

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität-Heidelberg

vorgelegt von

M. Sc. Alexander Benz

aus Leninski, Tadschikistan

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

miR-19b - ein essentieller Regulator der Länge und Form
des ventrikulären Aktionspotentials im Zebrafisch

Gutachter: Prof. Dr. Michael Boutros

Prof. Dr. David Hassel

Zusammenfassung

Der plötzliche Herztod (SCD) ist eine häufige Todesursache von herzinsuffizienten Patienten. Dabei verursacht in den meisten Fällen eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD) die letalen ventrikulären Arrhythmien. Während der Herzinsuffizienz werden zahlreiche Signalwege, einschließlich microRNAs beeinflusst. microRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die durch Inhibition der Translation und Transkriptdestabilisierung posttranskriptional die Genexpression regulieren. Bisherige Studien zeigen, dass microRNAs während der Herzinsuffizienz einer Fehlregulation unterliegen, was auf eine Beteiligung dieser Moleküle in der Entwicklung und dem Verlauf der Herzinsuffizienz hinweisen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde miR-19 als ein essentieller Regulator der Herzfunktion identifiziert. Zebrafische mit einer verminderten miR-19 Expression entwickelten eine Bradykardie und eine reduzierte ventrikuläre Kontraktilität. Während Säugetiere zwei miR-19-Isoformen exprimieren, besitzt der Zebrafisch vier Isoformen (miR-19a-d). Die spezifische Reduktion von miR-19b war ausreichend, um die Herzfrequenz um 30 % zu reduzieren und eine Herzinsuffizienz zu induzieren. In *patch-clamp* Experimenten wurde in miR-19b-defizienten Fischen eine signifikante Verlängerung der APD nachgewiesen, die auf eine gestörte Repolarisation zurückgeführt werden konnte. Zusätzlich zeigten diese Fische eine erhöhte Sensitivität für einen AV-Block, was ein Charakteristikum für ein Long QT Syndrom im Zebrafisch ist. Mittels qRT-PCR und Luciferase-Reporterassays wurde nachgewiesen, dass miR-19b direkt und indirekt die Expression kardialer Ionenkanäle reguliert und dadurch die Elektrophysiologie im Zebrafischherz moduliert. In dieser Arbeit konnte miR-19b als wichtiger Regulator der elektrischen Aktivität des Herzens beschrieben und als ein neues potentiell Kandidatenmolekül für das humane Long QT Syndrom identifiziert werden.

Abstract

Sudden cardiac death (SCD) is a common mode of death in heart failure (HF) and results from prolonged action potential duration (APD) and ventricular arrhythmias. During the pathogenesis and progression of HF, a myriad number of signaling pathways are altered, including microRNAs. microRNAs are small noncoding RNAs that fine-tune gene expression by translational repression or transcript destabilization. Interestingly, microRNAs are dysregulated during HF, suggesting a potential involvement in the development and progression of the disease. Here, miR-19 was identified as an important regulator of heart function. Zebrafish lacking miR-19 developed severe bradycardia and reduced cardiac contractility. While mammals express two isoforms of miR-19, the zebrafish genome encodes for four members (19a-d). The reduction of miR-19b specifically was found to be sufficient to reduce heart rate by 30 % and to induce heart failure. Patch-clamp experiments from whole hearts showed that miR-19b deficient zebrafish exhibit significantly prolonged ventricular APD caused by impaired repolarization. Additionally these fish show increased sensitivity to an AV-Block, which is a characteristic feature of long QT-Syndrome in zebrafish. qRT-PCR revealed that miR-19b directly and indirectly regulates the expression of cardiac ion channels and thereby modulates APD and shape. This study describes miR-19b as an essential regulator of electrical activity of the heart and identifies it as a potential candidate gene causative for human long QT syndrome.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz	1
1.2 Elektrophysiologie im gesunden Herzen und während der Herzinsuffizienz	2
1.2.1 Veränderungen von Natriumströmen während der Herzinsuffizienz.....	3
1.2.2 Veränderungen von Kaliumströmen während der Herzinsuffizienz	3
1.2.3 Das Long QT Syndrom	4
1.3 microRNAs und ihre Funktionen in der kardialen Physiologie und Pathophysiologie	5
1.4 Das miR-17~92 cluster	7
1.4.1 miR-19 in der kardialen Physiologie und Pathophysiologie	7
1.5 Der Zebrafisch als Modellorganismus	8
1.5.1 Die Elektrophysiologie im Zebrafisch.....	9
1.5.2 Reverse Genetik im Zebrafisch	11
1.6 Ziel dieser Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Puffer und Lösungen	13
2.2 Laborgeräte	15
2.3 Kits und Reagenzien	18
2.4 Zebrafischspezifische Methoden	20

2.4.1	Aufzucht, Haltung und Verpaarung von Zebrafischen.....	20
2.4.2	Mikroinjektion	20
2.4.3	<i>in-situ</i> -Hybridisierung kardialer Marker	21
2.4.4	<i>in-situ</i> -Hybridisierung von miRNAs	23
2.4.5	Pharmakologische Behandlung von Zebrafischen mit Terfenadin.....	24
2.4.6	M-Mode-Aufnahmen.....	25
2.4.7	Analyse von <i>reggae</i> -Mutanten	25
2.4.8.	Ermittlung der Herzfrequenz und des <i>fractional shortenings</i>	25
2.4.9	Foto- und Videodokumentation.....	26
2.5	Molekularbiologische Methoden	26
2.5.1	CRISPR/Cas9	26
2.5.2	Transformation von <i>E.coli</i>	29
2.5.3	Selektive Agarplatten und Flüssigmedien	29
2.5.4	Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	29
2.5.5	Dualer Luciferase-Reporterassay	29
2.6	Zellbiologische Methoden.....	32
2.6.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen und Bestimmung der Lebendzellzahl	32
2.6.2	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit Lipofectamine2000	32
2.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
2.7	Nukleinsäuren	33
2.7.1	Isolation der Gesamt-RNA aus Zebrafischen.....	33
2.7.2	qRT-PCR	34
2.7.3	Polymerasekettenreaktion.....	37
2.7.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	38
2.7.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.7.6	Restriktionsverdau von DNA	38
2.7.7	Ligation von DNA	38

2.7.8	Klonierung von Reporterplasmiden.....	39
2.7.9	Herstellung von RNA-Hybridisierungssonden.....	40
2.8	Sonstige Methoden	41
2.8.1	<i>Patch-clamp</i>	41
2.8.2	Elektronenmikroskopische Analysen	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Expression von miR-19 im Zebrafisch.....	43
3.2	miR-19-Defizienz beeinflusst die Herzfunktion	46
3.3	Individueller <i>knockdown</i> einzelner miR-19-Isoformen	48
3.4	Identifikation von miR-19b als kausale Isoform.....	52
3.5	miR-19b-defiziente Fische zeigen keine Entwicklungsdefekte	55
3.5.1	Die Morphologie von miR-19b-defizienten Zebrafischherzen ist..... unbeeinträchtigt.....	55
3.5.2	Die Angiogenese in miR-19b-defizienten Zebrafischembryos ist	
	unbeeinträchtigt.....	57
3.6	miR-19b-Defizienz resultiert in einer Verlängerung des Aktionspotentials	60
3.7	miR-19b reguliert die Expression kardialer Ionenkanäle.....	62
3.8	miR-19b-Defizienz vermindert <i>reggae</i> ^{m230} -Phänotyp	67
4	Diskussion	69
4.1	Ausblick	74
5	Literaturverzeichnis	76
6	Danksagung	87
	Erklärung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines humanen ventrikulären Aktionspotentials	2
Abbildung 2: Darstellung der Biogenese und des Wirkmechanismus von microRNAs und siRNAs	5
Abbildung 3: Darstellung der miR-19-kodierenden cluster im Säugetier- und im Zebrafischgenom.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung von ventrikulären Aktionspotentialen und EKG-Diagrammen aus Maus, Zebrafisch und Mensch.....	10
Abbildung 5: Aufnahmen ventrikulärer Aktionspotentiale aus dem Zebrafisch	11
Abbildung 6: Sequenz von miR-19a und miR-19b in verschiedenen Vertebratenspezies	43
Abbildung 7: Darstellung der Sequenzen von miR-19a-d im Zebrafisch.....	44
Abbildung 8: Expression von miR-19a-d während der Entwicklung des Zebrafischs	45
Abbildung 9: Expression von miR-19a und miR-19b im Zebrafischembryo	45
Abbildung 10: Design der Morpholinos für einen miR-19 <i>knockdown</i>	46
Abbildung 11: <i>Knockdown</i> von miR-19a-d reguliert die Expression von cotranskribierten miRNAs	47
Abbildung 12: <i>Knockdown</i> von miR-19 resultiert in einer kardialen Dysfunktion	48
Abbildung 13: Schematische Darstellung der <i>knockdown</i> -Strategie für miR-363	49
Abbildung 14: Reduktion der miR-363 Expression.....	49
Abbildung 15: Transienter <i>knockdown</i> von miR-363 zeigt keinen Einfluss auf kardiale Parameter	50
Abbildung 16: qRT-PCR von miR-19-Isoformen und benachbarter miRNAs.....	51
Abbildung 17: Identifikation von miR-19b als kausale Isoform	53
Abbildung 18: miR-19b-Reduktion durch einen CRISPR/Cas9 vermittelten <i>knockout</i>	54
Abbildung 19: Relative Herzfrequenz nach MO- und CRISPR/Cas9-vermittelter miR-19b-Reduktion.....	55
Abbildung 20: Der <i>knockdown</i> von miR-19b hat keinen Einfluss auf die Morphologie des Zebrafischherzens	55
Abbildung 21: Histologische Analyse zeigt keinen Einfluss durch miR-19b-Defizienz.....	56
Abbildung 22: <i>in-situ</i> -Hybridisierung kardialer Marker in miR-19b-defizienten Fischen.....	57
Abbildung 23: miR-19b-defiziente Zebrafische zeigen keine Defekte in der Angiogenese	58
Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von miR-19b-defizienten Kardiomyozyten.....	59

Abbildung 25: Schematische Darstellung der pharmakologischen Wirkung von Terfenadin..	60
Abbildung 26: miR-19b-Defizienz sensitiviert Zebrafische für einen AV-Block.....	61
Abbildung 27: miR-19b-Defizienz resultiert in einem verlängertem Aktionspotential.....	62
Abbildung 28: Expressionsanalyse kardialer Ionenkanäle nach miR-19b- <i>knockdown</i>	63
Abbildung 29: Schematische Darstellung eines Aktionspotentials und die Rolle von durch miR-19b regulierter Gene	64
Abbildung 30: Luciferase-Reportergenassay zur Überprüfung der direkten Regulation durch miR-19b	65
Abbildung 31: Zielsequenzen von miR-19b in der 3'-UTR potentieller Zielgene	66
Abbildung 32: Darstellung der Rolle von miR-19b in der kardialen Elektrophysiologie	67
Abbildung 33: miR-19b-Defizienz verringert die Anzahl phänotypischer <i>reg</i> ^{+/-} -Mutanten	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Long-QT Syndrom verursachende Gene	4
Tabelle 2: Puffer und Lösungen.....	13
Tabelle 3: Laborgeräte	15
Tabelle 4: Reagenzien.....	16
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 6: Fischlinien.....	20
Tabelle 7: Morpholinosequenzen.....	21
Tabelle 8: Methanolreihe	21
Tabelle 9: Dauer der Proteinase-K-Behandlung.....	22
Tabelle 10: Waschschritte nach der Hybridisierung mit miRNA-Sonden	24
Tabelle 11: Reaktionsprotokoll zum Hybridisieren von Oligonukleotiden.....	26
Tabelle 12: Reaktionsprotokoll für die Klonierung der sgRNA.....	27
Tabelle 13: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau von pT7-gRNA	27
Tabelle 14: CRISPR/Cas9 Injektionslösung.....	28
Tabelle 15: Reaktionsprotokoll zum <i>mismatch pairing</i> von mutanter und Wildtyp DNA.....	28
Tabelle 16: Luciferase-Reporterplasmide.....	31
Tabelle 17: Mutageneseprimer	31
Tabelle 18: Reaktionsansätze zur Herstellung von cDNA	34
Tabelle 19: Reaktionsansätze für die RT-PCR.....	35
Tabelle 20: Reaktionsprotokoll für die RT-PCR.....	35
Tabelle 21: qRT-PCR Primer	36
Tabelle 22: Reaktionsprotokoll für die Polymerasekettenreaktion.....	37
Tabelle 23: Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau von DNA	38
Tabelle 24: Primersequenzen für Luciferasereporter-Konstrukte	39
Tabelle 25: Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden	40
Tabelle 26: Primer zur Herstellung der <i>in situ</i> Hybridisierungssonden.....	40

Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-Untranslatierte Region
Amhc	atrial myosin heavy chain
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
AS	Aortenstenose
AV-Kanal	atrioventrikulärer Kanal
CRISPR/Cas9	clustered regulatory interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated Endonuclease 9
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dpf	days post fertilization
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	Elongationsfaktor-1- α
EKG	Elektrokardiogramm
FCS	fetales Kälberserum
FS	Fraktionsverkürzung
g	Erdbeschleunigung
hfp	hours post fertilization
HI	Herzinsuffizienz
ICD	Implantierbarer Kardioverter Defibrillator
KCNE	Potassium voltage-gated channel subfamily E
KCNQ	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT
kdrl	kinase insert domain receptor like
L-15	Leibowitz-15-Medium
LNA	lockes nucleid acid
LQTS	Long QT Syndrom
MIR17HG	miR-17~92 cluster host gene
miRNA	microRNA
M-Mode	Motion-Mode
MO	Morpholino

mRNA	messenger RNA
myl7	myosin light chain 7
nppa	natriuretic peptide A
PAM	protospacer adjacent motif
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pri-miRNA	primary miRNA
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
<i>reg</i>	reggae
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
SCD	sudden cardiac death
SCN	sodium channel subunit
sgRNA	short guide RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SQTS	Short QT Syndrom
TBE	TRIS-Borat-EDTA
tbx2b	T-box protein 2b
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
T_m	Schmelztemperatur
tRNA	transfer-RNA
UTR	untranslatierte Region
vmhc	ventricular myosin heavy chain

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz (HI) beschreibt ein komplexes klinisches Syndrom, das durch eine kardiale Dysfunktion charakterisiert ist, bei der das Herz aufgrund von morphologischen und molekularen Veränderungen nicht mehr in der Lage ist, eine physiologische Pumpleistung zu gewährleisten. Die HI ist nach der ischämischen Herzerkrankung und dem akuten myokardialen Infarkt die dritthäufigste Todesursache in Deutschland.¹ In der Bundesrepublik leiden etwa 1,8 Millionen Menschen unter einer chronischen HI, was etwa 2,2 % der Bevölkerung entspricht. Jedes Jahr werden 300.000 Fälle neudiagnostiziert.² Mit 370.000 Krankenhausaufnahmen pro Jahr ist die HI der häufigste Grund für eine Hospitalisierung von Patienten über 65 Jahren. In Europa müssen etwa 44 % der HI-Patienten innerhalb des ersten Jahres nach ihrer Entlassung erneut stationär aufgenommen werden.³ Zusätzlich hat die HI eine sehr schlechte Prognose. Lediglich 50 % der Patienten überleben die ersten vier Jahre nach der Diagnose. 50 % der Endstadium-Patienten versterben bereits im ersten Jahr.

Zu den unmittelbaren Symptomen der HI gehören Kurzatmigkeit, Atemnot, Müdigkeit und die Bildung von Ödemen. Die häufigsten Ursachen der HI sind akute Herzinfarkte, koronare Herzerkrankungen, erhöhter Blutdruck, Herzklappendefekte, Myokarditis, Kardiomyopathien und angeborene Herzfehler.⁴ Während der HI durchläuft das Herz zahlreiche molekulare Umstrukturierungen. Um die reduzierte Herzfunktion auszugleichen, werden das sympathische Nervensystem, das Renin-Angiotensin-Aldosteron System sowie weitere neurohormonale Mechanismen aktiviert.⁵ Dies führt zu einer Stimulation von Signalwegen, die eine Hypertrophie des Herzens bewirken.⁶ Eine chronische Aktivierung dieser kompensatorischen Mechanismen, die kurzfristig eine verbesserte Pumpleistung gewährleisten, führt langfristig durch verstärktes, maladaptives Wachstum des Myokards (Hypertrophie), Apoptose im Herzmuskel und Fibrose zur verstärkten Belastung des Herzmuskels und progressiven Verschlechterung der Herzfunktion.^{7,8} Eine weitere pathophysiologische Eigenschaft in HI-Patienten ist die Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials (AP).⁹ Ursächlich für die AP Verlängerung ist häufig eine defekte Kardiomyozytenrepolarisation. Die genauen molekularen Mechanismen, die zur Verlängerung der AP-Dauer (APD) führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Folgen einer APD-Verlängerung sind ventrikuläre Arrhythmien und der plötzliche Herztod (*sudden cardiac death*; SCD). Bis zu 50 % der Todesfälle bei HI-Patienten sind auf einen SCD zurückzuführen.¹⁰

1.2 Elektrophysiologie im gesunden Herzen und während der Herzinsuffizienz

Elektrisch leitfähige Zellen zeichnen sich durch ein gewebespezifisches AP aus. Ventrikuläre Myokardzellen besitzen ein charakteristisch langes AP, das in die Phasen 0-4 eingeteilt wird (Abbildung 1). In Phase 0 kommt es zu einer rapiden Öffnung von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen, wodurch ein nach innen gerichteter Na^+ -Strom (I_{Na}) entsteht.¹¹ Der Influx der Na^+ -Ionen bewirkt eine initiale Depolarisierung. Durch die Inaktivierung des I_{Na} und die gleichzeitige Aktivierung von nach außen gerichteten K^+ -Kanälen (I_{to}) entsteht in der frühen Phase der Repolarisierung ein, auch als *notch* bezeichneter, „Knick“ im Aktionspotential (Phase 1). Ein Gleichgewicht aus Ca^{2+} - (I_{Ca}) und K^+ -Strömen (I_{Kr}) sorgt in Phase 2 für das für Kardiomyozyten charakteristische Plateau. Am Ende der Plateauphase werden die nach innen gerichteten I_{Ca} -Ströme schwächer. Zusätzlich werden repolarisierende K^+ -Ströme aktiviert (I_{Kr} und I_{Ks}), wodurch es in der dritten Phase zu einer vollständigen Repolarisation kommt, bei der das Membranpotential auf das Ruhepotential gebracht wird. Bei einer Spannung von -85 bis -90 mV werden I_{Kr} und I_{Ks} deaktiviert, während I_{K1} in der Ruhephase aktiv bleibt (Phase 4). Der Konstante I_{K1} -Strom ist nötig, um das Ruhepotential konstant zu halten.¹¹

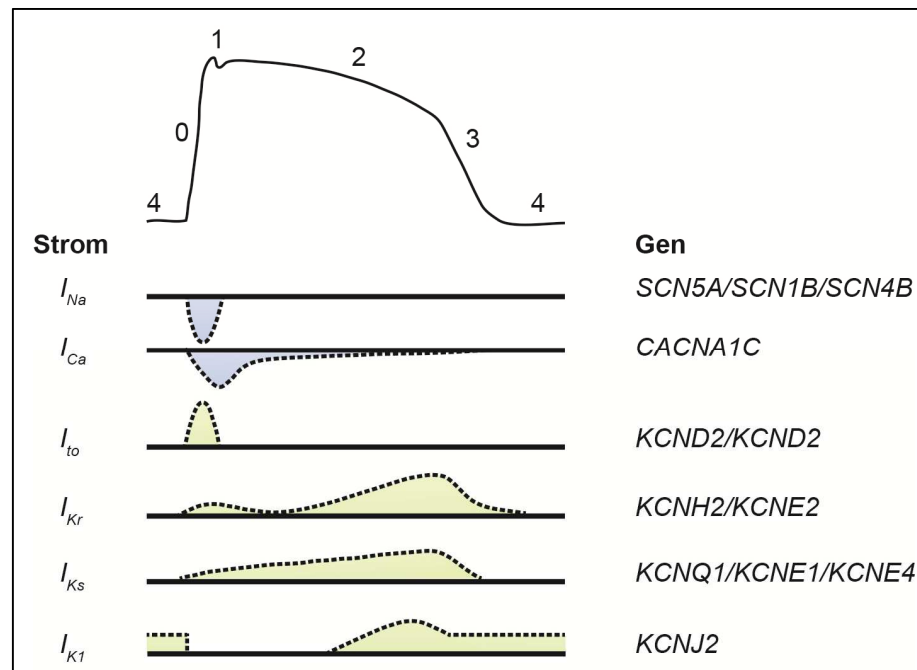


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines humanen ventrikulären Aktionspotentials Die Einteilung des AP erfolgt in die Phasen 0-4. Die Stärke der einwärts und auswärts gerichteten Ströme während des AP ist durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die bekannten Gene, die für die jeweiligen Ionenströme benötigt werden, sind rechts aufgeführt. Eigene Darstellung nach Ravens und Cerbai.¹²

Wie bereits erwähnt, ist die Verlängerung der APD ein charakteristisches Merkmal von HI-Patienten. Grundlegender Mechanismus der APD-Verlängerung ist eine verminderte oder erhöhte Expression von depolarisierenden und repolarisierenden Ionenkanälen. Wie diese während der HI verändert wird, wird im Folgenden aufgezeigt.

1.2.1 Veränderungen von Natriumströmen während der Herzinsuffizienz

I_{Na} ist für die rapide Depolarisation zu Beginn des AP verantwortlich. Als initialer Ionenkanal des AP nimmt I_{Na} eine zentrale Rolle ein und ist für die Geschwindigkeit der kardialen Erregungsweiterleitung verantwortlich. Nach der initialen Depolarisation folgt eine Inaktivierung des I_{Na} mit einer Restaktivität von unter 0,5 %.¹³ Diese Restaktivität wird als später Na^+ -Strom (I_{NaL}) bezeichnet. Obwohl der I_{NaL} -Strom, verglichen zur hohen Amplitude des I_{Na} in Phase 0, relativ klein ist, transportiert er während der langen Plateauphase mehr Na^+ -Ionen als der depolarisierende *peak*-Strom.¹⁴ Modifikationen des I_{NaL} können die APD maßgeblich beeinflussen.¹⁵ Kommt es zu einer fehlerhaften oder unvollständigen Deaktivierung des I_{Na} , wirkt I_{NaL} entgegen repolarisierender K^+ -Ströme. Dies führt zu einer Verlängerung der APD. Die Aktivität von I_{Na} wird durch die Interaktion von SCN5A, der α -Untereinheit des Kanals, mit den β -Untereinheiten SCN1B und SCN4B modifiziert.¹⁶⁻¹⁸ Wie die Aktivität durch die Interaktion dieser Untereinheiten moduliert wird, ist noch nicht ausreichend geklärt. Es wird vermutet, dass die Bindung der β -Untereinheiten die Inaktivierung des Stroms beeinflusst. In verschiedenen Studien zur I_{NaL} Aktivität bei HI-Patienten wurde gezeigt, dass der I_{NaL} -Strom verstärkt vorliegt, wodurch die Repolarisation verzögert und die APD verlängert wird.¹⁹⁻²³

1.2.2 Veränderungen von Kaliumströmen während der Herzinsuffizienz

Die verringerte Expression von repolarisierenden K^+ -Kanälen ist ein charakteristisches Merkmal bei HI-Patienten. Hierbei ist insbesondere eine konsistente Dysregulation von I_{to} in HI-Patienten zu beobachten.²⁴⁻²⁸ I_{to} ist ein K^+ -Strom, der nach der Depolarisation nur kurz aktiv ist. Dadurch hat dieser Kanal vor allem in großen Organismen, die ein langes AP besitzen, keinen direkten Einfluss auf die APD. Durch seine Funktion in der ersten Phase des AP bestimmt er jedoch die Amplitude des APs, was sich auf die Aktivität aller folgenden Ionenströme auswirkt. Außerdem ist er für den *notch*, den bereits erwähnten „Knick“ im AP in Phase 1, verantwortlich. Die meisten Studien, welche die Aktivität von I_{K1} untersuchen

zeigen, dass dieser Strom in HI-Patienten verringert vorliegt.²⁹⁻³⁵ Andere Studien hingegen berichten von einer unbeeinträchtigten Aktivität.^{36,37} Von den zahlreichen Studien, welche die repolarisierenden Ströme I_{Kr} und I_{Ks} untersuchen, zeigen die meisten, dass I_{Kr} unverändert vorliegt, während I_{Ks} konsistent einen geringeren Strom aufweist.^{32,33,35,37-39} Die verringerte Aktivität der K^+ -Ströme in HI-Patienten resultiert in einer Verlängerung der APD.

1.2.3 Das Long QT Syndrom

Die beschriebenen elektrophysiologischen Veränderungen während der HI ähneln angeborenen Kanalopathien, die ursächlich für das Long QT Syndrom (LQTS) sind. Daher kann die HI als eine Form des erworbenen LQTS bezeichnet werden.⁴⁰ Das LQTS ist eine vererbte oder erworbene lebensbedrohliche kardiale Erkrankung, die zu Arrhythmien und einem daraus folgenden SCD führen kann.^{41,42} Der namensgebende Befund ist eine Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm (EKG), die durch eine verlängerte APD verursacht wird. Die Verlängerung der APD wird beim LQTS entweder durch verringerte I_{K-} , erhöhte I_{Ca-} oder erhöhte I_{NaL} -Ströme verursacht. Die häufigsten Ursachen des LQTS sind Mutationen in der α -Untereinheit des I_{Ks} (KCNQ1), im I_{Kr} -Kanal (KCNH2) und in der α -Untereinheit des I_{Na} (SCN5A).^{43,44} Mittlerweile sind jedoch viele weitere Gene bekannt, die zur Entstehung des LQTS beitragen können (Tabelle 1).

Tabelle 1: Long QT Syndrom verursachende Gene Die Tabelle beinhaltet Gene, die bei einem Funktionsverlust (↓) oder durch eine verstärkte Funktion (↑) für unterschiedliche Formen des Long QT Syndroms verantwortlich gemacht werden. Modifiziert nach Medeiros-Domingo et al.⁴⁵

Syndrom	Gen	Protein (Funktionaler Effekt)
LQTS1	KCNQ1	Kv7.1 (↓)
LQTS2	KCNH2	Kv11.1 (↓)
LQTS3	SCN5A	NaV1.5 (↑)
LQTS4	ANKB	Ankyrin B (↓)
LQTS5	KCNE1	MinK (↓)
LQTS6	KCNE2	MiRP1 (↓)
LQTS7	KCNJ2	Kir2.1 (↓)
LQTS8	CACNA1C	L-Typ Calcium Kanal (↑)
LQTS9	CAV3	Caveolin 3 (↓)
LQTS10	SCN4B	Natriumkanal- β 4 Untereinheit (↓)
LQTS11	AKAP9	Yotiao (↓)
LQTS12	SNTA1	Syntrophin (↓)
LQTS13	KCNJ5	Kir3.4 (↓)
LQTS	SCN1B	Natriumkanal- β 1 Untereinheit (↓)
LQTS	KCNE4	MiRP3 (↓)

1.3 microRNAs und ihre Funktionen in der kardialen Physiologie und Pathophysiologie

microRNAs (miRNAs) sind kleine, etwa 20-22 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die durch post-transkriptionale Mechanismen die Genexpression inhibieren. Die erste miRNA wurde 1993 in *Caenorhabditis elegans* entdeckt.⁴⁶ Seitdem wurden allein 2.000 humane miRNAs identifiziert, die schätzungsweise die Expression von über 60 % aller humanen Gene regulieren.^{47,48} miRNAs werden durch RNA-Polymerase II vom Genom in etwa 2 kb lange, sogenannte *primary miRNAs* (pri-miRNA) transkribiert (Abbildung 2).^{49,50}

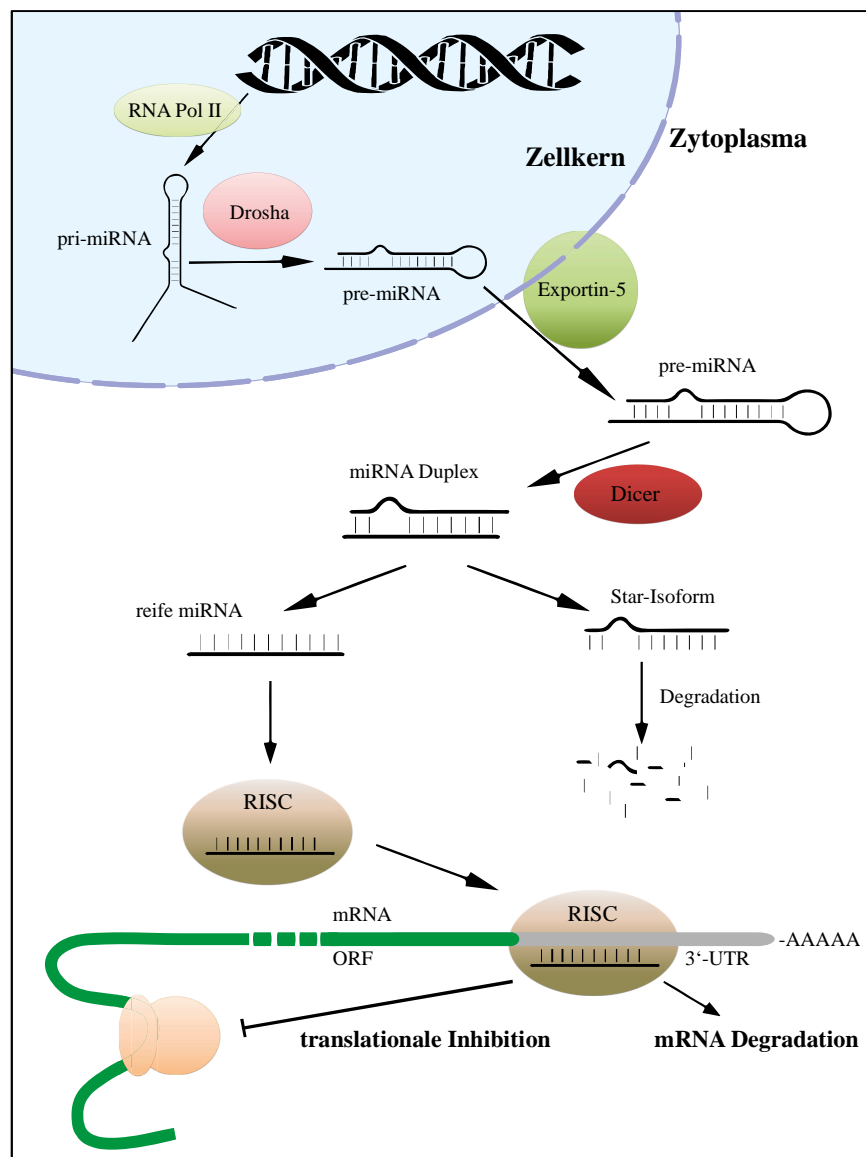


Abbildung 2: Darstellung der Biogenese und des Wirkmechanismus von microRNAs Die pri-miRNA-Transkripte werden im Zellkern zunächst durch Drosha zu ca. 70 Nukleotide langen pre-miRNAs prozessiert. Die pre-miRNAs werden anschließend durch Exportin 5 ins Cytoplasma transportiert. Im Zytoplasma werden diese Moleküle durch Dicer zu einem miRNA-Duplex prozessiert. Einer der beiden RNA-Stränge des miRNA-Duplex wird in den *RNA induced silencing complex* (RISC) eingebaut. Der RISC wirkt durch mRNA-Destabilisation oder translationale Repression inhibitorisch auf die Expression der Zielgene. Eigene Darstellung nach Winter et al.⁵¹

Diese pri-miRNA-Moleküle können eine oder mehrere miRNAs enthalten. Noch innerhalb des Zellkerns werden diese Moleküle durch den Drosha-DGCR8-Komplex zu *precursor miRNAs* (pre-miRNA) gespalten, die etwa 60-100 Nukleotide lang sind und eine charakteristische *hairpin*-Struktur ausbilden.⁵² Die pre-miRNA wird durch Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert, wo sie von Dicer, einem RNase III-Enzym, zu einem miRNA-Duplex prozessiert wird.⁵³⁻⁵⁶ Anschließend werden die beiden Stränge des miRNA-Duplex getrennt.⁵⁷⁻⁵⁹ Die reife miRNA kann durch die Interaktion mit Argonaute-Proteinen an den *RNA-induced silencing complex* (RISC) binden.⁶⁰⁻⁶³ Durch die spezifische Bindung der miRNA an die komplementäre Sequenz innerhalb der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA, kann der RISC-Komplex die Genexpression durch Inhibition der Translation oder bzw. und durch die Degradation der mRNA post-transkriptional inhibieren. In den vergangenen Jahren wurden unterschiedliche Algorithmen entwickelt, die dazu verwendet werden, Ziel-Gene für miRNAs zu bestimmen. Für die Bindung zwischen miRNA und mRNA wird keine vollständige Komplementarität benötigt. Es wird vermutet, dass hierfür vor allem die Komplementarität der 5'-gelegenen *seed*-Region zur mRNA von Bedeutung ist.^{64,65} Martin et al. zeigen jedoch, dass auch unvollständige und außerhalb der *seed*-Region gelegene Komplementarität ausreichen kann, um die Expression der entsprechenden Ziel-Gene zu inhibieren.⁶⁶ Inwiefern *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in miRNA-Genen oder deren Zielsequenzen die Genexpression beeinflussen, ist Teil gegenwärtiger Untersuchungen.⁶⁷⁻⁶⁹

miRNAs bieten durch ihren Wirkmechanismus den Vorteil, Gene in ihrer Expression sehr fein zu regulieren. Zusätzlich bieten sie die Möglichkeit, durch die Inhibition mehrerer Gene innerhalb eines Signalwegs, großen Einfluss auf biologische Prozesse zu nehmen.^{70,71} Das Herz ist ein Organ, das sensitiv auf kleinste Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene reagiert, wodurch eine sehr feine Regulation benötigt wird. Dabei ist der Einfluss von miRNAs im Herzen noch unzureichend aufgeklärt. Sowohl während der Kardiogenese als auch dem Fortschreiten von kardialen Erkrankungen wurde das miRNA-Expressionsprofil als verändert beschrieben.⁷²⁻⁷⁴ Weiterhin wurde gezeigt, dass eine myokard-spezifische Deletion von Dicer in adulten Mäusen zu einer biventrikulären Hypertrophie, Fibrose, Induktion von fetalen Genen und SCD führt.⁷⁵ Diese Ergebnisse wiesen erstmals darauf hin, dass die Fehlregulation von miRNAs eine Rolle während der kardiovaskulären Pathologie spielen könnte.

1.4 Das miR-17~92 cluster

Das miR-17~92 cluster wurde 2004 als *C13orf25* identifiziert und ist heute eines der am besten erforschten miRNA Cluster.⁷⁶ Das 800 Nukleotid lange Cluster befindet sich innerhalb eines Introns des *MIR17HG* (*miR-17~92 cluster host gene*) und kodiert für sechs miRNAs: miR-17, miR18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 und miR-92a-1 (Abbildung 3).⁷⁷ Das Cluster ist evolutionär stark konserviert und besitzt eine hohe Syntenie. Das humane Genom besitzt zwei weitere paraloge Cluster: das miR-106b~25 und das miR-106~363 Cluster.

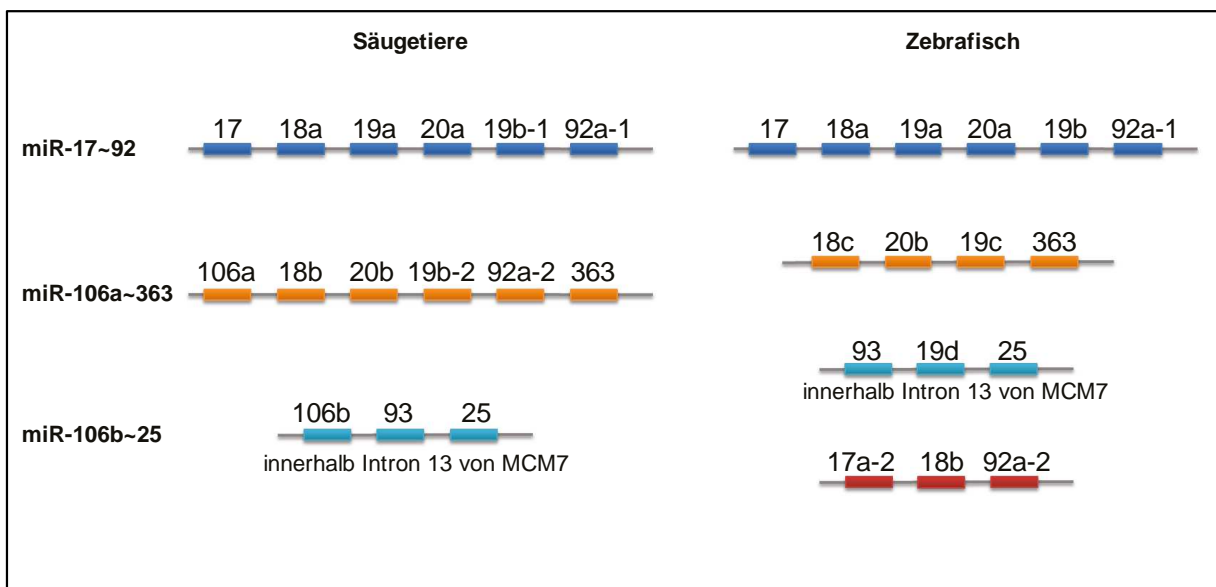


Abbildung 3: Darstellung der miR-19-kodierenden Cluster im Säugetier- und im Zebrafischgenom
Dargestellt sind die drei (A, im Säugetier) bzw. vier (B, im Zebrafisch) Mitglieder der miR-17~92-Familie der miRNA Cluster. Die Sequenzen der miRNAs und die Syntenie der kodierenden Cluster sind stark konserviert zwischen Mensch und Zebrafisch.

Die Expression des miR-17~92 Clusters wurde in diversen hämatopoetischen und soliden Tumoren dysreguliert vorgefunden und wird als ‚oncomiR-1‘ in der Krebsforschung intensiv erforscht.⁷⁸⁻⁸⁰ Des Weiteren sind Funktionen in Immunkrankheiten, neurodegenerativen Erkrankungen, kardiovaskulären Krankheiten und in Assoziation mit fortgeschrittenem Alter bekannt.^{72-75,81-91}

1.4.1 miR-19 in der kardialen Physiologie und Pathophysiologie

Im humanen Genom sind zwei Isoformen von miR-19 kodiert, die sich lediglich in einem Nukleotid außerhalb der *seed*-Sequenz unterscheiden: miR-19a und miR-19b. Als Teil des miR-17~92 Clusters wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Funktionen von miR-19 in

Tumoren aufgeklärt. Die Rolle von miR-19 in der kardiovaskulären Physiologie und Pathophysiologie ist jedoch noch unzureichend erforscht. Ventura et al. lieferten 2008 den ersten Hinweis darauf, dass miR-19 eine Rolle im Herzen spielen könnte.⁷⁷

Die Deletion des miR-17~92 Clusters in Mäusen führte zu Entwicklungsdefekten des ventrikulären Septums.⁷⁷ In weiteren Studien wurde gezeigt, dass spezifisch die verminderte Expression von miR-19a und miR-19b zur altersbedingten HI, kardialer Fibrose und Versteifung des Ventrikels durch direktes Targeting von CTGF und TSP-1 beiträgt.⁹² Ein miRNA-screen an Myokardproben von insuffizienten Herzen zeigte eine signifikant reduzierte Expression von miR-19a und miR-19b.⁷² Durch eine Überexpression des miR-17~92 Clusters hingegen wurde in transgenen Mäusen eine kardiale Hypertrophie induziert. Zusätzlich wiesen die Tiere Anfälligkeiten für letale Arrhythmien auf.⁹³ In zwei darauf folgenden Studien wurden diese Ergebnisse bestärkt. Song et al. zeigten, dass miR-19a und miR-19b durch direktes Targeting von MuRF-1 und atrogin-1 einen verstärkenden Einfluss auf die kardiale maladaptive Hypertrophie haben, während in einer anderen Studie die Überexpression von miR-19b im Zebrafisch zu Arrhythmien und einer Bradykardie führten.^{94,95}

1.5 Der Zebrafisch als Modellorganismus

In aktuellen Studien werden für die Erforschung von humanen kardiovaskulären Erkrankungen hauptsächlich genetisch modifizierte Mäuse als Modellorganismus verwendet, darunter auch für die Elektrophysiologie des Herzens.⁹⁶ Das Mausmodell hat einen wichtigen Einblick in die physiologische und pathophysiologische Funktion zahlreicher Ionenkanäle ermöglicht. Aufgrund der hohen Herzfrequenz von Mäusen besitzt das Modell jedoch Limitierungen in der Translation auf den Menschen. Um eine hohe Herzfrequenz zu ermöglichen, besitzen Mäuse ein sehr viel kürzeres AP, was durch eine beschleunigte kardiale Repolarisation zustande kommt. Dies führt zu einem fast kompletten Fehlen der im Menschen charakteristischen ventrikulären Plateauphase.⁹⁷ Ionenkanäle, die im humanen LQTS häufig fehlreguliert vorliegen oder nicht funktional sind, sind in Mäusen nur schwach exprimiert und spielen eine untergeordnete Funktion.

In den vergangenen Jahren hat sich der Zebrafisch (*Danio rerio*), ein tropischer Süßwasserfisch, als Modellorganismus für die Erforschung humaner Erkrankungen etabliert.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Abgesehen von der Morphologie des Herzens, die im Fisch lediglich durch zwei Kammern charakterisiert ist, dient der Zebrafisch insbesondere für die kardiale

Entwicklung und Elektrophysiologie immer häufiger als Modellorganismus für die Erforschung kardialer Gene.¹⁰¹ Ein großer Vorteil der Nutzung des Zebrafischs als Modellorganismus ist die extrauterine Entwicklung und die Transparenz des Zebrafischembryos. Hierdurch lassen sich Herzentwicklung, Schlagfrequenz und phänotypische Charakteristika mittels direkter Visualisierung unter dem Mikroskop beobachten.¹⁰² Durch genetische Veränderung zur gewebespezifischen Überexpression von fluoreszierenden Proteinen kann die Entwicklung einzelner Organe sehr genau beobachtet werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Zebrafisch für seine Entwicklung keine intakte Blutzirkulation benötigt. Aufgrund seiner geringen Größe werden während der ersten sieben Tage der Entwicklung sämtliche Gewebe durch Diffusion ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Dies ermöglicht, *in vivo* Studien ohne Komplikationen durch Nährstoffmangel durchzuführen. Außerdem erlaubt der Zebrafisch eine einfache genetische Manipulation, die es ermöglicht, die Funktion von Genen in diesem Modellorganismus zu analysieren. Weitere Vorteile sind die einfache Zucht, das schnelle Wachstum, eine große Nachkommenschaft und eine geringe Generationszeit.

1.5.1 Die Elektrophysiologie im Zebrafisch

Der Zebrafisch besitzt mit einem Puls von etwa 80-100 (bei Raumtemperatur) eine ähnliche Herzfrequenz wie der Mensch. Der Sinusknoten, der das elektrische Signal generiert, befindet sich am Sinus venosus.^{103,104} Von hier breitet sich das AP über das Atrium zum atrio-ventrikulären Kanal (AV-Kanal) aus, wo es verzögert weitergeleitet wird, bevor es sich über den Ventrikel ausbreitet.¹⁰⁵ Wie beim Menschen sind im Zebrafisch-EKG eine P-Welle, ein QRS-Komplex und eine T-Welle zu beobachten (Abbildung 4).¹⁰⁶ Dies lässt vermuten, dass De- und Repolarisierung im humanen und im Zebrafischherz ähnlich sind. Das AP im Zebrafisch kann durch Mikroelektroden, *patch-clamp* oder spannungssensitive Farbstoffe am Zebrafischherzen erfasst werden.^{105,107,108} Die Analysen der APs zeigten, dass das Ruhepotential, die APD und die AP-Form von atrialen und ventrikulären Zellen von Zebrafisch und Mensch vergleichbar sind (Abbildung 4).^{108,109}

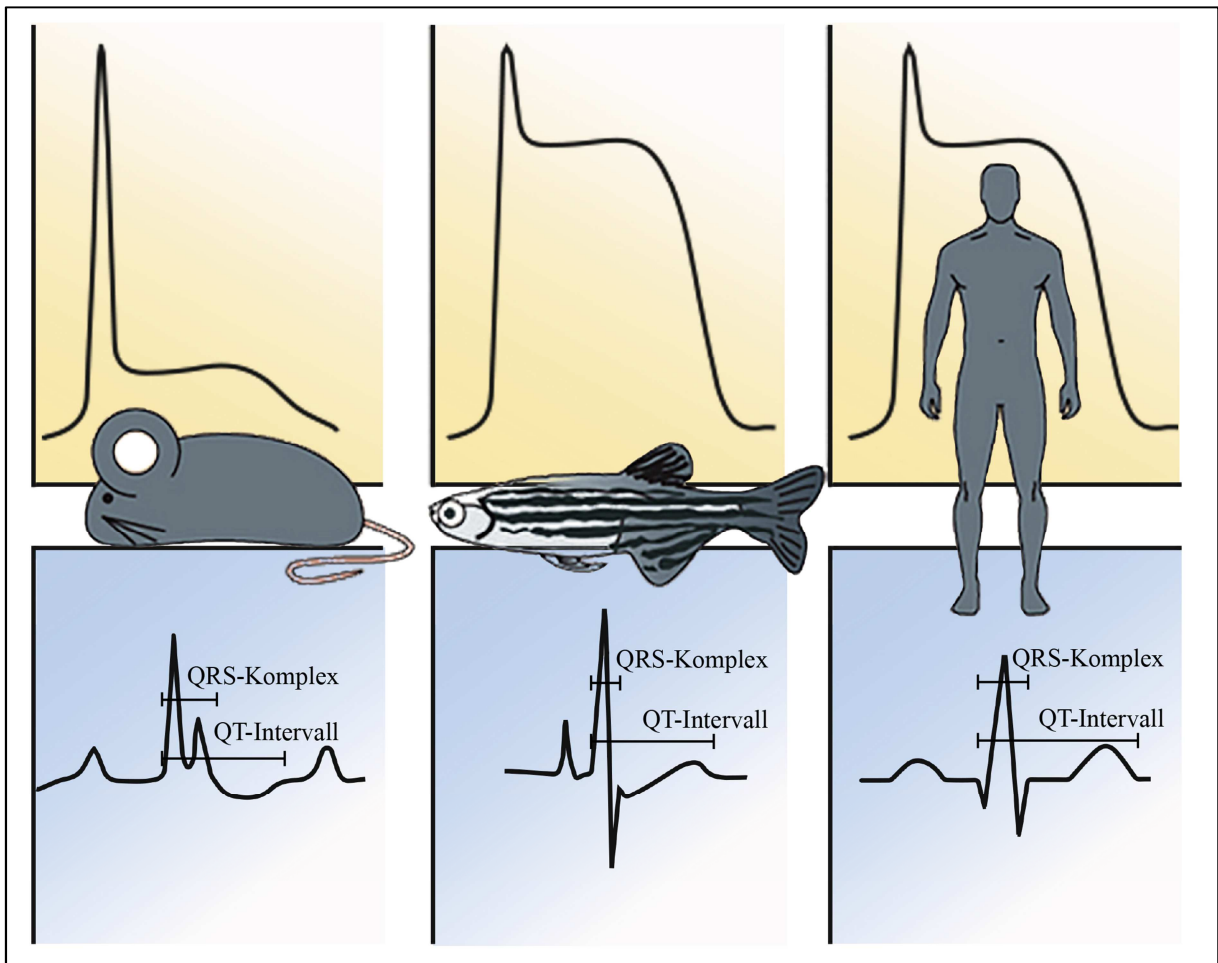


Abbildung 4: Schematische Darstellung von ventrikulären Aktionspotentialen und EKG-Diagrammen aus Maus, Zebrafisch und Mensch Die kardiale Elektrophysiologie ist zwischen Menschen und dem Zebrafisch stark konserviert. Während die Maus im ventrikulären Aktionspotential nahezu keine Plateauphase ausbildet, besitzt das Aktionspotential im Fisch eine dem humanen Aktionspotential ähnliche Form und Länge. Weiterhin besitzen auch das EKG-Diagramm von Fisch und Mensch eine große Ähnlichkeit. Eigene Darstellung nach MacRae et al. und Skinner et al.^{107,109}

In vorangegangenen Studien wurden durch *patch-clamp* Analysen die Eigenschaften kardialer Ionenkanäle im Zebrafisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Zebrafisch sich als Modellorganismus zur Untersuchung von I_{Na^+} ,^{102,110-112} $I_{Ca^{2+}}$,^{102,108,113,114} I_{Kr} ,^{102,108,115} I_{Ks} -^{108,115,116} und I_{K1} -Strömen^{108,117} eignet. Weiterhin konnte durch mutante Linien die Pathoelektrophysiologie einiger Kanäle untersucht werden. In diesem Zusammenhang identifizierten Langheinrich et al. die *breakdance* Mutante, die eine Mutation im *KCNH2* Gen besitzt.¹¹⁸ Durch die *KCNH2*-Mutation wird im Fisch der I_{Kr} -Strom verringert und es kommt zu einer gestörten Repolarisation im Ventrikel und charakteristischen Arrhythmien mit einem 2:1 AV-Block. Arnaout et al. untersuchte zwei weitere rezessive Mutationen in *KCNH2* und zeigte, dass die Mutanten ein verlängertes Aktionspotential und ein verlängertes QT-Intervall aufwiesen und lieferte damit ein Modellsystem für das humane LQTS.¹¹⁹ In einer weiteren Studie identifizierten Hassel et al. eine *gain of function* Mutation in *KCNH2*. Die sogenannte

reggae Mutante ist durch ein verkürztes AP charakterisiert und liefert ein Modell für das humane *short-QTS*.¹²⁰

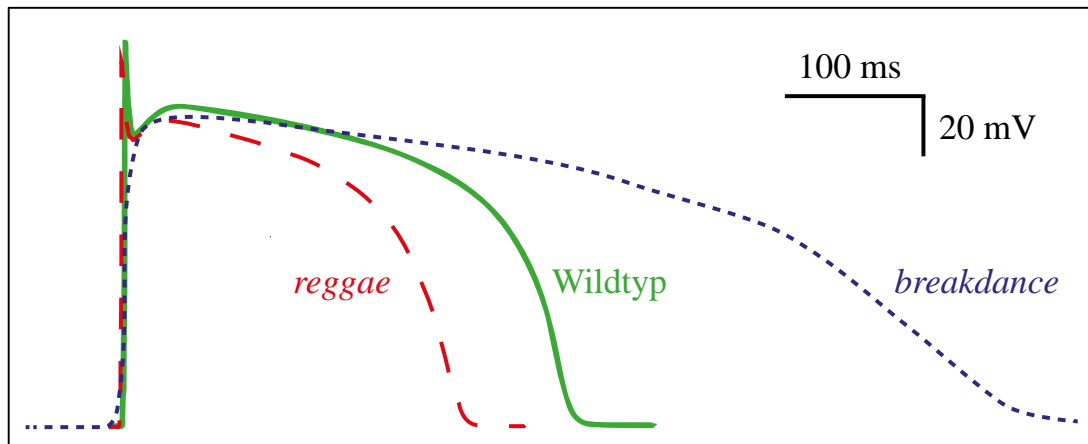


Abbildung 5: Aufnahmen ventrikulärer Aktionspotentiale aus dem Zebrafisch Aufgrund der ähnlichen Form des Aktionspotentials im Menschen und im Zebrafisch eignet sich der Zebrafisch als Modellorganismus für elektropathophysiologische Untersuchungen. *Gain of function* und *loss of function* Mutationen in KCNH2 lieferten Modelle für das humane Short QT Syndrom (*reggae*) und Long QT Syndrom (*breakdance*). Eigene Darstellung nach Hassel et al. und Arnaout et al.^{119,120}

1.5.2 Reverse Genetik im Zebrafisch

Wie bereits aufgezeigt, ist der Zebrafisch aufgrund seiner einfachen genetischen Manipulierbarkeit ein beliebtes Modell für die Untersuchung von Genen. Hierbei wird vor allem die *reverse genetics*-Strategie angewandt, bei der ein Gen gezielt mutiert oder dessen Expression reduziert wird, um durch einen Funktionsverlust die Genfunktion zu analysieren. Seit einigen Jahren werden für den transienten *knockdown antisense-morpholino* modifizierte Oligonukleotide (Morpholinos) verwendet. Morpholinos sind antisense-Oligonukleotide, die sich von normalen Nukleinsäuren dadurch unterscheiden, dass der Ring im Rückgrat des Oligonukleotids aus sechs Atomen besteht und das Rückgrat keine negative Ladung besitzt.¹²¹ Durch diese Struktur besitzen Morpholinos den Vorteil einer hohen Stabilität *in vivo* und sind vor einer Degradation durch Nukleasen geschützt. Weiterhin reduziert die elektrische Neutralität unspezifische Interaktionen mit Proteinen, vermindert dadurch die Toxizität und bewirkt eine erhöhte Bindeaffinität an RNA-Moleküle.¹²¹ Die Morpholinos werden so entworfen, dass sie an bestimmte Sequenzen innerhalb von mRNA-Molekülen binden können und dadurch die Translation oder das Splicing inhibieren. Außerdem können Morpholinos an pri- und pre-miRNA-Moleküle binden und auf diesem Weg die Prozessierung der miRNA in ihre reife, aktive Form inhibieren. Weiterhin können sie reife miRNAs binden und folglich deren Aktivität verringern.

Das CRISPR/Cas9 (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated Endonuclease 9*)-System bietet eine relativ neue Alternative zur Verwendung von Morpholinos. Diese biochemische Methode ermöglicht es, nahezu an jeder Stelle im Genom einen Doppelstrangbruch zu verursachen. Die Auswahl, wo der Doppelstrangbruch eingeführt werden soll, ist lediglich durch die sogenannte *protospacer adjacent motif* (PAM)-Sequenz, welche aus drei Nukleotiden besteht (5'-NGG-3'), limitiert. Um die Cas9-Endonuklease an die PAM-Sequenz zu führen, wird eine *single guide*-RNA (sgRNA) benötigt. Diese dient als *antisense*-Oligonukleotid und führt das Cas9-Protein an einen gewünschten Lokus im Genom. Dort kann das Cas9-Protein einen Doppelstrangbruch einführen. Durch zellinterne Mechanismen wird der Doppelstrangbruch repariert. Diese Reparaturmechanismen sind nicht immer präzise, wodurch es an diesen Stellen zu Mutationen kommt.

Beide Methoden bieten Vor- und Nachteile. Obwohl Morpholinos seit Jahrzehnten erfolgreich zur Aufklärung der Funktion vieler Gene beigetragen haben, wird die Anwendung in aktuellen Studien kritisch hinterfragt.¹²²⁻¹²⁶ Die CRISPR/Cas9-Methode zeigt eine höhere Spezifität, hat jedoch den Nachteil, dass zunächst homozygote Mutanten hergestellt werden müssen, um einen vollständigen Genverlust analysieren zu können. Weiterhin können kompensatorische Mechanismen den Verlust von Genfunktionen maskieren.¹²⁷

1.6 Ziel dieser Arbeit

Die pathophysiologischen Mechanismen während der Entstehung der HI sind unzureichend aufgeklärt. Um zu verstehen, wie es zu den morphologischen und elektrophysiologischen Veränderungen im Herzen kommt, ist es nötig, die molekularen Mechanismen der kardialen Pathophysiologie zu verstehen. Hierbei rückt insbesondere die Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials in den Fokus. Die Verlängerung führt zu Arrhythmien, an denen ein Großteil der Patienten mit HI verstirbt. Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Geweben von erkrankten Herzen zahlreiche miRNAs dysreguliert vorliegen. Die Funktion von miR-19 wurde, neben anderen miRNAs, in den vergangenen Jahren mit einigen Mechanismen und Signalwegen im Herzen in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit wird mit dem Zebrafisch als Modellorganismus die Funktion von miR-19 in der Elektrophysiologie des Herzens untersucht. Nach einem transienten *knockdown* und einem *knockout* von miR-19 werden die molekularen und funktionalen Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System analysiert und die entsprechenden Signalwege aufgeklärt.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen Die Substanzen für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Sigma Aldrich bezogen.

Puffer	Zusammensetzung	
EDTA-Lösung	0,5 M	Na ₂ EDTA
	pH 8,0	mit NaOH einstellen
LB-Medium	171 mM	NaCl
	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	pH 7,0	mit NaOH einstellen
TBE	44,5 mM	Tris
	44,5 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA [pH 8]
1x TBS	20 mM	Tris Base
	137 mM	NaCl
	pH 7,6	mit HCl einstellen
1x TBS/T	1x	TBS
	0,1% (v/v)	Tween 20
Trypanblau-Lösung	0,8% (v/v)	Trypanblau
DMEM complete	DMEM	high glucose
	10 %	FCS
	1x	L-Glutamin
	1x	Penicillin / Streptomycin
E3-Puffer	4 M	NaCl
	170 nM	KCl
	330 nM	CaCl ₂
	330 nM	MgSO ₄
LB-Agar	30 g/l	LB-Agar
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
PBS-T	1x	PBS
	0,1 % (v/v)	Tween-20
4 % PFA in PBS	1x	PBS
	4 %	Paraformaldehyd
PBT	1x	PBS
	0,2 %	Triton X-100
Pronase-Lösung	20 g/l	Pronase
	4 h	bei 37 °C inkubieren, bei -20 °C aufbewahren

Puffer	Zusammensetzung	
PTU, 100x	3 g/l	1-Phenyl-2-Thiourea in E3 lichtgeschützt aufbewahren
Lösung A	25 mM	NaOH
	0,2 mM	Na ₂ EDTA
Lösung B	40 mM	Tris-HCl
Prähybridisierungspuffer (miRNA)	50 – 65 %	Formamid
	5 x	SSC
	0,1 %	Tween-20
	50 µg/ml	Heparin
	500 µg/ml	tRNA
	pH 6,0	mit Zitronensäure einstellen
Hybridisierungspuffer (miRNA)	1x	Prähybridisierungspuffer
	2 µl	<i>miRCURY LNA detection probe</i>
SSC 20x	6 M	Natriumchlorid
	1 M	Natriumacetat
EDTA	0,5 M	EDTA
	pH 8	mit NaOH einstellen
TAE Puffer 50x	0,2 M	Tris
	0,1 M	EDTA pH 8
	pH 8	mit NaOH einstellen
SDS 10%	10 %	Sodiumdodecylsulfat
Pipettenlösung	139 mM	KCl
	10 mM	NaCl
	0,5 mM	MgCl ₂
	5 mM	Mg-ATP
	0,5 mM	EGTA
	0,4 mM	GTP-Tris
	10 mM	HEPES
	pH 7,2	mit NaOH einstellen
Außenlösung	1x	Leibowitz 15 Medium
	1x	Penicillin / Streptomycin
SSCT 2x	2x	SSC
	0,1 %	Tween-20
Zitronensäure	1 M	Zitronensäure
DEPC Wasser	0,1 %	DEPC
	1 h	autoklavieren
Essigsäureanhydrid Lösung	2,5 µl	Essigsäureanhydrid
	1 ml	0,1 M Triethanolamin
HYB⁻	50 %	deionisiertes Formamid
	5x	SSC
	0,1 %	Tween-20
		bei -20 °C lagern

Puffer	Zusammensetzung	
HYB⁺	1x	HYB ⁻
	5 mg/ml	Hefe-RNA
	50 µg/ml	Heparin
		bei -20 °C Lagern
MAB	100 mM	Maleinsäure
	150 mM	NaCl
	pH 7,5	mit NaOH einstellen
Blocking Lösung	1x	MAB
	2 %	Blocking Reagent (Roche)
Färbelösung	50 mM	mgCl ₂
	100 mM	NaCl
	0,1 %	Tween-20
	1 mM	Levasimol
	100 mM	Tris (pH 9,5)

2.2 Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte Geräte und deren Hersteller, die für die Anfertigung dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR System	Thermo Scientific, Karlsruhe
Elektrophoresegerät	Biorad, München
Feinwaage	Kern, Balingen
Geldokumentationssystem	Peqlab, Erlangen
Inkubator Heratherm	Thermo Scientific, Karlsruhe
Inkubator Heracell 150	Thermo Scientific, Karlsruhe
Kühlschränke	Liebherr, Biberach an der Riß
NanoDrop Lite	Thermo Scientific, Karlsruhe
Fluoreszenzlampe	Olympus, Hamburg
Mikroskop SZX16	Olympus, Hamburg
Mikroskop IX70	Olympus, Hamburg
pH Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Kinesis, Langenfeld
Sterilwerkbank	Integra Bioscience, Fernwald
Thermocycler T100	Bio-Rad, München
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf
Vortexgerät	Phoenix Instrument, Garbsen
Waage EW 6000 - 1M	Kern, Balingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Mikroskop, Axio Observer.Z1	Carl Zeiss, Jena
Mikroinjector	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 4530 R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 4: Reagenzien Substanzen und Reagenzien und deren Hersteller, die für die Anfertigung der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Reagenzien	Hersteller
2-Phenoxyethanol	Sigma Aldrich, München
4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Scientific, Karlsruhe
Agarose	Carl-Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck Calbiochem, Darmstadt
Dilution Buffer	Sigma Aldrich, München
Ethanol vergällt $\geq 99,8$ % mit ca. 1 % MEK	Carl-Roth, Karlsruhe
Hydrogen Peroxide 30 % w/v (100 vol.) for analysis	AppliChem GmbH, Darmstadt
Laminin	Sigma Aldrich, München
Methanol	Sigma Aldrich, München
Methylcellulose	Sigma Aldrich, München
Natriumcitrat	Carl-Roth, Karlsruhe
Power Block	BioGenex, San Ramon, CA, USA
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
Triton X100	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Tween-20	Carl-Roth, Karlsruhe
FCS	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler DNA-Marker	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
6x Loading Dye	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
T7 Endonuklease1	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Pen / Strep (Zellkultur)	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
DMEM - Medium	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Leibowitz-15-Medium	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
NBT/BCIP Stock Solution	11681451001, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	11093274910, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Terfenadin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Phenylephrin	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
SOC-Medium	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Trypsin / EDTA	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8$ %	Carl-Roth, Karlsruhe
Propanol	Carl-Roth, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Grüssing, Filsum, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland

Reagenzien	Hersteller
Essigsäure (>34 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Morpholino-modifizierte Oligonukleotide	Gene Tools, Philomath, USA
Wasser	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Cas9-Protein	ToolGen, Seoul, Südkorea
pEZX-MT01, Dual Luciferase Vector	GeneCopoeia, Wien Österreich
pGL3 - Luciferase Vector	AddGene, Cambridge, USA
pIS2 – Renilla Luciferase Vector	AddGene, Cambridge, USA

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller, die zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Materialien	Hersteller
Accu-Edge® Disposable Microtome Blades	Sakura, Staufen
Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel, Braunschweig
Einweg-Pasteurpipetten	Carl-Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 15/50 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Fettstift (Dako Pen)	Dako, Hamburg
FluoroDish Zellkulturplatte	World Precision Instruments, Herts, UK
Objektträger mit Vertiefungen	Marienfeld, Lauda Königshofen
Objektträger Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Reaktionsgefäße 0,2 ml (PCR)	kisker Biotech, Steinfurt
PCR Platte, 96-Well	Thermo Scientific, Karlsruhe
Petrischalen	greiner bio-one, Frickenhausen
Pinzetten	neoLab, Heidelberg
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Polyolefin StarSeal	Starlab, Hamburg
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Präpariernadel	neoLab, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen und Einmalkanülen	BD, Heidelberg
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Stößel	Sigma Aldrich, München

2.3 Kits und Reagenzien

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits und Reagenzien mit Bestellnummer, Hersteller und Verwendungszweck aufgelistet.

GeneJET Plasmid Miniprep Kit

Das GeneJET Plasmid Miniprep Kit Midiprep (K0502, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) wurde für die Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

PureYield™ Plasmid Midiprep System

Das PureYield Midiprep Kit (A2492, Promega, Mannheim, Deutschland) wurde für die Extraktion größerer Mengen an Plasmid-DNA verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

GeneJET Gel Extraction Kit

Das GeneJET Gel Extraction Kit (K0691, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) wurde für die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA wurden die Banden auf einem UV-Transluminator ausgeschnitten und nach den Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

QIAquick PCR Purification Kit

Das QIAquick PCR Purification Kit (28106, Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde zur Aufreinigung von DNA Fragmenten aus PCR- und Verdau-Ansätzen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

MEGAscript™ T7 Transcription Kit

Dieses Kit (AM1354, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) wurde zur Herstellung der sgRNA verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

mMESSAGE mMACHINE® SP6 T7 Transcription Kit

Das mMessage mMachine Kit (AM1340, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) wurde verwendet, um die RNA-Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung herzustellen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

miScript II RT Kit

Das miScript II-RT-Kit (218161, Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde für die RT von miRNAs verwendet. Die Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

iScript™ cDNA Synthesis Kit

Dieses Kit (1708891, Bio-Rad, München, Deutschland) wurde zur Herstellung von cDNA aus mRNA verwendet. Die Verwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

miScript SYBR® Green PCR Kit & QuantiFast SYBR Green PCR Kit

Diese Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden für die relative Quantifizierung von miRNA- (218076) und mRNA-Transkripten (204056) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

TA Cloning® Kit

Für die Zwischenklonierung von SONDENSEQUENZEN und 3'UTRs wurde das TA Cloning Kit (K2060-01, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Klonierung mittels A-Überhänge erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Dieses Kit (E1910, Promega, Mannheim, Deutschland) wurde für einen Reporter-Gen-Assay verwendet, um die posttranskriptionelle Regulation von miR-19b auf potentielle Gene zu untersuchen. Die Verwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit

Das Mutagenese-Kit (210519, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) wurde für die Mutagenese der potentiellen miR-19b-Bindestellen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

2.4 Zebrafischspezifische Methoden

2.4.1 Aufzucht, Haltung und Verpaarung von Zebrafischen

Die Aufzucht, Haltung und Verpaarung der Zebrafische erfolgte wie durch Westerfield beschrieben.¹²⁸ Die Fische wurden bei einer konstanten Temperatur von 28,5 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 13/11 Stunden gehalten. Die verwendeten Zebrafischlinien sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Fischlinien Für die Untersuchungen im Zebrafischmodell wurden die folgenden Fischlinien verwendet.

Art der Fischlinie	Linien
Wildtyplinien	AB
	TE
	TüAB
Transgene Linien	<i>Tg(myl7:GFP)</i>
	<i>Tg(kdrl:GFP)</i>
Mutante Linien	<i>reggae m230</i>

2.4.2 Mikroinjektion

Für die genetische Manipulation von Zebrafischembryonen wurden Substanzen mittels Mikroinjektion in die befruchtete Eizelle eingebracht. Hierfür wurde mithilfe einer speziell angefertigten Schablone (TU-1, Adaptive Science Tools, Worcester, USA) eine Injektionsrampe aus 3 %iger Agarose (in E3-Medium) in eine Petrischale gegossen. Die Injektionsrampe besitzt Vertiefungen, in denen die befruchteten Fischeier für die Mikroinjektion aufgereiht werden. Die Injektionsnadeln bestehen aus feinen Glaskapillaren, die mithilfe eines Kapillarziehers hergestellt werden. Die Morpholinos wurden für die Injektion mit 200 mM KCl auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Zusammensetzung des Injektionsgemisches für die CRISPR-Cas9-Methode ist Kapitel 2.5.1 zu entnehmen. Die zu injizierende Lösung wurde in die Glaskapillare gefüllt und mithilfe eines Mikroinjektors (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) je nach Injektionslösung in den Dotter oder in die Eizelle injiziert. Die verwendeten Morpholinos sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Eier wurden einige Stunden bei 28,5 °C in E3-Medium inkubiert. Anschließend wurden tote Eier aussortiert und das Medium erneuert. Die Embryonen wurden bis zur jeweiligen Untersuchung weiterhin bei 28,5 °C inkubiert.

Tabelle 7: Morpholinosequenzen Für den spezifischen *knockdown* von miRNAs wurden Morpholinos mit einer spezifischen Sequenz verwendet, die die Prozessierung und die Aktivität der jeweiligen miRNA inhibiert.

Morpholino	Sequenz (5'→3')
MO19	TCAGTTTTGCATGGATTTGCACAGC
MO19a	GTAGTGCAACTATGCAAAACTAGCA
MO19b	GCTGAATGCAAACCAGCAAACTGA
MO19c	GCCGGATGCAATCCTGCAAACTCA
MO19d	CTGACTGCCCACCCCGCAAAGCTGA
MO363	GATTACAGATGGATACCGTGCAATT
MO-Kontrolle	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

2.4.3 *in-situ*-Hybridisierung kardialer Marker

Für die Expressionsanalyse von kardialen Markern wurde eine *in-situ*-Hybridisierung an 10-15 Embryonen bei 48 hpf durchgeführt. Die Embryonen wurden dechorioniert und anschließend in einer 4 %igen PFA-Lösung (in PBS) über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zebrafischembryonen zwei Mal für 5 Minuten mit PBST gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen durch eine Methanolreihe dehydriert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Methanolreihe Während der *in-situ*-Hybridisierung wurden Embryonen zur Entwässerung mit aufsteigenden Konzentrationen an Methanol behandelt. Für die Rehydrierung wurden die Embryonen in umgekehrter Reihenfolge der Methanolreihe behandelt.

Waschschritt	Methanolkonzentration (in PBST)
1.	10 % Methanol
2.	30 % Methanol
3.	50 % Methanol
4.	70 % Methanol
5.	100 % Methanol (2x)

Bei jedem Schritt wurden die Embryonen für 5 Minuten in der jeweiligen Lösung inkubiert. Dehydrierte Embryonen können für mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden. Für die weitere Behandlung wurden die Embryonen rehydriert. Hierfür wurden die Embryonen in umgekehrter Reihenfolge mit den Methanollösungen für jeweils 5 Minuten inkubiert und anschließend zwei Mal für 5 Minuten mit PBST gewaschen. Durch eine Inkubation mit einer Proteinase-K-Lösung (10 µg/ml in PBST) wurde die Infiltration der *in-situ* RNA-Sonde erleichtert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach dem Alter der Zebrafischembryonen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Dauer der Proteinase-K-Behandlung Die Dauer des Proteinase-K-Verdau während der *in-situ*-Hybridisierung richtet sich nach dem Alter der Embryonen.

Alter der Embryonen	Dauer der Proteinase K-Behandlung
< 24 hpf	3 – 5 Minuten
24 hpf	8 – 10 Minuten
48 hpf	18 – 20 Minuten
72 hpf	26 – 30 Minuten

Nach dem Proteinase-K-Verdau wurde mit PBST gespült und für 5 Minuten mit PBST inkubiert, um die Reste der Proteinase-K zu entfernen. Anschließend wurde erneut für 20 Minuten mit 4 %iger PFA-Lösung fixiert und zweimal mit PBST für jeweils 5 Minuten gewaschen. Um in späteren Aufnahmen den Hintergrund zu reduzieren, wurden die Embryonen mit Essigsäureanhydrid behandelt. Hierfür wurden die Embryonen zunächst mit DEPC-Wasser gespült und für 60 Minuten mit einer Essigsäureanhydrid-Lösung inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimal für 10 Minuten mit PBST gewaschen. Für die Prähybridisierung wurden die Embryonen zunächst für 5 Minuten mit 200-500 µl HYB⁻-Puffer und anschließend für 3-4 Stunden mit HYB⁺-Puffer bei 65 °C inkubiert. Im folgenden Schritt erfolgte die Hybridisierung. Hierfür wurde die Prähybridisierungslösung durch die Hybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierungslösung (HYB⁺ + 10 µl/ml Digoxigenin-markierte RNA-Sonde) wurde bevor sie auf die Embryonen gegeben wurde 5-10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C.

Am folgenden Tag wurden die Zebrafischembryonen zweimal für 30 Minuten mit einer 50 %igen Formamid-Lösung (in 2x SSCT) inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen mit 2x SSC für 15 Minuten bei 65 °C gewaschen, bevor sie bei 37 °C für 30 Minuten mit RNaseA (10 µg/ml in 2x SSC) inkubiert wurden. Die RNaseA-Behandlung dient zur Degradation von einzelsträngiger RNA. Hierdurch wurden unspezifisch gebundene RNA-Sonden verdaut und der Hintergrund verringert. Die Embryonen wurden einmal für 5 Minuten bei 37 °C und zweimal für 30 Minuten bei 65 °C mit 0,2x SSC gewaschen. Anschließend wurden sie zweimal bei Raumtemperatur mit 0,2x SSC gewaschen. Die Embryonen wurden in 24-well-Platten überführt und für 3-5 Stunden mit 2%iger *blocking*-Lösung inkubiert. Anschließend wurde der Anti-Digoxigenin-Antikörper (11093274910, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) 1:3000 in *blocking*-Lösung gelöst, auf die Embryonen gegeben und über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Embryonen mit *blocking*-Lösung für 25 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Zebrafischembryonen dreimal

für jeweils 25 Minuten in MAB-Lösung gewaschen. Vor der Färbereaktion wurden die Embryonen dreimal für 5 Minuten in Färbelösung (ohne Substrat) äquilibriert und anschließend in 500 µl Färbelösung (mit 20 µl/ml NBT/BCP Substrat) in Dunkelheit inkubiert. In Abständen von 30 Minuten wurde unter dem Mikroskop untersucht, ob die gewünschte Färbung erreicht wurde. Durch Inkubation bei 37 °C kann die Reaktion beschleunigt werden. Zum Stoppen der Färbereaktion wurde die Färbelösung abgenommen und die Embryonen dreimal für jeweils 10 Minuten in PBST gewaschen.

Für die Dokumentation wurden die behandelten Embryonen in 2,5 %ige Methylzellulose überführt, mit einer flexiblen Präparationsnadel ausgerichtet und unter dem Mikroskop fotografiert.

2.4.4 *in-situ*-Hybridisierung von miRNAs

Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden 10 bis 15 Embryonen verwendet. Das Chorion der 48 und 72 hpf Zebrafischembryonen wurde mit zwei Pinzetten entfernt. Anschließend wurden die Embryonen in 4 % Paraformaldehyd (PFA; in PBS) bei 4 °C über Nacht fixiert. Um den fixierten Embryonen das Wasser zu entziehen, wurden sie in aufsteigenden Methanol-Konzentrationen jeweils 20 Minuten bei 4 °C inkubiert (vgl. Tabelle 8). Dehydrierte Embryonen können in Methanol bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden. Das Protokoll der *in-situ*-Hybridisierung erstreckte sich über einen Zeitraum von drei Tagen. Am ersten Tag wurden die Embryonen rehydriert. Hierfür wurden sie in umgekehrter Reihenfolge mit den Methanollösungen für jeweils 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Embryonen vier Mal für jeweils fünf Minuten in PBST gewaschen. Um das Gewebe durchlässig für die Sonden zu machen, wurden die Embryonen in 10 µg/ml Proteinase-K inkubiert. Die Länge der Inkubation richtete sich nach dem Alter der Embryonen. 24 hpf Embryonen wurden für 15 Minuten verdaut, während 48 hpf Embryonen für 30 Minuten und 72 hpf Embryonen für 60 Minuten verdaut wurden. Im nächsten Schritt wurden die Embryonen erneut für 20 Minuten in 4 % PFA-PBS fixiert und fünfmal für jeweils fünf Minuten in PBST gewaschen. Die Embryonen wurden für 4 Stunden bei 21 °C unterhalb der Schmelztemperatur in 200 µl Prähybridisierungspuffer inkubiert. Nachfolgend wurden der Prähybridisierungspuffer durch 200 µl Hybridisierungspuffer (Prähybridisierungspuffer mit 2 µl miR-19a bzw. miR-19b spezifischer DIG-markierter-miRCURY-Sonde) ausgetauscht und bei gleicher Temperatur über Nacht inkubiert.

Am zweiten Tag wurde der Hybridisierungspuffer abgenommen und die Embryonen kurz mit Prähybridisierungspuffer gewaschen. Daraufhin wurden die Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen an SSC behandelt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Waschschritte nach der Hybridisierung mit miRNA-Sonden Nach der Hybridisierung werden die Zebrafisch-embryonen mit steigenden Konzentrationen an SSC-Puffer und gleichzeitig absteigenden Konzentrationen an Hybridisierungspuffer für jeweils 15 Minuten gewaschen.

Waschschritt	Lösung
1.	75 % HP / 25 % 2x SSC
2.	50 % HP / 50 % 2x SSC
3.	25 % HP / 75 % 2x SSC
4.	2x SSC (2x)

Es folgten weitere Waschschritte: Zweimal mit 0,2x SSC bei Hybridisierungstemperatur für jeweils 30 Minuten, 75 % 0,2x SSC / 25 % PBST bei Raumtemperatur für 10 Minuten, 50 % 0,2x SSC / 50 % PBST bei Raumtemperatur für 10 Minuten, 25 % 0,2x SSC / 75 % PBST bei Raumtemperatur für 10 Minuten und mit PBST bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Mit dem Ziel, unspezifische Proteininteraktionen zu blockieren, wurden die Embryonen für mehrere Stunden mit einer *blockingsolution* (PBST/ 2 % Schafserum/ 2mg/µl BSA) inkubiert. Der Anti-DIG-Antikörper (11093274910, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde 1:5000 in *blockingsolution* verdünnt und über Nacht auf die Embryonen gegeben.

Am dritten Tag der *in-situ*-Hybridisierung wurde die Antikörperlösung abgenommen und 7 x mit PBST für 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Zebrafische dreimal mit *staining*-Puffer gewaschen. Für die Färbung wurde das Färbesubstrat hinzugegeben und bis zur gewünschten Färbung inkubiert. Zum Beenden der Färbereaktion wurde das Färbesubstrat abgenommen und die Embryonen mit PBST gewaschen. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden die Fische in 2,5 % Methylzellulose ausgerichtet und unter dem Mikroskop fotografiert.

2.4.5 Pharmakologische Behandlung von Zebrafischen mit Terfenadin

Zebrafischembryonen wurden durch Behandlung mit Terfenadin für einen 2:1 AV-Block sensitiviert. Terfenadin inhibiert die Funktion von I_{Kr} , wodurch die Repolarisierung im Ventrikel gestört wird. Schon bei sehr geringen Konzentrationen zeigen die Zebrafische eine

Verlängerung des ventrikulären AP. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu den beschriebenen Arrhythmien.

Für die Behandlung wurden 48 hpf Zebrafischembryos dechoreoniert, falls diese noch nicht geschlüpft waren. Eine 30 mM Stock-Lösung aus Terfenadin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in DMSO wurde in E3-Medium verdünnt. Für die Behandlung wurden Konzentrationen von 10-30 μ M verwendet. Als Kontrolle diente 1 % DMSO in E3-Medium.

2.4.6 M-Mode-Aufnahmen

Der M-Mode (*motion*-Mode) ist eine Aufnahmemethode der Echokardiographie. Diese Methode lässt sich unter anderem dafür verwenden, die Herzfunktion zu visualisieren. Am Zebrafischembryo wurden die Aufnahmen nicht mittels eines Echokardiographen, sondern durch Fluoreszenzmikroskopie erstellt. Hierfür wurde die transgene Fischlinie *Tg(My17:GFP)* verwendet. Die Zebrafischembryonen wurden bei 48 hpf in 2 %ige Methylzellulose eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop platziert. Das fluoreszierende Herz wurde für zehn Sekunden gefilmt. Um ein 1-dimensionales Bild des M-Mode zu konstruieren, wurde aus jedem *frame* ein 1 Pixel breiter Abschnitt in der Transversalebene auf der Höhe des Ventrikels oder des Atriums kopiert. Die kopierten Abschnitte wurden anschließend zu einer M-Mode Aufnahme zusammengesetzt.

2.4.7 Analyse von *reggae*-Mutanten

Die *reggae*-Mutante besitzt einen einfach zu beobachtenden Phänotyp, bei dem das Herz Arrhythmien aufweist. Um diesen Phänotyp festzustellen, wurden 48 hpf Zebrafischembryonen in 96-well Kulturschalen überführt. Der Herzschlag der Zebrafische wurde über einen Zeitraum von zwei Minuten beobachtet. Wies der Fisch während dieser Zeit Arrhythmien aus, wurde sein Phänotyp als Mutante notiert. Zeigte der Fisch während den zwei Minuten keinen Phänotyp, wurde er phänotypisch als Wildtyp beschrieben.

2.4.8. Ermittlung der Herzfrequenz und des *fractional shortenings*

Für die Analyse der Herzfrequenz wurden die Zebrafischembryonen unter dem Mikroskop beobachtet. Die Herzschläge wurden über einen Zeitraum von 10 Sekunden gezählt. Die ermittelten Werte wurden auf eine Minute hochgerechnet.

Für die Ermittlung der ventrikulären Verkürzungsfraction (*fractional shortening*, FS) wurden die Fische in 2 %iger Methylzellulose eingebettet und lateral nach links blickend ausgerichtet. Die Fische wurden unter dem Mikroskop plaziert und ein Video des kontrahierenden Herzens wurde angefertigt. Durch Ermittlung des systolischen und diastolischen Diameters des Ventrikels kann ein prozentualer Wert der Kontraktion ermittelt werden:

$$\text{FS [\%]} = \frac{\text{Diastole} - \text{Systole}}{\text{Diastole}} \times 100$$

2.4.9 Foto- und Videodokumentation

Die zu dokumentierenden Zebrafischembryonen wurden in 2,5 %iger Methylzellulose (in E3-Medium) positioniert und mithilfe einer elastischen Präpariernadel ausgerichtet. Für die Dokumentation wurden die Fische unter dem Stereomikroskop (SZX16, Olympus, Hamburg) oder dem Mikroskop (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss, Jena) fotografiert und gefilmt. Die Bilder wurden mit ImageJ bearbeitet.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 CRISPR/Cas9

Für die Mutagenese des miR-19b-Gens wurde die CRISPR/Cas9-Methode angewendet. Diese Methode ermöglicht eine gezielte Mutation an nahezu jedem Locus im Genom. Die Position der Mutation wird lediglich durch die PAM-Sequenz limitiert. Für das Design der sgRNA wurde der Algorithmus *chopchop* verwendet.¹²⁹ Für die Herstellung der sgRNA wurden folgende Oligonukleotide bestellt: miR-19b-sgRNA-F: 5'-TAGGACCCCCGGTCAG-TTTTGC-3', miR-19b-sgRNA-R: 5'-AAACGCAAAACTGACCGGGGGT-3'. Die in Rot dargestellten Überhänge wurden für die Klonierung benötigt. Die Oligonukleotide wurden entsprechend dem Reaktionsprotokoll miteinander hybridisiert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Reaktionsprotokoll zum Hybridisieren von Oligonukleotiden Die Oligonukleotide wurden nach dem Mischen durch langsames Abkühlen der Lösung miteinander hybridisiert.

Volumen	Lösung	Temperatur	Inkubationszeit
2 µl	gRNA forward Oligonukleotid (100 µM)	95 °C	5 Minuten
2 µl	gRNA reverse Oligonukleotid (100 µM)	-0,1 °C	pro Sekunde bis 50 °C
2 µl	NEB Puffer 3	50 °C	10 Minuten
14 µl	Wasser	-0,1 °C	pro Sekunde bis 4 °C

Die miteinander hybridisierten Oligonukleotide wurden in den pT7-gRNA-Vektor (46759, Addgene, Cambridge, USA) ligiert. In einem kombinierten Schritt aus Restriktionsverdau und Ligation wurden die Oligonukleotide an die entsprechende Position eingefügt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Reaktionsprotokoll für die Klonierung der sgRNA Das Einfügen der spezifischen Sequenz der sgRNA erfolgte in einem kombinierten Schritt aus Restriktionsverdau und Ligation.

Volumen	Lösung	Temperatur	Inkubationszeit
1 µl	hybridisierte Oligonukleotide	37 °C	60 Minuten
4 µl	pT7-gRNA-Vektor (100 ng/µl)	16 °C	45 Minuten
1 µl	Puffer 3 (NEB)	vorherige Schritte 3x wiederholen	
1 µl	T4 DNA Ligase Buffer (NEB)	55 °C	30 Minuten
0,5 µl	BsmBI (NEB)	80 °C	15 Minuten
0,3 µl	BglII (NEB)		
0,3 µl	SalI (NEB)		
0,5 µl	T4 DNA-Ligase (NEB)		
1,4 µl	Wasser		

Der komplette Ligationsansatz wurde für eine Transformation verwendet und auf Ampicillin-Selektivagar ausgestrichen. Die Plasmid-DNA von einzelnen Klonen wurde durch eine Miniprep isoliert und mit dem Primer M13Uni -21 sequenziert.

Für die Herstellung der sgRNA wurde eine *in vitro* Transkription durchgeführt. Hierfür wurde zunächst der Vektor pT7-gRNA (mit entsprechendem Insert) durch einen Restriktionsverdau für zwei Stunden bei 37 °C linearisiert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau von pT7-gRNA Damit der Vektor als Matrize zur Herstellung einer sgRNA dienen konnte, wurde er durch einen Restriktionsverdau linearisiert.

Volumen	Lösung
3 µg	pT7-gRNA (mit entsprechendem Insert)
5 µl	Puffer 3.1 (NEB)
1x	BSA (NEB)
1 µl	BamHI-HF (NEB)

Der Verdau wurde durch die Zugabe von Proteinase-K (finale Konzentration: 100 µg/ml) und SDS (finale Konzentration 0,5 %) und anschließender Inkubation bei 50 °C gestoppt. Das linearisierte Plasmid wurde mittels des PCR-purification-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und in 39 µl Wasser eluiert. Für die Herstellung der sgRNA wurde das T7-Megashoerscript-Kit (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die *in*

in vitro Transkription wurde durch Zugabe von 15 µl Ammoniumacetat Stopp-Lösung beendet. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 300 µl Ethanol für 30 Minuten bei -20 °C präzipitiert. Nach Pelettierung der RNA wurde diese mit gekühltem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 50 µl Wasser aufgelöst.

Für die Injektion der sgRNA in das Einzellstadium des Zebrafischembryos wurde eine Injektionslösung nach Tabelle 14 hergestellt.

Tabelle 14: CRISPR/Cas9 Injektionslösung Zusammensetzung der Injektionslösung für die Mikroinjektion.

Konzentration	Lösung
150 ng/µl	sgRNA
400 ng/µl	Cas9-Protein (ToolGen, Seoul, Südkorea)

Bei der Injektion ist darauf zu achten, dass die Lösung direkt in die Eizelle injiziert wird. Zur Überprüfung der Mutationseffizienz wurde 24 Stunden nach der Injektion DNA aus 10-15 Embryonen isoliert. Durch eine PCR-Reaktion wurde die miR-19b umgebende genomische Region amplifiziert. Hierzu wurden folgende Primer verwendet: miR-19b-genoF: 5'-CTGCTGCTTCTCCACGATTC-3', miR-19b-genoR: 5'-CGGGACAAGTGCAATACCTT-3'. Das PCR-Produkt wurde mittels des PCR-Aufreinigungs-Kits aufgereinigt und in 20 µl eluiert. 200 ng der DNA wurden auf 18 µl mit Wasser verdünnt und mit 2 µl Puffer 2 (NEB) versetzt. Die DNA-Stränge wurden nach Protokoll aufgeschmolzen und erneut hybridisiert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Reaktionsprotokoll zum *mismatch pairing* von mutanter und Wildtyp DNA Durch Aufschmelzen und erneutes Hybridisieren entstehen DNA-Stränge mit *mismatches* in den mutierten Bereichen.

Temperatur	Inkubationszeit
95 °C	5 Minuten
-0,2 °C	pro Sekunde bis auf 85 °C
-0,1 °C	pro Sekunde bis auf 4 °C

Durch das Aufschmelzen und erneute Hybridisieren entstehen DNA-Doppelstränge, die im Bereich von miR-19b eine fehlerhafte Komplementarität, sogenannte *mismatches*, besitzen. Diese nicht-komplementären Sequenzen werden durch die T7-Endonuklease 1 (T7E1, NEB) erkannt und geschnitten. Durch eine elektrophoretische DNA-Auftrennung im Agarosegel kann die Mutagenese-Effizienz analysiert werden. Proben mit dem gewünschten Bandenmuster wurden zusätzlich durch eine Sequenzierung auf Mutationen untersucht.

Zusätzlich wurden amplifizierte Fragmente mittels Topo-TA-Klonierung in den Vektor pCRII eingebracht, um die Sequenzen von einzelnen Mutationen zu analysieren.

2.5.2 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von *E.coli* wurden chemisch kompetente Top10-Zellen verwendet. Hierbei wurden jeweils 3-10 µl der Plasmidlösung zu den Bakterien gegeben, gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C. Nach weiteren 2 Minuten Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien in 250 µl SOC-Medium aufgenommen und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf selektiven LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.3 Selektive Agarplatten und Flüssigmedien

Für die Amplifikation von Plasmiden besitzen diese Antibiotika-Resistenzgene, die eine Selektion von *E.coli* durch Selektivmedien oder Selektivagar ermöglichen. Entsprechend der Antibiotikaresistenzen der jeweiligen Stämme wurden dem Medium und dem Selektivagar 100 µg/ml Ampicillin oder 20 µg/ml Kanamycin hinzugefügt.

2.5.4 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde das Miniprep-Kit (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Für größere Mengen an Plasmid-DNA wurde das Midi-Prep-Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.5.5 Dualer Luciferase-Reporterassay

Durch einen Luciferase-Reporterassay wurde die direkte Regulation der Expression von Genen durch miR-19b untersucht. Hierfür wurden wie in 2.6.2 beschrieben HEK293A-Zellen mit Luciferase-Konstrukten transfiziert. Eine Auflistung der verwendeten Plasmide ist Tabelle 16 zu entnehmen. Durch eine Kotransfektion mit einem miR-19b-mimic (C-300489-03, GE Healthcare) wurde überprüft, ob die 3'-UTR des jeweiligen Gens miR-19b-responsive Elemente enthält. Als Kontrolle wurden die gleichen Vektoren mit einem Kontroll-mimic

(CN-001000-01, GE Healthcare) kotransfiziert. Bei einer direkten Bindung von miR-19b im Bereich der 3'UTR des zu untersuchenden Gens, kommt es zu einer Inhibition der *firefly*-Luciferase-Expression. Für die Effizienzkontrolle der Transfektion diente eine Kotransfektion von *renilla*-Luciferase. Für den Assay wurde das *Dual-Luciferase® Reporter Assay System Kit* (E1910, Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit PBS gewaschen und mit 100 µl 1x Passive Lysis Buffer für 20 Minuten auf dem Schüttler lysiert. Anschließend wurden pro Ansatz 20 µl des Lysats in weiße 96-well-Platten (CLS3600, Sigma Aldrich) überführt. Im Luminometer wurden 25 µl Luciferase-Substrat zum Lysat gegeben und die Luciferase-Aktivität über 10 Sekunden gemessen. Anschließend wurden 25 µl Stop & GLO Puffer zu dem Gemisch gegeben und die *renilla*-Luciferaseaktivität ebenfalls über 10 Sekunden gemessen. Die relative Luciferase-Aktivität wurde aus dem Verhältnis der beiden Mittelwerte zueinander berechnet.

In einer weiteren Kontrolle wurden die potentiellen Binde-Motive von miR-19b innerhalb der 3'-UTR des jeweiligen Gens mutiert. Hierfür wurde das *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (210519, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die für die Mutagenese verwendeten Primer sind in Tabelle 17 aufgelistet. Durch die Mutation sollte im Falle einer direkten Regulation durch miR-19b die Bindestelle identifiziert werden.

Tabelle 16: Luciferase-Reporterplasmide Verwendete Plasmide für den Luciferase-Reporterassay.

Target-3'UTR	Vektor
Kontrolle	pEZX-MT01
Humanes KCNE1	pEZX-MT01
Humanes KCNE1 mut	pEZX-MT01
Humanes KCNE4	pEZX-MT01
Humanes KCNJ2	pGL3
Humanes KCNJ2 mut1	pGL3
Humanes KCNJ2 mut2	pGL3
Humanes KCNJ2 mut3	pGL3
Humanes SCN1B	pGL3
Humanes SCN1B mut	pGL3
Humanes SCN4B	pGL3
Humanes SCN4B mut	pGL3
Zebrafisch KCNE1	pGL3
Zebrafisch KCNE1 mut	pGL3
Zebrafisch KCNE4	pGL3
Zebrafisch KCNE4 mut	pGL3
Zebrafisch KCNJ2	pGL3
Zebrafisch KCNJ2 mut1	pGL3
Zebrafisch KCNJ2 mut2	pGL3
Zebrafisch SCN1B	pGL3
Zebrafisch SCN1B mut	pGL3
Zebrafisch SCN4B	pGL3
Zebrafisch SCN4B mut	pGL3

Tabelle 17: Mutageneseprimer Primersequenzen die für die Mutation von potentiellen miR-19b-sites in Luciferasereporter-Konstrukten verwendet wurden.

Primer	Sequenz (5' → 3')
hsaKCNJ2site1-F	CAAAGATAATGCATATTTTACGACAGTGGAGCTTACACTT
hsaKCNJ2site1-R	AAGTGTAAGCTCCACTGTCGTAATAATATGCATTATCTTTG
hsaKCNJ2site2-F	CTTGAACCGCCGGTTCATTTACGACCTTATTTCAGAAAATAGAG
hsaKCNJ2site2-R	CTCTATTTTCTGAATAAGGTCGTAATGAACCGGCGGTTCAAG
hsaKCNJ2site3-F	TTTCTGGGCTTTTCCTTTACGACATTCCAAAATTCATTTT
hsaKCNJ2site3-R	GAAATGAATTTTGAATGTTCGTAAGGAAAAGCCAGAAA
hsaSCN1B-F	CTCCTCCTTGCTGATTACGACACATTGGCCGCTTC
hsaSCN1B-R	GAAGCGGCCAATGTGTCGTAATCAGCAAGGAGGAG
hsaSCN4B-F	CTCCAGAGCTGGTTACGACAGCCCTTGTGTG
hsaSCN4B-R	CACACAAGGGCTGTCGTAACCAGCTCTGGGAG
hsaKCNE1-F	TCCACTCCTCCCTACGACCCATCCTGCACA
hsaKCNE1-R	TGTGCAGGATGGGTCGTAGGGAGGAGTGGGA
dreKCNE1-F	GTATGAAACAAAGCACATTACGATCCGAGATTTTTAATGTC
dreKCNE1-R	GACATTAAAATCTCGGATCGTAATGTGCTTTGTTTCATAC
dreKCNE4-F	CAATAGTGATGGGTTGTTACGAGAAAACGGTTCCC

Primer	Sequenz (5' → 3')
dreKCNE4-R	GCGGGAACCGTTTTTCTCGTAACAACCCATCACTATTG
dreKCNJ2site1-F	GAGTGTCTTACGAATATGCTACGTTAAATAAACACAGC
dreKCNJ2site1-R	GCTGTGTTTATTTAACGTAGCATATTCGTAAGAACAACCTC
dreKCNJ2site2-F	CATGGTTAAATAAACACAGCTATGAGGCACTGCACAGCTTAAG
dreKCNJ2site2-R	CTTAAGCTGTGCAGTGCCTCATAGCTGTGTTTATTTAACCATG
dreSCN1B-F	GCAGTAATTGTAGCACTGGTGATAACAAATCATAACCCAAC
dreSCN1B-R	GTTGGGTATGATTTGTTATCACCAGTGCTACAATTACTGC
dreSCN4B-F	CACATGCACGTGAATACAACCATCAGCCATCATGCTGTG
dreSCN4B-R	CACAGCATGATGGCTGATGGTTGTATTCACGTGCATGTG

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen und Bestimmung der Lebendzellzahl

HEK293A-Zellen wurden zweimal wöchentlich mit $1-2 \times 10^6$ Zellen in 75 cm²-Kulturflaschen ausgesät und mit 10 ml DMEM-Medium (+10 % fetales Kälberserum und 2 mM L-Glutamin) bei 10 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Für die Passage der Zellen wurde das Medium abgenommen und die adhärennten Zellen zweimal mit sterilem *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Durch Zugabe von 9 ml vorgewärmtem Kulturmedium wurde die Trypsinierung gestoppt. Ein Aliquot wurde im Verhältnis 1:2 mit einer 0,8 %igen Trypanblau-Lösung gemischt, um die Lebendzellzahl mittels Hämozytometer (BR717810-1EA, Sigma Aldrich, München, Deutschland) bestimmen zu können. Hierbei werden tote Zellen blau gefärbt, während lebende Zellen den Farbstoff aus der Zelle transportieren und farblos erscheinen.

2.6.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit Lipofectamine2000

Für die transiente Transfektion von HEK293A-Zellen mit Lipofectamine2000 (Thermo Fischer Scientific) wurden die Zellen am Vortag zunächst mit 1×10^5 Zellen/well in 24-well-Schalen ausgesät. Pro Ansatz wurden 6 µg Plasmid-DNA in 150 µl serumfreiem Medium gelöst. Gleichzeitig wurden 3 µl Lipofectamin2000 in 150 µl Medium gelöst. Anschließend wurden die zwei Lösungen gemischt und für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium in den wells wurde auf 400 µl reduziert. In einem nächsten Schritt wurden 100 µl der Transfektionslösung auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken mit

dem Medium gemischt. Nach 3-4 Stunden Inkubation bei 37 °C und 10 % CO₂ wurden die Schalen mit vorgewärmtem DMEM-Medium erneut auf 1 ml aufgefüllt.

2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung beschreibt eine Methode, die das Anfärben von verschiedenen Strukturen innerhalb von histologischen Gewebeschnitten ermöglicht. Die Zebrafischembryonen wurden zunächst mit 4 %iger PFA-Lösung über Nacht bei 4 °C fixiert und anschließend mithilfe des JB-4 Embedding Kits (Polyscience Inc.) in das entsprechende Einbettungsmedium überführt. Für die Einbettung wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Nach Aushärtung des Mediums wurden 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger überführt. Die Schnitte wurden über vier Stunden bei 70 °C getrocknet, bevor sie der HE-Färbung unterzogen wurden. Die getrockneten Schnitte wurden für 5 Minuten in Wasser rehydriert. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Minuten in gefilterter Hämatoxylin-Lösung inkubiert, bevor sie erneut für 2 Minuten in Wasser gewaschen wurden. In einem nächsten Schritt wurden die Schnitte für 1-2 Sekunden mit einer Säure-Alkohol-Mischung (2 ml 37 % Salzsäure, 25 ml 50 % Ethanol) gespült und nochmals mit Wasser gewaschen. Durch eine zweiminütige Inkubation in 10 %iger Natriumbikarbonat-Lösung erhalten die Zellkerne eine blaue Färbung. Anschließend werden die Objektträger jeweils eine Minute in 70 % und 95 % Ethanol inkubiert, bevor sie für 3-5 Minuten mit der Eosin-Lösung behandelt werden. Nach einem abschließenden Spülen mit Wasser und Trocknung im Wärmeschrank wurden die Schnitte unter dem Mikroskop analysiert.

2.7 Nukleinsäuren

2.7.1 Isolation der Gesamt-RNA aus Zebrafischen

Für die RNA-Isolation aus Zebrafischembryonen wurden 5-15 Embryonen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Medium wurde abgenommen und 800 µl Qiazol (79306, Qiagen, Hilden, Deutschland) zugegeben. Um das Gewebe zu dissoziieren und die Zellen zu lysieren wurden die Fische wiederholt durch eine Spritze gezogen (24G Kanüle). Die Extraktion der Ribonukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 160 µl Propanol. Nach der Zugabe wurden die Proben für 30 Sekunden stark geschüttelt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation (4°C, 15 min,

12.000 g). Die obere Phase, welche die RNA enthielt, wurde abgenommen und die RNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten gefällt. Beim Abnehmen der oberen Phase ist darauf zu achten, mit der Pipettenspitze die Interphase nicht zu berühren, um Kontaminationen der RNA zu vermeiden. Die präzipitierten RNA-Moleküle wurden durch Zentrifugation sedimentiert (13.000 rpm, 4°C , 30 min), mit $500\text{ }\mu\text{l}$ 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in $50\text{ }\mu\text{l}$ RNase freien Wasser aufgenommen.

2.7.2 qRT-PCR

Für die relative Quantifizierung von RNA-Transkripten wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde $1\text{ }\mu\text{g}$ Gesamt-RNA mit dem miScript II RT-Kit (für miRNAs; Qiagen, Hilden, Deutschland) oder mit dem iScript-Kit (für mRNA; Biorad, München, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Die Reaktionsansätze wurden nach Tabelle 18 angesetzt.

Tabelle 18: Reaktionsansätze zur Herstellung von cDNA Für die Herstellung von cDNA aus miRNA (miScript) und mRNA (iScript) wurden folgende Reaktionsansätze hergestellt.

miScript		iScript	
Volumen	Lösung	Volumen	Lösung
$10\text{ }\mu\text{l}$	RNA ($100\text{ ng}/\mu\text{l}$)	$10\text{ }\mu\text{l}$	RNA ($100\text{ ng}/\mu\text{l}$)
$4\text{ }\mu\text{l}$	5x HiSpec Buffer	$4\text{ }\mu\text{l}$	5x iScript Reaction Mix
$2\text{ }\mu\text{l}$	Nucleics Mix	$1\text{ }\mu\text{l}$	iScript RT
$2\text{ }\mu\text{l}$	RT Mix	$5\text{ }\mu\text{l}$	Wasser
$2\text{ }\mu\text{l}$	Wasser		

Die Probe wurde anschließend 1:10 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die qPCR wurde in 96-well Platten durchgeführt. Für die Quantifizierung von miRNAs wurde das miScript SYBR Green PCR Kit verwendet (Qiagen, Hilden). Für die Quantifizierung von mRNA-Molekülen wurde das Quantifast SYBR Green PCR Kit verwendet (Qiagen, Hilden). Die Reaktion erfolgte entsprechend Tabelle 19 und Tabelle 20.

Tabelle 19: Reaktionsansätze für die RT-PCR Für den Nachweis von miRNAs und mRNA wurden folgende Reaktionsansätze hergestellt.

MiScript SYBR Mix		Quantifast SYBR Mix	
Volumen	Lösung	Volumen	Lösung
5 µl	miScript SYBR Mix	5 µl	Quantifast SYBR Mix
1 µl	Wasser	2,8 µl	5x iScript Reaction Mix
1 µl	Primer Assay	0,1 µl	iScript RT
1 µl	Universal Primer	0,1 µl	Wasser
2 µl	cDNA	2 µl	cDNA

Tabelle 20: Reaktionsprotokoll für die RT-PCR Für den Nachweis von miRNAs und mRNA wurden folgende Reaktionsprotokolle durchgeführt.

miScript-RT-PCR (miRNA)			Quantifast RT-PCR (mRNA)	
	Temperatur	Inkubationszeit	Temperatur	Inkubationszeit
1.	95 °C	15 Minuten	95 °C	5 Minuten
2.	95 °C	15 Sekunden	95 °C	10 Sekunden
3.	55 °C	30 Sekunden	60 °C	30 Sekunden
4.	70 °C	30 Sekunden	Schritt 2-3 40x wiederholen	
5.	Schritt 2-4 40 Mal wiederholen			

Die PCR-Reaktion und die Ermittlung der Qt-Werte erfolgte mithilfe eines 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Thermo, Karlsruhe) und der entsprechenden Software. Die Berechnung der relativen Expression der Gene erfolgte nach der ddCt-Methode. Für die Normalisierung der mRNA-Quantifizierung wurde die Expression des ubiquitär exprimierten Gens EF1 α (Elongation factor 1 α) bestimmt. Um die Werte der miRNA-Expression zu normalisieren, wurde RNU6b (ubiquitär exprimierte snRNA) verwendet.

Tabelle 21: qRT-PCR Primer Auflistung von Primern, die für eine relative Quantifizierung mittels qRT-PCR verwendet wurden. Für die Quantifizierung von miRNAs wurden Primer Assays von Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen. Für diese Primer sind die Bestellnummern angegeben. Für die Quantifizierung von mRNA-Transkripten wurden die Primer selbst entworfen. dre: *Danio rerio*, RT: Reverse Transkription, F: forward, R:reverse.

Primer	Sequenz (5' → 3') oder Bestellnummer
Primer Assay miR-19a	MS00003192
Primer Assay miR-19b	MS00031584
Primer Assay miR-19c	MSC0002573
Primer Assay miR-19d	MS00049490
Primer Assay miR-20a	MS00003199
Primer Assay miR-20b	MS00003206
Primer Assay miR-18a	MS00031514
Primer Assay miR-25	MS00003227
Primer Assay miR-92a	MS00006594
Primer Assay miR-93	MS00003346
Primer Assay miR-363	MS00009576
dre CACNA1C RT F	TTGCAAACCTGTGTGGCCTTAGCTG
dre CACNA1C RT R	TTGCCTCCCATTGAAGTACCACCA
dre HCN4 RT F	TGAGGATGTTTGGGAGCGAG
dre HCN4 RT R	GGAGCAGCATAGTCAGATCCC
dre KCNA4 RT F	TTAAAATGCTGGCGGAAATC
dre KCNA4 RT R	ATCATGGCCATTCCTCTCTG
dre KCNAB1 RT F	CTGAAAACCTGGGAGCCATA
dre KCNAB1 RT R	AACCACTAGGGCACGAACAC
dre KCND2 RT F	TGTCCAACCTCAGCCGGATC
dre KCND2 RT R	CATGTCCACCAGCATCCCAT
dre KCND3 RT F	GCTCTGCCTGTTCTGTTCAT
dre KCND3 RT R	AGGATCCCGTTAGCTCCAGT
dre KCNE4 RT F1	CCACCGCGCTTTCATCGC
dre KCNE4 RT F2	GGCGAAACGCACATCCGC
dre KCNE4 RT R1	CCCCTTATCCGGCGGAAG
dre KCNE4 RT R2	GCTCCACCGAGCAGAGTG
dre KCNH2 RT F	CAAACACCAACCCTGAGAAGAT
dre KCNH2 RT R	GTGCCAGAATAACAACCTCTGAA
dre KCNJ2 RT F	CTGCTGTTCGTGGCTGTTTT
dre KCNJ2 RT R	CCGATTGTAGTCTGCGTCTC

Primer	Sequenz (5' → 3') oder Bestellnummer
dre KCNQ1 RT F	TCCAGTCGCTCATGTGTCTC
dre KCNQ1 RT R	ACGCACATCATATGGCTTACGT
dre SCN12ab RT F	GCCCTCCATCAAACACATCC
dre SCN12ab RT R	GCCAGTGTGGGGAATTTCCG
dre SCN1Ba RT F	AGCTTTTGGCTTGAGGCT
dre SCN1Ba RT R	TCTGTGAAGATGTCTGCA
dre SCN4Ba RT F	AGGTGAGCACAGGGAAGGTCCATT
dre SCN4Ba RT R	GGAGGCCATTTTCTGTGTTGTCGT
dre SCN4Bb RT F	TGTGTTGTGTTTCATGCTTTG
dre SCN4Bb RT R	GACCACCTTTAGTTCCTCTA

2.7.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro* Verfahren, bei dem spezifische DNA-Sequenzen von einem DNA-Strang mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase amplifiziert werden können. Für die PCR werden zwei Oligonukleotide, sogenannte Primer, verwendet, die nach Denaturierung des DNA-Stranges an ihre komplementäre Sequenz innerhalb des DNA-templates binden. Für diesen Schritt ist die *annealing*-Temperatur (T_m) wichtig, die jeweils an die Primer angepasst wird. Nach dem Primer-*annealing* wird der Komplementärstrang durch die thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert. Durch zahlreiche Wiederholungen dieses Zyklus wird die DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert. Um die Amplifikate an den Enden mit Restriktionsschnittstellen zu versehen, können die Primer sogenannte Primerextensions enthalten. Bei der Verwendung solcher Primer wird aufgrund der längeren Primersequenz die T_m nach 5 Zyklen auf 72 °C erhöht. Die Reaktion erfolgte nach dem Protokoll aus Tabelle 22:

Tabelle 22: Reaktionsprotokoll für die Polymerasekettenreaktion Für die Polymerasekettenreaktion wurde standardmäßig folgendes Reaktionsprotokoll verwendet.

Volumen	Lösung	Temperatur	Inkubationszeit
36,5 µl	Wasser	98 °C	30 Sekunden
10 µl	5x HF Puffer	98 °C	10 Sekunden
1 µl	dNTPs	T_m	30 Sekunden
0,5 µl	Primer A (50 µM)	72 °C	30 Sekunden / kb
0,5 µl	Primer B (50 µM)	Schritte 2-4 40x wiederholen	
1 µl	DNA-Template	72 °C	10 Minuten
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase		

2.7.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1,5 %ige Agarosegele (in 1x TBE) mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (R0611, Thermo Fischer Scientific) versetzt und für etwa 30 bis 40 Minuten bei 70 mA (100 V) aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (SM0331, Thermo Fischer Scientific). Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die DNA-Moleküle wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.7.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von RNA- und DNA-Proben wurden photometrisch durch die Absorption bei 260 nm bestimmt (Spektrophotometer, Thermo Scientific). Für die Messung wurde 1 µl der Probe verwendet. Die Absorption von 1 bei 260 nm entspricht etwa einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 30 µg/ml ssDNA oder 40 µg/ml RNA. Der Grad der Verunreinigung mit Proteinen wurde durch den Wert von A_{260nm}/A_{280nm} bestimmt. Bei reinen Proben beläuft sich dieser Wert auf 1,8 bis 2,0.

2.7.6 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs verwendet. Die Reaktion wurde entsprechend Tabelle 23 durchgeführt.

Tabelle 23: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau von DNA Für den Verdau von DNA wurde standardmäßig folgendes Reaktionsprotokoll verwendet.

Menge	Lösung
≤ 5 µg	DNA
3 µl	10 Reaktionspuffer
0,5 µl	Restriktionsenzym
auf 30 µl	mit Wasser auffüllen

2.7.7 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurde mit dem Enzym T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt, Deutschland) und dem entsprechenden Reaktionspuffer durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert wurde zwischen 1:1 und 1:3 variiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

2.7.8 Klonierung von Reporterplasmiden

Für den Luciferase-Reporterassay wurden die Vektoren pGL3 und pEZX verwendet. Die 3'-UTR des zu untersuchenden Gens wurden mittels PCR aus genomischer Zebrafisch- oder humaner DNA amplifiziert. Gleichzeitig wurden über *primerextensions* XbaI-Restriktionsschnittstellen an die Enden der Amplifikate kloniert. Diese dienten einer gezielten Integration der 3'-UTR hinter das *firefly*-Luziferasegen im pGL3-Vektor. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 24 aufgelistet.

Tabelle 24: Primersequenzen für Luciferasereporter-Konstrukte Für die Herstellung der Luciferase-Reporterplasmide wurden folgende Oligonukleotide als Primer verwendet.

Primer	Sequenz (5' → 3')
3'UTR hsa Scn4B F	GCTCTAGACTCCCCCTCCTACCTGAGAG
3'UTR hsa Scn4B R	GCTCTAGACCAGAACCTGGAATGCTGAT
3'UTR hsa Scn1B F	CGCTCTAGAAAGGAAGAGCCAGCCGTAAT
3'UTR hsa Scn1B R	CGCTCTAGACTTCTGTAAAGAGACGAGGCTGA
3'UTR hsa KCNJ2 F	CGCTCTAGAACAACACGGTCTGTTGGTCA
3'UTR hsa KCNJ2 R	CGCTCTAGAAGCGGAAACCCAAAATTACC
3'UTR dre Scn1B F	CGCTCTAGACTTGAAGCTCTGTCCATCATGA
3'UTR dre Scn1B R	CGCTCTAGATGATCCCATTAAAGCGGAGT
3'UTR dre KcnJ2 F	CGCTCTAGACGGGAAGGTTTGACAGACAC
3'UTR dre KcnJ2 R	CGCTCTAGATCACCCACCTACTAAACCCC
3'UTR dre Scn4Bb F	CGCTCTAGAACACAATCACACATGCACGT
3'UTR dre Scn4Bb R	CGCTCTAGATTTCCCCGACCATCACATCC
3'UTR dre KCNE1L F	CGCTCTAGATTCCCTTCTGAACCCCGGTAC
3'UTR dre KCNE1L R	CGCTCTAGATCAGACCTGCAGACTGATGG
3'UTR dre KCNE4 F	CGCTCTAGACTGCAGTTCCCGCCTAAATG
3'UTR dre KCNE4 R	CGCTCTAGACATACCCATGCACATAGACCA

Die Amplifikate und der pGL-3-Vektor wurden mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut und durch eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Extraktion aus dem Agarosegel aufgereinigt. Der linearisierte pGL-3-Vektor wurde dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Hierfür wurde die Antarctic Phosphatase (M0289S, NEB) entsprechend dem Reaktionsprotokoll aus Tabelle 25 verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 70 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das Amplifikat in den dephosphorylierten Vektor ligiert und in *E.coli* transformiert.

Tabelle 25: Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden Vor der Ligationsreaktion wurden die linearisierten Plasmide dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden.

Menge	Lösung
1-5 µg	linearisiertes Plasmid
3 µl	10x Antarctic Phosphatase Reaktionspuffer
1 µl	Antarctic Phosphatase (5 Einheiten)
auf 20 µl	mit Wasser auffüllen

2.7.9 Herstellung von RNA-Hybridisierungssonden

Für die Herstellung von RNA-Hybridisierungssonden wurden Primer für die Amplifikation der entsprechenden kodierenden Sequenz entworfen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 26 aufgelistet. Als DNA-Template diente cDNA aus 72 hpf Zebrafischembryonen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Gel-Elektrophorese und anschließender Extraktion aus dem Gel aufgereinigt und in den pCRII-Vektor kloniert. Vor der Synthese der RNA-Sonde wurde das Plasmid durch einen Restriktionsverdau *upstream* der kodierenden Sequenz linearisiert. Die Linearisierung des Plasmids dient dem gezielten Transkriptions-Abbruch bei der antisense-RNA Synthese. Für die Herstellung der Sonde wurde das *mMessage mMachine Kit* (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Tabelle 26: Primer zur Herstellung der *in-situ*-Hybridisierungssonden Die aufgelisteten Primer wurden zur Amplifikation der entsprechenden Sequenzen aus Zebrafisch-cDNA verwendet, um anschließend *in-situ*-Sonden für die angegebenen Gene herzustellen. amhc: *atrial myosin heavy chain*, vmhc: *ventricular myosin heavy chain*, nppa: *natriuretic peptide A*, myl7: *myosin light chain 7*, tbx2b: *T-Box 2 B* ish: *in-situ*-Hybridisierung.

Primer	Sequenz (5' → 3')
vmhc ish F	CCCAGCTAACCAGAAGCAAG
vmhc ish R	CTGGGCTCGCAGAATCTTAC
amhc ish F	ACCGGGAGAATCAGTCTGTG
amhc ish R	CCTGGTCCACACTTTGTCCT
nppa ish F	ACACGTTGAGCAGACACAGC
nppa ish R	TGTTAACAAATTAAGCCGTATTGT
myl7 ish F	CTCTTCCAATGTCTTCTCC
myl7 ish R	TATTTCCAGCCACGTCTA
tbx2b ish F	ATGGCTTACCACCCTTCCACG
tbx2b ish R	CGTCTTTCTTCTCCGCAATAGGC

2.8 Sonstige Methoden

2.8.1 Patch-clamp

Für die Ableitung von ventrikulären Aktionspotentialen wurde die *patch-clamp*-Methode angewandt. Beim *patch-clamp* wird die Membran der zu untersuchenden Zelle mit einer Kapillare geöffnet. Über die Öffnung kann die elektrische Spannung an der Zellmembran gemessen werden.

Die *patch-clamp* Versuche erfolgten an der Zebrafischlinie *Tg(My17:GFP)*, die kardialspezifisch GFP exprimiert. Die Reporterlinie diente zur Erleichterung der Entnahme der Herzen. Das Chorion von 48 hpf Zebrafischembryonen wurde entfernt und die Embryonen in Leibowitz-15 (L15)-Medium überführt. Das Medium enthält Calciumionen und dient der Aufrechterhaltung der kardialen Funktion nach der Entnahme aus dem Zebrafischembryo. Den Embryonen wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop das Herz entnommen. Dafür wurde der Fisch mit einer Kanüle (27G) fixiert und mit einer zweiten Kanüle (27G) jeweils ein Schnitt proximal und distal des Herzens geführt. Das Herz wurde mit einer Pipette in eine 2-cm Kulturschale überführt.

Für die *patch-clamp* Aufnahmen wurden ausschließlich vollständige und spontan schlagende Herzen verwendet. Die Aufnahmen der APs erfolgten bei Raumtemperatur und wurden in *current clamp* Konfiguration durchgeführt. Die Außenlösung bestand aus L15-Medium (mit den Zusätzen von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin). Die Pipettenlösung enthielt 139 mM KCl, 10 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 5 mM Mg-ATP, 0.5 mM EGTA, 0.4 mM GTPTris und 10 mM HEPES mit einem pH-Wert von 7,2. Die Pipetten besaßen einen Widerstand von 1,5 – 5 MΩ. Die Daten wurden mittels 4-Pol Besselfilter (-3 dB) mit 1-2 kHz tiefpassgefiltert und mit einer Rate von 5-10 kHz digitalisiert. Die Signale wurden mit einem Verstärker (RK-400, Bio-Logic SAS, Claix, France) und der pCLAMP-Software (Axon Instruments) aufgenommen und analysiert. Die APs wurden durch 5 ms sub-Schwellenwert-Impulse initialisiert. Die APD wurde vom Zeitpunkt der Depolarisierung bis zur 50 %igen (APD₅₀) und 90 %igen (APD₉₀) Repolarisierung gemessen.

2.8.2 Elektronenmikroskopische Analysen

Zebrafischembryonen verschiedener Entwicklungsstadien wurden in 4 %iger PFA-Lösung über Nacht bei 4 °C fixiert. Am folgenden Tag wurden die Embryonen mit Osmiumsäure behandelt. Dieser Schritt dient zur Kontrastverbesserung unter dem Transmissions-

elektronenmikroskop (TEM). Zusätzlich wurden die Embryonen mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Die dehydrierten Embryonen wurden in Epon 812 eingebettet. Nach einer Aushärtungszeit von 24 Stunden wurden die Embryonen mit einem Mikrotom in 70 nm breite Schnitte präpariert. Die Präparate wurden anschließend mit Uranylacetat und Raynoldscitrat behandelt. Dieser Vorgang diente erneut einem besseren Kontrast. Anschließend konnten die Präparate mit einem TEM analysiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von miR-19 im Zebrafisch

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die eine Dysregulation der miRNA-Expression in erkrankten Herzen zeigten.^{72,73} Ikeda et al. zeigten in einem miRNA-Screen von Herzgewebeproben aus HI-Patienten eine Veränderung von etwa 50 % der detektierten miRNAs. Insbesondere die Expression von miR-19a und miR-19b war in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und Aortenstenose (AS) mit einer Reduktion auf bis zu 37 % stark vermindert.⁷²

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zebrafisch verwendet, um die Rolle von miR-19 in der kardialen Funktion aufzuklären. Die Sequenz von miR-19a und miR-19b ist innerhalb der Vertebraten vom Zebrafisch bis zum Menschen auf Nukleotidebene zu 100 % konserviert (Abbildung 6). Diese starke Sequenzhomologie deutet auf eine essentielle und möglicherweise konservierte Funktion hin. miR-19a und miR-19b sind die zwei Isoformen der miR-19-Familie, die im Säugetier vorhanden sind. Im Zebrafischgenom sind zwei weitere Isoformen kodiert. Durch Genduplikationen stellen etwa 30 % des Zebrafischgenoms orthologe Kopien anderer, bereits vorhandener Gene dar.¹³⁰ Ein solches Duplikationsevent führte im Zebrafisch wahrscheinlich dazu, dass im Genom vier Isoformen von miR-19 zu finden sind: miR-19a-d. Die Sequenzen dieser vier Isoformen sind in Abbildung 7 dargestellt.

	miR-19a	miR-19b
Danio rerio	5'-ugugcaaaucuaugcaaaacuga-3'	5'-ugugcaaauccaugcaaaacuga-3'
Homo sapiens	5'-ugugcaaaucuaugcaaaacuga-3'	5'-ugugcaaauccaugcaaaacuga-3'
Mus musculus	5'-ugugcaaaucuaugcaaaacuga-3'	5'-ugugcaaauccaugcaaaacuga-3'
Gallus gallus	5'-ugugcaaaucuaugcaaaacuga-3'	5'-ugugcaaauccaugcaaaacuga-3'
Xenopus tropicalis	5'-ugugcaaaucuaugcaaaacuga-3'	5'-ugugcaaauccaugcaaaacuga-3'

Abbildung 6: Sequenz von miR-19a und miR-19b in verschiedenen Vertebratenspezies Aufgeführt sind die Sequenzen von miR-19a und miR-19b von unterschiedlichen Spezies innerhalb des Vertebratenstamms. Die Homologie der Sequenz beträgt 100 %. Die *seed*-Sequenz ist grau unterlegt.

Neben der hohen Sequenzhomologie, liegt für miR-19 in den Genomen vom Zebrafisch und Säugetieren eine starke Syntenie vor. Dementsprechend befinden sich die miR-19a und miR-19b enthaltenden Cluster in einer ähnlichen genetischen Umgebung wie im menschlichen Genom (vgl. Abbildung 3).



Abbildung 7: Darstellung der Sequenzen von miR-19a-d im Zebrafisch Im Zebrafisch werden vier homologe Isoformen von miR-19 kodiert: miR-19a-d. Die Sequenzen der reifen miRNA (grau hinterlegt) unterscheiden sich in höchstens zwei Nukleotiden. Die Star-Isoformen (gelb unterlegt) sind weniger stark konserviert.

Für die Funktionsanalyse von miR-19 im Zebrafisch wurde in dieser Arbeit zunächst die Expression aller vier Isoformen untersucht. Hierfür wurde während der Embryonalentwicklung zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Expression von miR-19a-d mittels qRT-PCR quantitativ ermittelt. Bei der PCR-Reaktion wurden spezifische Primer verwendet, die die Unterscheidung der einzelnen Isoformen ermöglichen sollten. Die Expression aller vier Isoformen von miR-19 war bereits im Einzellstadium unmittelbar nach Befruchtung der Eizelle zu detektieren (Abbildung 8). Es war zu beobachten, dass miR-19c und miR-19d eine sehr viel schwächere Expression aufwiesen als miR-19a und miR-19b ($C_{t-19a/b}$: ≈ 14 ; $C_{t-19c/d}$: ≈ 20). Die Expression aller vier Isoformen von miR-19 wurde 24 Stunden nach Fertilisation (*hours post fertilization*, hpf) stark induziert. Zu diesem Zeitpunkt nimmt das Herz seine Funktion auf und fängt an, erste Kontraktionen durchzuführen.

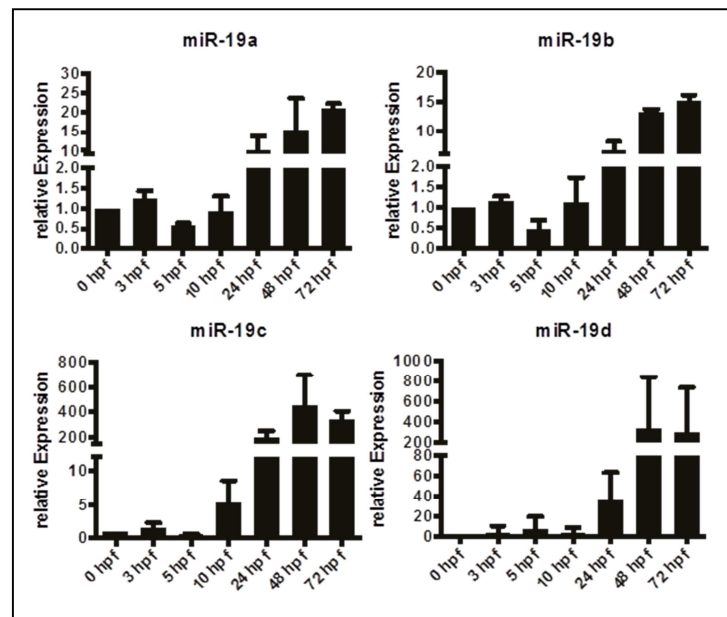


Abbildung 8: Expression von miR-19a-d während der Embryonalentwicklung des Zebrafischs Die relative Expression von miR-19a-d wurde zu den angegebenen Zeitpunkten während der Entwicklung mittels qRT-PCR detektiert. Die Expression aller vier Isoformen wurde bei 24 hpf stark induziert. *hpf*: hours post fertilization (\pm Standardabweichung; n = 3 mit 15 Tieren je Probe).

Neben der zeitlichen Auflösung der miR-19-Expression während der Entwicklung wurde auch die räumliche Expression von miR-19 untersucht. Hierzu wurde eine *in-situ*-Hybridisierung in Zebrafischembryonen bei 48 hpf und 72 hpf mit spezifischen *locked nucleic acid* (LNA)-Sonden gegen miR-19a und miR-19b durchgeführt. LNAs sind modifizierte RNA-Oligonukleotide, die eine um 2-8 °C pro modifizierter Base erhöhte Schmelztemperatur aufweisen und dadurch für den spezifischen Nachweis von kurzen DNA- und RNA-Sequenzen eingesetzt werden können.¹³¹ Die Expression von miR-19a und miR-19b zeigte eine ähnliche Verteilung. Sie waren vor allem in den Myosepten des Skelettmuskels und im Herz zu detektieren (Abbildung 9).

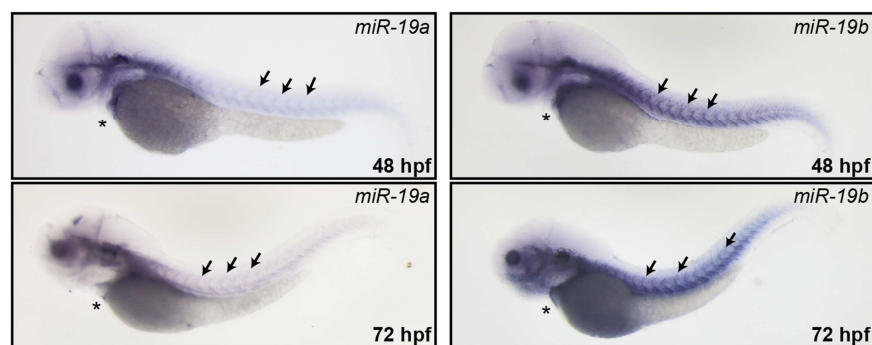


Abbildung 9: Expression von miR-19a und miR-19b im Zebrafischembryo Die Expression von miR-19a und miR-19b wurde in Embryonen bei 48 hpf und 72 hpf mittels *in-situ*-Hybridisierung untersucht. Die Expression beider Isoformen war in den Myosepten (Pfeile) und im Herz (Sterne) zu beobachten. *hpf*: hours post fertilization.

3.2 miR-19-Defizienz beeinflusst die Herzfunktion

Um die Rolle von miR-19 in der kardiovaskulären Funktion zu untersuchen, wurde die Expression von miR-19 in einem *knockdown*-Experiment transient verringert. Hierfür wurde ein Morpholino verwendet. Aufgrund der hohen Homologie der miR-19-Isoformen konnte ein Morpholino entworfen werden, das an die reife Sequenz aller vier Isoformen binden kann (MO19; Abbildung 10). Dadurch sollte die Expression aller miR-19-Isoformen gleichzeitig reduziert werden. Das Morpholino wurde mittels Mikroinjektion in das Einzellstadium der Embryonen eingebracht.

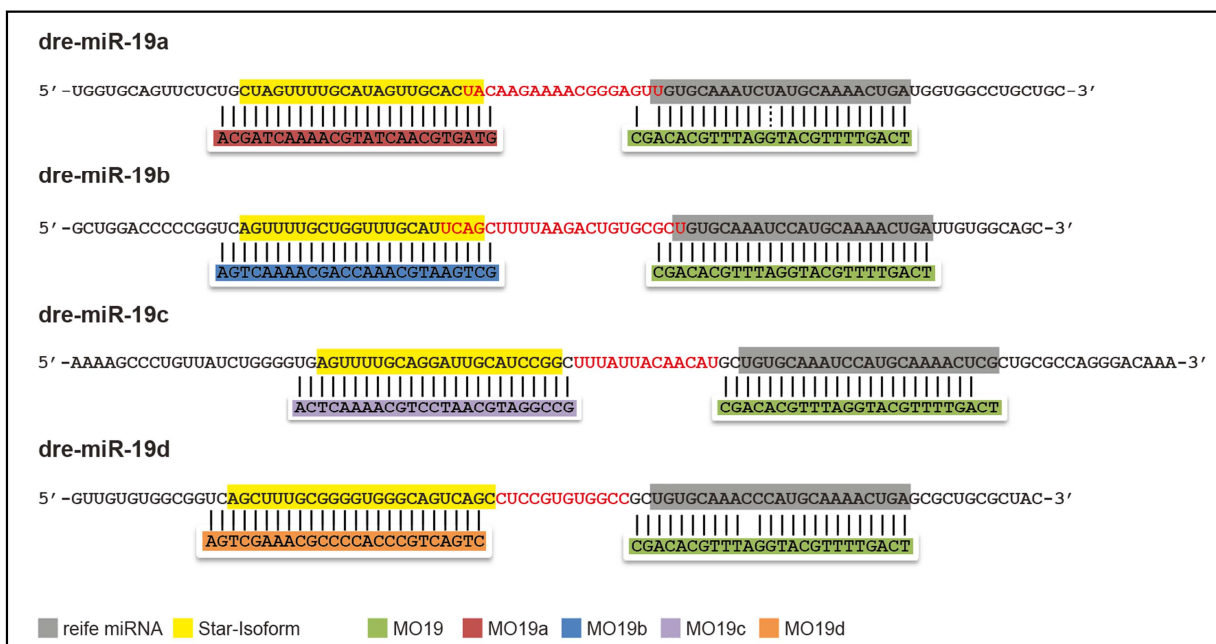


Abbildung 10: Design der Morpholinos für einen miR-19 knockdown Aufgrund der hohen Homologie der miR-19-Isoformen konnte MO19 (grün) so entworfen werden, dass es an alle Isoformen bindet. Für den spezifischen *knockdown* einzelner Isoformen wurden Morpholinos designed, die an weniger stark konservierten Sequenzen der pre-miRNA binden: MO19a (rot), MO19b (blau), MO19c (violett), MO19d (orange). Die Sequenzen der reifen miRNA und der Star-Isoform sind grau bzw. gelb unterlegt.

Durch eine qRT-PCR aus RNA-Proben von 48 hpf Zebrafischen wurde der *knockdown* aller miR-19-Isoformen nachgewiesen (Abbildung 11). Die Expression der reifen Isoformen von miR-19a-d wurde durch die Injektion von MO19 um bis zu 90 % verringert. Als Kontrolle wurde in einem weiteren Ansatz ein Kontroll-Morpholino verwendet, das keine Zielsequenz im Zebrafisch besitzt.

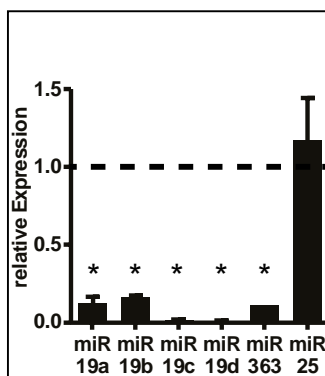


Abbildung 11: Knockdown von miR-19a-d reguliert die Expression von cotranskribierten miRNAs Mittels qRT-PCR wurde die Expression von miR-19-benachbarten Genen untersucht. Exemplarisch dafür ist die Expression von miR-363 und miR-25 aufgezeigt (\pm Standardabweichung; $n = 3$ mit 15 Tieren je Probe; $p < 0,05$).

miR-19-defiziente Tiere zeigten typische Charakteristika einer kardialen Dysfunktion (Abbildung 12A). Bei 48 hpf entwickelten die behandelten Zebrafische ein kardiales Ödem und einen Blutstau vor dem Herzen, was erste Hinweise auf eine gestörte Herzfunktion darstellt. In den kontrollinjizierten Fischen waren diese phänotypischen Veränderungen nicht zu beobachten. Um die kardiale Funktion genau zu bestimmen, wurde zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten die Herzfrequenz und die ventrikuläre Fraktionsverkürzung (*fractional shortening*; FS) als Indikator für die Herzkontraktilität bestimmt. Die Fische entwickelten durch den miR-19 *knockdown* eine starke Bradykardie. Die Herzfrequenz wurde hierbei um $28 \% \pm 6,7 \%$ ($p < 0,005$) verringert, was konsistent bis 72 hpf beobachtet werden konnte. Die Bradykardie wurde zusätzlich durch eine verringerte Kontraktilität begleitet. Die FS betrug in Kontrolltieren bei 48 hpf $26 \% \pm 3,9 \%$ und wurde durch eine MO19 Applikation auf $19 \% \pm 7,6 \%$ reduziert. Dies entspricht einer Reduktion um 23% ($p < 0,005$). Interessanterweise wurde die bei 48 hpf hoch signifikante Reduktion der Kontraktilität bei 72 hpf wieder normalisiert, während die Bradykardie weiterhin bestand.

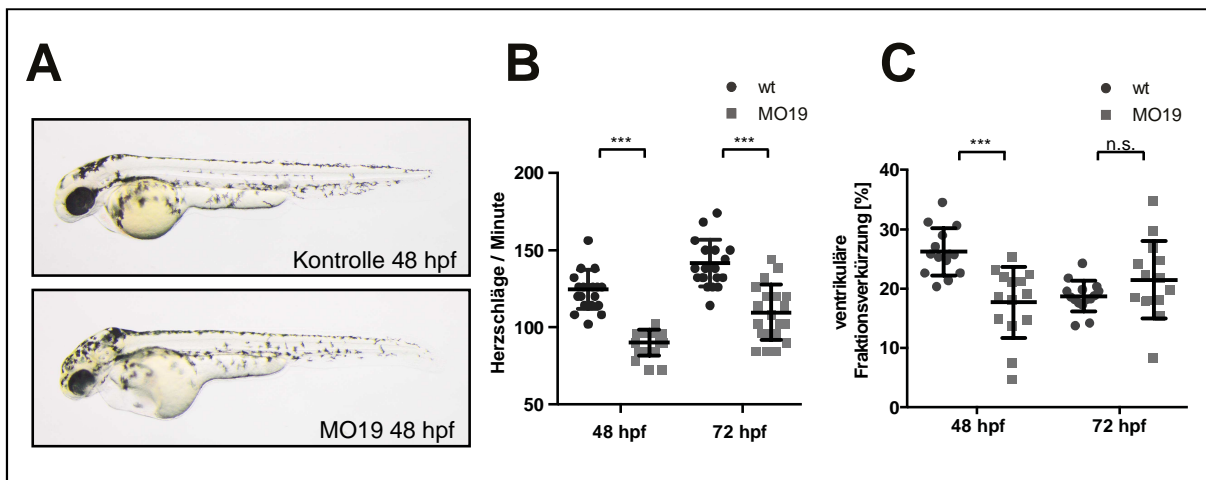


Abbildung 12: Knockdown von miR-19 resultiert in einer kardialen Dysfunktion Fische mit einer verringerten Expression von miR-19a-d entwickelten typische Charakteristika einer kardialen Dysfunktion mit einem kardialen Ödem und einem Blutstau vor dem Herzen (A). Zusätzlich wurden Schlagfrequenz (B) und ventrikuläre Verkürzungsfraction (C) signifikant reduziert (\pm Standardabweichung; $n \geq 14$; $p < 0.005$).

3.3 Individueller *knockdown* einzelner miR-19-Isoformen

Die vier Isoformen von miR-19 sind zusammen mit anderen miRNAs auf insgesamt vier miRNA-Clustern kodiert. Die einzelnen miRNA-Gene innerhalb dieser Cluster liegen eng zusammen und sind teilweise nur durch 20 Nukleotide voneinander getrennt. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob durch den miR-19-*knockdown* eine ungewollte Regulation miR-19-benachbarter miRNAs vorlag. Hierfür wurde eine qRT-PCR durchgeführt, bei der die Expression von miR-19b-benachbarter miRNAs untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Expression von miR-363 signifikant verringert war (Abbildung 11). miR-363 wird *downstream* von miR-19c kodiert und ist zusammen mit dieser auf einem pri-miRNA-Strang exprimiert (Abbildung 3). Die verringerte Expression von miR-363 ließ die Möglichkeit offen, dass die beschriebene Bradykardie und die verringerte FS nicht durch den *knockdown* von miR-19, sondern durch eine verringerte Expression von miR-363 verursacht wurden. Diese Möglichkeit sollte durch einen spezifischen *knockdown* von miR-363 überprüft werden. Hierfür wurde ein miR-363-spezifisches Morpholino (MO363) in das Einzellstadium von Zebrafischembryonen injiziert. MO363 wurde so entworfen, dass es die reife Sequenz von miR-363 erkennt (Abbildung 13). Auf diese Weise kann es an die pri-, pre- sowie reife miRNA binden und dadurch die Prozessierung der Vorläufermoleküle und die Aktivität der reifen miRNA inhibieren.

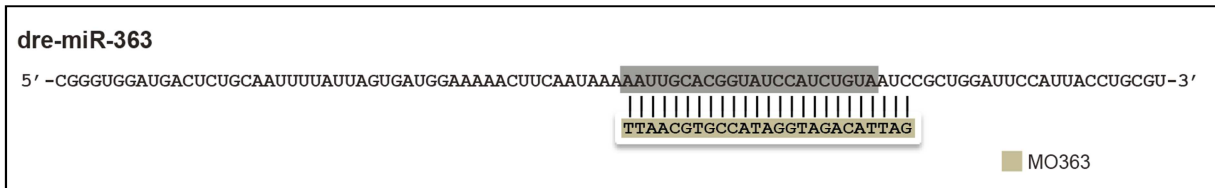


Abbildung 13: Schematische Darstellung der *knockdown*-Strategie für miR-363 Dargestellt ist die Sequenz der pre-miR-363. Das Morpholino für den *knockdown* von miR-363 (MO363, grün hinterlegt) bindet an die Sequenz der reifen miRNA (grau hinterlegt).

Die *knockdown*-Effizienz von miR-363 wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Hierfür wurde RNA aus MO363- und kontrollinjizierten Zebrafischembryonen bei 48 hpf isoliert und die relative Expression von miR-363 untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der *knockdown* erfolgreich war und die Expression von miR-363 auf unter 1 % reduziert wurde.

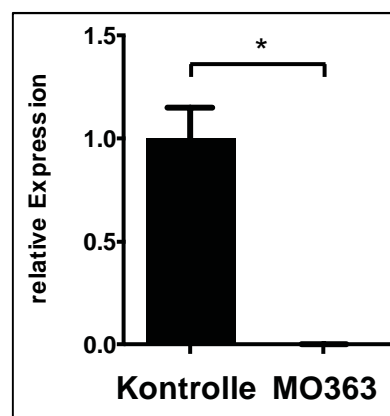


Abbildung 14: Reduktion der miR-363 Expression Die Expression von miR-363 zeigte in 48 hpf Zebrafischembryonen nach einem Morpholino vermittelten *knockdown* eine Reduktion auf unter 1 % (\pm Standardabweichung; n = 3 mit 15 Tieren je Probe; p < 0,05).

Phänotypisch zeigten miR-363-defiziente Fische einen sehr spezifischen Defekt der Augenentwicklung. Ein großer Teil der Embryonen entwickelte kleinere Augen mit einer Störung der Retinogenese bis hin zum vollständigen Verlust der Augen (Abbildung 15A). Auch in MO19-injizierten Embryonen war eine leichte Störung der Augenentwicklung festzustellen, die sich durch eine kleinere Augengröße kennzeichnete (Abbildung 12A). Dieser Effekt könnte durch eine ungewollte Fehlregulation von miR-363 nach MO19 Applikation verursacht worden sein. Die Schlagfrequenz und die FS, die durch eine MO19 Applikation reduziert wurden, blieben durch einen *knockdown* von miR-363 dagegen

unbeeinträchtigt (Abbildung 15B, C). Diese Ergebnisse bestätigen, dass der kardiale Phänotyp nicht durch die Fehlregulation von miR-363 bedingt ist.

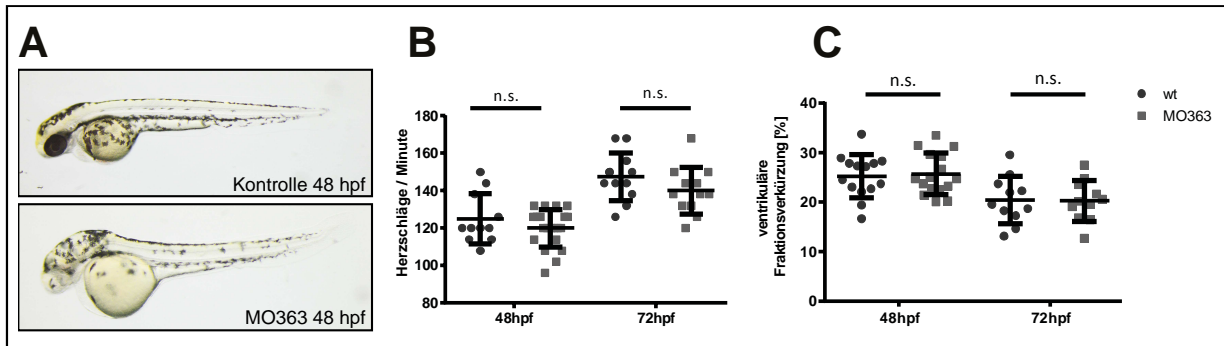


Abbildung 15: Transienter *knockdown* von miR-363 zeigte keinen Einfluss auf kardiale Parameter (A) Ein Morpholino-vermittelter *knockdown* von miR-363 führte in Zebrafischembryonen zu starken Defekten der Augenentwicklung. Die Herzfrequenz (B) und die FS (C) blieben nach einem *knockdown* von miR-363 unverändert (\pm Standardabweichung; $n = 11$; $p > 0,05$).

Um eine höhere Spezifität zu gewährleisten und eine der vier miR-19-Isoformen als ursächlich für die Regulation der kardialen Parameter zu identifizieren, wurde in einem nächsten Schritt die Expression der miR-19-Isoformen individuell reduziert. Hierfür wurden vier Morpholinos verwendet, die im Bereich der Star-Isoformen von miR-19a-d binden (MO19a, MO19b, MO19c, MO19d; Abbildung 10). Die Star-Isoform einer miRNA bezeichnet den komplementären Strang im miRNA-Duplex. Dieser Bereich des miRNA-Gens ist weniger stark konserviert und ermöglicht es, spezifisch die Expression von miR-19a-d individuell zu verringern. Um den *knockdown* der entsprechenden miRNA zu validieren und die Expression der benachbarten miRNA-Gene zu überprüfen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die Expression von miR-19a-d und aller miR-19-benachbarten miRNA-Gene detektiert: miR-20a/b, miR-25, miR-363, miR-92a, miR-18a und miR-93.

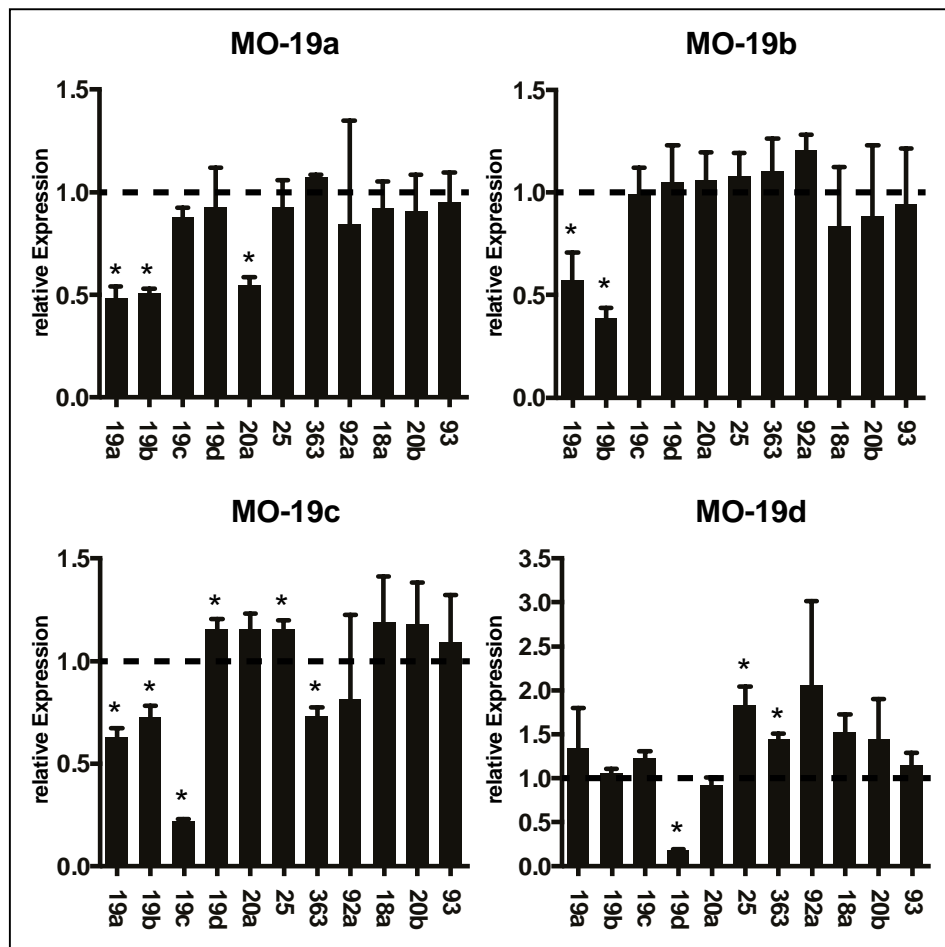


Abbildung 16: qRT-PCR von miR-19-Isoformen und benachbarter miRNAs Die Auswirkung des spezifischen *knockdowns* von MO19a, MO19b, MO19c und MO19d auf die Expression benachbarter miRNAs wurde mittels einer qRT-PCR untersucht. Lediglich durch einen MO19b-induzierten *knockdown* wurde keine Regulation anderer miRNAs festgestellt (\pm Standardabweichung; n = 3 mit 15 Tieren je Probe; $p < 0,05$).

Die Ergebnisse der qPCR zeigen, dass durch den spezifischen *knockdown* von miR-19a, miR-19c und miR-19d die Expression der jeweils *downstream*-kodierten miRNA beeinträchtigt wurde (Abbildung 16). Der spezifische *knockdown* von miR-19a resultierte gleichzeitig in einer verringerten Expression von miR-20. Eine Verringerung von miR-19c führte zu einer schwächeren Expression von miR-363 und die Verringerung von miR-19d führte zu einer verstärkten Expression von miR-25 und miR-363. Lediglich in miR-19b-defizienten Fischen war keine Veränderung der Expression anderer miRNAs zu beobachten. Neben der Dysregulation von benachbarten miRNAs, resultierte die Reduktion von miR-19a, miR-19b und miR-19c zusätzlich in einer verringerten Expression ihrer Familienmitglieder. Da die Morpholinos so entworfen wurden, dass sie nur die Prozessierung einer einzelnen Isoform beeinflussen können, ist die wahrscheinlichste Erklärung hierfür, dass die Primer in der qRT-PCR aufgrund der starken Homologie der reifen miR-19-Isoformen nicht zwischen

den einzelnen Isoformen unterscheiden können. Dabei scheint vor allem die Expression von miR-19a und miR-19b nicht individuell betrachtet werden zu können.

3.4 Identifikation von miR-19b als kausale Isoform

In einem weiteren Versuch wurde die Morphologie des Zebrafischembryos und die kardiale Funktion nach einem *knockdown* von miR-19b untersucht. miR-19b-defiziente Embryos zeigten keine auffälligen, globalen, morphologischen Veränderungen, die durch Entwicklungsstörungen verursacht wurden (Abbildung 17A). Es konnten jedoch, wie in MO19-injizierten Zebrafischembryonen, kardiale Ödeme und ein Blutstau vor dem Herzen beobachtet werden. Während eine MO19-Applikation in einer Störung der Augenentwicklung resultierte, zeigten miR-19b-defiziente Fische im Vergleich zu Kontrolltieren keine Veränderung der Augengröße oder Augenform. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Reduktion von miR-19b spezifischer auf die Beeinflussung von kardialen Parametern wirkt und gleichzeitig weniger unspezifische Effekte verursacht, als eine Applikation von MO19.

Für die Untersuchung der kardialen Funktion wurde die Herzfrequenz von MO19b- und kontrollinjizierten Fischen ermittelt. Es zeigte sich, dass miR-19b-defiziente Fische bei 48 hpf eine um $36,1 \% \pm 5,7 \%$ ($p < 0,005$) reduzierte Herzfrequenz aufwiesen. Die miR-19b-Defizienz vermittelte Reduktion der Herzfrequenz war somit etwas stärker, als die MO19 vermittelte Reduktion, die die Herzfrequenz um $28,1 \pm 6,7 \%$ verringerte. Zusammenfassend zeigt sich, dass die Reduktion von miR-19b alleine ausreicht, um den MO19-induzierten Phänotyp zu reproduzieren, ohne dabei die Expression anderer miRNAs oder die Entwicklung der Zebrafischembryonen in ihrer zu beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die Analysen in allen nachfolgenden Experimenten auf miR-19b fokussiert.

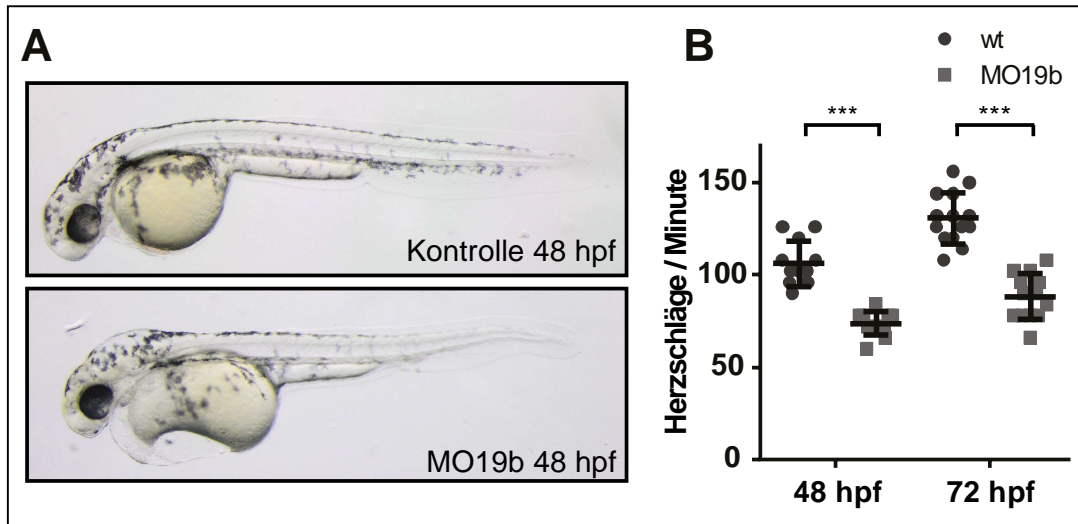


Abbildung 17: Identifikation von miR-19b als kausale Isoform (A) Ein transienter *knockdown* von miR-19b mittels MO19b-Injektion in das Einzellstadium von Embryonen führte zu einem karidalen Ödem und einem Blutstau vor dem Herzen. **(B)** Zusätzlich entwickelten miR-19b-defiziente Zebrafische eine Bradykardie mit einer um $36\% \pm 5,7\%$ verringerten Herzfrequenz (\pm Standardabweichung; $n \geq 12$; $p < 0,005$).

Damit ausgeschlossen werden konnte, dass der MO19- und der MO19b-induzierte Phänotyp durch *off-target*-Effekte der verwendeten Morpholinos verursacht wurde, sollte in einem weiteren Schritt die Expression von miR-19b durch eine alternative Methode blockiert werden. Hierfür wurde die CRISPR/Cas9-Methode verwendet. Für die Sequenzbestimmung der sgRNA für den miR-19b *knockout* wurde der *chopchop*-Algorithmus verwendet.¹²⁹ Um eine hohe Spezifität zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die sgRNA, ähnlich wie die Isoform spezifischen Morpholinos, im Bereich der Star-Isoform bindet (Abbildung 18). Dies verhinderte eine unspezifische Bindung der sgRNA an miR-19a, miR-19c oder miR-19d. Die sgRNA wurde zusammen mit Cas9-Protein mittels Mikroinjektion in das Einzellstadium von Zebrafischembryonen eingebracht. Als Kontrolle wurde eine gegen GFP gerichtete sgRNA verwendet, die keine Zielsequenz in Wildtyp-Zebrafischen besitzt. Nach 24 Stunden wurde die genomische DNA der Embryonen isoliert und mittels T7E1-Assay auf Mutationen im miR-19b-Gen untersucht. Das Ergebnis des T7E1-Assays zeigt, dass die CRISPR/Cas9-Methode eine hohe Mutations-Effizienz erreichte (Abbildung 18B). Von neun getesteten Embryonen enthielten sieben mindestens eine Mutation im miR-19b-kodierenden Gen. Sequenzierungen des miR-19b-Genes zeigten Deletionen und Insertionen im Bereich der Star-Isoform und der Drosha-site (Abbildung 18A).

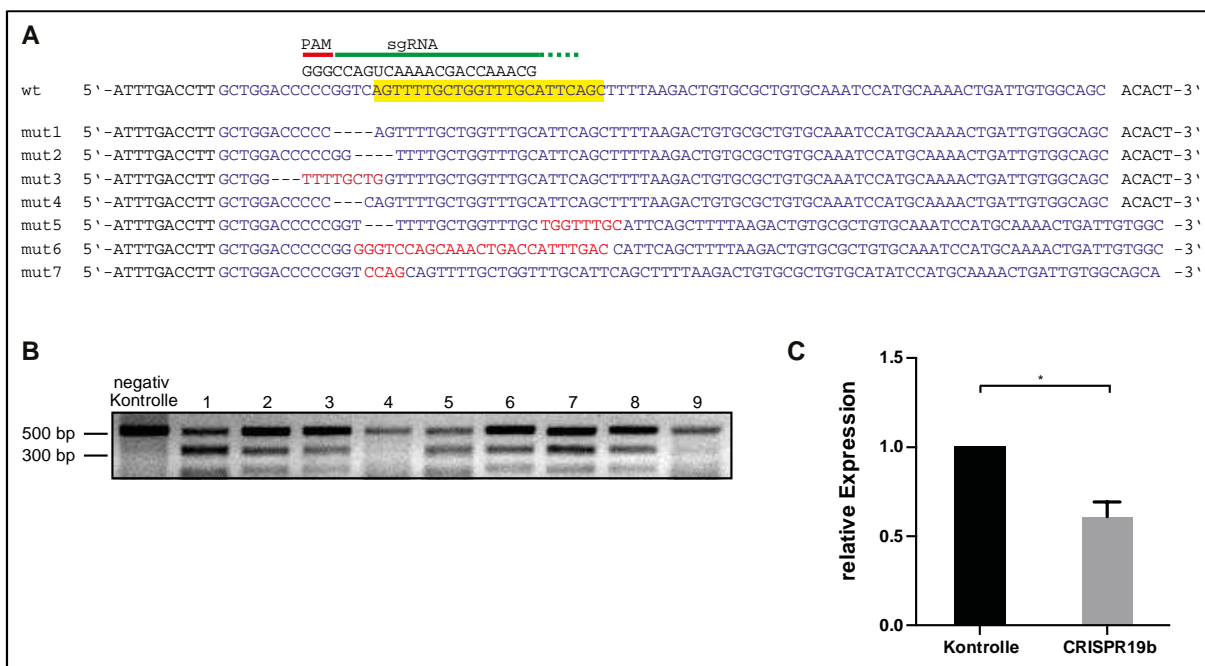


Abbildung 18: miR-19b-Reduktion durch einen CRISPR/Cas9 vermittelten *knockout* (A) Die sgRNA gegen miR-19b (grün) bindet im Bereich der Star-Isoform (gelb hinterlegt) von miR-19b (blau) und der Drosha-site. Die entstandenen Mutationen enthielten Insertionen und Deletionen innerhalb dieser Bereiche (mut1-7). (B) Durch einen T7E1-Assay wurde die Effizienz der CRISPR/Cas9-Methode untersucht. (C) Die Expression von miR-19b war in CRISPR/Cas9-injizierten Zebrafischembryonen signifikant reduziert.

Bemerkenswerterweise zeigte eine qRT-PCR, dass die Expression von miR-19b durch den CRISPR/Cas9 vermittelten *knockout* ähnlich stark reduziert wurde, wie durch MO19b (Abbildung 18C). Die Expression von miR-19b konnte bereits durch eine MO19b-Applikation maximal auf 50 % reduziert werden. Es ist anzunehmen, dass die qRT-PCR Primer, aufgrund der starken Homologie von miR-19a und miR-19b, die Expression dieser beiden Isoformen nicht getrennt voneinander nachweisen können. Entsprechend konnte durch einen CRISPR/Cas9 vermittelten *knockout* die Expression von miR-19b vergleichbar stark auf etwa 60 % reduziert werden. Die vermeintlich verbliebene Expression wird durch die unveränderte Expression von miR-19a begründet.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Herzfrequenz durch eine CRISPR/Cas9-vermittelte Reduktion der miR-19b-Expression ähnlich stark reduziert wurde wie in MO19b-injizierten Zebrafischembryonen (Abbildung 19). Die Herzfrequenz wurde in 48 hpf Zebrafischen um etwa 37,7 % \pm 9,5% ($p < 0,005$) reduziert. Zusätzlich persistierte die Bradykardie mindestens bis zu 5 Tage nach Fertilisation (*days post fertilization*, dpf). Dies zeigt, dass die verringerte Expression von miR-19b spezifisch für die Bradykardie verantwortlich ist und Morpholino vermittelte *off-target*-Effekte ausgeschlossen werden können.

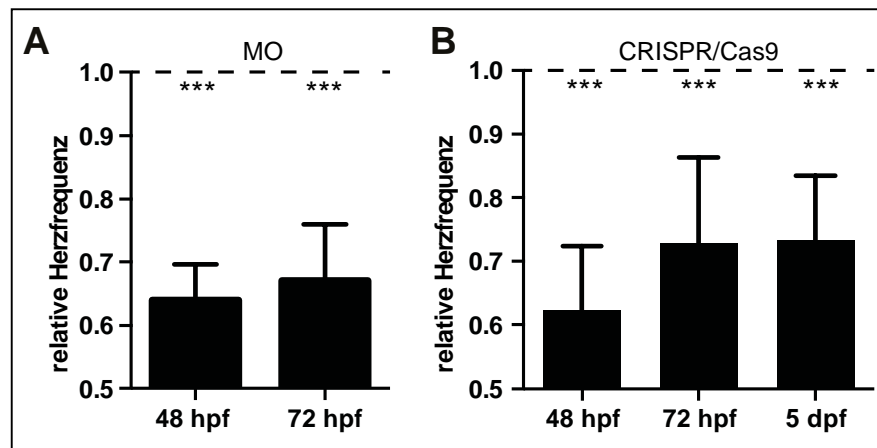


Abbildung 19: Relative Herzfrequenz nach MO- und CRISPR/Cas9-vermittelter miR-19b-Reduktion (A) Die Herzfrequenz von 48 hpf und 72 hpf Zebrafischembryonen wurde durch MO19b-Injektion auf 60 – 65 % reduziert. (B) Durch einen CRISPR/Cas9-vermittelten *knockout* von miR-19b wurde die Herzfrequenz in Zebrafischembryonen ähnlich stark reduziert und persistiert über 5 dpf (\pm Standardabweichung; $n = 10$; $p < 0,005$).

3.5 miR-19b-defiziente Fische zeigen keine Entwicklungsdefekte

3.5.1 Die Morphologie von miR-19b-defizienten Zebrafischherzen ist unbeeinträchtigt

Die Beeinträchtigung der kardialen Funktion kann durch unterschiedliche Ursachen hervorgerufen werden. Um zu überprüfen, ob morphologische Veränderungen die kardiale Dysfunktion nach einem miR-19b-*knockdown* verursachen, wurden zunächst die makroskopische Morphologie und die detaillierten histologischen Strukturen des Zebrafischherzens untersucht.

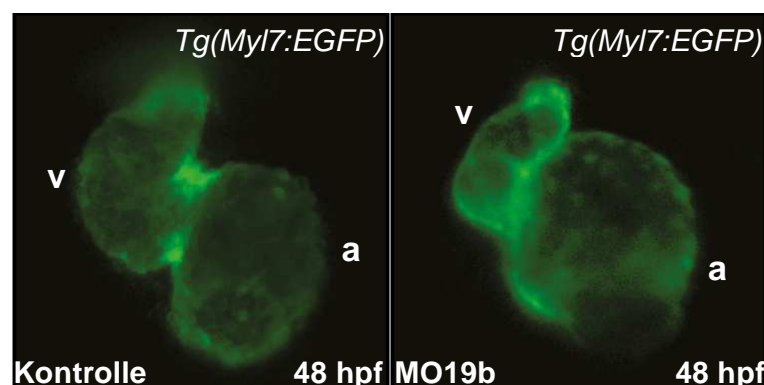


Abbildung 20: Der *knockdown* von miR-19b hatte keinen Einfluss auf die Morphologie des Zebrafischherzens miR-19-defiziente *Tg(myI7:GFP)*-Zebrafischembryonen wurden bei 48 hpf frontal fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Morphologie des Herzens zeigte keine Veränderungen. Das *heart-tube jogging*, das *cardiac looping* und die Abgrenzung von Ventrikel (v) und Atrium (a) waren klar zu erkennen.

Um die Morphologie des Herzens auf Veränderungen durch einen *miR-19b-knockdown* zu überprüfen, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Tg(Myf7:GFP)*-Zebrafischen gemacht. *Myf7* ist ein kardial spezifisches Gen und dient als Marker für die kardiale Differenzierung. *miR-19b*-defiziente Fische zeigten eine normale kardiale Morphologie. Ventrikel und Atrium waren klar voneinander zu trennen und der AV-Kanal deutlich zu erkennen (Abbildung 20). Das *heart-tube jogging* und das kardiale *looping* waren ordnungsgemäß ausgebildet. Diese Ergebnisse wurden durch histologische Untersuchungen bestätigt. Die histologischen Analysen zeigten, dass das Wachstum des Myokards nicht beeinträchtigt war und dass der Ventrikel eindeutig durch einen AV-Ring vom Atrium getrennt vorlag (Abbildung 21). Weiterhin waren die sogenannten *cushions*, welche die Vorläufer der Herzklappen bilden, nicht beeinträchtigt.

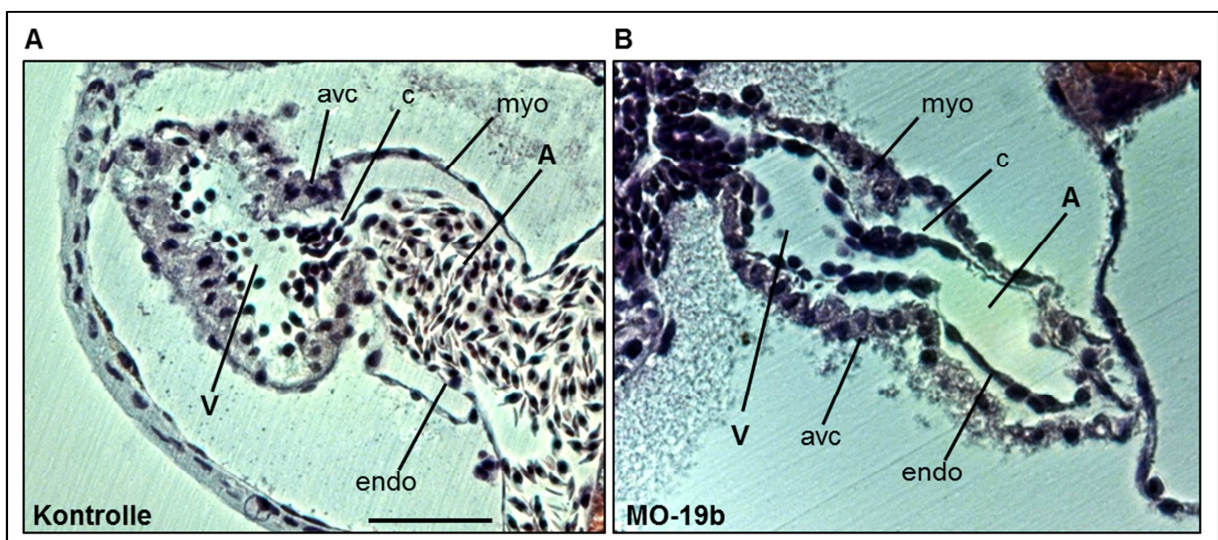


Abbildung 21: Histologische Analysen zeigen keinen Einfluss durch *miR-19b*-Defizienz Eine H&E-Färbung von (A) kontroll- und (B) MO19b-injizierten Embryonen bei 72 hpf zeigte eine normale Kardiogenese und Herzmorphologie. Maßstabsbalken: 50 μ m, A: Atrium, avc: atrioventrikulärer Kanal, c: *cushions* (Vorläufer der Herzklappen), endo: Endokard, myo: Myokard, v: Ventrikel.

In den folgenden Experimenten wurde durch eine *whole-mount in-situ*-Hybridisierung überprüft, ob *miR-19b* die molekulare Identität von atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten reguliert und somit möglicherweise sekundär die Funktion des Herzens beeinträchtigt. Anhand der kardialen Marker *ventricular myosin heavy chain (vmhc)* und *atrial myosin heavy chain (amhc)* lässt sich die Spezifizierung der kardialen Zellen in atriales und ventrikuläres Myokard beurteilen. Der *knockdown* von *miR-19b* zeigte hier keine Auswirkung auf die Stärke oder die Lokalisation der Expression (Abbildung 22). Weiterhin

war die *myl7*-Expression in miR-19b-defizienten Herzen vergleichbar stark wie in Herzen aus kontrollinjizierten Fischen. Zusätzlich wurde die Entwicklung des AV-Kanals überprüft. Hierfür wurde die Expression von *Natriuretic Peptide A* (*nppa*) und *T-box protein 2b* (*tbx2b*) analysiert. *tbx2b* ist ein transkriptioneller Repressor, der bei 48 hpf spezifisch im AV-Kanal des Zebrafischherzens exprimiert wird und die Kammerdifferenzierung inhibiert.^{132,133} Die Expression von *nppa* wird unter anderem durch *tbx2b* inhibiert und ist folglich nicht im AV-Kanal zu detektieren.¹³⁴ In beiden Fällen zeigte sich durch den *knockdown* von miR-19b kein Unterschied in der Genexpression.

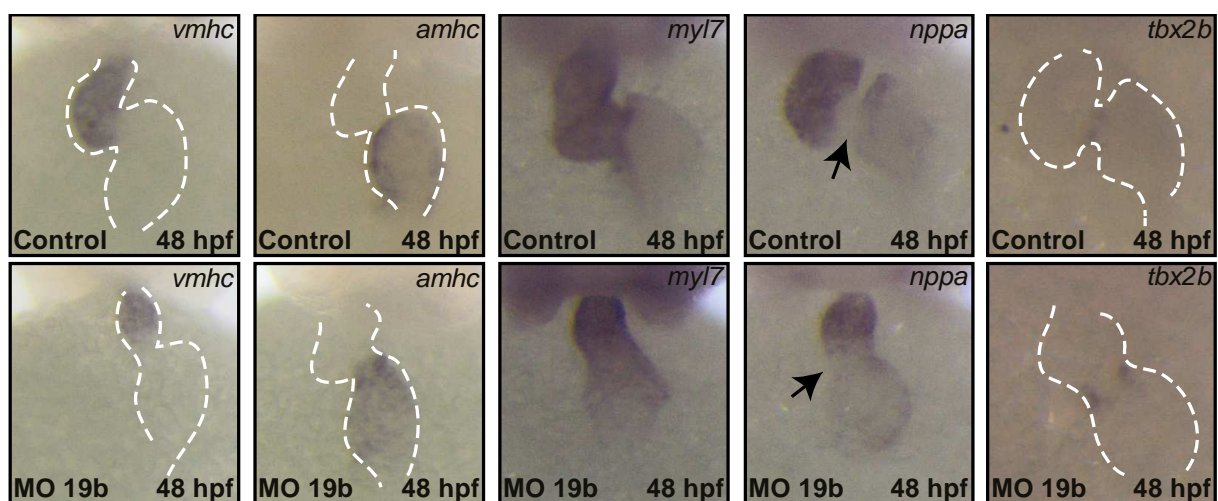


Abbildung 22: *in-situ*-Hybridisierung kardialer Marker in miR-19b-defizienten Fischen Die kardiale Expression von *vmhc*, *amhc*, *myl7*, *nppa* und *tbx2b* wurde durch eine Reduktion von miR-19b nicht beeinträchtigt. Die molekulare Identität von atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten blieb unbeeinträchtigt in miR-19b-defizienten Herzen und die *myl7*-Expression vergleichbar mit unbehandelten Herzen. Zusätzlich war die Expression von *nppa* und *tbx2b* und damit die molekulare Identität des AV-Kanals (Pfeile) unverändert.

3.5.2 Die Angiogenese in miR-19b-defizienten Zebrafischembryos ist unbeeinträchtigt

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Herzfunktion nehmen kann, ist die Angiogenese. In vorangegangenen Publikationen wurde berichtet, dass miR-19b eine Rolle in der Angiogenese spielt. In einer Studie von Yin et al. wurde miR-19b als ein Regulator des Zellzyklus von Endothelzellen beschrieben.¹³⁵ Zusätzlich zeigten Landskroner-Eiger et al., dass in Mäusen eine endothelspezifische Deletion des miR-17~92 Clusters nach einer Ischämie zu einer verbesserten Vaskularisierung der Extremitäten und des Herzens führt.¹³⁶ Daher sollte in einem weiteren miR-19b *knockdown*-Versuch ausgeschlossen werden, dass eine Reduktion von miR-19b die Angiogenese im Zebrafischembryo beeinflusst. Hierfür wurden die miR-19b-Expression in *Tg(kdrl:GFP)*-Zebrafischen durch eine MO19b-Injektion reduziert.

Die *Tg(kdrl:GFP)*-Linie kodiert ein GFP-Gen, das durch einen endothelspezifischen Promotor in allen Blutgefäßzellen exprimiert wird. Die Durchlichtbilder zeigen, dass miR-19b-defiziente Zebrafischembryonen den oben beschriebenen Phänotyp mit kardialem Ödem und Blutstau vor dem Herzen entwickelten (Abbildung 23). In den gleichen Fischen zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen keine bedeutenden Beeinträchtigungen der Angiogenese innerhalb der ersten fünf Tage der embryonalen Entwicklung. Die Anzahl und Ausprägung der Intersegmentalgefäße sowie die Ausbildung der Subintestinalgefäße war nicht gestört.

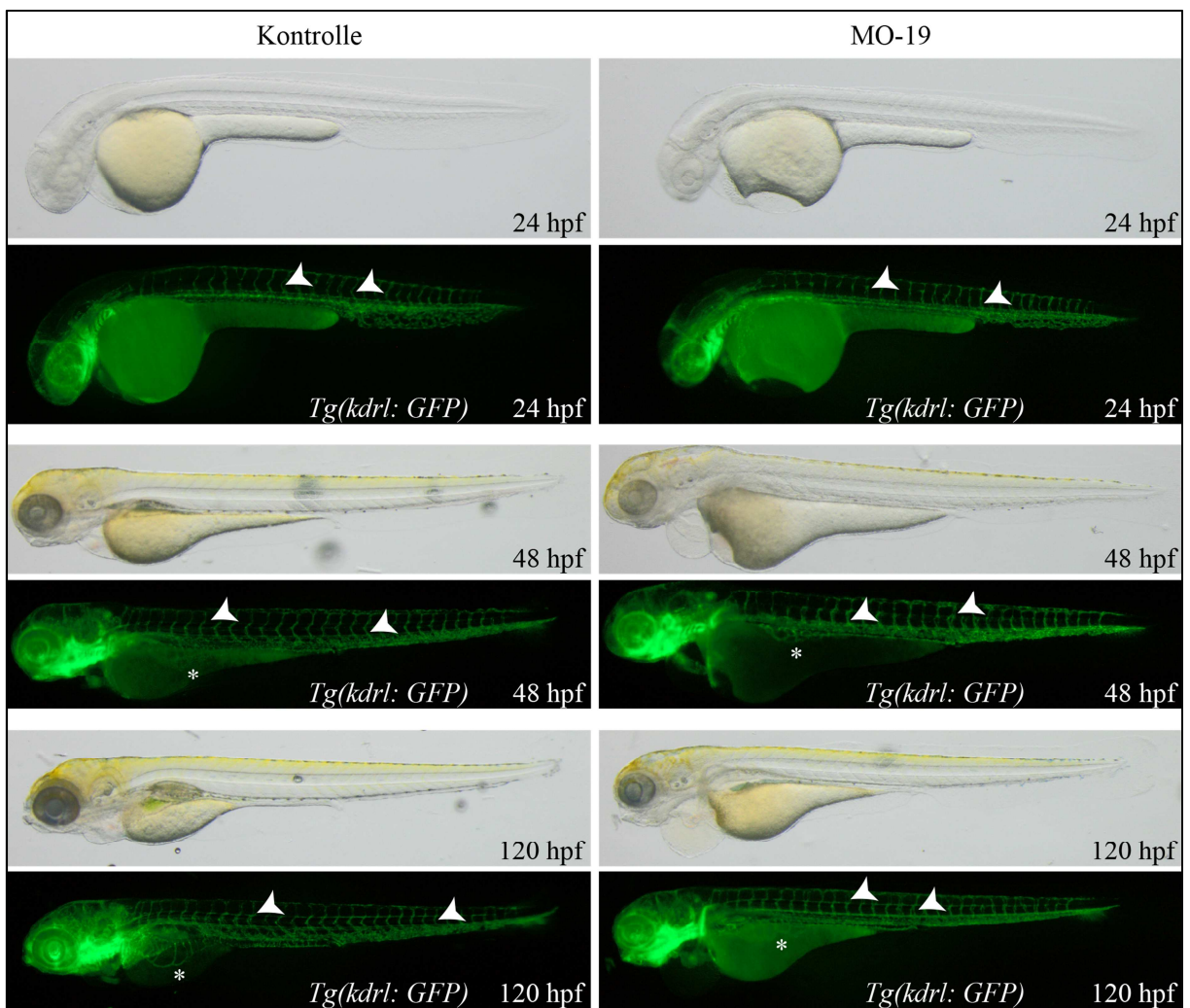


Abbildung 23: miR-19b-defiziente Zebrafische zeigten keine Defekte in der Angiogenese Die miR-19b-Expression wurde in *Tg(kdrl:GFP)*-Zebrafischen durch eine MO19b-Injektion reduziert. Die Entwicklung der Blutgefäße wurde während der ersten fünf Tage der Entwicklung beobachtet. Die Fische zeigten Charakteristika einer kardialen Dysfunktion, ohne dabei Defekte in der Angiogenese aufzuweisen.

Nachdem ausgeschlossen wurde, dass der *miR-19b-knockdown* Auswirkungen auf die kardiale Morphogenese und Differenzierung hat, wurden ultrastrukturelle Analysen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt. MO19b-defiziente Fische zeigten keine Auffälligkeiten in der molekularen Struktur der Kardiomyozyten. Die sarkomerischen Einheiten waren hoch organisiert und an den Z-Scheiben klar abgegrenzt (Abbildung 24). Weiterhin zeigte ein Querschnitt durch die Myofilamente keine Strukturveränderung. Die Myosin- und Aktin-Filamente waren regelmäßig angeordnet.

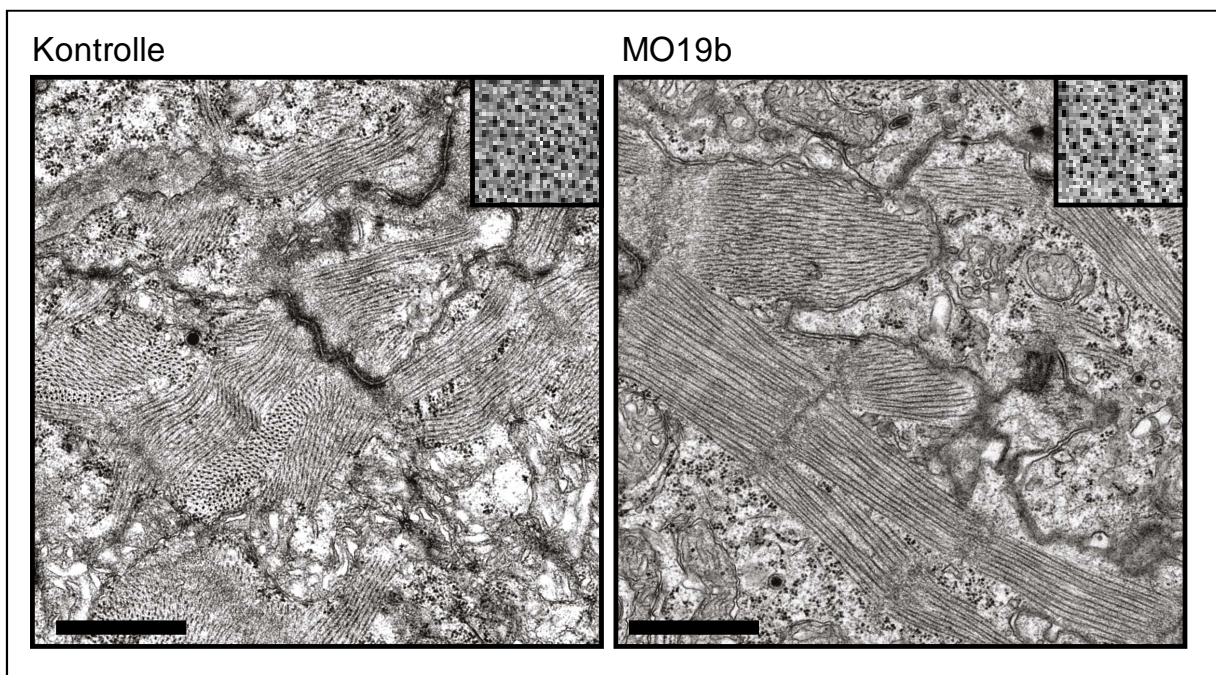


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von miR-19b-defizienten Kardiomyozyten
miR-19b-defiziente Zebrafischembryonen zeigten bei 48 hpf in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Unterschiede der Ultrastruktur von ventrikulären Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Struktur der Sarkomere war geordnet, die Z-Scheiben klar abgegrenzt und der Querschnitt der Myofilamente (Ecke rechts oben) zeigte eine regelmäßige Anordnung. Größenstandard = 1 μm

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass miR-19b kardiale Prozesse nicht über die Regulation der morphologischen und strukturellen Entwicklungen oder durch einen Einfluss auf die Spezifizierung kardialer Myozyten beeinflusst. Vielmehr besitzt miR-19b vermutlich eine Rolle in der Regulation und Aufrechterhaltung der kardialen Funktion.

3.6 miR-19b-Defizienz resultiert in einer Verlängerung des Aktionspotentials

Eine reduzierte Herzfrequenz kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen verursacht werden. Die erste Möglichkeit liegt in einem defekten Sinusknoten, der eine pathologisch niedrige Frequenz erzeugt. Die andere Möglichkeit ist die Verlängerung der APD. Durch eine gestörte Repolarisation befinden sich die Ionenkanäle in einer verlängerten Refraktärzeit, was in einem niedrigeren Puls resultiert. Da die Verlängerung der APD ein bekanntes Symptom bei HI-Patienten ist, wurde zunächst diese Hypothese analysiert.⁹ Um zu überprüfen, ob miR-19b-defiziente Fische eine verlängerte APD aufwiesen, wurde ein pharmakologischer Ansatz gewählt.¹¹⁹ Durch die Behandlung von Zebrafischembryonen mit Terfenadin wurde der repolarisierende I_{Kr} -Strom inhibiert und das ventrikuläre AP künstlich verlängert (Abbildung 25). Wird das ventrikuläre AP über eine gewisse Schwelle hinaus verlängert, zeigt der Zebrafisch einen sehr charakteristischen und einfach zu beobachtenden Phänotyp, bei dem der Ventrikel lediglich nach jeder zweiten atrialen Kontraktion schlägt.^{107,118,119}

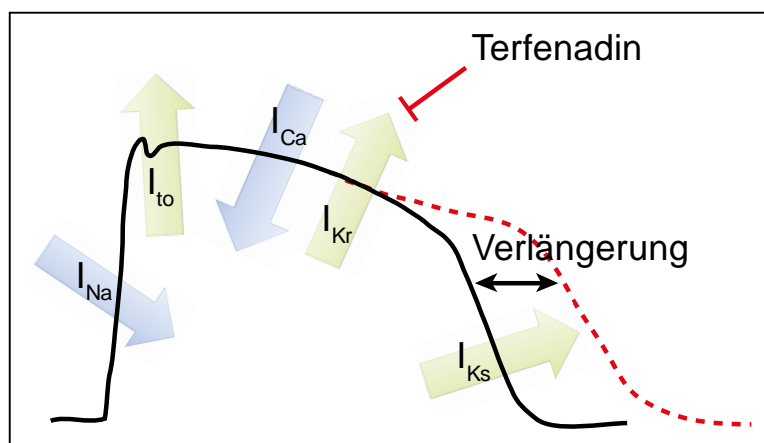


Abbildung 25: Schematische Darstellung der pharmakologischen Wirkung von Terfenadin Nach der initialen Repolarisierung ventrikulärer Kardiomyozyten entsteht durch ein Gleichgewicht von einströmenden Ca^{2+} -Ionen (I_{Ca}) und auswärtsgerichteten I_{Kr} -Strömen eine Plateauphase. Durch die Verstärkung der I_{Kr} -Ströme wird das Membranpotential repolarisiert. Terfenadin bindet an KCNH2, den I_{Kr} -vermittelnden Kanal und inhibiert dessen Aktivität. Dadurch kommt es zu einer gestörten Repolarisierung und somit zu einer Verlängerung des Aktionspotentials.

48 hpf Zebrafische wurden mit einer subphänotypischen Terfenadin-Dosis behandelt, bei der die Kontrollfische keinerlei Phänotyp entwickelten, um sie für einen APD-Verlängerungstypischen AV-Block zu sensitivieren. M-Mode-Analysen zeigen, dass die Terfenadin-Behandlung in $25 \% \pm 4,1 \%$ der miR-19b-defizienten Fischen zu einem solchen AV-Block führten, während kontrollinjizierte Fische weiterhin einen regelmäßigen Herzschlag zeigten (Abbildung 26). Dies ließ vermuten, dass eine miR-19b-Defizienz zu einer

subphänotypischen Verlängerung des AP führte, wodurch die Fische für die weitere pharmakologische APD-Verlängerung sensitiviert wurden und LQTS-charakteristische Symptome entwickelten.

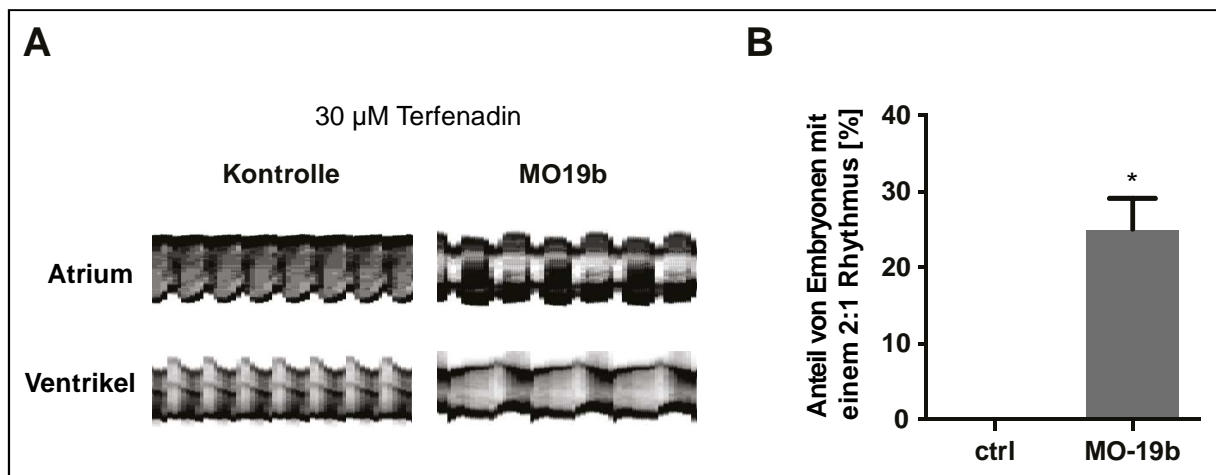


Abbildung 26: miR-19b-Defizienz sensitiviert Zebrafische für einen AV-Block miR-19b-defiziente 48 hpf Zebrafischembryonen wurden mit subphänotypischen Terfenadin-Dosen (30 μ M) behandelt. **(A)** M-Mode-Analysen zeigen, dass eine miR-19b-Defizienz in einem AV-Block resultierte. **(B)** Während kontrollinjizierte Tiere keinen Phänotyp zeigten, war der charakteristische 2:1-Rhythmus in 25 % \pm 4,1 % der miR-19b-defizienten Embryonen zu beobachten (\pm Standardabweichung; n = 3 mit \geq 10 Tieren pro Gruppe; p < 0,05).

Um den Einfluss von miR-19b auf die ventrikuläre APD zu bestätigen, wurden ventrikuläre APs von kontrollinjizierten und miR-19b-defizienten Herzen aufgenommen. Hierfür wurden die Herzen von 48 hpf Zebrafischembryonen herauspräpariert. Die APs wurden mittels *patch-clamp* am Ventrikel des Herzens abgeleitet. Das Ruhepotential ($-68,5 \pm 2,9$ mV) und die APD (APD₅₀: $286 \pm 9,7$ ms; APD₉₀: $349,9 \pm 9,9$ ms) von kontrollbehandelten Herzen waren vergleichbar mit bereits veröffentlichten Ergebnissen (Abbildung 27).¹¹⁹ In MO-19b-injizierten Embryonen waren die APD₅₀ um 57 % \pm 3,8 % und die APD₉₀ um 39 % \pm 3,5 % signifikant verlängert. Zusätzlich war zu beobachten, dass in der Phase der frühen Repolarisierung die Form des AP verändert war. Der sogenannte *notch*, der Knick im AP vor der Plateauphase, war in miR-19b-defizienten Herzen stark abgeflacht (Abbildung 27).

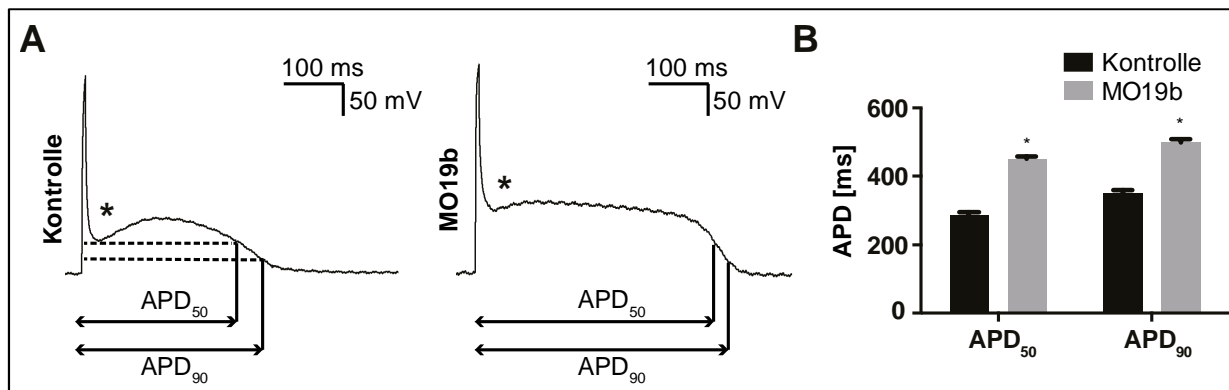


Abbildung 27: miR-19b-Defizienz resultierte in einem verlängertem Aktionspotential (A) Ventrikuläre Aktionspotentiale wurden mittels *patch-clamp* an explantierten Herzen von miR-19b-defizienten Zebrafisch-embryonen abgeleitet. Eine miR-19b-Defizienz resultierte in einer Verlängerung des Aktionspotentials und einem abgeflachtem *notch* (Stern). **(B)** Die APD wurde durch eine Reduktion von miR-19b bei einer Repolarisierung von 50 % (APD₅₀) um 57 % ± 3,8 % und 90% (APD₉₀) um 39 % ± 3,5 % verlängert (± Standardabweichung; n ≥ 10 Aktionspotentiale aus 5 Herzen; p < 0.05).

3.7 miR-19b reguliert die Expression kardialer Ionenkanäle

Eine Verlängerung der APD tritt in der Regel auf, wenn die Expression oder die Funktion kardialer Ionenkanäle beeinträchtigt ist. Um die molekularen Mechanismen zu verstehen, über die eine miR-19b-Reduktion zu einer APD-Verlängerung führt, wurde mittels qRT-PCR die Expression von kardialen Ionenkanälen untersucht, die mit der APD in Zusammenhang stehen. Das Ergebnis der Expressionsanalyse zeigt, dass in miR-19b-defizienten Embryonen diverse Ionenkanäle fehlreguliert vorlagen (Abbildung 28). Bemerkenswerterweise blieb die Expression von HCN4 durch einen miR-19b-*knockdown* unbeeinträchtigt. HCN4, der Ionenkanal der den sogenannten *funny current* bildet, besitzt im Sinusknoten die Aufgabe, den Sinusrhythmus vorzugeben. Die unbeeinträchtigte Expression dieses Kanals weist auf eine normale Entwicklung und Funktion des Sinusknotens hin.

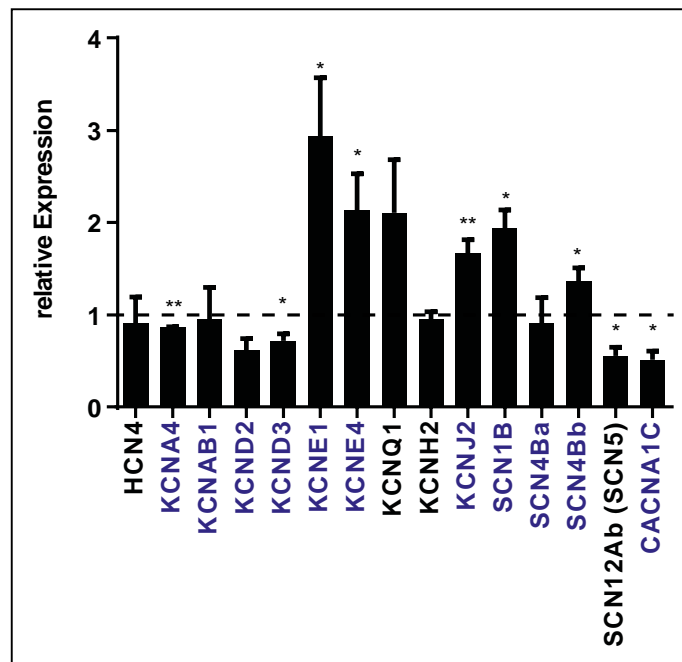


Abbildung 28: Expressionsanalyse kardialer Ionenkanäle nach miR-19b-knockdown Die Expression von Ionenkanälen, die mit einer Verlängerung oder Verkürzung der APD und dem LQTS im Zusammenhang stehen, wurde in miR-19b-defizienten Zebrafischembryonen bei 48 hpf untersucht. Die Expression von KCNA4, KCND3, SCN12Ab und CACNA1C zeigten eine Reduktion, während KCNE1, KCNE4, KCNJ2, SCN1B und SCN4Bb eine verstärkte Expression aufwiesen. Durch bioinformatische Analysen wurden potentielle miR-19b-Zielgene ermittelt - in blau dargestellt (\pm Standardabweichung; $n = 3$ mit 15 Tieren je Probe; $p < 0,05$).

Die Kanäle SCN1B und SCN4Bb zeigten nach einer miR-19 Reduktion eine verminderte und SCN12A eine erhöhte Expression. Diese Kanäle steuern die Depolarisation in Phase 0 (Abbildung 29). Zusätzlich wiesen die I_{to} -Strom assoziierten Kanäle, KCNA4 und KCND3, die hauptsächlich den *notch* regulieren, eine verringerte Expression auf. CACNA1C, ein L-Typ Calciumkanal der während der Plateauphase (Phase 2) aktiv ist, zeigte eine verringerte Expression. Weiterhin wurden kanalassoziierte Proteine während der Repolarisationsphase (KCNE1, KCNE4) und während der Ruhephase (KCNJ2) verstärkt exprimiert. Zusammengefasst wurden durch einen *knockdown* von miR-19b Ionenkanäle aus allen Phasen des AP fehlreguliert (Abbildung 29).

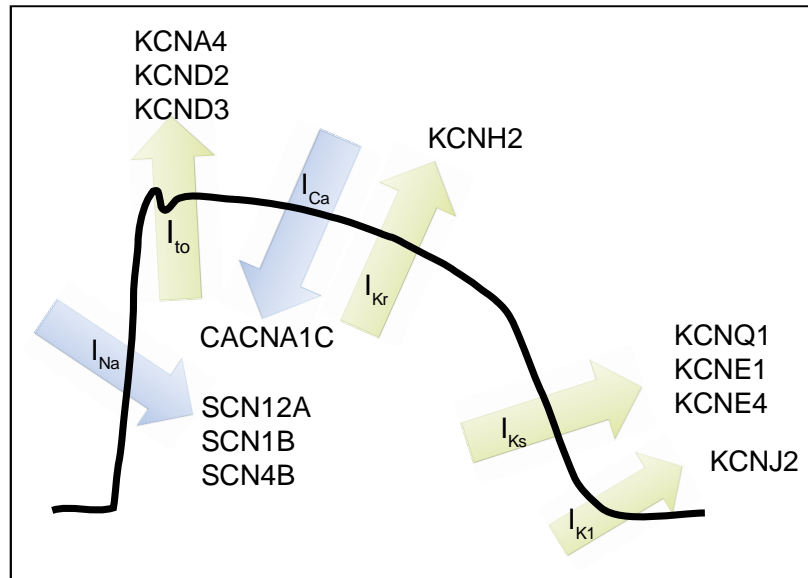


Abbildung 29: Schematische Darstellung eines Aktionspotentials und die Rolle von miR-19b regulierter Gene Der Verlust der miR-19b-Expression resultierte im Zebrafisch in einer veränderten Expression zahlreicher kardialer Ionenkanäle. Die beeinflussten Ionenkanäle übernehmen in jeder Phase des Aktionspotentials eine Rolle.

In weiteren Analysen wurde die direkte Regulation von miR-19b auf die fehlregulierten Ionenkanäle untersucht. Da eine Reduktion von miR-19b zu einer verstärkten Expression eines Zielgens führen sollte, wurden die hochregulierten Ionenkanäle KCNE1, KCNE4, KCNJ2, SCN1B und SCN4Bb als potentielle, direkt von miR-19b regulierte Zielgene untersucht. Durch bioinformatische Analysen wurde überprüft, welche dieser Gene potentielle Bindestellen in der 3'-UTR für miR-19b besitzen (Abbildung 28). Interessanterweise waren alle Ionenkanäle mit einer verstärkten Expression potentielle Zielgene für miR-19b. Die 3'-UTR des entsprechenden Gens wurde aus Zebrafisch-cDNA amplifiziert und in einen Reporter-Vektor in die 3'-UTR eines Luciferasegens kloniert. Bei einer direkten Regulation durch miR-19b würde die Expression und somit die Aktivität der Luciferase durch eine Kotransfektion von miR-19b *mimic* inhibiert werden. Die Luciferaseaktivität wurde *in vitro* in HEK293-Zellen überprüft. So konnte gezeigt werden, dass miR-19b eine direkte Regulation auf die 3'-UTR von KCNE4, KCNJ2 und SCN1B ausübt (Abbildung 30). Durch Mutieren der potentiellen Bindestellen in den 3'-UTRs von KCNE4, KCNJ2 und SCN1B wurde die miR-19b-abhängige Repression aufgehoben.

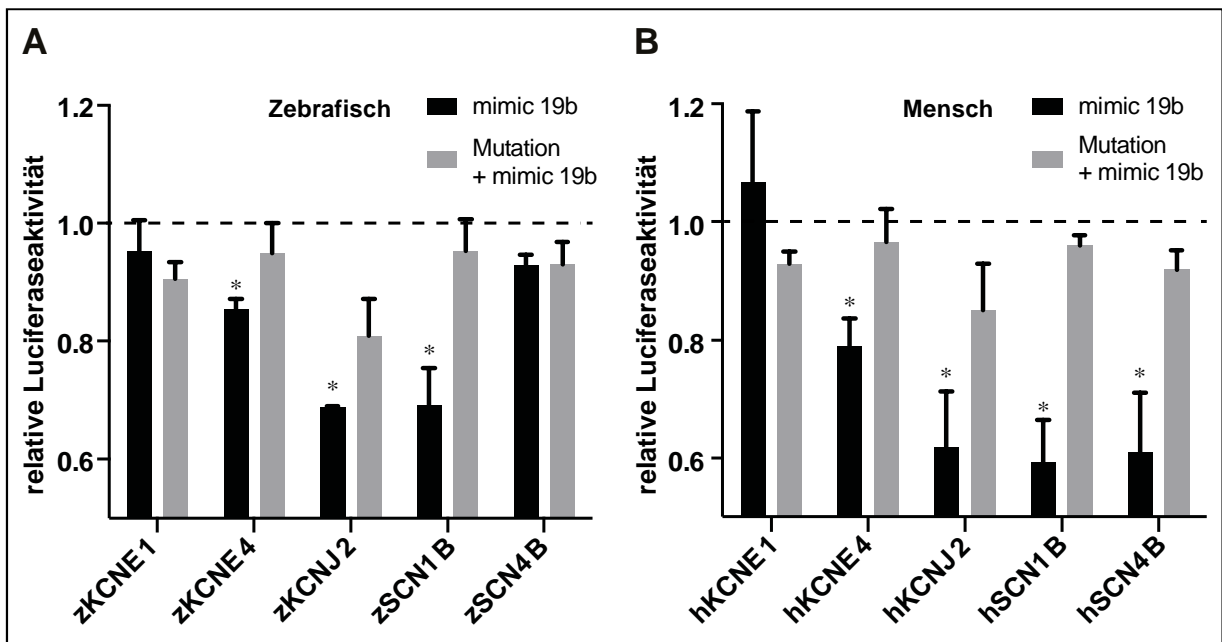


Abbildung 30: Luciferase-Reportergenassay zur Überprüfung der direkten Regulation durch miR-19b
 Die direkte Regulation von miR-19b auf die Expression von potentiellen Zielgenen wurde mittels Luciferase-Reportergenassay analysiert. Die 3'-UTR des potentiellen Zielgens wurde in einen Luciferase-Reportergen-Vektor kloniert und mit miR-19b *mimics* in HEK293-Zellen kotransfiziert. Sowohl die Zebrafisch- (A) als auch die humanen (B) 3'-UTRs von KCNE4, KCNJ2 und SCN1B wiesen Bindestellen für miR-19b auf. Zusätzlich zeigte humanes SCN4B eine direkte Regulation durch miR-19b (\pm Standardabweichung; $n = 3$; $p < 0,05$).

In einem weiteren Experiment wurde die direkte Regulation von miR-19b auf die homologen humanen Gene überprüft. Hierfür wurden die Sequenzen der 3'-UTRs der entsprechenden Gene aus HEK293-DNA amplifiziert. Luciferasekonstrukte mit humanen Sequenzen zeigten eine direkte Regulation bei KCNE4, KCNJ2, SCN1B und SCN4B (Abbildung 30B). Auch hier konnte die miR-19b abhängige Repression durch gezielte Mutation der miR-19b-Bindestelle aufgehoben werden. KCNE1 konnte weder im Menschen, noch im Zebrafisch als direktes Zielgen von miR-19b identifiziert werden. Die Bindestellen und die eingeführten Mutationen sind in Abbildung 31 dargestellt.

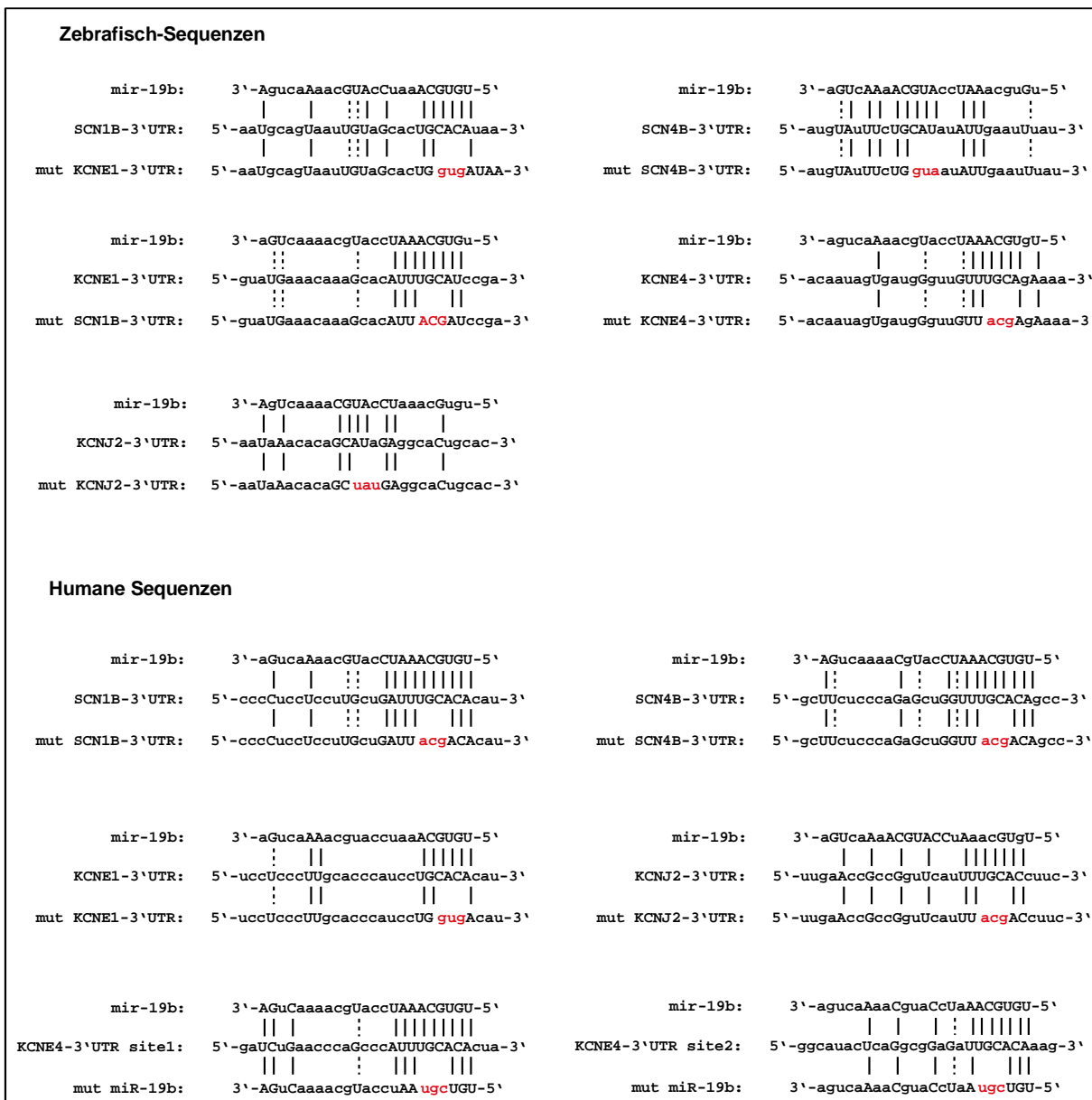


Abbildung 31: Zielsequenzen von miR-19b in der 3'-UTR potentieller Zielgene Für einen Luciferase-Reportergenassay wurde die 3'-UTR des potentiellen Zielgens in einen Luciferase-Reportergen-Vektor kloniert. Mit dem Ziel, die durch miR-19b induzierte Inhibition der Expression aufzuheben, wurde die Zielsequenz jeder 3'-UTR mutiert (in rot dargestellt).

3.8 miR-19b-Defizienz vermindert *reggae*^{m230}-Phänotyp

Um den spezifischen Effekt von miR-19b auf die Elektrophysiologie des Zebrafischherzens weiter zu verdeutlichen, wurde ein *rescue*-Experiment durchgeführt. Ein klassisches *rescue*-Experiment, bei dem die Expression eines kausalen Zielgens normalisiert wird, ist in diesem Zusammenhang sehr schwierig, da miR-19b die Expression vieler kardialer Ionenkanäle beeinflusst und der Phänotyp eine Konsequenz aus der Dysregulation aller Kanaltranskripte darstellt (Abbildung 28). Eine Normalisierung aller fehlregulierten Gene durch zusätzliche Morpholinoinjektionen wäre aufgrund der großen Anzahl schwer zu etablieren. Um weniger die Normalisierung einzelner Transkripte, als den resultierenden Phänotyp in den Fokus zu stellen, wurde in einem alternativen *rescue*-Experiment die zuvor beschriebene *reggae* Mutante verwendet. *reggae* wurde als ein Modell für das *short-QTS* im Zebrafisch beschrieben.¹²⁰ Durch eine *gain-of-function*-Mutation im KCNH2-Gen wird der Kaliumstrom I_{Kr} verstärkt und die ventrikuläre Repolarisierung beschleunigt. Die dabei entstehende Verkürzung des ventrikulären AP resultiert in einem Phänotyp, der in allen homozygoten und in etwa der Hälfte der heterozygoten *reggae*-Mutanten beobachtet werden konnte. Die *reggae*-Mutanten zeigten Phasen von atrialer Fibrillation, sinus-atrialer Blockaden und vollständigem Herzstillstand.

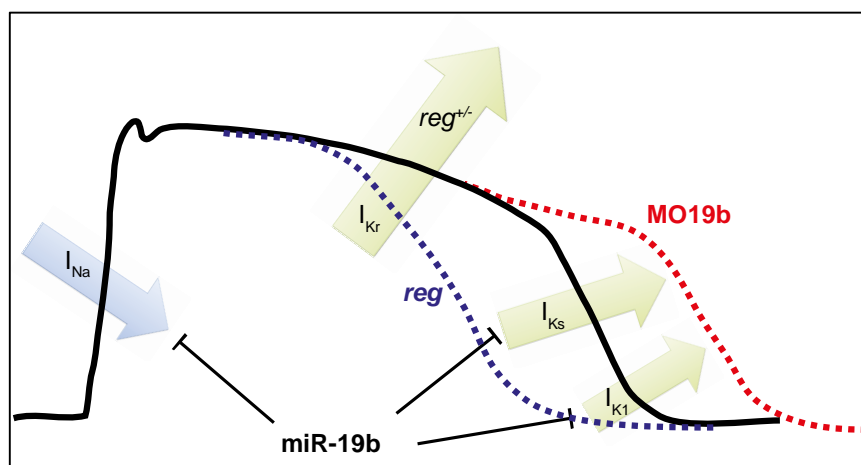


Abbildung 32: Darstellung der Rolle von miR-19b in der kardialen Elektrophysiologie miR-19b reguliert direkt die Expression von Proteinen die mit I_{Na} , I_{Ks} und I_{K1} assoziiert sind. Durch die erhöhte Expression dieser kardialen Ionenkanäle wird das AP verlängert. In *reggae*-Mutanten liegt der Kalium-Strom I_{Kr} verstärkt vor, wodurch das Aktionspotential verkürzt wird. In einem *rescue*-Experiment soll dieser Effekt durch einen *knockdown* von miR-19b aufgehoben werden.

Die Hypothese hinter dem *rescue*-Experiment bestand darin, durch einen miR-19b-*knockdown* die Arrhythmien in *reggae*-Mutanten zu verhindern. Dabei sollte die miR-19b-Defizienz vermittelte Verlängerung der APD die verkürzte APD der *reggae*-Mutanten normalisieren (Abbildung 32). In einem *rescue*-Experiment wurde der Effekt einer miR-19b Reduktion auf den Phänotyp von homozygoten und heterozygoten *reggae*-Mutanten untersucht. Eine Applikation von MO19b hatte keinen Einfluss auf den Phänotyp von homozygoten Mutanten. Der Anteil von homozygoten *reggae*-Mutanten, die einen *reggae*-spezifischen Phänotyp aufzeigten, wurde durch eine verringerte Expression von miR-19b nicht beeinflusst (Abbildung 33). In heterozygoten Mutanten hingegen war das *rescue*-Experiment erfolgreich. Durch eine Reduktion von miR-19b konnte dem Phänotyp entgegengewirkt und die Anzahl der Arrhythmien aufweisenden Embryonen signifikant um $33\% \pm 5,2\%$ reduziert werden (Abbildung 33).

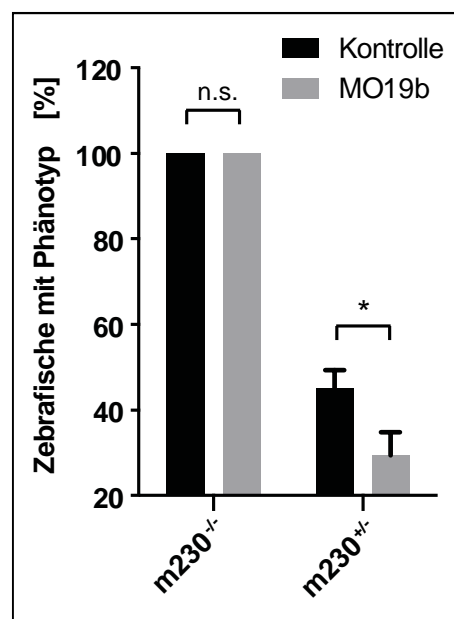


Abbildung 33: miR-19b-Defizienz verringert die Anzahl phänotypischer *reg^{+/-}*-Mutanten Für ein *rescue*-Experiment wurde die miR-19b-Expression in *reggae*-Mutanten verringert. Die miR-19b-Defizienz vermittelte Verlängerung des AP war nicht ausreichend, um in *reg^{-/-}* die Anzahl phänotypischer Embryonen zu verringern, konnte jedoch die Anzahl phänotypischer *reg^{+/-}*-Mutanten um $33\% \pm 5,2\%$ reduzieren (\pm Standardabweichung; $n = 73$ Tiere aus 3 unabhängigen Versuchen; $p < 0,05$).

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die kardiale Funktion der nicht-kodierenden RNA-Isoformen der miR-19 Familie zu charakterisieren. Mithilfe des Zebrafischs als Tiermodell wird aufgezeigt, dass insbesondere miR-19b eine essentielle Rolle in der kardialen Elektrophysiologie übernimmt. Durch direkte und indirekte Regulation kardialer Ionenkanäle beeinflusst miR-19b als ein wesentlicher Faktor maßgeblich die APD und die Form des ventrikulären AP.

Die miR-19-Familie bildet eine Gruppe von nicht-kodierenden RNA-Molekülen mit einer starken Konservierung innerhalb der Vertebraten. Die Sequenzen und die Syntenie der miR-19-Isoformen im Zebrafisch zeigen eine hohe Homologie zum Säugetiergenom. Der einzige Unterschied besteht darin, dass das Zebrafischgenom vier miR-19-Isoformen kodiert, während die miR-19-Familie im Säugetier nur aus zwei Isoformen besteht. Durch Chromosomenduplikationen, die im Fisch im Laufe der Evolution nach der phylogenetischen Abspaltung der Säugetierlinie stattfanden, besitzt der Zebrafisch in vielen Fällen zusätzliche orthologe Varianten eines bestimmten Gens.¹³⁰ Bei einer dieser Chromosomenduplikationen sind wahrscheinlich im Zweig der Teleosten die Isoformen miR-19c und miR-19d entstanden.¹³⁷ Nach einer Genduplikation werden zusätzliche Orthologe in ihrer Expression häufig herunterreguliert und zu Pseudogenen degradiert.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Dies würde erklären, weshalb miR-19c und miR-19d im Zebrafischembryo schwächer als miR-19a und miR-19b exprimiert vorliegen. Die starke Konservierung von miR-19a und miR-19b weist auf eine essentielle und konservierte Funktion hin. Die Expression dieser beiden miR-19-Isoformen wird in der vorliegenden Arbeit in den Myosepten und im Herzen des Zebrafischembryos nachgewiesen. Bei 24 hpf wird die Expression stark induziert. Zu diesem Zeitpunkt nimmt das Herz seine Funktion auf und fängt an, kontinuierlich zu kontrahieren. Die zeitliche Übereinstimmung der miR-19-Expression mit der Funktionsaufnahme des Herzens weist auf eine Rolle von miR-19 in der kardialen Funktion hin.

Die relative Expression von miR-19 wurde in der vorliegenden Arbeit stets mittels qRT-PCR nachgewiesen. Die Expressionsanalyse nach einem individuellen *knockdown* von miR-19a und miR-19b zeigt jeweils eine Reduktion beider Isoformen. Die Expression beider Isoformen kann durch eine Erhöhung der Morpholino-Konzentrationen nicht weiter reduziert werden. Dies lässt vermuten, dass der individuelle *knockdown* spezifisch die Expression der entsprechenden Isoform reduziert, die Primer jedoch kreuzreaktiv beide Isoformen binden.

Dadurch kann in der Quantifizierung mittels qRT-PCR nicht zwischen miR-19a und miR-19b differenziert werden.

Die Kausalität des Phänotyps konnte auf die Reduktion von miR-19b beschränkt werden. Eine Reduktion von miR-19b ist ausreichend, um eine Bradykardie in Zebrafischembryonen zu induzieren. Als Ursache für die Bradykardie wurde eine Verlängerung der APD identifiziert. Der Zusammenhang zwischen einer APD-Verlängerung und einer Bradykardie konnte bereits in anderen Studien ermittelt werden.¹⁴¹ Die Ursachen und die molekularen Mechanismen, die zu einer Verlängerung der APD während der HI führen, sind dagegen unzureichend aufgeklärt. Mit miR-19b liefert die vorliegende Arbeit einen Kandidaten, der die Veränderung der APD in HI-Patienten erklären könnte. Die verminderte Aktivität von repolarisierenden K⁺-Strömen in HI-Patienten ähnelt vererbten Kanalopathien, die ursächlich für LQTS-Erkrankungen sind. Daher wird die HI als eine Form des erworbenen LQTS beschrieben.⁴⁰ Die veränderte Expression kardialer Ionenkanäle geht mit einem erhöhten Risiko einher, einen SCD zu erleiden und daran zu versterben.^{142,143} Die bevorzugte Behandlung von LQTS Patienten besteht in einer hochdosierten Verabreichung von β -Blockern.^{144,145} β -Blocker nehmen keinen direkten Einfluss auf die APD, reduzieren jedoch die Wahrscheinlichkeit von Arrhythmien.¹⁴⁶ Erst nach einem überlebten Herzstillstand, wird in LQTS Patienten das Implantieren eines Kardioverten Defibrillators (ICD) empfohlen.¹⁴⁷ HI-Patienten wird ein ICD erst bei einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von unter 35 % eingesetzt.¹⁴⁷ Die späte Indikation des ICD zeigt die dringende Notwendigkeit eines biologischen Markers, der die Risikobewertung von lebensbedrohlichen Arrhythmien zulässt. miRNAs wurden bereits in vorangegangenen Studien als wichtige Regulatoren in einer Reihe von pathologischen Prozessen beschrieben, die zu einer kardialen Hypertrophie, HI oder Arrhythmien führen.^{72,74,148,149}

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Reduktion von miR-19b im Zebrafischembryo in einer Bradykardie und einer verringerten Kontraktilität resultiert. Auffallend ist, dass die Bradykardie sehr konsistent in jedem Fisch zu beobachten ist, während der Kontraktilitätsverlust nicht in allen miR-19b-defizienten Embryonen evident ist. Dies lässt vermuten, dass miR-19b die Kontraktilität und die Herzfrequenz über verschiedene, voneinander unabhängige Mechanismen beeinflusst. Bereits veröffentlichte Studien assoziieren miR-19 mit einer Bradykardie, Arrhythmien und Kardiomyopathien im Maus- und Zebrafischmodell.^{93-95,150} Der Mechanismus, der zu diesen pathologischen Effekten führt, ist bis heute weitestgehend unaufgeklärt. In dieser Arbeit wurde die Funktion von miR-19b durch einen Funktionsverlust untersucht. Um eine hohe Spezifität zu gewährleisten, wurde die

miR-19b Expression durch einen Morpholino vermittelten *knockdown* und mittels CRISPR/Cas9-Genmodifikation reduziert.

Herzen aus miR-19b-defizienten Zebrafischembryonen weisen eine Verlängerung der APD auf. Dieses Ergebnis wurde in dieser Arbeit durch zwei unterschiedliche Experimente bestätigt. Zunächst wurde ein pharmakologischer Ansatz durchgeführt, bei dem das APD verlängernde Medikament Terfenadin verwendet wurde. Die ventrikuläre Repolarisation wird durch die spezifische Inhibition der I_{Kr} -Ströme durch Terfenadin verzögert und die Zebrafischherzen werden für einen charakteristischen AV-Block zweiten Grades sensitiviert.^{107,119} Aufgrund der zusätzlichen miR-19b-Defizienz vermittelten Verlängerung der APD, entwickeln die Morphanten im Vergleich zu den Kontrollen schon bei geringeren Terfenadin-Konzentrationen einen AV-Block. Die Verlängerung der APD wurde durch die Ableitung eines ventrikulären *compound*-AP mittels *patch-clamp* bestätigt. Dies zeigt, dass die Reduktion von miR-19b nicht nur eine Folge der Herzinsuffizienz ist, sondern dass die miR-19b-Defizienz eine APD verlängernde Ursache ist, die zu einer Bradykardie führt. Das abgeleitete AP zeigt neben einer signifikanten Verlängerung eine veränderte Form im Bereich des *notch*, die auch bei kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet werden kann.¹⁵¹⁻¹⁵³ Um den grundlegenden Mechanismus aufzuklären, über den miR-19b die Länge und die Form des AP moduliert, wurde eine Expressionsanalyse von bekannten LQTS-verursachenden Genen durchgeführt. Die gestörte Expression von Ionenkanälen aus jeder Phase des AP zeigt, dass miR-19b eine essentielle Rolle in der Regulation der kardialen Elektrophysiologie besitzt. Neben der verringerten Expression von I_{to} -assoziierten Kanälen, wurde eine erhöhte Expression von depolarisierenden und repolarisierenden Ionenkanälen detektiert. Besonders interessant ist, dass sich die meisten dieser Ionenkanäle als ein bioinformatisch vorhergesagtes Zielgen für miR-19b herausstellten. Mittels Luciferase-Reporterassays konnten SCN1B, SCN4B, KCNE1 und KCNJ2 als direkte Zielgene von miR-19b identifiziert werden. Die miR-19b abhängige Regulation dieser Gene konnte ebenfalls mit humanen 3'-UTR Sequenzen nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die regulatorische Funktion von miR-19b auch eine Rolle in der humanen Elektrophysiologie des Herzens spielt. Zusätzlich zeigt KCNE1 nach einer miR-19b Reduktion eine konsistent verstärkte Expression, was eine indirekte Regulation durch miR-19b vermuten lässt.

Die KCNE-Familie bildet eine Gruppe von Proteinen, die als β -Untereinheiten von KCNQ1 fungieren. KCNQ1 ist ein spannungsabhängiger Kaliumkanal, der in der Repolarisation des kardialen AP den I_{Ks} -Strom ausbildet. Sowohl KCNE1 als auch KCNE4 modulieren die Aktivität von KCNQ1.¹⁵⁴⁻¹⁵⁹ Die Expression von KCNE1 wurde in HF-Patienten sowohl

verringert als auch erhöht vorgefunden.^{39,160,161} Mansén et al. zeigten, dass sowohl eine verringerte, als auch eine erhöhte Expression von KCNE1 den I_{Ks} -Strom inhibieren.¹⁶² Für eine optimale Aktivität von KCNQ1 ist vielmehr das richtige Verhältnis der beiden Proteine zueinander maßgeblich. KCNE4 ist eine weitere β -Untereinheit von KCNQ1. Eine Koexpression von KCNE4 mit KCNQ1 *in vitro* resultierte in einer vollständigen Inhibition des I_{Ks} -Stroms.¹⁶³ In der vorliegenden Arbeit wurde nach einer Reduktion von miR-19b eine signifikant verstärkte Expression von KCNE1 und KCNE4 festgestellt. Die Hochregulation dieser Gene könnte durch eine Inhibition der KCNQ1 Aktivität in einer Reduktion des I_{Ks} -Stroms resultieren. Dies würde die Verlängerung APD und die Bradykardie erklären. Interessanterweise zeigten Li et al., dass eine Überexpression von miR-19b im Zebrafisch ebenfalls in einer Bradykardie resultiert.⁹⁴ Dies könnte dadurch erklärt werden, dass KCNE1 bei einer miR-19b Überexpression möglicherweise herunterreguliert wird, was wie beschrieben ebenfalls in einer Verlängerung des AP resultiert.

In den letzten Jahren zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass erhöhte *late* $Na_v1.5$ -Ströme vermehrt in HI-Patienten auftreten.^{20,22,23,164} $Na_v1.5$ bildet den Natriumkanal, der hauptsächlich die initiale Depolarisierung bewirkt. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Inaktivierung dieses Kanals nach der Depolarisierung in weniger als 4 ms.¹⁶⁵ Durch eine gestörte Inaktivierung des I_{Na} kommt es zu einem erhöhten I_{NaL} . Dieser Strom bleibt bis in die Plateauphase aktiv und wirkt repolarisierenden K^+ -Strömen entgegen. Auf diese Weise wird die Repolarisierung verzögert und es entsteht ein verlängertes AP. SCN1B fungiert als eine β -Untereinheit von $Na_v1.5$ und wurde in dieser Arbeit als ein direktes Zielgen von miR-19b bestätigt.¹⁶⁶ Eine Überexpression von SCN1B mit SCN5A, der alpha-Untereinheit von $Na_v1.5$, resultiert in einer erhöhten Amplitude des I_{NaL} .¹⁸ Die erhöhte Expression von SCN1B nach miR-19-*knockdown* könnte daher einen weiteren Faktor darstellen, der die Verlängerung der ventrikulären APD verursacht.

Neben den direkt regulierten Ionenkanälen wurden in der vorliegenden Arbeit mittels qPCR weitere Ionenkanäle identifiziert, die nach einer miR-19b Reduktion eine fehlregulierte Expression aufweisen und vermutlich einer indirekten Regulation von miR-19b unterliegen. Es ist davon auszugehen, dass die verringerte Expression von KCNA4 und KCND3 Ursache für die schwächere Ausprägung des *notch* ist. KCNA4 und KCND3 bilden Kaliumkanäle, die den I_{to} -Strom ausbilden.^{167,168} Eine Verringerung des I_{to} -Stroms ist in unterschiedlichen kardialen Erkrankungen zu beobachten.^{151-153,169-171} Durch die verringerte Expression dieser frühen repolarisierenden K^+ -Kanäle wird die Tiefe des Phase 1-*notch* verringert und das Plateaupotential beeinflusst, was sich auf die Aktivität aller folgenden Ionenströme auswirken

kann. Allerdings ist die verringerte Expression dieser Kanäle im Menschen nicht zwingend mit einer Verlängerung der APD assoziiert.¹⁷²

Zusätzlich zeigen SCN12Ab und der L-Typ-Calciumkanal CACNA1C eine verringerte Expression und eine Studie zeigt, dass Cx43 direkt durch miR-19 reguliert wird.⁹³ Dies zeigt, dass die Reduktion von miR-19b durch direkte, indirekte, adaptive und maladaptive Veränderungen der Genexpression eine komplexe molekulare Umstrukturierung der kardialen Elektrophysiologie bewirkt. Ein klassisches *rescue*-Experiment, bei dem die Expression eines einzelnen Gens nach einem miR-19b *knockdown* wieder normalisiert wird, würde den induzierten Phänotyp vermutlich nicht aufheben können. Aus diesem Grund wurde für ein *rescue*-Experiment eine Alternative gewählt, bei der die Zebrafischmutante *reggae* verwendet wurde. Die *reggae*-Mutante ist durch eine *gain-of-function* Mutation in KCNH2 charakterisiert. Die Mutanten zeigen ein verkürztes AP und entwickeln Arrhythmien mit atrialer Fibrillation, sinus-atrialen Blockaden und vorübergehend vollständigem Herzstillstand. Ein *knockdown* von miR-19b hat keine Auswirkungen auf die Expression von KCNH2. Dies lässt vermuten, dass die KCNH2 Aktivität auch in *reggae* Mutanten durch eine Reduktion von miR-19b nicht beeinflusst wird. Während der Phänotyp in homozygoten *reggae* Mutanten nicht beeinflusst wurde, konnte eine miR-19b-Defizienz in einer signifikanten Anzahl von heterozygoten *reggae* Mutanten einen regelmäßigen Herzschlag wiederherstellen. An dieser Stelle muss berücksichtigt werden, dass miR-19b in der kardialen Elektrophysiologie eine modulatorische Rolle übernimmt und eine miR-19b-Defizienz in einer signifikanten, aber sub-phänotypischen APD-Verlängerung resultiert. Die Tatsache, dass eine miR-19b-Defizienz vermittelte Verlängerung der APD nicht ausreicht, um die Phänotyp verursachende Verkürzung der APD in *reg*^{-/-} Mutanten zu normalisieren und erneut einen normalen Herzrhythmus herzustellen, scheint plausibel. In *reg*^{+/-} Mutanten reicht die miR-19b-Defizienz vermittelte APD-Verlängerung hingegen aus, um einen regelmäßigen Herzschlag wiederherzustellen.

Die direkte Regulation von KCNE4, SCN1B und KCNJ2 durch miR-19b konnte im Luciferaseassay mit humanen Sequenzen bestätigt werden. Außerdem konnte humanes SCN4B als direktes Zielgen von miR-19b identifiziert werden. Die konservierte Funktion von miR-19b liefert einen Hinweis darauf, dass miR-19b in der kardialen Elektrophysiologie des Menschen eine Rolle spielt. Es ist davon auszugehen, dass die im Zebrafisch identifizierten Veränderungen der APD auch als Konsequenz einer miR-19b Fehlregulation im Menschen auftreten.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit mit miR-19b ein Regulator der APD identifiziert, der in HI-Patienten fehlreguliert vorliegt. Mit der modulatorischen Funktion von miR-19b auf die Expression von kardialen Ionenkanälen liefert diese Arbeit einen Mechanismus, der die Verlängerung und Formveränderung des ventrikulären AP in HI-Patienten erklärt. Zusätzlich liefern die vorgestellten Ergebnisse mit miR-19b einen Kandidaten als ursächliches Gen für ein erworbenes LQTS.

4.1 Ausblick

Der Mechanismus, der zu einer Verlängerung der APD in HI-Patienten führt, ist unzureichend aufgeklärt. In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse aufgezeigt, die miR-19b als Regulator der kardialen Elektrophysiologie im Zebrafisch beschreiben. Durch direkte und indirekte Regulation kardialer Ionenkanäle, moduliert miR-19b die APD und die Form des AP.

In weiteren Studien muss aufgeklärt werden, unter welchen Umständen miR-19b zur Pathophysiologie von kardialen Erkrankungen beiträgt. Hierzu wäre interessant zu untersuchen, ob Patienten mit einer Verlängerung der APD und einem LQTS eine Fehlregulation der miR-19b Expression aufweisen. Hierfür müsste das QT-Intervall von betroffenen Patienten ausgemessen und auf eine Korrelation mit der miR-19b Expression untersucht werden. Weiterhin wäre interessant, ob es in Patienten, die unter einer HI leiden, einen kausalen Zusammenhang mit miR-19b assoziierten Mutationen gibt. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten, an welcher Stelle diese Mutation auftreten könnte. Zum einen kann sich die Mutation im miR-19b kodierenden Gen befinden, zum anderen in der 3'-UTR des Zielgens. Eine Mutation im miR-19b-Gen, welche die Prozessierung von miR-19b inhibiert oder die Bindeaffinität an die 3'-UTR verringert, ist unwahrscheinlich. miR-19b reguliert viele zelluläre Prozesse und eine Fehlregulation der miR-19b Aktivität ist mit vielen Krankheiten assoziiert. Durch eine Sequenzänderung von miR-19b, würden folglich alle miR-19b assoziierten Signalwege beeinträchtigt werden. Dadurch stehen miRNAs im Allgemeinen unter einem hohen Selektionsdruck und sind selbst unter weit entfernten Spezies oft stark konserviert.^{173,174} Nozawa et al. zeigen in einer Studie, dass die Mutationsrate der *mature*-Sequenz im miRNA-Gen, im Vergleich zu nicht-synonymen Substitutionen in proteinkodierenden Sequenzen, nur etwa 10 % beträgt.¹⁷⁵ Dementsprechend sind Mutationen in der 3'-UTR des regulierten Gens weitaus wahrscheinlicher. In weiteren Studien sollte daher überprüft werden, ob die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Bindesequenzen von

miR-19b in der 3'-UTR von KCNE4, SCN1B, SCN4B und KCNJ2 in Patienten vermehrte Mutationen aufweisen. Dafür würde sich eine Kohorte eignen, die aus HI-Patienten mit einer Verlängerung der APD oder einem LQTS besteht.

Wenn miR-19b auf diese Weise mit einer pathophysiologischen Verlängerung der APD im Menschen in Zusammenhang gebracht werden kann, könnte weiterhin untersucht werden, ob sich miR-19b als Marker für eine Risikobewertung, einen SCD zu erleiden, eignet.

5 Literaturverzeichnis

- 1 Statistisches-Bundesamt. Todesursachen. (2015).
- 2 Statistisches-Bundesamt. Die häufigsten Diagnosen bei Krankenhauspatienten. (2015).
- 3 Chen, J., Hsieh, A. F., Dharmarajan, K., Masoudi, F. A. & Krumholz, H. M. National trends in heart failure hospitalization after acute myocardial infarction for Medicare beneficiaries: 1998-2010. *Circulation* **128**, 2577-2584, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003668 (2013).
- 4 Ashley, E. A. & Niebauer, J. in *Cardiology Explained* Ch. 7, Heart Failure, (2004).
- 5 Dzau, V. J., Colucci, W. S., Hollenberg, N. K. & Williams, G. H. Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation* **63**, 645-651 (1981).
- 6 Iwai, N., Shimoike, H. & Kinoshita, M. Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation* **92**, 2690-2696 (1995).
- 7 Jackson, G., Gibbs, C. R., Davies, M. K. & Lip, G. Y. ABC of heart failure. Pathophysiology. *BMJ* **320**, 167-170 (2000).
- 8 Kemp, C. D. & Conte, J. V. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol* **21**, 365-371, doi:10.1016/j.carpath.2011.11.007 (2012).
- 9 Wickenden, A. D. *et al.* The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res* **37**, 312-323 (1998).
- 10 Zipes, D. P. & Wellens, H. J. Sudden cardiac death. *Circulation* **98**, 2334-2351 (1998).
- 11 Grunnet, M. Repolarization of the cardiac action potential. Does an increase in repolarization capacity constitute a new anti-arrhythmic principle? *Acta Physiol (Oxf)* **198 Suppl 676**, 1-48, doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02072.x (2010).
- 12 Ravens, U. & Cerbai, E. Role of potassium currents in cardiac arrhythmias. *Europace* **10**, 1133-1137, doi:10.1093/europace/eun193 (2008).
- 13 Makielski, J. C. & Farley, A. L. Na(+) current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *J Cardiovasc Electrophysiol* **17 Suppl 1**, S15-S20, doi:10.1111/j.1540-8167.2006.00380.x (2006).
- 14 Noble, D. & Noble, P. J. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart* **92 Suppl 4**, iv1-iv5, doi:10.1136/hrt.2005.078782 (2006).
- 15 Maltsev, V. A. *et al.* Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* **98**, 2545-2552 (1998).
- 16 Medeiros-Domingo, A. *et al.* SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **116**, 134-142, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.659086 (2007).
- 17 Mishra, S. *et al.* Post-transcriptional silencing of SCN1B and SCN2B genes modulates late sodium current in cardiac myocytes from normal dogs and dogs with chronic heart

- failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1596-1605, doi:10.1152/ajpheart.00948.2009 (2011).
- 18 Maltsev, V. A., Kyle, J. W. & Undrovinas, A. Late Na⁺ current produced by human cardiac Na⁺ channel isoform Nav1.5 is modulated by its beta1 subunit. *J Physiol Sci* **59**, 217-225, doi:10.1007/s12576-009-0029-7 (2009).
- 19 Undrovinas, A. & Maltsev, V. A. Late sodium current is a new therapeutic target to improve contractility and rhythm in failing heart. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **6**, 348-359 (2008).
- 20 Undrovinas, A. I., Maltsev, V. A. & Sabbah, H. N. Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. *Cell Mol Life Sci* **55**, 494-505 (1999).
- 21 Undrovinas, A. I., Maltsev, V. A., Kyle, J. W., Silverman, N. & Sabbah, H. N. Gating of the late Na⁺ channel in normal and failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 1477-1489 (2002).
- 22 Valdivia, C. R. *et al.* Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 475-483, doi:10.1016/j.yjmcc.2004.12.012 (2005).
- 23 Maltsev, V. A., Silverman, N., Sabbah, H. N. & Undrovinas, A. I. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur J Heart Fail* **9**, 219-227, doi:10.1016/j.ejheart.2006.08.007 (2007).
- 24 Cerbai, E., Barbieri, M., Li, Q. & Mugelli, A. Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc Res* **28**, 1180-1187 (1994).
- 25 Benitah, J. P. *et al.* Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* **469**, 111-138 (1993).
- 26 Coulombe, A., Momtaz, A., Richer, P., Swynghedauw, B. & Coraboeuf, E. Reduction of calcium-independent transient outward potassium current density in DOCA salt hypertrophied rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* **427**, 47-55 (1994).
- 27 Tomita, F., Bassett, A. L., Myerburg, R. J. & Kimura, S. Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res* **75**, 296-303 (1994).
- 28 Potreau, D., Gomez, J. P. & Fares, N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* **30**, 440-448 (1995).
- 29 Thuringer, D., Deroubaix, E., Coulombe, A., Coraboeuf, E. & Mercadier, J. J. Ionic basis of the action potential prolongation in ventricular myocytes from Syrian hamsters with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **31**, 747-757, doi:10.1016/0008-6363(96)00018-1 (1996).
- 30 Kaab, S. *et al.* Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* **78**, 262-273 (1996).
- 31 Beuckelmann, D. J., Nabauer, M. & Erdmann, E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* **73**, 379-385 (1993).

- 32 Li, G. R., Lau, C. P., Ducharme, A., Tardif, J. C. & Nattel, S. Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1031-1041, doi:10.1152/ajpheart.00105.2002 (2002).
- 33 Li, G. R., Lau, C. P., Leung, T. K. & Nattel, S. Ionic current abnormalities associated with prolonged action potentials in cardiomyocytes from diseased human right ventricles. *Heart Rhythm* **1**, 460-468, doi:10.1016/j.hrthm.2004.06.003 (2004).
- 34 Pogwizd, S. M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. & Bers, D. M. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* **88**, 1159-1167 (2001).
- 35 Rose, J. *et al.* Molecular correlates of altered expression of potassium currents in failing rabbit myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H2077-2087, doi:10.1152/ajpheart.00526.2003 (2005).
- 36 Rozanski, G. J., Xu, Z., Whitney, R. T., Murakami, H. & Zucker, I. H. Electrophysiology of rabbit ventricular myocytes following sustained rapid ventricular pacing. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 721-732, doi:10.1006/jmcc.1996.0314 (1997).
- 37 Tsuji, Y. *et al.* Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovasc Res* **48**, 300-309 (2000).
- 38 Petkova-Kirova, P. S. *et al.* Electrical remodeling of cardiac myocytes from mice with heart failure due to the overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H2098-2107, doi:10.1152/ajpheart.00097.2005 (2006).
- 39 Tsuji, Y., Zicha, S., Qi, X. Y., Kodama, I. & Nattel, S. Potassium channel subunit remodeling in rabbits exposed to long-term bradycardia or tachycardia: discrete arrhythmogenic consequences related to differential delayed-rectifier changes. *Circulation* **113**, 345-355, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.552968 (2006).
- 40 Choy, A. M. *et al.* Normalization of acquired QT prolongation in humans by intravenous potassium. *Circulation* **96**, 2149-2154 (1997).
- 41 Moss, A. J. *et al.* The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation* **84**, 1136-1144 (1991).
- 42 Schwartz, P. J., Periti, M. & Malliani, A. The long Q-T syndrome. *Am Heart J* **89**, 378-390 (1975).
- 43 Kapplinger, J. D. *et al.* Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* **6**, 1297-1303, doi:10.1016/j.hrthm.2009.05.021 (2009).
- 44 Tester, D. J., Will, M. L., Haglund, C. M. & Ackerman, M. J. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* **2**, 507-517, doi:10.1016/j.hrthm.2005.01.020 (2005).
- 45 Medeiros-Domingo, A., Iturralde-Torres, P. & Ackerman, M. J. [Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome]. *Rev Esp Cardiol* **60**, 739-752 (2007).

- 46 Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854 (1993).
- 47 Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* **12**, 861-874, doi:10.1038/nrg3074 (2011).
- 48 Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**, 92-105, doi:10.1101/gr.082701.108 (2009).
- 49 Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957-1966, doi:10.1261/rna.7135204 (2004).
- 50 Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-4060, doi:10.1038/sj.emboj.7600385 (2004).
- 51 Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* **11**, 228-234, doi:10.1038/ncb0309-228 (2009).
- 52 Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419, doi:10.1038/nature01957 (2003).
- 53 Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185-191 (2004).
- 54 Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-3016, doi:10.1101/gad.1158803 (2003).
- 55 Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366, doi:10.1038/35053110 (2001).
- 56 Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* **293**, 834-838, doi:10.1126/science.1062961 (2001).
- 57 Robb, G. B. & Rana, T. M. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell* **26**, 523-537, doi:10.1016/j.molcel.2007.04.016 (2007).
- 58 Salzman, D. W., Shubert-Coleman, J. & Furneaux, H. P68 RNA helicase unwinds the human *let-7* microRNA precursor duplex and is required for *let-7*-directed silencing of gene expression. *J Biol Chem* **282**, 32773-32779, doi:10.1074/jbc.M705054200 (2007).
- 59 Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. & Zamore, P. D. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* **306**, 1377-1380, doi:10.1126/science.1102755 (2004).
- 60 Hutvagner, G. & Zamore, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-2060, doi:10.1126/science.1073827 (2002).
- 61 Liu, J. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-1441, doi:10.1126/science.1102513 (2004).

- 62 Meister, G. *et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**, 185-197, doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007 (2004).
- 63 Pillai, R. S., Artus, C. G. & Filipowicz, W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* **10**, 1518-1525, doi:10.1261/rna.7131604 (2004).
- 64 Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233, doi:10.1016/j.cell.2009.01.002 (2009).
- 65 Nielsen, C. B. *et al.* Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* **13**, 1894-1910, doi:10.1261/rna.768207 (2007).
- 66 Martin, H. C. *et al.* Imperfect centered miRNA binding sites are common and can mediate repression of target mRNAs. *Genome Biol* **15**, R51, doi:10.1186/gb-2014-15-3-r51 (2014).
- 67 Gong, J. *et al.* An update of miRNASNP database for better SNP selection by GWAS data, miRNA expression and online tools. *Database (Oxford)* **2015**, bav029, doi:10.1093/database/bav029 (2015).
- 68 Gong, J. *et al.* Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat* **33**, 254-263, doi:10.1002/humu.21641 (2012).
- 69 Sun, G. *et al.* SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA* **15**, 1640-1651, doi:10.1261/rna.1560209 (2009).
- 70 Baek, D. *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64-71, doi:10.1038/nature07242 (2008).
- 71 Selbach, M. *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**, 58-63, doi:10.1038/nature07228 (2008).
- 72 Ikeda, S. *et al.* Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* **31**, 367-373, doi:10.1152/physiolgenomics.00144.2007 (2007).
- 73 Thum, T., Catalucci, D. & Bauersachs, J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* **79**, 562-570, doi:10.1093/cvr/cvn137 (2008).
- 74 Zhao, Y. *et al.* Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* **129**, 303-317, doi:10.1016/j.cell.2007.03.030 (2007).
- 75 da Costa Martins, P. A. *et al.* Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* **118**, 1567-1576, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769984 (2008).
- 76 Ota, A. *et al.* Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* **64**, 3087-3095 (2004).
- 77 Ventura, A. *et al.* Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* **132**, 875-886, doi:10.1016/j.cell.2008.02.019 (2008).
- 78 Mogilyansky, E. & Rigoutsos, I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in

- health and disease. *Cell Death Differ* **20**, 1603-1614, doi:10.1038/cdd.2013.125 (2013).
- 79 Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2257-2261, doi:10.1073/pnas.0510565103 (2006).
- 80 Volinia, S. *et al.* Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res* **20**, 589-599, doi:10.1101/gr.098046.109 (2010).
- 81 Bates, D. J., Liang, R., Li, N. & Wang, E. The impact of noncoding RNA on the biochemical and molecular mechanisms of aging. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 970-979, doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.028 (2009).
- 82 Cox, M. B. *et al.* MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One* **5**, e12132, doi:10.1371/journal.pone.0012132 (2010).
- 83 De Santis, G. *et al.* Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **226**, 165-171, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.06.009 (2010).
- 84 Fontana, L. *et al.* MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol* **9**, 775-787, doi:10.1038/ncb1613 (2007).
- 85 Hebert, S. S. & De Strooper, B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* **32**, 199-206, doi:10.1016/j.tins.2008.12.003 (2009).
- 86 Kapsimali, M. *et al.* MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol* **8**, R173, doi:10.1186/gb-2007-8-8-r173 (2007).
- 87 Lindberg, R. L., Hoffmann, F., Mehling, M., Kuhle, J. & Kappos, L. Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol* **40**, 888-898, doi:10.1002/eji.200940032 (2010).
- 88 Otaegui, D. *et al.* Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One* **4**, e6309, doi:10.1371/journal.pone.0006309 (2009).
- 89 Schonrock, N., Matamales, M., Ittner, L. M. & Gotz, J. MicroRNA networks surrounding APP and amyloid-beta metabolism--implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **235**, 447-454, doi:10.1016/j.expneurol.2011.11.013 (2012).
- 90 Taganov, K. D., Boldin, M. P. & Baltimore, D. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* **26**, 133-137, doi:10.1016/j.immuni.2007.02.005 (2007).
- 91 Tsitsiou, E. & Lindsay, M. A. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 514-520, doi:10.1016/j.coph.2009.05.003 (2009).
- 92 van Almen, G. C. *et al.* MicroRNA-18 and microRNA-19 regulate CTGF and TSP-1 expression in age-related heart failure. *Aging Cell* **10**, 769-779, doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00714.x (2011).
- 93 Danielson, L. S. *et al.* Cardiovascular dysregulation of miR-17-92 causes a lethal hypertrophic cardiomyopathy and arrhythmogenesis. *FASEB J* **27**, 1460-1467, doi:10.1096/fj.12-221994 (2013).

- 94 Li, M. *et al.* Overexpression of miR-19b impairs cardiac development in zebrafish by targeting *ctnnb1*. *Cell Physiol Biochem* **33**, 1988-2002, doi:10.1159/000362975 (2014).
- 95 Song, D. W., Ryu, J. Y., Kim, J. O., Kwon, E. J. & Kim do, H. The miR-19a/b family positively regulates cardiomyocyte hypertrophy by targeting atrogin-1 and MuRF-1. *Biochem J* **457**, 151-162, doi:10.1042/BJ20130833 (2014).
- 96 Kaese, S. & Verheule, S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol* **3**, 345, doi:10.3389/fphys.2012.00345 (2012).
- 97 Salama, G. & London, B. Mouse models of long QT syndrome. *J Physiol* **578**, 43-53, doi:10.1113/jphysiol.2006.118745 (2007).
- 98 Hassel, D. *et al.* Nexilin mutations destabilize cardiac Z-disks and lead to dilated cardiomyopathy. *Nat Med* **15**, 1281-1288, doi:10.1038/nm.2037 (2009).
- 99 Beis, D. & Stainier, D. Y. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol* **16**, 105-112, doi:10.1016/j.tcb.2005.12.001 (2006).
- 100 Williams, R. Thanks be to zebrafish. *Circ Res* **107**, 570-572, doi:10.1161/RES.0b013e3181f6c515 (2010).
- 101 Bakkars, J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res* **91**, 279-288, doi:10.1093/cvr/cvr098 (2011).
- 102 Baker, K., Warren, K. S., Yellen, G. & Fishman, M. C. Defective "pacemaker" current (I_h) in a zebrafish mutant with a slow heart rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4554-4559 (1997).
- 103 Arrenberg, A. B., Stainier, D. Y., Baier, H. & Huisken, J. Optogenetic control of cardiac function. *Science* **330**, 971-974, doi:10.1126/science.1195929 (2010).
- 104 Tessadori, F. *et al.* Identification and functional characterization of cardiac pacemaker cells in zebrafish. *PLoS One* **7**, e47644, doi:10.1371/journal.pone.0047644 (2012).
- 105 Panakova, D., Werdich, A. A. & Macrae, C. A. Wnt11 patterns a myocardial electrical gradient through regulation of the L-type Ca(2+) channel. *Nature* **466**, 874-878, doi:10.1038/nature09249 (2010).
- 106 Milan, D. J., Jones, I. L., Ellinor, P. T. & MacRae, C. A. In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H269-273, doi:10.1152/ajpheart.00960.2005 (2006).
- 107 Leong, I. U., Skinner, J. R., Shelling, A. N. & Love, D. R. Zebrafish as a model for long QT syndrome: the evidence and the means of manipulating zebrafish gene expression. *Acta Physiol (Oxf)* **199**, 257-276, doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02111.x (2010).
- 108 Nemtsas, P., Wettwer, E., Christ, T., Weidinger, G. & Ravens, U. Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 161-171, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.034 (2010).
- 109 MacRae, C. A. & Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 721-731, doi:10.1038/nrd4627 (2015).
- 110 Chopra, S. S. *et al.* Voltage-gated sodium channels are required for heart development in zebrafish. *Circ Res* **106**, 1342-1350, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.213132 (2010).

- 111 Novak, A. E. *et al.* Gene duplications and evolution of vertebrate voltage-gated sodium channels. *J Mol Evol* **63**, 208-221, doi:10.1007/s00239-005-0287-9 (2006).
- 112 Warren, K. S., Baker, K. & Fishman, M. C. The slow mo mutation reduces pacemaker current and heart rate in adult zebrafish. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1711-1719 (2001).
- 113 Brette, F. *et al.* Characterization of isolated ventricular myocytes from adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 143-146, doi:10.1016/j.bbrc.2008.06.109 (2008).
- 114 Zhang, P. C., Llach, A., Sheng, X. Y., Hove-Madsen, L. & Tibbits, G. F. Calcium handling in zebrafish ventricular myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R56-66, doi:10.1152/ajpregu.00377.2010 (2011).
- 115 Tsai, C. T. *et al.* In-vitro recording of adult zebrafish heart electrocardiogram - a platform for pharmacological testing. *Clin Chim Acta* **412**, 1963-1967, doi:10.1016/j.cca.2011.07.002 (2011).
- 116 Jost, N. *et al.* Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation* **112**, 1392-1399, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.550111 (2005).
- 117 Jou, C. J., Spitzer, K. W. & Tristani-Firouzi, M. Blebbistatin effectively uncouples the excitation-contraction process in zebrafish embryonic heart. *Cell Physiol Biochem* **25**, 419-424, doi:10.1159/000303046 (2010).
- 118 Langheinrich, U., Vacun, G. & Wagner, T. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. *Toxicol Appl Pharmacol* **193**, 370-382 (2003).
- 119 Arnaout, R. *et al.* Zebrafish model for human long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11316-11321, doi:10.1073/pnas.0702724104 (2007).
- 120 Hassel, D. *et al.* Deficient zebrafish ether-a-go-go-related gene channel gating causes short-QT syndrome in zebrafish reggae mutants. *Circulation* **117**, 866-875, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.752220 (2008).
- 121 Summerton, J. & Weller, D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**, 187-195 (1997).
- 122 Ekker, S. C. & Larson, J. D. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* **30**, 89-93 (2001).
- 123 Pickart, M. A. *et al.* Genome-wide reverse genetics framework to identify novel functions of the vertebrate secretome. *PLoS One* **1**, e104, doi:10.1371/journal.pone.0000104 (2006).
- 124 Robu, M. E. *et al.* p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* **3**, e78, doi:10.1371/journal.pgen.0030078 (2007).
- 125 Amoyel, M., Cheng, Y. C., Jiang, Y. J. & Wilkinson, D. G. Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development* **132**, 775-785, doi:10.1242/dev.01616 (2005).
- 126 Gerety, S. S. & Wilkinson, D. G. Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev Biol* **350**, 279-289, doi:10.1016/j.ydbio.2010.11.030 (2011).

- 127 Rossi, A. *et al.* Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* **524**, 230-233, doi:10.1038/nature14580 (2015).
- 128 Westerfield, M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. Vol. 4th Edition (2000).
- 129 Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M. & Valen, E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res* **42**, W401-407, doi:10.1093/nar/gku410 (2014).
- 130 Postlethwait, J. H. *et al.* Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet* **18**, 345-349, doi:10.1038/ng0498-345 (1998).
- 131 Braasch, D. A. & Corey, D. R. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* **8**, 1-7 (2001).
- 132 Sedletcaia, A. & Evans, T. Heart chamber size in zebrafish is regulated redundantly by duplicated *tbx2* genes. *Dev Dyn* **240**, 1548-1557, doi:10.1002/dvdy.22622 (2011).
- 133 Ribeiro, I. *et al.* *Tbx2* and *Tbx3* regulate the dynamics of cell proliferation during heart remodeling. *PLoS One* **2**, e398, doi:10.1371/journal.pone.0000398 (2007).
- 134 Habets, P. E. *et al.* Cooperative action of *Tbx2* and *Nkx2.5* inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev* **16**, 1234-1246, doi:10.1101/gad.222902 (2002).
- 135 Yin, R., Bao, W., Xing, Y., Xi, T. & Gou, S. MiR-19b-1 inhibits angiogenesis by blocking cell cycle progression of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 771-776, doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.032 (2012).
- 136 Landskroner-Eiger, S. *et al.* Endothelial miR-17 approximately 92 cluster negatively regulates arteriogenesis via miRNA-19 repression of WNT signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 12812-12817, doi:10.1073/pnas.1507094112 (2015).
- 137 Liu, J. *et al.* Dynamic evolution and biogenesis of small RNAs during sex reversal. *Sci Rep* **5**, 9999, doi:10.1038/srep09999 (2015).
- 138 Lund, G., Lauria, M., Guldberg, P. & Zaina, S. Duplication-dependent CG suppression of the seed storage protein genes of maize. *Genetics* **165**, 835-848 (2003).
- 139 Walsh, J. B. How often do duplicated genes evolve new functions? *Genetics* **139**, 421-428 (1995).
- 140 Rodin, S. N. & Riggs, A. D. Epigenetic silencing may aid evolution by gene duplication. *J Mol Evol* **56**, 718-729, doi:10.1007/s00239-002-2446-6 (2003).
- 141 Kim, J. J. *et al.* Bradycardia alters Ca(2+) dynamics enhancing dispersion of repolarization and arrhythmia risk. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**, H848-860, doi:10.1152/ajpheart.00787.2012 (2013).
- 142 Day, C. P., McComb, J. M. & Campbell, R. W. QT dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. *Br Heart J* **63**, 342-344 (1990).
- 143 Tomaselli, G. F. *et al.* Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization. *Circulation* **90**, 2534-2539 (1994).
- 144 Chiang, C. E. Congenital and acquired long QT syndrome. Current concepts and management. *Cardiol Rev* **12**, 222-234 (2004).

- 145 Schwartz, P. J. Management of long QT syndrome. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **2**, 346-351, doi:10.1038/ncpcardio0239 (2005).
- 146 Schwartz, P. J. *et al.* Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* **103**, 89-95 (2001).
- 147 Jung, W. *et al.* [Guidelines for the implantation of defibrillators]. *Clin Res Cardiol* **95**, 696-708, doi:10.1007/s00392-006-0475-7 (2006).
- 148 Lu, Y. *et al.* MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation* **122**, 2378-2387, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958967 (2010).
- 149 van Rooij, E. *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18255-18260, doi:10.1073/pnas.0608791103 (2006).
- 150 Chen, J. *et al.* mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res* **112**, 1557-1566, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300658 (2013).
- 151 Brundel, B. J. *et al.* Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K⁺ channels. *J Am Coll Cardiol* **37**, 926-932 (2001).
- 152 Gaborit, N. *et al.* Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* **112**, 471-481, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.506857 (2005).
- 153 Grammer, J. B., Bosch, R. F., Kuhlkamp, V. & Seipel, L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* **11**, 626-633 (2000).
- 154 Barhanin, J. *et al.* K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**, 78-80, doi:10.1038/384078a0 (1996).
- 155 Neyroud, N. *et al.* A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* **15**, 186-189, doi:10.1038/ng0297-186 (1997).
- 156 Sanguinetti, M. C. *et al.* Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80-83, doi:10.1038/384080a0 (1996).
- 157 Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* **96**, 195-215 (1990).
- 158 Schroeder, B. C. *et al.* A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196-199, doi:10.1038/35003200 (2000).
- 159 Tinel, N., Diocot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M. & Barhanin, J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J* **19**, 6326-6330, doi:10.1093/emboj/19.23.6326 (2000).
- 160 Li, X. *et al.* Bisoprolol reverses down-regulation of potassium channel proteins in ventricular tissues of rabbits with heart failure. *J Biomed Res* **25**, 274-279, doi:10.1016/S1674-8301(11)60037-7 (2011).

- 161 Watanabe, E. *et al.* Upregulation of KCNE1 induces QT interval prolongation in patients with chronic heart failure. *Circ J* **71**, 471-478 (2007).
- 162 Mansen, A. *et al.* Thyroid hormone receptor alpha can control action potential duration in mouse ventricular myocytes through the KCNE1 ion channel subunit. *Acta Physiol (Oxf)* **198**, 133-142, doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02052.x (2010).
- 163 Grunnet, M. *et al.* KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J Physiol* **542**, 119-130 (2002).
- 164 Maltsev, V. A. & Undrovinas, A. I. A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **69**, 116-127, doi:10.1016/j.cardiores.2005.08.015 (2006).
- 165 Chiang, K. C., Lai, L. P. & Shieh, R. C. Characterization of a novel Nav1.5 channel mutation, A551T, associated with Brugada syndrome. *J Biomed Sci* **16**, 76, doi:10.1186/1423-0127-16-76 (2009).
- 166 Liu, M., Yang, K. C. & Dudley, S. C., Jr. Cardiac sodium channel mutations: why so many phenotypes? *Nat Rev Cardiol* **11**, 607-615, doi:10.1038/nrcardio.2014.85 (2014).
- 167 Dixon, J. E. *et al.* Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* **79**, 659-668 (1996).
- 168 Kassiri, Z., Hajjar, R. & Backx, P. H. Molecular components of transient outward potassium current in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Med (Berl)* **80**, 351-358, doi:10.1007/s00109-002-0325-7 (2002).
- 169 Ji, Q. *et al.* Expression changes of ionic channels in early phase of cultured rat atrial myocytes induced by rapid pacing. *J Cardiothorac Surg* **8**, 194, doi:10.1186/1749-8090-8-194 (2013).
- 170 Kaab, S. *et al.* Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* **98**, 1383-1393 (1998).
- 171 Rossow, C. F., Minami, E., Chase, E. G., Murry, C. E. & Santana, L. F. NFATc3-induced reductions in voltage-gated K⁺ currents after myocardial infarction. *Circ Res* **94**, 1340-1350, doi:10.1161/01.RES.0000128406.08418.34 (2004).
- 172 Huo, R., Sheng, Y., Guo, W. T. & Dong, D. L. The potential role of Kv4.3 K⁺ channel in heart hypertrophy. *Channels (Austin)* **8**, 203-209 (2014).
- 173 Ehrenreich, I. M. & Purugganan, M. D. Sequence variation of MicroRNAs and their binding sites in Arabidopsis. *Plant Physiol* **146**, 1974-1982, doi:10.1104/pp.108.116582 (2008).
- 174 Lu, J. *et al.* Adaptive evolution of newly emerged micro-RNA genes in Drosophila. *Mol Biol Evol* **25**, 929-938, doi:10.1093/molbev/msn040 (2008).
- 175 Nozawa, M., Miura, S. & Nei, M. Origins and evolution of microRNA genes in Drosophila species. *Genome Biol Evol* **2**, 180-189, doi:10.1093/gbe/evq009 (2010).

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während der letzten Jahre unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zu allererst bedanke ich mich bei David Hassel für das faszinierende Thema und die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Danke für die wissenschaftliche Betreuung, die Geduld und den grenzenlosen Optimismus. Gleichzeitig möchte ich mich bei Prof. Dr. Boutros für die Bereitschaft bedanken, die Arbeit zu begutachten. Danke auch an meine Prüfer, Prof. Dr. Wieland und Dr Mirko Völkers.

Ein besonders großer Dank steht dem Team zu, mit dem ich in den letzten Jahren zusammenarbeiten durfte. Danke für die gute Laune und den Humor von Lonny und Mandy, die abendlichen Stunden im Labor mit Hannes und die wissenschaftlichen und nicht so wissenschaftlichen Diskussionen mit Thomas. Danke an meine Benachbarn Domi und Jana, die mich immer wieder mit einem Kaffee aufheitern konnten. Danke auch an Fangyi, für seine CRISPR-Expertise und für die Gewissheit am Wochenende niemals alleine im Labor sein zu müssen. Außerdem möchte ich mich auch bei allen anderen Kollegen bedanken: Jonas, Selina, Sebastian, Benjamin, Clarissa und Simon. Es war eine schöne Zeit mit euch. Ihr habt mir die Arbeit im Labor zu einer großen Freude gemacht.

Außerdem bedanke ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie, die mich schon mein ganzes Leben lang grenzenlos unterstützt. Danke an alle Benzens und die Hehlgänse. Ihr seid die Besten! Aber ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Mutter, ohne die ich heute nicht hier stehen würde.

Mein größter Dank geht an meine Frau, Lisa. Du hast mich immer wieder aufgebaut und an mich geglaubt. Du hast dich mit mir über neue Ergebnisse gefreut und über fehlgeschlagene Experimente geärgert, als wären es deine eigenen. Du hast mich unterstützt und mir die Kraft gegeben, in schwierigen Phasen nicht den Mut zu verlieren. Ich danke dir!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die Arbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Quellen angefertigt und in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Declaration

I herewith declare, that I did this work without assistance from any third party and without using other sources than the cited ones. I certify that this work has not been submitted in the same or similar form to any other examination office and has not been accepted as an examination part. All direct and indirect references are indicated and have been cited accordingly.

Heidelberg, April 2016

Alexander Benz