte die miR-basierte therapeutische Behandlung ein großes Potential.

4.8 Schlussfolgerung

Durch die Analyse eines Calsarcin1-„knockout“-Modells konnten wir zeigen, dass das Fehlen von Calsarcin1 zur Entwicklung einer DCM und zu Veränderungen in der Expression von verschiedenen microRNAs (unter anderem in unserem Modell mit miR-298-5p und miR-301a) *in vivo* führt. Die Überexpression von miR-298-5p in Kardiomyozyten *in vitro* hat eine zelluläre

Hypertrophie zur Folge und aktiviert das Hypertrophie-assoziierte-Genprogramm auf RNA-Ebene. Die Überexpression von miR-301a *in vitro* führt ebenfalls zu einer Aktivierung des Hypertrophie-assoziierten Genprofils, zeigt jedoch keine Veränderungen in Bezug auf die Zellgröße. Diese Daten zeigen den Einfluss dieser miRs auf Zellveränderungen bei bestehender DCM und werden Forschungsschwerpunkt bei weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe sein. Insbesondere sollen beide microRNAs in entsprechenden Tiermodellen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist einer der häufigsten Gründe für Herztransplantationen und geht mit ungünstigen Folgeerscheinungen wie Herzinsuffizienz, Arrhythmien und dem frühzeitigen Herztod einher. Sie zeichnet sich durch eine krankhafte Erweiterung des linken Ventrikels und eine eingeschränkte systolische Pumpfunktion aus und geht mit charakteristischen Zellveränderungen einher. Zahlreiche klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass die angeborene, familiäre dilatative Kardiomyopathie ihren Ursprung in genetischen Mutationen von Genen hat, die zu großen Teilen für zytoskelettale und sarkomerische Proteine codieren. In den letzten Jahren konnten einige intrazelluläre Signalwege in den Zusammenhang mit der dilatativen Kardiomyopathie gebracht werden. So nimmt das überwiegend im Herzen exprimierte sarkomerische Protein Calsarcin1, welches ein Interaktionspartner der Phosphatase Calcineurin an der Z-Scheibe ist, eine große Rolle in der Pathogenese eines kardialen dilatativen Phänotyps ein. In Vorversuchen unsere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Calsarcin1-„knockout“-Mäuse in einem gemischten genetischen Hintergrund eine Aktivierung des Hypertrophie-assoziierten Genprogramms aufweisen. Interessanterweise fand dies im ungestressten Zustand ohne wesentliche morphologisch-funktionelle Veränderungen statt. In unseren jetzigen Versuchen mit Calsarcin1-„knockout“-Mäusen in einem reinen (für Herzerkrankungen besonders sensitiven) C57/Bl6-Hintergrund entwickelten die Tiere einen dilatativen Phänotyp wie bei einer DCM ohne typische sekundäre Begleitveränderungen, wie Hypertrophie und Fibrose zu entwickeln. Die Calsarcin1-„knockout“-Mäuse zeigten in der Echokardiografie eine stark eingeschränkte systolische Pumpfunktion, eine signifikante linksventrikuläre Dilatation und, ebenfalls typisch für die DCM, eine Ausdünnung der Herzwände. In histologischen Untersuchungen der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse waren eine Vergrößerung des Herzens und insbesondere eine Dilatation des linken Ventrikels sichtbar. Im Myokard der Mäuse kam es zu einer ausgeprägten Aktivierung des Hypertrophie-assoziierten- oder „fötalen“ Genprogramms, sowohl auf RNA-, als auch auf Protein-Ebene.

Da die hohe genetische Heterogenität, die Anzahl an Mutationen in Genen der dilatativen Kardiomyopathie und individuelle Neumutationen das klinische Screening erschweren, ist es sinnvoll nach anderen pathogenetischen Regulationsmechanismen zu suchen.

In umfangreichen microRNA-Microarray-Analysen im Myokard von Calsarcin1-„knockout“-Mäusen konnten wir hier mehrere differentiell regulierte microRNAs identifizieren. Insbesondere auffällig waren die signifikant vermehrte Expression der miR-298-5p und die ebenfalls signifikant reduzierte Expression von miR-301a in der Herzmuskulatur der Calsarcin1-„knockout“-Mäuse.

Um nun einen denkbaren Einfluss dieser microRNAs auf die Kardiomyozyten nachvollziehen zu können, führten wir *in vitro* Versuche zur Überexpression und Inhibition dieser microRNAs durch. Dazu generierten wir entsprechende Adenoviren zur Überexpression der MicroRNAs in Kardiomyozyten. Ebenso kamen sog. miR-„mimics“ zum Einsatz. In mehreren Versuchen zeigte sich, dass die Überexpression von miR-298-5p zur zellulären Hypertrophie und Aktivierung des Hypertrophie-assoziierten Genprogramms (*Nppa*, *Nppb*, *RCAN1.4* und *Myh7*) auf RNA-Ebene führt. Der „Knockdown“ mit Hilfe einer spezifischen AntimiR erbrachte keine signifikanten Ergebnisse.

Auch die Überexpression der miR-301a zeigte eine signifikante Stimulation des Hypertrophie-assoziierten Genprofils. Eine damit einhergehende Hypertrophie der Zellen konnte bei Ausmessungen der Zellgröße nicht bestätigt werden. Der „Knockdown“-Versuch mit der AntimiR-301a zeigte hingegen eine insbesondere nach zusätzlicher Phenylephrin-Stimulation verminderte Expression des Hypertrophie-assoziierten Genprogramms. Insbesondere die Dissoziation zwischen Dysregulation der Hypertrophie-assoziierten Markergene und der zellulären Hypertrophie durch die miR-301a ist auffällig und auch bei den Calsarcin1-defizienten Mäusen anzutreffen. Insbesondere hier sollen weiterführende Experimente ansetzen. Zur Funktion und Zielstrukturen dieser MiRs im Herzen gibt es derzeit praktisch keine Literatur. So ist vor diesem Hintergrund weiterhin geplant, über Datenbanken wie Targetscan, microRNA.org, DIANA und Pictar mögliche Zielgene für die miR-301a und miR-298-5p zu identifizieren und weiter zu untersuchen. Ebenso werden derzeit Tiermodelle (konditionale „knockout“-Mausmodelle) zu diesen microRNAs generiert und sollen später analysiert werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit zwei microRNAs identifiziert werden, die signifikant im Myokard eines Mausmodells für die DCM dysreguliert sind. Es konnten Techniken zur Überexpression bzw. „knockdown“ dieser microRNAs entwickelt und erfolgreich in primären Kardiomyozyten angewendet werden. Die phänotypische und molekulare Analyse dieser Zellen erbrachte Hinweise, dass insbesondere die miR-301a eine wesentliche Rolle in

der Pathogenese der DCM spielen könnte, da sie dem Tiermodell sehr ähnlich eine Dissoziation typischer molekularer Marker der Hypertrophie und Zellgröße verursachte.

6. Literaturverzeichnis

- AHN, H. W., MORIN, R. D., ZHAO, H., HARRIS, R. A., COARFA, C., CHEN, Z. J., MILOSAVLJEVIC, A., MARRA, M. A. & RAJKOVIC, A. 2010. MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing. *Mol Hum Reprod*, 16, 463-71.
- ALVAREZ, J. A., ORAV, E. J., WILKINSON, J. D., FLEMING, L. E., LEE, D. J., SLEEPER, L. A., RUSCONI, P. G., COLAN, S. D., HSU, D. T., CANTER, C. E., WEBBER, S. A., COX, G. F., JEFFERIES, J. L., TOWBIN, J. A. & LIPSHULTZ, S. E. 2011. Competing risks for death and cardiac transplantation in children with dilated cardiomyopathy: results from the pediatric cardiomyopathy registry. *Circulation*, 124, 814-23.
- ANVERSA, P., KAJSTURA, J., ROTA, M. & LERI, A. 2013. Regenerating new heart with stem cells. *J Clin Invest*, 123, 62-70.
- ARAI, M., MATSUI, H. & PERIASAMY, M. 1994. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*, 74, 555-64.
- ARIMURA, T., NAKAMURA, T., HIROI, S., SATOH, M., TAKAHASHI, M., OHBUCHI, N., UEDA, K., NOUCHI, T., YAMAGUCHI, N., AKAI, J., MATSUMORI, A., SASAYAMA, S. & KIMURA, A. 2000. Characterization of the human nebulin gene: a polymorphism in an actin-binding motif is associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy. *Hum Genet*, 107, 440-51.
- AU, Y. 2004. The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell Mol Life Sci*, 61, 3016-33.
- BARBAGALLO, D., PIRO, S., CONDORELLI, A. G., MASCALI, L. G., URBANO, F., PARRINELLO, N., MONELLO, A., STATELLO, L., RAGUSA, M., RABUAZZO, A. M., DI PIETRO, C., PURRELLO, F. & PURRELLO, M. 2013. miR-296-3p, miR-298-5p and their downstream networks are causally involved in the higher resistance of mammalian pancreatic alpha cells to cytokine-induced apoptosis as compared to beta cells. *BMC Genomics*, 14, 62.
- BARRINGHAUS, K. G. & ZAMORE, P. D. 2009. MicroRNAs: regulating a change of heart. *Circulation*, 119, 2217-24.
- BARRY, S. P., DAVIDSON, S. M. & TOWNSEND, P. A. 2008. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2023-39.
- BARTEL, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97.
- BEISVAG, V., KEMI, O. J., ARBO, I., LOENNECHEN, J. P., WISLOFF, U., LANGAAS, M., SANDVIK, A. K. & ELLINGSEN, O. 2009. Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 16, 690-7.
- BENITO, B., GAY-JORDI, G., SERRANO-MOLLAR, A., GUASCH, E., SHI, Y., TARDIF, J. C., BRUGADA, J., NATTEL, S. & MONT, L. 2011. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation*, 123, 13-22.
- BOLOGNESE, L., DELLAVESA, P., ROSSI, L., SARASSO, G., BONGO, A. S. & SCIANARO, M. C. 1994. Prognostic value of left ventricular mass in uncomplicated acute myocardial infarction and one-vessel coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 73, 1-5.
- BONAUER, A., CARMONA, G., IWASAKI, M., MIONE, M., KOYANAGI, M., FISCHER, A., BURCHFIELD, J., FOX, H., DOEBELE, C., OHTANI, K., CHAVAKIS, E., POTENTE, M., TJWA, M., URBICH, C., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2009. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*, 324, 1710-3.
- BONNEUX, L., BARENDREGT, J. J., MEETER, K., BONSEL, G. J. & VAN DER MAAS, P. J. 1994. Estimating clinical morbidity due to ischemic heart disease and congestive heart failure: the future rise of heart failure. *Am J Public Health*, 84, 20-8.
- BONOW, R. O., CARABELLO, B. A., KANU, C., DE LEON, A. C., JR., FAXON, D. P., FREED, M. D., GAASCH, W. H., LYTLE, B. W., NISHIMURA, R. A., O'GARA, P. T., O'ROURKE, R. A., OTTO, C. M., SHAH, P. M., SHANEWISSE, J. S., SMITH, S. C., JR.,

- JACOBS, A. K., ADAMS, C. D., ANDERSON, J. L., ANTMAN, E. M., FAXON, D. P., FUSTER, V., HALPERIN, J. L., HIRATZKA, L. F., HUNT, S. A., LYTLE, B. W., NISHIMURA, R., PAGE, R. L. & RIEGEL, B. 2006. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists: endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *Circulation*, 114, e84-231.
- BOON, R. A. & DIMMELER, S. 2011. MicroRNAs and aneurysm formation. *Trends Cardiovasc Med*, 21, 172-7.
- BOON, R. A., SEEGER, T., HEYDT, S., FISCHER, A., HERGENREIDER, E., HORREVOETS, A. J., VINCIGUERRA, M., ROSENTHAL, N., SCIACCA, S., PILATO, M., VAN HEIJNINGEN, P., ESSERS, J., BRANDES, R. P., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2011. MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circ Res*, 109, 1115-9.
- BOUDINA, S. & ABEL, E. D. 2007. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, 115, 3213-23.
- BRAUNWALD, E. 2013. Cardiovascular science: opportunities for translating research into improved care. *J Clin Invest*, 123, 6-10.
- BRYANT, C. D., ZHANG, N. N., SOKOLOFF, G., FANSELOW, M. S., ENNES, H. S., PALMER, A. A. & MCROBERTS, J. A. 2008. Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J Neurogenet*, 22, 315-31.
- 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.
- BUSHATI, N. & COHEN, S. M. 2007. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 175-205.
- CARE, A., CATALUCCI, D., FELICETTI, F., BONCI, D., ADDARIO, A., GALLO, P., BANG, M. L., SEGHALINI, P., GU, Y., DALTON, N. D., ELIA, L., LATRONICO, M. V., HOYDAL, M., AUTORE, C., RUSSO, M. A., DORN, G. W., 2ND, ELLINGSEN, O., RUIZ-LOZANO, P., PETERSON, K. L., CROCE, C. M., PESCHLE, C. & CONDORELLI, G. 2007. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 13, 613-8.
- CHEN, J. F., MANDEL, E. M., THOMSON, J. M., WU, Q., CALLIS, T. E., HAMMOND, S. M., CONLON, F. L. & WANG, D. Z. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 38, 228-33.
- 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.
- CHEN, Z., CHEN, L. Y., DAI, H. Y., WANG, P., GAO, S. & WANG, K. 2012. miR-301a promotes pancreatic cancer cell proliferation by directly inhibiting Bim expression. *J Cell Biochem*, 113, 3229-35.
- CHENDRIMADA, T. P., FINN, K. J., JI, X., BAILLAT, D., GREGORY, R. I., LIEBHABER, S. A., PASQUINELLI, A. E. & SHIEKHATTAR, R. 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447, 823-8.
- CHENG, Y., JI, R., YUE, J., YANG, J., LIU, X., CHEN, H., DEAN, D. B. & ZHANG, C. 2007. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol*, 170, 1831-40.
- CHIANG, H. R., SCHOENFELD, L. W., RUBY, J. G., AUYEUNG, V. C., SPIES, N., BAEK, D., JOHNSTON, W. K., RUSS, C., LUO, S., BABIARZ, J. E., BLELLOCH, R., SCHROTH, G. P., NUSBAUM, C. & BARTEL, D. P. 2010. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*, 24, 992-1009.

- CHIEN, K. R., KNOWLTON, K. U., ZHU, H. & CHIEN, S. 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*, 5, 3037-46.
- 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.
- DA COSTA MARTINS, P. A., BOURAJAJ, M., GLADKA, M., KORTLAND, M., VAN OORT, R. J., PINTO, Y. M., MOLKENTIN, J. D. & DE WINDT, L. J. 2008. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*, 118, 1567-76.
- DA COSTA MARTINS, P. A., SALIC, K., GLADKA, M. M., ARMAND, A. S., LEPTIDIS, S., EL AZZOUZI, H., HANSEN, A., COENEN-DE ROO, C. J., BIERHUIZEN, M. F., VAN DER NAGEL, R., VAN KUIK, J., DE WEGER, R., DE BRUIN, A., CONDORELLI, G., ARBONES, M. L., ESCHENHAGEN, T. & DE WINDT, L. J. 2010. MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat Cell Biol*, 12, 1220-7.
- DEGENHARDT, K., SINGH, M. K. & EPSTEIN, J. A. 2013. New approaches under development: cardiovascular embryology applied to heart disease. *J Clin Invest*, 123, 71-4.
- DEVEREUX, R. B., WACHTELL, K., GERDTS, E., BOMAN, K., NIEMINEN, M. S., PAPADEMETRIOU, V., ROKKEDAL, J., HARRIS, K., AURUP, P. & DAHLOF, B. 2004. Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. *JAMA*, 292, 2350-6.
- DHAHBI, J. M., SPINDLER, S. R., ATAMNA, H., YAMAKAWA, A., GUERRERO, N., BOFFELLI, D., MOTE, P. & MARTIN, D. I. K. 2013. Deep sequencing identifies circulating mouse miRNAs that are functionally implicated in manifestations of aging and responsive to calorie restriction. *Aging-Us*, 5, 130-141.
- DORN, G. W., 2ND, ROBBINS, J. & SUGDEN, P. H. 2003. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*, 92, 1171-5.
- DRAZNER, M. H., RAME, J. E., MARINO, E. K., GOTTDIENER, J. S., KITZMAN, D. W., GARDIN, J. M., MANOLIO, T. A., DRIES, D. L. & SISCOVICK, D. S. 2004. Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*, 43, 2207-15.
- ELMEN, J., LINDOW, M., SCHUTZ, S., LAWRENCE, M., PETRI, A., OBAD, S., LINDHOLM, M., HEDTJARN, M., HANSEN, H. F., BERGER, U., GULLANS, S., KEARNEY, P., SARNOW, P., STRAARUP, E. M. & KAUPPINEN, S. 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, 452, 896-9.
- FAULKNER, G., PALLAVICINI, A., COMELLI, A., SALAMON, M., BORTOLETTO, G., IEVOLELLA, C., TREVISAN, S., KOJIC, S., DALLA VECCHIA, F., LAVEDER, P., VALLE, G. & LANFRANCHI, G. 2000. FATZ, a filamin-, actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle. *J Biol Chem*, 275, 41234-42.
- FAULKNER, G., PALLAVICINI, A., FORMENTIN, E., COMELLI, A., IEVOLELLA, C., TREVISAN, S., BORTOLETTO, G., SCANNAPIECO, P., SALAMON, M., MOULY, V., VALLE, G. & LANFRANCHI, G. 1999. ZASP: a new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J Cell Biol*, 146, 465-75.
- FENG, J. A., PERRY, G., MORI, T., HAYASHI, T., OPARIL, S. & CHEN, Y. F. 2003. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in atrial natriuretic peptide-deficient mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30, 343-9.
- FICHTLSCHERER, S., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2011. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 2383-90.
- FIEDLER, J. & THUM, T. 2013. MicroRNAs in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 201-5.

- FLICK, M. J. & KONIECZNY, S. F. 2000. The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta-tactinin. *J Cell Sci*, 113 (Pt 9), 1553-64.
- FRANK, D. & FREY, N. 2011. Cardiac Z-disc signaling network. *J Biol Chem*, 286, 9897-904.
- FRANK, D., GANTENBERG, J., BOOMGAARDEN, I., KUHN, C., WILL, R., JARR, K. U., EDEN, M., KRAMER, K., LUEDDE, M., MAIRBAURL, H., KATUS, H. A. & FREY, N. 2012. MicroRNA-20a inhibits stress-induced cardiomyocyte apoptosis involving its novel target Egln3/PHD3. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 711-7.
- FRANK, D., KUHN, C., BRORS, B., HANSELMANN, C., LUDDE, M., KATUS, H. A. & FREY, N. 2008. Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension*, 51, 309-18.
- FRANK, D., KUHN, C., KATUS, H. A. & FREY, N. 2006. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl)*, 84, 446-68.
- FRANK, D., KUHN, C., KATUS, H. A. & FREY, N. 2007a. Role of the sarcomeric Z-disc in the pathogenesis of cardiomyopathy. *Future Cardiol*, 3, 611-22.
- FRANK, D., KUHN, C., VAN EICKELS, M., GEHRING, D., HANSELMANN, C., LIPPL, S., WILL, R., KATUS, H. A. & FREY, N. 2007b. Calsarcin-1 protects against angiotensin-II induced cardiac hypertrophy. *Circulation*, 116, 2587-96.
- 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 calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med*, 10, 1336-43.
- FREY, N., FRANK, D., LIPPL, S., KUHN, C., KOGLER, H., BARRIENTOS, T., ROHR, C., WILL, R., MULLER, O. J., WEILER, H., BASSEL-DUBY, R., KATUS, H. A. & OLSON, E. N. 2008. Calsarcin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J Clin Invest*, 118, 3598-608.
- FREY, N. & OLSON, E. N. 2002. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem*, 277, 13998-4004.
- FREY, N. & OLSON, E. N. 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*, 65, 45-79.
- FREY, N., RICHARDSON, J. A. & OLSON, E. N. 2000. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14632-7.
- FUSTER, V., GERSH, B. J., GIULIANI, E. R., TAJIK, A. J., BRANDENBURG, R. O. & FRYE, R. L. 1981. The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 47, 525-31.
- GAN, X. T., RAJAPUROHITAM, V., HAIST, J. V., CHIDIAC, P., COOK, M. A. & KARMAZYN, M. 2005. Inhibition of phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy by activation of multiple adenosine receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 27-34.
- GENTNER, B., SCHIRA, G., GIUSTACCHINI, A., AMENDOLA, M., BROWN, B. D., PONZONI, M. & NALDINI, L. 2009. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods*, 6, 63-6.
- GEORGE, A. L., JR. 2013. Molecular and genetic basis of sudden cardiac death. *J Clin Invest*, 123, 75-83.
- GHILDIYAL, M. & ZAMORE, P. D. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*, 10, 94-108.
- GONTIER, Y., TAIIVAINEN, A., FONTAO, L., SONNENBERG, A., VAN DER FLIER, A., CARPEN, O., FAULKNER, G. & BORRADORI, L. 2005. The Z-disc proteins myotilin and FATZ-1 interact with each other and are connected to the sarcolemma via muscle-specific filamins. *J Cell Sci*, 118, 3739-49.
- GRUNIG, E., TASMAN, J. A., KUCHERER, H., FRANZ, W., KUBLER, W. & KATUS, H. A. 1998. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 31, 186-94.
- GUO, H., INGOLIA, N. T., WEISSMAN, J. S. & BARTEL, D. P. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466, 835-40.

- HAJJAR, R. J. 2013. Potential of gene therapy as a treatment for heart failure. *J Clin Invest*, 123, 53-61.
- HAYASHI, T., ARIMURA, T., ITOH-SATOH, M., UEDA, K., HOHDA, S., INAGAKI, N., TAKAHASHI, M., HORI, H., YASUNAMI, M., NISHI, H., KOGA, Y., NAKAMURA, H., MATSUZAKI, M., CHOI, B. Y., BAE, S. W., YOU, C. W., HAN, K. H., PARK, J. E., KNOLL, R., HOSHIIJIMA, M., CHIEN, K. R. & KIMURA, A. 2004. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 44, 2192-201.
- 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.
- 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.
- HERMAN, I. M. 1993. Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol*, 5, 48-55.
- HILL, J. A. & OLSON, E. N. 2008. Cardiac plasticity. *N Engl J Med*, 358, 1370-80.
- HILL, J. A., ROTHERMEL, B., YOO, K. D., CABUAY, B., DEMETROULIS, E., WEISS, R. M., KUTSCHKE, W., BASSEL-DUBY, R. & WILLIAMS, R. S. 2002. Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *J Biol Chem*, 277, 10251-5.
- HO, K. K., ANDERSON, K. M., KANNEL, W. B., GROSSMAN, W. & LEVY, D. 1993. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation*, 88, 107-15.
- HOUBAVIY, H. B., MURRAY, M. F. & SHARP, P. A. 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*, 5, 351-8.
- HUANG, Z. P., NEPPL, R. L. & WANG, D. Z. 2010. MicroRNAs in cardiac remodeling and disease. *J Cardiovasc Transl Res*, 3, 212-8.
- IKEDA, S., KONG, S. W., LU, J., BISPING, E., ZHANG, H., ALLEN, P. D., GOLUB, T. R., PIESKE, B. & PU, W. T. 2007. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*, 31, 367-73.
- JHUND, P. S., MACINTYRE, K., SIMPSON, C. R., LEWSEY, J. D., STEWART, S., REDPATH, A., CHALMERS, J. W., CAPEWELL, S. & MCMURRAY, J. J. 2009. Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation*, 119, 515-23.
- KEHAT, I. & MOLKENTIN, J. D. 2010. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*, 122, 2727-35.
- KENT, O. A. & MENDELL, J. T. 2006. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*, 25, 6188-96.
- KNOLL, R., HOSHIIJIMA, M., HOFFMAN, H. M., PERSON, V., LORENZEN-SCHMIDT, I., BANG, M. L., HAYASHI, T., SHIGA, N., YASUKAWA, H., SCHAPER, W., MCKENNA, W., YOKOYAMA, M., SCHORK, N. J., OMENS, J. H., MCCULLOCH, A. D., KIMURA, A., GREGORIO, C. C., POLLER, W., SCHAPER, J., SCHULTHEISS, H. P. & CHIEN, K. R. 2002. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111, 943-55.
- 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.
- KWON, C., HAN, Z., OLSON, E. N. & SRIVASTAVA, D. 2005. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in Drosophila and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18986-91.
- LANDGRAF, P., RUSU, M., SHERIDAN, R., SEWER, A., IOVINO, N., ARAVIN, A., PFEFFER, S., RICE, A., KAMPHORST, A. O., LANDTHALER, M., LIN, C., SOCCI, N. D.,

- HERMIDA, L., FULCI, V., CHIARETTI, S., FOA, R., SCHLIWKA, J., FUCHS, U., NOVOSEL, A., MULLER, R. U., SCHERMER, B., BISSELS, U., INMAN, J., PHAN, Q., CHIEN, M., WEIR, D. B., CHOKSI, R., DE VITA, G., FREZZETTI, D., TROMPETER, H. I., HORNUNG, V., TENG, G., HARTMANN, G., PALKOVITS, M., DI LAURO, R., WERNET, P., MACINO, G., ROGLER, C. E., NAGLE, J. W., JU, J., PAPAVALIIOU, F. N., BENZING, T., LICHTER, P., TAM, W., BROWNSTEIN, M. J., BOSIO, A., BORKHARDT, A., RUSSO, J. J., SANDER, C., ZAVOLAN, M. & TUSCHL, T. 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129, 1401-14.
- LANFORD, R. E., HILDEBRANDT-ERIKSEN, E. S., PETRI, A., PERSSON, R., LINDOW, M., MUNK, M. E., KAUPPINEN, S. & ORUM, H. 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 327, 198-201.
- LEE, 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.
- LEINWAND, L. A. 2001. Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: a matter of balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2947-9.
- 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.
- LEWIS, B. P., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
- LEWIS, B. P., SHIH, I. H., JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P. & BURGE, C. B. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115, 787-98.
- LICHTMAN, A. H., BINDER, C. J., TSIMIKAS, S. & WITZTUM, J. L. 2013. Adaptive immunity in atherogenesis: new insights and therapeutic approaches. *J Clin Invest*, 123, 27-36.
- LIU, G., FRIGGERI, A., YANG, Y., MILOSEVIC, J., DING, Q., THANNICKAL, V. J., KAMINSKI, N. & ABRAHAM, E. 2010. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*, 207, 1589-97.
- LU, Y., ZHANG, Y., WANG, N., PAN, Z., GAO, X., ZHANG, F., ZHANG, Y., SHAN, H., LUO, X., BAI, Y., SUN, L., SONG, W., XU, C., WANG, Z. & YANG, B. 2010. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation*, 122, 2378-87.
- 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.
- MAILLET, M., DAVIS, J., AUGER-MESSIER, M., YORK, A., OSINSKA, H., PIQUEREAU, J., LORENZ, J. N., ROBBINS, J., VENTURA-CLAPIER, R. & MOKKENTIN, J. D. 2010. Heart-specific deletion of *CnB1* reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *J Biol Chem*, 285, 6716-24.
- MAISEL, A. 2001. B-type natriuretic peptide levels: a potential novel "white count" for congestive heart failure. *J Card Fail*, 7, 183-93.
- MANN, D. L. 2007. MicroRNAs and the failing heart. *N Engl J Med*, 356, 2644-5.
- MARKS, A. R. 2013. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest*, 123, 46-52.
- MATRANGA, C. & ZAMORE, P. D. 2007. Small silencing RNAs. *Curr Biol*, 17, R789-93.
- MCMULLEN, J. R., SHIOI, T., ZHANG, L., TARNAVSKI, O., SHERWOOD, M. C., KANG, P. M. & IZUMO, S. 2003. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12355-60.
- MENDELL, J. T. & OLSON, E. N. 2012. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 148, 1172-87.
- MINAMISAWA, S., HOSHIJIMA, M., CHU, G., WARD, C. A., FRANK, K., GU, Y., MARTONE, M. E., WANG, Y., ROSS, J., JR., KRANIAS, E. G., GILES, W. R. & CHIEN, K. R. 1999.

- Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*, 99, 313-22.
- 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.
- 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.
- MONTGOMERY, R. L., HULLINGER, T. G., SEMUS, H. M., DICKINSON, B. A., SETO, A. G., LYNCH, J. M., STACK, C., LATIMER, P. A., OLSON, E. N. & VAN ROOIJ, E. 2011. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*, 124, 1537-47.
- MORI, T., CHEN, Y. F., FENG, J. A., HAYASHI, T., OPARIL, S. & PERRY, G. J. 2004. Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. *Cardiovasc Res*, 61, 771-9.
- MOSTERD, A., HOES, A. W., DE BRUYNE, M. C., DECKERS, J. W., LINKER, D. T., HOFMAN, A. & GROBBEE, D. E. 1999. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J*, 20, 447-55.
- 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.
- NAGA PRASAD, S. V., DUAN, Z. H., GUPTA, M. K., SURAMPUDI, V. S., VOLINIA, S., CALIN, G. A., LIU, C. G., KOTWAL, A., MORAVEC, C. S., STARLING, R. C., PEREZ, D. M., SEN, S., WU, Q., PLOW, E. F., CROCE, C. M. & KARNIK, S. 2009. Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J Biol Chem*, 284, 27487-99.
- NAGUIBNEVA, I., AMEYAR-ZAZOUA, M., POLESSKAYA, A., AIT-SI-ALI, S., GROISMAN, R., SOUIDI, M., CUVELLIER, S. & HAREL-BELLAN, A. 2006. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*, 8, 278-84.
- NISHIKIMI, T., MAEDA, N. & MATSUOKA, H. 2006. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 69, 318-28.
- NOURRY, C., GRANT, S. G. & BORG, J. P. 2003. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE*, 2003, RE7.
- OBAD, S., DOS SANTOS, C. O., PETRI, A., HEIDENBLAD, M., BROOM, O., RUSE, C., FU, C., LINDOW, M., STENVANG, J., STRAARUP, E. M., HANSEN, H. F., KOCH, T., PAPPIN, D., HANNON, G. J. & KAUPPINEN, S. 2011. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet*, 43, 371-8.
- OKA, T., DAI, Y. S. & MOLKENTIN, J. D. 2005. Regulation of calcineurin through transcriptional induction of the calcineurin A beta promoter in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol*, 25, 6649-59.
- OLSON, E. N. & WILLIAMS, R. S. 2000. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell*, 101, 689-92.
- 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.
- OSIO, A., TAN, L., CHEN, S. N., LOMBARDI, R., NAGUEH, S. F., SHETE, S., ROBERTS, R., WILLERSON, J. T. & MARIAN, A. J. 2007. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*, 100, 766-8.
- OTEY, C. A. & CARPEN, O. 2004. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton*, 58, 104-11.

- 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.
- PASSIER, R., RICHARDSON, J. A. & OLSON, E. N. 2000. Oracle, a novel PDZ-LIM domain protein expressed in heart and skeletal muscle. *Mech Dev*, 92, 277-84.
- PATEL, N., TAHARA, S. M., MALIK, P. & KALRA, V. K. 2011. Involvement of miR-30c and miR-301a in immediate induction of plasminogen activator inhibitor-1 by placental growth factor in human pulmonary endothelial cells. *Biochem J*, 434, 473-82.
- PATRICK, D. M., MONTGOMERY, R. L., QI, X., OBAD, S., KAUPPINEN, S., HILL, J. A., VAN ROOIJ, E. & OLSON, E. N. 2010. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest*, 120, 3912-6.
- PRASAD, A. M., MA, H., SUMBILLA, C., LEE, D. I., KLEIN, M. G. & INESI, G. 2007. Phenylephrine hypertrophy, Ca²⁺-ATPase (SERCA2), and Ca²⁺ signaling in neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C2269-75.
- QUIAT, D. & OLSON, E. N. 2013. MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest*, 123, 11-8.
- 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.
- RAO, P. K., TOYAMA, Y., CHIANG, H. R., GUPTA, S., BAUER, M., MEDVID, R., REINHARDT, F., LIAO, R., KRIEGER, M., JAENISCH, R., LODISH, H. F. & BLELLOCH, R. 2009. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*, 105, 585-94.
- 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.
- ROBSON, R. M., GOLL, D. E., ARAKAWA, N. & STROMER, M. H. 1970. Purification and properties of alpha-actinin from rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, 200, 296-318.
- ROGNMO, O., MOHOLDT, T., BAKKEN, H., HOLE, T., MOLSTAD, P., MYHR, N. E., GRIMSMO, J. & WISLOFF, U. 2012. Cardiovascular risk of high- versus moderate-intensity aerobic exercise in coronary heart disease patients. *Circulation*, 126, 1436-40.
- ROTHERMEL, B. A., MCKINSEY, T. A., VEGA, R. B., NICOL, R. L., MAMMEN, P., YANG, J., ANTOS, C. L., SHELTON, J. M., BASSEL-DUBY, R., OLSON, E. N. & WILLIAMS, R. S. 2001. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3328-33.
- SAYED, D., HONG, C., CHEN, I. Y., LYPOWY, J. & ABDELLATIF, M. 2007. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 100, 416-24.
- 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.
- 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.
- SEHM, T., SACHSE, C., FRENZEL, C. & ECHEVERRI, K. 2009. miR-196 is an essential early-stage regulator of tail regeneration, upstream of key spinal cord patterning events. *Dev Biol*, 334, 468-80.
- SELBACH, M., SCHWANHAUSSER, B., THIERFELDER, N., FANG, Z., KHANIN, R. & RAJEWSKY, N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455, 58-63.
- SHIMOYAMA, M., HAYASHI, D., TAKIMOTO, E., ZOU, Y., OKA, T., UOZUMI, H., KUDOH, S., SHIBASAKI, F., YAZAKI, Y., NAGAI, R. & KOMURO, I. 1999. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*, 100, 2449-54.

- SMALL, E. M., FROST, R. J. & OLSON, E. N. 2010. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*, 121, 1022-32.
- SMALL, E. M. & OLSON, E. N. 2011. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*, 469, 336-42.
- SPIRITO, P., SEIDMAN, C. E., MCKENNA, W. J. & MARON, B. J. 1997. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 336, 775-85.
- SUCKAU, L., FECHNER, H., CHEMALY, E., KROHN, S., HADRI, L., KOCKSKAMPER, J., WESTERMANN, D., BISPING, E., LY, H., WANG, X., KAWASE, Y., CHEN, J., LIANG, L., SIPO, I., VETTER, R., WEGER, S., KURRECK, J., ERDMANN, V., TSCHOPE, C., PIESKE, B., LEBECHE, D., SCHULTHEISS, H. P., HAJJAR, R. J. & POLLER, W. C. 2009. Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation*, 119, 1241-52.
- SUH, M. R., LEE, Y., KIM, J. Y., KIM, S. K., MOON, S. H., LEE, J. Y., CHA, K. Y., CHUNG, H. M., YOON, H. S., MOON, S. Y., KIM, V. N. & KIM, K. S. 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 270, 488-98.
- SUK, H. Y., ZHOU, C., YANG, T. T., ZHU, H., YU, R. Y., OLABISI, O., YANG, X., BRANCHO, D., KIM, J. Y., SCHERER, P. E., FRANK, P. G., LISANTI, M. P., CALVERT, J. W., LEFER, D. J., MOLKENTIN, J. D., GHIGO, A., HIRSCH, E., JIN, J. & CHOW, C. W. 2013. Ablation of calcineurin Abeta reveals hyperlipidemia and signaling cross-talks with phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 288, 3477-88.
- TAKADA, F., VANDER WOUDE, D. L., TONG, H. Q., THOMPSON, T. G., WATKINS, S. C., KUNKEL, L. M. & BEGGS, A. H. 2001. Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1595-600.
- TATSUGUCHI, M., SEOK, H. Y., CALLIS, T. E., THOMSON, J. M., CHEN, J. F., NEWMAN, M., ROJAS, M., HAMMOND, S. M. & WANG, D. Z. 2007. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 1137-41.
- TAYLOR, M. R., CARNIEL, E. & MESTRONI, L. 2006. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 27.
- THUM, T. 2012. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Mol Med*, 4, 3-14.
- THUM, T., CHAU, N., BHAT, B., GUPTA, S. K., LINSLEY, P. S., BAUERSACHS, J. & ENGELHARDT, S. 2011. Comparison of different miR-21 inhibitor chemistries in a cardiac disease model. *J Clin Invest*, 121, 461-2; author reply 462-3.
- THUM, T., GALUPPO, P., WOLF, C., FIEDLER, J., KNEITZ, S., VAN LAAKE, L. W., DOEVENDANS, P. A., MUMMERY, C. L., BORLAK, J., HAVERICH, A., GROSS, C., ENGELHARDT, S., ERTL, G. & BAUERSACHS, J. 2007. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*, 116, 258-67.
- THUM, T., GROSS, C., FIEDLER, J., FISCHER, T., KISSLER, S., BUSSEN, M., GALUPPO, P., JUST, S., ROTTBAUER, W., FRANTZ, S., CASTOLDI, M., SOUTSCHEK, J., KOTELIANSKY, V., ROSENWALD, A., BASSON, M. A., LICHT, J. D., PENA, J. T., ROUHANIFARD, S. H., MUCKENTHALER, M. U., TUSCHL, T., MARTIN, G. R., BAUERSACHS, J. & ENGELHARDT, S. 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456, 980-4.
- TOWBIN, J. A., LOWE, A. M., COLAN, S. D., SLEEPER, L. A., ORAV, E. J., CLUNIE, S., MESSERE, J., COX, G. F., LURIE, P. R., HSU, D., CANTER, C., WILKINSON, J. D. & LIPSHULTZ, S. E. 2006. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA*, 296, 1867-76.
- VAN BERLO, J. H., MAILLET, M. & MOLKENTIN, J. D. 2013. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest*, 123, 37-45.
- VAN ROOIJ, E., DOEVENDANS, P. A., CRIJNS, H. J., HEENEMAN, S., LIPS, D. J., VAN BILSEN, M., WILLIAMS, R. S., OLSON, E. N., BASSEL-DUBY, R., ROTHERMEL, B. A. & DE WINDT, L. J. 2004. MCIP1 overexpression suppresses left ventricular

- remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res*, 94, e18-26.
- VAN ROOIJ, E. & OLSON, E. N. 2007. microRNAs put their signatures on the heart. *Physiol Genomics*, 31, 365-6.
- VAN ROOIJ, E., SUTHERLAND, L. B., LIU, N., WILLIAMS, A. H., MCANALLY, J., GERARD, R. D., RICHARDSON, J. A. & OLSON, E. N. 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18255-60.
- VAN ROOIJ, E., SUTHERLAND, L. B., THATCHER, J. E., DIMAIO, J. M., NASEEM, R. H., MARSHALL, W. S., HILL, J. A. & OLSON, E. N. 2008. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13027-32.
- 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.
- VEGA, R. B., YANG, J., ROTHERMEL, B. A., BASSEL-DUBY, R. & WILLIAMS, R. S. 2002. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem*, 277, 30401-7.
- VOGEL, B., KELLER, A., FRESE, K. S., KLOOS, W., KAYVANPOUR, E., SEDAGHAT-HAMEDANI, F., HASSEL, S., MARQUART, S., BEIER, M., GIANNITIS, E., HARDT, S., KATUS, H. A. & MEDER, B. 2013. Refining diagnostic microRNA signatures by whole-miRNome kinetic analysis in acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 59, 410-8.
- VORGERD, M., VAN DER VEN, P. F., BRUCHERTSEIFER, V., LOWE, T., KLEY, R. A., SCHRODER, R., LOCHMULLER, H., HIMMEL, M., KOEHLER, K., FURST, D. O. & HUEBNER, A. 2005. A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet*, 77, 297-304.
- 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*.
- WEBER, M. J. 2005. New human and mouse microRNA genes found by homology search. *FEBS J*, 272, 59-73.
- 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.
- YANG, J., ROTHERMEL, B., VEGA, R. B., FREY, N., MCKINSEY, T. A., OLSON, E. N., BASSEL-DUBY, R. & WILLIAMS, R. S. 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res*, 87, E61-8.
- YANG, Y., AGO, T., ZHAI, P., ABDELLATIF, M. & SADOSHIMA, J. 2011. Thioredoxin 1 negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through upregulation of miR-98/let-7. *Circ Res*, 108, 305-13.
- ZENG, L., CARTER, A. D. & CHILDS, S. J. 2009. miR-145 directs intestinal maturation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17793-8.
- ZHAO, Y., RANSOM, J. F., LI, A., VEDANTHAM, V., VON DREHLE, M., MUTH, A. N., TSUCHIHASHI, T., MCMANUS, M. T., SCHWARTZ, R. J. & SRIVASTAVA, D. 2007. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 129, 303-17.
- ZHAO, Y., SAMAL, E. & SRIVASTAVA, D. 2005. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436, 214-20.
- ZHOU, P., JIANG, W., WU, L., CHANG, R., WU, K. & WANG, Z. 2012. miR-301a is a candidate oncogene that targets the homeobox gene Gax in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*, 57, 1171-80.

- ZHOU, Q., CHU, P. H., HUANG, C., CHENG, C. F., MARTONE, M. E., KNOLL, G., SHELTON, G. D., EVANS, S. & CHEN, J. 2001. Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *J Cell Biol*, 155, 605-12.
- ZHOU, Q., RUIZ-LOZANO, P., MARTONE, M. E. & CHEN, J. 1999. Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *J Biol Chem*, 274, 19807-13.
- ZIPES, D. P., CAMM, A. J., BORGGREFE, M., BUXTON, A. E., CHAITMAN, B., FROMER, M., GREGORATOS, G., KLEIN, G., MOSS, A. J., MYERBURG, R. J., PRIORI, S. G., QUINONES, M. A., RODEN, D. M., SILKA, M. J., TRACY, C., SMITH, S. C., JR., JACOBS, A. K., ADAMS, C. D., ANTMAN, E. M., ANDERSON, J. L., HUNT, S. A., HALPERIN, J. L., NISHIMURA, R., ORNATO, J. P., PAGE, R. L., RIEGEL, B., BLANC, J. J., BUDAJ, A., DEAN, V., DECKERS, J. W., DESPRES, C., DICKSTEIN, K., LEKAKIS, J., MCGREGOR, K., METRA, M., MORAIS, J., OSTERSPEY, A., TAMARGO, J. L. & ZAMORANO, J. L. 2006. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation*, 114, e385-484.
- ZOLK, O., CARONI, P. & BOHM, M. 2000. Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation*, 101, 2674-7.
- ZOU, Y., YAO, A., ZHU, W., KUDOH, S., HIROI, Y., SHIMOYAMA, M., UOZUMI, H., KOHMOTO, O., TAKAHASHI, T., SHIBASAKI, F., NAGAI, R., YAZAKI, Y. & KOMURO, I. 2001. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation*, 104, 102-8.

7. Veröffentlichung

Phillip Hoppe¹, Elisa Zille¹, Johanne Gantenberg^{1,2}, Matthias Eden^{1,2}, Christian Kuhn^{1,2}, Norbert Frey^{1,2} und Derk Frank^{1,2}, *Cofilin-2 ist heraufreguliert in Mausmodellen der Dilatativen Kardiomyopathie und führt zu einer Steigerung der SRF-Aktivität in Kardiomyozyten*, Vortrag der 81. Jahrestagung Herzinsuffizienz - Heart failure der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim, 2015.

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

²DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung), Standort Hamburg/Kiel/Lübeck, Kiel.

8. Lebenslauf

Name: Elisa Zille
Geburtsdatum: 10.09.1988
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang

1995- 1999 Grundschole Ratsmühlendam in Hamburg
1999- 2008 Albert-Schweitzer-Gymnasium in Hamburg
Abschluss: Abitur, Note: 1,6

Universitärer Werdegang

WS 2008/2009 Beginn des Medizinstudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Seit 01/2011 Experimentelle Promotionsarbeit „Die Rolle der microRNAs in der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie“ im Institut für Kardiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein-Campus-Kiel
08/2010 1. Staatsexamen „Physikum“, Note: gut
11/2014 2. Staatsexamen, Note: gut
12/2014 Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

seit 01.01.2015 Assistenzärztin in der Asklepios Klinik Barmbek in Hamburg, Abteilung für Neurologie

Auslandsaufenthalte

05.03.12-30.03.12 Famulatur im St.Mary's Hospital Department of Anesthesia, Isle of Wight, England
26.08.13-20.10.13 Chirurgisches Tertial im Western Hospital of Melbourne, Australien
21.10.13-15.12.13 Chirurgisches Tertial im Inselspital Bern, Schweiz

Auszeichnungen

26.08.13-15.12.13 Auslandsstipendium zur Ableistung des Praktischen Jahres durch die Medizinische Fakultät Kiel

9. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung bei Herrn Prof. Dr. med. Norbert Frey bedanken.

Ein großer Dank gilt PD Dr. med. Derk Frank für die kontinuierliche und herausragende Betreuung des Projektes und die Unterstützung bei der Strukturierung und Durchführung der Versuche.

Bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe des molekularbiologischen kardiologischen Labors für die qualifizierte Unterstützung bei der Einarbeitung in die Arbeitsbereiche der Labore und den fortwährenden Rat. Dr. med. Matthias Eden danke ich für den Einsatz bei der Echokardiographie. Besonders möchte ich hier Phillip Hoppe für das große Engagement bezüglich der MicroRNA-Versuche danken.

Meinen Eltern und meinem Bruder schulde ich Dank für die immerwährende liebevolle Unterstützung und das Verständnis für meine Arbeit.

Zuletzt gilt mein herzlicher Dank Jannik Frings und Ruth Seikowski für die Hilfe und Anregungen bezüglich der Doktorarbeit.