

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Untersuchungen zur Funktion der *microRNA-30*-Familie bei
Herzinfarkt und Herzinsuffizienz**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ann-Christin Pecher

aus

Regensburg

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Kupatt
Prof. Dr. Christian Weber

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. Dr. Robert Frost

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1. 1. Herzinsuffizienz	1
1. 1. 1. Definition und Klinik der chronischen Herzinsuffizienz	1
1. 1. 2. Ätiologie und Epidemiologie chronischer Herzinsuffizienz	3
1. 1. 3. Diagnose der chronischen Herzinsuffizienz	4
1. 1. 4. Neurohumorale Kompensationsmechanismen	5
1. 2. Kardiales <i>remodeling</i>	6
1. 3. Therapeutische Strategien bei Herzinsuffizienz	7
1. 4. Definition, Geschichte und Entstehung von <i>microRNAs</i>	9
1. 5. Bedeutung von <i>microRNAs</i> im Herzen	12
1. 5. 1. Kardiale Hypertrophie und <i>remodeling</i>	12
1. 5. 2. Kardiomyozyten-Apoptose	13
1. 6. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Alphabetische Liste der Materialien	15
3. Methoden	19
3. 1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	19
3. 1. 1. Phusion® DNA-Polymerase	19
3. 1. 2. Gene Choice® Taq-Polymerase	20
3. 1. 3. GoTaq DNA-Polymerase	20
3. 1. 4. Quantitative PCR (qPCR)	21
3. 1. 4. 1. TaqMan® Gene Assay	21
3. 1. 4. 2. SYBR® Green PCR	21
3. 2. Agarosegele	22
3. 3. Trägergelelektrophorese	22
3. 4. Klonierung mit dem TOPO® TA Cloning® Kit	22
3. 5. DNA-Aufbereitung	23
3. 5. 1. Minipräparation	23
3. 5. 2. Maxipräparation	23
3. 5. 3. Gelextraktion von DNA aus Agarosegel	24

3. 6. Bestimmung von DNA- oder RNA-Konzentrationen	24
3. 7. Restriktionsverdau	25
3. 8. Dephosphorylierung mit antarktischer Phosphatase	25
3. 9. Ligation	26
3. 10. Transformation	26
3. 11. RNA-Isolation mit TRIzol®-Reagent	27
3. 12. <i>Copy DNA</i> -Synthese	28
3. 12. 1. <i>Micro RNA</i> : TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription	28
3. 12. 2. <i>Messenger RNA</i>	28
3. 13. <i>Northern Blotting</i> für <i>microRNAs</i>	29
3. 14. Transfektion mit Lipofectamine™ 2000K	30
3. 15. Luciferase-Assays	31
3. 16. Statistische Auswertung	32
3. 17. Versuchstiere	32
3. 17. 1. Mäuse	32
3. 17. 2. Kardiomyozyten von neonatalen Ratten	33
3. 18. Humane Gewebeproben	34
4. Ergebnisse	35
4. 1. Die miR-30-Familie	35
4. 1. 1. Einteilung	35
4. 1. 2. Lokalisation	36
4. 1. 3. Expression	37
4. 1. 4. Detektion	38
4. 2. Regulation von miR-30 bei kardialen Umbauvorgängen	41
4. 3. Überexpression der miR-30-Familie	44
4. 3. 1. Überexpression von miR-30 in Kardiomyozyten	44
4. 3. 2. Überexpression von miR-30 in transgenen Mäusen	45
4. 4. Identifizierung möglicher Zielstrukturen	52
4. 4. 1. Eingrenzung der Zielstrukturen	52
4. 4. 2. Luciferase-Assays	53
4. 4. 3. Möglichkeiten der Hemmung von <i>microRNAs</i>	57
4. 4. 6. <i>Knockdown</i> der miR-30-Familie mit Hilfe von antimiR-30	58

4. 5. Bedeutung der miR-30-Familie in der Entwicklung	62
5. Diskussion	65
5. 1. Zusammenfassung der Ergebnisse	65
5. 2. Beurteilung und Limitationen der Ergebnisse	66
5. 3. Mögliche kardioprotektive Signalwege über miR-30-Suppression	68
5. 3. 1. Die miR-30-Familie und RGS2	69
5. 3. 2. Die miR-30-Familie und EDNRA	69
5. 3. 3. Die miR-30-Familie und ADRA2A	70
5. 3. 4. Die miR-30-Familie und DDAH1	71
5. 3. Ausblick: AntimiR als mögliche Therapiestrategie?	72
6. Zusammenfassung	74
7. Summary	75
8. Literaturverzeichnis	76
9. Abkürzungsverzeichnis	83

1. Einleitung

1. 1. Herzinsuffizienz

1. 1. 1. Definition und Klinik der chronischen Herzinsuffizienz

Die chronische Herzinsuffizienz beschreibt ein komplexes klinisches Syndrom, welches von verschiedenen strukturellen oder funktionellen kardialen Störungen hervorgerufen werden kann, die entweder die Ventrikelfüllung oder die Austreibungsphase beeinträchtigen (Hunt SA, 2005). Allerdings kann man nicht von einem einzelnen Krankheitsbild sprechen, da gerade zu Beginn sehr wenige bis keine Symptome vorhanden sein können, welche zudem häufig auch nicht spezifisch für Herzinsuffizienz und abhängig vom hauptsächlich betroffenem Ventrikel sind.

Dass eine einheitliche Definition schwierig ist, zeigt sich auch daran, dass in epidemiologischen Studien viele verschiedene Kriterien zum Einsatz kommen (Bui AL et al., 2011). Während bei den Framingham Kriterien (*Framingham Heart Study*) eine bestimmte Anzahl diverser Kriterien (Tabelle 1) erfüllt sein müssen (McKee PA et al., 1971), wird die Unterteilung des *American College of Cardiology* (ACC) und der *American Heart Association* (AHA) auch den Patienten gerecht (Hunt SA, 2005), die noch nicht symptomatisch sind und keine strukturellen Herzveränderungen aufweisen (Tabelle 2). Das ist insofern wichtig, da auch diese Patientengruppe stärker gefährdet ist in eine Phase akuter kardialer Dekompensation zu gelangen (Allen LA et al., 2007) und demnach rechtzeitig identifiziert werden muss.

Hauptkriterien mindestens eins	Halsvenenstauung, nächtliche Dyspnoeattacken, akutes Lungenödem, Rasselgeräusche, Kardiomegalie, 3. Herzton, erhöhter Venendruck
Nebenkriterien mindestens zwei	Beinödeme, nächtlicher Husten, Belastungsdyspnoe, Hepatomegalie, Pleuraerguss, Reduktion der Vitalkapazität um ein Drittel, Tachykardie ≥ 120 /Minute

Tabelle 1: Kriterien für Herzinsuffizienz. *Framingham Heart Study* (McKee PA et al., 1971)

Stadium A	Hochrisikopatient ohne strukturelle Herzerkrankung und ohne Symptome einer Herzinsuffizienz. (Atherosklerose, arterielle Hypertonie, Diabetes u. a.)
Stadium B	Patienten mit struktureller Herzerkrankung, die stark mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert sind, aber ohne Symptome einer Herzinsuffizienz (Zustand nach Myokardinfarkt, <i>remodeling</i> des linken Ventrikels u. a.)
Stadium C	Stadium B mit Symptomen einer Herzinsuffizienz (Leistungsminderung und Dyspnoe)
Stadium D	Patienten mit refraktärer Herzinsuffizienz, die spezieller Interventionen bedürfen

Tabelle 2: Stadien der Herzinsuffizienz. Einteilung nach ACC und AHA (Hunt SA et al., 2005).

Die klassischen Symptome, die bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz auftreten, liegen demnach erst in Stadium C und D vor. Eines dieser klassischen Symptome ist die vom Patienten wahr genommene zunehmende Leistungsminderung oder Schwäche, die hauptsächlich durch Dyspnoe und / oder peripheren Sauerstoffmangel aufgrund verminderten Herzminutenvolumens verursacht wird. Das zweite typische Symptom ist die Flüssigkeitsretention, bedingt durch einen Austritt von Plasmaflüssigkeit in das Interstitium bei kardial bedingtem Rückstau des Blutvolumens. Diese macht sich meist durch Ödeme an den Beinen bemerkbar, kann aber auch klinisch als Aszites oder in fortgeschrittenen Stadium als Lungenödem mit schweren Hustenanfällen im Sinne eines Asthma cardiale imponieren (Hunt SA et al., 2009). Anhand der Belastungsfähigkeit des Patienten und seinen subjektiven Beschwerden klassifiziert man das klinische Erscheinungsbild auch in vier NYHA-Stadien⁶ der *New York Heart Association* (Tabelle 3). Diese Einteilung nach NYHA ist auch für den behandelnden Arzt bei der Therapieentscheidung von Bedeutung.

NYHA 1	Asymptomatisch
NYHA 2	Leichte Einschränkung, Symptome bei stärkerer Belastung
NYHA 3	Starke Einschränkung, Symptome bei leichter Belastung
NYHA 4	Symptome bereits in Ruhe

Tabelle 3: Stadien der Herzinsuffizienz. Einteilung nach NYHA⁶.

1. 1. 2. Ätiologie und Epidemiologie chronischer Herzinsuffizienz

Vereinfacht gesagt, kann fast jede kardiale Erkrankung zu Herzinsuffizienz führen. Die Hauptursachen in den Industriestaaten bleiben dennoch Koronare Herzerkrankung (KHK), arterielle Hypertonie und Dilatative Kardiomyopathie. Somit sind hauptsächlich ältere Menschen betroffen und die Prävalenz steigt altersabhängig von etwa 1% bei 55- bis 64-Jährigen auf etwa 13% bei 85- bis 94-Jährigen (Redfield MM, 2003 et al. ; Mosterd A et al., 2009).

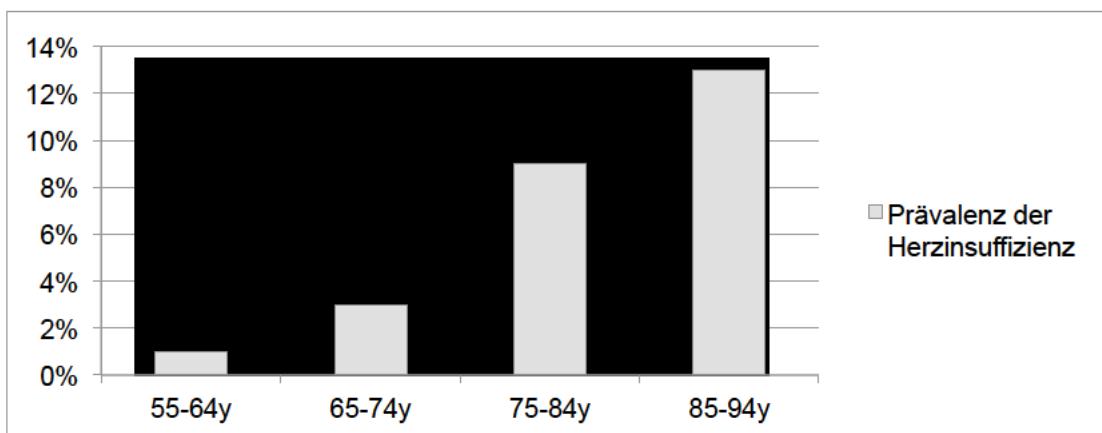


Abbildung 1: Prävalenz der Herzinsuffizienz. Altersabhängige (in Jahren = y) Prävalenz der Herzinsuffizienz in der Allgemeinbevölkerung (The Rotterdam Study, 1999⁸).

Im Jahr 2009 waren in Deutschland insgesamt etwa 1,6 Millionen Menschen und etwa 141.000 der über 79-Jährigen von Herzinsuffizienz betroffen. Im Jahr 2050 rechnet man aufgrund des demographischen Wandels und sinkender Letalität ischämischer kardialer Ereignisse bereits mit 350.000 Betroffenen in dieser Altersgruppe (Neumann T et al., 2009). Bei einer durchschnittlichen Fünf-Jahres-Mortalität um die 45 bis 60% (Levy D et al., 2002), vergleichbar mit vielen malignen Krebserkrankungen, verwundert es nicht, dass seit 1998 die Herzinsuffizienz die dritthäufigste Todesursache in Deutschland darstellt, nach KHK und Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt, 2012). Außerdem ist Herzinsuffizienz derzeit die häufigste Hauptdiagnose für stationäre Krankenhauseinweisungen in Deutschland und verursacht etwa 1,1% der direkten Krankheitskosten in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2010). Im Jahr 2006 entsprach das 2,9 Milliarden Euro (Neumann T et al., 2009). Damit

stellt die Herzinsuffizienz nicht nur eine medizinische, sondern auch eine große wirtschaftliche Herausforderung dar.

1. 1. 3. Diagnose der chronischen Herzinsuffizienz

Patienten bei denen der Verdacht auf eine Herzinsuffizienz besteht, sollten zunächst mit Hilfe einer Echokardiographie hinsichtlich ihrer Herzanatomie und Herzfunktion evaluiert und voneinander unterschieden werden (Hunt SA et al., 2009). Anhand der Ejektionsfraktion (EF) des linken Ventrikels werden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: Ist sie reduziert spricht man von Herzinsuffizienz mit reduzierter EF (*Heart failure with reduced ejection fraction*, HFrEF) oder systolischer Herzinsuffizienz; ist die EF weitgehend normal oder nur gering eingeschränkt, hingegen von Herzinsuffizienz mit erhaltener EF (*Heart failure with preserved ejection fraction* HFpEF), welche wohl zum Großteil mit diastolischer Herzinsuffizienz gleichzusetzen ist (Zile MR et al., 2003). Außerdem werden die Patienten auf Strukturveränderungen des linken Ventrikels (LV), wie Wandbewegungsstörungen, Hypertrophie und Dilatation sowie Anomalien an Klappen, Perikard und rechten Ventrikel hin untersucht, welche das klinische Erscheinungsbild erklären könnten.

Wie erwähnt ist ein Großteil der Herzinsuffizienz durch Myokardischämien im Rahmen einer KHK verursacht. Die Myokardszintigraphie stellt dabei eine gute Methode dar, um Perfusionssstörungen des Myokards zu visualisieren.

Hilfreich ist auch ein Elektrokardiogramm, um Anzeichen für Erregungsbildungs- und Leitungsstörungen, alte oder frische Ischämie-/Infarktzeichen bzw. ventrikuläre Hypertrophie zu gewinnen. Eine Röntgenaufnahme des Thorax kann ebenfalls Hinweise auf kardiale Hypertrophie und zusätzlich auf Beteiligung der Lunge im Sinne pulmonaler Stauung erbringen. Elektrokardiogramm und Röntgen sollten zu Beginn der Evaluation eines Patienten erfolgen, spielen aufgrund ihrer niedrigen Sensitivität und Spezifität jedoch für die Ursachenfindung einer Herzinsuffizienz in den Leitlinien der AHA eine sekundäre Rolle (Hunt SA et al., 2009).

Andere technische Untersuchungen erfolgen bei bestimmten Indikationen, wie die Magnetresonanztomographie, um Narben bzw. interstitielle Fibrosierung des Myokards darzustellen oder die Positronen-Emissions-Tomographie um eine Differenzierung zwischen Narbengewebe und *Hibernating myocardium* zu ermöglichen.

Diverse laborchemische Parameter können wichtige Hinweise auf sekundäre Ursachen einer Herzinsuffizienz geben. So können sowohl eine Hyper-, als auch Hypothyreose, Veränderungen im Eisenstoffwechsel (Anämie, Hämochromatose) oder zahlreiche Infektionen eine Herzinsuffizienz verursachen, beziehungsweise verschlechtern.

Für Diagnose, Prognose und Verlauf relevant sind das natriuretische Peptid (*brain natriuretic peptide*, BNP) und sein Vorläufer, das N-terminale proBNP (NT-proBNP), welche im Herzen synthetisiert und in die Blutbahn abgegeben werden. Eine erhöhte BNP-Plasmakonzentration kann allerdings verschiedene Ursachen haben und hängt außerdem von anderen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht und Nierenfunktion ab (Bayes-Genis A et al., 2004). Dennoch sprechen erhöhte BNP-Plasmakonzentrationen für erhöhte intrakardiale Drücke (Dao Q et al., 2001) und helfen so z. B. in Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild bei der Differentialdiagnose einer Dyspnoe aufgrund von Herzinsuffizienz gegenüber anderen Ursachen einer Dyspnoe (AHA, 2005; Davis M et al., 1994). Darüberhinaus korreliert die BNP-Plasmakonzentration direkt mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz (Dao Q et al., 2001) und invers mit der EF (Silvers SM et al., 2007).

1. 1. 4. Neurohumorale Kompensationsmechanismen

Die Herzinsuffizienz führt zu einem verminderten Herzminutenvolumen und damit auch zu einer unzureichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Peripherie. Das wiederum führt zur Aktivierung diverser neurohumoraler Kompensationsmechanismen. Diese umfassen: Erstens die Aktivierung des sympathiko-adrenalen Systems mit erhöhter Katecholaminausschüttung,

welche das Herzminutenvolumen über die positiv inotrope und chronotrope Wirkung steigert. Zweitens eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), welches zu einer Zunahme des zirkulierenden Blutvolumens führt. Drittens zur Ausschüttung von Vasopressin aus dem Hypothalamus, das ebenfalls zur WasserRetention und damit Anhebung des intravasalen Volumens führt.

Langfristig sind es jedoch gerade diese Kompensationsmechanismen, die maßgeblich zur Progression der Herzinsuffizienz beitragen: So resultiert die erhöhte Ausschüttung von Katecholaminen über verstärkte Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren letztendlich zu einer kardialen Herunterregulation dieser Rezeptoren. In der Folge wirken Katecholamine immer weniger positiv inotrop am Herzen und erhöhen durch ihre vasokonstriktorische Wirkung sogar das *Afterload* und damit die Belastung des linken Ventrikels (LV). Außerdem vermutet man, dass der durch Katecholamine am Herzen erzeugte Stress (unter anderem durch erhöhte Herzfrequenz) maßgeblich zum pathologischen *remodeling* (siehe Kapitel 1. 2.) beiträgt. Auch die Aktivierung von RAAS und Vasopressin, welche durch Retention von Natrium und Wasser zunächst das intravasale Blutvolumen und damit das Herzminutenvolumen steigert, erhöht gleichzeitig der *afterload* und führt letztendlich zu einer Aggravierung der Herzinsuffizienz.

1. 2. Kardiales *remodeling*

Ein weiterer prognostisch ungünstiger Faktor ist das *remodeling*, welches zumeist unvorteilhafte, progradient fortschreitende pathologische Umbau- und Anpassungsvorgänge des Herzens umschreibt. Diese betreffen sowohl die Kardiomyozyten (CM), als auch die extrazelluläre Matrix (EZM) und kardiale Fibroblasten (CF) und können letztendlich zu kardialer Hypertrophie, CM-Apoptose, Reorganisation der Sarkomere und interstitieller Fibrose führen (Frey N et al., 2004). Zunächst beschrieb *remodeling* die Veränderungen am Herzen, die nach ischämischen Ereignissen auftraten. Allerdings treten

ähnliche Mechanismen auch bei dilatativer Kardiomyopathie und chronischer Myokarditis auf (Carnegie GK et al., 2011).

Auch unter physiologischer Belastung, unter anderem durch Ausdauer- oder Krafttraining, kann es zu kardialem *remodeling* und Hypertrophie kommen, wie man es z. B. bei Athleten findet (Weiner RB et al., 2012). Dieses unterscheidet sich jedoch von dem pathologischen *remodeling* morphologisch, insofern typischerweise nur eine mäßige Zunahme der Wanddicke vorliegt und sich keine Fibrose nachweisen lässt (Medugorac J et al., 1980). Außerdem finden sich auch auf molekularer Ebene signifikante Unterschiede (Frey N et al., 2003): BNP und Endothelin-1 (ET-1) sind z. B. oft beim pathologischen, nicht aber beim physiologischen *remodeling* erhöht. Auch die Regulation der α - und β -Isoformen der schweren Myosinkette (α MHC bzw. β MHC) erfolgt in gegensätzliche Richtung (Kinugawa K et al., 2001): Beim pathologischen *remodeling* findet man eine Reinduktion des fetalnen Programms, das heißt die Expression von α MHC ist vermindert und die von β MHC erhöht.

Andere Signalwege, wie z. B. über Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase und Calcineurin, sind hingegen in beiden Fällen am *remodeling* und kardialer Hypertrophie beteiligt (Olson EN et al., 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Calcineurin-Aktivierung durch bestimmte Signalwege verstärkt wird, die ausschließlich im Rahmen pathologischer kardialer Hypertrophie auftreten (Frost RJ et al., 2010).

1. 3. Therapeutische Strategien bei chronischer Herzinsuffizienz

Während all diese Kompensationsmechanismen und Veränderungen initial dem Organismus helfen ein gewisses Herzminutenvolumen aufrecht zu halten, führen sie auf Dauer zu einer Progression und letztendlich häufig zu einer akuten Dekompensation der Herzinsuffizienz. Um dem entgegen zu steuern, werden zur Therapie unter anderem diverse Medikamente eingesetzt, die diese Kompensationsmechanismen und Umbauvorgänge hemmen (Tabelle 4). So senken Inhibitoren des *Angiotensin converting enzyme* (ACEI) die

Konzentration von Angiotensin II, ein Wachstumsfaktor für Myozyten und Fibroblasten, welcher über die Expression von Protoonkogenen und Synthese extrazellulärer Matrixproteine zum *remodeling* beiträgt (Karow T et al., 2010). ACEI, Mineralkortikoidrezeptorblocker und Beta-Blocker konnten in großen Studien auch die Mortalität bei Herzinsuffizienz senken (Karow T et al., 2010; Heart Failure Society Of America, 2006; McAlister FA et al., 2009; V-HeFT, 1993; Pfeffer MA et al., 2003; Pitt B et al., 1999, Gajarsa JJ et al., 2011). Daneben gibt es zahlreiche andere Strategien (Tabelle 4), die zum Teil rein symptomatisch (z. B. Steigerung der EF) wirken. Die Wahl des Therapeutikums wird nach dem Stufenschema der NYHA getroffen und bezieht auch Komorbiditäten mit ein.

Medikament/ Methode	Direkter Effekt	Langzeit-Effekt ²⁷⁻³³
ACEI, Angiotensin II- Rezeptor-Blocker	Vor- und Nachlast↓ <i>remodeling</i> ↓	Mortalität↓, Morbidität↓
Aldosteroninhibitoren	Vor- und Nachlast↓	Mortalität↓, Morbidität↓
Beta-Blocker	Herzfrequenz↓ <i>remodeling</i> ↓	Mortalität↓, Morbidität↓
Herzglykoside	Kontraktilität↑, Herzfrequenz↓	Morbidität↓
Nitrate	Vor- und Nachlast↓	Morbidität↓
Diuretika	Vor- und Nachlast↓	Morbidität↓

Tabelle 4: Übersicht therapeutischer Ansätze bei Herzinsuffizienz
nach Gajarsa JJ et al., 2011 und Karow T et al., 2010

Da wie oben erwähnt die Fünf-Jahres-Mortalität eines Patienten mit Herzinsuffizienz immer noch bei etwa 50% liegt, wird weiter intensiv an neuen therapeutischen Strategien geforscht. Interessanterweise häufen sich in den letzten Jahren Hinweise, dass eine Gruppe kleiner Ribonukleinsäuren (RNA), die *microRNAs* (miRs), maßgeblich am myokardialen *remodeling* beteiligt sind, weshalb spekuliert wird, ob sie interessante neue Zielstrukturen bei der Therapie der Herzinsuffizienz darstellen könnten.

1. 4. Definition, Geschichte und Entstehung von *microRNAs*

MicroRNAs sind einsträngige etwa 22 Nukleotide (nt) lange, nicht-Protein-kodierende RNA-Moleküle, die Genexpression hauptsächlich posttranslational durch Degradation von *messenger RNAs* (mRNAs) beeinflussen können. In der Regel binden miRs über ihre Nukleotide zwei bis acht des 5'-Endes, auch als *Seed* bezeichnet, eine Sequenz in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von Ziel-mRNAs (Bartel DP et al., 2004). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass eine Bindung auch mit Abschnitten der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) der mRNA, mit Exonen oder sogar Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Abschnitten stattfinden kann (Small EM et al., 2010). Bei Säugetieren liegt zumeist eine inkomplette Komplementarität zwischen miR und 3'-UTR der mRNA vor, was zur Hemmung der Translation und/oder Degradation der mRNA führt. Der genaue Mechanismus dieser Repression ist noch nicht ganz geklärt und hängt von der Anzahl der miR-Bindestellen im 3'-UTR, Komplementarität von miR und mRNA, Sekundärstrukturen der mRNA sowie dem Abstand zwischen miR-Bindestelle und kodierenden Teil der mRNA ab (Valencia-Sanchez MA et al., 2006). Liegt z. B. exakte Basenpaarung zwischen *Seed* und miR-Bindestelle vor, resultiert das wahrscheinlich im Abbau der mRNA durch Endonukleasen (Hutvágner G et al., 2002).

Die erste miR wurde 1993 entdeckt, als Lee et al. erkannten, dass das Gen *lin-4*, ein bekannter Regulator der Larvenentwicklung von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), nicht für ein Protein, sondern für zwei kurze RNAs kodiert (Wightman B, 1993). Die längere 61nt lange RNA hielt man für den Vorläufer der 22nt langen RNA. Im Weiteren bemerkten sie, dass diese RNAs *antisense* Komplementarität zu verschiedenen Stellen im 3'-UTR des Gens *lin-14* besitzen. Sie konnten zeigen, dass die LIN-14 Proteinexpression durch *lin-4* RNA beträchtlich reduziert wird, ohne die Anzahl an *lin-14* mRNA Molekülen zu beeinträchtigen. Diese Entdeckungen führten letztendlich zu einem Modell, in dem *lin-4* RNA im 3' UTR von *lin-14* bindet und dort spezifisch die Translation hemmt. Die verminderte Expression von LIN-14 bewirkt dann im Zusammenhang mit anderen Faktoren den Übergang vom ersten zum zweiten Larvenstadium. Erst sieben Jahre später wurde die Bedeutung von

nicht-kodierenden RNAs in anderen Organismen erkannt, als eine weitere miR, let-7, in *C. elegans* und bald auch im Genom von Fliegen und Menschen gefunden wurde. Inzwischen geht man davon aus, dass etwa 30% der menschlichen Gene von miRs reguliert werden und, dass miRs an vielen unterschiedlichen Prozessen, wie Signaltransduktion, Entwicklung, Wachstum, Zellzyklus etc. beteiligt sind (Lewis BP et al., 2005).

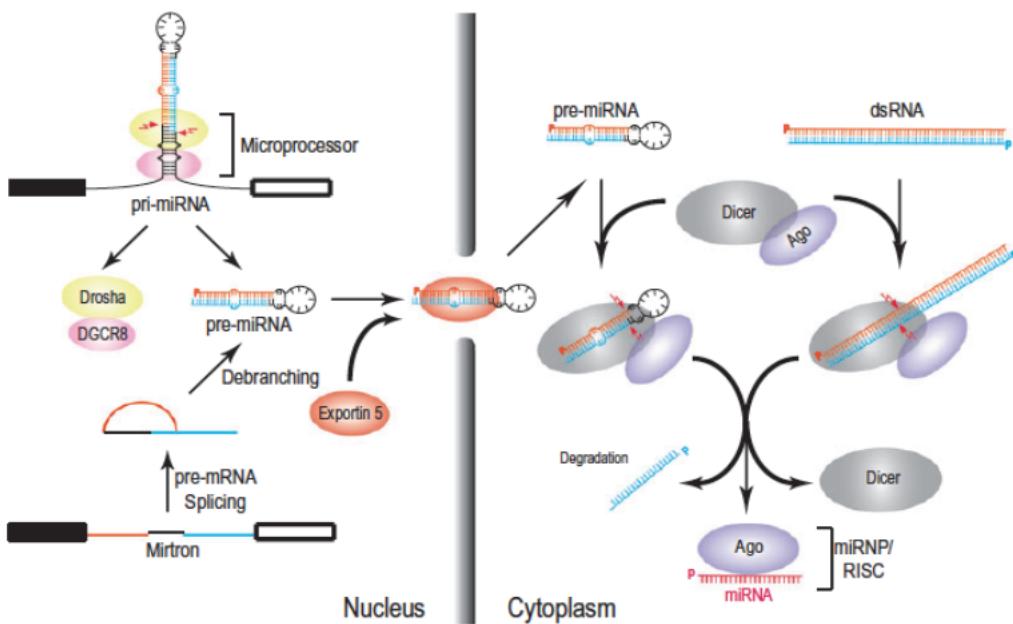


Abbildung 2: MicroRNA-Prozessierung. Die Entstehung einer miR aus dem Vorläufer pri-miR im Nukleus (Nucleus) sowie Funktion im Zytosoma (Cytoplasm), bei der die miR zum Abbau der mRNA führt. Abbildung aus Liu X et al., 2008

MicroRNAs werden im Nukleus von der RNA-Polymerase II als bis zu mehrere 1000 Nukleotide lange Primärtranskripte, den *primary* miRs (pri-miRs) abgeschrieben (Abbildung 2). Diese pri-miRs besitzen sowohl 5'-Cap als auch eine Poly-(A)-Sequenz, können mono- sowie polycistronisch sein und mehrere Sekundärstrukturen formen.

Noch im Nukleus wird die pri-miR durch den Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus dem RNAse III-Enzym Drosha und einem doppelsträngigen RNA (dsRNA) bindenden Protein, Dgcr8 (*DiGeorge critical region 8*), gespalten.

Daraus resultiert ein etwa 60nt langer Vorläufer mit Haarnadel-Struktur, die *precursor-miR* (pre-miR) (Gregory RI et al., 2004). Die pre-miR gelangt daraufhin mit Hilfe von Exportin-5, ein weiteres dsRNA bindendes Protein, welches Ran-GTP abhängig ist, ins Zytoplasma, wo sie von einem anderen RNase III-Enzym, Dicer, zu einer etwa 22nt langen, doppelsträngigen miR gespalten wird. Ein Strang davon entspricht der reifen miR. Der komplementäre Strang, als miR* bezeichnet, wird meist degradiert, kann jedoch bei einzelnen miRs auch als reife miR regulatorisch wirken (Zhang Y et al., 2009).

Die reife miR wird anschließend in den *RNA-induced-silencing-complex* (RISC) geladen und trifft dort auf die Ziel-mRNAs. Der genaue Aufbau des RISC ist noch unbekannt, jedoch enthält er als *Core-protein* ein Argonaute (Ago) Protein, auf welches die miR geladen wird. Komplexe aus Ago Proteinen, miRs und supprimierte mRNAs sind an spezifischen Stellen im Zytoplasma angereichert, die man als *P-bodies* bezeichnet. In *P-bodies* wurden auch gehäuft Enzyme für den Abbau von mRNAs gefunden, was jedoch nicht bedeutet, dass alle mRNAs, die sich darin finden, notwendigerweise degradiert werden (Pillai RS et al., 2007).

Eine miR kann verschiedene mRNAs zum Ziel haben und umgekehrt kann eine mRNA auch durch verschiedene miRs reguliert werden. Dadurch entstehen komplexe Netzwerke, die ganze Signalkaskaden sehr fein beeinflussen können. Viele miRs werden spezifisch in bestimmten Geweben oder zu bestimmten Zeitpunkten exprimiert, andere wiederum lassen sich ubiquitär finden, so dass man davon ausgehen kann, dass miRs an vielen unterschiedlichen Prozessen im Organismus beteiligt sind.

1. 5. Bedeutung von *microRNAs* im Herzen

Erst in den letzten Jahren begann man die Bedeutung von miRs im Herzen zu erforschen. Die Generierung verschiedener miR-*Knockouts* und transgener Tiere mit Überexpression diverser miRs zeigte die Bedeutung von miRs bei der kardialen Entwicklung und bei Erkrankungen des Herzens. Wie in Abbildung 3

erkennbar, können miRs Kardiomyozyten-Hypertrophie, Kardiomyozyten-Apoptose und Regeneration, Erregungsbildungs- und Leitungsstörungen sowie kardiale Fibrose beeinflussen (Small EM et al., 2010).

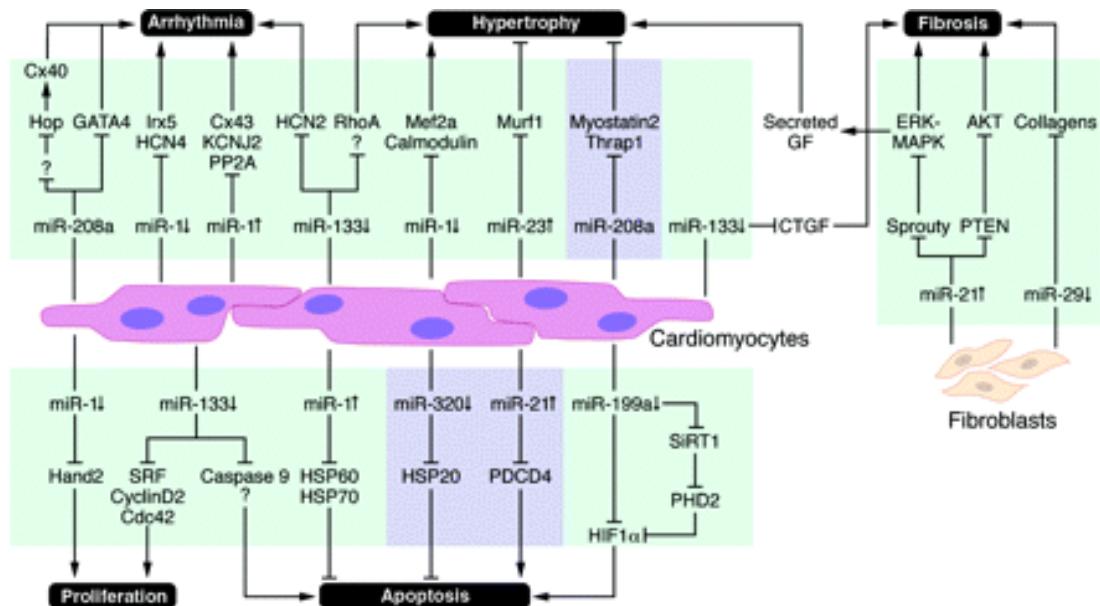


Abbildung 3: MicroRNAs im Rahmen kardialer Erkrankungen. Publizierte Zusammenhänge zwischen mRNAs und miRs in CM (Cardiomyocytes) und CF (Fibroblasts) im Rahmen von Arrhythmien, Hypertrophie, Fibrose, Proliferation und Apoptose. Zielproteine mit unterschiedlicher Studienlage sind mit Fragezeichen versehen. Violett/grün hinterlegte Kaskaden führen zu einer Hemmung/Aktivierung der jeweiligen kardialen Pathologie. Abbildung aus Small EN et al., 2010

1. 5. 1. Kardiale Hypertrophie und *remodeling*

Van Rooij et al. (van Rooij E et al., 2006, van Rooij E et al., 2007) konnten als erste zeigen, dass die Expression zahlreicher miRs in Herzinsuffizienzmodellen dysreguliert ist. Sie simulierten z. B. an Mäusen kardiales *remodeling* einmal als Folge von *Aortic banding*, welches zu einer akuten Volumenüberladung des Herzens führt, außerdem mit Hilfe der Expression aktivierten Calcineurins. Insgesamt konnten sie zwölf miRs identifizieren, die eine veränderte Expression aufwiesen.

Eine wichtige Rolle bei kardialer Hypertrophie scheint unter anderem miR-1 zu spielen, die nicht nur während der kardialen Entwicklung von Bedeutung ist, sondern auch bei Herzinsuffizienz reguliert ist (Small EN et al., 2010). MiR-1 wird von zwei Genen codiert. Zhao et al. generierten eine Knockout-Maus eines dieser Gene, was zu 50-60% Reduktion der kardialen miR-1 Expression führte. Die Herzen dieser Mäuse zeigten unter anderem morphologisch und histologische Auffälligkeiten sowie Herzrhythmusstörungen (Zhao Y et al., 2007).

Auch die Hemmung von miR-133, die ebenfalls von zwei Genen kodiert wird, führte zu kardialer Hypertrophie (Care A et al., 2007). Liu et al. fanden bei Mäusen, welche nur noch eine Kopie von miR-133 exprimierten, keine Veränderung bezüglich der Antwort auf Volumenüberladung (Liu N et al., 2008). Wurden hingegen beide miR-133a Kopien ausgeschaltet, starb ein Großteil der Knockout (K.O.)-Mäuse mit schwerwiegenden kardialen Veränderungen bereits in der späten Embryonal- oder Neonatalperiode. Die wenigen, welche die Neonatalperiode überlebten, verstarben dann an plötzlichem Herzversagen im Erwachsenenalter.

1. 5. 2. Kardiomyozyten-Apoptose

Die Apoptose von Kardiomyozyten ist ein weiterer wichtiger Faktor im Rahmen des *remodelings*, da verloren gegangener Herzmuskel nur in geringem Ausmaß regeneriert werden kann. Die miR-15-Familie scheint über die Herunterregulation des bekannten Protoonkogens *bcl-2* proapoptotisch zu wirken (Wang Y et al., 2009). Außerdem werden Mitglieder der miR-15-Familie im Rahmen kardialer Erkrankungen verstärkt exprimiert und die kardiale Überexpression von miR-15 führte im Mäusemodell zu myokardialem *remodeling* (van Rooij E et al., 2008).

Auch in transgenen Mäusen mit kardialer Überexpression von miR-320 fanden sich nach Ligation des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA), einem Myokardinfarktmodell, sowohl eine Vergrößerung des Infarktareals als auch

histologisch vermehrt CM-Apoptosen (Ren XP et al., 2009). Als vermittelndes Protein wurde dabei das Hitzeschockprotein HSP20 ermittelt, welches durch miR-320 supprimiert wird.

1. 6. Zielsetzung der Arbeit

Zusammenfassend kann man sagen, dass die chronische Herzinsuffizienz in Zeiten einer alternden Gesellschaft eine häufige Krankheit darstellt, deren Prävalenz weiterhin steigen wird und die außerdem mit hoher Morbidität und einer Fünf-Jahres-Mortalität von etwa 45 bis 60% verbunden ist. Da nur wenige der heutigen Therapieansätze zu einer deutlichen Verlängerung der Lebensdauer führen, ist es von Bedeutung, die Pathomechanismen hinter der Entwicklung und dem Fortschreiten der chronischen Herzinsuffizienz zu verstehen, um neue Ansatzpunkte für die Therapie zu gewinnen.

MicroRNAs, die an vielen Prozessen im Organismus beteiligt sind, spielen auch im Herzen eine wichtige Rolle. Wie oben beschrieben, wurden bereits einige miRs identifiziert, die an der Entstehung von kardialem *remodeling* beteiligt sind.

Ziel dieser Arbeit ist es die miR-30-Familie (vergleiche Abbildungen 5 bis 7) zu untersuchen, welche eine im Herzen stark exprimierte miR-Familie darstellt (Rao PK et al., 2009) und welche in Pilotexperimenten unserer Arbeitsgruppe eine verringerte Expression bei Herzinsuffizienz zeigte (vergleiche Kapitel 3). Sie scheint somit ebenfalls eine Rolle im *remodeling* zu spielen. In der Folge wollten wir erstens die Funktion der miR-30-Familie bei Herzinsuffizienz näher analysieren. Sowie zweitens mögliche Gene identifizieren, welche durch miR-30 reguliert werden und gleichzeitig an den Umbauprozessen des *remodeling* beteiligt sind, um letztlich auch mögliche zukünftige Therapiestrategien zu entwerfen.

2. Alphabetische Liste der Materialien

Produkt	Firma	Katalognummer
10cm ² , 6cm ² Platten, Sterilfilter, 24/12/6-Wellen	TPP®	
10x BlueJuice™ Gel Loading Buffer	invitrogen™	10816015
2-Propanol, BAKER ANALYZED ACS Reagent (isopropyl alcohol)	Mallinckrodt Baker	9084-07
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta- D-galactopyranoside	Gold Biotechnology	X4281C
Agarose LE (low electroendosmosis)	Roche	11 685 678 001
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	NEB	M0290S
Ammoniumpersulfat (APS)	Fisher Scientific	AM0370
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich®	A9393
Antarctic Phosphatase	NEB	M0289S
Autoflow 4750 water jacketed CO ₂ incubator	NuAire	
Blotting Membranes	Biorad	
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich®	C0378-5G
Chromatography Paper	Whatman	
Ethyl Alcohol, 200 Proof, ACS/USP Grade	PHARMCO-AAPER	111000200
EZ-Mark™DNA Size Markers low/high	MacConnell	
FluoReporter® <i>lacZ</i> / Galactosidase Quantitation Kit	invitrogen™	F-2905

FLUOstar OPTIMA- Fluorescence Microplate Reader	BMG labtech	
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega	E2311
Gateway® Vector Conversion System with One Shot® <i>ccdB</i> Survival Cells	invitrogen™	11828-029
Gelkammern	Biorad	
Gene Choice® Taq DNA Polymerase	Genese Scientific	42-801B1
GIBCO™ <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (D-MEM), low glucose	invitrogen™	11885-084
GIBCO™ Insulin, Human Recombinant, Zinc Solution	invitrogen™	12585-014
GIBCO™ Medium 199 (10x)	invitrogen™	11825-015
GIBCO™ MEM (<i>Minimal- essential-medium</i>) Amino Acids Solution (50x)	invitrogen™	11130-051
GIBCO™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100x)	invitrogen™	11140-050
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega	M8295
HyClone 0.25% Trypsin	Thermo Scientific	SH30042.01
HyClone DMEM/High-Glucose (+4mM L-Glutamine, +4500mg/L Glucose, -Sodium Pyruvate)	Thermo Scientific	SH3024902
HyClone DPBS 1x; Without Calcium, Magnesium, or Phenol Red	Thermo Scientific	SH30028.02
Lipofectamine™ 2000	invitrogen™	11668-019

Transfection Reagent		
Luciferase Assay Reagent	Promega	E1483
MicroAmp® 96- & 384-Well Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	4311971
miRNA StarFire® Kit	IDT	
MultilImage® Light Cabinet	Alpha Innotech Corp.	
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	Sigma-Aldrich®	D4451
NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific	
Nuclease-free Water	Applied Biosystems	AM0030
NucleoBond® Xtra Maxi EF kit	Machery Nagel	740424.10
Passive Lysis 5x Buffer	Promega	E1941
Penicillin-Streptomycin Solution, 100x	Cellgro®	30-002-CI
Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes	F-540S
Pipetten, Spitzen	Gilson, Inc.	
pMIR-REPORT™ miRNA Expression Reporter Vector System	Applied Biosystems	AM5795
Primer (Primer, antagomiRs)	Integrated DNA Technologies	s.u.
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN	28704
Restriktionsenzyme (soweit nicht anderweitig aufgeführt)	NEB	
S.O.C. Medium	invitrogen™	15544034
StarFire® miRNA Detection Kit	IDT	
Sterile Water for Irrigation, USP	Baxter	2F7113
SuperScript® II Reverse	invitrogen™	18064014

Transcriptase		
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	4309155
T4 DNA Ligase	NEB	M0202S
TaKaRa LA Taq™ DNA Polymerase	TaKaRa	TAK RR002A
TaqMan® Gene Assay: 5x RT-Primer, 20x Probe	Applied Biosystems	
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	4369016
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4366596
hsa-miR-30a-5p		417
hsa-miR-30b		602
hsa-miR-30c		419
hsa-miR-30d		420
hsa-miR-30e		2223
Thermo Scientific EC Primo* Horizontal Submarine Gel Systems	Fisher Health Care	FB-EC340
TOPO® TA Cloning Dual Promoter Kit	invitrogen™	K4600-01
TOPO® TA Cloning Kit	invitrogen™	KNM4500-01
TRIzol® Reagent	invitrogen™	15596-018
Urea	Fischer Biotech	U15-50
Vortex Genie 2®	Fisher Scientific	
Waagen	Denver Instruments	
Wasserbäder	VWR Scientific	
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf	
Zentrifuge Sorvall RC5B	Sorvall	

3. Methoden

3. 1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um DNA zu amplifizieren bzw. nachzuweisen oder zu quantifizieren. Abhängig von der weiteren Verwendung des PCR Produktes wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Die einzelnen Komponenten wurden auf Eis zusammengefügt und auf Eis belassen, bis die Reaktion in einem sogenannten *hot-start* gestartet wurde, um unspezifisches *annealing* zu vermeiden.

3. 1. 1. Phusion® DNA-Polymerase

Sie wurde aufgrund ihrer geringen Mutationsrate ($4,4 \times 10^{-7}$ pro Basenpaar) verwendet, wenn die Fehlerrate möglichst gering gehalten werden sollte. Die Reaktion wurde bei 98°C für eine Minute (Min.) gestartet, dann erfolgten 30 Zyklen mit jeweils 98°C für fünf bis zehn Sekunden, dann bei Primer-abhängiger T_m für 20 Sekunden und 30 Sekunden pro 1000 Basenpaare (kb) PCR-Produkt bei 72°C.

	Klonen	Colony-screening
H ₂ O (steriles Wasser)	ad 20 µl	ad 25 µl
5x Phusion® HF Buffer	4 µl	5 µl
10mM dNTPs (Nukleosidtriphosphate)	0,4 µl	0,5 µl
vorwärts-Primer (20 pmol)	0,4 µl	0,5 µl
rückwärts-Primer (20 pmol)	0,4 µl	0,5 µl
Template	0,5 pg-5 ng Plasmid oder 25-125ng genomische DNA	Probe einer Kolonie
Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl	0,25 µl

Zum *Colony-screening* wurden Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Nährmedium (*Lysogeny broth*, LB)-Platte abgetragen, ein Teil der Kolonie

dann via PCR auf das gewünschte *insert* geprüft und der Rest der Kolonie in 3ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum aufgenommen, um später die gewünschten Kolonien selektieren zu können.

3. 1. 2. Gene Choice® Taq-Polymerase

Um die für TOPO® TA Cloning® (siehe Kapitel 3. 4.) notwendigen A'-Überhang an ein PCR-Produkt anzuhängen, wurde die Gene Choice® Taq Polymerase verwendet und für zehn Minuten bei 72°C inkubiert.

Gereinigtes PCR-Produkt	16 µl
10x Taq <i>Reaction Buffer</i> CLP	2 µl
50mM MgCl ₂	0,7 µl
dNTPs	0,5 µl
CLP-Polymerase	0,5-1 µl

3. 1. 3. GoTaq® DNA-Polymerase

Die GoTaq® DNA Polymerase wurde zum Genotypisieren der verschiedenen Mauslinien benutzt.

ddH ₂ O	ad 20 µl
5x Green GoTaq® <i>Reaction Buffer</i>	4 µl
10mM dNTPs	0,4 µl
Primer-Mix vor-/rückwärts (20 pmol)	0,4 µl
<i>Template</i>	1 µl aus <i>Hot-shot</i> DNA-Extraktion
Polymerase (5 U/µl)	0,12 µl

3. 1. 4. Quantitative PCR (qPCR)

3. 1. 4. 1. TaqMan® MicroRNA Assay

Der TaqMan® MicroRNA Assay fand Anwendung um die Menge an einer bestimmten RNA zu ermitteln. Nach RNA-Isolation und Umschreibung in cDNA (*copyDNA*; mit Hilfe von TaqMan® MicroRNA *Reverse Transcription*, siehe dazu Kapitel 3. 12. 1.) wurde die PCR-Reaktion nach unten stehender Anleitung zusammengestellt, die *Plate* geladen und nach zehn Minuten bei 95°C in 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C gestartet.

Nuklease-freies H ₂ O	7,35 µl
TaqMan® MicroRNA Assay 20x	1,15 µl
TaqMan® 2x <i>Universal PCR Master Mix</i>	11,5 µl
cDNA 1:3 Verdünnung	3 µl

3. 1. 4. 2. SYBR® Green PCR

Die einzelnen Substanzen wurden gemischt und für zehn Minuten bei 95°C inkubiert, um die Polymerase zu aktivieren. Daraufhin folgten 38 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95°C, 20 Sekunden bei 56°C und 35 Sekunden bei 60°C. Danach folgte eine Minute bei 60°C und abschließend die Erstellung einer Dissoziationskurve, um die Spezifität der Primer zu überprüfen.

Nuklease-freies H ₂ O	8,65 µl
Primer-Mix: vor-/rückwärts (20 pmol)	0,35 µl
SYBR® Green PCR <i>Master Mix</i>	11 µl
cDNA (10 ng/µl)	2 µl

3. 2. Agarosegele

200 ml eines Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffers wurden mit entsprechenden Mengen Agarose vermischt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten und zum Kochen gebracht. Das Gemisch erstarnte nach dem Erkalten zu einer Matrix, deren Porengröße durch die Agarosekonzentration bestimmt wurde. Die Gele wurden nach Abkühlen und Zugabe von 1,8 µl Ethidiumbromid gegossen.

3. 3. Trägergelelektrophorese

Für alle DNA-Moleküle ist das Verhältnis von Ladung zu Masse etwa gleich. Eine elektrophoretische Trennung erfolgt daher im Wesentlichen nach Unterschieden in der Molekülgröße und Molekülform. Zumeist wurden 0,8%-haltige Gele verwendet, welche einen Trennbereich für lineare DNA-Moleküle von etwa 0,5-7,0 kb aufweisen. Nur für sehr kleine DNA-Fragmente wurden höhere Agarosekonzentrationen gewählt. Die Auftrennung erfolgte meist bei 150 V.

3. 4. Klonierung mit dem TOPO® TA Cloning® Kit

Der TOPO®-Vektor ist mit einem 3'-Deoxythymidin-Überhang so entworfen, dass DNA-Stücke mit Adenosin (A')-Überhang aufgenommen werden und ohne dass eine Ligase notwendig ist. Folgende Substanzen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und nach dem Mischen bei Raumtemperatur für fünf bis 30 Minuten, abhängig von der Größe des PCR-Produkts, inkubiert.

PCR-Produkt mit A'-Überhang	0,5-4 µl
<i>Salt Solution</i>	1 µl
ddH ₂ O	ad 5 µl
pCR™II-TOPO®-Vektor	1 µl

Anschließend wurde die TOPO-Cloning® Reaktion in kompetente Zellen transformiert (siehe Kapitel 3. 10.) und selektioniert. Im Anschluss kann das gewünschte Genprodukt vervielfältigt und wieder aufbereitet werden, um nach geeignetem Restriktionsenzymverdau mit dem Zielvektor ligiert zu werden.

3. 5. DNA-Aufbereitung

3. 5. 1. Minipräparation

Sowohl Mini-, als auch Maxipräparationen wurden mit dem *NucleoBond® Xtra Maxi EF Kit* durchgeführt. Für die Minipräparation wurden etwa 1,5 ml Bakteriensuspension bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und das Pellet in 250 µl *Resuspension-Puffer S1* durch Vortexen resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen wurden 250 µl *Lysis-Puffer S2* in das Reaktionsgefäß gegeben, vorsichtig gemischt und zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde mit 250 µl *Neutralization-Puffer S3* beendet, die Flüssigkeiten erneut gemischt und zehn Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand mit darin enthaltener DNA vorsichtig entnommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, die DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol ausgefällt und drei Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Die DNA, als gelartiges Pellet am Boden oder Rand des *Tubes* sichtbar, wurde nun mit 70% Ethanol gereinigt und nach Abgießen des Alkohols in 30 µl ddH₂O resuspendiert.

3. 5. 2. Maxipräparation

250ml Bakteriensuspension wurden bei 4°C mit 5000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 12 ml Puffer S1 resuspendiert. Die fünfminütige Lyse in 12 ml Puffer S2 wurde durch 12 ml Puffer S3 beendet. Während das Gemisch etwa zehn Minuten auf Eis blieb, wurden auf beiliegende *Columns* Filter aufgesetzt und mit 15 ml *Equilibration-Puffer N2* vorbereitet. Daraufhin wurde der flüssige Überstand mit der DNA von

restlichen Zellbestandteilen durch den Filter getrennt. Anschließend folgte ein Wasch-Schritt mit 30 ml *Wash*-Puffer N3. Nachdem dieser vollständig durchgelaufen war, wurde die DNA mit 15ml *Eluation*-Puffer N5 in neuen 50 ml *Falcons* eluiert, dann mit 11 ml Isopropanol gemischt und bei 4°C, 10000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Isopropanols wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, der Überstand entfernt und je nach vorhandener DNA Menge in 80-300 µl ddH₂O resuspendiert.

3. 5. 3. Gelextraktion von DNA aus Agarosegel

Gelextraktion erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit*®. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden nach Auftrennung durch Gelelektrophorese unter UV-Licht (Ultraviolettes Licht) mit einer Rasierklinge ausgeschnitten. Das Gel-Stück wurde in 800 µl *QG Solubilization*-Puffer bei 50°C im Wasserbad aufgelöst, die DNA mit 266 µl Isopropanol gefällt und das Gemisch in die beiliegenden *QIA-quick-spin-column* übertragen. Diese wurden bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und, um Agarosereste zu beseitigen, wurde erneut 500 µl Puffer *QG* zugegeben, eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Daraufhin mit 750 µl *PE Wash*-Puffer gewaschen, zweimal jeweils eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und die DNA mit 30 µl ddH₂O in frische 1,5 ml *Tubes* eluiert.

3. 6. Bestimmung von DNA- oder RNA-Konzentrationen

Nukleinsäure-Menge und Reinheit wurden mittels *Nano-Drop*® bestimmt. Dabei wurde die Extinktion von 2 µl DNA in Lösung beim Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (260nm) gemessen und mit dem Absorptionsmaximum von Proteinen (280nm) verglichen. Erwünscht ist eine Ratio von 1,8. Auf gleiche Weise wurde die RNA-Konzentration bestimmt, dabei wird allerdings eine Ratio von 2,0 als reine RNA betrachtet.

3. 7. Restriktionsverdau

Zielvektor und gewünschtes *insert* wurden mit dem gleichen Restriktionsenzymen (RE) geschnitten, um später in einer Ligations-Reaktion durch die T4-Ligase (siehe Kapitel 3. 9.) zusammengefügt zu werden. Der Restriktionsverdau fand auch Anwendung um die Kolonie mit dem richtigen *insert* aus Minipräparationen zu finden.

Die Reaktion wurde mit Restriktionsenzymen von NEB® nach folgendem Schema angesetzt und für etwa zwei Stunden bei Temperaturen nach Angaben des Herstellers inkubiert.

10x adäquater NEB®-Buffer	10% des Gesamtvolumens
ddH ₂ O	x µl ad Gesamtvolumen
DNA	etwa 6 µg des benötigten Verdauprodukts oder 200 ng für Minipräparation-Analyse
wenn nötig 10x BSA	10% des Gesamtvolumens
Restriktionsenzym	36 U (entspricht sechsfachem Überverdau)
Gesamtvolumen	wurde mindestens so hoch gewählt, so dass Glycerolanteil <5%

3. 8. Dephosphorylierung mit antarktischer Phosphatase

Eine Dephosphorylierung des Vektors war dann nötig, wenn der Vektor entweder *Blunt-end* beziehungsweise nur mit einem einzigen Enzym geschnitten wurde. Die Reaktion wurde nach folgendem Schema pipettiert und für zehn Minuten bei 37°C inkubiert.

10x Antarctic Phosphatase Buffer	10% des Gesamtvolumens
Antarctic Phosphatase	1 µl

3. 9. Ligation

Ligationen wurden nach folgendem Schema bei 16°C über Nacht im Wasserbad durchgeführt. Die *insert*-Menge wurde dabei mit dem *Ligation calculator* der Universität Düsseldorf⁵² für eine Ratio 1:4 = Vektor : *insert* berechnet.

ddH ₂ O	ad 20 µl
Puffer für NEB®-T4-Ligase	2 µl
Vektor DNA	50 ng
<i>Insert</i> DNA	x
T4-Ligase	1 µl

3. 10. Transformation

Chemisch kompetente DH5α-*Escherichia coli* (*E. coli*) wurden, sobald sie aus minus 80°C entnommen worden waren, für 15 Minuten auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 3µl Ligations-Reaktionsmischung blieben sie weitere 30 Minuten auf Eis. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 60 Sekunden im Wasserbad bei 42°C und ein etwa zweiminütiges Abkühlen auf Eis. Daraufhin wurden 250 µl von etwa 25°C warmem SOC-Medium dazugegeben. Zur Regeneration blieben die Bakterien für 60 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler. 50 bis 200 µl dieses Ansatzes wurden entnommen, auf angewärmte LB-Platten (darin enthalten ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion) gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnten einzelne Kolonien durch *Colony-screen-PCR* oder Minipräparation mit anschließendem Restriktionsverdau auf das gewünschte *insert* getestet werden. Positive Kolonien wurden in 250 µl LB-Medium mit Selektionsmarker über Nacht inkubiert und die DNA am folgenden Tag in Maxipräparation aufbereitet.

3. 11. RNA-Isolation mit *TRIzol®-Reagent*

Zuvor isoliertes Gewebe wurde direkt aus flüssigem Stickstoff in 1 ml *TRIzol®* gegeben und mit einem Homogenisiergerät etwa 30 Sekunden homogenisiert, um die Zellen aufzuschließen und deren Bestandteile freizulegen. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der Membranen, Fett und anderen festen Bestandteilen vom restlichen Zellinhalt durch einen zehnminütigen Zentrifugationsschritt mit 11800 g bei 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Handelte es sich um Zellen aus der Zellkultur, wurden diese in der Kulturschale mit PBS (*Phosphate-buffered saline*) gewaschen und dann in 1ml *TRIzol®* pro 10cm² vom Boden abgeschabt. Beim folgenden Schritt wurde dann genauso verfahren wie bei Gewebeproben:

Pro 1 ml *TRIzol®* wurden 200 µl Chloroform dazugegeben, zum Mischen 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt und anschließend drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die darauf folgende Zentrifugation mit 11800 g bei 4°C für 15 Minuten trennte sich die RNA in einer flüssigen Phase mit DNA und Proteinen von anderen Zellbestandteilen ab. Der Überstand wurde entnommen, mit 500 µl Isopropanol kräftig gemischt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin 10 Minuten mit 11800 g bei 4°C zentrifugiert, wobei die RNA als gelartiges Pellet sichtbar wurde. Nach Abgießen des Überstands, welches die im *TRIzol®* gelösten DNA und Proteine enthielt, wurde das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen, fünf Minuten mit 7600 g bei 4°C zentrifugiert und in 30 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

3. 12. CopyDNA-Synthese

3. 12. 1. MicroRNA: TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription

Nuklease-freies H ₂ O	4,16 µl
10x <i>Reverse Transcription Buffer</i>	1,5 µl
100 mM dNTPs (inklusive dTTP)	0,15 µl
TaqMan® 5x RT- <i>Primer</i>	3 µl
RNAse Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
<i>MultiScribe</i> reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl
RNA	10 ng in 5 µl

Die Substanzen wurden gemischt und für fünf Minuten auf Eis belassen. Die Reaktion erfolgte für 30 Minuten bei 16°C, dann 30 Minuten bei 42°C und wurde durch fünf Minuten bei 85°C beendet. Nach dem Abkühlen auf 4°C wurde die cDNA durch Zugabe von 7,5 µl ddH₂O im Verhältnis 1:3 verdünnt.

3. 12. 2. Messenger RNA

Nuklease-freies H ₂ O	8,6 µl-x µl
<i>Random hexamers</i>	0,4 µl
dNTPs	1 µl
RNA	1 µg in x µl

Die RNA wurde für fünf Minuten bei 65°C inkubiert, dann auf 4°C gekühlt und nach Zugabe folgender Substanzen erfolgte die Reaktion in zehn Minuten bei 25°C und anschließend 50 Minuten bei 42°C. Sie wurde durch fünf Minuten bei 85°C beendet.

Nuklease-freies H ₂ O	2 µl
5X <i>First-strand-buffer</i>	4 µl
RNAse OUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl

Nach Abkühlen der Lösung auf 4°C wurde 1 µl RNase H zugegeben und zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die cDNA mit 79 µl ddH₂O auf 10 ng/µl verdünnt.

3. 13. *Northern Blotting* für microRNAs

Pro 17%-Urea-Gel wurden folgende Bestandteile bei 37°C erwärmt, bis die einzelnen Bestandteile in Lösung gegangen waren:

Urea	5,625 g
40% Acrylamid	5,625 ml
10x TBE (TrisBase, Boric Acid, EDTA)	1,125 ml
ddH ₂ O	0,75 ml

Anschließend wurden 75 µl von 10% APS (1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml ddH₂O) beigefügt, die Lösung filtriert und nach Start der Polymerisation mit Tetramethylethylenediamine (TEMED) die Gele gegossen.

Pro *RNA-sample* wurden folgende Bestandteile gemischt, die Gele geladen und 210 Minuten bei 150 Volt in einfach konzentriertem TBE laufen gelassen.

8 µg RNA	18 µl
Formamid	20 µl
0,5 M EDTA	1,6 µl
6x Ficoll® Ladepuffer (0,25% Bromocriptin, 0,25% Xylene, 15% Ficoll®)	2 µl

Die Gele wurden mit 80 Volt für 70 Minuten bei 4°C in TBE (*TrisBase, boric acid* und EDTA) auf ein *chromatography-paper* übertragen und anschließend mit dem StarFire® miRNA Detection Kit markiert. Dazu wurde eine *probe* (ein Sequenz-spezifisches Oligonukleotid für die gewünschte miR) im ersten zehnminütigen *annealing*-Schritt an seiner Bindestelle von einem universellen

Oligonukleotid mit 5'-Poly-(T) gebunden. Im zweiten *Labeling*-Schritt erfolgte für 60 Minuten die Extension der Probe mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) und Klenow-Fragment, welches den Nukleinsäure-Strang nur vom 5'-Ende auffüllt. Anschließend wurde sowohl überschüssiges dATP, als auch das universelle Oligonukleotid entfernt, so dass allein die Sonde, für die miR spezifische Probe mit radioaktivem 3'-Poly-(A), vorlag. Die anschließende Hybridisierung dieser Sonde mit der RNA auf dem *chromatography-paper* erfolgte bei 39°C für ein bis zwei Tage. Nach Entfernen von überschüssigen Sonden konnte die miR auf Filmpapier mit der gewünschten Belichtungszeit sichtbar gemacht werden.

3. 14. Transfektion mit Lipofectamine™ 2000K

African green monkey kidney fibroblast cells (cos-Zellen) wurden in 24-Well-Platten ausgesät, über Nacht inkubiert und nach Protokoll bei etwa 80% Konfluenz folgendermaßen transfiziert:

pMir-Vektor mit <i>insert</i> (3'-UTR der mRNA)	20 ng	
p6CMV-miR-Vektor	x ng	
leerer p6CMV-Vektor	y ng	insgesamt 200 ng
CMV-β-Gal-Kontrollplasmid	10 ng	

Jeweils ein Triplott cos-Zellen (Tabelle 5) erhielt entweder 0, 50 ng, 100 ng, oder 200 ng p6-Promotor-Cytomegalievirus-Vektor (p6CMV)-miR und, damit in alle Zellen die gleiche Menge DNA (=200 ng) transfiziert wurde, entsprechende Mengen an leerem p6CMV-Vektor. Das Medium wurde 24 Stunden später gewechselt und weitere 24 Stunden später erfolgte der Assay.

0 ng	0 ng	50 ng	100 ng	100 ng	200 ng
0 ng	50 ng	50 ng	100 ng	200 ng	200 ng

Tabelle 5: Verteilung der Triplikate. Mengenangabe der jeweils transfizierten p6CMV-miR (0-200 ng)

3. 15. Luciferase-Assays

Bei der von der *Firefly*-Luciferase katalysierten Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin wird Licht frei, welches von einem Photometer erfasst werden kann.

3'-UTRs von mRNAs wurden in ein Reporterplasmid, den pMir-Vektor geklont, in dem die Luciferase-Aktivität durch eben diese 3'-UTR geregelt wird, da sie als 3'-UTR der mRNA des Luciferase-Proteins abgeschrieben werden. Handelte es sich bei dem 3'-UTR um eine Zielstruktur für eine co-transfizierte miR, so wurde weniger Luciferase in den Zellen synthetisiert und folglich das Lichtsignal abgeschwächt.

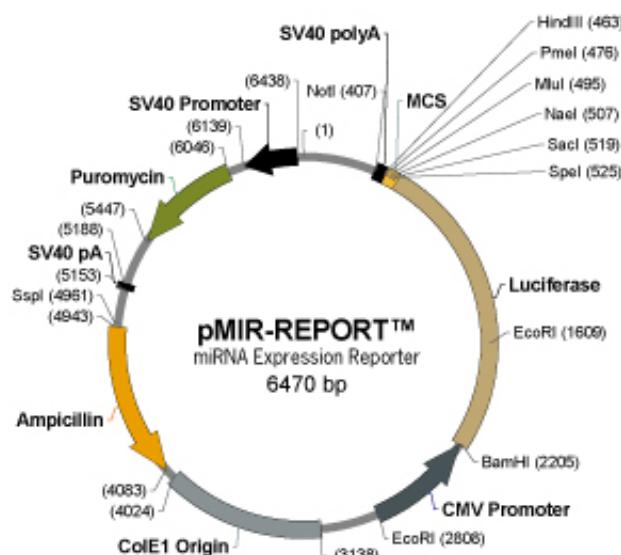


Abbildung 4: pMIR-REPORT® von Applied Biosystems (Quelle: Produktinformation⁹⁰)

48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 150 µl einfach-konzentriertem Lysis-Puffer pro Well bei Raumtemperatur 20 Minuten auf dem Schüttler lysiert. Jeweils 30 µl des Lysats wurden in eine weiße 96-Well-Platte zur Messung der Luciferase-Aktivität und eine klare 96-Well-Platte für die beta-Galactosidase (β-Gal)-Kontrolle gegeben. In letztere wurden pro Well 100 µl PBS, 1 mM MgCl₂ und 1,5 µl CUG (3-Carboxyumbelliferyl β-D-Galactopyranosid) als Substrat für

die beta-Galactosidase zugefügt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen. Die Reaktion wurde mit 50 μ l 0,2 M Na₂CO₃ pro Well beendet und dann im Photometer β -Gal-Fluoreszenz gemessen. Dabei diente die β -Gal-Fluoreszenz als Kontrolle, um auf gleiche Zellzahlen zu normieren. Die Luciferase-Aktivität konnte sofort nach Zugabe des Luciferase-Substrats im Photometer gemessen werden.

3. 16. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika).

Bei normalverteilten Daten kamen parametrische Tests, wie der t-Test bei Vergleich zweier Stichproben bzw. die Varianzanalyse bei mehr als zwei Stichproben zum Einsatz. Ein Test galt dann als signifikant, wenn sich der p-Wert kleiner als die Irrtumswahrscheinlichkeit Alpha (5%) zeigte.

Die Streuung der erhobenen Werte wurde als Standardabweichung angegeben.

3. 17. Versuchstiere

Die Generierung und Untersuchung der in dieser Arbeit beschrieben transgenen Tiere wurde vom *Animal Care and Use Committee* der *University of Texas Southwestern Medical Center* genehmigt.

3. 17. 1. Mäuse

Alle Tieren entstammen der C57BL/6 Linie. Die verwendeten Mäuse wurden mit Wasser und Nahrung nach freier Verfügung versorgt und unterliefen einem normalen Tag-Nacht-Rhythmus.

Ein Myokardinfarkt wurde in einer Gruppe von narkotisierten Mäusen durch Abklemmen des Ramus interventricularis anterior induziert, als Vergleichsgruppe diente eine kontolloperierte Gruppe, d.h. mit Sternotomie aber ohne Abklemmen von Gefäßen.

Um physiologische Hypertrophie zu induzieren, wurden Mäusekäfige mit Laufrädern ausgestattet und die Mäuse dort zehn Tage lang trainiert.

3. 17. 2. Kardiomyozyten von neonatalen Ratten

Kardiomyozyten von neonatalen Ratten (NRCM) wurden aus Herzen von ein bis zwei Tage alten Sprague-Dawley Ratten isoliert. Die Ventrikel wurden zerkleinert und durch Trypsinlösung zu Einzelzellen verdaut. Nach Inaktivierung von Trypsin mittels Serum wurden die Zellen abzentrifugiert und in eine Zellkulturschale mit Minimum Essential Medium sowie 5% Kälberserum gegeben. Etwa eine Stunde später wird der Überstand mit nicht adhärierten Kardiomyozyten gewonnen und in weitere Zellkulturschalen überführt. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37°C.

Um eine Überexpression von miR-30 hervorzurufen, wurden die NRCM mit unterschiedlichen Mengen Adenoviren infiziert, welche miR-30a transduzierten. Als Kontrolle diente hierbei ein Adenovirus, welches beta-Galactosidase transduziert. Als indirektes Maß für Hypertrophie, das heißt vermehrte Proteinsynthese, dient die Aufnahme der radioaktiven Aminosäure [³H]Isoleucin (Konzentration 1 nCi/ml im Medium). Die Zellen wurden dazu in 24-Well Platten kultiviert, mit dem Adenovirus transfiziert und nach 24 Stunden Hungerphase wurde das [³H]Isoleucin-haltige Kulturmedium hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen nach 40 Stunden Inkubation gewaschen, die Proteine lysiert und die radioaktive Strahlung mit einem Scintillationszähler gemessen.

3. 18. Humane Gewebeproben

Die kardialen Gewebeproben von Patienten mit Herzinsuffizienz und von gesunden Kontrollen wurden uns in anonymisierter Form von *Myogen Inc* zur Verfügung gestellt und deren Nutzung für Genexpressionsanalysen wurde vom *Institutional Review Board* (entsprechend der Ethikkommission) der *University of Texas Southwestern Medical Center* genehmigt. Leider liegen aufgrund der Anonymisierung keine *Baseline*-Charakteristika vor.

4. Ergebnisse

4. 1. Die miR-30-Familie

Diese Arbeit konzentriert sich auf die miR-30-Familie (Abbildung 5), die neben der let-7-Familie am stärksten exprimierte miR-Familie im Herzen (Rao PK et. al., 2009).

4. 1. 1. Einteilung

MicroRNA-Familien haben sich wahrscheinlich aus einer gemeinsamen Vorläufer miR entwickelt, deren Gen sich im Laufe der Zeit mit einigen Modifikationen multipliziert hat (Griffiths-Jones S et. al., 2003). Folglich besitzen einzelne miRs einer Familie häufig eine identische, oder zumindest sehr ähnliche Sequenz in der *seed*-Region, können sich aber an anderen Stellen durch einzelne oder mehrere Nukleotide unterscheiden. Da die *seed*-Sequenz der wichtigste Bereich der miR ist, der für die Bindung an die Ziel-mRNA notwendig ist, vermutet man, dass die einzelnen Mitglieder einer miR-Familie weitestgehendst ähnliche mRNAs zum Ziel haben.

mmu-miR-30a	5'- <u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAG- 3'
mmu-miR-30b	5'- <u>UGUAAACA</u> UCCU A CACUC - - AGCU - 3'
mmu-miR-30c	5'- <u>UGUAAACA</u> UCCU A CAC C UCAGC- 3'
mmu-miR-30d	5'- <u>UGUAAACA</u> UCC C CGACUGGAAG- 3'
mmu-miR-30e	5'- <u>UGUAAACA</u> UCCU U GACUGGAAG- 3'

Abbildung 5: Nukleotidsequenzen der miR-30-Familie bei der Maus (*Mus musculus*, mmu). Die identische *seed*-Sequenz der einzelnen Mitglieder ist unterstrichen, unterschiedliche Nukleotide sind fett gedruckt. (Quelle: mirbase⁵⁴)

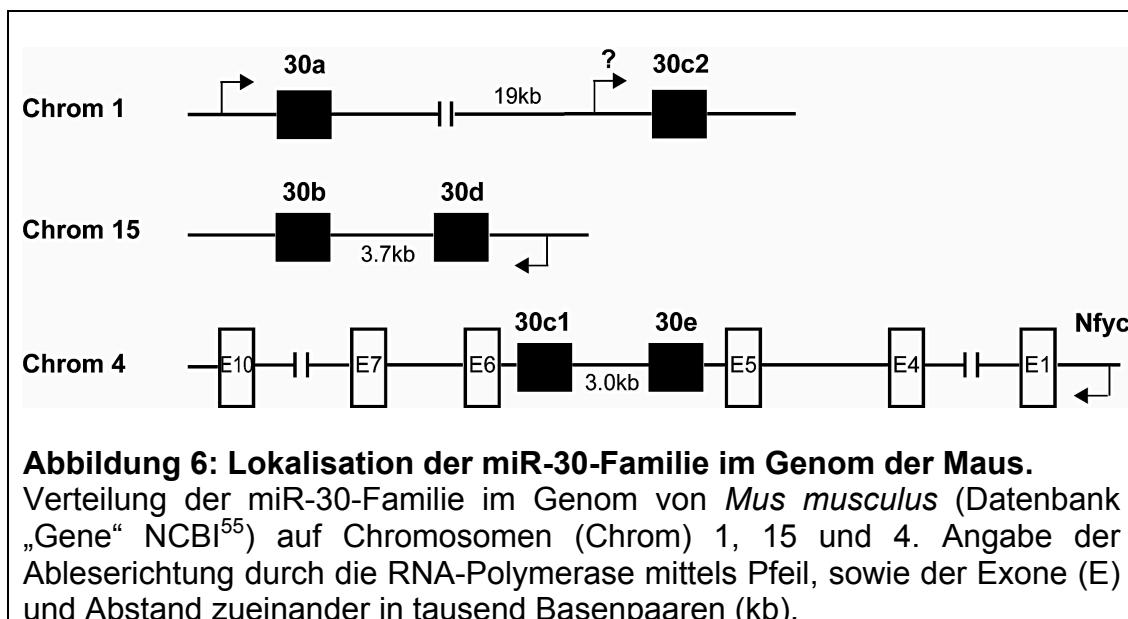
Die miR-30-Familie lässt sich in zwei Untergruppen unterteilen: die miR-30a-, miR-30d-, miR-30e-Unterfamilie (im Folgenden auch miR-30ade), die sich jeweils nur in einem Nukleotid unterscheiden. Außerdem die miR-30b-,

miR-30c-Unterfamilie (miR-30bc), welche eine Reihe unterschiedlicher Nukleotide am 3'-Ende besitzt (Abbildung 5).

Wahrscheinlich spielen auch die Nukleotide außerhalb der seed-Sequenz für die Interaktion mit mRNAs eine Rolle, z. B. im Sinne von Ausbildung von Sekundärstrukturen. Folglich könnte man hypothetisieren, dass beide Untergruppen geringfügig unterschiedliche Gruppen an Ziel-mRNAs haben könnten.

4. 1. 2. Lokalisation

Die Gene der miR-30-Familie sind bei der Maus auf drei Chromosomen (Chromosomen 1, 4 und 15, Abbildung 6) verteilt: miR-30a und miR-30c2 (eine zweite Kopie von miR-30c) befinden sich in einem *Cluster* auf dem Chromosom 1, miR-30b und miR-30d auf Chromosom 15. MiR-30c1 und miR-30e sind als einzige intronisch zwischen Exon 5 und Exon 6 des *Nuclear-transcription-factor-Y* (*Nfyc*)-Gens auf Chromosom 4 lokalisiert.



Ähnlich verhält es sich beim Menschen: die miR-30-Familie ist ebenfalls auf drei Chromosomen (allerdings: Chromosomen 1, 6 und 8) verteilt und zeigt die

selbe Anordnung der Cluster. Bei Nfyc handelt es sich um eine Untereinheit eines hochkonservierten Transkriptionsfaktors. Tatsächlich ist die Expression dieser zwei intronischen miR-30 beim Menschen wichtig, um Metaplasie der pankreatischen β -Inselzellen zu verhindern (Joglekar MV et. al., 2009). Die Funktion von Nfyc im Herzen ist allerdings nicht bekannt.

4. 1. 3. Expression

Rao et al. (Rao PK et. al., 2009) (Abbildung 7) bestimmten mittels *High-throughput-deep-sequencing* den relativen Anteil einzelner miRs im Herzen von sowohl männlichen, als auch weiblichen, sechs bis acht Wochen alten Mäusen. Dabei stellte sich miR-1 mit 40% als die im Herzen der Maus am stärksten exprimierte miR dar.

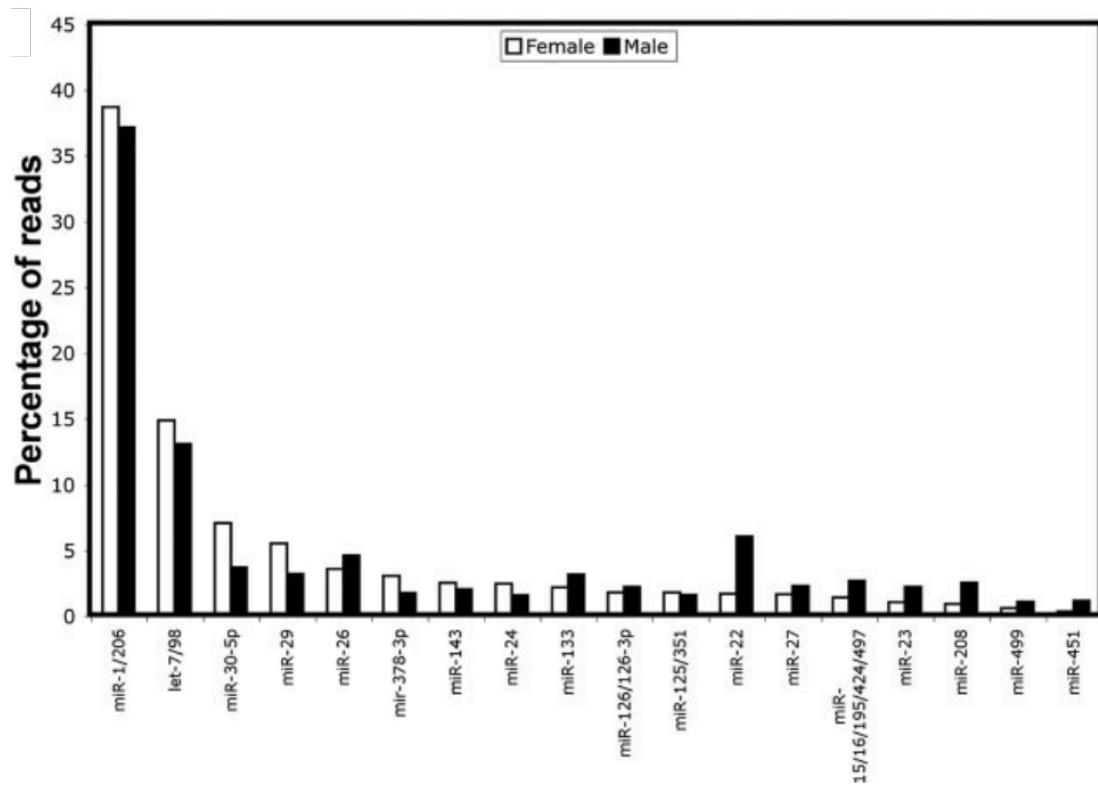


Abbildung 7: Real time (RT)-qPCR: relative Expression diverser microRNAs. Die anteilmäßige Expression verschiedener miRs (*percentage of reads*) in Mäuseherzen, nach Zusammenfassen zu miR-Familien (männliche Tiere als schwarze, weibliche Tiere als weiße Balken dargestellt)
Quelle: Rao PK et. al., 2009.

Da auch Rao et al. (Rao PK, 2009) in ihrer Arbeit davon ausgingen, dass miRs mit identischen Sequenzen an ihrem 5'-Ende in ähnlicher Weise agieren, fassten sie anschließend einzelne miRs nach ihrer *seed*-Region zu Familien zusammen (Abbildung 7). Dabei zeigte sich, dass die let7-/ miR-98-Familie mit etwa 14% und die miR-30-5p mit etwa 5% aller kardial exprimierten miRs, die zweit- beziehungsweise dritthäufigste miR-Familie waren (Abbildung 7). Dies könnte auf die Bedeutung der bisher wenig untersuchten let-7- und miR-30-Familie im Herzen hinweisen, da die physiologische Relevanz einer miR oft mit deren Expressionsniveau zu korrelieren scheint.

4. 1. 4. Detektion

In diesem Zusammenhang interessierte uns auch wie stark die einzelnen miR-30-Mitglieder im Herzen im Vergleich zu anderen Organen exprimiert sind. Um dies zu untersuchen haben wir verschiedene Organe von adulten, männlichen C57BL/6-Mäusen entnommen und anschließend RNA isoliert. Mit für jedes Organ gepoolter RNA haben wir dann *Northern blots* für die einzelnen miR-30-Familienmitglieder durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen miR-30-Mitglieder co-exprimiert waren, mit der stärksten Expression in Herz und Lunge, aber auch starker Expression in Muskel, Gehirn und Niere (Abbildung 8).

Des weiteren zeigte sich, dass miR-30c und miR-30b deutlich stärker als miR-30a, -30d, -30c exprimiert waren. Man muss allerdings gewisse Vorsicht bei der Interpretation der relativen Expression walten lassen, da die Sonden für miR-30c und -30b genauso wie die *Northern blot*-Sonden für miR-30a, -30d, -30e vermutlich zu einem geringen Grade kreuzreagieren. Man kann das auch an dem Blot für miR-30c und -30b erkennen, welche bei genauem Betrachten Doppelbanden zeigen. Diese kann man vermutlich darauf zurückführen, dass miR-30c ein Nukleotid länger als miR-30b ist (vergleiche Abbildung 5).

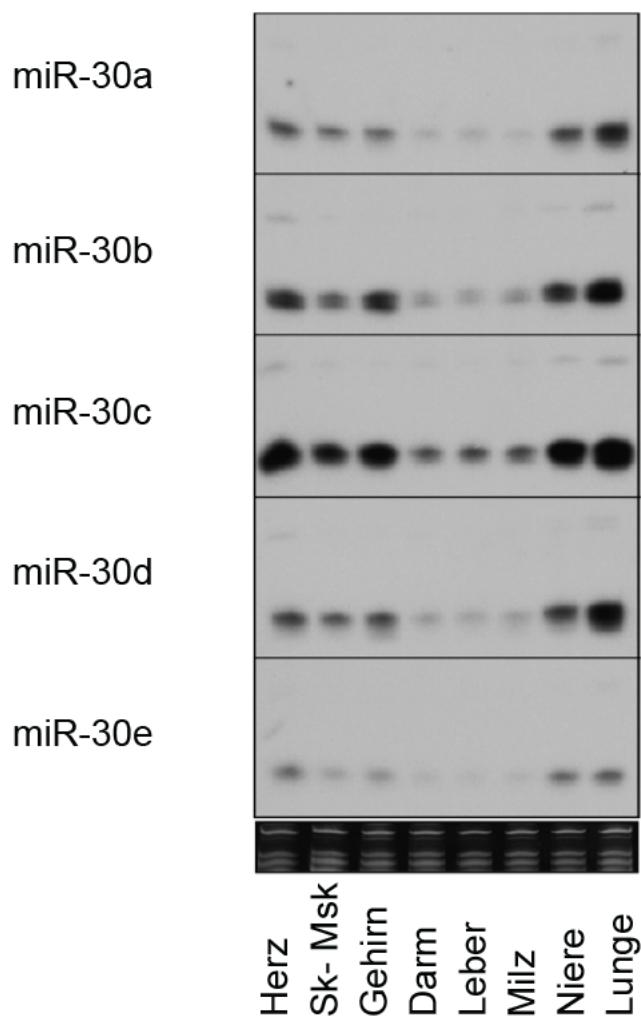


Abbildung 8: Northern blot: Expression der miR-30-Familie in verschiedenen Geweben von *Mus musculus*.

Dargestellt sind von links nach rechts: Herz, Skelettmuskulatur (Sk-Msk), Gehirn, Darm, Leber, Milz, Niere und Lunge.

Die oben erwähnte Kreuzreaktivität der *Northern blot* -Sonden liegt auch ähnlich bei den *probes* des TaqMan® MicroRNA Assay vor (Abbildung 9), sodass eine erneute Bestimmung der relativen Organexpression der miR-30-Familie mit Hilfe dieser Methode keine weiteren Erkenntnisse brachte.

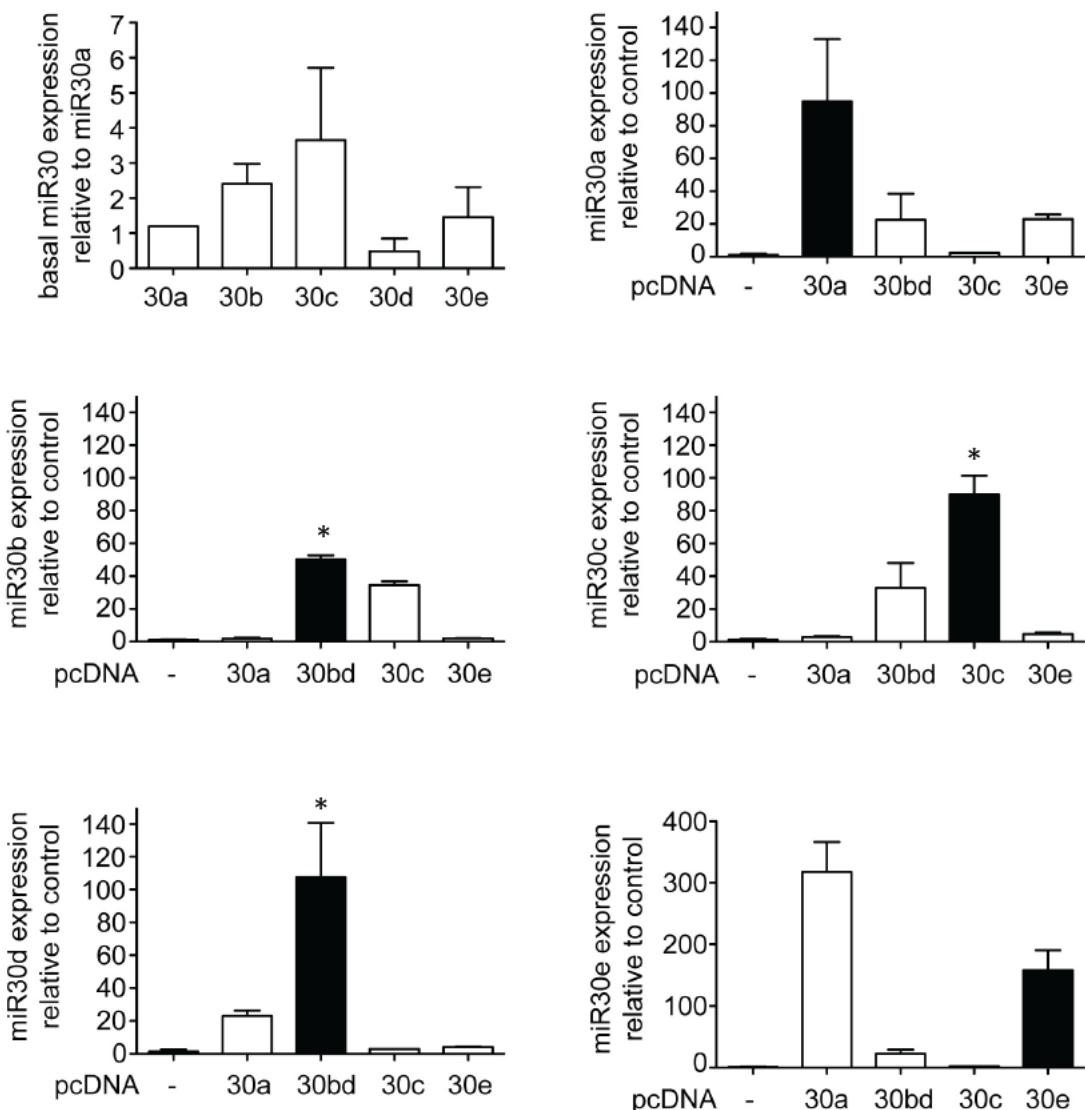


Abbildung 9: RT-qPCR: Spezifität der Probes für miR-30 in cos-Zellen.

Die Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der RT-qPCR, dargestellt als Expression der entsprechenden miR-30 im Vergleich zur Kontrolle. Für das Umschreiben in cDNA wurde jeweils die spezifische probe für die mit schwarzem Balken versehene miR-30 verwendet. Anschließend erfolgte für jede miR-30 eine RT-qPCR. Der linke Balken ohne Legende entspricht als Kontrolle einem sample, das nicht in cDNA umgeschrieben wurde. Die Abbildung oben links beschreibt noch einmal zum Vergleich die basale miR-30 Expression in cos-Zellen. n=4. * = p<0,05

Diese fälschliche Detektion gilt, wie bereits erwähnt, vor allem für miR-30-Mitglieder der gleichen Untergruppe, was wahrscheinlich dadurch bedingt ist, dass sich diese einander ähnlicher sind (vergleiche Abbildung 5).

4. 2. Regulation von miR-30 bei kardialen Umbauvorgängen

Nachdem wir nun also wussten, dass miR-30 im Herzen besonders stark exprimiert ist, wollten wir testen, ob die miR-30-Expression bei Herzinsuffizienz reguliert ist. Dazu haben wir Genarrays mit *Affymetrix*-Chips von Herzen herzinsuffizienter Patienten und mit gesunden Kontrollen durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die kardiale Expression von miR-30 bei Menschen mit Herzinsuffizienz im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe um etwa die Hälfte, im Falle von miR-30e sogar um fast 75%, vermindert war (Abbildung 10A). Aufgrund der geringen Probenzahl wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

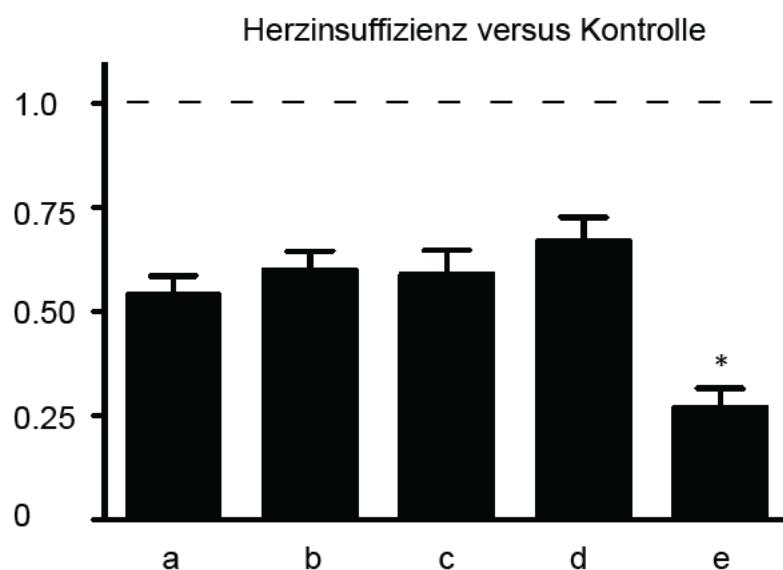


Abbildung 10A: Microarray: Relative Expression der miR-30-Familie beim Menschen.

Vergleich der relativen Expression der einzelnen Mitglieder der miR-30-Familie in menschlichen Herzen bei Patienten mit Herzinsuffizienz n=9 zu einer gesunden Kontrollgruppe (Kontrolle).

n=10, * = p<0,05.

Darüberhinaus untersuchten wir die miR-30 Expression bei Mäusen, bei denen durch Abklemmen der RIVA (*Ramus interventricularis anterior*) ein Myokardinfarkt (MI) induziert worden war (im Folgenden auch als *Post MI* bezeichnet) im Vergleich zu kontrollierten Gruppe (*Sham*).

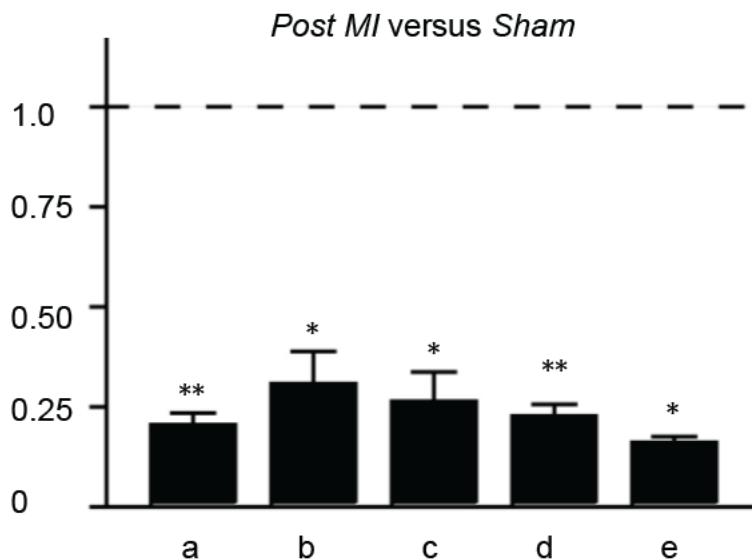


Abbildung 10B: RT qPCR: Relative Expression der miR-Familie.

Vergleich der relativen Expression der einzelnen Mitglieder der miR-30-Familie nach Myokardinfarkt (*Post MI*) n=6, ausgelöst durch Abklemmen von Koronararterien; gegenüber der *Sham*-operierten Kontrollgruppe (*Sham*) n=6.

* = p<0,05. ** = p<0,005.

Eine Woche nach Induktion des Myokardinfarkts wurden die Herzen entnommen, RNA isoliert und anschließend mit Hilfe von RT-qPCR die Expression der miR-30-Familie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression aller Mitglieder der miR-30-Familie gegenüber der *Sham*-Kontrolle signifikant vermindert war (Abbildung 10B).

Um zu sehen, ob die miR-30-Familie auch bei physiologischer Hypertrophie des Myokards reguliert ist, haben wir Wildtyp-Mäuse für zehn Tage in Käfigen mit Laufrädern trainiert (= Training). Dies führt zu einer Zunahme von etwa 10% des Herzgewichts, einem Zeichen für (physiologische) kardiale Hypertrophie. Anschließend entnahmen wir wieder die Herzen, isolierten RNA und bestimmten die Expression der miR-30-Familie. Als Vergleichsgruppe dienten inaktivere Wildtyp-Mäuse ohne Training (= Kein Training).

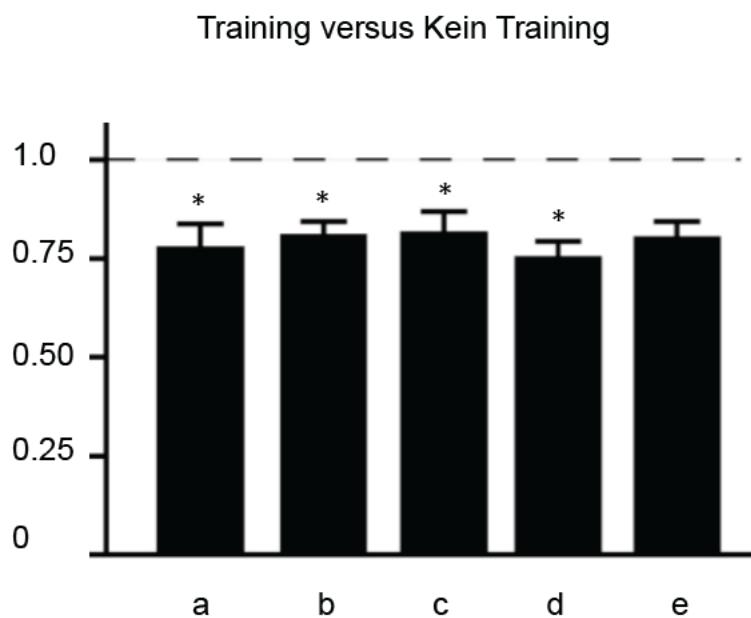


Abbildung 10C: qPCR: Relative Expression der miR-Familie.

Vergleich der relativen Expression der einzelnen Mitglieder der miR-30-Familie bei physiologischer Hypertrophie in Mäuse mit körperlicher Betätigung (Training) n=4 gegenüber inaktiveren Tieren (Kein Training) n=4. * = p<0,05.

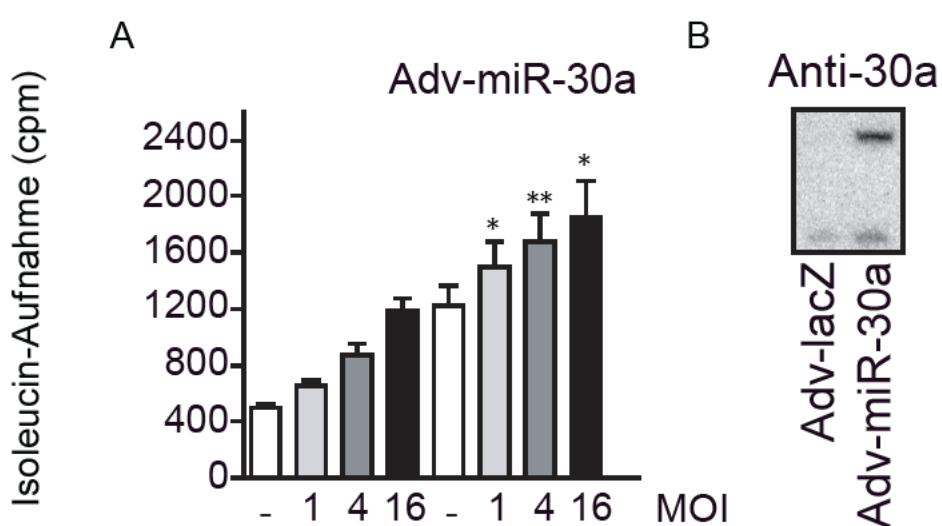
Interessanterweise zeigt sich auch in diesem Fall eine, wenn auch in Relation zu Herzinsuffizienz und nach Myokardinfarkt weniger stark ausgeprägte, signifikante Verminderung der Expression der miR-30-Familie im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 10C). Da sich die Herunterregulation von miR-30 sowohl bei pathologischen, als auch bei physiologischen *remodeling* finden lässt, könnte man spekulieren, dass die Herunterregulation von miR-30 während einer Herzinsuffizienz einen protektiven Mechanismus darstellt.

Somit scheint die miR-30-Familie nicht nur allein aufgrund ihrer bloßen Menge im Herzen eine Rolle zu spielen. Auch die Herunterregulation unter anderem bei Herzinsuffizienz lässt vermuten, dass die miR-30-Familie eine funktionelle kardiale Bedeutung besitzt.

4. 3. Überexpression der miR-30-Familie

4. 3. 1. Überexpression von miR-30 in Kardiomyozyten

Falls die Herunterregulation von miR-30 einen protektiven Effekt hätte, könnte im Umkehrschluss eine kardiale Überexpression von miR-30 zu pathologischen Umbauvorgängen führen. Um diese Hypothese zu testen, haben wir Kardiomyozyten von neonatalen Ratten (NRCM) mit miR-30a-Adenoviren transduziert, so dass diese miR-30a überexprimierten (Abbildung 11B).



Wie zuvor hypothetisiert zeigten die NRCM in Abhängigkeit der transduzierten Menge von Viruspartikeln eine signifikant gesteigerte Aufnahme von Isoleucin, was auf gesteigerte Proteinsynthese hindeutet und als indirektes Maß für Hypertrophie gewertet wird (Abbildung 11A).

4. 3. 2. Überexpression von miR-30 in transgenen Mäusen

Um diesen Effekt *in vivo* zu überprüfen, wurde eine transgene Mauslinie generiert, welche unter Kontrolle des herzspezifischen alpha Isoform der schweren Myosinkette (α MHC)-Promotors miR-30a überexprimierte (Abbildung 12), im Folgenden auch als α MHC-30a-TG bezeichnet. Da α MHC spezifisch in der kardialen Muskulatur exprimiert wird (Molkentin JD et. al., 1996), konnte mit diesen Mäusen spezifisch die Auswirkung kardialer Überexpression von miR-30a untersucht werden.

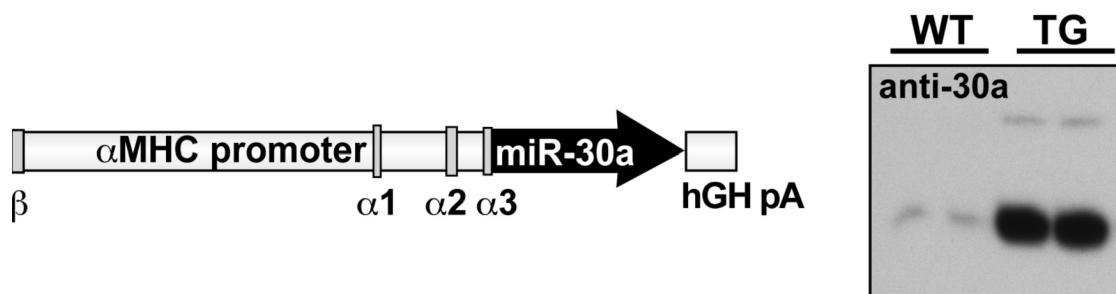


Abbildung 12: Northern blot: Kardiale Überexpression von miR-30a.
Unter Kontrolle des α MHC-Promotors wird miR-30a in transgenen Mäusen (TG) exprimiert. Deutlich bildet sich die kardiale Überexpression von miR-30a im Vergleich zum Wildtyp (WT) auf dem *Northern blot* ab.

Die schweren Ketten des Myosins werden von einer hochkonservierten, viele Gene umfassenden Familie kodiert und sowohl entwicklungs- als auch gewebespezifisch exprimiert (Subramaniam A et. al., 1991). Im Herzen finden sich die beiden Isoformen alpha und beta, welche sich in ihrer Adenosintriphosphatase (ATPase)-Aktivität unterscheiden. α MHC wird in der Fetalzeit nur schwach in den Vorhöfen exprimiert und stellt erst nach der Geburt die dominierende Isoform in den Ventrikeln dar, so dass transgene miR-30a nicht während der fetalnen kardialen Entwicklung, sondern erst postnatal im Ventrikel überexprimiert wurde.

β MHC hingegen stellt die dominierende Isoform der Ventrikel während der Kardiogenese dar und ist postpartal hauptsächlich in glatter Muskulatur und

langsamem Skelettmuskelfaser, jedoch im Herzen nur noch schwach exprimiert zu finden. Allerdings kann sich der postnatale *Switch* der beiden MHC Isoformen im Rahmen von *remodeling* zum Teil wieder umkehren, sodass in Kardiomyozyten erneut β MHC exprimiert wird (Subramaniam A et. al., 1991). Diese Reinduktion des fetalnen Genprogramms wird auch als ein Faktor im Rahmen pathologischer kardialer Hypertrophie gewertet (Molkentin JD et. al., 1998).

Im Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven von transgenen Tiere, welche miR-30a unter dem α MHC-Promotor überexprimierten, zu Wildtypen zeigte sich zunächst kein Unterschied (Abbildung 13). Ab einem Alter von etwa 100 Tagen verstarben jedoch vermehrt Tiere in der transgenen Gruppe.

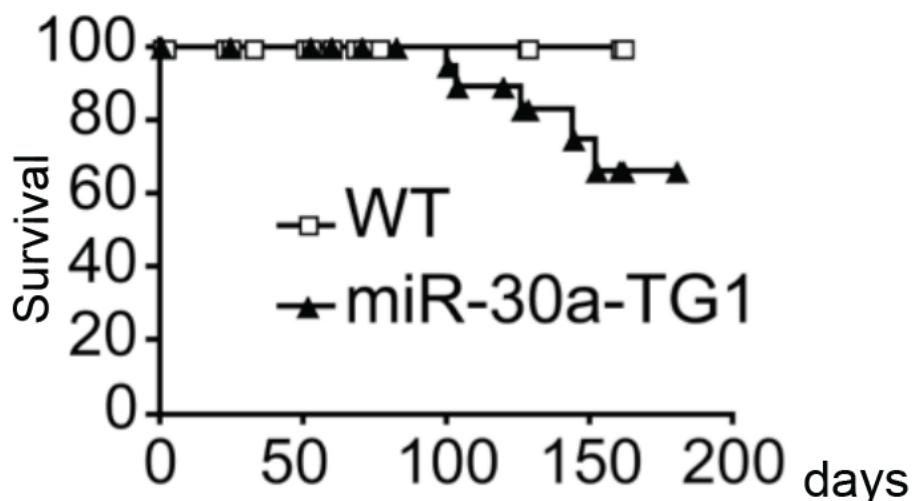


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurven:
Gegenüberstellung des Prozentanteils der Überlebenden (survival) im Verlauf über Tage (days) von transgenen Mäusen, welche miR-30a überexprimieren (miR-30a-TG1) und Wildtypen (WT).

Somit schien die Überexpression von miR-30a eine Veränderung in den Herzen der transgenen Mäusen hervorzurufen, die zu erhöhter Mortalität führte.

Anschließend wurden die Herzen von Mäusen aus Würfen, die sowohl Wildtypen als auch α MHC-30a-TG Tiere hervorgebracht hatten, makroskopisch

und histologisch auf strukturelle Unterschiede hin untersucht, um die Todesursache weiter zu analysieren. Hierfür wurden etwa sechs Monate alte Geschwistertiere euthanasiert, da um diesen Zeitpunkt der Unterschied im Überleben bereits deutlich zu erkennen war (vergleiche Abbildung 13) und man somit davon ausgehen konnte, dass die Veränderungen bereits stattgefunden hatten und ihre Herzen verglichen.

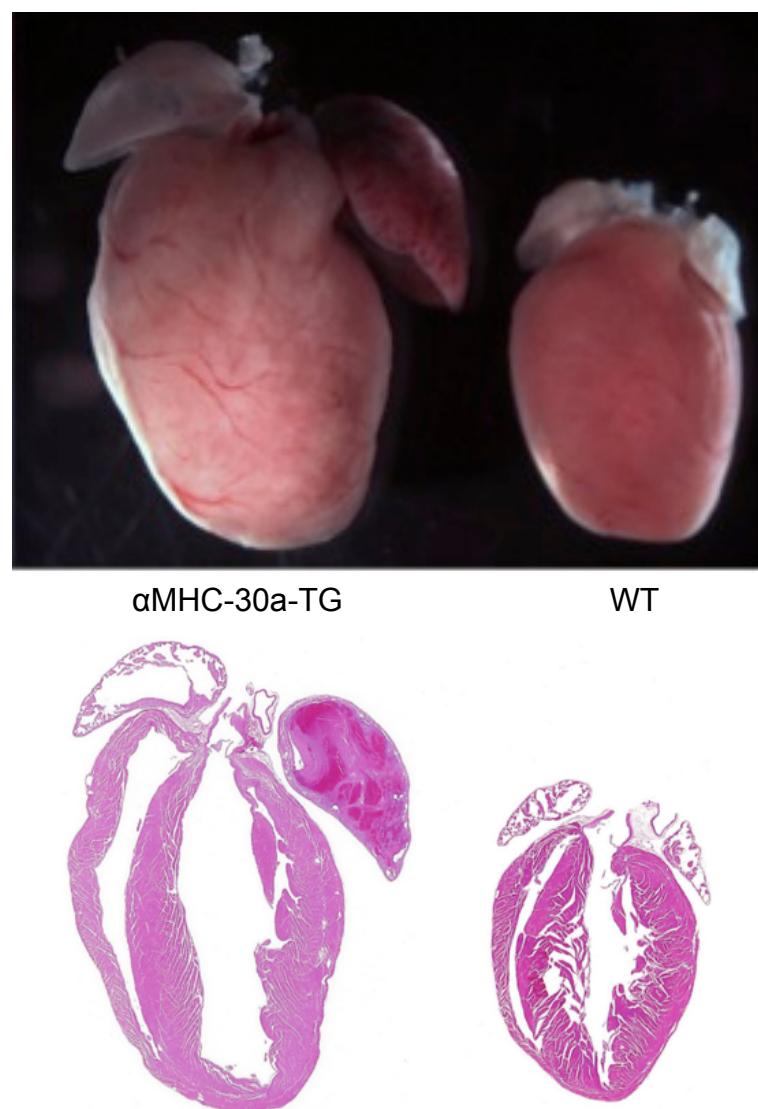


Abbildung 14: Herzen makroskopisch bzw. histologisch in HE-Färbung. Links das Herz eines transgenen Tieres (α MHC-30a-TG), rechts das eines Wildtyp (WT)- Maus.

Bereits makroskopisch fiel ein deutlicher Größenunterschied der Herzen von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen auf. Nach Fixierung in Formaldehyd wurden histologische Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Schnitte der Herzen in Vierkammer-Ansicht angefertigt. Hier erschienen die Ventrikel im Vergleich zu der Kontrollgruppe zusätzlich massiv dilatiert (Abbildung 14). Außerdem fanden wir dilatierte und mit organisierten Thromben gefüllte linke Vorhöfe, wie es auch häufig im Rahmen von Herzinsuffizienz auftritt.

Um sicher zu stellen, dass es sich dabei nicht um ein Artefakt handelt und um zusätzlich die Expression anderer miR-30-Familienmitglieder untersuchen zu können, generierten wir daraufhin transgene Mäuse mit kardialer Überexpression von miR-30c, des miR-30bd-Clusters und von miR-30e (Abbildung 15).

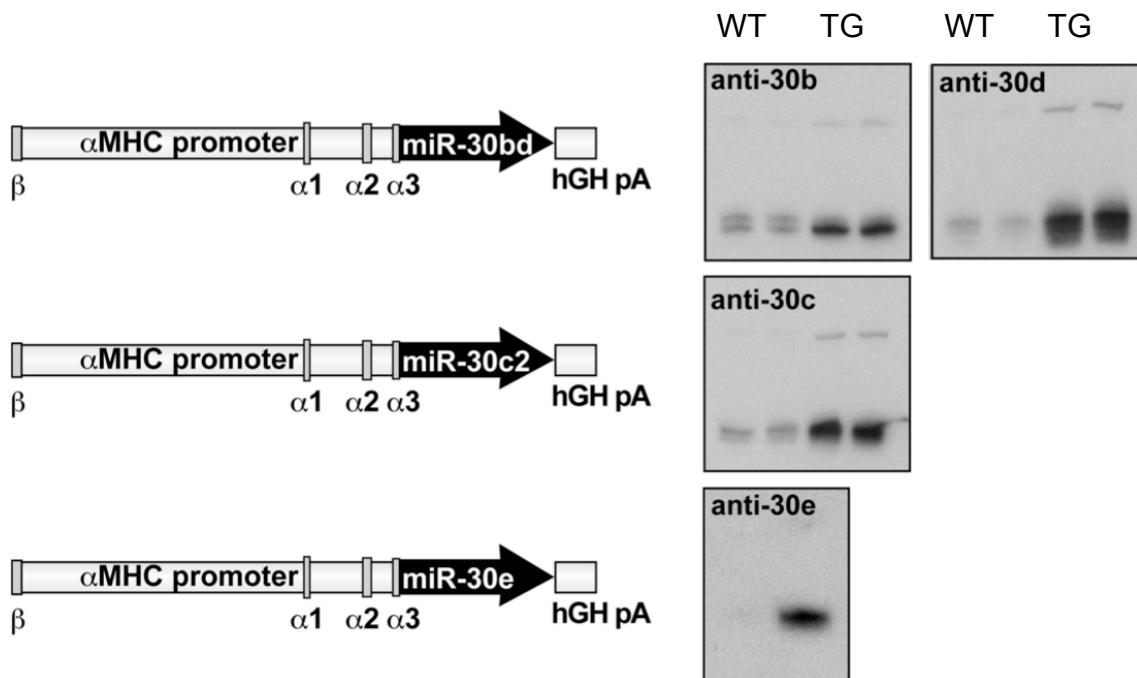


Abbildung 15: Northern blot: Expression des jeweiligen miR-30-Familienmitglieds.

Dabei sind jeweils rechts die transgenen Tiere (TG) und links die Wildtypen (WT) aufgetragen. hGH pA bezieht sich auf den Sequenzierungs-Primer.

Auch die Herzen dieser Mäuse waren makroskopisch vergrößert und die Ventrikel in der histologischen Darstellung nach Fixierung in Formaldehyd dilatiert (Abbildung 16).

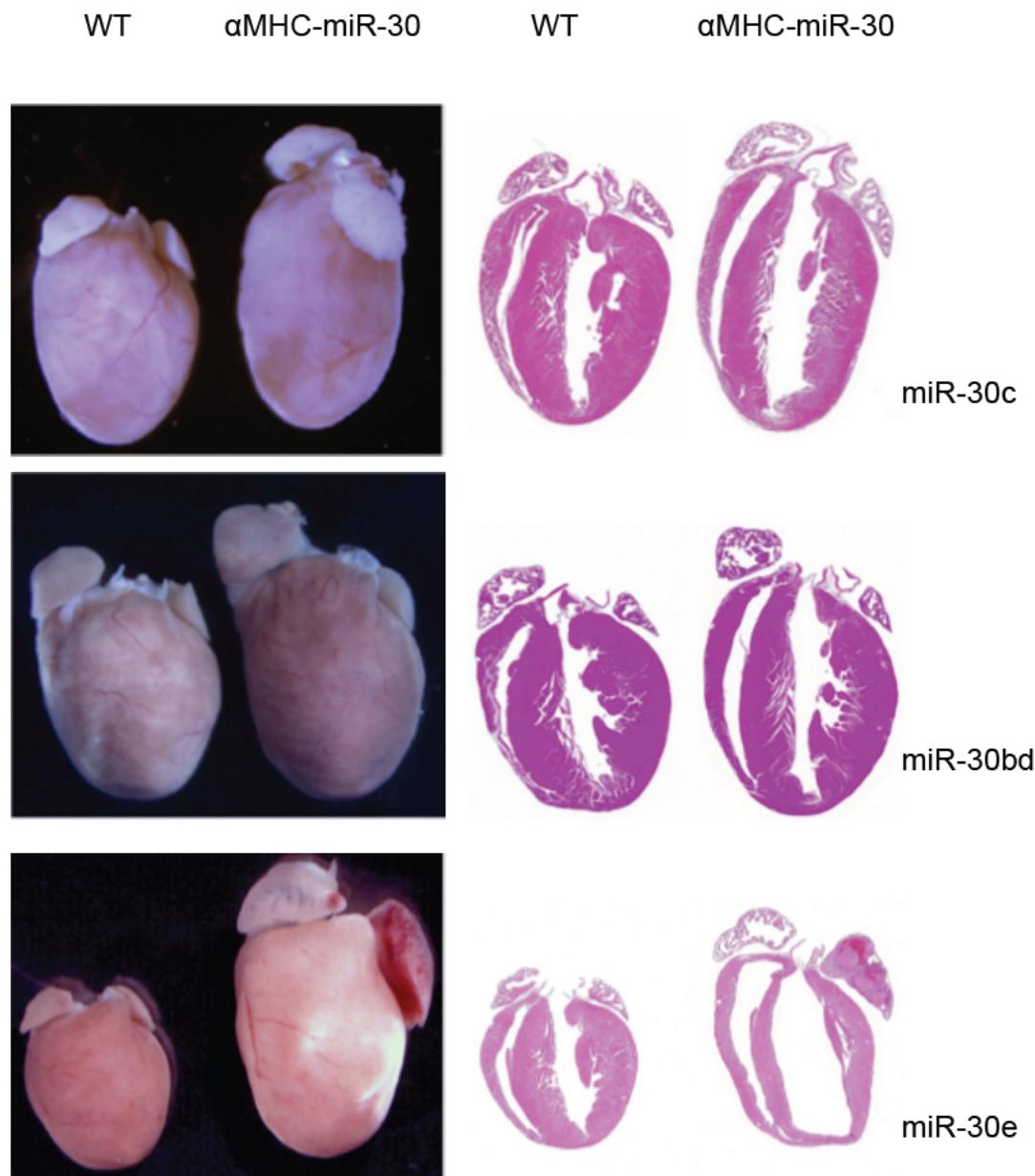


Abbildung 16: Herzen makroskopisch bzw. histologisch in HE-Färbung. Jeweils links das Herz eines Wildtyps (WT) und rechts eines transgenen Tieres (α MHC-miR-30).

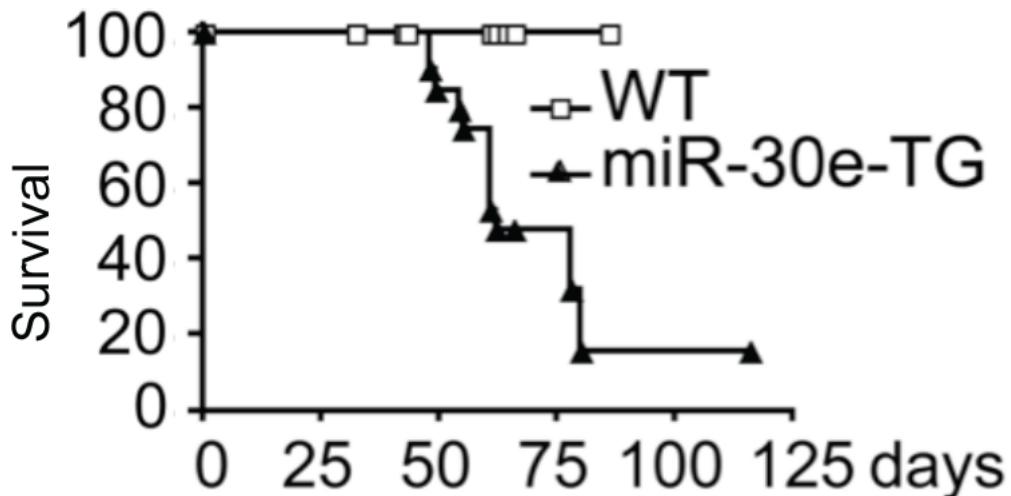


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve. Überlebenszeit (survival, Prozentangabe) in Tagen (days) von Wildtypen (WT) und transgenen Mäuse, die miR-30e überexprimieren (miR-30e-TG).

Wie in Abbildung 17 exemplarisch gezeigt, wiesen auch die Tiere dieser transgenen Linien eine deutlich erhöhte Mortalität auf. Dabei starben miR-30e-TG noch früher als miR-30a-TG. Das liegt vermutlich an der im Vergleich zur endogenen basalen Expression stärkeren Überexpression von miR-30e (vergleiche Abbildung 15 und Abbildung 21).

Die Überexpression von miR-30 scheint also ein verfrühtes Versterben der Mäuse zu bewirken und zu einer kardialen Dilatation zu führen, die als mögliche Erklärung, z. B. plötzlicher Herztod aufgrund von dilatativer Kardiomyopathie oder exzentrischer Hypertrophie, in Frage käme.

Um herauszufinden, ob die Überexpression von miR-30 initial vor der Dilatation eine myokardiale Hypertrophie induziert, wie wir es in der NRCM-Zellkultur beobachten konnten (vergleiche Abbildung 11A), haben wir das Herzgewicht (*Heart weight, HW*) von etwa zwei Wochen, sowie etwa drei Monate alten α MHC-30a-TG und Wildtypen eines Wurfs verglichen. Dabei ist es üblich das HW in Relation zum Körpergewicht (KG) anzugeben, um mögliche Größenunterschiede der Tiere zu berücksichtigen. Weder bei zwei Wochen,

noch bei drei Monate alten α MHC-30a-TG konnten wie einen signifikantem Unterschied zu Wildtypen feststellen (Abbildung 18).

Mit zunehmenden Alter reduzierte sich tendenziell die Herzgewicht- zu Körpergewicht-Ratio in den transgenen Tieren, was eher auf einen Verlust von Kardiomyozyten schließen lässt. Das bedeutet, dass die Herzen am ehesten primär aufgrund von Dilatation und nicht Hypertrophie vergrößert waren.

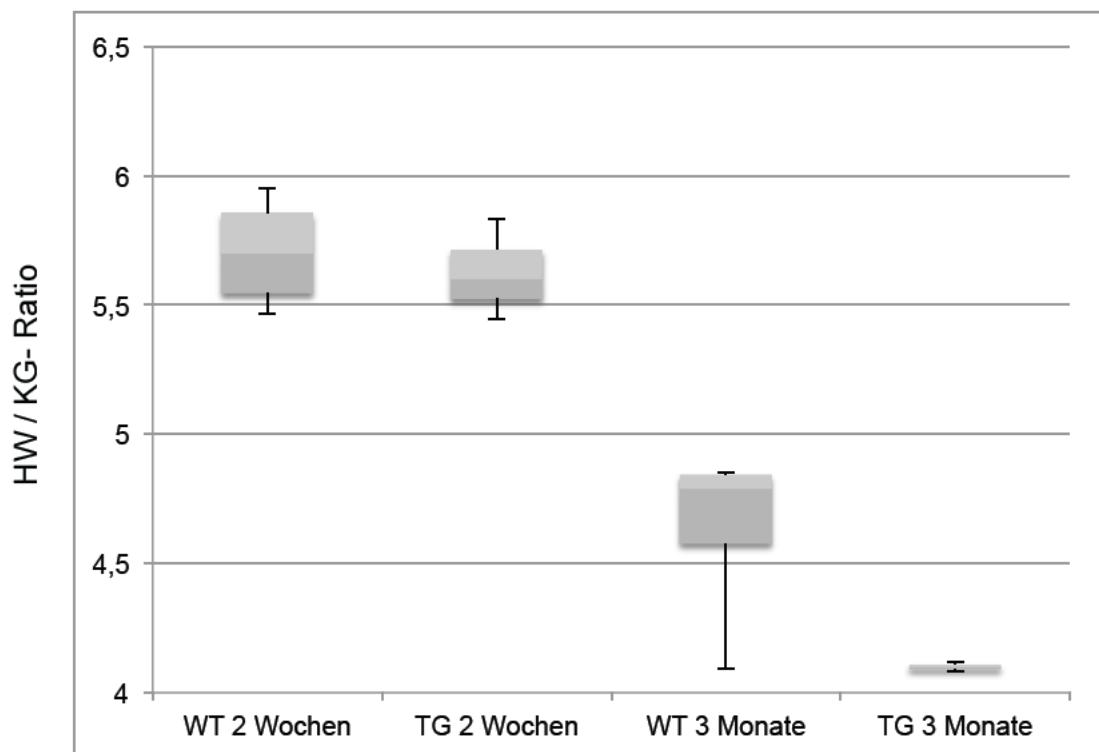


Abbildung 18: Vergleich der Herzgewicht-Körpergewicht-Ratio.
Herzgewicht-Körpergewicht-Ratio bei transgenen Tieren (TG), die miR-30a überexprimieren gegenüber Wildtypen (WT) jeweils des selben Wurfs. Links im Alter von zwei Wochen (n=4), Rechts im Alter von drei Monaten (n=3). Ergebnis nicht signifikant.

Wir sahen also nur eine Dilatation, so dass die in NRCM induzierte Hypertrophie (vergleiche Abbildung 11) *in vivo* nicht reproduzierbar war und es sich wahrscheinlich um ein *in vitro*-Artefakt handelte.

4. 4. Identifizierung möglicher Zielstrukturen

Um herauszufinden, welche Ziel-Gene von miR-30 reguliert werden, haben wir als erstes mit Hilfe eines Gen-Arrays die Genexpression in zwei Wochen alten, scheinbar noch gesunden, miR-30-TG Mäusen untersucht. Dabei fanden sich einige hundert Gene reguliert. Unter anderem auch folgende Gene, die auch bei kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen (vergleiche auch Tabelle 6, Kapitel 4. 4. 1.): EDNRA (Endothelin-Rezeptor A), ADRA2A (Adrenerger alpha-2A Rezeptor), GRK5 (*G-protein-coupled-receptor-kinase 5*), DDAH1 (Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1), RGS2 (*Regulator of G-protein signaling*), CAPN7 (Calpain 7) und CAMK2D (*Calcium-Calmodulin-dependent-protein-kinase II δ*).

4. 4. 1. Eingrenzung der Zielstrukturen

*TargetScan*⁶⁰ ist ein Programm, welches unter Berücksichtigung der seed-Sequenz einer miR mögliche, dazu passende Ziel-mRNAs anhand ihres 3'-UTR ermittelt. Dabei spielt es unter anderem auch eine Rolle, ob die Nukleotide im 3'-UTR in einer Ziel-mRNA über verschiedene Spezies hinweg konserviert sind und ob z. B. konservierte komplementäre Basenpaarung am 3'-Ende vorhanden sind, welche eine Bindung möglicherweise unterstützen (vergleiche Kapitel 1. 4.).

Die folgenden, in Tabelle 6 zusammengefassten Gene, wurden durch *TargetScan*⁶⁰ als miR-30 Zielgene prädictiert und waren im *Microarray* in miR-30a transgenen Mäusen herunterreguliert, was für eine Suppression durch miR-30a sprechen würde. Interessanterweise wurden die meisten dieser Gene bereits in der Vergangenheit mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht (Rich S et. al., 2003; Chen EP et. al., 2001; Hu X et. al., 2009; Tsang S et. al., 2010; Zhang W et. al., 2006; Letavernier E et. al., 2012; Patterson C et. al., 2011; Ling H et. al., 2009).

Gen	Protein	Beispiele für Proteinfunktionen ⁶¹⁻⁶⁸
EDNRA	<i>Endothelin-Rezeptor A</i>	Vasokonstriktion. Dysreguliert bei Herzinsuffizienz.
ADRA2A	<i>Adrenerger alpha-2A Rezeptor</i>	Rezeptor des sympathischen Nervensystems. Mitregulation der Transmitterausschüttung.
GRK5	<i>G-protein coupled receptor kinase 5</i>	Hochregulation bei Herzinsuffizienz.
DDAH1	<i>Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1</i>	Mitregulation der NO-Bioverfügbarkeit.
RGS2	<i>Regulator of G-protein signaling</i>	Spielt eine Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen.
CAPN7	<i>Calpain 7</i>	beeinflussen die Signaltransduktion von Herzversagen und <i>remodeling</i> , Therapieansätze werden diskutiert.
CAMK2D	<i>Calcium-Calmodulin-dependent-protein-kinase II δ</i>	Unter anderem am Übergang zu Herzversagen beteiligt.

Tabelle 6: Vorauswahl möglicher Zielstrukturen.

Dem jeweiligen Gen wurden Proteinname und Proteinfunktion im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen gegenübergestellt.

4. 4. 2. Luciferase-Assays

Anschließend führten wir so genannte Luciferase-Assays durch, um zu untersuchen, ob diese mRNAs nur indirekt reguliert wurden, oder direkt mit miR-30 interagieren können (vergleiche Kapitel 3. 15.). Wenn man davon ausgeht, dass miRs die Expression eines Proteins vor allem über den 3'-UTR einer mRNA regulieren, kann man ein Plasmid-Konstrukt erstellen, in dem das Luciferase-Gen mit dem 3'-UTR eines zu überprüfenden potentiellen Zielgens gekoppelt wird. Reguliert die miR das Gen, d. h. bindet sie direkt an den 3'-UTR, sollte die Co-Expression der miR zu einer Degradation der mRNA bzw. Inhibition der Translation und damit letztendlich zu geringeren Mengen an Luciferaseprotein führen. Da die Menge an Luciferase proportional zu der messbaren Menge an Licht ist, die im anschließenden Assay photometrisch gemessen wird, kann man die Stärke der Suppression quantifizieren.

Nach Identifizierung der Bindestelle für miR-30 in den 3'-UTRs der einzelnen möglichen Zielgene, haben wir diese 3'UTRs aus dem Genom der Maus amplifiziert und hinter das Luciferase-Gen im Vektor pMiR kloniert (= "*Inserts*").

Abbildung 19 zeigt die Lokalisation der putativen miR-30-Bindestellen in den einzelnen 3'UTRs.

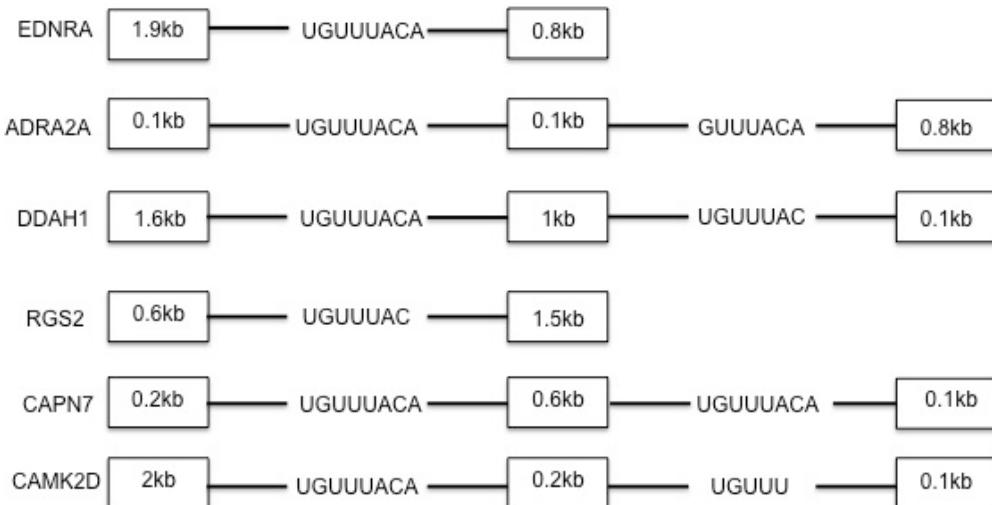


Abbildung 19: Inserts für pMIR-REPORT®.

Die einzelnen 3'-UTRs besitzen ein bis zwei Bindestellen für miR-30 (UGUUUAC), diese Bindestellen müssen allerdings nicht immer alle acht Nukleotide besitzen. Die Bindestellen werden von 100 bis 2000 Basenpaaren (bp) flankiert Nach *TargetScan*⁶⁰.

Anschließend wurden die Konstrukte zusammen mit verschiedenen Mengen an miR-30-Vektor (p6CMV-miR-30, 0 – 50 ng – 100 ng – 200 ng, vergleiche Tabelle 5) in Triplikaten in cos-Zellen transfiziert. Idealerweise sollte die miR dabei dosisabhängig die Luciferase-Aktivität inhibieren.

Nachdem den cos-Zellen 48 Stunden Zeit zur Aufnahme der Vektoren und Expression von miR und Luciferasekonstrukt gegeben worden war, erfolgte der eigentliche Assay, bei dem die Luciferase-Aktivität photometrisch ermittelt wurde. Erfolgte tatsächlich eine Suppression des 3'-UTR durch miR-30, so zeigte sich das in einer Abschwächung der Luciferase-Aktivität und damit, als messbare Größe, auch als Abschwächung des Lichtsignals.

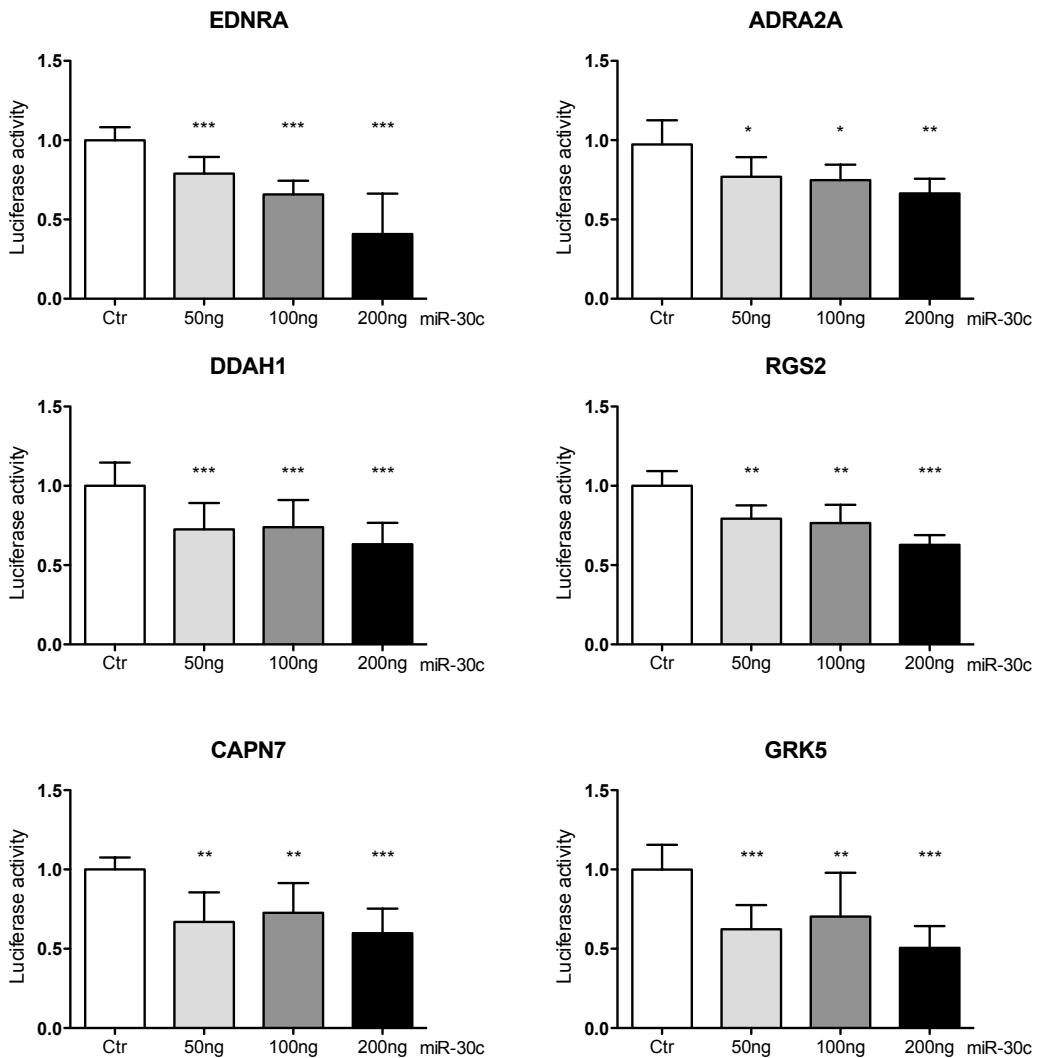


Abbildung 20: Luciferase-Assays: Suppression durch miR-30c.

Auf der Y-Achse die Aktivität des Luciferase-Enzyms (*luciferase activity*), welche in einer indirekt proportionalen Beziehung zur Suppression durch die miR steht. Die X-Achse beschreibt die Menge transfizierter miR-30c, neben der Kontrolle (Ctr), in welche keine miR transfiziert wurde. n=24. * = p<0,05 ** = p<0,005 *** = p<0,001.

Für mehrere der 3'-UTRs kam es zu der erwarteten Abschwächung des Lichtsignals, sobald miR-30c co-transfiziert wurde (Abbildung 20). In der Folge führten wir das selbe Experiment mit anderen Mitgliedern der miR-30-Familie durch, wobei wir das Ergebnis reproduzieren konnten.

Somit stellen die 3'-UTR von EDNRA, ADRA2A, DDAH1, RGS2, CAPN7 und GRK5 mögliche Zielstrukturen für miR-30 dar. Daraufhin ergab sich die

Überlegung, ob die Überexpression der miR-30-Familie in Mäusen über die Degradation oben genannter mRNAs und damit verminderter Proteinsynthese ihrer Genprodukte zu den kardialen Veränderungen führt, die an den transgenen Mäusen beobachtet worden sind.

Wie oben erwähnt verwenden wir cos-Zellen anstelle von Kardiomyozyten, da diese nicht nur besser in Zellkultur wachsen, sondern auch, da Kardiomyozyten sehr schwer zu transzitieren sind. Dadurch werden besser reproduzierbare Ergebnisse erreicht. Bezuglich ihres Expressionsmusters der miR-30-Familie sind sie vergleichbar mit dem in Kardiomyozyten (Abbildung 21 und Abbildung 8).

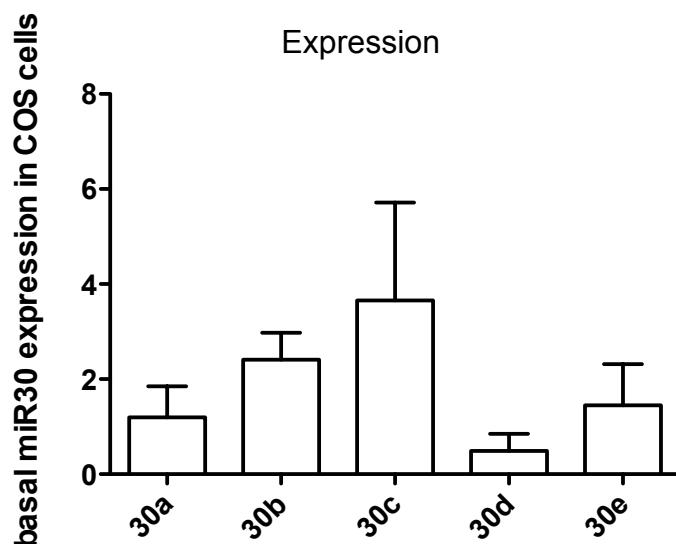


Abbildung 21: RT-qPCR: basale miR-30 Expression in cos-Zellen (COS cells).

Die einzelnen Mitglieder der miR-30-Familie wurden nach Isolation der RNA aus den Fibroblasten quantifiziert und in Relation zu miR-30a dargestellt.

4. 4. 3. Möglichkeiten der Hemmung von *microRNAs*

Wenn es sich bei oben genannten 3'-UTRs um Zielstrukturen von miR-30 handelt und eine Überexpression der miR zur Degradation der mRNA und damit verminderter Proteinsynthese führt, müsste im Umkehrschluss auch das Gegenteil zutreffen: bei Fehlen oder verminderter von miR-30 müsste vermehrt mRNA bzw. Protein nachweisbar sein.

Eine Möglichkeit, um die miR-30-Expression herunter zu regulieren, ist die Generierung von Knockout-Mäusen (K.O.-Mäuse), die miR-30 nicht mehr exprimieren können. Solche K.O.-Mäuse sind jedoch äußerst schwer zu generieren, da es sich bei miR-30 um eine Familie handelt, die an verschiedenen Stellen im Genom lokalisiert ist (vergleiche Abbildung 6). Die Generierung von K.O.-Mäusen würde in diesem Fall schließlich eine Elimination vom mindestens vier, wenn nicht gar sechs Genomabschnitte bedeuten.

Demnach ist es einfacher die gewünschten miRs zu hemmen: Dies kann einerseits mit miRNA *sponges* erfolgen, welche stark exprimierte Transgene mit multiplen, meist vier bis zehn, miR-Bindestellen darstellen (Ebert MS et. al., 2010). Solche Bindestellen sind gegen die *seed*-Sequenz gerichtet, so dass miRNA *sponges* die miRs eine Familie „aufsaugen“ beziehungsweise abfangen. Sie werden mittels Transfektion oder Transduktion in den Organismus eingebracht und können sowohl eine Kurz-, wie auch Langzeitwirkung ausüben (Stenvang J et. al., 2012). Die Inhibition von miRs ist jedoch sehr variabel ausgeprägt (Ebert MS et. al., 2010)

Eine andere Technik sind sogenannte *antimiR*, welche als *Antisense*-Oligonukleotide zu miRs kompetitiv mit den eigentlichen Zielstrukturen um die miR-Bindestelle, die *seed*-Sequenz, konkurrieren. Sie werden als intravenöse, subkutane oder intraperitoneale Injektion verabreicht und können ebenfalls eine Kurz-, wie auch Langzeitwirkung besitzen (Stenvang J et. al., 2012). Es existiert eine Vielfalt an möglichen *antimiRs*, im Folgenden beschränkten wie uns jedoch auf zwei Formen. Erstens eine *antimiR* aus einer Klasse unkonjugierter, kleiner, bizyklischer RNA-Analoga (*tiny*), auch als *locked*

nucleic acid (LNA) bezeichnet, welche in der Regel ausschließlich zur *seed*-Sequenz komplementär sind und mit die höchste Affinität zu RNA aufweisen. Zweitens 3'-Cholesterin-konjugierte, 2'-O-Methyl-Oligonukleotide, auch als *antagomirs* bezeichnet, deren Bioverfügbarkeit und Stabilität durch die genannten Modifikationen gesteigert wird und welche sehr spezifisch und effizient wirken (Krützfeldt J et. al., 2005).

4. 4. 6. Knockdown der miR-30-Familie mit Hilfe von antimiR-30

Wir konnten zeigen, dass nach intravenöser Applikation zweier verschiedener (im Folgenden 1 bzw. 2) antimiR-30 in die Schwanzvene, die Suppression der ganzen miR-30-Familie mit 16nt langen antimiR (*16mer*) erfolgt (Abbildung 22). Die Expression der miR-30-Familie vermindert sich dabei auf etwa 20% des Ursprungswertes.

Anstelle der miR-Bande erscheint auf dem *Blot* eine neue, größere Bande (vergleiche Abbildung 22), die wahrscheinlich die an die antimiR gebundene, damit auch funktionslose miR-30 darstellt. Diese wird von der *Northern blot*-Sonde jedoch noch erkannt.

Der Effekt der *tiny*-antimiR fiel hingegen nicht so stark aus und minderte die Expressionstärke der miR nur unwesentlich. Das könnte vielerlei Ursachen haben, entweder ist die LNA instabil, da ihr die oben genannten Modifikationen fehlen, sodass sie gar nicht erst in die Zelle gelangt, oder sie wird z. B. bald im Zytoplasma degradiert.

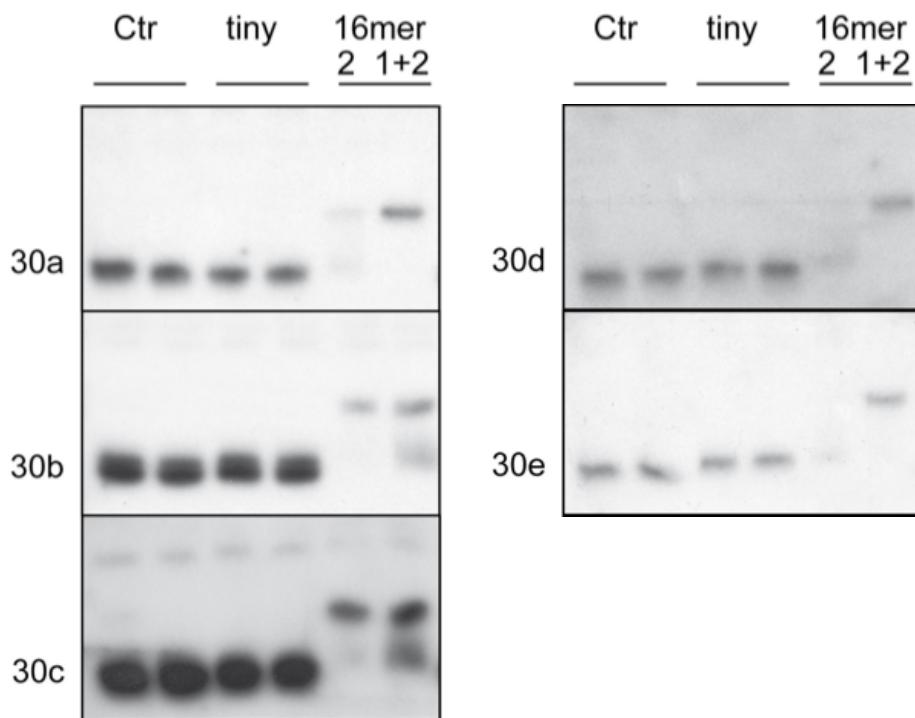


Abbildung 22: Northern blot: Kardiale Expression der miR-30-Familie.

Jeweils links die basale Expression als Kontrolle (*Ctr*), mittig nach Inhibition mit einer kleinen (*tiny*) beziehungsweise rechts mit zwei verschiedenen, größeren antimiR (*16mer*, nur 2 bzw. 1 und 2).

Der miR-30-Knockdown müsste in der Folge einen Anstieg der Ziel-mRNA-Konzentration und letztlich auch der Proteinkonzentration nach sich ziehen. Um diesen Anstieg an mRNA beziehungsweise Protein im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen, eignet sich z. B. eine RT-qPCR für den Nachweis der mRNA, respektive ein Western Blot für den Proteinnachweis.

Für DDAH1 führten wie bereits eine RT-qPCR durch, nachdem antimiR-30 in die Schwanzvene von C57BL/6-Mäusen appliziert worden war und verglichen die Expressionsstärke von DDAH1-mRNA in der Aorta mit der von unbehandelten C57BL/6-Mäusen (Abbildung 23). Im Vergleich zur Kontrolle kam es zu dem erwarteten Anstieg des Proteins bei Gabe von miR30-antimiR.

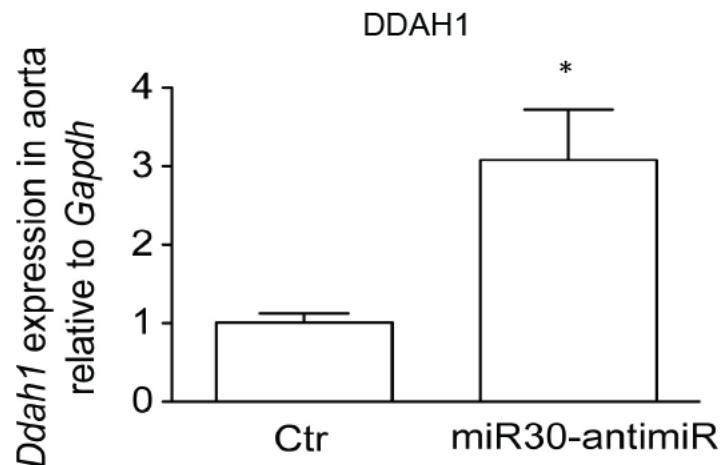


Abbildung 23: RT-qPCR: DDAH1-mRNA-Expression nach antimiR-Applikation. Quantifizierung der aortalen Menge von DDAH1-mRNA normiert auf die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), basal (Ctr) und nach miR30-antimiR-Applikation (miR30-antimiR). n=6. * = p<0,05.

Auch für andere mögliche Zielstrukturen der miR-30-Familie verglichen wir die kardiale Expression der jeweiligen mRNA (CAMK2D, EDNRA, GRK5) in C57BL/6-Mäusen nach Injektion von antimiR-30 und entsprechenden Kontrollen (Abbildung 24 und 25).

Bei diesem und folgenden Experiment verwendeten wir einmal nur eine der beiden antimiR-30 (2) und einmal beide (1+2), da der *Northern blot* (vergleiche Abbildung 22) Hinweise geliefert hatte, dass der Effekt des *Knockdowns* der miR-30 durch beide antimiR-30 stärker ist als der durch eine antimiR-30. Hierdurch müsste sich ein dosisabhängiger Effekt der mRNA-Expression ergeben.

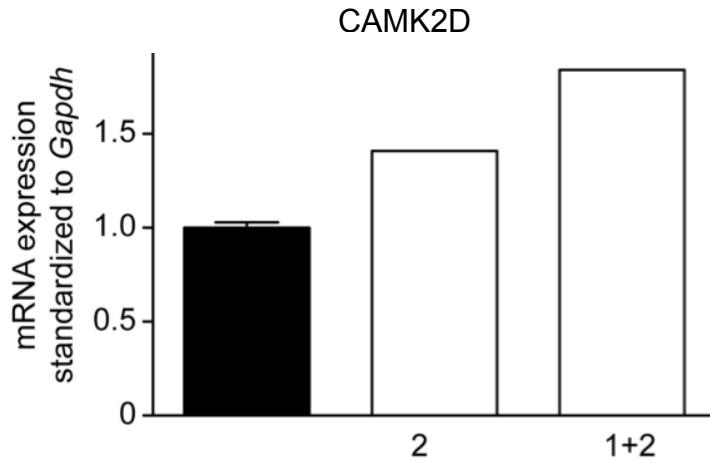


Abbildung 24: RT-qPCR: CAMK2D-mRNA-Expression im Herzen.

Expressionstärke der CAMK2D-mRNA normiert auf die Expression der GAPDH (*Gapdh*), basal (schwarzer Balken) und nach Applikation von miR30-antimiR (eine antimiR-30: 2, bzw. beide antimiR-30: 1+2). Weiße Balken ohne Fehlerbalken aufgrund der geringen Probengröße. Ergebnis nicht signifikant.

Für die mRNA der CAMK2D ließ sich der Anstieg besonders gut nachweisen: bei Gabe nur einer der beiden antimiR-30 stieg die Zahl der mRNA-Kopien um fast 50%, bei Gabe beider antimiR-30 sogar um fast 100% (Abbildung 24).

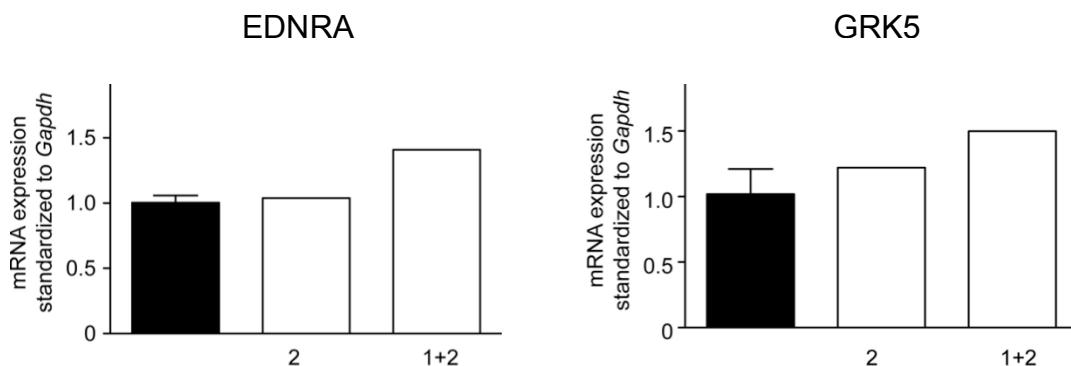


Abbildung 25: RT-qPCR: mRNA-Expression von EDNRA und GRK5 im Herzen.

Expressionstärke der jeweiligen mRNA normiert auf die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*), basal (schwarzer Balken) und nach Applikation von miR30-antimiR (eine antimiR-30: 2, bzw. beide antimiR-30: 1+2). Weiße Balken ohne Fehlerbalken aufgrund der geringen Probengröße. Ergebnis nicht signifikant..

Nicht so deutlich, aber dennoch zu einem Anstieg der mRNA-Kopien kam es nach Hemmung von miR-30 bei EDNRA und auch GRK5 (Abbildung 25). Diese Ergebnisse sind aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht signifikant und müssen bei weiteren Mäusen noch wiederholt werden, sobald weitere Würfe verfügbar sind.

Um eine weitere Aussagen zu treffen, müssten diese Ergebnis weiterhin hinsichtlich der Auswirkung auf die Proteinsynthese im Herzen überprüft werden. Käme es auch auf dieser letzten Ebene zu dem beobachteten Anstieg, könnte man die Beobachtungen auf *in vivo* Experimente an Mäuse ausweiten und die kardioprotektive Rolle von miR-30 *in vivo* ermitteln: So z. B. ob bei kardialem Stress, etwa nach Induktion eines Herzinfarktes, ein besseres *outcome* besteht, wenn miR-30 in geringeren Mengen exprimiert war (z. B. nach Applikation von antimiR-30).

4. 5. Bedeutung der miR-30-Familie in der Entwicklung

Eine Therapie mit antimiR-30 kann jedoch nur dann erfolgversprechend sein, wenn die miR-30-Familie für einen Großteil der pathologischen Veränderungen verantwortlich ist. Daher ist es unter anderem wichtig zu differenzieren, ob allein die miR-30-Überexpression für den in Kapitel 4. 3. beschriebenen Phänotyp verantwortlich ist, oder ob erst, wie bei vielen Krankheiten zu sehen, ein Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und Genetik (multifaktorielle Ätiopathogenese) nötig ist.

Untersuchungen an Mäusen in ihrer Entwicklung von der Embryonalzeit (ab Tag 13,5 der Embryonalentwicklung) bis hin zum erwachsenen Tier haben gezeigt, dass die miR-30-Familie bereits zu einem frühen Zeitpunkt exprimiert wird (Abbildung 26). Der Promotor α MHC ist jedoch erst *post partum* aktiviert (vergleiche Kapitel 4. 3. 2.).

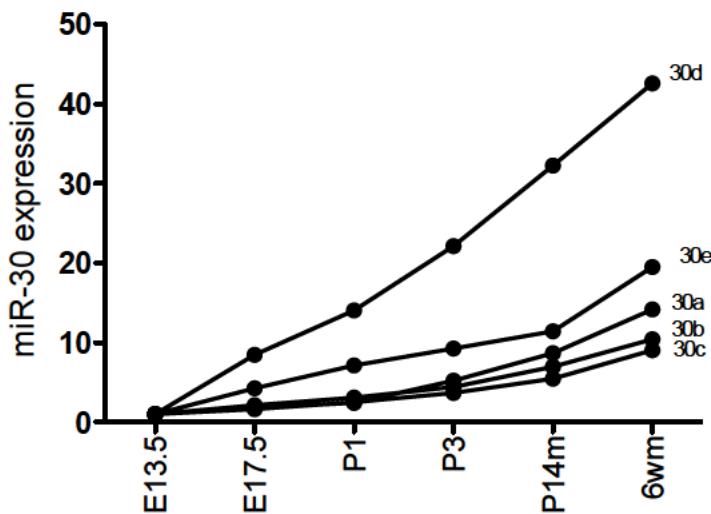


Abbildung 26: RT-qPCR: miR-30-Expression während der Entwicklung. Die RNA wurde aus Herzen an verschiedenen Zeitpunkten isoliert, die von der Embryonalzeit (E13.5, E17.5), über Tiere von Tag 1, 3, 14 *post partum* (P1, P3, P14) bis zum adulten, sechs Wochen alten Tier (6w) reichen. Sobald eine Differenzierung möglich war, wurden männliche Tiere gewählt (m). Vergleich jeweils zum Tag 13.5 der Embryonalentwicklung (E13.5).

Um die Bedeutung von miR-30 auch am pränatalen Herzen zu untersuchen, begannen wir eine weitere Mauslinie zu generieren: diese exprimiert bereits in der Entwicklung miR-30 unter dem CAG-Promotor (eine Kombination von CMV-*early-enhancer-element* und *chicken-beta-actin promoter*). Das Ablesen des Konstrukts wird von einem Stop-Codon gehemmt, das an seinen *loxP sites* erst durch das Cre-Enzym (*Cyclization-recombination*-Enzym), auch Cre-Lox-Rekombinase, entfernt werden muss, wodurch der Promotor aktiviert wird. Diese Cre-Lox-Rekombinase wird von einer anderen Mauslinie unter dem Nkx2.5-Promoter, einem frühen Transkriptionsfaktor, der nur im Herzen zu finden ist, gebildet. Um den CAG-Promotor zu aktivieren, muss man diese beiden Mauslinien kreuzen und erhält in der nachfolgenden Generation Tiere mit aktivem CAG-miR-30.

Wir erhielten vier transgene Tiere, die das (inaktive) Konstrukt CAG-miR-30 exprimieren (Beispiel: siehe Abbildung 27). Diese lassen sich selektionieren, da nur sie die beta-Galactosidase exprimieren, mit Hilfe derer sie das chromogene 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) spalten können.



Abbildung 27: Transgene Mäuse. Die transgenen Mäuse (TG) lassen sich leicht identifizieren, da nur sie mit Hilfe des Enzyms X-Gal spalten und es dadurch zur charakteristischen Blaufärbung kommt, hingegen die Wildtypen (WT) nicht angefärbt werden.

Für zukünftige Experimente, sobald die CAG-miR-30-Line zahlreich genug ist, kann sie mit Nkx2.5-Cre-Mäusen gekreuzt werden. Die F1-Generation wird dann miR-30 ausschließlich im Herzen überexprimiert, da Nkx2.5 den Promotor nur kardial aktiviert.

Dabei sind verschiedene Szenarien denkbar: Einmal kann die kardiale Überexpression von miR-30 bereits vor der Geburt letal sein, was auf schwerwiegende Entwicklungsstörungen am Herzen schließen lässt. Oder, die Mäuse überleben zwar bis zur Geburt, versterben dann aber verfrüht. Dies kann, als eine unter vielen Möglichkeiten, aufgrund kardialer Dekompenstation geschehen und müsste weiter hinsichtlich Co-Faktoren der Umwelt untersucht werden, beziehungsweise wie sich ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und miR-30 herstellen lässt. Andererseits kann es natürlich auch zu einem weitgehend unauffälligem Phänotyp kommen, was z. B. durch mögliche Adoptionsvorgänge bereits vor der Geburt zu erklären wäre.

5. Diskussion

5. 1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer Gruppe ähnlicher *microRNAs*, der miR-30-Familie. Dabei wollten wir mögliche Funktionen dieser Familie im Rahmen von kardialem *remodeling* bei Herzinfarkt und Herzinsuffizienz erarbeiten.

Zusammenfassend lässt sich aus den Befunden folgern, dass die miR-30-Familie bei pathologischem kardialem Stress, wie es z. B. nach Herzinfarkt oder bei Herzinsuffizienz der Fall ist, herunterreguliert wird. Interessanterweise trifft dies auch bei „positivem Stress“ im Sinne von physiologischer Hypertrophie zu, wodurch sich erste Hinweis auf eine mögliche kardioprotektive Funktion der miR-30-Familie ergaben.

Untersucht man experimentell das Gegenteil, das heißt eine Hochregulation der miR-30-Familie, so zeigten Kardiomyozyten in der Zellkultur bei Überexpression von miR-30 eine verstärkte Proteinsynthese bzw. Isoleucininkoporation, was ein indirektes Maß für Hypertrophie darstellt.

In Studien mit transgenen Mäusen konnten wir zeigen, dass die kardiale Überexpression von Mitgliedern der miR-30-Familie zu dilatativer Kardiomyopathie und einem verfrühten Sterben der transgenen Tiere im Vergleich zu nicht-transgenen Geschwistern führte. Jedoch fanden wir *in vivo* keine Anzeichen einer myokardialen Hypertrophie, wie wir aufgrund der *in vitro* Experimente mit miR-30-Überexpression in isolierten Rattenkardiomyozyten erwartet hatten. Der Grund für die Diskordanz dieser Ergebnisse ist nicht klar. Aber wir vermuten, dass entweder die starke adenovirale Überexpression von miR-30 *in vitro* zu einem Artefakt-Phänotyp führte, oder miR-30 Überexpression *in vivo* nur zu einer kurzen hypertrophen Phase und dann rasch zur myokardialen Dilatation führte (vergleiche Kapitel 4. 3.).

Da erstens kardiale Überexpression von miR-30 in dilatativer Kardiomyopathie und erhöhter Mortalität resultierte und sich zweitens bei physiologischer

Hypertrophie eine verminderte kardiale Expression der miR-30-Familie zeigte, hypothesierten wir, dass die Herunterregulierung von miR-30 einen protektiven Effekt haben könnte.

Dieser Hypothese folgend, versuchten wir eine Gruppe möglicher Gene, bzw. Proteine zu identifizieren, durch die dieser Effekt vermittelt sein könnte. Mit Hilfe von Gen-Arrays suchten wir nach Genen, die in Herzen von miR-30 überexprimierenden Mäusen herunterreguliert waren und gleichzeitig anhand bioinformatischer Methoden (*TargetScan*⁶⁰) als mögliche Ziel-Gene von miR-30 identifiziert werden konnten (vergleiche Tabelle 6).

Anschließend konnten wir mittels Luciferase-Assays in cos-Zellen zeigen, dass mehrere dieser Gene (RGS2, DDAH1, EDNRA, ADRA2A) über ihren 3'-UTR tatsächlich direkt durch die miR-30-Familie reguliert werden.

Zusätzlich konnten wir zeigen, dass *in vivo* der Knockdown der miR-30-Familie mittels spezifischer anti-miRs auch zu erhöhter Expression der mRNA dieser Gene führte.

Noch nicht im Rahmen dieser Arbeit abschließend untersucht wurde, ob die De-Repression dieser Gene durch miR-30 auch zu erhöhter Proteinexpression dieser Gene führt und ob dies letztendlich einem protektiven Effekt im Rahmen einer Herzinsuffizienz hat. Außerdem begannen wir die pränatalen Auswirkungen der miR-30-Überexpression zu untersuchen. Dies sollte in weiter laufenden Projekten untersucht werden, um Pathomechanismen direkt mit miR-30 in Verbindung zu bringen und die physiologische Funktion weiter zu verstehen.

5. 2. Beurteilung und Limitationen der Ergebnisse

Nach unserem Wissen ist dies die erste Arbeit, welche systematisch *in vivo* die Rolle einzelner Mitglieder der miR-30-Familie bei Herzinfarkt und Herzinsuffizienz bezüglich verschiedener Interaktionswege untersucht.

Wie von Rao et al. gezeigt (Rao PK et al., 2009), ist die miR-30-Familie eine der am stärksten im Herzen exprimierten miR. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten wir mittels *Northern blot* und *RT-qPCR* eine ausgeprägte kardiale Expression aller miR-30 Familienmitglieder bestätigen. Limitierend muss jedoch einmal die schwierige Quantifizierung (Gilliland G. et al., 1990) mittels *Northern blot* erwähnt werden. Außerdem konnten wir zeigen, dass sowohl *Northern blotting* als auch *RT-qPCR* nur mit eingeschränkter Spezifität zwischen den einzelnen miR-30 Familienmitgliedern unterscheiden können. Dies ist insofern wichtig, als dass nicht bekannt war, ob die Subgruppen redundante Kopien mit denselben Funktionen bzw. miR mit eigenständigen, sich unterscheidenden Funktionen im Organismus darstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zumindest darauf hin, dass die Überexpression eines jeden einzelnen miR-30 Familienmitglieds zu Herzinsuffizienz führen kann und dass alle Familienmitglieder die Expression bestimmter Gene regulieren können, die mit Herzerkrankungen in Verbindung gebracht wurden. Dies schließt selbstverständlich nicht aus, dass einzelne Familienmitglieder auch andere bei kardialen Erkrankungen relevante Gene regulieren können. So haben wir vorrangig auf mRNA Ebene nach Genen gesucht, die durch miR-30 reguliert werden. Während angenommen wird, dass die am stärksten durch eine miR regulierten Gene zumindest zu einem gewissen Grad auch auf mRNA Ebene reguliert werden, können wir nicht ausschließen, Gene "übersehen" zu haben, die hauptsächlich auf Proteinebene durch miR-30 reguliert werden.

Auch andere Gruppen konnten nachweisen, dass miR-30 bei myokardialen Erkrankungen herunterreguliert wird (Melman YF et al. 2014). In der aktuellen Literatur finden sich sowohl Arbeiten, welche eine protektive Funktion der verminderten Expression der miR-30 Familie am Herzen proklamieren (Wei C et al. 2014, Shen Y et al. 2015), als auch das Gegenteil (Duisters RF et al. 2009, Pan W et al. 2013). Diese Diskrepanz könnte z. B. durch Subgruppenunterschiede zu erklären sein, so arbeiteten Duisters et al. vorrangig mit miR-30c, Shen Y et al. hingegen mit miR-30b. Es ist jedoch wichtig hervorzuheben, dass die Schlussfolgerungen der beiden letzten Arbeiten hauptsächlich auf *in vitro* Daten beruhen und wir z. B. im Gegenteil zu Duisters et al. keine Regulation von CTGF (*Connective tissue growth factor*,

Daten nicht demonstriert), in unseren miR-30 transgenen Mäusen nachweisen konnten. Auch bezüglich Kardiomyozytenhypertrophie konnten wir zeigen, dass sich die wachstumsfördernden Effekte von miR-30 *in vitro* in isolierten Rattenkardiomyozyten nicht unbedingt *in vivo* Experimenten in der Maus bestätigen ließen.

Leider liegen uns zu den humanen Gewebeproben bei herzinsuffizienten Patienten keine *Baseline*-Charakteristika vor, da uns diese nur in anonymisierter Form von *Myogen Inc.* übermittelt wurde, sodass diese Ergebnisse allein betrachtet nur wenig aussagekräftig und valide sind. Jedoch erbrachten diese Proben den Hinweis auf eine Herunterregulation der miR-30 Familie bei kardialen Umbauvorgängen, die sich dann im Mausmodell bestätigen ließ. Im Folgenden beschränkten wir uns dann aber unter anderem aus oben genannten Gründen auf das Mausmodell.

Da der Luciferase Assay in cos-Zellen etabliert ist, kamen diese Zellen zum Einsatz. Dies schränkt einerseits die Aussagekraft ein, da zum Nachweis einer kardialen Funktion sicher Kardiomyozyten besser geeignet sind. Andererseits wollten wir mithilfe des Assays die Regulation der Gene durch miR-30 nachweisen, was unabhängig von dem in der Zelle transkribierten Genom sein sollte.

5. 3. Mögliche kardioprotektive Signalwege über miR-30-Suppression

Aufgrund der von uns *in vivo* erhobenen Befunde sehen wir trotz der uneinheitlichen Forschungslage die verminderte Expression der miR-30-Familie als kardioprotektiv an.

Im Folgenden sind mögliche Signalwege dargestellt, wie eine De-Repression der oben erwähnten Gene als Folge der Herunterregulation der miR-30-Familie direkt und indirekt kardioprotektive Effekte ausüben könnte.

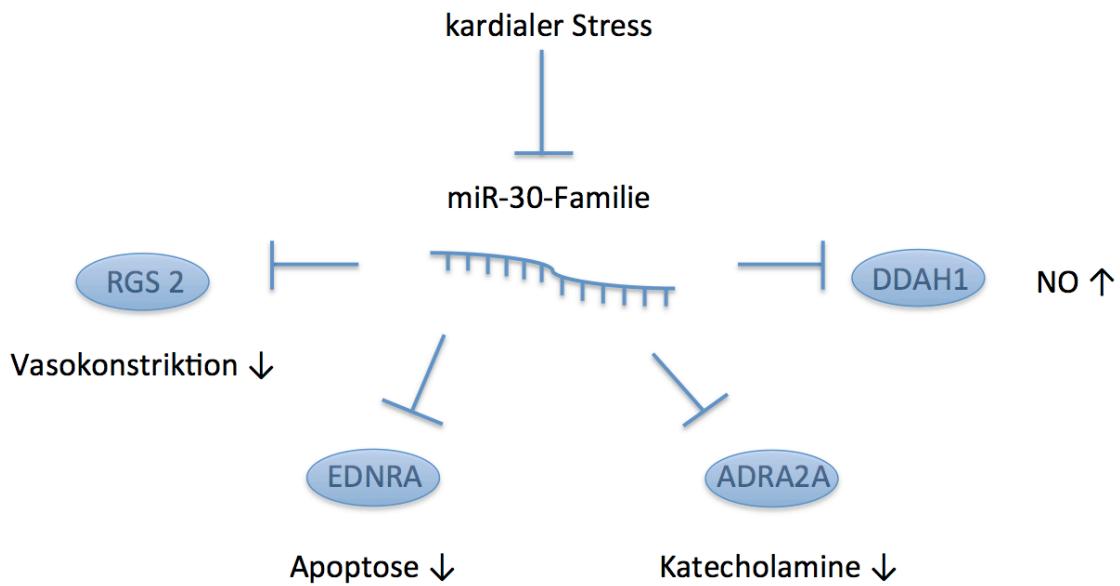


Abbildung 28: Kardioprotektive Signalwege vermittelt über die Suppression der miR-30-Familie.

5. 3. 1. Die miR-30-Familie und RGS2

Regulator of G-protein signaling 2 (RGS2), ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), besitzt eine wichtige kardiovaskuläre Funktion: Unter anderem hemmt es durch seine relativ spezifische GAP-Aktivität für Gq (Phospholipase-C-gekoppeltes G-Protein) z. B. einen Angiotensin II vermittelten Signalweg, welcher zu Vasokonstriktion führt (Riddle EL et. al., 2005).

Knockout-Mäuse, denen eine (*rgs2+/-*) oder gar beide Kopien dieses Gens (*rgs2-/-*) fehlen, weisen phänotypisch nicht nur einen starken arteriellen Hypertonus (Heximer SP et. al., 2003), sondern auch beschleunigte Herzhypertrophie und Herzversagen auf (Tsang S et. al., 2010).

Ein potentieller Mechanismus, wie eine Heunterregulation der miR-30-Familie eine kardioprotektive Wirkung am Herzen bewirkt, könnte somit einen Weg über RGS2 nehmen (Abbildung 28), wenn dieses bei kardialem Stress weniger supprimiert wird.

Beispielsweise könnte kardialer Stress die Bildung von miR-30 hemmen, dadurch steht mehr RGS2 zur Verfügung, was wiederum Angiotensin II-vermittelter Vasokonstriktion entgegenwirkt und letztendlich der arteriellen Hypertonie, einer der Hauptsrisikofaktoren für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Nicht zuletzt ist Angiotensin II, als Teil des RAAS, bereits eine wichtige Zielstruktur bestehender pharmakologischer Interventionsstrategien im Rahmen von arteriellem Bluthochdruck und Herzinsuffizienz (vergleiche Kapitel 1. 3. sowie Tabelle 4).

5. 3. 2. Die miR-30-Familie und EDNRA

Der Endothelin-Rezeptor A (EDNRA) ist mit 90% der häufigere der beiden Endothelin-Rezeptoren an Kardiomyozyten (Schorlemmer A et. al., 2008). Während seit langem Endothelin nur als ein Vasokonstriktor verstanden wurde und unselektive oder auch selektive Endothelin-Rezeptoren-Hemmer therapeutisch zum Einsatz kamen, zeigte sich die Inhibition von Endothelin-Rezeptoren in einigen Studien als nicht besonders erfolgreich (Schorlemmer A et. al., 2008), so z. B. ENABLE (Kalra PR et. al., 2002), ENCOR (Kelland NF et. al., 2006) oder HEAT (Szokodi I et. al., 2003).

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Endothelin-1 (ET-1) über den Endothelin-Rezeptor A (EDNRA) zu Aktivierung einer Reihe von Signalwegen führt, die kardioprotektiv sind (Schorlemmer A et. al., 2008): In Kardiomyozyten vermittelt EDNRA so unter anderem den antiapoptotischen ERK1/MAP-Kinase-Weg. Die Herunterregulation von miR-30 könnte somit wieder über verminderte Suppression, in diesem Fall von EDNRA, kardioprotektiv wirken, da die Apoptose von Kardiomyozyten vermindert wird (Abbildung 28). Nicht zuletzt hat die Apoptose von Kardiomyozyten einen bedeutenden Anteil an den Entwicklungen im Rahmen des kardialen *remodelings* (vergleiche Kapitel 1. 5. 2.).

5. 3. 3. Die miR-30-Familie und ADRA2A

Der adrenerge alpha-2A Rezeptor (ADRA2A) ist ein präsynaptischer Rezeptor und kontrolliert somit die Freisetzung der Botenstoffe des sympathischen Nervensystems im Herzen und im zentralen Nervensystem. Für den Subtyp alpha-2A ist diese Funktion vor allem bei hoher Stimulationsfrequenz der Fall (Hein L et. al., 1999).

Welche Bedeutung diese Regulation hat zeigen *Knockout*-Mäuse, denen die adrenergen alpha-2A und alpha-2C Rezeptoren fehlen: Sie weisen phänotypisch eine kardiale Hypertrophie und Herzversagen aufgrund von chronisch erhöhter Katecholaminausschüttung auf (Triposkiadis F et. al., 2009). Eine Konstellation, die sich auch bei chronischer Herzinsuffizienz nachweisen lässt (vergleiche Kapitel 1. 1.).

Wie bereits in Kapitel 1. 1. 4. erwähnt, sind es unter anderem die neurohumoralen Kompensationsmechanismen, wie die Aktivierung des sympathetischen Nervensystems, die zu einem Fortschreiten und einer Verschlechterung der Prognose bei Herzinsuffizienz führen. Die De-Repression des adrenergen alpha-2A Rezeptors könnte somit auch zu einer kardioprotektiven Funktion der Herunterregulation von miR-30 beitragen (Abbildung 28): Indem die Katecholaminausschüttung gehemmt wird, wird die kardiale Herunterregulation der beta-Rezeptoren vermindert und das Gleichgewicht zwischen der Wirkung des sympathischen Nervensystems an Gefäßen und Herz bleibt erhalten.

5. 3. 4. Die miR-30-Familie und DDAH1

Auf ähnliche Weise könnte sich auch die verminderte Suppression der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) auswirken. Wobei es sich weniger um eine direkt kardiale, als vielmehr um eine vasoaktive Wirkung handelt.

DDAH1, welches sich hauptsächlich in Endothelzellen im Herzen und Gefäßen finden lässt, baut asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und L-N-Monomethyl-Arginin *nitric oxide synthase inhibitor* (L-NMMA) ab (Hu X et. al., 2009). Die asymmetrischen Methylarginine ADMA und L-NMMA bewirken beide eine Hemmung der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase. Die Stickstoffmonoxidsynthase bildet NO, ein wichtiger Botenstoff, der nicht nur endothelprotektiv wirkt, sondern durch Vasodilatation auch den Blutdruck senkt. Nicht zuletzt führt die als endotheliale Dysfunktion bezeichnete Funktionsstörung des Endothels, der unter anderem auch ein Mangel an NO zugrunde liegt, zu Atherosklerose und deren Folgeerscheinungen (Karow T et. al., 2010 sowie Lüscher TF et. al., 1991).

Für transgene Mäuse, die menschliches DDAH1 überexprimieren, konnte bereits gezeigt werden, dass sie erhöhte NO-Niveaus (Dayoub H et. al., 2003) und einen niedrigeren arteriellen Blutdruck aufweisen (Hu X et. al., 2009) als entsprechende Vergleichstiere.

Eine mögliche kardioprotektive Wirkung der miR-30-Suppression könnte somit über DDAH1 vermittelt werden (Abbildung 28), indem mehr Stickstoffmonoxid am Endothel gebildet wird.

Bei verminderter Expression der miR-30-Familie steht mehr NO zur Verfügung, welches sich positiv auf Gefäße und Blutdruck auswirkt und damit den beiden Hauptsrisikofaktoren für Herzinsuffizienz entgegenwirkt: erstens der koronaren Herzkrankheit als Erscheinungsbild der Atherosklerose der Koronararterien und zweitens der arteriellen Hypertonie.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass unsere Daten darauf hindeuten, dass die Herunterregulation von miR-30 durch eine Fein-Regulierung all dieser oben genannten Gene zu einem positiven Effekt im Herzen führt. Letztendlich könnte es aber auch sein, dass noch weitere von miR-30 regulierte Gene zu den putativen positiven Effekten beitragen.

5. 3. Ausblick: AntimiR als mögliche Therapiestrategie?

Falls die Herunterregulation der miR-30-Familie tatsächlich kardioprotektiv ist, könnte eine antimiR-vermittelte Inhibition von miR-30 eine interessante Therapiestrategie bei kardialen Erkrankungen darstellen.

Wie bereits in Kapitel 5. 1. diskutiert, wäre es als nächstes wichtig *in vivo* zu testen, ob die in Zusammenarbeit mit miRagen Therapeutics entwickelte antimiR-30 auf Proteinebene einen Effekt hat und wie lange die pharmakodynamischen Effekte anhalten, um ein adäquates Therapieschema entwickeln zu können. Daraufhin müsste untersucht werden, ob in murinen Herzinsuffizienzmodellen Verabreichung von antimiR-30 zu einem nachweisbaren Nutzen führt - entweder durch frühere oder intensivere Herunterregulation der miR-30-Familie - als es physiologisch unter pathologischem Stress zu beobachten ist.

Da miRs mehrere Zielgene haben, könnte nicht nur, wie es bei heutigen Medikamenten vielfach der Fall ist, ein einzelner, sondern unter Umständen gleich mehrere synergistische Signalwege moduliert werden, die z. B. *remodeling* oder Hypertrophie beeinflussen. Darin liegt natürlich auch die Gefahr, da das möglicherweise auch bedeutet, dass in anderen Organen, die miR-30 exprimieren, eine Vielzahl von Genen reguliert werden und dort mit Nebenwirkungen verbunden sein könnten. Genauso müssten weitere Problemstellungen geklärt werden: wie etwa die Steuerbarkeit der Wirkungsdauer.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Daten dieser Arbeit darauf hindeuten, dass die Herrunterregulation von miR-30 bei Herzinsuffizienz ein protektiver Mechanismus ist. Ob eine weitere oder frühere Herrunterregulation der miR-30 Familie auch therapeutisch im Rahmen von kardialen Erkrankungen eingesetzt werden könnte, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Die miR-30-Familie gehört zu den am stärksten exprimierten *microRNAs* im Herzen. Expressionsanalysen zeigten, dass alle Mitglieder der miR-30-Familie bei humaner Herzinsuffizienz und bei Mäusen im Rahmen einer post-Infarkt-Herzinsuffizienz herunterreguliert werden. Überraschenderweise fanden wir auch bei physiologischer Hypertrophie nach Lauftraining eine Herunterregulation von miR-30. Dies könnte ein Indiz für eine kardioprotektive Funktion der Herunterregulation der miR-30-Familie im Rahmen von pathologischem Stress sein könnte. Im Einklang mit dieser Hypothese entwickelten transgene Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer Überexpression einzelner miR-30-Familienmitglieder eine dilative Kardiomyopathie und starben deutlich verfrüht. Eine kardiale Hypertrophie ließ sich *in vivo* anders als *in vitro* bei Experimenten mit isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten jedoch nicht beobachten.

Anhand von Gen-Array-Analysen mit Herzen von transgenen miR-30-Mäusen sowie bioinformatischer Zielgensuche mit *TargetScan*⁶⁰ konnten wir RGS2, DDAH1, EDNRA und ADRA2A als mögliche Ziel-Gene identifizieren, über die miR-30 potentielle kardioprotektive Effekte ausüben könnte. Durch weitere Analysen mit Luciferase-Assays konnten wir zeigen, dass die miR-30-Familie diese Gene tatsächlich direkt über ihre 3'-UTRs regulieren kann.

Mit Hilfe eines in Zusammenarbeit mit dem Unternehmen miRagen Therapeutics entwickelten miR-30-antimiRs war es uns möglich die gesamte miR-30-Familie *in vivo* in Mäusen herunter zu regulieren. In ersten Experimenten konnten wir dabei auf RNA-Ebene die Regulation von RGS2, DDAH1, EDNRA und ADRA2A durch miR-30 bestätigen.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die Herunterregulation von miR-30 im Rahmen von kardialem *remodeling* einen kardioprotktiven Effekt haben könnte. Die verstärkte Herunterregulation von miR-30 mittels antimiR-Technologie könnte einen interessanten therapeutischen Ansatz bei Herzinsuffizienz darstellen.

7. Summary

The miR-30 family is one of the strongest expressed microRNAs in the heart. Expression analysis showed that all members of the miR-30 family are down-regulated in human heart failure and in mice in the context of a post-infarction heart failure. Surprisingly, we also found downregulation of miR-30 in physiological hypertrophy, i. e. after exercise, which could be an indication of a cardioprotective function of the down-regulation of miR-30 family in the context of pathological stress. Consistent with this hypothesis transgenic mice with cardiomyocyte-specific overexpression of individual miR-30 family members presented with dilated cardiomyopathy and died much earlier. However, cardiac hypertrophy could not be observed *in vivo*, unlike *in vitro*-experiments with isolated neonatal rat cardiomyocytes.

Based on gene array analyses with the heart tissue of transgenic miR-30 mice and bioinformatic target prediction with TargetScan⁶⁰ we could identify RGS2, DDAH1, EDNRA and ADRA2A as potential target genes by which miR-30 could exert its potential cardioprotective effects. Through further analysis with luciferase assays, we demonstrated that the miR-30 family actually regulates these genes directly through their 3'-UTRs.

By using miR-30-antimiRs developed in cooperation with the company miRagen Therapeutics, it was possible to downregulate the entire miR-30 family in mice *in vivo*. In initial experiments, we could also confirm at RNA level, that miR-30 regulates RGS2, DDAH1, EDNRA and ADRA2A.

In summary: the downregulation of miR-30 in the context of cardiac remodeling and heart failure could have a cardioprotective effect. Thus, enhanced downregulation of miR-30 by antimiR-technology could represent an interesting therapeutic approach in heart failure.

8. Literaturverzeichnis

1. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005;112(12):e154-235
2. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2011;8(1):30-41
3. McKee PA, Castelli WP, McNamara PM et al. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 1971;285(26):1441-6
4. Allen LA, O'Connor CM. Management of acute decompensated heart failure. *CMAJ* 2007;176(6):797-80
5. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005;112(12):e154-235
6. The Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of diseases of the Heart. 4th edition. *Boston, Mass: Little, Brown & Co*; 1939
7. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC Jr et al. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 2003;289(2):194-202
8. Mosterd A, Hoes AW, deBruyne MC et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 1999;20(6):447-55
9. Neumann T, Biermann J, Neumann A et al. Herzinsuffizienz: häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte- Medizinische und ökonomische Aspekte. *Dtsch Ärztebl Int* 2009;106(16): 269-75
10. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG et al. Long-Term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;347(18):1397-402

- 11.** Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland. Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht. Fachserie 12, Reihe 4-2011. Wiesbaden 2012.
- 12.** Statistisches Bundesamt: Krankheitskosten. Fachserie 12, Reihe 7.2 – 2002, 2004, 2006, 2008. Wiesbaden 2010.
- 13.** Zile MR. Heart Failure with preserved ejection fraction: is this diastolic heart failure? *J Am Coll Cardiol* 2003;41(9):1519-22
- 14.** Bayes-Genis A, Santalo-Bel M, Zapico-Muniz E, et al. N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-proBNP) in the emergency diagnosis and in-hospital monitoring of patients with dyspnoea and ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2004;6:301-8.
- 15.** Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, et al. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:379-85.
- 16.** American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics–2005 Update. Dallas, TX: *American Heart Association*; 2005.
- 17.** Davis M, Espiner E, Richards G et al. Plasma brain natriuretic peptide in assessment of acute dyspnoea. *Lancet* 1994;343(8895):440-4
- 18.** Silvers SM, Howell JM, Kosowsky JM, et al. Clinical policy: Critical issues in the evaluation and management of adult patients presenting to the emergency department with acute heart failure syndromes. *Ann Emerg Med* 2007;49:627–6
- 19.** Frey N, Katus HA, Olson EN et al. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 2004;109(13):1580-9
- 20.** Carnegie GK, Burmeister BT. A-kinase anchoring proteins that regulate cardiac remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;58(5):451-8
- 21.** Weiner RB, Baggish AL. Exercise-induced cardiac remodeling. *Prog Cardiovasc Dis* 2012;54(5):380-6
- 22.** Medugorac I. Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. *Cardiovasc Res* 1980;14(9):551-4
- 23.** Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003;65:45-79
- 24.** Kinugawa K, Yonekura K, Ribeiro RC et al. Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2001;89(7):591-8

- 25.** Olson EN, Williams RS. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* 2000;101(7):689-92
- 26.** Frost RJ, Olson EN. Separating the good and evil of cardiac growth by CIB1 and calcineurin. *Cell Metab* 2010;12(3):205-6
- 27.** Karow Thomas. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 18. Auflage. 2010; 116-8, 319
- 28.** Heart Failure Society Of America. Executive summary: HFSA 2006 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J Card Fail* 2006;12(1):10-38
- 29.** McAlister FA, Wiebe N, Ezekowitz JA et al. Meta-analysis: beta-blocker dose, heart rate reduction, and death in patients with heart failure. *Ann Intern Med* 2009;150(11):784-94
- 30.** The Vasodilator-Heart Failure Trials (V-HeFT). *Circulation* 1993;87(6 Suppl):VI1-117
- 31.** Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB et al. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 2003;362(9386):759-66
- 32.** Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect f spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 1999;341:707-17
- 33.** Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev* 2011;16(1):13-21
- 34.** Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004;116:281-97
- 35.** Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 2010;12(8):1022-32
- 36.** Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006;20:515-24
- 37.** Hutvágner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNA enzyme complex. *Science* 2002;297:2056-60
- 38.** Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75:855-62
- 39.** Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20

- 40.** Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathology* 2008; 18(1):113-21
- 41.** Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004;432:235-40
- 42.** Zhang Y, Zhang R, Su B. Diversity and evolution of MicroRNA clusters. *Sci China C Life Sci* 2009;52(3):261-6
- 43.** Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms. *Trends Cell Biol* 2007;17(3):118-26
- 44.** van Rooij E, Sutherland LB, Liu N et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2006;103(48):18255-60
- 45.** van Rooij E, Sutherland LB, Qi X et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;316:575-9
- 46.** Zhao Y, Ransom JF, Li A et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007;129(2):303-17
- 47.** Care A, Catalucci D, Felicetti F et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007;13:613-8
- 48.** Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 2008;22:3242-54
- 49.** Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis. *J Cell Mol Med* 2009;13(1):12-23
- 50.** van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* 2008; 103(9):919-28
- 51.** Ren XP, Wu J, Wang X et al. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* 2009;119(17):2357-66
- 52.** Rao PK, Toyoma Y, Chiang HR et al. Loss of Cardiac microRNA-Mediated Regulation Leads to Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circ Res* 2009;105(6):585-94
- 53.** http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html 12.10.2010
- 54.** Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, et al. Rfam: an RNA family database. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):439-41
- 55.** <http://www.mirbase.org/> 01.02.2011

- 56.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> 04.08.2010
- 57.** Joglekar MV, Patil D, Joglekar VM et al. The miR-30 family microRNAs confer epithelial phenotype to human pancreatic cells. *Islets* 2009;1(2):137-47
- 58.** Molkentin JD, Jobe SM, Markham BE. Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28(6):1211-25
- 59.** Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumannli J, Robbins J. Tissue-specific Regulation of the a-Myosin Heavy Chain Gene Promoter in Transgenic Mice. *J Biol Chem* 1991;266(36):24613-20
- 60.** Molkentin JD, Lu JR, Antos CL et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998;93(2):215-28
- 61.** <http://www.targetscan.org/> 18.04.2012
- 62.** Rich S, McLaughlin VV. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation* 2003;108(18):2184-90
- 63.** Chen EP, Bittner HB, Akhter SA et al. Myocardial function in hearts with transgenic overexpression of the G protein-coupled receptor kinase 5. *Ann Thorac Surg* 2001;71(4):1320-4
- 64.** Hu X, Xu X, Zhu G et al. Vascular endothelial-specific dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1-deficient mice reveal that vascular endothelium plays an important role in removing asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2009;120(22):2222-9
- 65.** Tsang S, Woo AY, Xiao RP. Dereulation of RGS2 in cardiovascular diseases. *Front Biosci (Schol Ed)* 2010;2:547-57
- 66.** Zhang W, Anger T, Su J et al. Selective loss of fine tuning of Gq/11 signaling by RGS2 protein exacerbates cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2006;281(9):5811-20
- 67.** Letavernier E, Zafrani L, Perez J et al. The role of calpains in myocardial remodelling and heart failure. *Cardiovasc Res*. 2012; 96(1):38-45
- 68.** Patterson C, Portbury AL, Schisler JC, Willis MS. Tear me down: role of calpain in the development of cardiac ventricular hypertrophy. *Circ Res* 2011;109(4):453-62.
- 69.** Ling H, Zhang T, Pereira L et al. Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest* 2009;119(5):1230-40
- 70.** Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* 2010;16(11):2043-50

- 71.** Stenvang J, Petri A, Lindow M et al. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence* 2012;3(1):1
- 72.** Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438(7068):685-9
- 73.** Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, et al. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;159(5):489-92
- 74.** Melman YF, Shah R, Das S. MicroRNAs in heart failure: is the picture becoming less miRky? *Circ Heart Fail*. 2014;7(1):203-14
- 75.** Wei C, Li L, Gupta S. NF- κ B-mediated miR-30b regulation in cardiomyocytes cell death by targeting Bcl-2. *Mol Cell Biochem*. 2014;387(1-2):135-41
- 76.** Shen Y, Shen Z, Miao L et al. miRNA-30 family inhibition protects against cardiac ischemic injury by regulating cystathionine- γ -lyase expression. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(3):224-40
- 77.** Duisters RF, Tijsen AJ, Schroen B et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res*. 2009;104(2):170-8
- 78.** Pan W, Zhong Y, Cheng C et al. MiR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy. *PLoS One* 2013;8(1):e53950
- 79.** Riddle EL, Schwartzman RA, Bond M, Insel PA. Multi-tasking RGS proteins in the heart: the next therapeutic target? *Circ Res* 2005;96(4):401-11
- 80.** Heximer SP, Knutson RH, SunX, et al. Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J Clin Invest* 2003;111(4):445-52
- 81.** Schorlemmer A, Matter ML, Shohet RV. Cardioprotective signaling by endothelin. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18(7):233-9
- 82.** Kalra PR, Moon JC, Coats AJ. Do results of the ENABLE (Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure) study spell the end for non-selective endothelin antagonism in heart failure? *Int J Cardiol* 2002;85(2-3):195-7
- 83.** Kelland NF, Webb DJ. Clinical trials of endothelin antagonists in heart failure: a question of dose? *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(6):696-9
- 84.** Szokodi I, Pihola J, Ruskoaho H. Endothelin receptor blockade and exacerbation of heart failure. *Circulation* 2003;107(22):e211

- 85.** Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 1999;402(6758):181-4
- 86.** Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G et al. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(10):1747-62
- 87.** Hu X, Xu X, Zhu G et al. Vascular endothelial-specific dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1-deficient mice reveal that vascular endothelium plays an important role in removing asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2009;120(22):2222-9
- 88.** Lüscher TF. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J* 1991;12 Suppl E:2-11
- 89.** Dayoub H, Achan V, Adimoolam S et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthase: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003;108:3042-7
- 90.** <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/AM5795> 04.08.2010

9. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung		Seite
A	Adenosin	22
ACC	<i>American College of Cardiology</i>	1
AHA	<i>American Heart Association</i>	1
αMHC	Alpha Isoform der schweren Myosinkette	7
αMHC-30-TG	Transgene Mauslinie, welche miR-30 unter dem αMHC-Promotor exprimiert	43
Antagomir	3'-Cholesterin-konjugierte, 2'-O-Methyl antimiR	58
ACEI	Inhibitoren des <i>Angiotensin-converting-enzyme</i>	7
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin	72
ADRA2A	Adrenerger alpha-2A Rezeptor	52
Adv	Adenoviren	44
Ago	Argonaute	11
Amp	Ampicillin	15
APS	Ammoniumpersulfat	15
(d)ATP	(Desoxy)-Adenosintriphosphat	30
ATPase	Adenosintriphosphatase	45
β-Gal	Beta-Galactosidase	31
βMHC	Beta Isoform der schweren Myosinkette	7
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i> , B-Typ natriuretisches Peptid	5
bp	Basenpaare	54
CAG	<i>CMV-early-enhancer-element</i> und <i>chicken-beta-actin</i> promotor	63
CAMK2D	<i>Calcium-Calmodulin-dependent-protein-kinase II δ</i>	52
CAPN7	Calpain 7	52
cDNA	<i>Copy DNA</i>	21
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	9
CF	Kardiale Fibroblasten	6
Chrom	Chromosom	36
CIP	<i>Calf-intestinal-phosphatase</i> , Alkaline Phosphatase	15

CM	<i>Cardiomyocytes</i> , Kardiomyozyten	6
CMV	Cytomegalievirus	30
cos-Zellen	<i>African green monkey kidney fibroblast cells</i>	30
cpm	<i>counts per minute</i>	44
Cre	<i>Cyclization-recombination-Enzym</i>	63
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>	67
Ctr	<i>Control</i> , Kontrolle	55
CUG	3-Carboxyumbelliferyl β -D-Galactopyranosid	31
DDAH1	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1	52
(dd)H ₂ O	(Doppelt destilliertes) steriles Wasser	19
Dgcr8	<i>DiGeorge critical region 8</i>	10
D-MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	16
DNA	Desoxyribonukleinsäure	9
dsRNA	Doppelstränginge RNA	10
E	Exon(e)	36
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	26
EDNRA	Endothelin-Rezeptor A	52
EF	Ejektionsfraktion	4
ET-1	Endothelin-1	7
EZM	Extrazelluläre Matrix	6
E13.5, E17.5	Tag 13,5 bzw. Tag 17,5 der Embryonalentwicklung	63
GAP	GTPase-aktivierendes Protein	69
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	60
Gq	Phospholipase-C-gekoppeltes G-Protein	69
GRK5	<i>G-protein coupled receptor kinase 5</i>	52
HE	Hämatoxylin-Eosin	48
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion	4
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion	4
HW	<i>Heart weight</i> , Herzgewicht	50
kb	1000 Basenpaare	19
KG	Körpergewicht	50
KHK	Koronare Herzerkrankung	3
K. O.	<i>Knockout</i>	11

lacZ	Gen für β -Galactosidase	44
LB	<i>Lysogeny broth</i>	19
LE	<i>Low-electroendosmosis</i>	15
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>	58
L-NMMA	L-N-Monomethyl-Arginin (<i>nitric oxide synthase inhibitor</i>)	72
LV	Linker Ventrikel oder linksventrikulär	4
m	Männlich	63
MEM	<i>Minimal essential medium</i>	16
MHC	<i>Myosin heavy chain</i> , schwere Kette des Myosins	7
MI	Myokardinfarkt	41
Min.	Minute(n)	19
mmu	<i>Mus musculus</i>	35
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion	44
miR	<i>microRNA</i>	8
miR-30ade	miR-30a-/ miR-30d- und miR-30e-Unterfamilie	35
miR-30bc	miR-30b- und miR-30c-Unterfamilie	35
mRNA	<i>Messenger RNA</i>	9
Nfyc	<i>Nuclear transcription factor Y</i>	36
NO	Stickstoffmonoxid	72
NRCM	Kardiomyozyten neonataler Ratten	35
nt	Nukleotid(e)	9
NT-proBNP	N-terminales proBNP	5
NTP bzw. NTPs	Nukleosidtriphosphat bzw. Nukleosidtriphosphate	19
NYHA	<i>New York Heart Association</i>	2
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>	27
p6CMV	p6-Promotor-CMV-Vektor	30
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	19
pre-miR	<i>Precursor-miR</i>	11
pri-miR	<i>Primary miR</i>	10
P1, P3, P14	Tag 1 bzw. 3 bzw. 14 der Zeit nach Geburt	63
qPCR	Quantitative PCR	21
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	6

RE	Restriktionsenzym	25
RGS2	<i>Regulator of G-protein signaling</i>	52
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>	13
RNA	Ribonukleinsäure	8
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	11
(RT)-qPCR	<i>(Real time) quantitative polymerase chain reaction</i>	37
Sk-Msk	Skelettmuskulatur	39
TAE	Tris-Acetat-EDTA	22
TBE	<i>TrisBase, boric acid und EDTA</i>	29
TEMED	Tetramethylethylenediamine	29
TG	Transgene Maus bzw. Mäuse	45
<i>tiny</i>	Unkonjugierte kleine bipyklische RNA-Analoga	58
UV	Ultraviolett	24
w	Weiblich	63
WT	Wildtyp(en)	45
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid	64
y	Jahre	3
3'- bzw. 5'-UTR	3'- bzw. 5'-untranslatierte Region	9
16mer	16 Nukleotide lange antimiR	58

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
Untersuchungen zur Funktion der microRNA-30-Familie bei Herzinfarkt und Herzinsuffizienz

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand