Aus der

Medizinischen Klinik und Poliklinik I

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung eines miR-144-5p Knockout-Mausmodells im Hinblick auf strukturelle Remodelingprozesse bei Vorhofflimmern

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Lina-Sophie Volz

aus
München

Jahr
2026

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten:	Priv. Doz. Dr. Sebastian Clauß
Zweites Gutachten:	Prof. Dr. Daphne Merkus
Drittes Gutachten:	Prof. Dr. Christopher Reithmann

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2026

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ... **3**

Zusammenfassung ... **6**

Abstract (English) ... **8**

Abbildungsverzeichnis ... **11**

Tabellenverzeichnis ... **14**

Abkürzungsverzeichnis ... **15**

1. Einleitung ... **18**

1.1 Vorhofflimmern ... 18

1.1.1 Epidemiologie ... 18

1.1.2 Definition ... 19

1.1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie ... 20

1.1.4 Physiologische Reizleitung im Herzen und Pathophysiologie von Vorhofflimmern ... 22

1.1.5 Fibrose im Kontext von Vorhofflimmern ... 25

1.2 MicroRNA (miRNA) ... 27

1.2.1 Beeinflussung der Genexpression durch miRNAs ... 27

1.2.2 Die Rolle von miRNAs in Bezug auf Vorhofflimmern ... 29

1.2.3 Die miR-144-5p ... 31

1.5. Vorarbeiten ... 33

1.5.1. Die miR-144-5p als potenzieller Biomarker bei Vorhofflimmern ... 33

1.5.2. Phänotypisierung eines miR-144-5p Knockdown-Mausmodells unter dem Einfluss eines miRNA-Inhibitors ... 36

1.3 Transgene Mausmodelle ... 39

1.3.1 Transgene Mausmodelle zur Untersuchung der kardialen Elektrophysiologie ... 39

1.3.2 Das Cre-loxP-System zur Erschaffung eines Gen-Knockouts ... 41

1.4 Zielsetzung und Hypothese ... 43

2. Material und Methoden ... **44**

2.1 In vivo 44

2.1.1 Versuchstiere ... 44

2.1.2 Versuchstierhaltung ... 44

2.1.3 Studiendesign ... 45

2.1.4 Materialien und Geräte für *in vivo* Untersuchungen 45
2.1.5 *In vivo* Methoden 47
2.2 In vitro 54
2.2.1 Materialien und Geräte für *in vitro* Untersuchungen 54
2.2.2 *In vitro* Methoden 62

3. Ergebnisse 85
3.1 Charakterisierung des miR-144-5p Knockout-Mausmodells 85
3.1.1 Expression des miR-144/451-Clusters im Herzgewebe 85
3.1.2 Elektrophysiologische Untersuchung 87
3.1.3 Histologische Fibrose-Quantifizierung 93
3.1.4 Echokardiographische Untersuchung 97
3.1.5 Elektrokardiographische Untersuchung 100
3.1.6 Anatomische Parameter 102
3.2 Experimentelle Validierung potenzieller Zielgene der miR-144-5p 103
3.3 mRNA-Expressionsanalyse mittels qPCR 107

4. Diskussion 112
4.1 Der kardiale Phänotyp im miR-144-5p Knockout-Mausmodell 112
4.1.1 Gesteigerte Suszeptibilität für atriale tachykarde Rhythmusstörungen 112
4.1.2 Strukturelles Remodeling 113
4.1.3 Elektrisches Remodeling 126
4.1.4 Anatomische und funktionelle Aspekte des Herzens 128
4.2 Diskussion der Methoden 130
4.2.1 Das miR-144-5p Knockout-Mausmodell zur Untersuchung der kardialen Elektrophysiologie 130
4.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung mittels transvenöser elektrischer Stimulation 132
4.2.3 Fibrose-Quantifizierung mittels Masson-Trichrom-Färbung und semi-automatisierter computergestützter Analyse 133
4.2.4 Relative Quantifizierung der Zielgen-Expression mittels qPCR .. 133
4.3 Limitationen 134
4.4 Ausblick und Relevanz 135

Literaturverzeichnis 138

Danksagung 154

Affidavit **155**

Übereinstimmungserklärung **156**

Lebenslauf **157**

Publikationsliste **158**

Zusammenfassung

Vorhofflimmern (VHF) stellt die häufigste persistierende Herzrhythmusstörung des Menschen dar.[1,2] Trotz der weltweit hohen Prävalenz sind die komplexen zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen bislang noch unzureichend verstanden. Häufig treten irreversible Remodeling-Prozesse im Herzgewebe auf und es kommt zu Komplikationen, die sowohl die Morbidität als auch die Mortalität signifikant erhöhen.[2-4] Innovative diagnostische Verfahren sowie kausale Behandlungsansätze könnten maßgeblich zur Verbesserung der Prognose bei VHF beitragen.[5-7] Der Grundlagenforschung kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu, da sie wesentlich dazu beiträgt das Verständnis der Erkrankung zu vertiefen.

MicroRNAs (miRNAs) fungieren als zentrale Mediatoren der Translation und beeinflussen zahlreiche strukturelle und elektrische Remodeling-Prozesse bei VHF.[8-10] Insbesondere die miR-144-5p hat sich als potenzieller Biomarker für VHF herauskristallisiert, da sie bei Patienten mit VHF signifikant herabreguliert ist.[11] Im Rahmen einer bisher unveröffentlichten Pilotstudie führte die Herabregulation der miR-144-5p durch die Verabreichung eines miR-144-5p-Inhibitors bei Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund zu einer erhöhten Anfälligkeit für atriale tachykarde Rhythmusstörungen sowie zu einer Dilatation des linken Atriums. Darüber hinaus wurde in humanen embryonalen Stammzellen (H7 hESC-CMs[12]), die mit einem miR-144-5p-Inhibitor transfiziert wurden, eine signifikante Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD) festgestellt.

Die genaue Rolle der miR-144-5p im Kontext von VHF sowie die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch bislang noch kaum erforscht. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen eines *in vivo* Knockouts (KO) der miR-144-5p in einem transgenen Mausmodell zu untersuchen. Dabei wurde der Fokus insbesondere auf die atriale Elektrophysiologie und Arrhythmogenität sowie auf strukturelle Remodeling-Prozesse im Herzgewebe gelegt. Für die Untersuchungen wurden C57BL/6-Wildtyp-Mäuse, sowie heterozygote- und homozygote miR-144-5p Knockout-Mäuse eingesetzt. Diese wurden mittels Elektrokardiogramm (EKG), Echokardiographie und elektrophysiologischer Untersuchung (EPU) *in vivo* phänotypisiert. Das Herzgewebe wurde mittels Masson-Trichrom-Färbung auf Fibrose untersucht. Mithilfe einer *in silico* Targetscan-Analyse konnten verschiedene Zielgene der miR-144-5p identifiziert werden, welche mittels Luciferase Reporter Assays *in vitro* validiert und anschließend im Rahmen einer qPCR auf Expressionsunterschiede im murinen Herzgewebe untersucht wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Knockout der miR-144-5p bei transgenen Mäusen zu einer erhöhten Anfälligkeit für atriale tachykarde Rhythmusstörungen nach Burst-Stimulationen führt. Zudem konnte bei Knockout-Tieren eine atriale Fibrose sowie eine signifikante Dilatation des linken Atriums beobachtet werden - zwei charakteristische Kennzeichen des strukturellen Remodelings bei VHF. In der echokardiographischen Untersuchung stellte sich eine unbeeinträchtigte Herzfunktion bei unveränderten Wanddicken dar. Weder die EKG-Untersuchung noch die Messung der Refraktärzeiten im Rahmen der EPU ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Es konnten verschiedene Zielgene der miR-144-5p validiert werden, welche mit kardialen Remodeling-Prozessen assoziiert sind. Bei den Zielgenen WNT5A, Smad6, NOS1AP und MARCKS wurde zudem eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression jeweils auf atrialer oder ventrikulärer Ebene festgestellt, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen fehlenden miRNA-bedingten mRNA-Abbau zurückzuführen ist. Auch TGFBR1 wies, trotz fehlender Interaktion mit der miR-144-5p, eine verstärkte mRNA-Expression im rechten Atrium auf, was möglicherweise auf eine Beteiligung des TGF-β_1-Signalwegs hinweist.

Die vorliegenden Daten deuten insgesamt darauf hin, dass ein Knockout der miR-144-5p bei transgenen Mäusen mit einer erhöhten Anfälligkeit für atriale tachykarde Rhythmusstörungen assoziiert ist. Die Ergebnisse legen zudem nahe, dass eine erhöhte mRNA-Expression von WNT5A, Smad6 und NOS1AP durch die Induktion struktureller Remodelingprozesse im atrialen Herzgewebe eine Rolle in diesem Kontext spielen könnte. Um einen direkten Zusammenhang zu belegen und die Auswirkungen des Knockouts auf die mRNA-Translation zu untersuchen, sind jedoch weitere Experimente erforderlich. Zukünftige Studien, die auf den Erkenntnissen dieser Arbeit aufbauen, könnten den Weg für innovative pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten ebnen, die eine gezielte Regulation der miR-144-5p ermöglichen. Dies könnte einen entscheidenden Beitrag zum Krankheitsmanagement bei VHF leisten und die Prognose der Erkrankung möglicherweise signifikant verbessern.

Abstract (English)

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia in humans.[1,2] However, effective therapeutic approaches are lacking, which is partly due to an incomplete understanding of the complex underlying pathophysiological mechanisms.[5-7] As the disease progresses, it often comes to irreversible remodelling in the cardiac tissue and complications that increase morbidity and mortality.[2-4] Innovative diagnostic means and new causal therapeutic approaches could improve the prognosis of AF significantly. Therefore, basic scientific research is of fundamental importance.

MicroRNAs (miRNAs) serve as central mediators of translation and influence numerous structural and electrical remodelling processes in AF.[8-10] Notably, miR-144-5p has emerged as a potential biomarker for AF, as it is downregulated in patients with AF.[11] In a preliminary study the treatment with a miR-144-5p-inhibitor lead to an arrhythmogenic phenotype with left atrial (LA) enlargement in a mouse model with C57BL/6-background. Human embryonic stem cells (H7 hESC-CMs[12]) further showed a prolongation of action potential duration (APD) after transfection with a miR-144-5p-inhibitor.

However, the exact role of miR-144-5p in AF and its underlying mechanisms remain incompletely understood. The aim of this study was to investigate the effects of an *in vivo* knockout (KO) of miR-144-5p on atrial electrophysiology, arrhythmogenesis and structural remodelling in a transgenic mouse model. C57BL/6-wildtype, heterozygous and homozygous miR-144-5p knockout mice were phenotyped *in vivo* by electrocardiography, echocardiography and electrophysiological studies. Tissue samples were examined for fibrosis using Masson's trichrome staining. MiR-144-5p target genes were identified through an *in silico* Targetscan analysis, validated *in vitro* using luciferase reporter assays and analysed for differential expressions in murine cardiac tissue samples by qPCR.

The results indicate that knockout of miR-144-5p in mice leads to increased susceptibility for atrial arrhythmias after burst stimulation during EPS, accompanied by significant LA enlargement and atrial fibrosis, which are two hallmarks of structural remodelling in AF. Echocardiographic analysis revealed no change of wall thickness and no impairment of left ventricular function. Neither the ECG parameters nor the measurement of refractory periods showed significant differences between groups. Several target genes of miR-144-5p that are associated with remodelling were validated by luciferase reporter assays. For the target genes WNT5A, Smad6, NOS1AP and MARCKS a significant increase of mRNA expression was observed on either the atrial or ventricular level, most likely attributed to the absence of miRNA mediated mRNA degradation. Additionally, TGFBR1

mRNA was upregulated in the right atrium, despite TGFBR1 not being identified as a target gene of miR-144-5p, suggesting involvement of the TGF-β_1 signalling pathway.

Overall, the findings indicate that a knockout of miR-144-5p leads to increased vulnerability for atrial arrhythmias in transgenic mice. The data of this study suggests that elevated mRNA-expression levels of WNT5A, Smad6 and NOS1AP may play a role in this context by induction of structural remodelling in atrial heart tissue. However, further experimental investigations are necessary to prove a causal relationship and to investigate the effects of miR-144-5p knockout on mRNA translation. Future studies building upon these results may pave the way for novel pharmacological interventions, which allow for targeted regulation of miR-144-5p. This could significantly enhance the management and prognosis of AF.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Epidemiologie von Vorhofflimmern 18

Abbildung 2. EKG-Charakteristika bei normalem Sinusrhythmus und bei Vorhofflimmern 19

Abbildung 3. Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen bei VHF 23

Abbildung 4. Reentry-Mechanismen bei VHF 24

Abbildung 5. Schematische Darstellung der möglichen Interaktion zwischen der TGFβ_1- und WNT-Signaltransduktion bei der Entstehung von kardialen Fibrose 27

Abbildung 6. Schematische Darstellung der Biogenese von miRNAs und ihren Wirkungsmechanismen..... 29

Abbildung 7. Verschiedene Methoden zur Beeinflussung der miRNA-Aktivität 30

Abbildung 8. Schematische Übersicht potenzieller therapeutischer Interventionen zur Regulierung von VHF-relevanten miRNAs 31

Abbildung 9. Relative Expression der miR-144-5p im Plasma und im linksatrialen Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern..... 34

Abbildung 10. Vorhersagekraft der miR-144-5p Expression im Blut von VHF-Patienten für den Therapieerfolg nach Ablation der Pulmonalvenen..... 35

Abbildung 11. LA-Dilatation in der Echokardiographie nach 14-tägiger Verabreichung eines miR-144-5p-Inhibitors..... 36

Abbildung 12. Gesteigerte Vulnerabilität für VHF in der EPU nach 14-tägiger Verabreichung eines miR-144-5p Inhibitors..... 37

Abbildung 13. Einfluss der miR-144-5p-Expression auf die APD..... 38

Abbildung 14. Das Cre-loxP System..... 42

Abbildung 15. Repräsentative Aufnahmen des linksatrialen Durchmessers in der Echokardiographie 48

Abbildung 16. Repräsentative Darstellung der EKG-Auswertung mithilfe der LabChart Pro-Software 50

Abbildung 17. Schematische Darstellung der Morphologie des endokardialen Elektrogramms abhängig von der Katheterposition 51

Abbildung 18. Gelelektrophorese des qPCR-Produkts zur Genotypisierung der Versuchstiere 64

Abbildung 19. Repräsentative Aufnahmen des Mausherzens in der Histologie 67

Abbildung 20. psiCHECK^{TM}-2 Vektor 68

Abbildung 21. Fibrose-Quantifizierung in der Histologie 84

Abbildung 22. Relative Expression der miR-144-5p im Herzgewebe der Versuchstiere 85

Abbildung 23. Relative Expression der miR-451-3p im Herzgewebe der Versuchstiere 86

Abbildung 24. Verhältnis der Sinusknotenerholungszeit zur intrinsischen Basiszykluslänge in Prozent 88

Abbildung 25. Leitungseigenschaften von AV-Knoten und His-Bündel 88

Abbildung 26. Retrograde Überleitung vom Ventrikel auf die Atrien 89

Abbildung 27. Refraktärzeiten in verschiedenen Herzregionen 90

Abbildung 28. Repräsentative Aufzeichnung atrialer Arrhythmien nach Burst-Stimulation im Rahmen der EPU 91

Abbildung 29. Induzierbarkeit von atrialen tachykarden Rhythmusstörungen nach Burststimulation im Rahmen der EPU 92

Abbildung 30. Histologische Fibrose-Quantifizierung in den Atrien 93

Abbildung 31. Repräsentative Darstellung von fibrotischem Herzgewebe in den Atrien 94

Abbildung 32. Histologische Fibrose-Quantifizierung in den Ventrikeln 95

Abbildung 33. Repräsentative Darstellung von ventrikulärem Herzgewebe . 96

Abbildung 34. Echokardiographische Vermessung des linken Atriums 97

Abbildung 35. Echokardiographische Vermessung der myokardialen Wanddicken des linken Ventrikels 98

Abbildung 36. Parameter der Herzfunktion im Rahmen der Echokardiographischen Untersuchung 100

Abbildung 37. EKG-Parameter 101

Abbildung 38. Daten der körperlichen Untersuchung 103

Abbildung 39. relative Aktivität der Renilla-Luciferase in Prozent 106

Abbildung 40. Positiv- und Negativkontrolle der dualen Luciferase Reporter Assays 107

Abbildung 41. Relative Expression der miR-144-5p Zielgene auf mRNA-Ebene 111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Auswahl an potenziellen Zielgenen der miR-144-5p 104

Tabelle 2 - Zielgenvalidierung mittels dualer Luciferase Reporter Assays . 105

Abkürzungsverzeichnis

AERP	Atriale effektive Refraktärzeit (engl.: *atrial effective refractory period)*
AF	Atrial Fibrillation (englisch)
AKT1/AKT	Proteinkinase B
ANP	Atriales natriuretische Protein
AP	Aktionspotential
APD	Dauer des Aktionspotentials (engl.: *action potential duration*)
AngII	Angiotensin II
AVNRP	Refraktärzeit des AV-Knotens (engl.: *AV node refractory period)*
BCL	Basiszykluslänge (engl.: *basic cycle length)*
BMP	Bone Morphogenic Protein
bp	Basenpaare
CDH	Cadherin
CDH11	Cadherin 11
CO	Herzzeitvolumen (engl.: *cardiac output*)
COLI	Kollagen Typ I
COLIII	Kollagen Typ III
DAD	Späte Nachdepolarisation (engl.: *Delayed After Depolarisation*)
EAD	Frühe Nachdepolarisation (engl.: *Early After Depolarisation*)
EDV	Enddiastolisches linksventrikuläres Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EPU/EPS	Elektrophysiologische Untersuchung (engl.: *electrophysiological study*)
ESV	Endsystolisches linksventrikuläres Volumen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (engl.: *fluorescence-activated cell sorting*)

Fluc	Firefly-Luciferase, hluc+
FS	Fraktionelle Verkürzung *(*engl.: *fractional shortening)*
HZV	Herz-Zeit-Volumen
I/R	Ischämie-Reperfusion
IL	Interleukin
IRI	Ischämie-Reperfusions-Schädigung (engl.: *ischemia reperfusion injury*)
IVS	Interventrikuläres Septum
JNK	c-Jun-N-terminale-Kinasen
KO	Knockout
KO/+	Heterozygot Knockout
LA	Linkes Atrium, linker Vorhof
LAD	Linke Koronararterie
lncRNA	Lange nicht-kodierende RNA
LV	Linker Ventrikel, linke Herzkammer
LVID	Linksventrikulärer interner Durchmesser
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (engl.: *mitogen activated protein kinase*)
MARCKS	Myristoyliertes Alanin-reiches Substrat der Protein Kinase C
MBNL	Muscleblind Like Splicing Regulator
MCS	Mehrfache Klonierungsstelle (engl.: *multiple cloning site*)
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger-RNA
mTOR2	Serin/Threonin-Proteinkinase 2
mTORC2	mTOR-Komplex 2
NOS1	Neuronale Nitric Oxide Synthase
NOS1AP	Nitric Oxide Synthase 1 Adaptor Protein
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PKC	Proteinkinase C
PLAX	Lange Achse des Herzens
PSAX	Kurze Achse des Herzens
PW	Hintere Herzwand des linken Ventrikels (engl.: *posterior wall*)
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion in Echtzeit
RA	Rechtes Atrium, rechter Vorhof
RICTOR	Rapamycin-independent Companion des MTOR Komplexes 2
RISC	RNA-induzierter silencing-Komplex (engl.: *RNA-induced silencing complex)*
Rluc	Renilla-Luciferase, hRluc
ROCK	Rho-assoziierte Coiled-Coil-beinhaltende Protein-Kinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RV	Rechter Ventrikel, rechte Herzkammer
SMAD6	Mitglied Nummer 6 der Smad-Familie
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: *single nucleotide polymorphism*)
SNRT	Sinusknotenerholungszeit (engl.: s*inus node recovery time)*
SV	Schlagvolumen
TAC	transverse aortale Verengung (engl.: *transverse aortic constriction*)
TGF-β_1	Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (engl.: *transforming growth factor-β1*)
TGFBR1	TGF-β_1-Rezeptor 1
UTR	Nicht-translatierte Region einer mRNA (engl.*: untranslated region)*
VERP	Ventrikuläre effektive Refraktärzeit (engl.: *ventricular effective refractory period)*
VHF	Vorhofflimmern
WNT5A	Mitglied Nummer 5 der WNT-Familie
WT	Wildtyp

1. Material und MethodenEinleitung

1.1 Vorhofflimmern

1.1.1 Epidemiologie

Vorhofflimmern (VHF) stellt die häufigste persistierende Herzrhythmusstörung des Menschen dar.[1] Schätzungen der American Heart Association (AHA) zufolge lag die globale Prävalenz im Jahr 2020 bei etwa 55 Millionen Betroffenen.[13,14] Zwischen 1990 und 2019 hat sich die Prävalenz weltweit nahezu verdoppelt[15] und im Zuge des demographischen Wandels ist mit einer weiteren Zunahme von Inzidenz und Prävalenz zu rechnen (**Abbildung 1A**).[2,16,17] Schätzungen zufolge wird in Zukunft etwa ein Drittel der europäischen Bevölkerung im Alter von über 55 Jahren an VHF erkranken (**Abbildung 1B**)[17-20] und die Prävalenz in den Vereinigten Staaten wird sich bis zum Jahr 2050 voraussichtlich mehr als verdoppeln.[17,21]

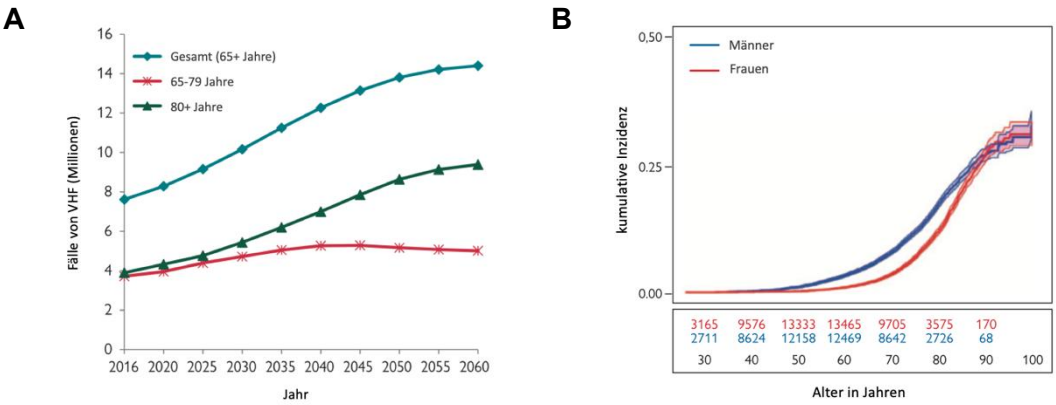


Abbildung 1. Epidemiologie von Vorhofflimmern

A, Projektion des Prävalenz-Anstiegs von VHF bei älteren EU-Bürgern von 2016-2060. **B**, Kumulative Inzidenz von VHF bei Frauen und Männern abhängig vom Lebensalter (die schraffierten Bereiche markieren die 95%-Konfidenzintervalle). Die Inzidenz von VHF steigt mit zunehmendem Alter deutlich an. VHF tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf. Modifiziert nach Hindricks et al. 2021.[17] (Translated and reproduced by permission of Oxford University Press on behalf of the European Society of Cardiology. Translation Disclaimer: OUP and the European Society of Cardiology are not responsible or in any way liable for the accuracy of the translation. The Licensee is solely responsible for the translation in this publication/reprint.)

Die Erkrankung ist mit einer signifikant gesteigerten Morbidität und Mortalität assoziiert.[17,20] Das Schlaganfallrisiko ist bei Patienten mit VHF um das Fünffache erhöht.[22,23] Das Risiko für die Entwicklung einer Demenz verdoppelt sich und es kommt

dreimal häufiger zur Ausbildung einer linksventrikulären Dysfunktion.[17,22,23] Aufgrund der kostspieligen Versorgung von Patienten mit VHF kann man von einer ernsthaften Herausforderung für das Gesundheitssystem sprechen.[2,4,22,24]

1.1.2 Definition

Bei VHF handelt es sich um eine supraventrikuläre tachykarde Herzrhythmusstörung.[17] Im Gegensatz zur normalen Herzaktivität (**Abbildung 2A**), zeichnet sich die Arrhythmie durch eine unkoordinierte Erregungsbildung und -ausbreitung in den Vorhöfen aus, die in Form kreisender Erregungen auftritt.[25] In der Folge kommt es zu einer ineffektiven Kontraktion des Vorhofmyokards sowie zu einer irregulären, oftmals schnellen Aktivierung der Ventrikel.[25] Dies kann die kardiale Kontraktionskraft schwächen und klinische Symptome hervorrufen.[25] Im Elektrokardiogramm (EKG) zeigen sich typischerweise unregelmäßige, arrhythmische R-R-Intervalle, ein Fehlen charakteristischer P-Wellen und eine irreguläre Aktivität des Vorhofmyokards (**Abbildung 2B**).[17,20,25]

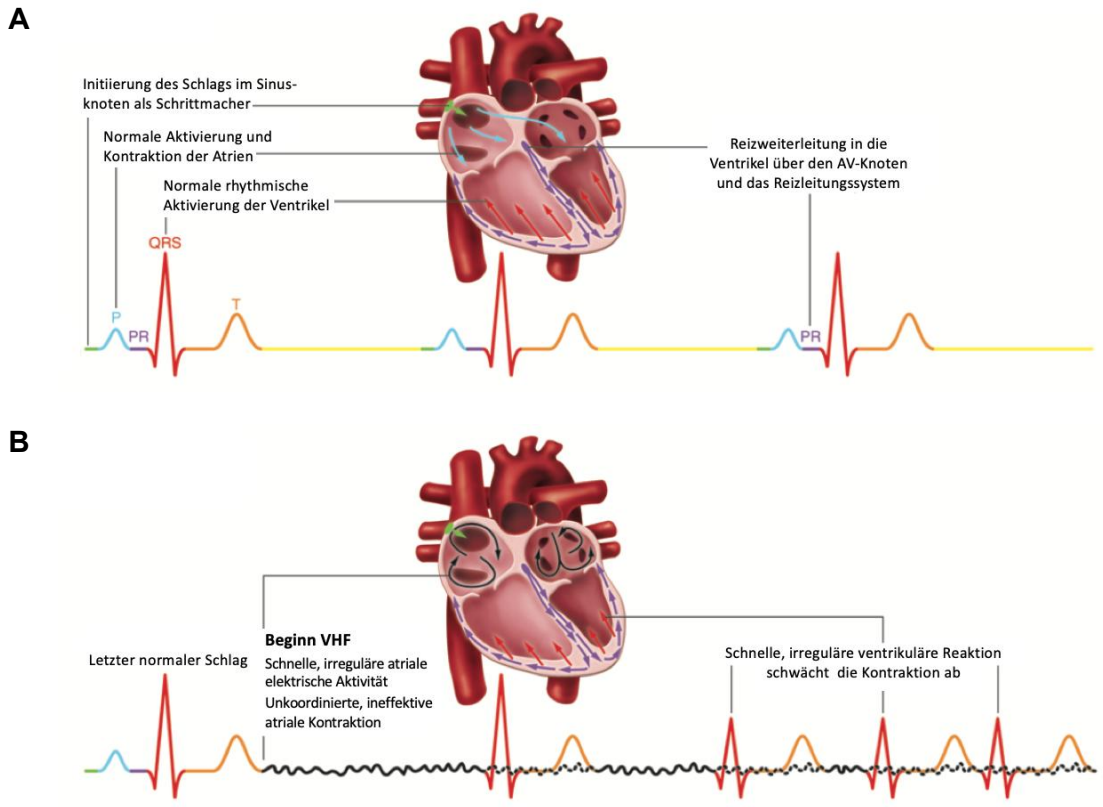


Abbildung 2. EKG-Charakteristika bei normalem Sinusrhythmus und bei Vorhofflimmern

A, Normaler Sinusrhythmus. oben: schematische Übersicht der Hauptereignisse während eines Zyklus der Herzaktivität: die Herzerregung wird rhythmisch im Sinusknoten als Schrittmacher initiiert und aktiviert

das Vorhofmyokard, die Reizweiterleitung erfolgt über den AV-Knoten, das His-Bündel und die Purkinje-Fasern und führt schließlich zur Aktivierung der Ventrikel. unten: EKG-Aufnahme bei normalem Sinusrhythmus. **B**, Vorhofflimmern. oben: Bei VHF führt die schnelle, unkoordinierte atriale Aktivität zu einer ineffektiven Vorhofkontraktion. Aufgrund kreisender Erregungen erfolgt die Aktivierung der Ventrikel (QRS-Komplexe) irregulär, was die kardiale Kontraktionskraft schwächt und klinische Symptome hervorrufen kann. unten: EKG-Aufnahme, die den Beginn von VHF nach einem regulären Herzschlag im Sinusrhythmus zeigt. Die Aktivierung der Atrien erfolgt schnell und unregelmäßig, was eine undulierende Grundlinie im EKG hervorruft, welche jedoch nur außerhalb der größeren QRS- und T-Wellen sichtbar ist (die kontinuierliche Aktivität der Atrien wird durch die gestrichelte Linie repräsentiert). Modifiziert nach Wakili et al. 2011.[25]

1.1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie

Aufgrund der heterogenen Natur des Krankheitsbildes, gestaltet sich die Diagnosestellung oft herausfordernd und erfolgt häufig erst nach dem Auftreten von Komplikationen.[26] Zwischen 50 und 87% der Patienten präsentieren sich initial asymptomatisch[17], was zu einer Verzögerung der Diagnostik führt[17,27], obwohl die Prognose bereits zu diesem Zeitpunkt ungünstig sein kann.[28,29] Die Symptome reichen von Herzrasen, Brustschmerz, Atemnot, Erschöpfung und Angstgefühlen[17,30,31] bis zu den Folgen thromboembolischer Ereignisse wie Schlaganfälle oder einer akuten Arrhythmie-bedingten hämodynamischen Instabilität im Extremfall.[20] Zu den wesentlichen Risikofaktoren zählen arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz, Adipositas, Bewegungsmangel sowie das obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS).[20]

VHF kann anhand von Faktoren wie der klinischen Präsentation, Dauer, Symptomatik und Art der Terminierung in verschiedene Formen unterteilt werden[17,20]:

- **Erstdiagnostiziertes VHF**, welches unabhängig von bestehenden Symptomen, Verlauf oder Dauer der Erkrankung zuvor noch nicht diagnostiziert wurde
- **Paroxysmales VHF**, welches spontan oder durch Intervention innerhalb von 7 Tagen nach Beginn zurück in den Sinusrhythmus konvertiert
- **Persistierendes VHF**, welches nicht eigenständig sistiert und kontinuierlich über die Dauer von 7 Tagen hinaus anhält, jedoch danach durch Kardioversion (medikamentös oder elektrisch) beendet werden kann
- **Langanhaltend persistierendes VHF**, welches kontinuierlich und bereits länger als 12 Monate anhält, bis eine rhythmuskontrollierende Intervention durchgeführt wird
- **Permanentes VHF**, welches von Arzt und Patient akzeptiert wird, ohne dass eine rhythmuskontrollierende Intervention angestrebt wird

Heutzutage wird VHF jedoch primär als eine fortschreitende Erkrankung betrachtet, bei der die anfänglich oft kurzen und seltenen paroxysmalen Episoden im Verlauf in persistierendes und schließlich in permanentes VHF übergehen.[13] Die Progression wird durch VHF-assoziierte Remodeling-Prozesse im Herzen begünstigt.[13,25,32,33] Da Herzerkrankungen sowohl Ursache als auch Folge von VHF sein können[34], entsteht häufig ein Teufelskreis, wobei die Erkrankung ihre eigene Progression verstärkt.[25,32]

Aktuell sind die Möglichkeiten zur Früherkennung von VHF limitiert.[35] Die gängigen diagnostischen Mittel beschränken sich derzeit auf Risiko-Scores (z.B. CHARGE-AF oder C_2HEST Score[13]), die Palpation des Pulses, EKG-Untersuchungen und Blutdruckmessgeräte mit einer Funktion zur Detektion von VHF.[35] Als Methode der ersten Wahl gilt die Ableitung eines Standard-12-Kanal- oder Ein-Kanal-Oberflächenelektrokardiogramms.[17,36] Bei diagnostischen Schwierigkeiten wird die Durchführung eines Langzeit-EKGs[37], oder in Ausnahmefällen auch die Implantation eines Eventrecorders empfohlen.[38] Neuere Technologien, wie tragbare Geräte und (Mikro-) Implantate verbessern die Diagnosemöglichkeiten bei Patienten mit einem erhöhtem Risiko für VHF, dennoch fehlen klare Leitlinien zu ihrem Einsatz.[13,17] Ein Screening-Instrument zur Früherkennung von VHF wäre insbesondere im Hinblick auf die Vermeidung von kardialem Remodeling und thromboembolischen Ereignissen von Bedeutung.

Als Leitfaden für die Therapie von VHF empfiehlt die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) seit dem Jahr 2024 den AF-CARE-Pfad.[20] Im Fokus stehen dabei die folgenden Dimensionen:

- **C** = Management von Komorbiditäten und Risikofaktoren
- **A** = Vermeidung (engl.: *avoidance*) von Schlaganfall und Thromboembolien
- **R** = Rhythmus- und Frequenzkontrolle
- **E** = Evaluation und dynamische Neubewertung

Trotz des anhaltenden Fortschritts und verbesserter Behandlungskonzepte gestaltet sich die Therapie von VHF häufig als Herausforderung.[39] Ursächlich dafür sind diverse Probleme, wie eine mangelnde Wirksamkeit, Komplikationen und Limitationen in der Anwendung, sowie zahlreiche unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie zum Beispiel Blutungen.[7,17,39-41] Auch mit einem individuell optimal angepassten Behandlungskonzept kommt es häufig zu Rezidiven und einer Krankheitsprogression mit erhöhtem Risiko für Komplikationen.[6,42-44] Aufgrund der Arrhythmie-bedingten strukturellen Remodeling-Prozesse in den Vorhöfen ist in fortgeschrittenen Krankheitsstadien häufig keine langfristige Symptomfreiheit mehr zu erreichen.[45-49] Es ist hervorzuheben, dass derzeit

ein Mangel an kausalen Behandlungsansätzen zur Behandlung von VHF besteht.[5] Mit den gegenwärtig verfügbaren Therapiemöglichkeiten gelingt häufig lediglich eine Linderung der Symptome.[5] Innovative Therapieansätze könnten durch die Prävention oder Umkehrung der pathologischen Prozesse eine effektivere und gezielte Behandlung ermöglichen und folglich zu einer Reduktion von Morbidität und Mortalität beitragen.[3,6,50]

1.1.4 Physiologische Reizleitung im Herzen und Pathophysiologie von Vorhofflimmern

Das Herz ist eine rhythmische, elektromechanische Pumpe.[51] Als primäre Schrittmacherregion fungiert der Sinusknoten, dessen spezialisierte Herzmuskelzellen eine rhythmische elektrische Automatizität mit einer diastolischen Depolarisation zur Generierung von Aktionspotentialen (AP) zeigen.[52,53] Die elektrische Aktivität ist Ausdruck einer sequenziellen Aktivierung und Inaktivierung von spezifischen Ionenkanälen, wobei sich die unterschiedlichen Expressionsmuster der Kanäle in den entsprechenden Leitungseigenschaften der verschiedenen Herzregionen widerspiegeln.[51,54] Die elektrische Kopplung der Zellen über Gap Junctions ermöglicht die physiologische Weiterleitung des Reizes.[51,54] Die unidirektionale Reizweiterleitung und der normale Sinusrhythmus werden dabei durch die genaue Koordination von Erregung, Reizleitung, Refraktärzustand und elektromechanischer Kopplung sichergestellt (**Abbildung 4A**).[51]

Eine Störung dieses empfindlichen Äquilibriums, zum Beispiel durch eine Fibrose, kann zu lebensbedrohlichen Arrhythmien mit einer schnellen und unregelmäßigen Vorhofaktivität führen.[51,55] Anstatt sich zu kontrahieren, zittern die Atrien bei VHF lediglich und verlieren ihre Pumpfähigkeit.[53] Bislang ist es noch nicht gelungen, die genauen Mechanismen von VHF vollständig zu entschlüsseln, da die Erkrankung multifaktoriell bedingt und von weitaus größerer Komplexität ist, als bisher angenommen.[44] VHF kann sowohl Ursache als auch Folge verschiedener pathophysiologischer Prozesse sein, welche von Patient zu Patient signifikant variieren.[44,56] Im gesunden Herzen werden Arrhythmien physiologisch durch die elektrischen Eigenschaften des atrialen Gewebes unterdrückt, doch bei VHF stören Remodeling-Prozesse diese Schutzmechanismen und schaffen ein Substrat für die Arrhythmie.[57] Viele dieser Anpassungsprozesse haben initial einen protektiven Effekt, fördern jedoch langfristig das Fortschreiten der Erkrankung von paroxysmalem, über persistierendes, zu schließlich permanentem VHF („AF begets AF“) (**Abbildung 3**).[10,33,58]

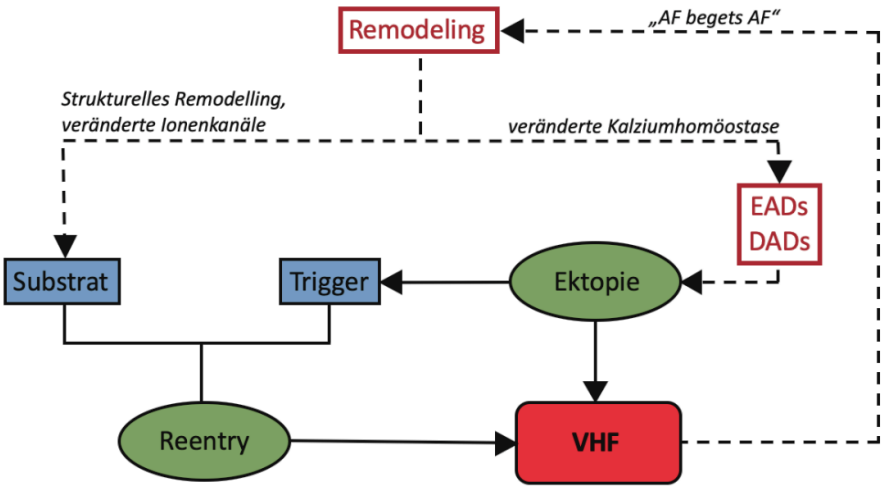


Abbildung 3. Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen bei VHF

EADs = frühe Nachdepolarisationen; DADs = späte Nachdepolarisationen. Modifiziert nach Dobrev et al., 2010.[59]

Die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF kann grundlegend auf die Interaktion zwischen einem Auslöser (Trigger) und einem dafür empfänglichen Substrat zurückgeführt werden.[25,53,57] Der Trigger initiiert die Arrhythmie als ein schnell mit elektrischen Reizen feuernder Herd im Vorhof.[25,53,57] Dabei handelt es sich häufig um eine abnormale fokale elektrische Aktivität (Ektopie), als Folge einer Störung des zellulären Kalziumhandlings.[25,53,57] Da mit jedem AP neues Kalzium in die Zelle strömt, kommt es infolge der schnellen Vorhofaktivität bei VHF zu einer zellulären Kalziumüberladung, was frühe Nachdepolarisationen (EADs) und späte Nachdepolarisationen (DADs) verursachen kann.[25,53,58,60] Paroxysmales VHF wird häufig durch Trigger im Gewebe der Pulmonalvenen ausgelöst, weshalb eine Ablation dieser vor allem in anfänglichen Stadien eine vielversprechende Therapiemöglichkeit darstellt.[61]

Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium werden die Episoden jedoch vermehrt durch ein Substrat hervorgerufen, welches durch komplexe und irreversible Veränderungen auf struktureller und elektrischer Ebene (strukturelles und elektrisches Remodeling) entsteht.[13,44,62] Ein solches Substrat umfasst bestimmte elektrophysiologische, mechanische und anatomische Charakteristika der Vorhöfe, welche die Aufrechterhaltung der Arrhythmie durch Reentry (dt.: kreisende Erregung) ermöglichen.[25,53] Ein Reentry beschreibt das Phänomen einer kreisenden Erregung, welche durch veränderte Leitungseigenschaften, wie einer schnelleren

Wiedererregbarkeit (**Abbildung 4B**), einer reduzierten Leitungsgeschwindigkeit (**Abbildung 4C**) oder veränderten Leitungswegen (**Abbildung 4D**) hervorgerufen werden kann.[25,53,55,63]

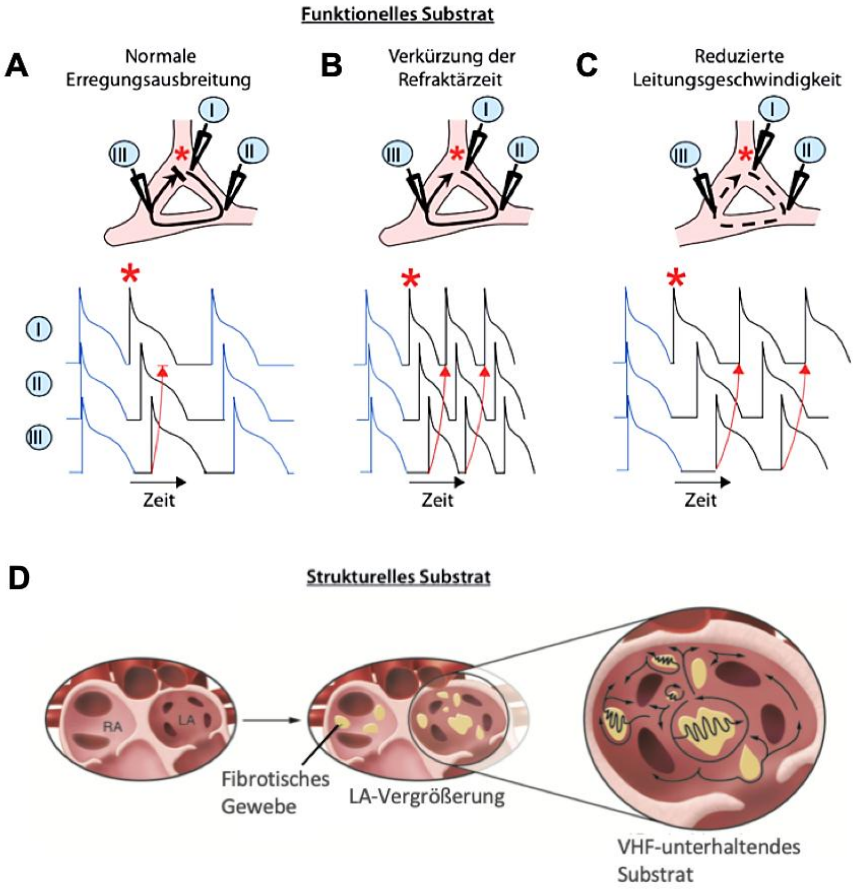


Abbildung 4. Reentry-Mechanismen bei VHF

Auswirkungen eines funktionellen und eines strukturellen Substrats auf die Erregungsleitung; * = ektoper Reiz; I, II, III = Weg der Erregungsleitung. **A**, normale Erregungsausbreitung im Vorhof: der ektope Reiz trifft auf Zellen in der Repolarisationsphase, es kommt nicht zum Reentry. **B**, Erregungsausbreitung bei Verkürzung der Refraktärphase: der ektope Reiz trifft auf erregbare Zellen, es kommt zum Reentry. **C**, Erregungsausbreitung bei reduzierter Leitungsgeschwindigkeit: der ektope Reiz wird verlangsamt weitergeleitet und trifft auf bereits wieder erregbare Zellen, es kommt zum Reentry. **D**, Durch atriale Fibrose und LA-Vergrößerung entstehen mehrere Substrate, welche die kreisenden Erregungen des VHFs unterhalten. Modifiziert nach Wakili et al., 2011[25].

Elektrische Remodeling-Prozesse umfassen alle Anpassungs- und Umbauvorgänge, welche die Expression und/oder Funktion von Ionenkanälen beeinflussen.[44,57,58] Diese Veränderungen werden hauptsächlich durch eine Kalziumüberladung der Zelle infolge der schnellen Vorhofaktivität bei VHF hervorgerufen.[25,53] In der Regel kommt es zu einer

Verkürzung der APD und der atrialen effektiven Refraktärzeit (AERP, engl.: *atrial effective refractory period*), was die Zelle schneller wieder erregbar und anfälliger für Reentry macht (**Abbildung 4B**).[25,53,63,64] Zudem können Anomalien im zellulären Kalziumhandling zu einer atrialen Dilatation im Sinne des strukturellen Remodelings beitragen.[44,58,63,65] Das strukturelle Remodeling beschreibt dahingegen alle Veränderungen der atrialen Größe, Gewebeeigenschaften und zellulären Feinstruktur[66], die zur Entstehung eines arrhythmogenen Substrats beitragen und die Wahrscheinlichkeit für Reentrys erhöhen.[67,68] Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Dilatation des linken Atriums (LA-Dilatation) und der atrialen Fibrose zu.[25,58,63,66] Bei strukturellem Remodeling handelt es sich um einen sich selbst verstärkenden Prozess.[58,69] Es kann sowohl Ursache, als auch Folge von VHF sein.[32,58,69] Insgesamt stellen Remodelingprozesse einen entscheidenden Faktor für die Chronifizierung der Erkrankung dar und sind ein Grund für die im Krankheitsverlauf zunehmende Resistenz gegenüber etablierten Therapieansätzen (medikamentös und interventionell).[6,50] Zur Abwendung der Krankheitsprogression bei VHF ist es daher von entscheidender Bedeutung, Remodelingprozesse zu verhindern.[6,50]

1.1.5 Fibrose im Kontext von Vorhofflimmern

Im Zentrum struktureller Remodelingprozesse steht unter anderem die kardiale Fibrose.[48,69] Sie kann sowohl physiologisch als Reparaturmechanismus, als auch pathologisch im Rahmen verschiedener Krankheitsprozesse auftreten.[48] Als zentraler Schritt in der Fibrose-Entstehung gilt die Differenzierung von kardialen Fibroblasten in sezernierende, α-SMA-exprimierende Myofibroblasten.[69] Entzündungszellen wie kardiale Makrophagen können diese Fibrose-fördernden Myofibroblasten rekrutieren, indem sie verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren wie Angiotensin II (AngII), den Plättchenwachstumsfaktor (PDGF), den Connective Tissue Growth Factor (CTGF) und den transformierenden Wachstumsfaktor TGF-β_1 (engl.: *transforming growth factor-β1*) sezernieren.[49,69,70] Die exzessive Proliferation der Fibroblasten führt zu einer Akkumulation von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) im Myokard.[71,72] Im Verlauf resultiert dies in einer irreversiblen Versteifung des Herzgewebes und unterbricht die elektrische Kopplung der Kardiomyozyten im Sinne eines physischen Leitungshindernisses.[55] Diese Veränderungen können wiederum das kardiale Reizleitungssystem sowie die kontraktilen Eigenschaften des Myokards beeinträchtigen und unterhalten bei VHF die stetige Krankheitsprogression.[71]

Insbesondere eine atriale Fibrose gilt als typisches Kennzeichen von VHF.[58,68] In den letzten Jahrzehnten konnten diverse profibrotische Faktoren identifiziert werden, welche

die Expression von Proteinen der EZM im Herzen beeinflussen.[58,73,74] Im Kontext von VHF gilt AngII als zentraler Mediator von strukturellen Remodeling-Prozessen.[74] Bei Mäusen führt eine gesteigerte Expression von AngII zu VHF-Episoden sowie zu einer ausgeprägten atrialen Dilatation mit fokaler Fibrose.[75] AngII kann kardiale Fibroblasten zur Synthese und Ausschüttung von EZM-Proteinen anregen, indem Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und nachgeschaltete profibrotische Faktoren wie der TGF-β_1 aktiviert werden.[69] TGF-β_1 ist der wohl bekannteste Faktor im Rahmen der Fibrose-verursachenden Signalkaskaden im Herzen.[58,73] Mithilfe von Smad-Proteinen reguliert TGF-β_1 die Transkription verschiedener Zielgene, die für Signalstoffe der Zellproliferation und -differenzierung, sowie für EZM-Proteine (Kollagene, Laminine, Fibronektin, u.a.) kodieren.[68,71] Bei VHF führt die erhöhte Expression von TGF-β_1 langfristig zur Ausprägung der charakteristischen atrialen Fibrose.[68,76] Auch der WNT-Signalweg ist an der Induktion einer kardialen Fibrose beteiligt und es besteht eine enge Verknüpfung mit dem TGF-β_1-Signalweg.[71] TGF-β_1 aktiviert den WNT/β-Catenin-Signalweg, welcher wiederum die TGF-β/Smad-Signalvermittlung stabilisiert.[71] Eine simultane Aktivierung beider Signalwege scheint erforderlich zu sein, um eine effektive Fibrose-Entwicklung zu initiieren.[71] Darüber hinaus übt der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Protein Kinase B (AKT1)-Signalweg einen regulatorischen Einfluss auf das physiologische und pathologische Auftreten einer kardialen Fibrose aus und auch dieser Signalweg kann durch TGF-β_1 aktiviert werden.[77-79] Der PI3K/AKT-Signalweg fördert die Überlebensfähigkeit von Fibroblasten, indem die Transkription verschiedener profibrotischer Gene initiiert wird (**Abbildung 5**).[77-79]

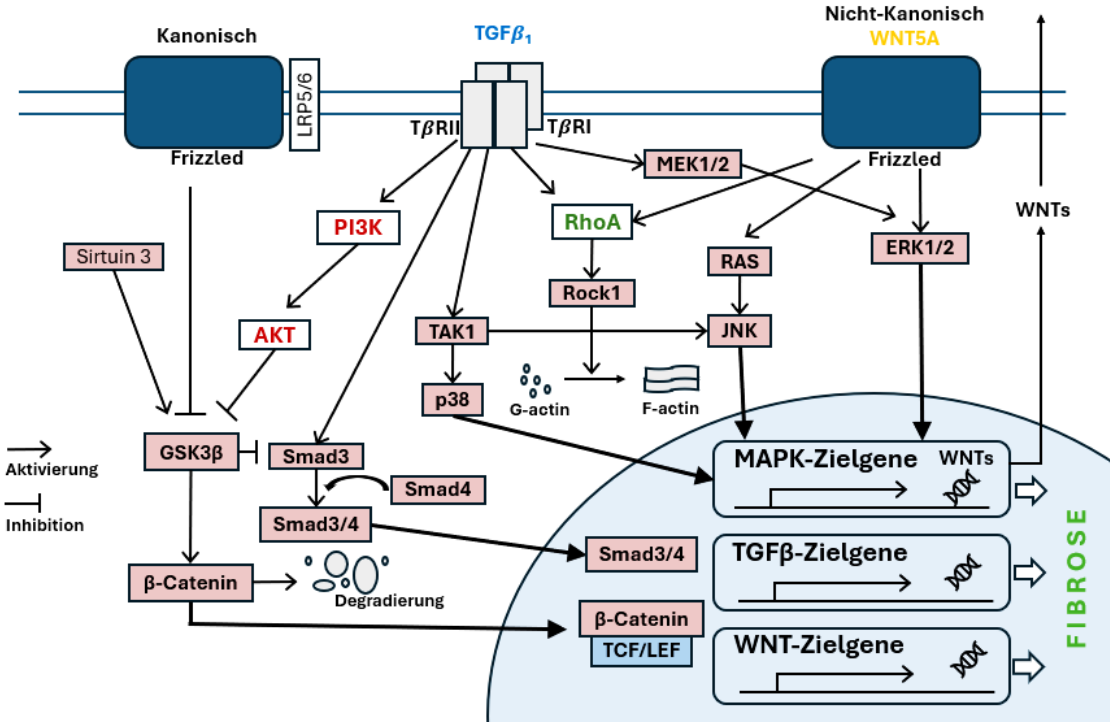


Abbildung 5. Schematische Darstellung der möglichen Interaktion zwischen der TGFβ_1- und WNT-Signaltransduktion bei der Entstehung von kardialen Fibrose

TGFβ_1 aktiviert den WNT-Signalweg durch die Synthese weiterer WNTs und durch die direkte Inhibition von GSK3β. Der aktivierte WNT-Signalweg stabilisiert im Gegenzug den TGFβ_1/SMAD-Signalweg. Die nicht-kanonische TGFβ_1-Antwort (SMAD-unabhängig) und die nicht-kanonische WNT-Antwort (β-Catenin-unabhängig) erfolgen über die Aktivierung von MAP-Kinasen (*„mitogen activated protein“*: p38, JNK = c-Jun-N-terminale-Kinasen, Erk1/2 = durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen) und RhoA/ROCK. Diese Signalkaskaden führen zur Expression profibrotischer Gene, welche einen fibrotischen Umbau auf zellulärer Ebene und im Gewebe hervorrufen können. Modifiziert nach Dzialo et al., 2018.[71]

1.2 MicroRNA (miRNA)

1.2.1 Beeinflussung der Genexpression durch miRNAs

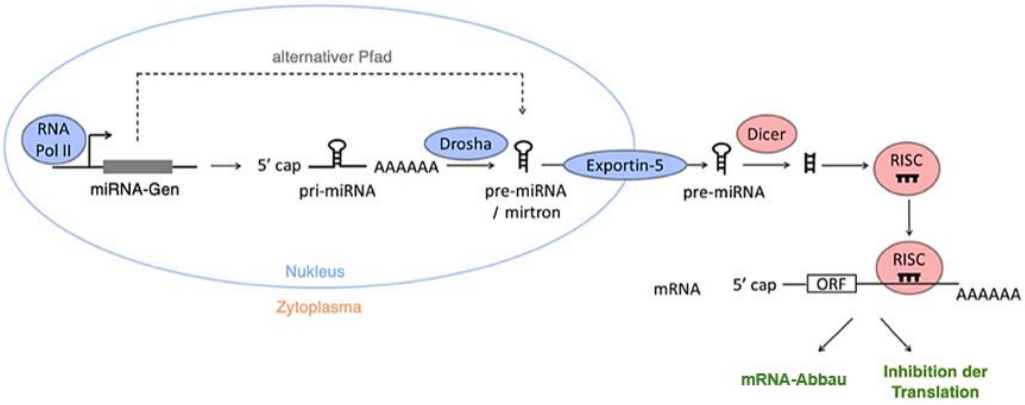
Im Jahr 1993 entdeckten Lee et al. erstmals die microRNAs (miRNAs) – eine bis dahin unbekannte Gruppe zentraler Mediatoren der Translation.[8,80] Diese miRNAs sind kurze (etwa 22 Basenpaare lange), nicht-kodierende, einzelsträngige RNA-Fragmente, die ubiquitär im Organismus vorkommen.[8] Durch Bindung an komplementäre Sequenzen einer Ziel-messengerRNA (mRNA) können sie die Genexpression post-transkriptionell regulieren.[8] MiRNAs und ihre Zielgene sind evolutionär auffallend hoch konserviert.[81] Es wird angenommen, dass die Mehrzahl aller Protein-kodierenden Gene unter dem Einfluss der miRNAs steht.[82] Dies bedeutet, dass praktisch jeder biologische Vorgang

ihrer Regulation unterliegt.[83] Eine miRNA kann viele verschiedene Zielgene beeinflussen, während jedes Gen gleichzeitig durch unterschiedliche miRNAs reguliert werden kann.[10] Funktionell handelt es sich bei miRNAs um reine Repressoren.[63] Die gleichzeitige Beeinflussung von Agonisten und Antagonisten in einem komplexen regulatorischen Netzwerk legt jedoch ihre Rolle als Feintuner der Genexpression nahe.[10]

Während der Biogenese einer miRNA entstehen ein Leitstrang (5p) sowie ein Folgestrang (3p).[84,85] In der Regel bleibt jedoch lediglich der Leitstrang erhalten um seine Wirkung zu entfalten.[84,85] Durch Bindung an das Argonaute 2-Protein (Ago2) wird der Effektor-Komplex RISC (RNA-induzierter silencing-Komplex, engl.: *RNA-induced silencing complex*) gebildet, welcher die Expression einer Ziel-mRNA post-transkriptionell regulieren kann (**Abbildung 6A)**.[8,63,86,87] Jede reife miRNA besitzt am 5'-Ende zwischen dem zweiten und achten Nukleotid eine spezifische „Seed Region", welche der Zielerkennung dient und den RISC durch mehr oder weniger komplementäre Basenpaarung an die Ziel-mRNA bindet.[86,88] Bei perfekter Übereinstimmung von „Seed Region" und komplementärer mRNA-Sequenz wird die Proteinexpression gehemmt, indem der RISC die Ziel-mRNA spaltet (mRNA-Abbau).[84,85] Im Falle einer nicht vollständig übereinstimmenden Komplementarität wird die Translation hingegen lediglich unterdrückt (translationale Suppression) (**Abbildung 6B**).[85,87]

Wird eine miRNA herabreguliert oder vollständig supprimiert, wird die Expression der entsprechenden Zielgene folglich nicht mehr unterdrückt.[83] Der Organismus kann dies häufig ohne Ausbildung eines Phänotyps verkraften.[83] Auf der anderen Seite ist es möglich, dass bereits eine geringe Überexpression bestimmter Zielgene einen starken Einfluss auf den Phänotyp ausüben kann, insbesondere wenn diese Zielgene funktionell miteinander verknüpft sind.[83]

A



B

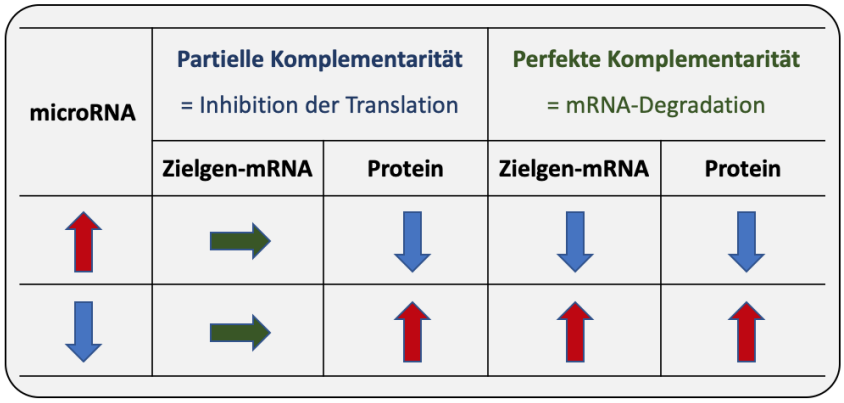


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Biogenese von miRNAs und ihren Wirkungsmechanismen

A, Ein miRNA-Gen wird von der RNA-Polymerase II (RNA Pol II) in eine pri-miRNA mit Haarnadelstruktur transkribiert. Noch im Nukleus wird die pri-miRNA von der RNase III Endonuklease Drosha in die haarnadelförmige Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Alternativ können pre-miRNAs unabhängig vom Drosha-Komplex durch direktes Splicing aus Introns entstehen und werden dann mirtrons genannt. Die pre-miRNAs/mirtrons werden dann mithilfe des GTP-abhängigen Protein-Transporters Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma werden die pre-miRNAs von der RNase III Endonuklease Dicer zu einem kurzen etwa 22 bp langen doppelsträngigen miRNA-Fragment gespalten. Nach der Auftrennung können beide miRNA-Stränge funktionsfähig werden, jedoch wird in der Regel nur ein Strang, der Leitstrang, in den RNA-induzierten silencing-Komplex (RISC, engl.: *RNA-induced silencing complex)* eingebaut. Der miRNA-RISC-Komplex, welcher das Argonaute 2 (Ago2) Protein enthält, bindet dann die Seedsequenz in der 3'UTR der Ziel-mRNA und hemmt die Genexpression durch Inhibition der Translation oder durch Spaltung der mRNA. Modifiziert nach A. Wojciechowska, et al., 2017.[87] **B**, Effekte auf die Zielgen-mRNA und Proteinexpression bei Hoch- (oben) oder Herabregulation (unten) einer microRNA und je nach Komplementarität zwischen Seedregion und Zielgen-mRNA.

1.2.2 Die Rolle von miRNAs in Bezug auf Vorhofflimmern

Im Herzen spielen miRNAs eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der elektrischen und strukturellen Homöostase.[9] Es ist keineswegs überraschend, dass eine Störung dieses fein abgestimmten Systems zum Auftreten von Krankheiten führen kann.[86,87] Anhand verschiedener Studien konnten bereits diverse miRNAs identifiziert werden, welche im Blut und/oder Herzgewebe von VHF-Patienten eine veränderte Expression aufweisen und nachweislich an der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF beteiligt sind.[9,10] Wichtige Mediatoren des elektrischen Remodelings sind zum Beispiel die miR-1, miR-26, miR-208a, miR-328 und die miR-499.[63] Sie beeinflussen die kardiale Elektrophysiologie, indem sie Zielgene für Ionenkanäle, Connexine und Proteine des Kalziumhaushalts regulieren.[10] Auf diese Weise können sie eine Verzögerung der elektrischen Leitung oder eine Verkürzung der APD vermitteln.[10] Die

miR-26, miR-29b[25,63,89], miR-30, miR-133, miR-590[90] und miR-384-5p[91] sind dahingegen wichtige Mediatoren des strukturellen Remodelings. Einige dieser miRNAs dienen zudem als Biomarker für atriale Fibrose bei VHF.[92]

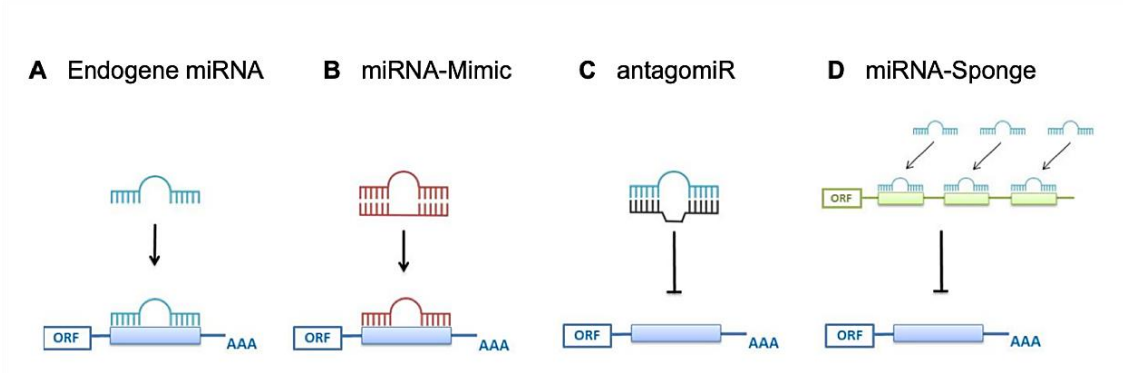


Abbildung 7. Verschiedene Methoden zur Beeinflussung der miRNA-Aktivität

A, Eine endogene miRNA (blau) bindet die komplementäre Sequenz der Seed-Region (blaue Box) in der 3'UTR der mRNA eines Zielgens. **B**, Ein miRNA-Mimic (rot) ist ein chemisch synthetisiertes doppelsträngiges mRNA-Molekül. Sie imitiert die endogene miRNA-Aktivität, indem sie komplementäre mRNA-Sequenzen der Zielgene angreift. **C**, Eine antagomiR (schwarz) ist ein synthetisches Oligonukleotid welches komplementär zu einer bestimmten miRNA ist. Das Oligonukleotid bindet die komplementäre miRNA und inhibiert ihre Aktivität. **D**, Ein miRNA-Sponge (grün) exprimiert mehrere Seed-Sequenzen für eine spezifische miRNA. Durch Bindung der Ziel-miRNAs wird die Anzahl freier und aktiver miRNAs reduziert und folglich die Aktivität der Ziel-miRNA herabreguliert. Modifiziert nach A. Wojciechowska, et al., 2017.[87]

Da miRNAs wichtige Mediatoren in der Pathophysiologie von VHF darstellen[10], ist es naheliegend sie als Angriffspunkt für die Therapie zu verwenden. Bereits heute wird der Einsatz von miRNAs als Therapieoption für die Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen klinisch erprobt.[10,93] MiRNAs können selbst als Therapeutikum eingesetzt werden, oder als Angriffspunkt für Medikamente dienen.[94] Wird eine miRNA im Rahmen einer Krankheit herabreguliert, so kann ihre Funktion durch sogenannte „miRNA mimics" ersetzt werden (**Abbildung 7B**).[10] Darüber hinaus stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung, um eine pathologisch gesteigerte miRNA-Expression zu antagonisieren.[10] Über komplementäre Basenbindung, können „anti-miRNA Oligonukleotide" (antagomiRs) (**Abbildung 7C**), oder „miRNA sponges" (**Abbildung 7D**), „erasers" und „masks" die Wirkung einzelner oder mehrerer miRNAs blockieren.[10] Die Suppression EZM-relevanter miRNAs oder eine Wiederherstellung der miRNA-Expression bieten interessante Ansätze zur Vermeidung von VHF-assoziiertem Remodeling (**Abbildung 8**).[10,89] Ein vertieftes Verständnis für die exakte Rolle bestimmter miRNAs, ihrer Zielgene sowie der Signalkaskaden bei VHF könnte die

Entwicklung gezielter und kausaler Interventionen ermöglichen. Die therapeutische Modulation einer miRNA könnte möglicherweise sogar als Grundlage für die Entwicklung eines kurativen Behandlungsansatzes für VHF-Patienten dienen.

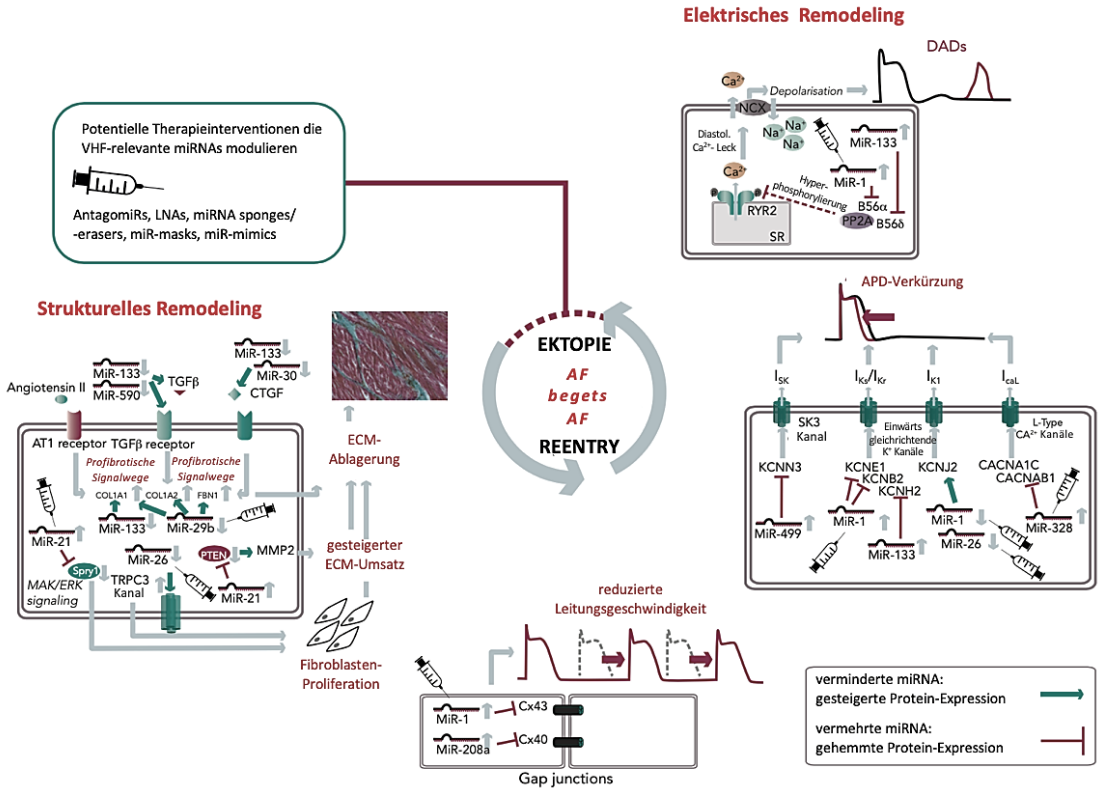


Abbildung 8. Schematische Übersicht potenzieller therapeutischer Interventionen zur Regulierung von VHF-relevanten miRNAs

APD = Dauer des Aktionspotentials; DAD = späte Nachdepolarisation; ECM = extrazelluläre Matrix; LNA = „locked nucleic acid"; SR = sarkoplasmatisches Retikulum. Die Abbildung zeigt Schlüsselaspekte des strukturellen und elektrischen Remodelings bei Ektopie und Reentry was schließlich zum Circulus vitiosus der Selbstbegünstigung bei VHF führt. Die Pfeile illustrieren die Wirkung der miRNAs, nachdem sie *in vivo* von antagomiRs, LNAs, miRNA sponges/erasers, miR-masks oder miRNA-mimics angegriffen wurden. Modifiziert nach Clauss et al., 2015.[10]

1.2.3 Die miR-144-5p

Unter den zahlreichen miRNAs hat sich unter anderem die miR-144-5p als potenzieller Einflussfaktor im Kontext von strukturellem Remodeling bei kardialen Erkrankungen herauskristallisiert.[95,96] Die miR-144 bildet gemeinsam mit der miR-451 das miR-144/451-Cluster.[95,97] Der Begriff miRNA-Cluster bezieht sich auf miRNAs die nahe beieinander auf einem Chromosom kodiert sind und aus derselben prä-mRNA transkribiert werden.[97,98] Diese miRNAs weisen üblicherweise eine ähnliche Funktion

auf, können jedoch sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte vermitteln.[97,98]

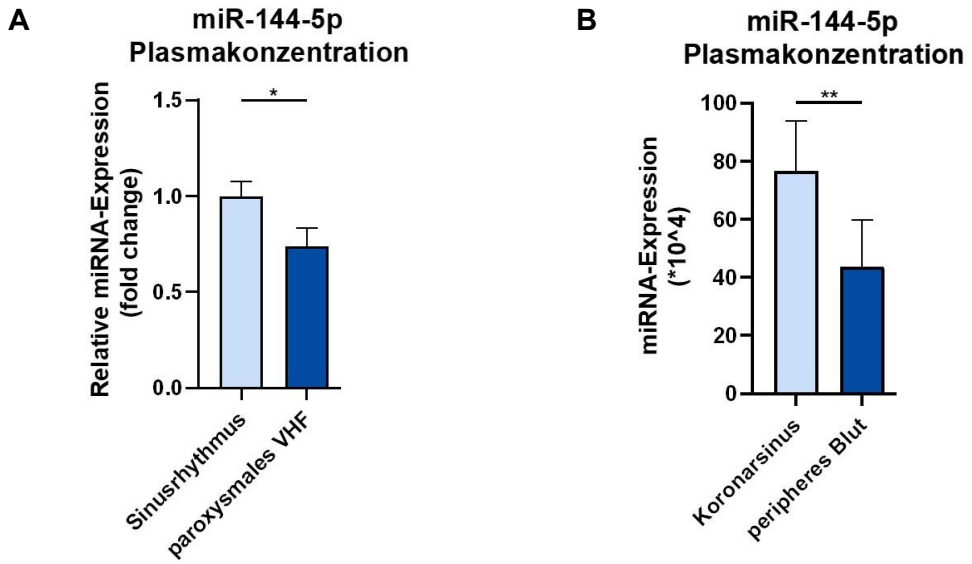
Über die 5p-Variante der miR-144 ist bislang insgesamt noch sehr wenig bekannt. Bisher wurde sie in lediglich 143 Publikationen in der Pubmed-Datenbank erwähnt (Stand: 06.07.2025). Ihre Rolle bei kardialen Remodeling-Prozessen im Rahmen verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen zeichnet sich jedoch bereits heute deutlich ab.[95,96] Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression des miR-144/451-Clusters einen protektiven Effekt bei kardialen Ischämie-Reperfusions-Schäden (IRI) ausübt[99,100], während ein Verlust des miR-144/451-Clusters gegenteilige Effekte nach sich zieht.[95,101] He et al. konnten anhand eines miR-144/451 Knockout-Mausmodells nachweisen, dass ein Verlust der miR-144 mit einer verstärkten myokardialen Fibrose nach Myokardinfarkt einherging und zudem die Erholung der Herzfunktion beeinträchtigte.[102] Untersuchungen an einem Kardiomyozyten-Modell auf Basis von H9C2-Zellen ergaben nach Simulation einer IRI und gleichzeitiger Inhibition der miR-144-5p eine verringerte Zellviabilität, eine erhöhte Apoptose-Rate sowie vermehrte Fibrose und Pyroptose, einer inflammatorischen Form des programmierten Zelltods, in den Modellzellen.[96] Zugleich fand man eine stärkere Expression der profibrotischen Proteine COLI, COLIII und Fibronektin im Vergleich zu den Kontrollzellen.[71,96,103] Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass speziell die 5p-Variante der miR-144 als Biomarker für Therapieentscheidungen bei VHF dienen könnte, da ihre Expression negativ mit dem CHA_2DS_2-VASc-Score zur Risikoabschätzung eines Schlaganfalls bei VHF und positiv mit erfolgreichen Ergebnissen nach einer Katheterablation der Pulmonalvenen korreliert.[11] Nähere Untersuchungen zu den potenziellen Mechanismen ergaben einen funktionellen Zusammenhang mit dem profibrotischen TGF-β-Signalweg.[11] Im Rahmen einer *in silico* Targetgen-Analyse finden sich schnell diverse weitere potenzielle Zielgene der miR-144-5p, die funktionell mit profibrotischem Remodeling assoziiert sind.[11] Im Kontext des Ösophaguskarzinoms[97], sowie bei einer renalen IRI[104] vermittelt das miR-144/451-Cluster seine Wirkung unter anderem über den WNT/β-Catenin-Signalweg.[71] Ferner reguliert die miR-144-5p im Rahmen der idiopathischen pulmonalen Fibrose den PI3/AKT-Signalweg.[105,106] Da diese Prozesse mit strukturellem Remodeling in Verbindung stehen, ist es denkbar, dass die involvierten Signalstoffe einen Hinweis auf die potentiellen Wirkmechanismen der miR-144-5p im Kontext von VHF liefern könnten.

1.5. Vorarbeiten

In bisher unveröffentlichten Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe ergaben sich weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der miR-144-5p und VHF, welche als Grundlage für die vorliegende Dissertation dienten.

1.5.1. Die miR-144-5p als potenzieller Biomarker bei Vorhofflimmern

Auf der Suche nach einem potenziellen miRNA-Biomarker bei VHF, wurde ein Screening-Experiment mittels Micro-Array durchgeführt. Für das Screening erfolgte eine Einteilung in zwei Patientengruppen. Die Patienten der Kontrollgruppe (n=29) waren weder an VHF noch an einer Herzinsuffizienz erkrankt und zeigten unauffällige Ergebnisse in der echokardiographischen Untersuchung. Die Patienten der Vergleichsgruppe waren an paroxysmalem VHF (n=38) erkrankt. Dabei fiel auf, dass die Konzentration der miR-144-5p im Blutplasma der Patienten mit paroxysmalem VHF im Vergleich zu den Kontrollprobanden signifikant verringert war (**Abbildung 9A**). Die genauere Differenzierung ergab eine signifikant geringere Konzentration im peripheren Blut gegenüber dem Koronarsinus (**Abbildung 9B**), was einen Ursprung der miRNA im Herzen nahelegt. Auch in der anschließenden Untersuchung des linksatrialen (LA) Herzgewebes konnte eine signifikante Herabregulation der miR-144-5p im Gewebe von Patienten mit paroxysmalem VHF beobachtet werden (**Abbildung 9C**).



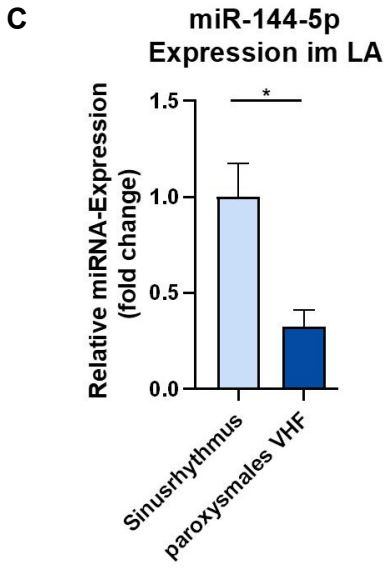


Abbildung 9. Relative Expression der miR-144-5p im Plasma und im linksatrialen Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern

Relative miRNA-Quantifizierung mittels qPCR. **A**, Relative Expression der miR-144-5p im Plasma von Patienten mit paroxysmalem VHF (n=38) im Vergleich zu Kontroll-Patienten mit Sinusrhythmus (n=29). **B**, Expression der miR-144-5p im Koronarsinus sowie im peripheren Blut von Patienten mit VHF. **C**, Relative Expression der miR-144-5p im Gewebe des linken Atriums von VHF-Patienten (n=10) im Vergleich zu Kontroll-Patienten mit Sinusrhythmus (n=24). Ungepaarter Student's t-test, *p<0,05. **p<0,01. Unveröffentlichte Daten von Clauß et al..

Die Untersuchungen ergaben zudem eine Korrelation zwischen dem miR-144-5p-Plasmaspiegel und dem Therapieerfolg nach Pulmonalvenenisolation, was mit den Daten von Kiyosawa et al. im Einklang steht.[11] Die präinterventionelle Expression der miR-144-5p war bei denjenigen Patienten signifikant niedriger, die nach 3 Monaten rezidivfrei waren. Dies legt nahe, dass die miR-144-5p als prädiktiver Biomarker für den Ablationserfolg bei Patienten mit paroxysmalem VHF dienen könnte (**Abbildung 10**).

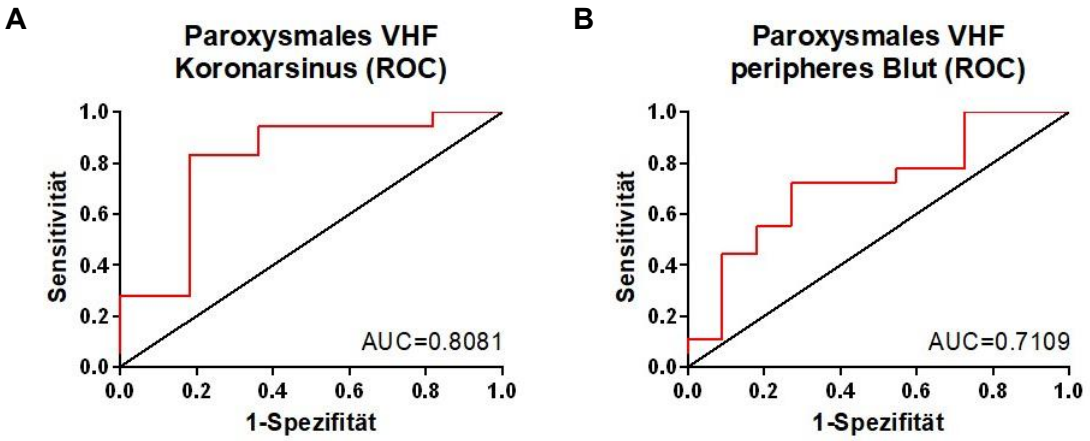


Abbildung 10. Vorhersagekraft der miR-144-5p Expression im Blut von VHF-Patienten für den Therapieerfolg nach Ablation der Pulmonalvenen

AUC = Fläche unter der Kurve (engl.: *"Area under the Curve"*). KS = Koronarsinus. PB = peripheres Blut. ROC-Kurven zur Darstellung der Vorhersagekraft der miR-144-5p-Expression im Plasma (vor Ablation) für den Therapieerfolg 3 Monate nach Ablation der Pulmonalvenen, bei Patienten mit **A**, paroxysmalem VHF, Messung im KS. **B**, paroxysmalem VHF, Messung im PB. Unveröffentlichte Daten von Clauß et al..

Es lassen sich somit folgende Erkenntnisse aus den Vorarbeiten zusammenfassen:

- Die miR-144-5p kann als zirkulierender Faktor im Blutplasma nachgewiesen werden. Die Plasmakonzentration ist im Koronarsinus höher als im peripheren Blut, was einen Ursprung im Herzen nahelegt.
- Die miR-144-5p wird in humanem Herzgewebe exprimiert.
- Bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern ist die Expression der miR-144-5p im Blutplasma und im Gewebe des linken Atriums signifikant niedriger als bei Patienten mit Sinusrhythmus.
- Bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern besteht eine Korrelation zwischen der miR-144-5p-Expression im Blutplasma und dem Therapieerfolg nach Ablation der Pulmonalvenen.

Die Daten deuten insgesamt darauf hin, dass die miR-144-5p ein hohes Potenzial als Biomarker für diagnostische und therapeutische Zwecke bei Patienten mit VHF aufweist. Dennoch bleiben die spezifischen zugrundeliegenden Mechanismen bislang ungeklärt.

1.5.2. Phänotypisierung eines miR-144-5p Knockdown-Mausmodells unter dem Einfluss eines miRNA-Inhibitors

Im Rahmen eines Pilotversuchs wurde daraufhin untersucht, ob eine gezielte Manipulation des miR-144-5p-Spiegels bei Mäusen zur Entwicklung eines arrhythmogenen Phänotyps führt. Um den Effekt einer Herabregulation der miR-144-5p *in vivo* zu simulieren, wurden osmotische Minipumpen in C57BL/6 Wildtyp-Mäuse im Alter von 3 Monaten subkutan implantiert. Zur Erzeugung eines Knockdowns wurden die Minipumpen mit einem „miR-144-5p-Inhibitor“ (miRcury LNA inhibitor for *in vivo* application, Exiqon, Dänemark) befüllt. Die Kontrollgruppe erhielt eine Kochsalzlösung (0,9% NaCl), die keinen Einfluss auf die miRNA-Expression hatte. Vor der Implantation der Minipumpen wurde eine initiale Phänotypisierung mittels Erhebung von Körpergewicht, Blutdruck, Elektrokardiographie und Echokardiographie durchgeführt. Nach einer kontinuierlichen Applikation der Substanzen über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Implantation, wurde eine erneute Phänotypisierung der Versuchstiere sowie eine *in vivo* EPU vorgenommen.

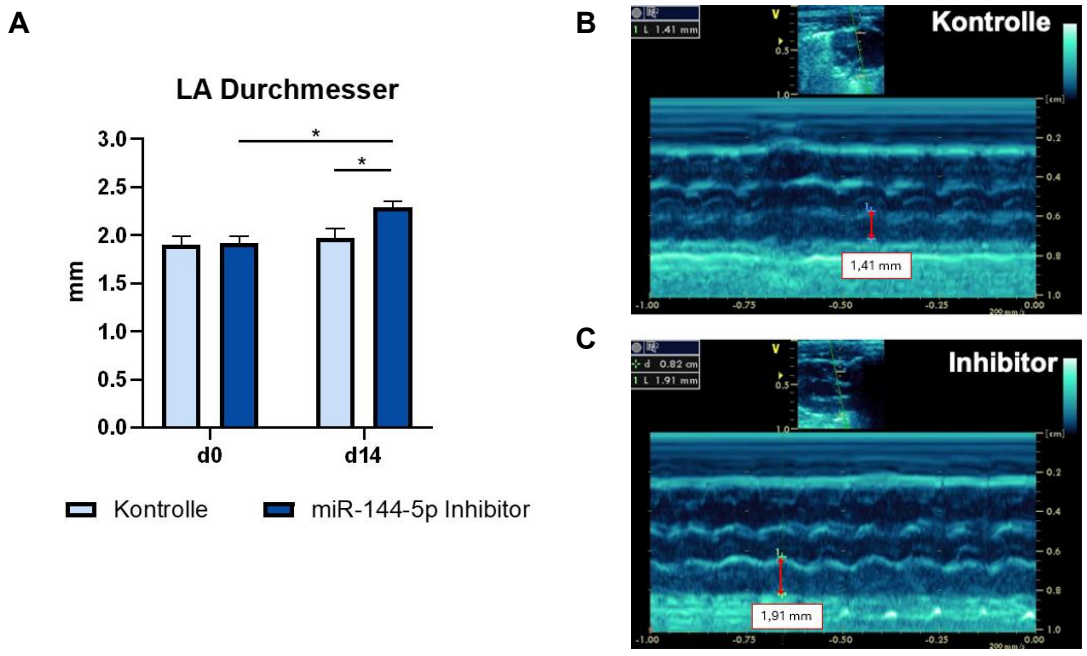


Abbildung 11. LA-Dilatation in der Echokardiographie nach 14-tägiger Verabreichung eines miR-144-5p-Inhibitors

Echokardiographische Vermessung des LA-Durchmessers im miR-144-5p Knockdown-Mausmodell. Die Messung erfolgte unter Darstellung der Aortenklappe im M-Mode, endsystolisch vor Klappenschluss. **A**, LA-Durchmesser vor (d0) und nach 14-tägiger Verabreichung eines miR-144-5p Inhibitors (d14). **B**, Repräsentative LA-Messung in der Kontrollgruppe **C**, Repräsentative LA-Messung in der Inhibitor-Gruppe. Ungepaarter Student’s t-test. *p<0,05. Unveröffentlichte Daten von Clauß et al..

Im Verlauf der Studie zeigte sich, dass sich der LA-Durchmesser bei den mit Inhibitor behandelten Tieren nach einem Zeitraum von 14 Tagen signifikant vergrößert hatte. Im Gegensatz dazu konnte in der Kontrollgruppe innerhalb desselben Zeitraums keine signifikante Veränderung festgestellt werden (**Abbildung 11**). Darüber hinaus konnte bei der Inhibitor-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Induzierbarkeit von atrialen Tachykardien und VHF durch Burst-Stimulationen in der EPU beobachtet werden (**Abbildung 12**).

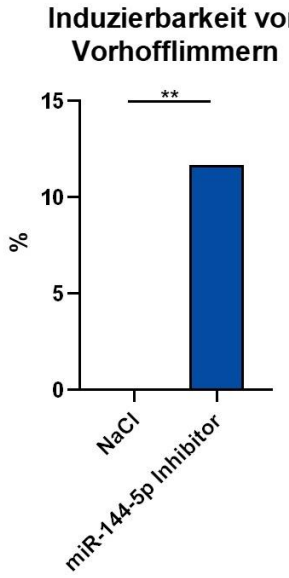


Abbildung 12. Gesteigerte Vulnerabilität für VHF in der EPU nach 14-tägiger Verabreichung eines miR-144-5p Inhibitors

Arrhythmie-Induktionsanalyse mittels 6-sekündiger Burst-Stimulationen, im Rahmen einer EPU zur *in vivo* Phänotypisierung eines miR-144-5p Knockdown-Mausmodells. Die Untersuchung fand nach 14-tägiger Verabreichung eines miR-144-5p Inhibitors oder NaCl als Kontrolle statt. Die Abbildung zeigt die Induzierbarkeit von VHF in Prozent (%). Episoden wurden als VHF gewertet, wenn die atriale Basiszykluslänge (BCL) < 60ms lag und eine irreguläre RR-Überleitung auftrat. Es wurden lediglich Episoden > 1s gewertet. Fisher's-Exact-Test. **p<0,01 vs. Kontrolle. Unveröffentlichte Daten von Clauß et al..

Im Rahmen einer *in-vitro*-Charakterisierung wurden zudem Kardiomyozyten untersucht, die den genetisch kodierten Spannungsindikator „ArcLight" (H7 hESC-CMs[12]) exprimierten. Diese Kardiomyozyten wurden aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnen. Die Methode ermöglicht den Nachweis von Arrhythmie-bedingtem elektrischem Remodeling, insbesondere hinsichtlich potenzieller Veränderungen im intrazellulären Kalziumhaushalt sowie des Transmembranpotentials.[12,107,108] Es erfolgte die Einteilung in eine Kontrollgruppe ohne Zugabe eines Transfektionsreagenz, eine Kontrollgruppe unter Zugabe von Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fischer Scientific,

Waltham, Massachusetts, USA), eine Überexpressions-Gruppe unter Hinzugabe eines miR-144-5p-Mimics (0,5 pmol miRcury LNA mimic for *in vivo* application, Exiqon, Dänemark) und eine Knockdown-Gruppe unter Hinzugabe eines miR-144-5p-Inhibitors (5 pmol miRcury LNA inhibitor for *in vivo* application, Exiqon, Dänemark). Die Messungen ergaben eine signifikante APD-Verlängerung unter dem Einfluss des Inhibitors im Vergleich zur Kontroll- bzw. Mimic-Gruppe (**Abbildung 13**).

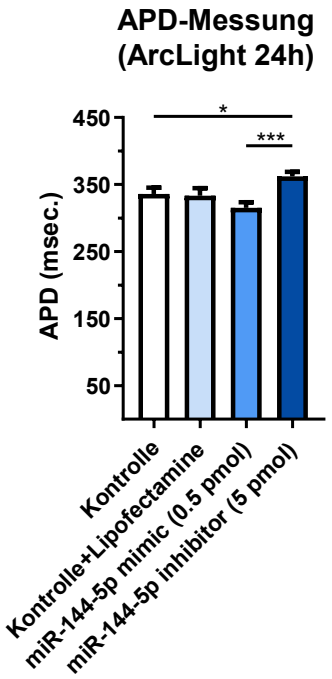


Abbildung 13. Einfluss der miR-144-5p-Expression auf die APD

APD = Dauer des Aktionspotentials. APD-Messung mithilfe der ArcLight-Methode in humanen embryonalen Stammzellen (H7 hESC-CMs) nach Transfektion eines miR-144-5p Mimics (0,5 pmol), Inhibitors (5 pmol) oder Lipofectamine™ 2000 als Kontrolle. Ordinary One-way-ANOVA, *p<0,05, ***p<0,001. Unveröffentlichte Daten von Tomsits et al..

Aus den Daten der Pilotstudie lässt sich somit zusammenfassen, dass die Herabregulation der miR-144-5p mithilfe eines miRNA-Inhibitors bei…

- … Mäusen zu einer echokardiographisch messbaren LA-Dilatation *in vivo* führt.
- … Mäusen zu einer gesteigerten Induzierbarkeit von atrialen Arrhythmien durch Burst-Stimulationen im Rahmen einer EPU *in vivo* führt.
- … humanen Kardiomyozyten zu einer APD-Verlängerung *in vitro* führt.

Insgesamt ergab sich die Hypothese, dass die miR-144-5p elektrische sowie strukturelle Remodeling-Prozesse im Herzen reguliert, welche der Entstehung von VHF zugrunde liegen.

1.3 Transgene Mausmodelle

Zur Überprüfung dieser Hypothese erachteten wir es für sinnvoll, im folgenden Schritt ein transgenes Tiermodell zu phänotypisieren, in welchem das miR-144-5p-Gen durch gezielte genetische Modifikation inaktiviert wurde.

1.3.1 Transgene Mausmodelle zur Untersuchung der kardialen Elektrophysiologie

Da VHF eine multifaktoriell bedingte und äußerst komplexe Erkrankung darstellt, besteht gegenwärtig keine adäquate Alternative zur Verwendung von Tiermodellen, um die zugrundeliegende Pathophysiologie umfassend zu untersuchen.[109] Zahlreiche Zelltypen wie Kardiomyozyten, Fibroblasten und Myofibroblasten spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese.[44] Die verschiedenen Zellen zeigen vielschichtige Interaktionen untereinander und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Funktion.[44,110] Daran verdeutlicht sich die Schwierigkeit, ein derart verflochtenes Netzwerk in einer isolierten Zellkultur adäquat zu modellieren. Die exakten Reaktionsabläufe sind abhängig von einem intakten Gesamtorganismus, weshalb die Etablierung von Tiermodellen von wesentlicher Bedeutung für die Forschung ist.[22,56,109,111] Obwohl grundlegende physiologische Unterschiede zwischen Menschen und Tieren bestehen, konnten bereits verschiedene etablierte Modellorganismen wie Zebrafisch, Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund, Schaf, Pferd und Schwein maßgeblich zum Verständnis von VHF beitragen.[109] Bei der Auswahl des geeigneten Modellorganismus sind Faktoren wie Kosten, Zucht- und Unterbringungsmöglichkeiten, die Verfügbarkeit transgener Modelle sowie die Anwendbarkeit humanmedizinischer diagnostischer und operativer Methoden zu berücksichtigen.[112] Großtiermodelle ermöglichen eine detaillierte Untersuchung der Herzfunktion und weisen größere anatomisch-physiologische Ähnlichkeiten zum Menschen auf.[113] Jedoch wird insbesondere die Maus, aufgrund ihrer kostengünstigen und einfachen Zucht, sowie der Vielzahl an Möglichkeiten zur genetischen Manipulation, als idealer Modellorganismus für initiale Studien zur kardialen Elektrophysiologie angesehen.[109]

Das Mausherz weist sowohl anatomische als auch physiologische Ähnlichkeiten zum menschlichen Herzen auf.[114] Es besitzt alle relevanten Arten an spezialisierten Herzzellen, wie zum Beispiel Schrittmacherzellen und ein kardiales Reizleitungssystem.[114] Transgene Mausmodelle sind weit verbreitet, kommerziell erhältlich und es stehen verschiedene Technologien zur Verfügung, um spezifische Gen-Knockouts, -Knockdowns oder -Überexpressionen zu vergleichsweise geringen Kosten zu generieren.[109,115] Es besteht zudem eine ausgeprägte Homologie zwischen dem

murinen und dem humanen Genom.[116] Monogenetische Mutationen führen in der Regel zu einem vergleichbaren Phänotyp in beiden Spezies.[117] Interessanterweise konnten bereits verschiedene genetische Modifikationen vorgenommen werden, die bei Mäusen strukturelles und elektrisches Remodeling in den Vorhöfen hervorriefen und die Suszeptibilität für atriale Arrhythmien steigerten.[118,119]

Ein wesentlicher Vorteil des Mausmodells besteht zudem in der Möglichkeit, eine umfassende elektrophysiologische Charakterisierung durchzuführen, die auch die Induktion von Arrhythmien einschließt.[109] Die meisten Tierarten weisen kein „natürliches VHF“ auf, weshalb experimentelle Verfahren zur Induktion und Beobachtung von Arrhythmien erforderlich sind.[109] Aufgrund von Walter Garrey‘s „Theorie der kritischen Masse“ (engl.: *„critical mass hypothesis“*)[120] wurde lange Zeit angenommen, dass kleine Tiere wie Mäuse aufgrund ihrer geringen kardialen Gewebeoberfläche nicht in der Lage seien einen fibrillierenden Rhythmus aufrechtzuerhalten.[121,122] Etwa 60 Jahre später wurde jedoch vermehrt über das Auftreten von VHF in Mäusen berichtet.[123,124] Wakimoto et al. entwickelten ein *in vivo* Protokoll zur transvenösen elektrischen Stimulation, welches zeigte, dass auch gesunde, genetisch nicht-modifizierte Mäuse VHF entwickeln können.[125] Durch das Einführen eines acht-poligen EP-Katheters über die rechte Jugularvene in die Kammern des rechten Herzens konnten gezielt VHF-Episoden induziert werden.[125] Dies wurde durch elektrische Stimulation über den Katheter in Kombination mit einer medikamentösen Aktivierung des Parasympathikus erreicht.[125] In Versuchsgruppen ohne parasympathische Stimulation, war die Induktion von VHF eine Ausnahme.[125] Insofern bietet die Methode der transvenösen elektrischen Stimulation die idealen Voraussetzungen zur Untersuchung eines potenziellen Vulnerabilitätsfaktors.[118] Im Kontext von VHF könnte es sich hierbei um ein Substrat oder einen Risikofaktor, wie beispielsweise ein Gen-Knockout, handeln.[118]

Nichtsdestotrotz dürfen die Unterschiede zum menschlichen Organismus nicht außer Acht gelassen werden. Obwohl Mäuse einen kardialen Phänotyp entwickeln können, der VHF bei Menschen stark ähnelt, bestehen Unterschiede in den elektrophysiologischen Eigenschaften.[109] Die geringe Herzgröße der Mäuse erschwert die langfristige Aufrechterhaltung von VHF-Episoden.[118] Diese halten bei Mäusen in der Regel nur für wenige Sekunden bis Minuten an, was eher dem klinischen Bild von paroxysmalem VHF entspricht.[118] Zudem sind Abweichungen im Kalziumhandling bekannt.[126] Eine höhere Ruheherzfrequenz sowie unterschiedliche Expressionsmuster bestimmter Ionenkanäle resultieren in einer abweichenden Aktionspotentialdauer und -morphologie.[126] Die Erkenntnisse aus Studien am Mausmodell sollten daher mit Vorsicht interpretiert und nicht unreflektiert auf die klinische Situation übertragen werden.

1.3.2 Das Cre-loxP-System zur Erschaffung eines Gen-Knockouts

MiRNAs regulieren eine Vielzahl von Signalkaskaden in mehreren Organen und über alle Entwicklungsstufen hinweg.[97,105,127-129] Um die spezifischen Effekte einer Herabregulation zu erforschen, ist folglich ein möglichst spezifischer Gen-Knockout erforderlich.[130] Einen möglichen Ansatz bieten miRNA-Inhibitoren (vgl. Kapitel 1.2.2. und 1.5.2), jedoch ist ihre Anwendung durch potenzielle Off-Target-Effekte limitiert.[131] Das Cre-*loxP* System stellt derweil eine etablierte Methode dar, um solche unerwünschten Wirkungen zu minimieren.[132] Spezifische Driver (Promoter/Enhancer) ermöglichen eine gezielte Implementierung von spezifischen Genknockouts an einer bestimmten Stelle im Genom (**Abbildung 14**).[132] Das Cre-*loxP* System wurde bereits erfolgreich eingesetzt um die Wirkmechanismen von miRNAs[133] sowie die Signalwege im Zusammenhang mit kardialer Fibrose[134] zu untersuchen. Die Methode ist demnach ideal geeignet, um die Auswirkungen eines Knockouts der miR-144-5p auf atriales Remodeling und VHF zu untersuchen[109,135], zumal ein transgenes Mausmodell mit Knockout des miR-144/451-Lokus bereits etabliert ist.[136,137] Obwohl sich die Rolle der miR-144-5p in Bezug auf VHF seit einigen Jahren immer deutlicher abzeichnet[11,138], ist die vorliegende Dissertation die bislang erste Studie zur kardialen Elektrophysiologie am miR-144/451 Knockout-Mausmodell (im Folgenden miR-144-5p Knockout-Mausmodell genannt) (Stand: 06.07.2025).

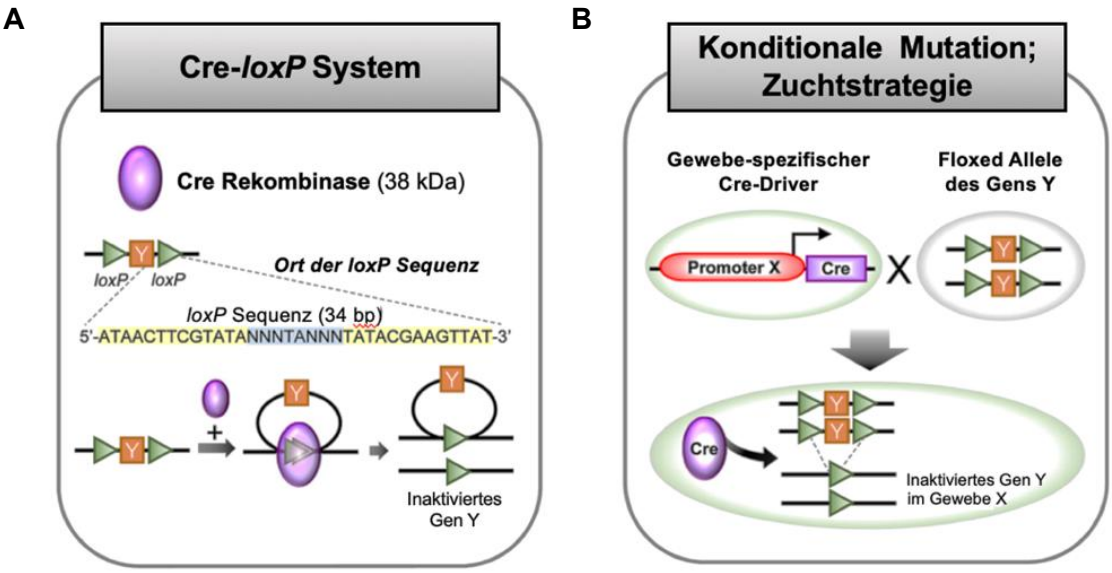


Abbildung 14. Das Cre-loxP System

A, Überblick über das Cre-*loxP* System. Durch genetische Modifikation wurden zunächst *loxP*-Sequenzen ins Mausgenom eingebracht, welche das zu entfernende DNA-Fragment flankieren. Die 38 kDa Cre-Rekombinase erkennt die spezifische 34 bp *loxP*-DNA-Sequenz und inaktiviert daraufhin das durch *loxP*-Sequenzen flankierte Gen Y. B, Generelle Zuchtstrategie für konditionale Mutationen in *loxP* und Cre-exprimierenden Mauslinien. Prinzipiell muss eine Maus ein gewebespezifisches Cre-Gen exprimieren und das Gen von Interesse Y bei einer anderen Maus von *loxP*-Sequenzen flankiert sein. Bei den Nachkommen führt die Gewebe-spezifische Expression der Cre-Rekombinase durch den Promoter X zur Exzision des floxed DNA-Lokus und inaktiviert auf diese Weise das Gen Y im Zielgewebe X. Modifiziert nach Kim et al., 2018.[132]

1.4 Zielsetzung und Hypothese

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Charakterisierung eines miR-144-5p Knockout-Mausmodells. Der Fokus der Untersuchungen wurde insbesondere auf strukturelles Remodeling im Herzgewebe sowie auf Veränderungen der kardialen Elektrophysiologie im Kontext von VHF gelegt. Die Hypothese der Dissertation lautet, dass eine Herabregulation der miR-144-5p in einem transgenen Mausmodell zu strukturellem Remodeling im Herzgewebe führt und die Anfälligkeit für atriale tachykarde Rhythmusstörungen erhöht.

Die Erkenntnisse könnten langfristig dazu beitragen die Risikostratifizierung, Früherkennung und Diagnostik bei VHF zu verbessern. Zudem könnten bestehende Therapieansätze optimiert und neue Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden, um die Effektivität der Therapie zu verbessern. Dies könnte eine Reduktion von Morbidität und Mortalität ermöglichen, was nicht nur eine Entlastung für das Gesundheitssystem, sondern auch eine Steigerung der Lebensqualität von Patienten mit VHF bedeuten würde.

Zur Untersuchung der Hypothese diente ein transgenes Mausmodell (miR-144-5p Knockout-Modell), welches mithilfe verschiedener *in vivo*- und *in vitro*-Methoden charakterisiert wurde. Ziel war zum einen die Untersuchung des Phänotyps und zum anderen die Identifizierung relevanter Zielgene der miR-144-5p.

Im Fokus der Arbeit standen die folgenden Punkte:

- Untersuchung der Versuchstiere auf atriale tachykarde Rhythmusstörungen
- Untersuchung der Versuchstiere auf VHF-assoziiertes strukturelles Remodeling im Herzen, im Sinne einer LA-Dilatation und atrialen Fibrose
- Validierung potenzieller Zielgene der miR-144-5p
- Expressionsanalyse der Zielgene auf Transkriptionsebene

2. Material und Methoden

2.1 In vivo

2.1.1 Versuchstiere

Die Tierversuche erfolgten entsprechend der Vorschriften der Tierschutzverordnung und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Az. ROB-55.2-2532.Vet_02-16-106 und Az. ROB-55.2-2532.Vet_02-15-32). Alle Versuche hielten sich an die ARRIVE guidelines zur Meldung von *in vivo* Tierversuchen[139] und an den „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“[140].

Für die Versuche wurden C57BL6 Wildtyp-Mäuse von Charles River, sowie ein transgenes Mausmodell im C57BL6 Hintergrund, aus dem EMMA Mouse Repository des Helmholtz Zentrums in München bezogen. Besagte Mäuse besitzen ein sogenanntes „floxed“ Allel bei dem das miR-144-5p Gen von sog. loxP Sequenzen flankiert ist. Diese Mäuse (miR-144$^{flox/+}$) wurden mit einer weiteren transgenen Maus verpaart, welche die sog. Cre-Rekombinase exprimiert. Die Nachkommen dieser Verpaarung sind heterozygote Knockout-Mäuse, welche mit den heterozygoten miR-144$^{flox/+}$- und schließlich mit den Wildtyp-Mäusen rückgekreuzt wurden um die finalen Genotypen (homozygot Wildtyp, heterozygot Knockout, homozygot Knockout) zu erhalten. Aufgrund der räumlich nahen Kodierung auf dem Chromosom (miR-144/451-Cluster), weisen die transgenen Tiere außerdem ein Knockout der miR-451 auf.

Der Genotyp wurde mittels PCR bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.2.1). Für die Versuche wurden alle drei Genotypen (homozygot Wildtyp (WT), heterozygot Knockout (KO/+), homozygot Knockout (KO)) verwendet.

2.1.2 Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere waren im Tierstall der Medizinischen Klinik I in Großhadern untergebracht. Sie wurden in Gruppen zu maximal 5 Tieren in Standardkäfigen Typ II long gehalten. Die tägliche Kontrolle der Tiere und die Reinigung, sowie das Auswechseln der Käfige wurde zweimal täglich durch ausgebildete Tierpfleger/-innen sichergestellt. Die Tiere erhielten Wasser und Standardfutter ad libitum. Der Tagesrhythmus wurde per Lichtprogramm vorgegeben und betrug 12 Tag- und 12 Nachtstunden. Auf Lärmvermeidung wurde geachtet. Die Temperatur in der Tierhaltung lag konstant zwischen 20-24 °C. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde durch eine

Klimaanlage und ein Luftbefeuchtungs-Gerät im Bereich um 45% (bis maximal 65%) gehalten.

2.1.3 Studiendesign

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung eines transgenen Mausmodells mit spezifischem Knockout des miR-144/451-Clusters. Die Studie wurde im Kontext der Erkrankung VHF durchgeführt. Der Fokus lag dabei auf der Untersuchung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen der miR-144-5p und strukturellen Remodeling-Prozessen im Herzen, die möglicherweise die Vulnerabilität gegenüber atrialen Arrhythmien erhöhen könnten.

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter von circa 3 Monaten (ca. 20-30 g Körpergewicht) verwendet und entsprechend ihrem Genotyp in drei Gruppen unterteilt. Die Gruppe (WT) entsprach den Wildtyp-Mäusen (Genotyp: miR-144$^{+/+}$) und diente zur Kontrolle. Die Gruppe (KO/+) bestand aus heterozygoten Knockout-Tieren (Genotyp: miR-144$^{+/-}$) und die Gruppe (KO) aus homozygoten Knockout-Tieren (Genotyp: miR-144$^{-/-}$). Per Zufall wurden zwei Kohorten generiert. Kohorte A diente der histologischen Untersuchung des Herzgewebes zur Fibrose-Quantifizierung. Versuchstiere der Kohorte B wurden durch Erhebung körperlicher Basisparameter, Elektrokardiographie, Echokardiographie und invasiver elektrophysiologischer Untersuchung *in vivo* phänotypisiert. Im Anschluss erfolgte die Herzentnahme für molekularbiologische *in vitro* Untersuchungen.

2.1.4 Materialien und Geräte für *in vivo* Untersuchungen

2.1.4.1 Geräte

Aria Ventilated Cabinet	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
UniVet-Porta T-8 Narkosegerät	Groppler Medizintechnik, Deggendorf, Deutschland
Narkoseinduktions-Kammer	Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland
Schwenkbare Wärmeplatte für Sonographie	Visualsonics Inc., Toronto, ON, Canada

Isofluran Vaporizer System	Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland
Veterinary Fluosorber	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
MiniVac Gas Evacuation Unit	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Modifiziertes Bain-System	Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland
Vevo® 2100 Imaging System Ultraschallgerät	Visualsonics Inc., Toronto, ON, Canada
Surgical Platform SURGI-M	Kent Scientific, Torrington, CT, USA
PhysioSuite®	Kent Scientific, Torrington, CT, USA
EKG Nadelelektroden (29G)	AD Instruments, Oxford, UK
Animal Bio Amplifier	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Iso-Stim 01D – Isolated Stimulator	npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland
PowerLab 8/30 Station	AD Instruments, Oxford, UK
Voltcraft DSO-1062D Digital Oszilloskop	Voltcraft®, Hirschau, Deutschland
Voltcraft FSP 1132 Labornetzgerät	Voltcraft®, Hirschau, Deutschland
Acht-poliger 1F EP-Katheter, EPR 800	Millar Inc., Houston, TX, USA
Scout™ STX Waage	Ohaus, Parsippany, NJ, USA
VWR VisiCam 5 Plus Dissection Microscope	Vwr, Radnor, PA, USA
Feine Pinzette	Fine Science Tools, Foster City, CA, USA
Iris-Schere	Fine Science Tools, Foster City, CA, USA
Spring scissor	Fine Science Tools, Foster City, CA, USA
Anatomische Pinzette	Fine Science Tools, Foster City, CA, USA
Sterican® Kanüle 30G	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland

2.1.4.2 Reagenzien und Chemikalien

Reagenz	**Hersteller**
Isoflurane 1 ml/ml	CP-pharma, Burgdorf, Deutschland
Sauerstoff	Linde GmbH, Pullach, Deutschland
Fentanyl 12,5 ng/mL	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Asid®-med Enthaarungscreme	Asid Bonz, Herrenberg, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 4%, gepuffert, pH 6,9	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x)	Gibco, Darmstadt, Deutschland

2.1.4.3 Software

LabChart Pro v8	AD Instruments, Oxford, UK
RadiAnt Dicom Viewer	Medixant, Poznań, Polen
GraphPad Prism v8	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA

2.1.5 *In vivo* Methoden

2.1.5.1 Narkoseeinleitung

Die Versuche erfolgten in Allgemeinanästhesie mit Isofluran. Vor Beginn der Narkose wurden die Tiere gewogen, um eine gewichtsadaptierte Medikamentengabe zu gewährleisten. Die Narkoseinduktion wurde in einer speziellen Kammer mit 2-3% Isofluran/98-97% Sauerstoff p.i. durchgeführt. Die Narkoseaufrechterhaltung während der Versuche erfolgte unter Maskennarkose mit einen Vaporizer (1,75-3% Isofluran p.i., Flow 1L/min.). Um für die Dauer der Maßnahmen eine konstante Körpertemperatur von 37-38°C zu gewährleisten, wurden die Versuchstiere auf einer Wärmeplattform in Rückenlage fixiert. Die Überwachung der Temperatur erfolgte kontinuierlich mittels rektaler Temperatursonde.

2.1.5.2 Echokardiographie

Zur Prüfung von anatomischen und funktionellen Unterschieden am Herzen, wurde eine echokardiographische Untersuchung der Versuchstiere durchgeführt. Die Narkoseinduktion erfolgte wie zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.5.1). Nach Narkoseinduktion wurden die Tiere auf einem speziellen schwenkbaren Tisch in

Rückenlage gebracht und dort unter Maskennarkose (1,75-3% Isofluran p.i., Flow 1L/min) untersucht. Dieser war mit einer Wärmeplattform, Temperatursonde sowie EKG-Elektroden zur kontinuierlichen Überwachung der Vitalparameter (Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz) ausgestattet. Vor der Untersuchung wurde ein ca. 1,5 x 1,5 cm großes Areal im Bereich der linken Thoraxhälfte mittels Enthaarungscreme (Asid®-med) schmerzfrei enthaart. Um bei geringer Eindringtiefe eine hohe Auflösung zu erreichen, wurde für die Untersuchung ein 15 MHz-Schallkopf verwendet.

Die myokardialen Wanddicken (interventrikuläres Septum (IVS), posteriore Wand (PW)) und der Durchmesser des Kammerlumens (linksventrikulärer interner Durchmesser (LVID)) wurden im M-Mode sowohl während der Systole (syst.) als auch während der Diastole (diast.) erhoben. Die Messungen erfolgten in der kurzen (PSAX) sowie in der langen Achse (PLAX). Hierzu wurden Quer- und Längsschnitt des Herzens in ihrer größten Ausdehnung im B-Bild aufgesucht. Zur Übersicht wurde für jeden Schnitt ein Videoloop im B-Mode aufgenommen. Das linke Atrium (LA) wurde unter Darstellung der Aortenklappe im M-Mode endsystolisch vor Klappenschluss vermessen (**Abbildung 15)**. Jede Messung wurde in dreifacher Ausführung zu verschiedenen Messzeitpunkten im M-Mode durchgeführt.

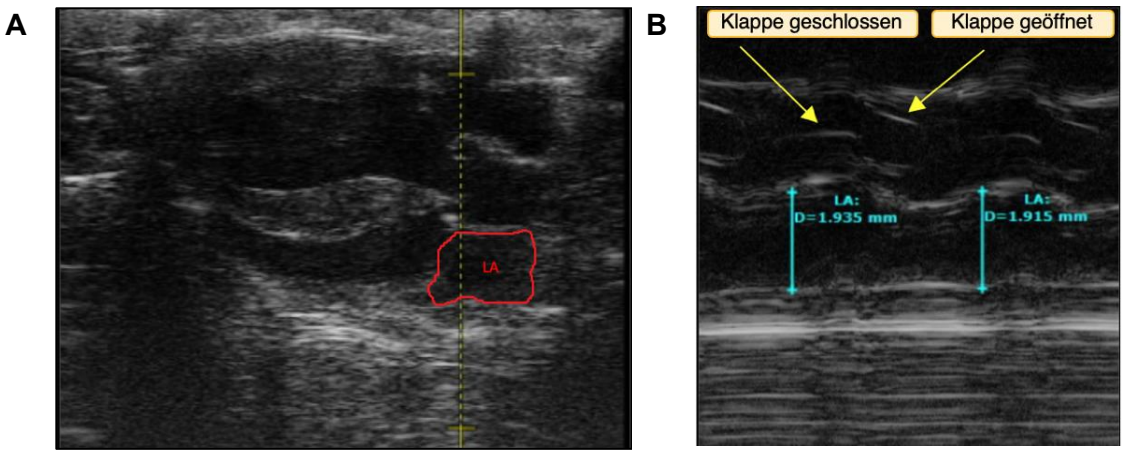


Abbildung 15. Repräsentative Aufnahmen des linksatrialen Durchmessers in der Echokardiographie

A, B-Bild des Herzens in der Längsachse mit Abbildung des linken Atriums (LA) unterhalb der Aortenklappe, LA rot umrahmt, gelb-gestrichelte Linie durch die Ebene der Aortenklappe. **B**, M-Mode auf Ebene der gelb-gestrichelten Linie in A, Zweifache Messung des linksatrialen Durchmessers, endsystolisch, nach Klappenschluss.

Nach der Untersuchung (Dauer ca. 20 Minuten) wurden die Tiere in einem Einzelkäfig unter eine Wärmelampe gesetzt. Die Rückführung in den eigenen Käfig erfolgte erst bei vollständiger Wachheit.

Anhand der sonographisch erhobenen Daten konnten weitere Parameter der Herzfunktion mithilfe der folgenden Formeln berechnet werden:

Enddiastolisches linksventrikuläres Volumen: **EDV** [µl] = $\left(\frac{7}{2{,}4+\mathrm{LVIDdiast}}\right) * (\mathrm{LVIDdiast}^3)$

Endsystolisches linksventrikuläres Volumen: **ESV** [µl] = $\left(\frac{7}{2{,}4+LVIDsyst}\right) * (LVIDsyst^3)$

Ejektionsfraktion nach Teichholz: **EF** [%] = $\left(\frac{EDV-ESV}{EDV} * 100\right)$

Fraktionelle Verkürzung *(fractional shortening):* **FS** [%] = $100 * \left(\frac{LVIDdiast-LVIDsyst}{LVIDdiast}\right)$

Schlagvolumen: **SV** [µl] = $EDV - ESV$

Herzzeitvolumen (*cardiac output*): **CO** [µl/min] = $\frac{SV * heart\ rate}{1000}$

2.1.5.3 Elektrokardiographie

Die Narkoseinduktion und -aufrechterhaltung, sowie die Lagerung und Überwachung der Tiere erfolgten wie zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.5.1). Vor Versuchsbeginn erhielten die Versuchstiere zusätzlich eine Analgosedierung intraperitoneal mit 0,05 mg/kg Körpergewicht Fentanyl. Um die vollständige Schmerzfreiheit zu überprüfen, wurde mithilfe einer Pinzette ein Schmerzreiz am Zeh gesetzt. Erst als der Schmerzreflex eindeutig negativ ausfiel wurden die Versuche begonnen. Drei Nadelelektroden (29G, AD Instruments) wurden subkutan in den linken und rechten Vorderlauf, sowie in den linken Hinterlauf der Versuchstiere eingebracht. Über diese wurde kontinuierlich ein EKG entsprechend der Ableitung I dokumentiert. Die Daten wurden mithilfe eines Amplifiers (AD Instruments), Powerlab (AD Instruments) und LabChart Pro (AD Instruments) erhoben. Die Aufzeichnung des EKGs fand vor Beginn der elektrophysiologischen Untersuchung statt und dauerte ca. 5 Minuten. Für die Auswertung mithilfe der EKG-Analyse Software von LabChart Pro (AD Instruments) wurden Abschnitte von 30 Sekunden ausgewählt, welche keine Störartefakte aufwiesen (**Abbildung 16**).

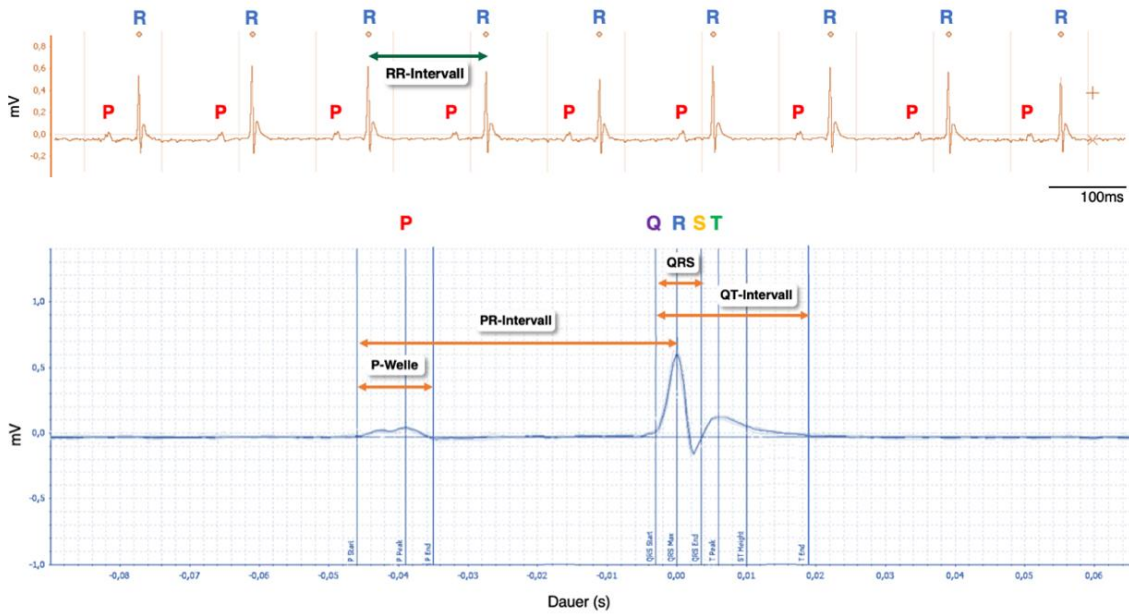


Abbildung 16. Repräsentative Darstellung der EKG-Auswertung mithilfe der LabChart Pro-Software

Analyse eines 30 Sekunden langen EKG-Abschnitts mit der LabChart Pro-Software (Ad Instruments). Oben ist ein repräsentativer Ausschnitt aus einer EKG-Aufnahme zu sehen. Die Punkte markieren die R-Zacken (R). Die Messwerte wurden mithilfe der LabChart Pro-Software gemittelt. Die graphische Darstellung der gemittelten elektrischen Erregung ist unten im EKG-Streifen abgebildet.

2.1.5.4 Elektrophysiologische Untersuchung

Die elektrophysiologische Untersuchung der Versuchstiere diente der Betrachtung des kardialen Reizleitungssystems, sowie der Prüfung der Vulnerabilität für atriale tachykarde Herzrhythmusstörungen. Die Narkoseinduktion, Analgosedierung, Lagerung und Überwachung der Versuchstiere erfolgten wie zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.5.1 und 2.1.5.3.) Die rechte Halsregion wurde mittels Enthaarungscreme (Asid®-med) schmerzfrei enthaart und anschließend mit 70% Ethanol gereinigt. Nach entsprechender Einwirkzeit erfolgten ein ca. 1 cm langer Hautschnitt seitlich am Hals auf Höhe des M. sternocleidomastoideus und die nachfolgende Präparation der V. jugularis interna. Ein acht-poliger 1F EP-Katheter (Millar Inc., Houston, Tx, USA) wurde in die Vene eingeführt und unter EKG-Kontrolle zum Herzen vorgeschoben. Die korrekte Lage der Katheterspitze im rechten Ventrikel war daran erkennbar, dass das distale Elektrodenpaar ein ventrikuläres Signal und das proximale Elektrodenpaar ein atriales Signal lieferte (**Abbildung 17B**). Die Daten wurden mit derselben Hardware wie für die EKG-Aufzeichnung erhoben. Zur Erzeugung der elektrischen Impulse wurde ein

Stimulator (ISO-STIM-01D NPI electronic) verwendet. Durch Verletzung der V. jugularis kam es im Verlauf der Untersuchung zu starkem Blutverlust einzelner Versuchstiere, woraufhin sie von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden.

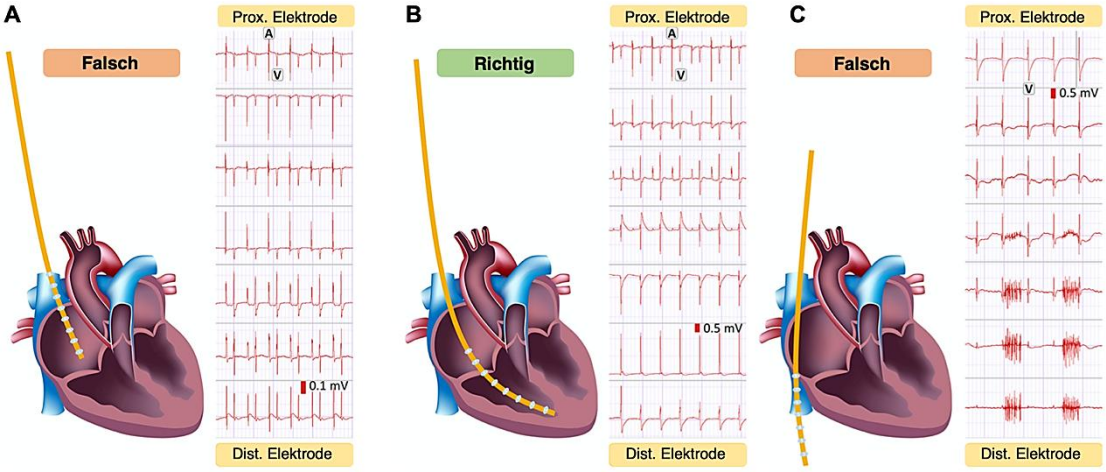


Abbildung 17. Schematische Darstellung der Morphologie des endokardialen Elektrogramms abhängig von der Katheterposition

Die Aufzeichnungen der elektrischen Aktivität sind von proximal (oben) nach distal (unten) dargestellt. **A**, Katheterposition im Atrium mit prominenter atrialen Aktivität (A) in allen Ableitungen. Für die korrekte Positionierung des Katheters muss dieser weiter in den rechten Ventrikel vorgeschoben werden. **B**, Korrekte Katheterposition mit allein ventrikulären Signalen in den distalen Ableitungen (V) und deutlicher atrialer Aktivität in den proximalen Ableitungen. **C**, Katheterposition in der Vena cava inferior mit Artefakten durch Zwerchfellkontraktionen in den distalen Ableitungen. Modifiziert nach Favere et al., 2022.[141]

Für die Untersuchung wurden eine Reihe von atrialen und ventrikulären Stimulationsmanövern durchgeführt, anhand derer folgende Parameter gemessen werden konnten:

Stimulationsreizschwelle: Die Stimulationsreizschwelle entspricht der Stromstärke, welche gerade noch eine Erregung auslöst. Zur Auffindung dieser erfolgte die Stimulation der Versuchstiere mit einer Frequenz, die schneller war als ihre intrinsische Herzfrequenz. Durch schrittweise Reduktion der Stromstärke, wurde der Punkt aufgesucht, an dem ein Stimulus zum ersten Mal keine erkennbare Erregung mehr auslöste. Um eine sichere und konstante Erregung der Herzmuskelzellen durch die Stimuli gewährleisten zu können, wurden die darauffolgenden Untersuchungen mit der doppelten Stromstärke des letzten übergeleiteten Stimulus durchgeführt. Die Durchführung erfolgte sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel. Wenn die intrinsische

Herzfrequenz des Versuchstiers schneller als die untersuchte Basiszykluslänge der Stimulationen war, konnten keine Messungen erhoben werden.

Sinusknotenerholungszeit (Sinus node recovery time, SNRT): Stimulation im Vorhof mit einer Basiszykluslänge (*basic cycle length, BCL)* von 120 ms, 100 ms und 80 ms für die Dauer von jeweils 30 Sekunden. Unter der Sinusknotenerholungszeit versteht man das Intervall zwischen dem letzten Stimulus und dem ersten intrinsischen Signal im Vorhof. Die Herzfrequenz-korrigierte SNRT (korrigierte SNRT) wird berechnet, indem die Sinusknoten-Basiszykluslänge von der jeweils gemessenen SNRT subtrahiert wird.

Refraktärzeiten: Bei verschiedenen Basiszykluslängen (BCL 120 ms, BCL 100 ms) wurde mit 8 Basisschlägen (S1) und einem vorzeitigen Extrastimulus (S2) stimuliert. Dieser wurde zeitlich zunehmend kürzer an S1 angekoppelt (in 1 ms Dekrementen), bis er keine erkennbare Erregung mehr auslöste. Die effektive Refraktärperiode entspricht der Zykluslänge des vorzeitig angekoppelten S2-Stimulus, welcher gerade noch in einer übergeleiteten Erregung resultiert, bevor der Stimulus in die Refraktärzeit fällt. Die Durchführung erfolgte sowohl im Vorhof, zur Messung der AERP und der Refraktärzeit des AV-Knotens (*AV node refractory period,* AVNRP), als auch im Ventrikel, zur Messung der ventrikulären effektiven Refraktärzeit (*ventricular effective refractory period,* VERP).

Bestimmung des Wenckebachpunktes: Die Stimulationsabstände im Vorhof wurden schrittweise (in 1 ms Dekrementen) reduziert. Aufgrund der Refraktärzeit des His-Bündels, verlängert sich das Intervall zwischen einem Stimulus und der übergeleiteten ventrikulären Erregung zunehmend, bis schließlich eine Überleitung ausfällt. Der Wenckebachpunkt entspricht der Zykluslänge, bei der aufgrund einer fehlenden 1:1 AV-Überleitung, zum ersten Mal eine ventrikuläre Erregung ausfällt.

Bestimmung der Wenckebach 2:1 Zykluslänge: Durch eine weitere Steigerung der Stimulationsfrequenz im Vorhof, wurde die Zykluslänge bestimmt, bei der zum ersten Mal eine stabile 2:1 Überleitung eintrat.

Bestimmung der retrograden Leitung (va conduction, VA Überleitung): Die Stimulationsfrequenz im Ventrikel wurde schrittweise (in 1 ms Inkrementen) gesteigert. Eine stabile retrograde Überleitung lag vor, sobald sich ein konstantes Intervall zwischen ventrikulärem Stimulus und atrialem Signal eingestellt hat.

Induktion von Arrhythmien im Vorhof mittels Burst-Stimulation: Burst-Stimulationen (Zykluslängen 50 - 10 ms, in 5 ms Dekrementen und einer Dauer von 6 Sekunden) wurden zur Provokation von Arrhythmien im Vorhof durchgeführt. Atriale Arrhythmien wurden definiert als hochfrequente, polymorphe atriale Erregungen. Bei regulärer

Überleitung und atrialer Periodizität handelt es sich um Vorhofflattern (Aflut). Bei irregulärer Überleitung und fehlendem Muster bzw. Periodizität handelte es sich um VHF (Afib). Eine Arrhythmie wurde ab einer Dauer ≥ 2000 Millisekunden gewertet. Wenn ≥ 1 Burst-Stimulation eine Arrhythmie in einem Versuchstier hervorrief, galt VHF in diesem Tier als induzierbar. Anderenfalls galt das Tier als nicht-induzierbar.

2.1.5.5 Herzentnahme

Die Entnahme der Herzen erfolgte mittels Thorakotomie unter Narkose und Fixierung in Rückenlage auf einer OP-Wärmeplatte. Aufgrund der Schmerzbelastung für das Versuchstier, wurde zur Analgesie Fentanyl (0,05 mg/kg i.p.) bereits nach Einleitung der Narkose verabreicht. Anschließend wurde mit einer chirurgischen Pinzette überprüft, ob noch Schmerzreize auslösbar waren. Erst nach Eintreten einer vollständigen Analgosedierung begann der Eingriff. Zunächst wurde die Haut des Abdomens durchtrennt, stumpf vom Unterhautfettgewebe gelöst und zur Seite präpariert. Im Anschluss wurde der Bauchraum unter Schonung der Organe eröffnet, indem Muskulatur und Bauchfell durchtrennt und bis zum Proc. Xiphoideus und Rippenbogen präpariert wurden. Um Zugang zum Herzen im Brustraum zu erlangen, wurden Diaphragma und Rippen seitlich auf Höhe der Lungen durchtrennt und V-förmig nach oben präpariert und umgeschlagen. Nach einer Blutentnahme mit einer 30G Kanüle aus dem noch schlagenden Herzen wurde die V. cava inferior durchtrennt. In Folge konnte das Herz mit Gibco™ DPBS-Puffer (ohne Calcium und Magnesium) sorgfältig perfundiert werden, um jegliche Blutbestandteile aus Gefäßen und Gewebe zu entfernen. Die Herzbasis wurde dann mit einer Pinzette fixiert und das unbeschädigte Herz konnte mit einer Schere an den großen Gefäßen abgesetzt werden. Nach Entfernung des Fettgewebes wurde das Herz gewogen. Außerdem wurde eine Längenmessung des Tibiaknochens der Versuchstiere durchgeführt, nachdem dieser vom umliegenden Gewebe befreit wurde.

2.1.5.6 Asservierung der Gewebeproben, Vorbereitung der Histologie

In einer mit Gibco™ DPBS-Puffer gefüllten Petrischale wurde das Herz unter dem Mikroskop von übrig gebliebenem Lungengewebe, Fettgewebe sowie von großen Gefäßstümpfen befreit und anschließend gewogen. Die Herzen von Kohorte A wurden für die Histologie vorbereitet. Dafür wurde das ganze Herz in einer Histokassette, für 24 Stunden in eine 4% Formalin-Lösung gegeben und anschließend in 70% Ethanol aufbewahrt. Die Herzen von Kohorte B wurden für molekularbiologische Untersuchungen unter dem Mikroskop, mit Schere und Pinzette in ihre vier Kammern

(rechtes Atrium (RA), linkes Atrium (LA), rechter Ventrikel (RV), linker Ventrikel (LV)) zerlegt. Jedes Gewebestück wurde einzeln in einem Kryotube in Flüssigstickstoff schockgefrostet und bei -80°C asserviert.

2.2 In vitro

2.2.1 Materialien und Geräte für *in vitro* Untersuchungen

2.2.1.1 Geräte

Sterilbank

Gerätename	**Hersteller**
HERA safe Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Zentrifugen

Gerätename	**Hersteller**
Rotina 46 R Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Centrifuge 5430 R Hochgeschwindigkeitszentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Cycler

Gerätename	**Hersteller**
Biometra T-Personal Thermocycler	Analytik Jena GmbH + Co. KG, Jena, Deutschland
Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland

Mikroskop

Gerätename	**Hersteller**
Leica microscope DM6	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland

Sonstige Geräte

Gerätename	**Hersteller**
Waage Sartorius BL610	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Binder Standard-Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Mini Rocker-Shaker Plattform PMR-30	Grant Instruments Ltd, Royston, UK
IKA® Rocker 3D digital Schaukelplattform	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Eppendorf ThermoMixer F1.5	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
IKA® RCT basic safety control	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
GelDoc	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
pH-Meter pH 538	WTW, Weilheim, Deutschland
Thermo Scientific - Shandon Citadel 1000 Tissue Processor	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Microm HM 340E Mikrotom	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Medite COP 30 Cooling Plate	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Lauda Wasserbad E100	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Hydro Paraffinstreckbad	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Infinite 200® Pro Microplate Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Liebherr Kühlgerät KT 1530-21	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland

Liebherr Comfort Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Eppendorf CryoCube Gefrierschrank	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CoolNat Eismaschine, S-No. 190565	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland

2.2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produktname	**Hersteller**
Reagiergefäß 1.5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Flat 12 Cap Strips	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
0,2ml Skirted 96-well PCR Plate	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Weiße Nunc™ F96 MicroWell™ Mikrotiterplatten aus Polystyrol	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Thin-walled Tubes with Flat Caps 0,2ml	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PCR SingleCap 8er SoftStrips 0,1ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon Tubes 50ml	Corning, NY, USA
Falcon Flasks 75cm^2	Corning, NY, USA
Serologische Pipette 25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Zellkultur-Platten 100x20mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.2.1.3 Kits und Mastermixe

Produktname	**Hersteller**
Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

SuperScript™ IV System für Erststrangsynthese	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® Hot Start Master Mix	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
TaqMan™ microRNA Kit zur reversen Transkription	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ Master-Mix für Genexpression	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
SYBR™ Safe DNA Gel-Stain	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
TriTrack Loading Dye (6x)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
HEK293 Zellen	Cytion, Eppelheim, Deutschland
NEB® 5-alpha Competent E.coli (High Efficiency)	New England Biolabs Inc., Frankfurt am Main, Deutschland
psiCHECK™-2 Vektor	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (without competent cells)	New England Biolabs Inc., Frankfurt am Main, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
mirVANA® miR-144-5p mimic	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
mirVANA® cel-miR39-3p	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ Advanced miRNA Assay U6 snRNA	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

TaqMan™ Advanced miRNA Assay mmu-miR144-5p	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ Advanced miRNA Assay mmu-miR-451a	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Thermo Scientific™ Gene Ruler 50 bp DNA-Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ Schneller Advanced Master Mix	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ Genexpressionsassay (FAM)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

2.2.1.4 Chemikalien

Produktname	**Hersteller**
OptiMEM™ I Serumreduziertes Medium	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
DMEM Medium	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (0,5%) (10000 U/ml Penicillin und 100000 µg/ml Streptomycin)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA (0,05%), phenolrot	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Bacto™ Agar	BD, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Tryptone	BD, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Yeast Extract	BD, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Ampicillin [100 mg/ml]	Apotheke LMU-Klinikum, Großhadern, Deutschland

SOC-Outgrowth Medium	New England Biolabs Inc., Frankfurt am Main, Deutschland
Gibco™ DPBS (ohne $CaCl_2$ und ohne $MgCl_2$)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TRIzol™ Reagenz	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Nuklease-freies Wasser	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pertex®	Histo-Line, Pantigliate, Italien
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
TRIS-Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 4%, gepuffert, pH 6,9	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.2.1.5 Oligonukleotidprimer für die Klonierung

Bestellung aller selbst designten Oligonukleotidprimer bei ThermoFisher Scientific, München, Deutschland.

Name	**Sequenz**	**Temperatur**
CDH11 F	aaagatatcaaacctgagtatAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
CDH11 R	gcgagggataaatccattgatgAGCGATCGCCTAGAATTAC	
CLDN1 F	agttgatatctgggggctgcaAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
CLDN1 R	gatctctttccagctttggtagAGCGATCGCCTAGAATTAC	
MARCKS F	tcttgatatccttcagaagcaAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
MARCKS R	tttgtttttatacaatagtcacAGCGATCGCCTAGAATTAC	
TGFBR1 F	tcatgatatctgaagttgaagAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C

TGFBR1 R	gaagtgtcttcagtaaaaacccAGCGATCGCCTAGAATTAC	
WNT5A-1 F	tgatgatatctcttggcccagAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
WNT5A-1 R	aaacacatcaagttaccgtaccAGCGATCGCCTAGAATTAC	
WNT5A-2 F	gcctgatatctcagttttttgAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
WNT5A-2 R	accattaaaccacatccccctAGCGATCGCCTAGAATTAC	
GATA6 F	tgggatatcatatggaaacctAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
GATA6 R	ttaaaaaaaataataatgtaaaAGCGATCGCCTAGAATTAC	
SMAD6 F	ccagatatcatctacctagatAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
SMAD6 R	ggggagggcgaggttgtccctgAGCGATCGCCTAGAATTAC	
MBNL2 F	ctatgatatccattttccagaAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
MBNL2 R	taaaaaatacagtcatctatatAGCGATCGCCTAGAATTAC	
RICTOR F	gaagatatcagagctttgtgaAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
RICTOR R	ccaaagtaagtgctataggcagAGCGATCGCCTAGAATTAC	
ROCK2 F	ctttgatatctgggaagaggcAGCCCGGGAATTCGTTTA	63°C
ROCK2 R	ctgaaatattgccacacacagaAGCGATCGCCTAGAATTAC	
psiCHECK2_ Seq_1551_F	CAGCCAGGAG GACGCTCCAG	63°C

2.2.1.6 Oligonukleotidprimer für die qPCR

Bestellung aller selbst designten Oligonukleotidprimer bei ThermoFisher Scientific, München, Deutschland.

Genotypisierung

Name	**Sequenz**
miR144-Vorwärts-Primer	AGTGTTGGGGTTCTTGGCTA
miR144-Rückwärts-Primer	TCCAGGGTCATGAGCTCTTC

qPCR

Name	Richtung	Sequenz
CDH11	Vorwärts-Primer	TCTGACATTGACTCCGGTGAT
	Rückwärts-Primer	GCTCCAGTGGTCTGTTGGT
CLDN1	Vorwärts-Primer	GGCTGTCATTGGGGGCATAA
	Rückwärts-Primer	TGGCATTGATGGGGGTCAAG
MARCKS	Vorwärts-Primer	CGTCGTTACACCAACCGAAG
	Rückwärts-Primer	GGTCTTGGAGAACTGGGCAC
TGFBR1	Vorwärts-Primer	AGAGCGTTCATGGTTCCGAG
	Rückwärts-Primer	CTGCGTCCATGTCCCATTGT
WNT5A	Vorwärts-Primer	ACTGCAGCACAGTGGACAAT
	Rückwärts-Primer	GTACGTGAAGGCCGTCTCTC
GATA6	Vorwärts-Primer	CACCAGCAGCGACTAGCAGA
	Rückwärts-Primer	TCCAACCTGACTTTTGATTCCTCG
SMAD6	Vorwärts-Primer	TGCAACCCCTACCACTTCAG
	Rückwärts-Primer	GAGACAGCCGAGAATAGGGG
MBNL2	Vorwärts-Primer	GCGGCTCGCAGAGTACAA
	Rückwärts-Primer	AACCCCAAGAACATCTGGCA
RICTOR	Vorwärts-Primer	CGCTCGTGGGCAGGTATTAT
	Rückwärts-Primer	GCAGAGGGAGACGAAAGATGT
ROCK2	Vorwärts-Primer	GACAGCTGCAGGAGAAGCTC
	Rückwärts-Primer	TTATCCGCTAGCCGTGCTTT
GAPDH	Vorwärts-Primer	AACT TTG GCA TTG TGG AAG G
	Rückwärts-Primer	GGA TGA TGT TCT GGG CAG C

2.2.1.7 Software

Produktname	Hersteller
Primer-BLAST NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

NEBaseChanger™	https://nebasechanger.neb.com/
Chromas DNA Sequencing Software	Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia
CellProfiler	Broad Institute, Cambridge, MA, USA
CFX Manager 2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Fiji	https://imagej.net/
Microsoft Office Suite	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism v8	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA

2.2.1.8 Sonstiges

Produktname	**Hersteller**
Eppendorf Research® plus – mechanische Pipette (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus – mechanische Multichannel Pipette 100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
AccuJet®	Brand, Wertheim, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Gelkammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Deckglas für Haemacytometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

2.2.2 *In vitro* Methoden

2.2.2.1 Genotypisierung

Um eine Genotyp-basierte Gruppenzuordnung der Versuchstiere zu ermöglichen, wurde Gewebe aus Ohrstanzen auf das Vorliegen des miR44-5p-Knockouts untersucht. Dafür wurde eine qPCR mit darauffolgender Gelelektrophorese eingesetzt. Zur DNA-Gewinnung aus dem Gewebe wurden die Proben mithilfe des NucleoSpin DNA Rapid

Lyse Kits (Macherey-Nagel™) nach Protokoll lysiert, die DNA durch Spin-Membranen herausgefiltert und schließlich in Wasser eluiert. Für die nachfolgende qPCR wurde ein selbst designtes und getestetes Primerpaar verwendet, welches die Sequenz von Interesse einschließt *(miR144-Vorwärts-Primer, miR144-Rückwärts-Primer)*. Der 10 µl PCR-Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

Mastermix (pro Ansatz)	1x
GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega)	5 µl
Vorwärts-Primer	0,5 µl
Rückwärts-Primer	0,5 µl
Nukleasefreies Wasser	1,5 µl
DNA	2,5 µl
Total	10 µl

Zur Kontrolle wurden 2,5 µl nukleasefreies Wasser anstelle der DNA verwendet. Anschließend wurden die Proben unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert:

Schritt	**Temperatur**	**Dauer**	**Zyklen**
Initiale Denaturierung	95 °C	2 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	30
Annealing	58 °C	30 Sekunden	
Elongation	72 °C	30 Sekunden	
Terminale Elongation	72 °C	5 Minuten	1

Im Anschluss an die qPCR wurden je 2 µl TriTrack Loading Dye (6x) zu den Proben hinzugegeben und eine 90-minütige Gelektrophorese bei 100 Volt in 3%igem Agarosegel mit SYBR™ Safe DNA Gel-Stain (1:10.000) durchgeführt. Zur Skalierung wurde eine DNA-Leiter (Gene Ruler 50bp, Thermo Scientific™) verwendet. Das Ergebnis konnte dann unter dem UV-Licht einer GelDoc-Kammer betrachtet werden. Je nachdem ob ein Gen-Knockout vorlag oder nicht, hatten die PCR-Fragmente unterschiedliche Längen und konnten darüber identifiziert werden (**Abbildung 18**).

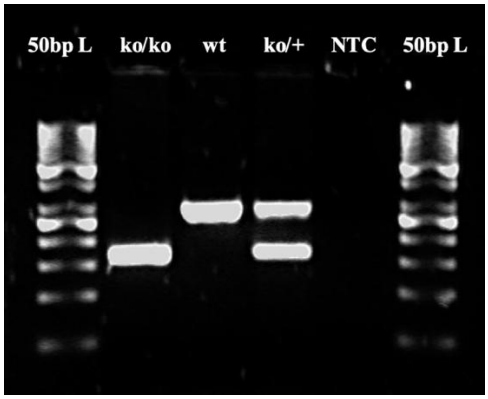


Abbildung 18. Gelelektrophorese des qPCR-Produkts zur Genotypisierung der Versuchstiere

Als Maßstab diente eine 50 Basenpaar DNA-Leiter (50bpL). Abbildung der Banden in folgender Reihenfolge: homozygot KO (ko/ko), Wildtyp (wt), heterozygot KO (ko/+), Kontrolle mit nukleasefreiem Wasser (NTC).

2.2.2.2 Histologie

Die histologische Untersuchung wurde zur Quantifizierung von Fibrose im murinen Herzgewebe durchgeführt.

2.2.2.2.1 Verarbeitung der Gewebe und Paraffineinbettung

Direkt im Anschluss an die Organentnahme wurden die Herzen in Histokassetten bei Raumtemperatur in vierprozentiger Formalinlösung fixiert. Nach 24 Stunden wurden sie in 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur gelagert. Für die Weiterverarbeitung wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet. Hierfür wurden sie zunächst mithilfe eines Karussell-Gewebeeinbettungsautomaten durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Xylol durchmischt. Darauf folgte die Einbettung in Paraffin. Die Paraffinblöcke wurden am Mikrotom (ThermoFisher) in ca. 4,5 µm dicke Paraffinscheiben geschnitten, welche möglichst alle vier Herzkammern im Längsschnitt abbilden sollten. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad von ca. 40 °C geglättet und auf Glasobjektträger übertragen. Nach einer Inkubationszeit von circa 12 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C waren die Paraffin-Gewebe-Schnitte bereit zur Färbung.

2.2.2.2.2 Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Schnitte mit folgenden Inkubationsschritten entparaffiniert und rehydriert:

Reagenz	Dauer
Xylol I	10 Minuten
Xylol II	10 Minuten
Ethanol 100% I	5 Minuten
Ethanol 100% II	5 Minuten
Ethanol 96%	5 Minuten
Ethanol 70%	5 Minuten

Im Anschluss wurde die eigentliche Färbung mit dem Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit von Carl Roth® in folgenden Schritten durchgeführt. Zuerst wurden die Objektträger für 2,5 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylinlösung getaucht. Dies führte zur säureresistenten Färbung der Zellkerne, welche daraufhin eine braunschwarze Farbe annahmen. Die Objektträger wurden anschließend für 15 Minuten in Leitungswasser gebläut. Das restliche Gewebe wurde darauffolgend mit den sauren Farbstofflösungen nach Goldner eingefärbt. Nach 5-minütiger Inkubation in Goldner-Lösung I wurden die Objektträger 30 Sekunden in einprozentiger Essigsäure gespült. Nachfolgend wurden sie für 5 Minuten in Goldner-Lösung II getaucht und erneut für 30 Sekunden in einprozentiger Essigsäure gespült. Abschließend kam es zur fünfminütigen Inkubation in Goldner-Lösung III, woraufhin die Objektträger für 3 Minuten in einprozentiger Essigsäure gewaschen wurden. Das kollagene Bindegewebe nahm im Ergebnis eine grüne Farbe an, welche eindeutig vom rot gefärbten Muskelgewebe zu unterscheiden ist.

Schließlich durchliefen die nun gefärbten Schnitte eine Rückreihe zur erneuten Dehydratation in folgenden Schritten:

Reagenz	Schritt
Ethanol 70%	10x tunken
Ethanol 96%	10x tunken
Ethanol 70%	10x tunken
Ethanol 100% II	10x tunken
Ethanol 100% I	10x tunken
Xylol II	5 Minuten
Xylol I	5 Minuten

Nachdem die Objektträger vollständig luftgetrocknet waren, wurde je ein Tropfen Pertex® (Medite, Burgdorf) neben dem Gewebe aufgetragen und ein Deckglas blasenfrei abdeckend über den gefärbten Schnitten festgedrückt. Zum Trocknen wurden sie abschließend unter einem Abzug platziert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.2.2.3 Mikroskopie und Bildgewinnung

Die Präparate wurden unter einem Lichtmikroskop von Leica betrachtet und die Bilder computergestützt aufgenommen. Zur Orientierung wurde jeweils eine Übersichtsaufnahme in 5-facher Vergrößerung erstellt (**Abbildung 19A**). Zur eigentlichen Untersuchung der Fibrose wurden uniforme Ausschnitte der Präparate in 40-facher Vergrößerung festgehalten. Aufgrund des geringen Gewebeanteils in den Atrien, wurden diese vollständig festgehalten und ausgewertet (**Abbildung 19B**). In den Ventrikeln wurden jeweils 10 sich nicht überschneidende Bilder aus verschiedenen Arealen des angeschnittenen Herzkammergewebes aufgenommen (**Abbildung 19C**).

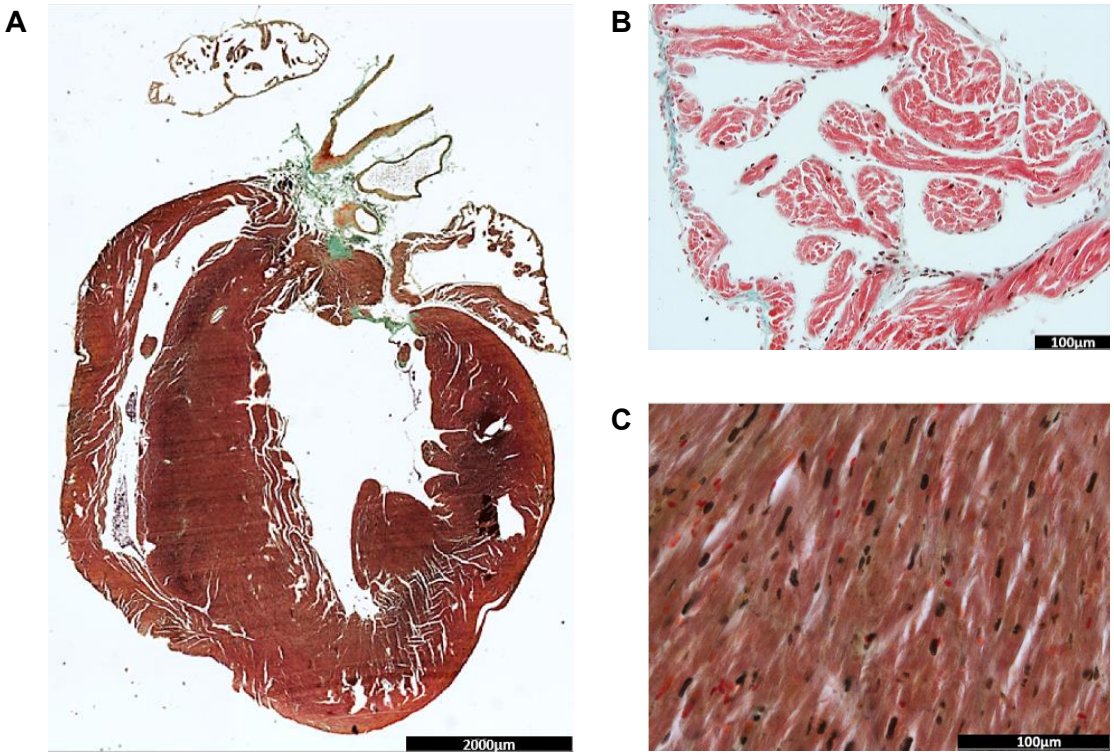


Abbildung 19. Repräsentative Aufnahmen des Mausherzens in der Histologie

Masson-Goldner-Trichrom Färbung. Repräsentative Darstellung **A**, des gesamten murinen Herzens zur Übersicht, oben links: rechter Vorhof, oben rechts: linker Vorhof, unten links: rechter Ventrikel, unten rechts: linker Ventrikel. **B**, eines Ausschnitts aus dem linken Vorhof mit Muskelgewebe (rot) und fibrotischen Arealen (blau). **C**, eines Ausschnitts aus dem linken Ventrikel in 40x Vergrößerung mit Muskelgewebe (rot).

2.2.2.3 Validierung der miR-144-5p Zielgene

Mithilfe des Onlinetools *TargetScanMouse7.2* wurden potenzielle Zielgene der miR-144-5p ermittelt. Daraufhin erfolgte eine Auswahl von Genen, die einen potenziellen Einfluss auf profibrotische Remodeling-Prozesse am Herzen ausüben. Diese wurden schließlich mithilfe dualer Luciferase Reporter Assays validiert.

2.2.2.3.1 Vektordesign und Klonierung

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen der miR-144-5p und der nicht-translatierten Region (UTR) am 3‘-Ende der mRNA der ausgewählten Zielgene wurde der psiCHECK™-2 Vektor (**Abbildung 20**) verwendet. Mithilfe des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kits (NEB) erfolgte im ersten Schritt die Insertion der komplementären DNA-Abschnitte in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors. Dabei wurden auch die 3’UTR-Regionen flankierenden Abschnitte berücksichtigt.

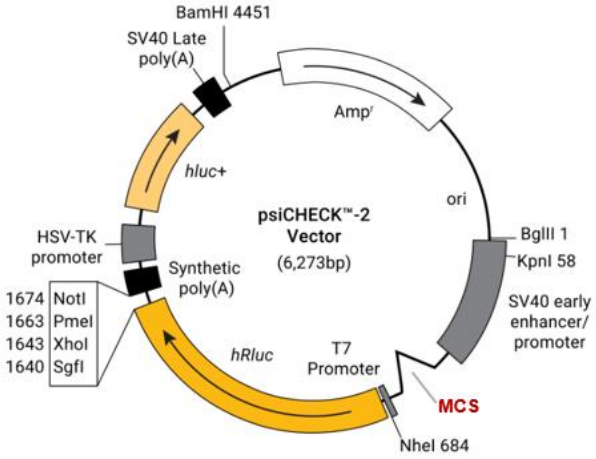


Abbildung 20. psiCHECK™-2 Vektor

psiCHECK™-2 Vektor mit der Multiple Cloning Site (MCS), dem Gen für Ampicillinresistenz (Amp), verschiedenen Enhancern/Promotern, sowie den Genen für die Renilla-Luciferase (hRluc) und die Firefly-Luciferase (hluc+). Quelle: Promega, Walldorf.

Die benötigten Primer wurden mit dem NEBaseChanger™ Online-Tool designed. Für die qPCR wurden die Proben wie folgt zu einem 25 µl Ansatz pipettiert:

1. Exponentielle Amplifikation der DNA	1x
Q5 Hot Start High Fidelity 2X Master Mix	12,5 µl
10 µM Vorwärts-Primer	1,25 µl
10 µM Rückwärts-Primer	1,25 µl
psiCHECK™-2 Vector-DNA (10 ng/µl)	1 µl
Nukleasefreies Wasser	9 µl
Total	25 µl

Anschließend wurden die Proben unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden	1
Denaturierung	98 °C	10 Sekunden	25
Annealing	63 °C	3 Minuten	
Elongation	72 °C	3 Minuten	
Terminale Extension	72 °C	2 Minuten	1

Die Produkte der qPCR wurden sofort im Anschluss für die Kinase-Ligase-DpnI-Reaktion (KLD-Reaktion) in Schritt Zwei weiterverwendet. Um eine Phosphorylierung mit anschließender Ligation, sowie eine Bereinigung der Probe von der DNA-Matrize zu erreichen, wurde je 1 µl des qPCR-Produktes fünf Minuten lang bei Raumtemperatur mit folgenden Reagenzien inkubiert:

2. KLD-Reaktion	1x
PCR-Produkt	1 µl
2X KLD Reaktion Buffer	5 µl
10X KLD Enzyme Mix	1 µl
Nukleasefreies Wasser	3 µl
Total	10 µl

Zuletzt erfolgte die Klonierung der Vektor-DNA (Plasmid) in kompetente NEB5-alpha E.coli Zellen (New England BioLabs® Inc.). Diese mussten wenige Minuten auf Eis aufgetaut werden, bevor 5 µl des KLD-Reaktions-Mixes in das Reaktionsgefäß hinzugegeben werden konnten. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen im Reaktionsgefäß in einem Wasserbad von 42 °C für 30 Sekunden inkubiert, um die Zellmembran durch einen Hitzeschock zu permeabilisieren. Nach einer weiteren Inkubation von 5 Minuten auf Eis, wurden 950 µl SOC-Medium von 37°C zum Transformationsansatz hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin für eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Heizblock inkubiert. Auf einer Ampicillin-haltigen [100 µg/ml] LB-Agar-Platte wurden schließlich 50 µl des Ansatzes ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch das im Vektor integrierte Ampicillin-Resistenzgen konnte sichergestellt

werden, dass nur die Bakterien auf dem Nährboden wachsen konnten, welche zuvor den Vektor im Rahmen der Transformation aufgenommen haben.

2.2.2.3.2 Plasmidpräparation

Am Folgetag wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt und je in einen 50 ml Falcontube mit 5 ml Ampicillin-haltigem [100µg/ml] LB-Medium gegeben. Diese wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rmp im Wasserbad inkubiert. Nach 14-16 Stunden konnte mit der Plasmidpräparation mithilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen) nach Protokoll fortgefahren werden. Dafür wurde die Bakterienkultur zunächst bei 6800 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um ein Zellpellet am Boden des Falcontubes zu erhalten. Das übriggebliebene Medium wurde verworfen und die Bakterien in 250 µl des P1-Puffers resuspendiert, um sie in ein bereitgestelltes 2 ml Reaktionsgefäß zu transferieren. Der P2-Puffer wurde hinzugefügt und alles durch 5-maliges Umdrehen miteinander vermischt. Innerhalb von 5 Minuten wurden 350 µl des N3-Puffers hinzugegeben und die Komponenten sofort durch 5-maliges Umdrehen vermischt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 17.900 x g wurde der Überstand in ein *QIAprep Spin column* überführt und erneut für 60 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss im Auffanggefäß wurde verworfen und 0,75 ml PE-Puffer in das Spin column pipettiert. Nach 60-sekündiger Zentrifugation wurde der Durchfluss erneut verworfen und die Zentrifugation wiederholt. Das Auffanggefäß wurde durch ein 1,5 ml Reaktionsgefäß ersetzt. 50 µl EB-Puffer wurden in das Spin column gegeben um die Vektor-DNA durch einminütige Inkubation und einminütige Zentrifugation zu eluieren.

Das Produkt wurde in 50 µl des im Kit enthaltenen Elution Buffers eluiert und mittels einer photometrischen Konzentrationsbestimmung im NanoDrop™ durch Messung des Verhältnisses der optischen Dichte bei 260/280 nm quantifiziert. Die Proben wurden als qualitativ befriedigend angesehen, wenn das Extinktionsverhältnis einen Wert > 1,6 erreichte und schließlich auf 250 ng/µl verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die gewonnenen psiCHECK™-2 -Reportergen-Konstrukte (Plasmide) bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde durch den Sequencing Service der Fakultät für Biologie der LMU durchgeführt. Es wurde das „Cycle, Clean and Run“ Protokoll des Sequencing Services genutzt. Der verwendete Primer *(„psiCHECK2_Seq_1551_F“)* wurde zuvor selbst designt und getestet. Er flankiert die MCS des psiCHECK™-2 Vektors, um zu untersuchen, ob die inserierte 3’UTR-Sequenz fehlerfrei im Plasmid

vorlag. In 0,1 ml Reaktionsgefäßen wurden je 1 µl Plasmid-DNA [250 ng/µl] mit 3,2 µl des Primers [1 pmol/µl] und 2,8 µl nukleasefreiem Wasser vorbereitet und zur Sequenzanalyse eingereicht. Das Ergebnis wurde mithilfe der Chromas (Technelysium Pty Ltd) DNA Sequenzierungs-Software ausgewertet.

2.2.2.3.4 Zellkultur und Transfektion

In unbeschichteten Zellkulturplatten mit 48 wells wurden in jedes Well etwa 5 x 10^4 HEK293-Zellen ausgesät und mit ausreichend Wachstumsmedium (500 ml DMEM Medium + 50 ml FCS (10%) + 5 ml Penicillin/Streptomycin (0,5%) (10000 U/ml Penicillin und 100000 µg/ml Streptomycin)) versorgt. Nach circa 40 Stunden im CO_2-Inkubator bei 37 °C und einem CO_2-Gehalt von 5% war eine Konfluenz von circa 75% erreicht. Nachdem das Wachstumsmedium vorsichtig durch 225 µl des antibiotikafreien Transfektionsmediums (500 ml DMEM + 50 ml FCS (10%)) ersetzt wurde, konnte mit der Kotransfektion mit Plasmid und miR-mimic fortgefahren werden. Zur Untersuchung der mRNA-miRNA-Interaktion wurde ein miR-144-5p mimic (mirVANA® miR-144-5p mimic, Thermo Fischer Scientific, USA) verwendet. Als Negativkontrolle diente ein mimic der cel-miR39-3p (mirVANA® cel-miR39-3p, Thermo Fischer Scientific, USA). Alle zuvor generierten psiCHECK™-2-Reportergen-Konstrukte (Plasmide) wurden mit jeder microRNA einzeln untersucht. Pro Transfektionsreaktion, also für jedes Well, wurden zunächst die folgenden beiden Ansätze pipettiert:

Ansatz 1	1x
Plasmid [250 ng/µl]	0,5 ml
OptiMEM™	11,5 µl
microRNA [5 pmol/µl]	0,5 µl
Total	12,5 µl

Ansatz 2	1x
Lipofectamine 2000	1 µl
OptiMEM™	11,5 µl
Total	12,5 µl

Die Ansätze wurden zunächst einzeln für 5 Minuten und in Folge zusammengemischt für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 25 µl des Ansatzes zu den HEK293-Zellen im Transfektionsmedium hinzugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und einem CO2-Gehalt von 5% wurde mit der passiven Lyse der Zellen fortgefahren.

2.2.2.3.5 Passive Zelllyse

Nach der Transfektion wurde das Medium zunächst von den Zellen entfernt und abgestorbene Zellen, sowie Mediumsreste mit PBS aus den Wells gewaschen. Zu jedem Well wurden daraufhin 65 µl des 1X Passive Lysis Buffers aus dem *Dual Luciferase® Reporter Assay Systems* Kit (Promega) hinzugegeben, um die Zellen zu lysieren. Nach einer 15-minütigen Inkubation der Platte bei Raumtemperatur auf einer Schaukelplattform, konnten die Luciferase Messplatten vorbereitet werden. In jedes Well einer weißen 96 well-Platte wurden 20 µl des Zelllysats gegeben. Die folgende Messung wurde pro Zielgen und pro microRNA in Triplikaten durchgeführt.

2.2.2.3.6 Dualer Luciferase-Reporter-Assays

Die Assays wurden mithilfe des *Dual Luciferase® Reporter Assay Systems* Kits (Promega) durchgeführt. Der psiCHECK™-2 Vektor enthält das Gen der Firefly-Luciferase hluc+ (Fluc), welches unabhängig von jeglicher microRNA konstant exprimiert wird und anhand dessen die Reporterkonzentration in jeder Probe einzeln gemessen werden konnte. Am 3‘ Ende der außerdem im Vektor enthaltenen Renilla Luciferase hRluc (Rluc), befindet sich die MCS mitsamt der klonierten 3’UTR-Sequenzen. Handelte es sich bei der in den Vektor klonierten Sequenz um ein tatsächliches Zielgen der miR-144-5p, so kam es durch komplementäre Bindung zwischen miRNA und 3’UTR-Sequenz zur Suppression oder Abbau der mRNA. Da die mRNA auch das transkribierte hRluc-Gen enthält, wird diese folglich in ihrer Aktivität gequencht. Das Ausmaß der Suppression war abhängig von der Affinität zwischen microRNA und Zielgensequenz. Bei einer perfekt komplementären Bindungssequenz wird die Aktivität der Renilla Luciferase im Verhältnis zur Firefly-Luciferase demnach stark gequencht. Bei fehlender Interaktion wird die Aktivität nicht beeinflusst und entspricht 100%. Für die Positivkontrolle wurden HEK293-Zellen mit einem Reporter mit perfekt komplementärer miR-144-5p Bindestelle transfektiert. Für die Negativkontrolle wurden HEK293-Zellen mit leerem Reporter transfektiert.

Im Anschluss an die passive Zelllyse wurden das *Luciferase Assay Reagent II (LAR II)* sowie das *Stop & Glo® Reagent,* wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, bei

Raumtemperatur vorbereitet und direkt weiterverwendet. Das Luminometer wurde so voreingestellt, dass es nach einem zwei Sekunden langem „premeasurement delay“ pro Well eine 10-sekündige Messung durchführen würde. Mit einer Multipipette wurden je 100 µl des LAR II Reagenz hinzugefügt und durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren mit dem Reporter vermischt. In direkter Folge wurde die Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität im Luminometer initiiert. Nach Abschluss folgte die Zugabe von 100 µl des Stop & Glo Reagents mit einer Multipipette und ein kurzes Mischen mittels Vortex-Rüttler. Daraufhin wurde die Messung der Renilla Luciferase Aktivität durchgeführt. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurden drei Wells pro Platte mit den entsprechenden Reagenzien befüllt, jedoch ohne Zugabe von Zellen. Die Hintergrundaktivität fiel stets so klein aus, dass sie im Verhältnis vollständig zu vernachlässigen war.

Die Reporterkonzentration konnte durch die relative Firefly-Luciferase-Aktivität (Fluc Luminescence arbitrary units) quantifiziert werden (Rluc/Fluc Luminescence arbitrary units). Die Renilla-Luciferase-Aktivität (Rluc Luminescence arbitrary units) in den mit der cel-miR39-3p kotransfizierten Proben wurde als 100% angenommen, da aufgrund einer fehlenden Basenkomplementarität keine mRNA-Interferenz stattfinden sollte. Der Quench der Renilla-Luciferase-Aktivität in den mit der miR-144-5p kotransfizierten Proben konnte daran in Prozent gemessen werden ((Rluc miR-144-5p / Rluc cel-miR39-3p) x 100%).

2.2.2.4 RNA-Analyse der Zielgene

Die Quantifizierung der Zielgen-mRNA im murinem Herzgewebe erfolgte mittels qPCR. Sie diente der Untersuchung eines potenziellen mRNA-Abbaus durch die miR-144-5p.

2.2.2.4.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Nach Herzentnahme wurde das Gewebe in die vier Herzkammern (rechtes (RA) und linkes (LA) Atrium, rechter (RV) und linker (LV) Ventrikel) aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Menge des isolierten Gewebes beschränkte sich auf wenige Milligramm. Da der linke Ventrikel stets aus weitaus mehr Gewebe als die anderen Regionen bestand, wurde hier zur Isolation der RNA stets die doppelte Menge an Chemikalien verwendet. Das Gewebe wurde zunächst in TRIzol™ Reagenz homogenisiert. Dazu wurden die Proben einzeln in ein Reaktionsgefäß mit 0,5 ml TRIzol™ (LV: 1 ml TRIzol™) auf Eis gegeben. Noch im gefrorenen Zustand, wurde mithilfe eines Sonopulse-Gerätes eine vollständige Homogenisierung des Gewebes erreicht. Nach 5-minütiger Inkubationszeit zur

vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe wurden jeweils 0,1 ml Chloroform pro 0,5 ml TRIzol™ hinzugefügt und die Phasen durch vorsichtiges Umdrehen des Reaktionsgefäß miteinander vermischt. Im Anschluss an eine 2-3-minütige Inkubationsphase wurden die Proben bei 4°C für 15 Minuten bei 12,000 x g zentrifugiert. Resultat der Zentrifugation war eine Phasentrennung in eine untere organische Phase aus Phenol und Chloroform, eine mittlere Interphase und eine wässrige obere Phase, welche die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde durch vorsichtiges Pipettieren in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Dabei wurde eine Kontamination mit den anderen Phasen streng vermieden. In Folge wurden 0,25 ml Isopropanol pro 0,5 ml TRIzol™ zur wässrigen Phase hinzugegeben und die Bestandteile durch 4-5-maliges Umdrehen des Reaktionsgefäßes miteinander vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubationsphase folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C. Die gesamte präzipitierte RNA lag daraufhin als weißes Gel-ähnliches Pellet am Boden des Gefäßes vor. Der flüssige Überstand wurde durch Pipettieren abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 0,5 ml 75% Ethanol pro 0,5 ml verwendetem TRIzol™ gelöst. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin kurz gevortexed und anschließend für 5 Minuten bei 7.500 x g und 4°C zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen und das übriggebliebene Pellet für 5-10 Minuten luftgetrocknet. Schließlich wurde das RNA-Pellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in nukleasefreiem Wasser gelöst. Die Wassermenge wurde in Abhängigkeit von der Pelletgröße variiert, um eine ähnliche Konzentration aller Proben zu erzielen und schwankte zwischen 20 µl bei kleinen und 100 µl bei großen RNA-Mengen. Zum Abschluss wurden die Reaktionsgefäße für 10-15 Minuten in einem Heizblock bei 56°C inkubiert. Die RNA-Quantifizierung erfolgte mittels einer photometrischen Konzentrationsbestimmung im NanoDrop™ durch Messung des Verhältnisses der optischen Dichte bei 260/280 nm. Die Proben wurden als qualitativ befriedigend angesehen, wenn das Extinktionsverhältnis einen Wert > 1,8 erreichte. Abschließend wurden die Proben standardisiert auf 100 ng/µl verdünnt. Die Proben wurden daraufhin sofort bei -80 °C asserviert.

2.2.2.4.2 cDNA-Synthese

Zum Umschreiben der isolierten RNA in cDNA wurde die *SuperScript® IV Reverse Transcriptase* von Thermofischer verwendet. Die Proben wurden wie folgt einzeln zu einem Gesamtansatz von 20 µl/Probe pipettiert:

Annealing Ansatz	1x
50 µM Random Hexamers	1µl
10 mM dNTP	1µl
RNA [100 ng/µl]	5 µl
Nucleasefreies Wasser	6 µl
Total	13 µl

Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wurden der „Annealing Ansatz“ zunächst für 5 Minuten bei 65°C und daraufhin für mindestens 1 Minute auf Eis inkubiert.

Nach kurzer Zentrifugation des 5x SSIV-Puffers konnte daraufhin folgender „Reverse Transkription Master Mix“ angesetzt werden:

Reverse Transkription Master Mix	1x
5x SSIV Buffer	4 µl
100mM DTT	1 µl
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 µl
SuperScript® IV Reverse Transcriptase [200 U/µl]	1 µl
Total	7 µl

Nach der Zentrifugation wurden zu jeder Probe des „Annealing Ansatzes“ je 7 µl des „Reverse Transcription Master Mixes“ hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben unter den folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert:

Dauer	**Temperatur**
10 Minuten	23 °C
10 Minuten	53 °C
10 Minuten	80 °C

Die erhaltene cDNA wurde anschließend entweder auf 2,5 ng/µl verdünnt oder bei einer Konzentration von 25 ng/µl belassen und in beiden Fällen bei -80°C gelagert.

2.2.2.4.3 Primerdesign

Die Primer wurden unter Verwendung des Onlinetools Primer-BLAST entworfen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Größe des Amplicons zwischen 100 und 150 Basenpaaren (bp) lag und die Primer-Länge etwa 20 bp betrug. Das amplifizierte Produkt sollte Exon-übergreifend sein. Die Schmelztemperatur der Primer wurde auf einen Bereich zwischen 57 und 63 Grad festgelegt. Der GC-Gehalt sollte idealerweise bei 50% liegen, wobei eine Toleranzspanne von 35% bis 65% berücksichtigt wurde.

2.2.2.4.4 Primertests

Die Testung der Primer erfolgte durch eine qPCR mit SYBR®-Green. Darauf folgten eine Schmelzkurvenanalyse mittels Gradienten-PCR und Gelelektrophorese sowie der Erstellung einer Standardkurve.

Für die Schmelzkurvenanalyse im Rahmen der Gradienten-PCR wurde der iTaq™ Universal SYBR®-Green Supermix (ThermoFisher Scientific) verwendet. Nach kurzer Zentrifugation der Reagenzien wurde für jedes zu untersuchende Primerpaar zwei Mastermixe (10x für die Schmelzkurvenanalyse, 12x für die Standardkurvenanalyse) nach folgendem Schema pipettiert und lichtgeschützt auf Eis gelagert:

Primertest Master Mix	1x	10x	12x
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)	5 µl	50 µl	60 µl
Primer F (10 µM)	1 µl	10 µl	12 µl
Primer R (10 µM)	1 µl	10 µl	12 µl
Nukleasefreies Wasser	2 µl	20 µl	24 µl

Nach dem Mischen erfolgte eine kurze Zentrifugation. Eine 96-well Platte wurde in einzelne Spalten pro Primerpaar aufgeteilt. In jedes Well wurden dann 9 µl des Primer-spezifischen Mastermixes zusammen mit 1 µl cDNA [2,5 ng/µl] pipettiert. Es wurde pro Spalte eine Kontrolle mit 1 µl nukleasefreiem Wasser hinzugefügt. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 4.600 x g erfolgte eine Gradienten-PCR (jede Reihe hatte eine spezifische Annealing-Temperatur zwischen 55 °C und 65 °C) mit Aufzeichnung einer Schmelzkurve unter den folgenden Bedingungen:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der Polymerase + DNA-Denaturierung	95 °C	2 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	40
Annealing/Extension/Lesen der Platte	55-65 °C	60 Sekunden	
Schmelzkurvenanalyse	65-95 °C	Anstieg: 0,5 °C / Sekunde	1
Halten	4 °C	∞	

Im Anschluss wurden die Platten geöffnet und das PCR-Produkt eines jeden Primerpaares für die Gelelektrophorese vorbereitet. Hierfür wurde zunächst ein 3%-Agarose-Gel mit SYBR™ Safe DNA Gel-Stain (1:10.000) gegossen und in einer Kammer mit TBE-Puffer (1x) vorbereitet. Die 10 µl des PCR-Produktes, wurden mit je 2 µl TriTrack Loading Dye (6x) vermischt. Die Proben wurden daraufhin gemeinsam mit einer DNA Ladder (1 µl Gene Ruler 50bp DNA-Leiter + 1 µl TriTrack Loading Dye + 4 µl nukleasefreies Wasser) in die Kammern des Gels geladen. Die Gelelektrophorese lief für 1,5 Stunden bei 100 V. Anhand der DNA Ladder konnte unter dem UV-Licht schließlich die Fragmentlänge der PCR-Produkte bestimmt und mit der erwarteten Amplikonlänge der Primerpaare abgeglichen werden. Die Schmelzkurven wurden mit der Bio-Rad CFX Software (2.1) analysiert und bewertet. Um ein Primerpaar verwenden zu können, mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

- Ein angemessener c_T-Wert in der qPCR,
- Eine Schmelzkurve mit einem einzelnen Gipfel,
- Die erwartete Amplikonlänge in der Gelelektrophorese.

Pro Primerpaar wurde die beste Annealing-Temperatur ermittelt, indem die höchste der Schmelzkurven ausgewählt wurde.

Bei Übereinstimmung der Amplikonlängen in der Gelelektrophorese und positiver Schmelzkurve, wurde als nächster Schritt eine Standardkurve angefertigt.

Hierfür wurde zunächst eine cDNA-Verdünnungsreihe nach folgendem Schema pipettiert:

Standard 1 12,5 ng/µl

Standard 2 6,25 ng/µl

Standard 3 3,12 ng/µl

Standard 4 1,56 ng/µl

Standard 5 0,78 ng/µl

Anschließend wurde in jedes Well einer 96 Well Platte 9µl des oben beschriebenem qPCR-Mastermix pipettiert. Die Aufteilung erfolgte in Primer-spezifischen Reihen. Pro Well wurden jeweils 1µl der verdünnten cDNA in absteigender Konzentration hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben steril versiegelt und zentrifugiert. Die Messung erfolgte in Duplikaten und mit je zwei Negativkontrollen mit 1 µl nukleasefreiem Wasser. Die qPCR-Messung wurde bei der zuvor ermittelten Primer-spezifischen Annealing Temperatur im BioRad Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	**Temperatur**	**Dauer**	**Zyklen**
Aktivierung der Polymerase + DNA-Denaturierung	95 °C	2 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	40
Annealing/Extension/Lesen der Platte	55-65 °C	60 Sekunden	
Halten	4 °C	∞	

Um ein Primerpaar verwenden zu können, mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

- Effizienz der Schmelzkurve zwischen 90 – 115%,
- Reproduzierbarkeit zwischen den Replikaten R^2 > 90%.

Als funktionell wurden nur die Primer-Paare erachtet, die in allen Primer-Tests positive Ergebnisse zeigten. Diese konnten im Anschluss für die qPCRs zur Quantifizierung von Zielgen-mRNA im Herzgewebe der Versuchstiere verwendet werden.

2.2.2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR, engl.: real-time quantitative PCR) mit SYBR®-Green

Zur Quantifizierung der Zielgene erfolgte eine Realtime-PCR mittels iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix von ThermoFisher Scientific. Der SYBR® Green I Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und emittiert daraufhin grünes Licht der Wellenlänge 521 nm. Die Stärke des Fluoreszenzsignals wurde vom Thermocycler zu jedem Zyklus im Anschluss an den Elongationsschritt gemessen. Da der Anstieg direkt proportional zur synthetisierten DNA-Menge ist, konnte diese daraufhin quantifiziert werden. Gemessen wurden die c_T-Werte, also der Zyklus, in dem das emittierte Fluoreszenz-Signal eine definierte Schwelle überschritt. Zur relativen Quantifizierung der Zielgene wurden deren c_T-Werte mit dem c_T-Wert des Housekeeping-Gens GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Der Baseline Threshold aller Läufe wurde auf eine definierte Schwelle angepasst. Der Mastermix von ThermoFisher Scientific enthielt außerdem eine AmpliTaq Gold™ DNA-Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passivreferenzfarbstoff (ROX) und einen optimierten Puffer.

Unter sterilen Bedingungen wurden die PCR-Reaktionsansätze nach folgendem Schema in 96-well Platten mit je 9 µl Mastermix und 1 µl cDNA pipettiert:

qPCR mittels SYBR-Green	**1x**
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	5 µl
Vorwärtsprimer [10 µM]	1 µl
Rückwärtsprimer [10 µM]	1 µl
Nucleasefreies Wasser	2 µl
cDNA [2,5 ng/µl]	1 µl
Total	10 µl

Zur Untersuchung eines jeden Gens wurden für jede cDNA-Probe Tripletts pipettiert. Die Platten wurden daraufhin steril verschlossen und für 1 Minute bei 4.600 x g zentrifugiert. Im Thermocycler von Bio-Rad wurde dann bei der Primer-spezifischen Annealing-Temperatur zwischen 57-63°C die qPCR-Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der Polymerase + DNA-Denaturierung	95 °C	2 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	35
Annealing/Extension/Lesen der Platte	57-63 °C	60 Sekunden	
Halten	4 °C	∞	

Unplausible Ausreißer mit starker Abweichung von den anderen beiden Werten eines Tripletts wurden aus der statistischen Analyse ausgeschlossen. Auf jeder Platte wurden drei Kontrollproben mit nukleasefreiem Wasser mitgemessen, um eine generelle Kontamination der Platten auszuschließen. Diese waren stets negativ. Zur Normierung der Ergebnisse wurde das Housekeeping-Gen GAPDH verwendet.

2.2.2.5 MicroRNA Analyse

Um zu validieren, dass das Gen-Knockout der miR-144-5p im Genom des verwendeten Knockout-Mausmodells in allen Herzregionen vollständig vorlag, wurde eine miRNA-Expressionsanalyse mittels qPCR durchgeführt. Für die Untersuchung wurde Herzgewebe aus allen 4 Kammern (LA, RA, LV, RV) verwendet. Aufgrund des außerdem im Modell enthaltenen Knockouts der miR-451-3p, wurde diese zusätzlich mituntersucht.

2.2.2.5.1 cDNA-Synthese

Das Umschreiben der analog Kapitel 2.2.2.4.1 isolierten RNA in cDNA wurde mit microRNA-spezifischen Primern von ThermoFisher Scientific und dem TaqMan™ microRNA Kit zur reversen Transkription (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Zunächst wurde ein Mastermix für die Reverse Transkription wie folgt pipettiert und miteinander vermischt:

RT Reaktionsmix	**1x**	**100x**
100mM dNTPs	0,15 µl	150 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase [50 U/µl]	1 µl	100 µl
10x Reverse Transcription Buffer	1,5 µl	150 µl
RNase Inhibitor [20 U/µl]	0,19 µl	190 µl
Nucleasefreies Wasser	4,16 µl	416 µl
Total	7 µl	700 µl

In einer 96-well PCR-Platte wurden dann die Komponenten wie folgt pipettiert:

PCR Reaktionsmix	**1x**
RT Reaction Mix	7 µl
RNA [2 ng/µl]	5 µl
Zentrifugation	
5x RT Primer	3 µl

Nachdem die Platten steril versiegelt und erneut zentrifugiert wurden, konnte die eigentliche Reverse Transkriptions-Reaktion im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt werden:

Schritt	**Temperatur**	**Dauer**
Reverse Transkription	16 °C	30 Minuten
	42 °C	30 Minuten
Stopp	85 °C	5 Minuten
Hold	4 °C	Hold

Die gewonnene cDNA wurde entweder direkt für die Realtime-PCR weiterverwendet oder für maximal eine Woche bei -20°C gelagert.

2.2.2.5.2 Quantitative Echtzeit-PCR mittels TaqMan-Sonden

Die microRNA-Assays wurden mithilfe des TaqMan™ Master Mix für Genexpression (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Dafür wurden von miR-144-5p und miR-451-spezifischer TaqMan™-Sonden und TaqMan™-Sonden für U6 als Housekeeping-Gen verwendet. Die Quantifizierung der cDNA-Menge erfolgte durch die Messung von fluorogenen Lichtsignalen. Die Sonden bestehen aus einem zielsequenzspezifischen Oligonukleotid an dessen 5'-Ende ein Fluorophor-Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende ein Quencher angefügt wurde. Durch die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporter wird die Lichtemission unterdrückt. Während dem Annealing an die reziproke DNA-Sequenz der Sonde kann folglich kein Signal emittiert werden. Für die qPCR wird zudem eine Taq-Polymerase mit 5' → 3'-Exonukleaseaktivitöt benötigt. Diese spaltet während der Elongation der Primer das 3'-Ende mitsamt des Quenchers von der Sonde ab. Durch diese Hydrolyse kommt es zur räumlichen Trennung zwischen Farbstoff und Quencher. Dies führt zur Emission eines fluorogenen Lichtsignals, welches quantitativ der Menge an neu synthetisierter DNA entspricht.

Zunächst wurde ein PCR-Reaktionsmix nach folgendem Schema pipettiert:

PCR Reaktionsmix	**1x**	**100x**
20x TaqMan™ Small RNA Assay	0,5 µl	50 µl
PCR Master Mix	5 µl	500 µl
Nukleasefreies Wasser	3,5 µl	350 µl
cDNA [25 ng/µl]	1 µl	
Total	10 µl	900 µl

In eine 96-well PCR-Platte wurden pro Well 9 µl des PCR Reaktionsmixes und je 1 µl der cDNA in Tripletts pipettiert. Nach Zentrifugation der Platte wurde die Realtime-PCR-Reaktion im BioRad-Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	**Temperatur**	**Dauer**	**Zyklen**
Enzymaktivierung	95°C	10 Minuten	1
Denaturierung	95°C	15 Sekunden	40
Annealing, Extension, Lesen der Platte	60°C	60 Sekunden	

Die Auswertung der qPCRs erfolgte mithilfe der BioRad Software. Zur relativen Quantifizierung wurden die Ergebnisse auf das mitgemessene Housekeeping-Gen U6 bezogen. Die Baseline-Thresholds der Läufe wurden aneinander angeglichen. Um eine Kontamination auszuschließen, wurden pro Platte 3 Negativkontrollen mit nukleasefreiem Wasser mitgemessen, welche stets negativ waren.

2.2.2.6 Software und bioinformatische Methoden

2.2.2.6.1 Targetgen-Analyse mit TargetScanMouse 7.2

Potenzielle Zielgene der miR-144-5p wurden durch das Onlinetool *TargetScanMouse 7.2* identifiziert. Dabei wurde das Genom der Maus nach konservierten kanonischen Bindestellen innerhalb der 3'UTR-Regionen gescreent. Die verschiedenen Bindestellen wurden nach der Anzahl an komplementären Basen innerhalb der microRNA „seed-region" unterschieden. Potenziell relevante Zielgene wurden durch eine PubMed-Literaturrecherche herausgefiltert. In diesem Rahmen fand eine Bewertung in Bezug auf elektrische und strukturelle Remodeling-Prozesse am Herzen, sowie zur Erkrankung VHF statt. Da sich das Onlinetool einer Computerberechnung bedient, die auch falschpositive Treffer beinhaltet, mussten die Treffer wie in 2.2.2.3. beschrieben *in vitro* validiert werden.

2.2.2.6.2 Semi-automatisierte computergestützte Analyse der Histologie

Die bioinformatische Analyse der histologischen Daten wurde mithilfe der CellProfiler Software durchgeführt. Dafür wurde arbeitsgruppenintern eine Pipeline erstellt, welche basierend auf einem festgelegten Baseline-Grenzwert die Fibrose-gefärbten Pixel quantifizierte und in Relation zum insgesamt abgebildeten Gewebe stellte. Bildabschnitte ohne Gewebe, Blutgefäße, Zellkerne und Artefakte wurden herausgerechnet, um den tatsächlichen Bildanteil des Herzgewebes herauszufiltern. Der gemessene Anteil an fibrotischem Gewebe wurde schließlich prozentual, auf den kalkulierten Gewebe-Anteil des Bildes bezogen. Jedes Bild wurde im Nachhinein manuell auf Übereinstimmung zwischen Ergebnis und visuellem Eindruck überprüft (**Abbildung 21**).

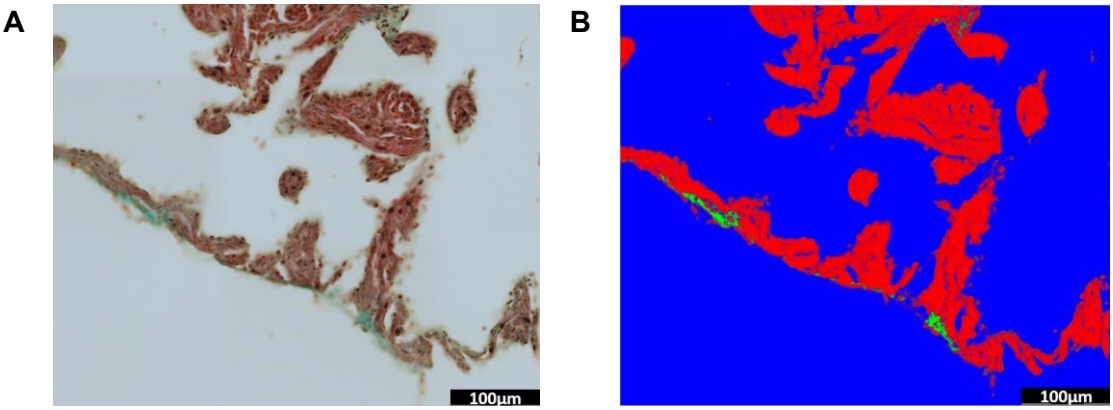


Abbildung 21. Fibrose-Quantifizierung in der Histologie

A Repräsentative Darstellung von fibrotischem Herzgewebe aus dem rechten Atrium mittels Masson-Goldner-Trichrom Färbung in 20x Vergrößerung. **B**, Fibrose-Quantifizierung mittels bioinformatischer Analyse. Herzmuskelgewebe, Blutgefäße, Artefakte und Erythrozyten (rot), fibrotisches Gewebe (grün), Hintergrund (blau).

2.2.2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung, sowie für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden Microsoft Excel sowie GraphPad PRISM Version 8.0.1 (GraphPad Software) verwendet. Für den Vergleich zweier unpaarer Gruppen wurde bei Annahme von gleicher Varianz ein ungepaarter Student‘s t-Test (miRNA-Assays, Histologie, qPCR) und bei Annahme von ungleicher Varianz ein Welch’s t-test (Körperliche Untersuchung, Luciferase-Assays) verwendet, um auf statistische Signifikanz zu testen. Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mittels One-way-ANOVA (Analysis of Variance). Die Verteilung des Auftretens von atrialen tachykarden Rhythmusstörungen in den Versuchsgruppen wurde mit dem Chi-Square-Test untersucht. Die statistischen Signifikanzniveaus wurden folgenderweise festgelegt: $p > 0,05$ als nicht statistisch signifikant (n.s.), $p \leq 0,05$ als (*), $p \leq 0,01$ als (**), $p \leq 0,001$ als (***) und $p \leq 0,0001$ als (****). Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des miR-144-5p Knockout-Mausmodells

3.1.1 Expression des miR-144/451-Clusters im Herzgewebe

Um zu validieren, dass der Knockout des miR-144/451-Clusters im kardialen Gewebe der transgenen Tiere vollständig vorlag, wurde die Expression der miR-144-5p sowie der miR-451-3p in allen vier Herzregionen (RA, LA, RV, LV) mittels qPCR untersucht.

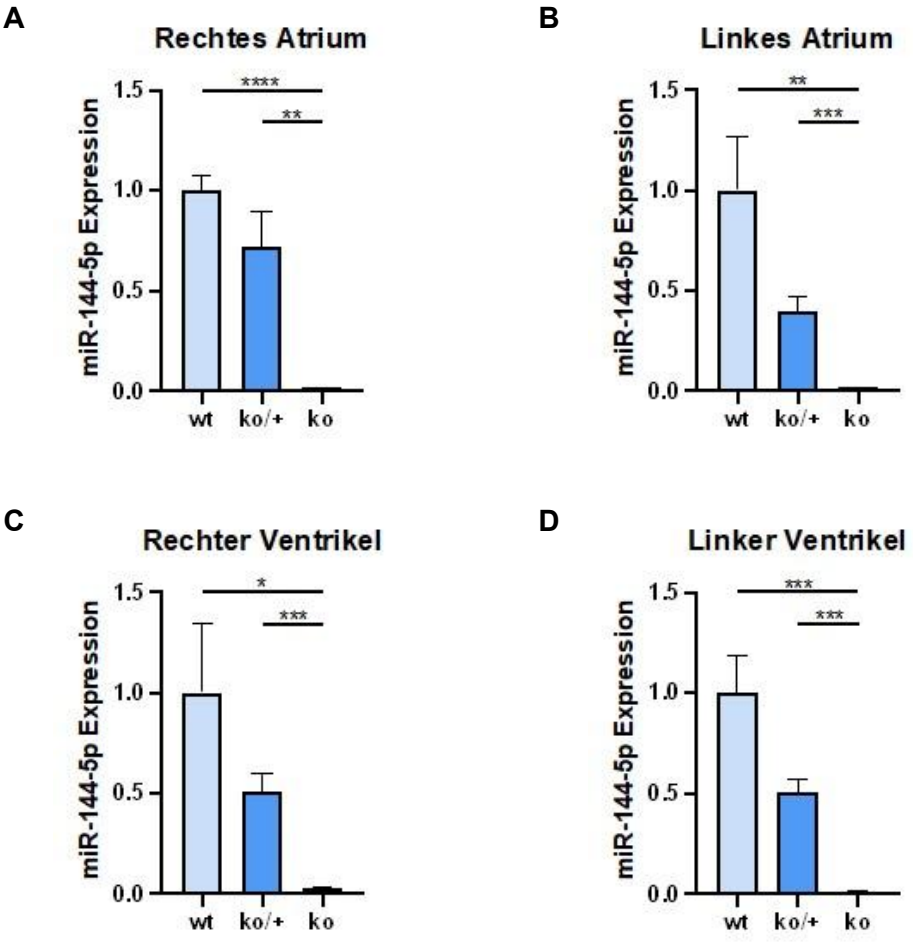


Abbildung 22. Relative Expression der miR-144-5p im Herzgewebe der Versuchstiere

Relative Quantifizierung der RNA-Expression der miR-144-5p im **A**, rechten Atrium (RA). **B**, linken Atrium (LA). **C**, rechten Ventrikel (RV). **D**, linken Ventrikel (LV). Die miRNA-Expression im Gewebe wurde auf die WT-Gruppe normiert. Ungepaarter t-test, *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001. ****p<0,0001. Gruppengröße aller Gruppen, n=5.

Bei den KO-Tieren konnte in keiner der Herzregionen eine Expression der miR-144-5p festgestellt werden (**Abbildung 22**, *RA*: KO 0,01 ± 0,00 vs. WT 1,00 ± 0,07 (p<0,0001). *LA*: KO 0,02 ± 0,00 vs. WT 1,00 ± 0,27 (p<0,01). *RV*: KO 0,03 ± 0,01 vs. WT 1,00 ± 0,35 (p<0,05). *LV*: KO 0,01 ± 0,00 vs. WT 1,00 ± 0,19 (p<0,001)). Die KO/+-Gruppe zeigte eine noch erhaltene Restexpression der miR-144-5p in allen vier Herzregionen (**Abbildung 22**, *RA*: KO 0,01 ± 0,00 vs. KO/+ 0,72 ± 0,18 (p<0,01). *LA*: KO 0,02 ± 0,00 vs. KO/+ 0,40 ± 0,07 (p<0,001). *RV:* KO 0,03 ± 0,01 vs. KO/+ 0,51 ± 0,09 (p<0,001). *LV:* KO 0,01 ± 0,00 vs. KO/+ 0,50 ± 0,07 (p<0,001)).

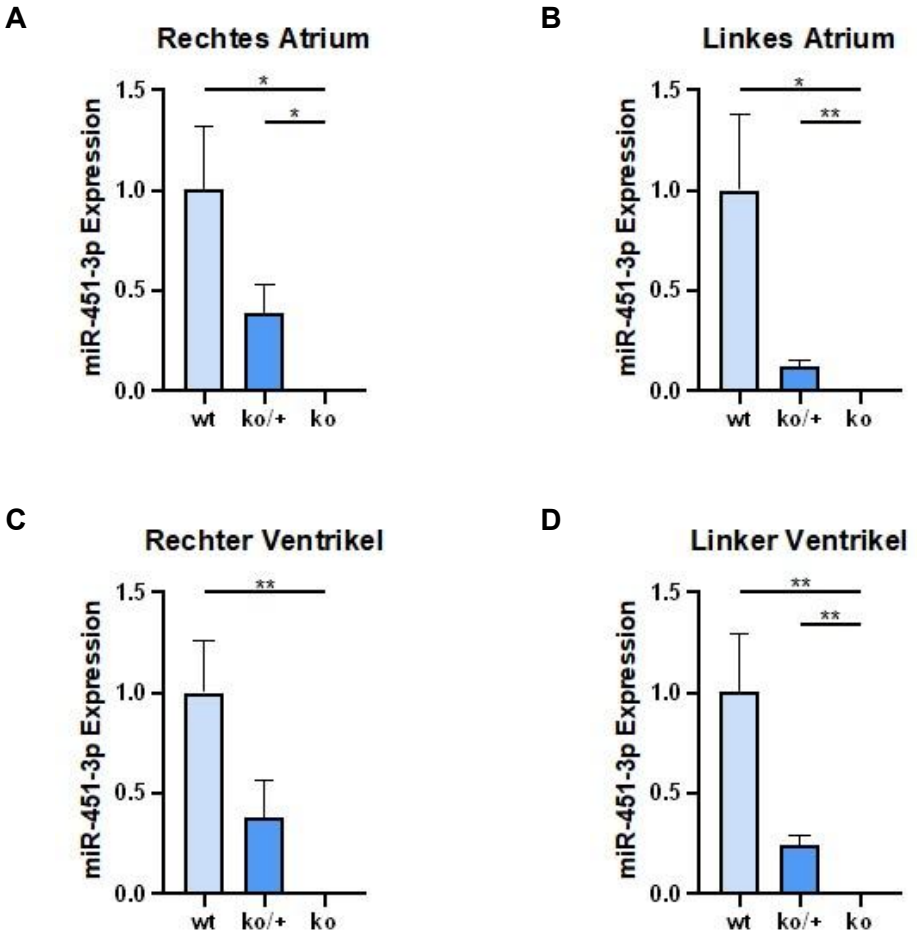


Abbildung 23. Relative Expression der miR-451-3p im Herzgewebe der Versuchstiere

Relative Quantifizierung der RNA-Expression der miR-451-3p im **A**, rechten Atrium (RA). **B**, linken Atrium (LA). **C**, rechten Ventrikel (RV). **D**, linken Ventrikel (LV). Die miRNA-Expression im Gewebe wurde auf die WT-Gruppe normiert. Ungepaarter t-test, *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001. ****p<0,0001. Gruppengröße aller Gruppen, n=5.

Auch die miR-451-3p war in keiner der vier Herzregionen der KO-Tiere exprimiert. Im Herzgewebe der KO/+-Gruppe war die Expression der miR-451-3p in allen Regionen noch teilweise erhalten (**Abbildung 23**, *RA:* KO 0,00 ± 0,00 vs. WT 1,00 ± 0,31 (p<0,05)

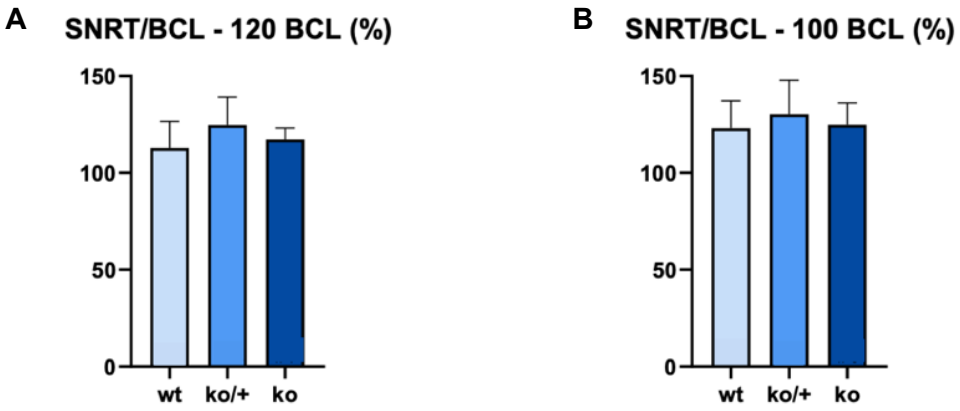
und KO 0,00 ± 0,00 vs. KO/+ 0,39 ± 0,14 (p<0,05). *LA:* KO 0,00 ± 0,00 vs. WT 1,00 ± 0,38 (p<0,05) und KO 0,00 ± 0,00 vs. KO/+ 0,12 ± 0,03 (p<0,01). *RV:* KO 0,00 ± 0,00 vs. WT 1,00 ± 0,25 (p<0,05) und KO 0,00 ± 0,00 vs. KO/+ 0,37 ± 0,18 (p=0,075). *LV:* KO 0,00 ± 0,00 vs. WT 1,00 ± 0,29 (p<0,05) und KO 0,00 ± 0,00 vs. KO/+ 0,24 ± 0,05 (p<0,05)).

3.1.2 Elektrophysiologische Untersuchung

Um die potenziellen Auswirkungen des Knockouts auf die kardiale Elektrophysiologie und Arrhythmogenität der Tiere zu evaluieren, wurde eine EPU inklusive Burst-Stimulationen *in vivo* durchgeführt.

3.1.2.1 Elektrophysiologische Basisparameter

Die Sinusknotenerholungszeit (SNRT) zwischen dem letzten Stimulus und der ersten intrinsischen Erregung des Vorhofs dient der Evaluation einer Sinusknoten-Dysfunktion.[142] Bei keiner der gemessenen Stimulations-Basiszykluslängen (BCL 120ms, BCL 100ms, BCL 80ms) war ein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar (**Abbildung 24**).



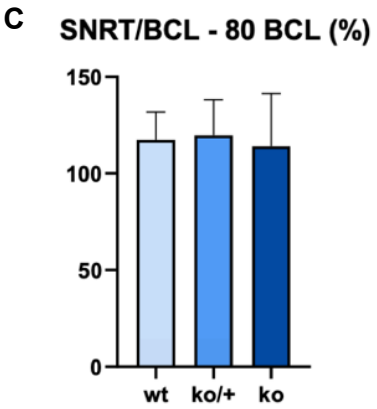


Abbildung 24. Verhältnis der Sinusknotenerholungszeit zur intrinsischen Basiszykluslänge in Prozent

Herzfrequenz-korrigierte Sinusknotenerholungszeit (SNRT) bei den Basiszykluslängen **A,** 120 ms. **B**, 100 ms. **C**, 80 ms. Ordinary One-way-ANOVA. Gruppengrößen: (wt) n=13, (ko/+) n=14, (ko) n=6.

Um den AV-Knoten und das His-Bündel auf Abnormalitäten bezüglich der Reizleitung zu überprüfen, wurden der Wenckebachpunkt (AV Wenckebach) sowie die Zykluslänge bestimmt, bei der zum ersten Mal eine stabile 2:1 Überleitung vom Atrium auf die Ventrikel stattfand (AV 2:1 Überleitung). Keine der Messungen ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 25)**.

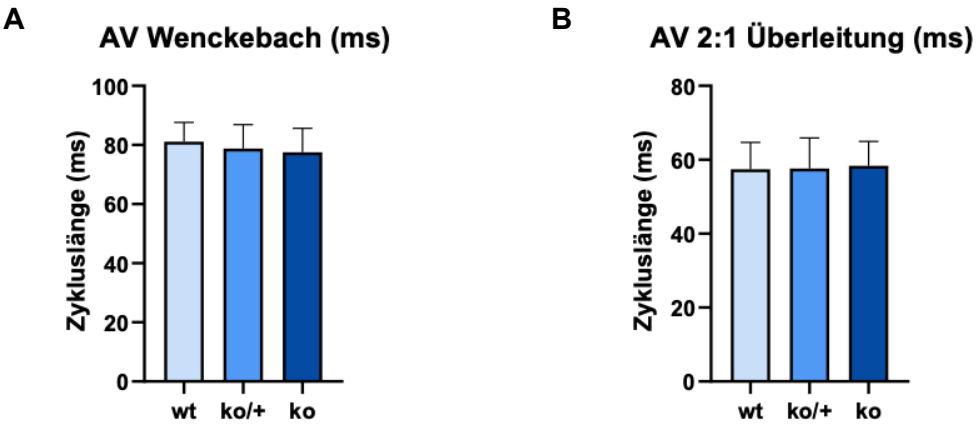


Abbildung 25. Leitungseigenschaften von AV-Knoten und His-Bündel

Zykluslänge in Millisekunden **A**, des AV-Wenckebach-Punktes. **B**, des Punktes der ersten stabilen 2:1-Überleitung vom Vorhof auf den Ventrikel. Ordinary One-way-ANOVA. Gruppengrößen: (wt) n=13, (ko/+) n=14, (ko) n=6.

Auch die retrograde Überleitungszeit vom Ventrikel auf die Atrien (VA Überleitung) kann zur Evaluation von Leitungsabnormitäten herangezogen werden. Es waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar (**Abbildung 26**).

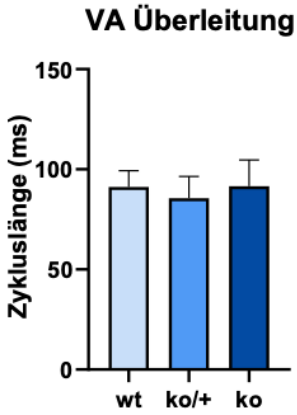
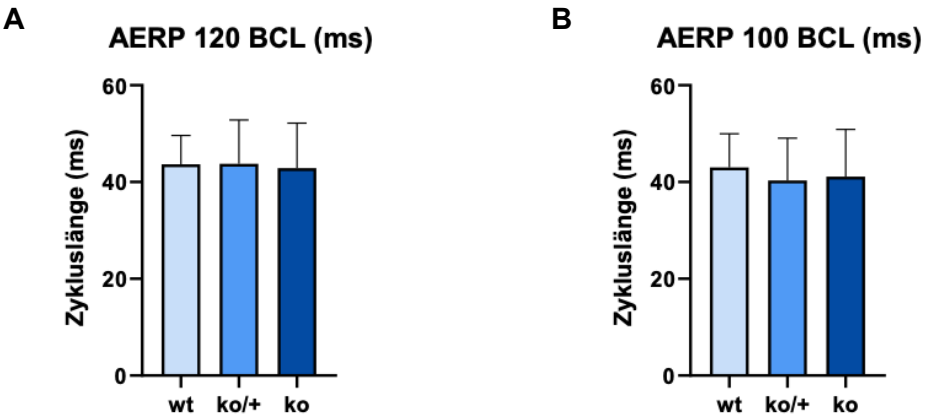


Abbildung 26. Retrograde Überleitung vom Ventrikel auf die Atrien

Erste Zykluslänge mit stabiler retrograder Überleitung auf die Atrien bei Ventrikel-Stimulation. Ordinary One-way-ANOVA. Gruppengrößen: (wt) n=13, (ko/+) n=14, (ko) n=6.

Da eine Veränderung der AERP mit einer erhöhten Suszeptibilität für VHF korreliert[135,143,144], wurde eine Messung der AERP bei verschiedenen BCL durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Refraktärzeiten der Zellen des AV-Knotens (AVERP) und der Ventrikel (VERP) erhoben. Bei keiner der Messungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (**Abbildung 27**).



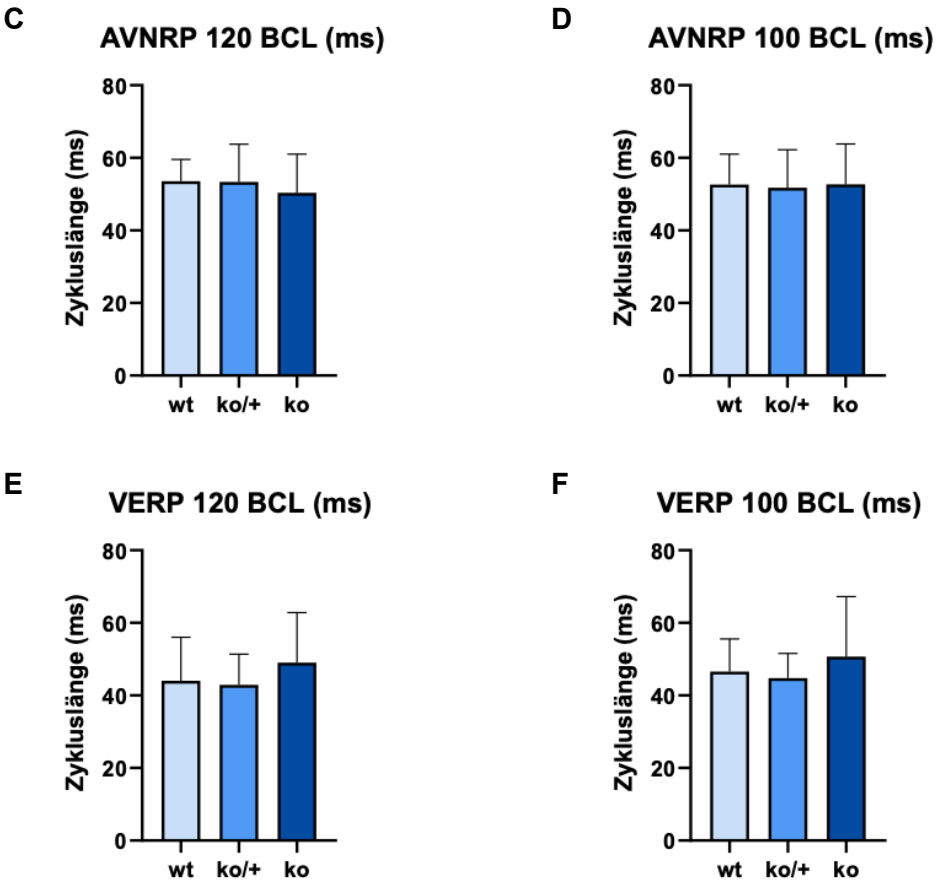


Abbildung 27. Refraktärzeiten in verschiedenen Herzregionen

Zykluslänge der effektiven Refraktärperiode in Millisekunden gemessen **A**, im Atrium bei BCL 120ms. **B**, im Atrium bei BCL 100ms. **C**, im AV-Knoten bei BCL 120ms. **D**, im AV-Knoten bei BCL 100ms. **E**, im Ventrikel bei BCL 120ms. **F**, im Ventrikel bei BCL 100ms. Ordinary One-way-ANOVA. Gruppengrößen: (wt) n=13, (ko/+) n=14, (ko) n=6.

3.1.2.2 Atriale tachykarde Rhythmusstörungen im miR-144-5p Knockout-Mausmodell

Zuletzt wurden die Versuchstiere mithilfe von Burst-Stimulationen auf ihre Vulnerabilität gegenüber atrialen tachykarden Rhythmusstörungen untersucht. Darunter wurden Episoden von VHF (AFib) (**Abbildung 28A**) und Vorhofflattern (AFlut) (**Abbildung 28B**) gezählt. Eine Arrhythmie wurde ab einer Dauer ≥ 2000 Millisekunden gewertet. Wenn ≥ 1 Burst-Stimulation eine Arrhythmie in einem Versuchstier hervorrief, galt VHF in diesem Tier als induzierbar.

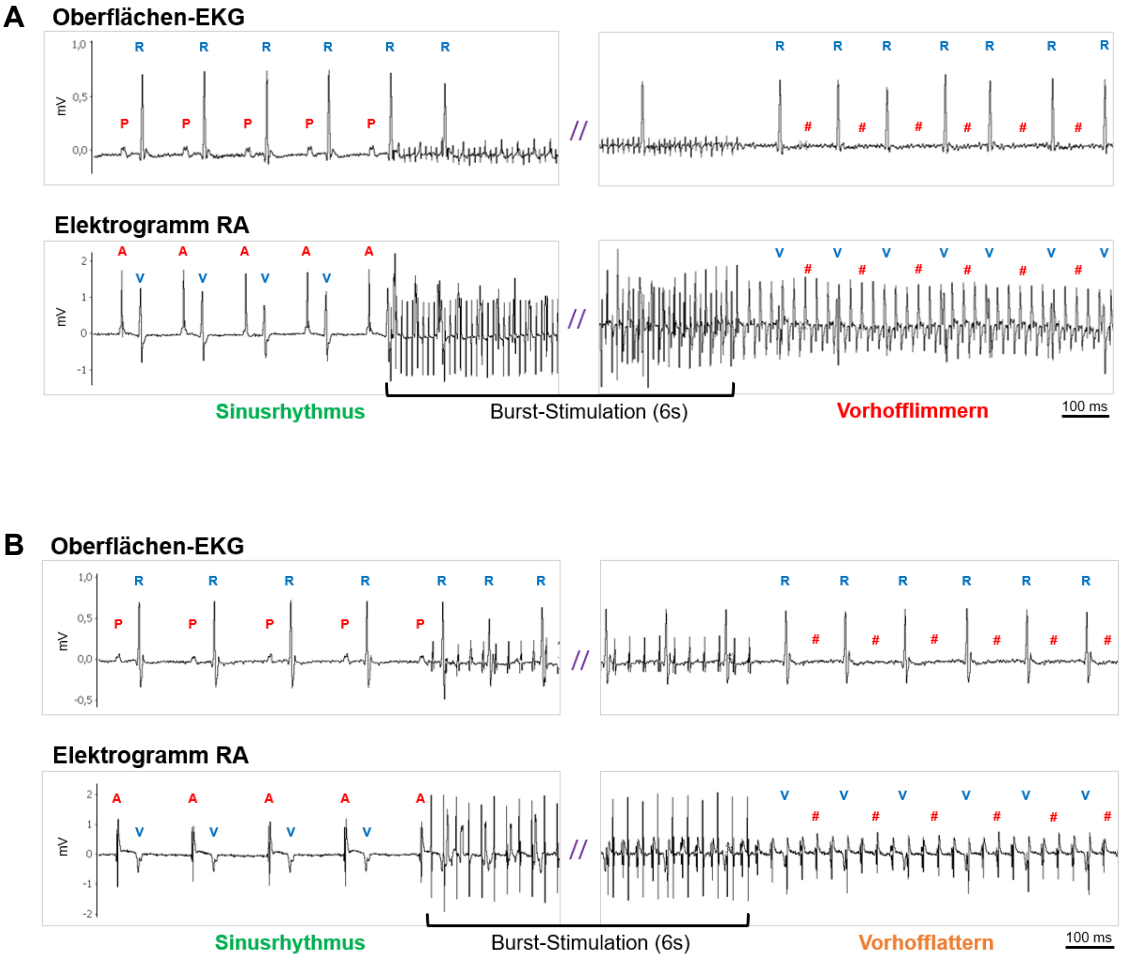


Abbildung 28. Repräsentative Aufzeichnung atrialer Arrhythmien nach Burst-Stimulation im Rahmen der EPU

P = P-Welle, R = R-Zacke, A = atriale elektrische Aktivität, V = ventrikuläre elektrische Aktivität, # = hochfrequente Vorhofaktivität. **A**, Aufzeichnung einer Vorhofflimmer-Episode nach sechs Sekunden langer Burst-Stimulation mit einer Zykluslänge von 10ms im Oberflächen-EKG (oben) und im intrakardialen Elektrogramm des rechten Atriums (unten) einer miR-144-5p Knockout-Maus. Vor der Burst-Stimulation ist ein normaler Sinusrhythmus zu verzeichnen. Nach dem letzten Stimulus sind im EKG keine P-Wellen und arrhythmische QRS-Komplexe mit unregelmäßigen RR-Abständen erkennbar. Im Elektrokardiogramm entspricht dies einer hochfrequenten Vorhofaktivität mit unregelmäßig übergeleiteter ventrikulärer elektrischer Aktivität. **B**, Aufzeichnung einer Vorhofflatter-Episode nach sechs Sekunden langer Burst-Stimulation mit einer Zykluslänge von 30ms. Wie bei VHF sind im EKG keine P-Wellen zu verzeichnen. Die QRS-Komplexe sind jedoch rhythmisch und mit regelmäßigen RR-Abständen erkennbar. Im Elektrokardiogramm entspricht dies einer hochfrequenten Vorhofaktivität mit regelmäßig übergeleiteter ventrikulärer elektrischer Aktivität. Die Frequenz der Vorhofaktivität ist niedriger als bei einer Vorhofflimmer-Episode.

Atriale tachykarde Rhythmusstörungen (AFib/AFlut) waren sowohl in der KO-Gruppe als auch in der KO/+-Gruppe signifikant häufiger induzierbar als in der WT-Gruppe (**Abbildung 29A,** WT 0 % vs. KO 2,1 % ($p<0,05$) und WT 0 % vs. KO/+ 1,5 % ($p<0,05$)). Der Anteil induzierbarer Tiere lag in der WT-Gruppe bei 0,0 %, in der KO/+-Gruppe bei 13,3 % und in der KO-Gruppe bei 25,0 % (**Abbildung 29B**).

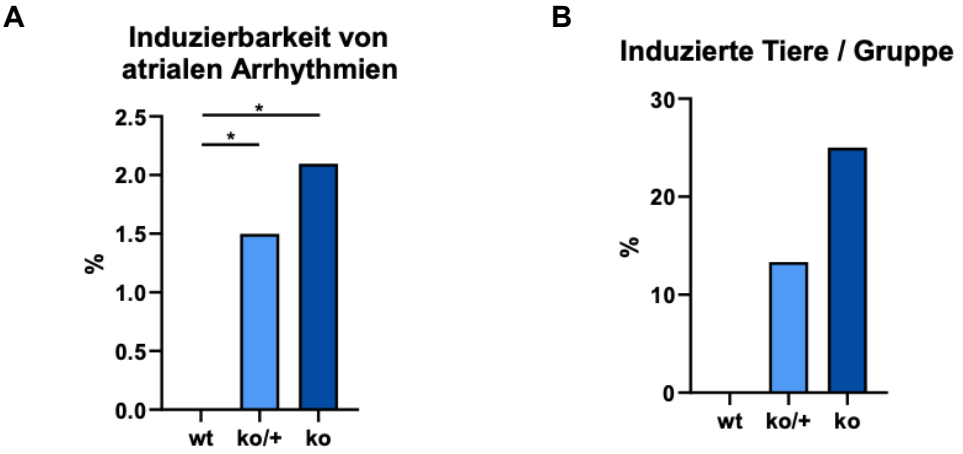


Abbildung 29. Induzierbarkeit von atrialen tachykarden Rhythmusstörungen nach Burststimulation im Rahmen der EPU

A, Anteil der Stimulationen, die in VHF (AFib) oder Vorhofflattern (AFlut) von > 2 Sekunden Dauer resultierten, an allen Burststimulationen in Prozent. Chi-square-Test, *$p<0,05$. **B**, Graphische Darstellung des Anteils der induzierten Tiere pro Gruppe in Prozent. Gruppengrößen: (wt) n=14, (ko/+) n=15, (ko) n=8.

3.1.3 Histologische Fibrose-Quantifizierung

Fibrotisches Gewebe dient als Indikator für strukturelles Remodeling.[58] Aus diesem Grund wurde das atriale (**Abbildung 31**) sowie das ventrikuläre Herzgewebe (**Abbildung 33**) der Versuchstiere mithilfe einer Masson-Trichrom-Färbung histologisch auf Fibrose untersucht.

Die KO-Gruppe zeigte gegenüber der WT-Gruppe in beiden Atrien einen signifikant höheren Anteil an fibrotischem Gewebe (**Abbildung 30A,** *rechtes Atrium* WT 0,94 ± 0,36 % vs. KO 3,30 ± 0,42% (p<0,0001) und **Abbildung 30B**, *linkes Atrium* WT 0,86 ± 0,24 % vs. KO 3,69 ± 0,65 % (p<0,05)). In der KO/+-Gruppe zeigte sich im Vergleich zur WT-Gruppe lediglich im rechten Atrium ein signifikant höherer Anteil an fibrotischem Gewebe (**Abbildung 30A,** WT 0,94 ± 0,36 % vs. KO/+ 2,62 ± 0,79 (p<0,01)). Im linken Atrium war ein Trend in dieselbe Richtung erkennbar.

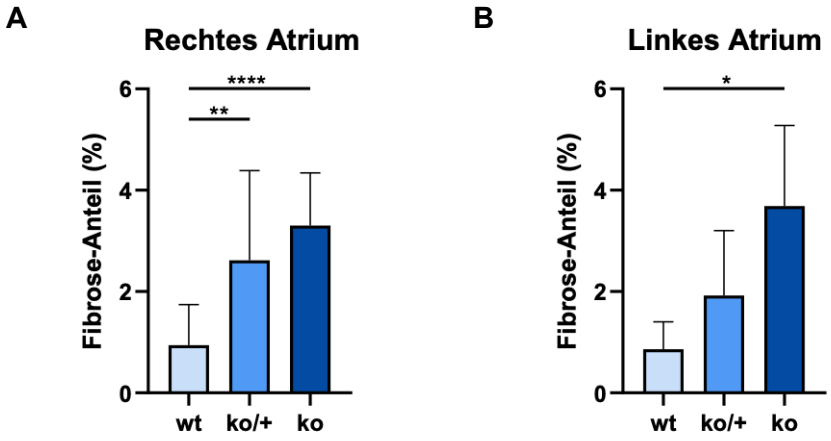


Abbildung 30. Histologische Fibrose-Quantifizierung in den Atrien

Anteil von fibrotischem Gewebe am **A**, gesamten rechtsatrialen Gewebe in Prozent. **B**, gesamten links-atrialen Gewebe in Prozent. Ungepaarter t-Test, *p<0,5. **p<0,01. ****p<0,0001. Gruppengrößen (wt) n=5, (ko/+) n=6, (ko) n=6.

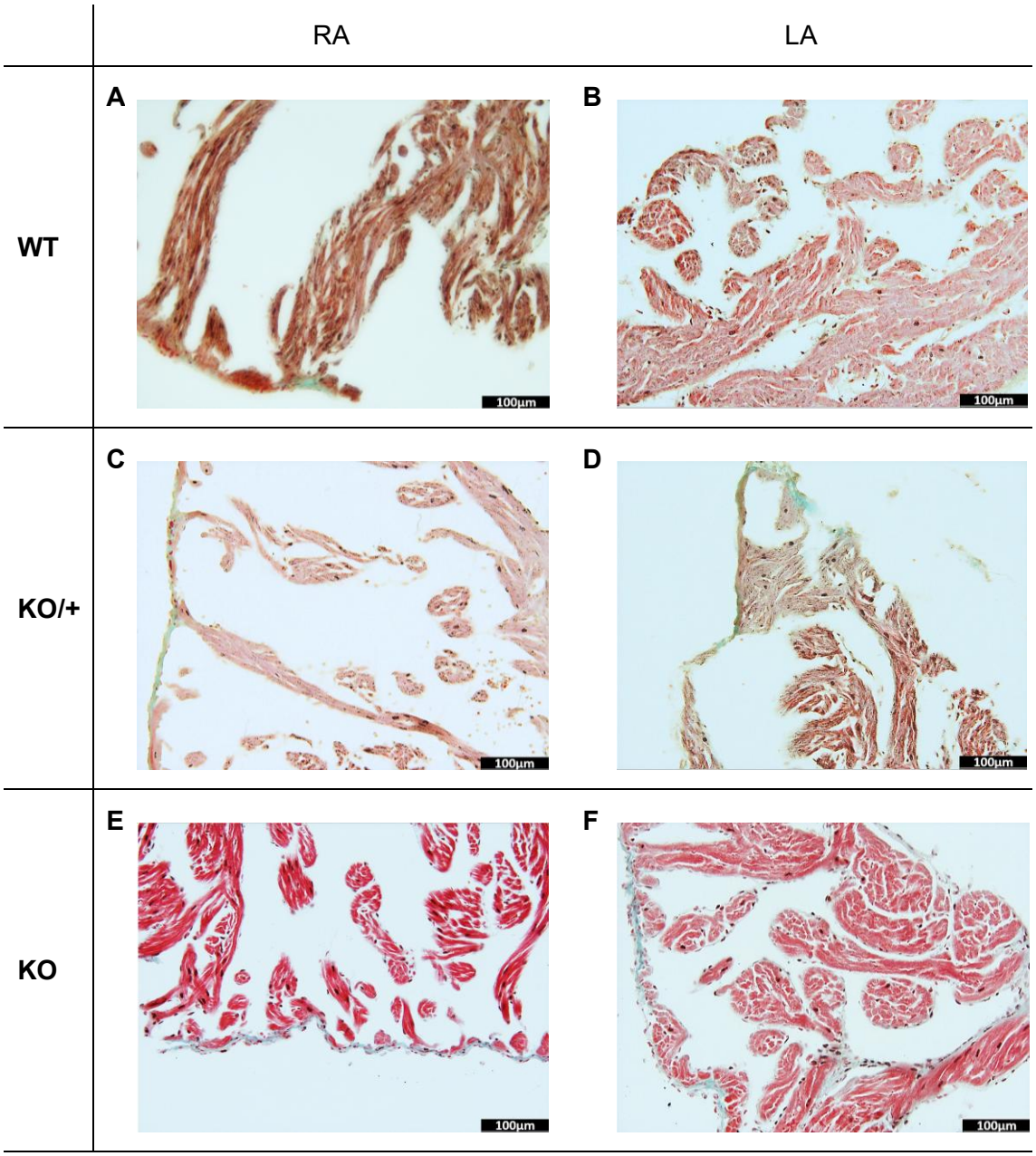


Abbildung 31. Repräsentative Darstellung von fibrotischem Herzgewebe in den Atrien

Repräsentative Darstellung von fibrotischem Herzgewebe in der Histologie mittels Masson-Goldner-Trichrom Färbung im **A**, rechten Atrium der WT-Gruppe. **B**, linken Atrium der WT-Gruppe. **C**, rechten Atrium der KO/+-Gruppe. **D**, linken Atrium der KO/+-Gruppe. **E**, rechten Atrium der KO-Gruppe. **F**, linken Atrium der KO-Gruppe.

Im rechten Ventrikel konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Im linken Ventrikel zeigte sich ausschließlich zwischen der WT- und der KO/+-Gruppe ein signifikanter Unterschied (**Abbildung 32B,** WT 0,07 ± 0,03 % vs. KO/+ 0,41 ± 0,14 % (p<0,05)).

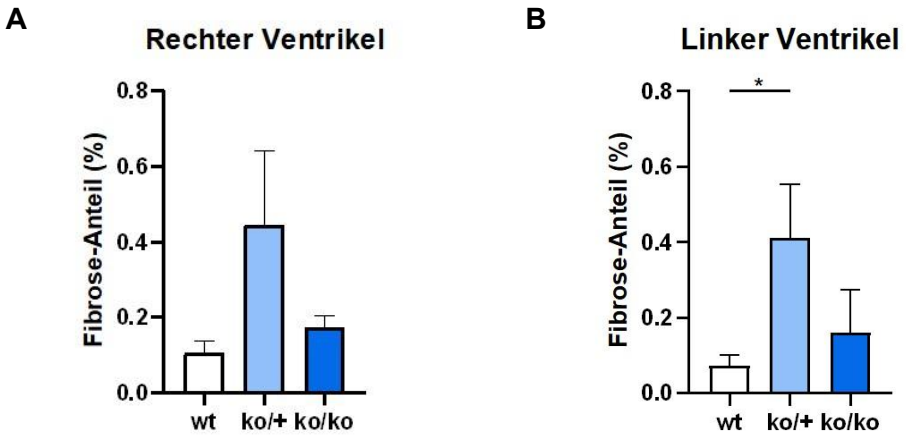


Abbildung 32. Histologische Fibrose-Quantifizierung in den Ventrikeln

Anteil von fibrotischem Gewebe am **A**, insgesamt untersuchten rechtsventrikulären Gewebe in Prozent. **B**, insgesamt untersuchten linksventrikulären Gewebe in Prozent. Ungepaarter t-Test, *p<0,5. Gruppengrößen (wt) n=6, (ko/+) n=5, (ko) n=4.

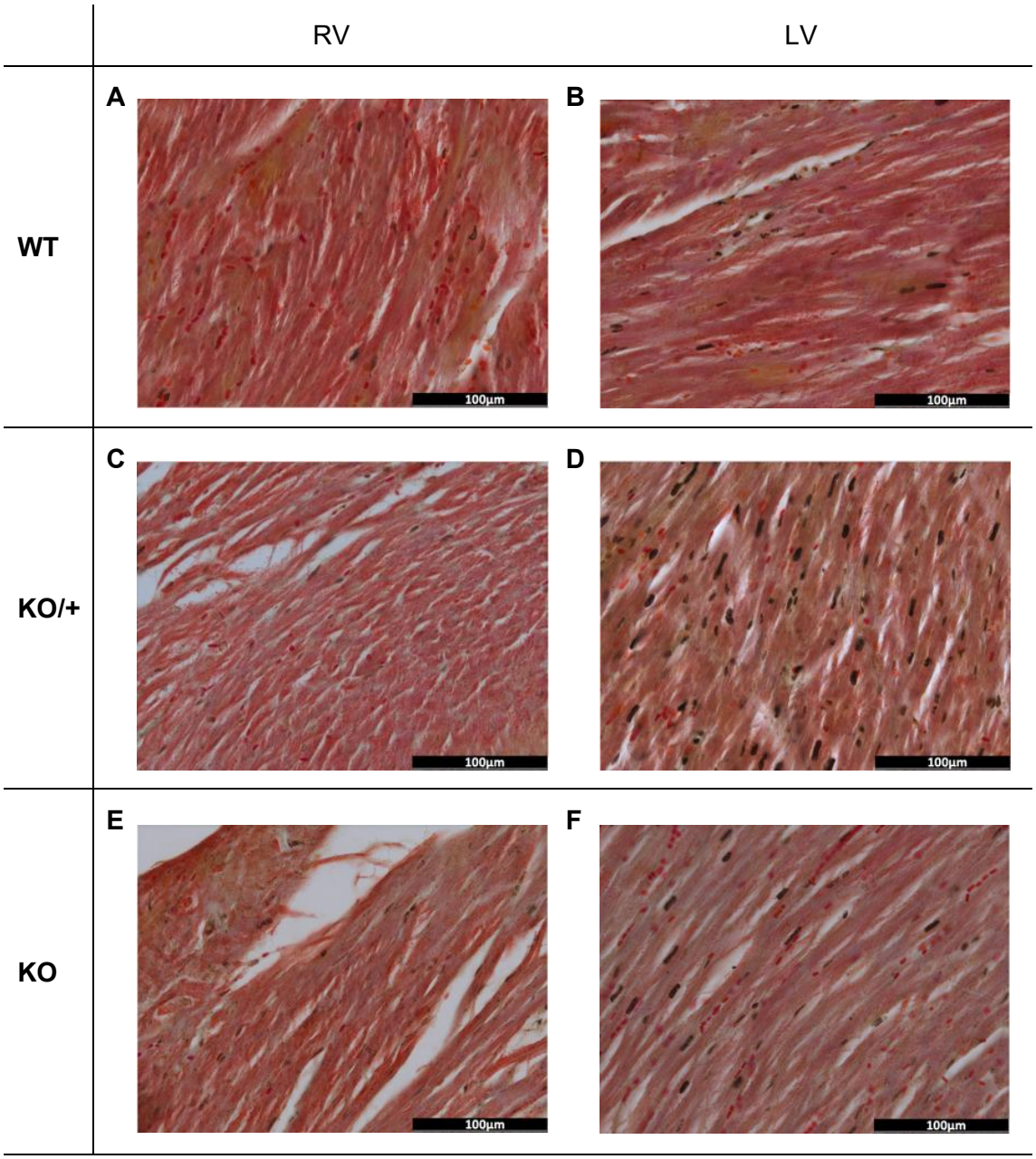


Abbildung 33. Repräsentative Darstellung von ventrikulärem Herzgewebe

Repräsentative Darstellung von fibrotischem Herzgewebe in der Histologie mittels Masson-Goldner-Trichrom Färbung im **A**, rechten Ventrikel der WT-Gruppe. **B**, linken Ventrikel der WT-Gruppe. **C**, rechten Ventrikel der KO/+-Gruppe. **D**, linken Ventrikel der KO/+-Gruppe. **E**, rechten Ventrikel der KO-Gruppe. **F**, linken Ventrikel der KO-Gruppe.

3.1.4 Echokardiographische Untersuchung

Die Echokardiographie dient als Goldstandard zur Quantifizierung der kardialen Physiologie und Funktion bei Mäusen.[145] Sie eignet sich insbesondere zur Feststellung von anatomischen und funktionellen Veränderungen am Herzen.[145] Bei den Versuchstieren wurde der interne Durchmesser des linken Atriums (LA) als Indikator für strukturelles Remodeling in den Atrien[58] bestimmt. Außerdem erfolgte eine Vermessung der Wanddicken auf ventrikulärer Ebene (IVS, PW). Aus den erhobenen Messwerten konnten daraufhin verschiedene Parameter für die Herzfunktion (SV, HZV, EF, FS) näherungsweise berechnet werden (siehe 2.1.5.2.).

3.1.4.1 Dilatation des linken Atriums

Der LA-Durchmesser der KO-Tiere war signifikant größer als in den anderen Gruppen (**Abbildung 34**, WT 1,65 ± 0,03 mm vs. KO 1,88 ± 0,10 mm (p<0,0001) und KO/+ 1,72 ± 0,02 mm vs. KO 1,88 ± 0,10 mm (p<0,0001)).

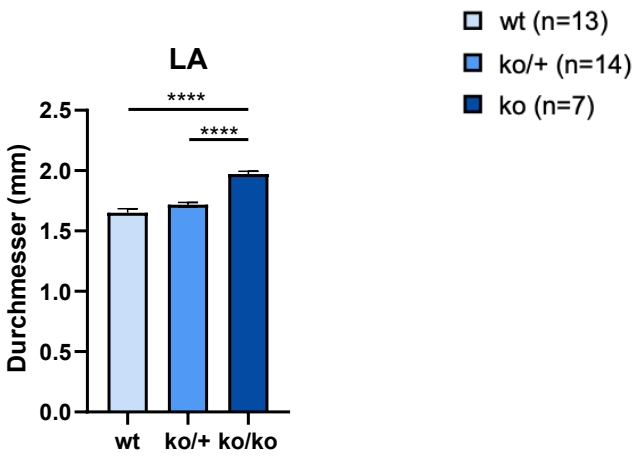


Abbildung 34. Echokardiographische Vermessung des linken Atriums

Echokardiographische Vermessung des Durchmessers des linken Atriums (LA) endsystolisch vor Klappenschluss in Millimetern (mm). Ordinary One-way-ANOVA, ****p<0,0001. Gruppengrößen (wt) n=13, (ko/+) n=14, (ko) n=7.

3.1.4.2 Myokardiale Wanddicken

Die echokardiographische Vermessung des interventrikulären Septums (IVS) sowie der posterioren Wand (PW) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 35A-D**).

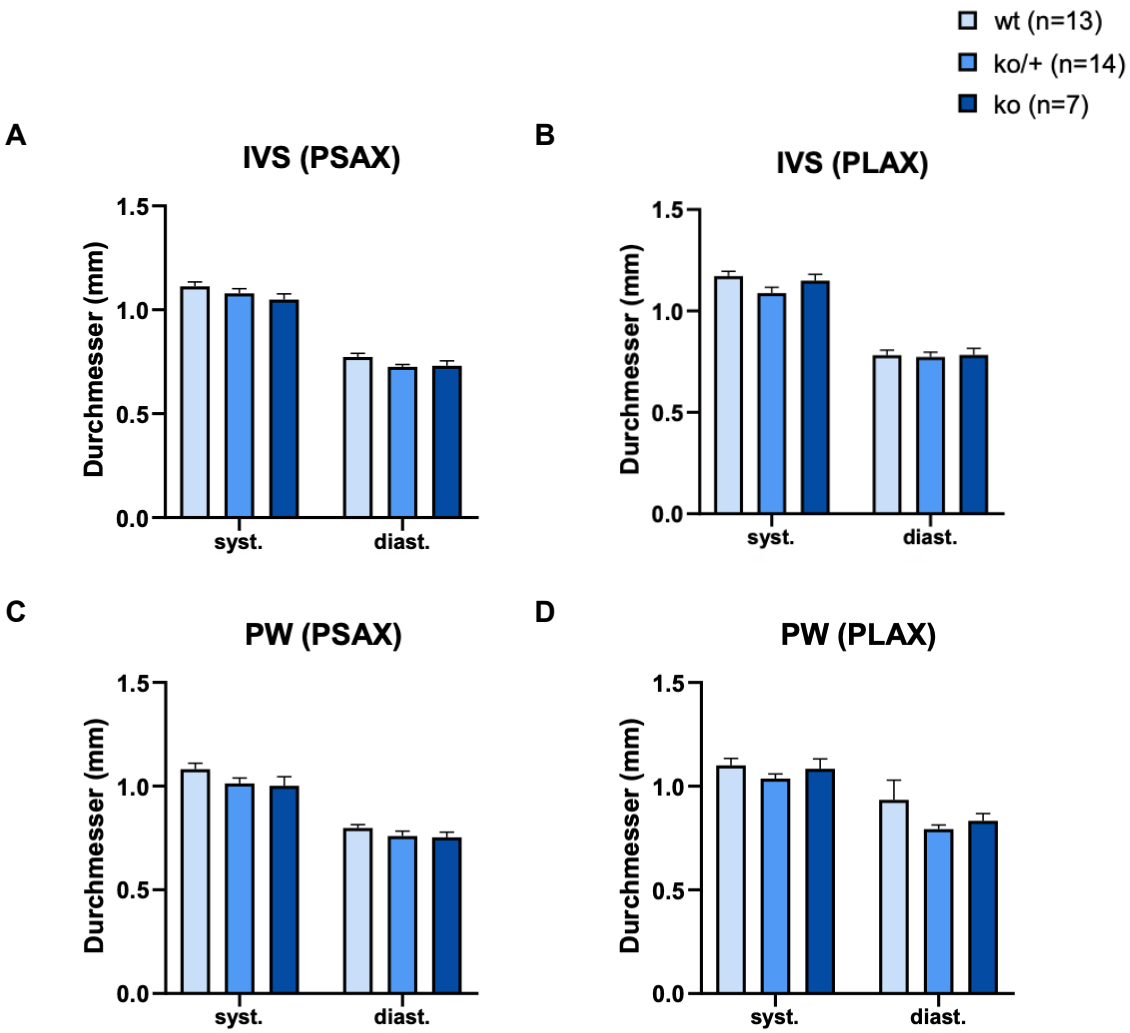
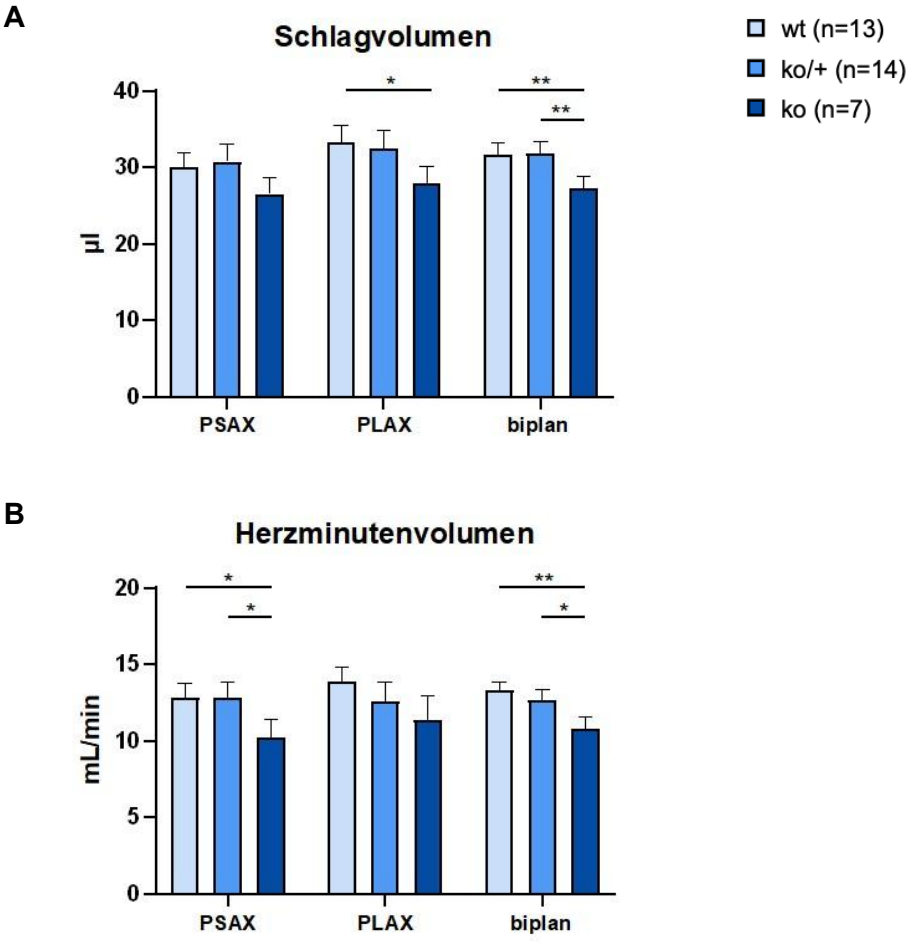


Abbildung 35. Echokardiographische Vermessung der myokardialen Wanddicken des linken Ventrikels

Echokardiographische Vermessung verschiedener Parameter in der kurzen (PSAX) und langen Achse (PLAX), während der Systole (syst.), sowie Diastole (diast.) in Millimetern (mm). **A**, Dicke des interventrikulären Septums (IVS) in der PSAX. **B**, Dicke des interventrikulären Septums (IVS) in der PLAX. **C**, Posteriore Wanddicke (PW) in der PSAX. **D**, Posteriore Wanddicke (PW) in der PLAX. Ordinary One-way-ANOVA. Gruppengrößen (wt) n=13, (ko/+) n=14, (ko) n=7.

3.1.4.3 Parameter der Herzfunktion

Das aus EDV und ESV berechnete Schlagvolumen (SV) der KO-Tiere war in der langen Achse (PLAX), sowie bei biplaner Betrachtung der Messwerte signifikant kleiner als das der WT-Tiere (**Abbildung 36A**: PLAX WT 33,26 ± 1,81 µl vs. KO 27,96 ± 2,39 µl ($p<0,05$). *Biplan* WT 31,68 ± 1,47 µl vs. KO 27,26 ± 1,50 µl ($p<0,01$)). Auch im Vergleich zur KO/+-Gruppe war das SV der KO-Gruppe bei biplaner Betrachtung signifikant kleiner (**Abbildung 36A**: *Biplan* KO/+ 31,64 ± 1,57 µl vs. KO 27,26 ± 1,23 µl ($p<0,01$)). Des Weiteren hatten Tiere der KO-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen ein signifikant geringeres Herzminutenvolumen (**Abbildung 36B**: *PSAX* WT 12,84 ± 0,53 ml/min vs. KO 10,20 ± 0,70 ml/min ($p<0,05$). KO/+ 12,81 ± 0,61 ml/min vs. KO 10,20 ± 0,70 ml/min ($p<0,05$). *Biplan* WT 13,35 ± 0,53 ml/min vs. KO 10,79 ± 0,80 ml/min ($p<0,01$). KO/+ 12,70 ± 0,67 ml/min vs. KO 10,79 ± 0,80 ml/min ($p<0,05$)). Es ließen sich keine Unterschiede hinsichtlich der Ejektionsfraktion nach Teichholz (EF) (**Abbildung 36C**) oder der fraktionellen Verkürzung (FS) des linken Ventrikels während der Systole (bezogen auf die Diastole) feststellen (**Abbildung 36D**).



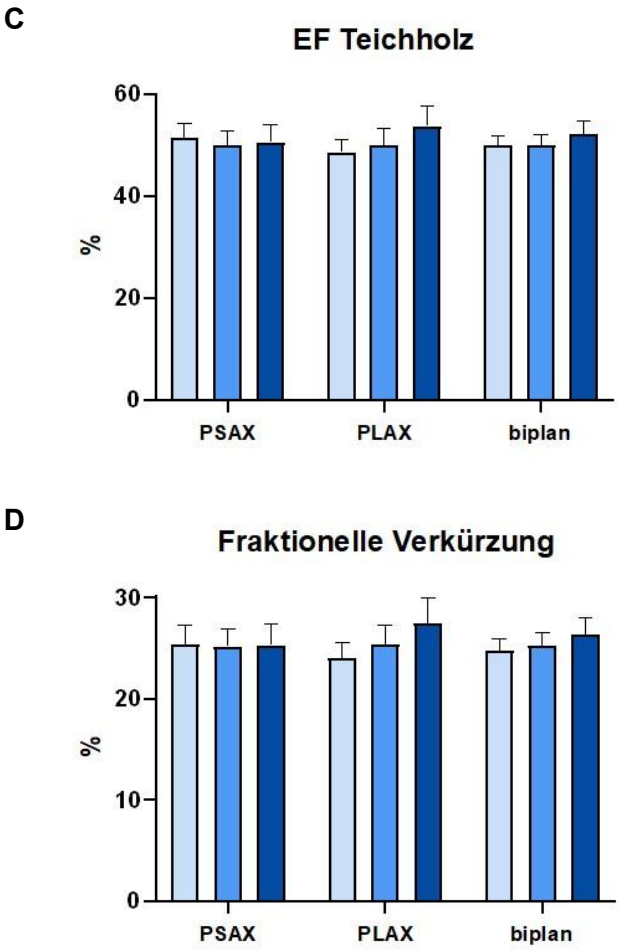


Abbildung 36. Parameter der Herzfunktion im Rahmen der Echokardiographischen Untersuchung

Die Parameter der Herzfunktion wurden durch echokardiographisch erhobene Messwerte berechnet. **A**, Schlagvolumen in Mikroliter. **B**, Herzminutenvolumen in Milliliter pro Minute. **C**, Ejektionsfraktion nach Teichholz in Prozent. **D**, Fraktionelle Verkürzung in Prozent. Ordinary One-way-ANOVA, *p<0,05. **p<0,01. Gruppengrößen (wt) n=13. (ko/+) n=14. (ko) n=7.

3.1.5 Elektrokardiographische Untersuchung

Die Elektrokardiographie dient als Goldstandard zur Untersuchung der kardialen Elektrophysiologie.[145] Auffälligkeiten können einen Hinweis auf Remodeling-Prozesse im Herzgewebe geben.[58] Die Messwerte der elektrokardiographischen Untersuchung (EKG) zeigten bei den Versuchstieren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 37**).

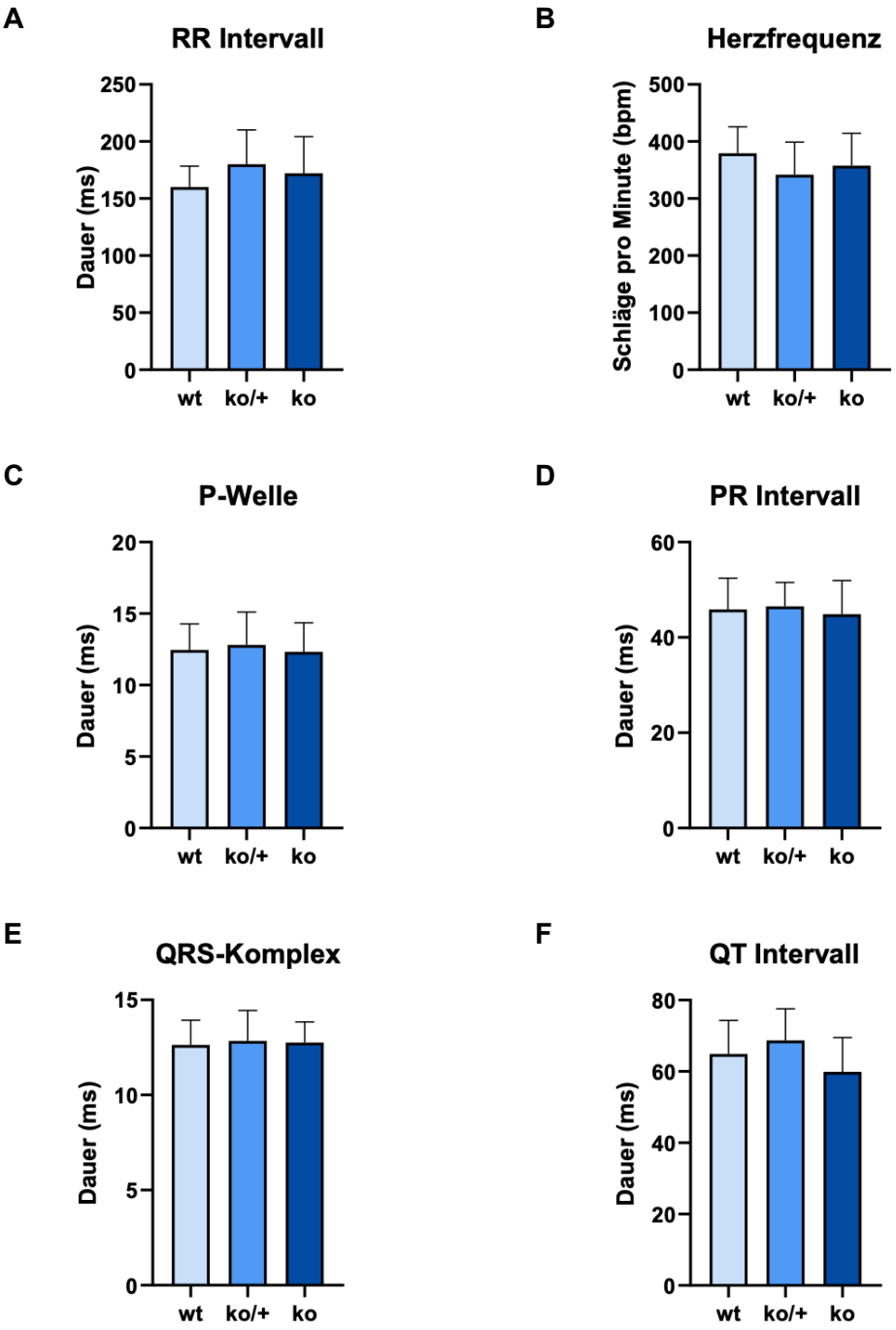


Abbildung 37. EKG-Parameter

A, RR-Intervall in Millisekunden. **B**, Herzfrequenz in *beats per minute,* errechnet aus dem RR-Intervall. **C**, Dauer der P-Welle in Millisekunden. **D**, Dauer des PR-Intervalls in Millisekunden. **E**, Dauer des QRS-Komplexes in Millisekunden. **F**, Dauer des QT-Intervalls in Millisekunden. Ordinary One-way-ANOVA. Gruppengrößen (wt) n=15, (ko/+) n=15, (ko) n=9.

3.1.6 Anatomische Parameter

Eine Genmanipulation bei Mäusen kann Einfluss auf die Entwicklung, sowie auf das Herz- und Körpergewicht nehmen.[146] Ein Unterschied hinsichtlich des Herzgewichts, insbesondere im Verhältnis zum Körpergewicht, kann außerdem erste Hinweise auf strukturelle Veränderungen im Herzgewebe geben.[147] Demzufolge wurde eine Erhebung von Herzgewicht, Körpergewicht und Tibialänge durchgeführt.

Die transgenen Mäuse wurden ohne strukturelle Defekte geboren und zeigten keine Auffälligkeiten hinsichtlich ihrer Entwicklung. Mäuse der WT-Gruppe zeigten im Vergleich zu den anderen Gruppen ein signifikant höheres Körpergewicht (**Abbildung 38A**, WT 28,89 ± 0,81 g vs. KO/+ 23,43 ± 1,07 g ($p<0,05$) und WT 28,89 ± 0,81 g vs. KO 23,05 ± 1,01 g ($p<0,01$)). Auch das Herzgewicht der WT-Gruppe erwies sich gegenüber den anderen Gruppen als signifikant schwerer (**Abbildung 38B**, WT 189,8 ± 6,7 mg vs. KO/+ 161,3 ± 8,3 mg ($p<0,05$) und WT 189,8 ± 6,7 mg vs. KO 161,1 ±1 0,3 mg ($p<0,05$)). Die Länge des Tibiaknochens sowie das Verhältnis des Herzgewichts zum Körpergewicht zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 38C-D).**

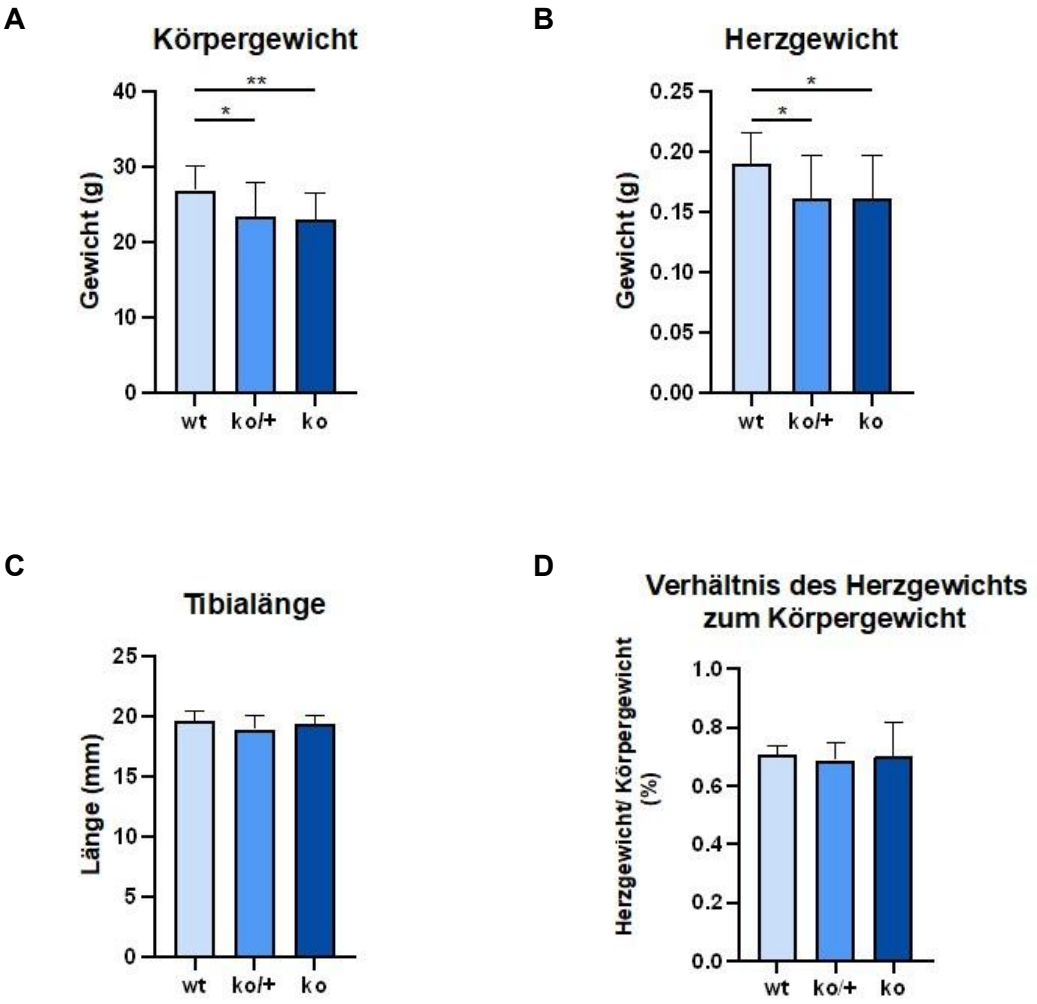


Abbildung 38. Daten der körperlichen Untersuchung

A, Körpergewicht gemessen in Gramm. **B**, Herzgewicht gemessen in Gramm. **C**, Tibialänge gemessen in Millimeter. **D**, Verhältnis des Herzgewichts zum Körpergewicht in Prozent. Welch's t-Test, *p<0,05, **p<0,01. (wt) n=15, (ko/+) n=18, (ko) n=11.

3.2 Experimentelle Validierung potenzieller Zielgene der miR-144-5p

Um potenzielle Bindestellen der miR-144-5p in den 3'UTR-Regionen des murinen Transkriptoms zu identifizieren, wurde zunächst eine *in silico* Zielgenanalyse mithilfe des Onlinetools *TargetScanMouse7.2* durchgeführt. Im Rahmen einer Literaturrecherche wurde die in **Tabelle 1** dargestellte Auswahl an potenziellen Zielgenen der miR-144-5p getroffen, welche im Folgenden genauer untersucht werden sollten.

Tabelle 1 – Auswahl an potenziellen Zielgenen der miR-144-5p

Die Gene wurden mithilfe einer *in silico* Zielgenanalyse mit TargetScanMouse7.2 ausgewählt.

Strukturelles Remodeling	
CDH11	Cadherin 11
MARCKS	Myristoyliertes Alanin-reiches Substrat der Protein Kinase C
RICTOR	Rapamycin-independent Companion des MTOR Komplexes 2
ROCK2	Rho-assoziierte Coiled-Coil-beinhaltende Protein-Kinase 2
TGFBR1	TGFβ_1-Rezeptor 1
WNT5A	Mitglied Nummer 5 der WNT-Familie
Transkriptionsfaktoren	
SMAD6	Mitglied Nummer 6 der Smad-Familie
Weitere	
NOS1AP	Nitric Oxide Synthase 1 Adaptor Protein
MBNL2	Muscleblind Like Splicing Regulator 2

Fett gedruckt = bereits im Rahmen anderer Studien validierte Zielgene der miR-144-5p

Mithilfe dualer Luciferase-Reporter Assays konnte daraufhin das relative Interaktionsausmaß zwischen der miR-144-5p und einer Zielgen-mRNA anhand der Stärke des Quenchs festgestellt werden (**Tabelle 2**). Die Luciferaseaktivität in den Zellen, welche mit cel-miR-39 transfiziert wurden konnte als 100% angenommen werden. Diese wurde als Maßstab zur Abbildung der relativen Aktivität der Renilla-Luciferase in den Zellen, welche mit dem miR-144-5p mimic transfiziert wurden, verwendet.

Tabelle 2 - Zielgenvalidierung mittels dualer Luciferase Reporter Assays

Die Interaktion zwischen der miR-144-5p und einer mRNA wurde anhand des Quenchs in % gemessen. Je höher der Quench, desto stärker die Interaktion.

	$Rluc_{miR\text{-}144\text{-}5p}$-Aktivität [Luminescense arbitrary units, A.U.]	**Quench** [%]	**p-Wert**
psiCHECK2 Negativkontrolle	1,03786344	-3,7993594	*n.s.*
psiCHECK2 Positivkontrolle	0,20221114	79,7713526	***<0,0001***
MBNL2	0,67812322	32,176199	***<0,0001***
SMAD6	0,6830563	31,062223	***0,0459***
MARCKS	0,71003088	28,9956295	***0,0002***
RICTOR	0,71491471	28,5007239	***0,0061***
CDH11	0,75698746	24,2095273	***0,0101***
WNT5A MRE1	0,78584532	21,3565295	***0,0093***
NOS1AP	0,8112197	18,7656949	***0,0044***
ROCK2	0,85319408	14,7016157	***0,0328***
WNT5A MRE2	0,92127272	7,88741101	***0,0343***
TGFBR1	0,90077145	9,4981247	*n.s.*

$Rluc_{miR\text{-}144\text{-}5p}$-Aktivität [A.U.] = ($Rluc_{miR\text{-}144\text{-}5p}$ / $Fluc_{miR\text{-}144\text{-}5p}$)/($Rluc_{cel\text{-}miR39\text{-}3p}$/$Fluc_{cel\text{-}miR39\text{-}3p}$)

Quench [%] = (1 – $Rluc_{miR\text{-}144\text{-}5p}$-Aktivität) x 100%

Die miR-144-5p zeigte die stärkste Interferenz mit der 3'UTR-Bindesequenz von MBNL2, gefolgt von SMAD6, MARCKS, RICTOR, CDH11, WNT5a MRE1, NOS1AP, ROCK2 und WNT5a MRE2. Lediglich bei TGFBR1 zeigte sich kein signifikanter Quench (**Tabelle 2** und **Abbildung 39)**.

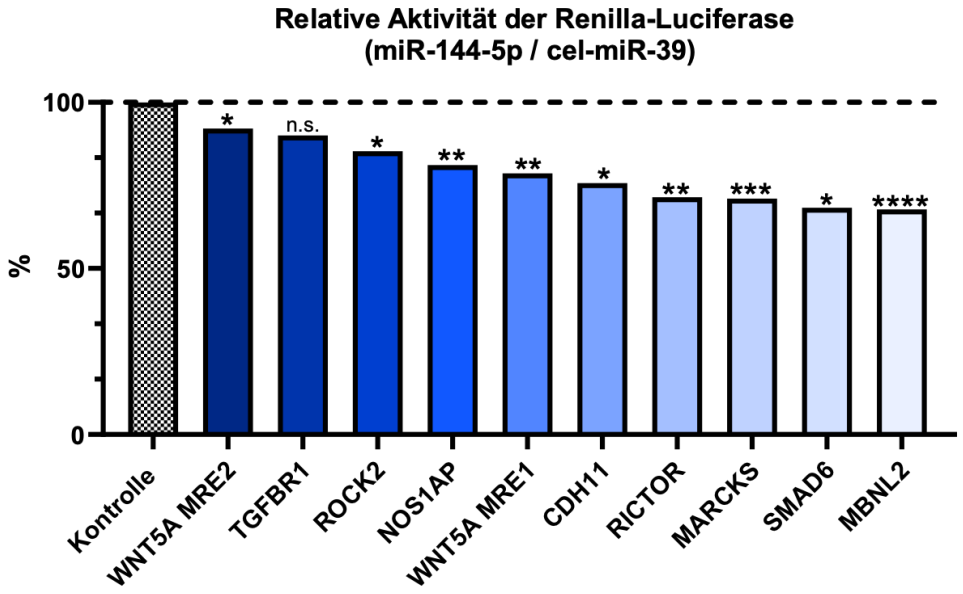


Abbildung 39. relative Aktivität der Renilla-Luciferase in Prozent

MRE = microRNA-Bindestelle (mircoRNA response Element). Für jedes Gen wurde die Kotransfektion mit dem jeweils spezifischen Plasmid und einer microRNA (miR-144-5p oder cel-miR-39) einzeln durchgeführt. Die Aktivität der Renilla-Luciferase wurde in allen mit cel-miR39-3p kotransfizierten Proben als 100% angenommen. Die Aktivität der Renilla-Luciferase in den Proben mit Kotransfektion der miR-144-5p konnte daran in Prozent gemessen werden. Welch's t-Test, *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001. ****p<0,0001. n=3

Die Ergebnisse wurden mithilfe einer Positivkontrolle mit perfekt komplementärer Bindestelle (**Abbildung 40A**), einer Negativkontrolle ohne Bindestelle (**Abbildung 40B**), sowie durch Sequenzierung verifiziert.

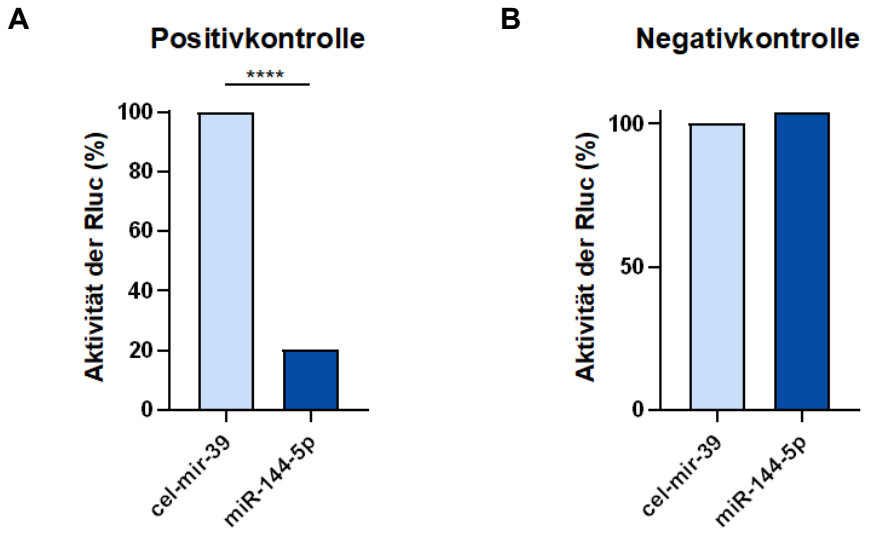


Abbildung 40. Positiv- und Negativkontrolle der dualen Luciferase Reporter Assays

Darstellung der relativen Aktivität der Renilla-Luciferase (Rluc) gemessen an der Aktivität der Firefly-Luciferase (Fluc) **A**, Positivkontrolle mit perfekt komplementärer Bindestelle in Prozent. B, Negativkontrolle mit Vektor ohne integrierte Bindestelle in Prozent. Welch's t-Test, ****p<0,0001. n=3.

3.3 mRNA-Expressionsanalyse mittels qPCR

Da die Interaktion zwischen einer microRNA und der entsprechenden Zielgen-mRNA zum Abbau dieser führen kann[85,87], wurde eine Quantifizierung der Zielgen-mRNA aus murinem Herzgewebe mittels qPCR durchgeführt. Eine verminderte Expression kann auf das Ausmaß des miRNA-bedingten mRNA-Abbaus hinweisen.

Die mRNA-Expression von WNT5a war im RA der KO-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöht (**Abbildung 41A** KO 2,19 ± 0,11 vs. WT 1,00 ± 0,23 ($p<0,01$) und KO 2,19 ± 0,11 vs. KO/+ 1,36 ± 0,26 ($p<0,05$)). Im LA war die Expression bei den KO-Tieren im Vergleich zur WT-Gruppe signifikant vermindert (KO 0,49 ± 0,11 vs. WT 1,00 ± 0,08 ($p<0,01$)).

Die mRNA-Expression von NOS1AP war im RA der KO-Tiere gegenüber der WT- sowie der KO/+-Gruppe signifikant erhöht (**Abbildung 41B** KO 3,24 ± 0,49 vs. WT 1,0 ± 0,20 ($p<0,01$) und KO 3,24 ± 0,49 KO/+ 1,54 ± 0,27 ($p<0,05$). Auch im LA der KO-Gruppe war die Expression gegenüber der WT-Gruppe signifikant gesteigert (KO 2,86 ± 0,14 vs. WT 1,00 ± 0,20 ($p<0,001$)).

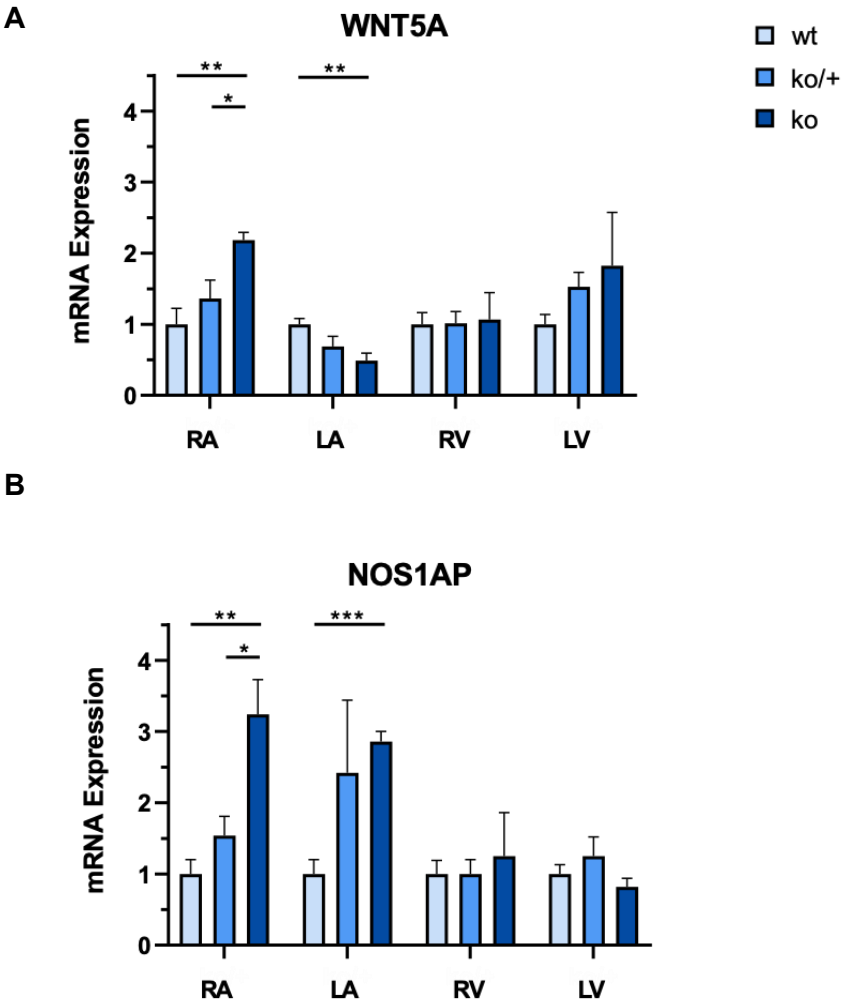
Die mRNA-Expression von SMAD6 war im RA der KO-Tiere im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöht (**Abbildung 41C** KO 2,99 ± 0,57 vs. WT 1,00 ± 0,12 ($p<0,01$) und KO 2,99 ± 0,57 vs. KO/+ 1,19 ± 0,32 ($p<0,05$)).

Die mRNA-Expression von TGFBR1 war im RA in der KO-Gruppe signifikant höher als in den anderen Gruppen (**Abbildung 41D** KO 1,97 ± 0,39 vs. WT 1,00 ± 0,18 ($p<0,05$) und KO 1,97 ± 0,39 vs. KO/+ 1,03 ± 0,18 ($p<0,05$)).

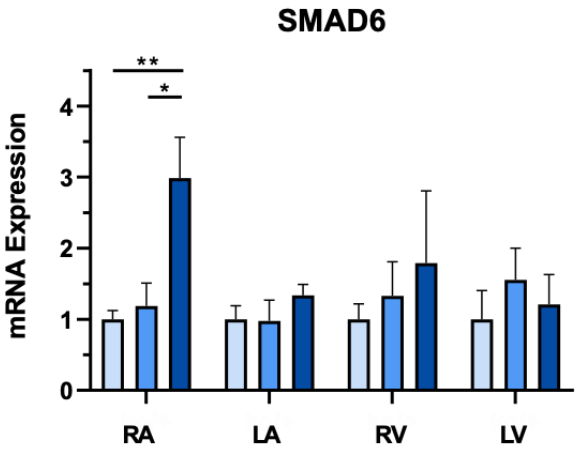
Die mRNA-Expression von MARCKS war im LV der KO-Gruppe und der KO/+-Gruppe signifikant höher als in der WT-Gruppe (**Abbildung 41E** KO 2,02 ± 0,40 vs. WT 1,00 ± 0,05 ($p<0,05$) und KO/+ 1,84 ± 0,23 vs. WT 1,00 ± 0,05 ($p<0,01$)).

Die mRNA-Expression von CDH11 war im LV der KO-Gruppe signifikant geringer als in der WT-Gruppe (**Abbildung 41F** WT 1,00 ± 0,02 vs. KO 0,77 ± 0,09 ($p<0,05$)).

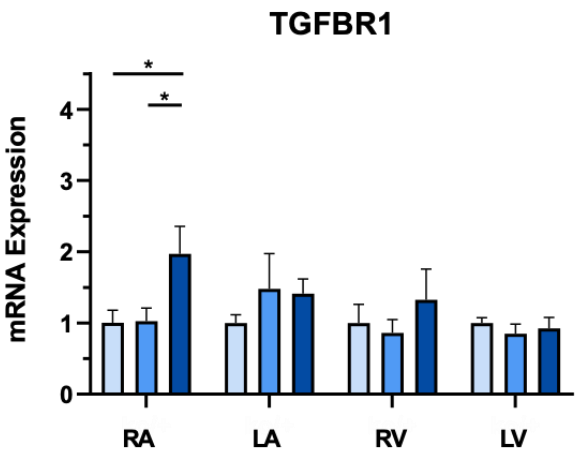
Es waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der mRNA-Expression von RICTOR, Rock2 und Mnbnl2 zwischen den Gruppen feststellbar (**Abbildung 41G-I)**.



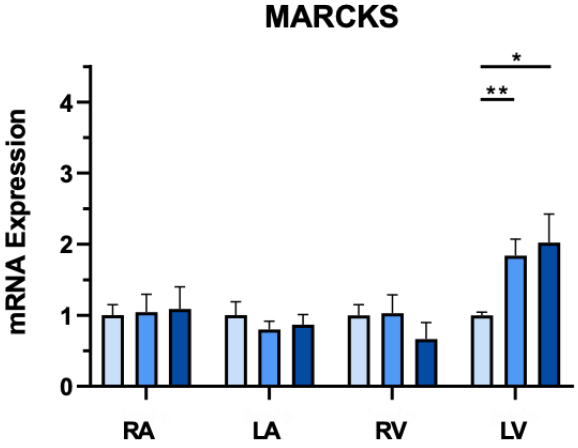
C


SMAD6
mRNA Expression
0
1
2
3
4
**
*
RA
LA
RV
LV

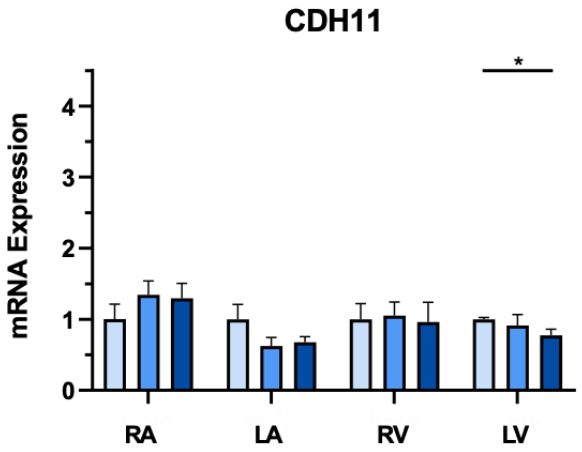
D


TGFBR1
mRNA Expression
0
1
2
3
4
*
*
RA
LA
RV
LV

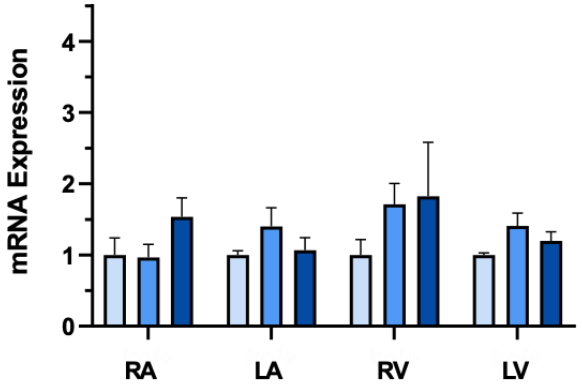
E


MARCKS
mRNA Expression
0
1
2
3
4
*
**
RA
LA
RV
LV

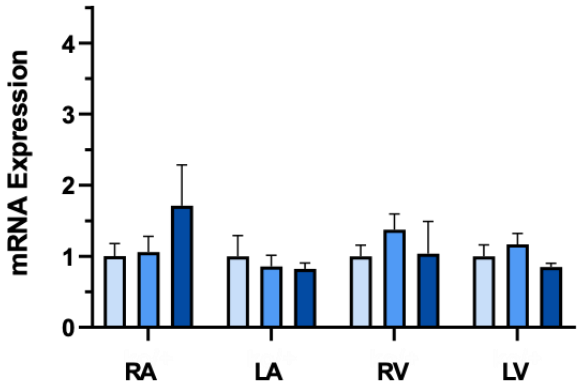
F


CDH11
*
mRNA Expression
0
1
2
3
4
RA
LA
RV
LV

G


RICTOR
mRNA Expression
0
1
2
3
4
RA
LA
RV
LV

H


ROCK2
mRNA Expression
0
1
2
3
4
RA
LA
RV
LV

I

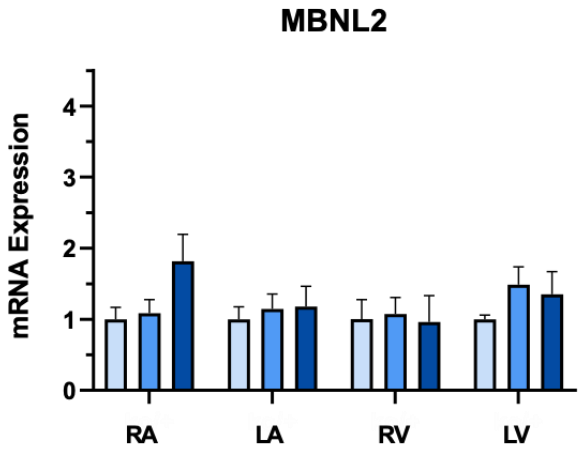


Abbildung 41. Relative Expression der miR-144-5p Zielgene auf mRNA-Ebene

Y-Achse = Vielfaches der mRNA-Expression des Housekeeping-Gens (fold change). Normierung aller Werte auf das Housekeeping-Gen GAPDH. **A**, WNT5A. **B**, NOS1AP. **C**, SMAD6. **D**, TGFBR1. **E**, MARCKS. **F**, CDH11. **G,** RICTOR, **H**, ROCK2. **I**, MBNL2. Ungepaarter t-Test, *p<0,05. **p<0,01. Gruppengrößen n=3-5.

4. Diskussion

4.1 Der kardiale Phänotyp im miR-144-5p Knockout-Mausmodell

Um die Funktion eines Gens zu entschlüsseln, hat es sich bewährt die normale Genexpression zu manipulieren und den daraus resultierenden Phänotyp am Modellorganismus zu studieren.[148] Obwohl sich die Bedeutung der miR-144-5p im Zusammenhang mit VHF bereits seit einigen Jahren immer deutlicher abzeichnet, ist dies die erste Arbeit, die sich mit der Charakterisierung eines miR-144-5p Knockout-Mausmodells in Bezug auf VHF befasst. Nachdem mittels qPCR der erfolgreiche Knockout der miR-144-5p im Herzgewebe der transgenen Tiere nachgewiesen war, interessierten uns die genauen Effekte auf den Organismus. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf die kardiale Elektrophysiologie und Arrhythmogenität der Tiere sowie auf strukturelles Remodeling im Herzgewebe gelegt.

4.1.1 Gesteigerte Suszeptibilität für atriale tachykarde Rhythmusstörungen

Die zentrale Fragestellung hinsichtlich der Effekte einer Herabregulation der miR-144-5p im Kontext von VHF lautete, ob die transgenen Tiere eine gesteigerte Suszeptibilität für atriale tachykarde Rhythmusstörungen aufwiesen. Anhand der Ergebnisse der EPU konnte diese Frage eindeutig mit „ja“ beantwortet werden. In der WT-Gruppe konnte durch elektrische Burst-Stimulation weder VHF noch Vorhofflattern induziert werden. Im Gegensatz dazu zeigten KO-Tiere sowie KO/+-Tiere eine signifikant gesteigerte Anfälligkeit für atriale tachykarde Rhythmusstörungen, was mit den Resultaten der Pilotstudie übereinstimmte (vgl. Kapitel 1.5.2). In der KO-Gruppe konnte bei 25% aller Tiere VHF oder Vorhofflattern induziert werden. In der KO/+-Gruppe lag der Anteil mit 13,3% etwa bei der Hälfte.

Die Episoden der Versuchstiere waren in der Regel kurz und selbstlimitierend, doch auch in anderen Studien am Mausmodell konnte eine spontane und abrupte Terminierung von VHF-Episoden verzeichnet werden.[125,149] Wakimoto et al. interpretierten dieses Phänomen als gesteigerte Reentry-Aktivität.[125] Beim Reentry trifft ein ektoper Reiz, als Trigger, auf ein vulnerables Substrat.[25] Da der Trigger im Rahmen der EPU durch die elektrische Stimulation geschaffen wird, eignet sich diese Untersuchungsmethode insofern vorrangig zur Prüfung auf ein vulnerables Substrat. Ein derartiges Substrat wurde von Wakimoto et al. durch eine medikamentöse Parasympathikus-Stimulation

erzeugt.[125] Bei den untersuchten miR-144-5p Knockout-Tieren konnten atriale tachykarde Rhythmusstörungen jedoch auch ohne Parasympathikus-Stimulation induziert werden, woraus sich ableiten lässt, dass die Herabregulation der miR-144-5p ein vulnerables Substrat für atriale tachykarde Rhythmusstörungen hervorgerufen haben muss. Für die Ausprägung eines solchen vulnerablen Substrats bei VHF sind elektrische und strukturelle Remodeling-Prozesse von entscheidender Bedeutung.[58] Diese führen zu längeren Reizleitungswegen, einer langsameren Leitungsgeschwindigkeit, sowie zu strukturellen Hindernissen, welche wiederum die Wahrscheinlichkeit für Reentrys erhöhen.[25,66]

Auch bei Patienten mit VHF lässt sich sowohl im Blut als auch im Herzgewebe eine reduzierte Expression der miR-144-5p nachweisen (vgl. Kapitel 1.5.1). Demzufolge ist anzunehmen, dass eine Herabregulation dieser miRNA nicht nur im Mausmodell, sondern auch im menschlichen Organismus einen Einfluss auf die Vulnerabilität gegenüber atrialen Arrhythmien ausüben könnte. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass die Art und Ausprägung der im Rahmen der EPU beobachteten Episoden nicht mit dem klinischen Bild von VHF beim Menschen gleichgesetzt werden darf. Die geringe Herzgröße der Mäuse erschwert die langfristige Aufrechterhaltung von VHF-Episoden, sodass diese eher dem klinischen Bild von paroxysmalem VHF entsprechen.[118]

Es ist außerdem zu bedenken, dass die Tiere für die Dauer der Versuche dem Einfluss der Anästhesie unterlagen. Bekanntermaßen haben verschiedene Anästhesie-Verfahren Auswirkungen auf die kardiale Elektrophysiologie und können Untersuchungsergebnisse somit verfälschen.[150] Das von uns verwendete Isofluran/Fentanyl-Regime hat jedoch nachweislich einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Herzfrequenz und die Funktion von Sinus- und AV-Knoten.[151] Isofluran besitzt erwiesenermaßen sogar protektive Eigenschaften bezüglich der Induzierbarkeit von VHF.[152] Dass die Tiere der KO-Gruppe trotz einer Isofluran-Narkose atriale tachykarde Rhythmusstörungen entwickelten, verdeutlicht demnach die proarrhythmogenen Effekte einer Herabregulation der miR-144-5p. Hinzu kommt, dass WT-Tiere unter dem Einfluss der Anästhesie keinerlei Arrhythmien entwickelten, sodass ein potenzieller Einfluss des Isofluran/Fentanyl-Regimes als vernachlässigbar betrachtet werden kann.

4.1.2 Strukturelles Remodeling

Es ist bekannt, dass strukturelle Remodeling-Prozesse bei VHF maßgeblich zur Entstehung eines arrhythmogenen Substrats beitragen.[67,68] Insbesondere Veränderungen in den Vorhöfen spielen hierbei eine entscheidende Rolle.[66] Der

Phänotyp bei VHF ist typischerweise durch eine atriale Fibrose sowie durch eine Dilatation des linken Atriums charakterisiert.[66] Um die potenziellen Effekte des miR-144-5p Knockouts im Kontext von strukturellem Remodeling bei unseren Versuchstieren zu untersuchen, wurde eine histologische Untersuchung des murinen Herzgewebes sowie eine echokardiographische Vermessung des linken Vorhofs *in vivo* durchgeführt.

4.1.2.1 Atriale Fibrose

Im Zuge der histologischen Untersuchung konnte bei miR-144-5p Knockout-Tieren eine signifikante Fibrose im atrialen Herzgewebe festgestellt werden. Im Vergleich zur WT-Gruppe wies die KO-Gruppe einen signifikant höheren Grad der Fibrosierung in beiden Atrien auf. Im RA betrug der Fibrose-Anteil 3,30±0,42%, was etwa einer 3,5-fach stärkeren Ausprägung im Vergleich zu WT-Tieren entspricht. Der Anteil im LA lag mit 3,69±0,65% sogar mehr als viermal höher als bei WT-Tieren. Darüber hinaus war auch im RA der KO/+-Tiere, im Vergleich zu WT-Tieren, ein signifikant vermehrtes Vorkommen von fibrotischem Gewebe festzustellen. Im LA konnte bei KO/+-Tieren zwar kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, jedoch war ein Trend in dieselbe Richtung erkennbar. Auf ventrikulärer Ebene konnten dahingegen keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden. Lediglich im linken Ventrikel zeigten KO/+-Tiere gegenüber WT-Tieren einen signifikant höheren Anteil an Fibrose, wobei der absolute Unterschied mit lediglich 0,35% als vernachlässigbar angesehen werden kann.

Unter Berücksichtigung der VHF zugrundeliegenden Mechanismen ist anzunehmen, dass die atriale Fibrose der KO-Tiere einen kausalen Beitrag zum vermehrten Auftreten von atrialen tachykarden Rhythmusstörungen geleistet hat. Der fibrotische Gewebeumbau in den Atrien führt zur Entstehung eines vulnerablen Substrats, welches die Grundlage für abnorme Reizleitungseigenschaften bildet.[69] Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass fibrotisches Gewebe die atrialen Herzmuskelstränge räumlich voneinander trennen kann.[69] Longitudinal verlaufende Fibrose-Septen unterbrechen die Kontinuität des Herzmuskels und stellen somit ein physisches Hindernis für die elektrische Reizleitung dar.[69] Infolgedessen steigt zum einen die Anfälligkeit für VHF, während gleichzeitig Reentry-Mechanismen stabilisiert werden, die für die Aufrechterhaltung von Arrhythmien verantwortlich sind.[69,153-156] Hinzu kommt, dass Myofibroblasten benachbarte Kardiomyozyten durch zelluläre Interaktionen beeinflussen können.[69] Obwohl Myofibroblasten klassischerweise als nicht-erregbare Zellen klassifiziert werden, haben Studien an Ko-Kultursystemen gezeigt, dass ihr Einfluss spontane Depolarisationen hervorrufen, ektope Impulse erzeugen, die

Reizleitungsgeschwindigkeit verlangsamen und die Vulnerabilität für Reentry-Arrhythmien steigern kann.[66,69,157] Inwieweit diese Effekte jedoch auch *in vivo* beobachtet werden können, bleibt bislang unklar.[69] Bei der Entstehung von Arrhythmien scheint zudem die Lokalisation der Fibrose im Myokard eine signifikante Rolle zu spielen.[158] Es konnte beobachtet werden, dass die für VHF charakteristischen elektrischen Störungen insbesondere durch eine subepikardiale Fibrose in den Vorhöfen begünstigt werden.[158] Die visuelle Betrachtung der histologischen Präparate offenbarte bei den untersuchten miR-144-5p Knockout-Tieren ein vergleichbares subepikardiales Verteilungsmuster des fibrotischen Gewebes (vgl. Abbildung 31). Dennoch sind zukünftige Analysen erforderlich, um den visuellen Eindruck objektiv zu validieren.

Auch bei Patienten mit VHF kann in der histologischen Untersuchung des Herzgewebes typischerweise eine ausgeprägte atriale Fibrose zu beobachtet werden.[159,160] Eine ventrikuläre Fibrose tritt bei VHF-Patienten dahingegen primär im Zusammenhang mit Begleiterkrankungen wie arterieller Hypertonie, Herzinsuffizienz und ischämischer Herzerkrankung auf.[22] Die Entstehung einer Fibrose ist im Wesentlichen auf die Proliferation von Fibroblasten sowie auf die damit verbundene Produktion und Ablagerung von EZM im Herzgewebe zurückzuführen.[161] Diverse Signalmoleküle sind in der Lage, diese Fibroblasten zu aktivieren und deren Differenzierung zu Myofibroblasten zu initiieren.[49,69,70] Besonders auffällig ist, dass bei VHF insbesondere die Fibroblasten des atrialen Herzgewebes eine signifikant erhöhte Aktivität aufweisen, was in einem charakteristischen atrialen Verteilungsmuster resultiert. Dies lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass der Wachstumsfaktor TGFβ1 in den Vorhöfen einen deutlich stärkeren Einfluss ausübt als in den Ventrikeln.[162] Studien haben demonstriert, dass eine selektive Überexpression von TGFβ1 alleine ausreicht, um bei transgenen Mäusen einen VHF-Phänotyp mit atrialer Fibrose und atrialen Arrhythmien zu induzieren.[67] Nichtsdestotrotz existieren noch zahlreiche weitere Faktoren, die eine bedeutende Rolle im Zuge der profibrotischen Signalvermittlung in den Atrien einnehmen. Zu diesen zählen unter anderem der WNT/β-Catenin-Signalweg, der PI3K/AKT-Signalweg sowie inflammatorische Prozesse.[70,71,77]

Doch welche spezifischen Faktoren innerhalb dieses komplexen Netzwerks aus profibrotischen Signalwegen und Mechanismen stehen unter dem direkten Einfluss der miR-144-5p und könnten somit potenziell zum Phänotyp der KO-Tiere beigetragen haben? Unsere *in silico* Targetscan-Zielgen-Analyse ergab eine Reihe an potenziellen Zielgenen, die bei profibrotischen Remodelingprozessen eine Rolle spielen. Zudem konnten verschiedene relevante miR-144-5p-Zielgene durch den Einsatz von Luciferase Reporter Assays validiert werden. Darüber hinaus zeigten einige dieser Zielgene

signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer mRNA-Expression im kardialen Gewebe der KO-Tiere, was auf einen Verlust des miRNA-bedingten mRNA-Abbaus hinweist[85]. Untersuchungen zu möglichen Expressionsunterschieden auf Proteinebene, die auf einen Verlust der translationalen Suppression hindeuten könnten, stehen jedoch noch aus.

Als potenzieller Einflussfaktor für strukturelles Remodeling konnte im Rahmen der Untersuchungen beispielsweise das „Mitglied Nummer 6 der Smad-Familie“ (Smad6) identifiziert werden. Mittels Luciferase-Reportergen-Assay konnte Smad6 als relevantes Zielgen der miR-144-5p bestätigt werden. Darüber hinaus war die mRNA-Expression von Smad6 im RA der KO-Mäuse signifikant erhöht. Als intrazelluläres Signalmolekül kommt Smad6 im Kontext der TGFβ_1-abhängigen Signaltransduktion eine zentrale Rolle zu.[163,164] Der Signalstoff kann durch Liganden-aktivierte TGFβ- und BMP (engl.: *bone morphogenic protein*)-Rezeptoren induziert werden und entfaltet daraufhin eine inhibitorische Wirkung.[163,164] BMPs haben die Fähigkeit den TGFβ_1-Signalweg zu blockieren und können aufgrund ihrer antifibrotischen und kardioprotektiven Eigenschaften den Erhalt der physiologischen Homöostase im Herzen unterstützen.[163,164] Smad6 hingegen blockiert Typ I BMP-Rezeptoren und fungiert somit als Inhibitor der kardioprotektiven BMP-Signaltransduktion.[165-168] Miyamoto et al. stellten fest, dass die Überexpression von Smad6 in einem transgenen Mausmodell zu einer signifikant stärkeren Pankreas-Fibrose nach Caerulein-Injektionen führte als bei WT-Tieren ohne Überexpression.[169] Die transgenen Tiere zeigten zudem eine signifikante Erhöhung der TGFβ_1-Expression auf mRNA- und Proteinebene, sowie eine verstärkte Expression des Myofibroblastenmarkers α-SMA in der Immunhistochemie.[169] Angesichts der Tatsache, dass verschiedene BMP-Proteine auch im Herzen antifibrotische Effekte vermitteln können[170,171], scheint es plausibel, dass Smad6 als BMP-Inhibitor auch im miR-144 Knockout-Mausmodell einen Beitrag zur atrialen Fibrose geleistet haben könnte. Obwohl Smad6 insgesamt als profibrotischer Signalstoff angesehen wird[172], ist zu beachten, dass das Protein als Bestandteil des Smad6/Smurf1-Komplexes auch antifibrotische Effekte vermitteln kann, die mit einer Suppression des TGFβ_1-Rezeptors 1 (TGFBR1) assoziiert sind.[164] Da die mRNA-Expression des TGFBR1-Gens im RA der KO-Tiere jedoch signifikant erhöht war, erscheint eine starke Aktivität des Smad6/Smurf1-Komplexes eher unwahrscheinlich. Zukünftige Untersuchungen zur Aktivität von Typ I BMP-Rezeptoren, der Smurf1-Expression sowie zum Anteil von Smad6/Smurf1-Komplexen am insgesamt vorliegenden Smad6-Protein könnten von Interesse sein.

Unsere dualen Luciferase Reporter Assays bestätigten außerdem eine relevante Interaktion zwischen der miR-144-5p und den beiden 3'-UTR-Bindestellen in der mRNA des „Liganden Mitglied Nummer 5 der WNT-Familie" (WNT5a), welcher als profibrotischer Faktor gilt[173]. Die mRNA-Expression von WNT5a war im RA der KO-Tiere signifikant gesteigert, sodass ein Einfluss auf den Phänotyp der KO-Tiere wahrscheinlich ist. Die WNT-Signalvermittlung nimmt im Rahmen der Gewebshomöostase eine ähnlich essenzielle Rolle ein wie TGFβ_1.[174] Zwischen den beiden Signalwegen besteht eine enge interdependente Beziehung, in der WNT5a eine zentrale Position einnimmt.[175] TGFβ_1 fördert die Expression von WNT5a[176], wohingegen eine Inhibition von WNT5a zu einer signifikanten Reduktion der TGFβ_1-abhängigen Produktion von EZM führt.[177] WNT5a fungiert zudem als Aktivator von Fibroblasten, indem der Faktor ihre Proliferation stimuliert, Zelltod abwehrt und die Expression verschiedener Leitproteine fibrotischer Erkrankungen fördert.[173] Verschiedene Studien belegen, dass WNT5a nicht nur an der Fibrose-Entstehung in der Lunge[176,178], Niere[179] und Leber[180] beteiligt ist, sondern darüber hinaus auch diverse inflammatorische Erkrankungen des Menschen beeinflusst[175]. Analysen von Abraityte et al. wiesen außerdem eine verstärkte Expression von WNT5a im Serum von Patienten mit Herzinsuffizienz nach.[181] Ferner konnte bei der Untersuchung von humanen isolierten Makrophagen, Endothelzellen und kardialen Fibroblasten nach Stimulation mit WNT5a eine signifikant gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine *in vitro* festgestellt werden.[181-183] Eine Dysregulation von WNT5a wurde interessanterweise bereits mit VHF in Verbindung gebracht. Feng et al. zeigten anhand eines Rattenmodells für ACh-$CaCl_2$-induziertes VHF, dass die Inhibition des WNT5a-Signalwegs mittels Angiotensin-Rezeptor-Blocker sowohl das Auftreten und die Dauer von VHF-Episoden als auch den Schweregrad einer atrialen Fibrose verringerte.[174] Sie fanden außerdem heraus, dass WNT5a seine Wirkung über den FZD8-Rezeptor und die nachgeschaltete p-JNK vermittelt, deren Aktivität mit VHF sowie mit der Proteinexpression der Fibrose-Marker COLI, COLIII, Fibronektin, TGFβ_1, und α-SMA als auch mit erhöhten IL-1β und IL-6-Spiegeln, als Marker für Inflammation korrelierte.[174] Die Assoziation zwischen der Aktivität von WNT5a und einer Fibrose bei VHF konnte auch durch Untersuchungen von Tan et al. bestätigt werden. Der Knockdown einer langen nichtkodierenden mRNA (lncRNA), welche normalerweise die Stabilität von WNT5a fördert, führte in murinen kardialen Fibroblasten zu einer Destabilisierung von WNT5a.[184] Dies ging mit einer Suppression der ERK- und JNK-Signalwege einher und verhinderte bei Mäusen mit VHF die Entwicklung einer kardialen Fibrose.[184] Als Regulator von Fibrose und Inflammation, zwei bedeutenden Grundpfeilern des strukturellen Remodelings bei VHF, ist es demnach denkbar, dass eine erhöhte Expression von WNT5a auch im miR-144-5p Knockout-Mausmodell

strukturelles Remodeling sowie die Arrhythmogenität der Tiere beeinflusst haben könnte. Western Blot-Analysen von WNT5a sowie von ERK1/2, p-JNK, IL-1β und IL-6 als Aktivitätsmarker könnten zukünftig tiefere Einblicke in die Aktivität des Signalwegs ermöglichen. Ein möglicher Erklärungsansatz für die widersprüchliche Herabregulation von WNT5a im LA könnten negative Feedback Mechanismen sein, wie sie beispielsweise durch die inhibitorischen Proteine Smad6 und Smad7 im Rahmen des TGFβ_1-Signalwegs vermittelt werden.[185]

Als mehrfach validiertes Zielgen der miR-144-5p[186] ist es denkbar, dass auch das „myristoylierte Alanin-reiche Substrat der Protein Kinase C“ (MARCKS) als Regulator des profibrotischen PI3K/AKT-Signalwegs[187,188] einen potenziellen Beitrag zum fibrotischen Gewebeumbau bei KO-Tieren geleistet haben könnte. Trotz einer unveränderten atrialen mRNA-Expression im Rahmen unserer qPCR-Untersuchung, ist es möglich, dass potenzielle Veränderungen auf Proteinebene einen Einfluss auf den Phänotyp ausgeübt haben könnten. MARCKS nimmt eine essenzielle regulatorische Rolle im Kontext des strukturellen Remodelings ein, da das Protein im phosphorylierten Zustand als Aktivator und im unphosphorylierten Zustand als Inhibitor des PI3K/AKT-Signalwegs fungieren kann.[78,189] Eine Inhibition der kardioprotektiven Klasse I_A PI3K(p110α) kann eine Dilatation des LAs verursachen und mit einer atrialen Fibrose sowie einer gesteigerten Suszeptibilität für VHF einhergehen.[190] Demnach scheint es plausibel, dass unphosphoryliertes MARCKS mittels Inhibition der kardioprotektiven PI3Kα zum profibrotischen Remodeling im miR-144-5p Knockout-Mausmodell beigetragen haben könnte. Aber auch eine gesteigerte Aktivität des PI3K(p110γ)-Subtyps im Herzen ist erwiesenermaßen mit pathologischen strukturellen und elektrischen Remodeling-Prozessen sowie mit atrialen Arrhythmien assoziiert.[191-193] Ob jedoch auch die PI3K(p110γ)-Untereinheit durch MARCKS reguliert wird, ist bislang ungewiss. Allerdings konnte beobachtet werden, dass die MARCKS-abhängige Aktivierung einer PI3K in der Leber fibrotische Umbauprozesse im Rahmen einer IRI verstärkte.[194] Yang et al. konnten darüber hinaus nachweisen, dass eine Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs durch unphosphoryliertes MARCKS die Aktivität pulmonaler Fibroblasten *in vitro* reduzierte und bei Mäusen, im Vergleich zu Tieren mit normaler PI3K/AKT-Aktivität, mit einem geringeren Grad an pulmonaler Fibrose nach Bleomycin-induzierter Schädigung *in vivo* korrelierte.[78] In beiden Studien wurde nicht spezifiziert welche PI3K-Untereinheit untersucht wurde, doch es ist anzunehmen, dass die beobachteten Effekte auf einer Beeinflussung der profibrotischen PI3Kγ-Untereinheit beruhten, was wiederum bedeuten würde, dass MARCKS vermutlich auch diese reguliert. Folglich besteht die Möglichkeit, dass phosphoryliertes MARCKS durch

Aktivierung der profibrotischen PI3Kγ zur Entstehung der atrialen Fibrose bei den miR-144 Knockout-Tieren beigetragen haben könnte. Sollten auf Proteinebene tatsächlich Unterschiede hinsichtlich der atrialen Expression von MARCKS nachgewiesen werden, wäre es sinnvoll den Phosphorylierungs-Zustand des Proteins genauer zu untersuchen. Ergänzend könnte eine Aktivitätsmessung der verschiedenen PI3K-Isoformen durchgeführt werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fu et al.[128], konnte auch im Rahmen unserer dualen Luciferase Reporter Assays das Gen „Rapamycin-independent Companion des mTOR 2 Komplex (mTORC2)“ (RICTOR) als Zielgen der miR-144-5p validiert werden. Auf mRNA-Ebene war zudem ein positiver Trend hinsichtlich der Expression im RA der KO-Tiere zu verzeichnen. Es ist demnach denkbar, dass eine potenziell gesteigerte Proteinexpression von RICTOR profibrotische Effekte im miR-144-5p Knockout-Mausmodell vermittelt haben könnte. Auch die PI3K-ähnliche Serin/Threonin-Proteinkinase 2 (mTOR2) und ihre regulatorische Untereinheit RICTOR vermitteln ihre Wirkung über die AKT.[195,196] Bisher konzentrierten sich die Studien zur Wirkung der mTOR2 im Herzen überwiegend auf die kardioprotektiven Effekte[197-199], zum Beispiel im Kontext des Alterns[200], bei myokardialer Ischämie[201] oder bei Volumen- und Druckbelastung[202]. Es ist jedoch bekannt, dass die mTOR2 in Abhängigkeit von TGFβ_1[203-206] in verschiedenen Organen auch eine profibrotische Wirkung entfalten kann.[207-210] Wie eine Studie von You et al. zeigt, scheint dies auch im Herzgewebe der Fall zu sein.[211] Bei spontan hypertensiven Ratten konnte beobachtet werden, dass eine vierwöchige ketogene Diät, im Vergleich zu einer normalen Diät, mit einer erhöhten Aktivität des mTORC2 sowie mit einer stärkeren Ausprägung von interstitieller Fibrose, kardialem Remodeling und inflammatorischen Prozessen assoziiert war.[211] In kardialen Fibroblasten der spontan hypertensiven Ratten führte die Stimulation mit Ketonen (β-Hydroxybutyrat) nur unter Ko-Stimulation mit TGFβ_1 zur Aktivierung des mTORC2, was wiederum eine gesteigerte Expression von COLI und COLIII sowie eine verstärkte Proliferation der kardialen Fibroblasten *in vitro* zur Folge hatte.[211] Eine Inhibition des mTORC2 konnte diese Effekte dahingegen verhindern.[211] Studien von Li et al. und Ren et al. zu strukturellem Remodeling in der Niere legen zudem nahe, dass RICTOR eine entscheidende Rolle in der TGFβ_1-abhängigen Aktivierung des mTORC2 spielt.[205,206] Die *in vitro* Stimulation des mTORC2 mit TGFβ_1 führte ausschließlich in Gegenwart von RICTOR zur Aktivierung der AKT, was Fibroblasten und Makrophagen wiederum zur Expression von Fibrose-assoziierten Stoffen (Fibronektin, COLI, α-SMA) und Fibrose-fördernden Zytokinen (PDGF, VEGF, CTGF) anregte.[205,206] Zudem zeigten transgene Mäuse mit Fibroblasten-spezifischem Knockout des RICTOR-Gens nach einer unilateralen Ureter-Obstruktion eine signifikant geringere Ablagerung von EZM sowie

eine verminderte Infiltration von Immunzellen im Nierengewebe.[205] Es ist naheliegend, dass vergleichbare Mechanismen auch im Rahmen einer kardialen Fibrose eine Rolle spielen könnten und dass RICTOR auch hier eine essenzielle Funktion in der profibrotischen TGFβ_1/mTOR2-Signalvermittlung einnimmt. Eine Aktivitätsmessung des mTORC2 mittels p-AKT^{S473}/AKT-Bestimmung bei unseren Versuchstieren könnte weitere Hinweise auf die Aktivität dieses Signalwegs liefern.

Mit dem „Cadherin 11“ (CDH11) konnte im Rahmen unserer Luciferase Reporter Assays ein weiteres relevantes Zielgen der miR-144-5p identifiziert werden, welches in die TGFβ_1-Signalvermittlung involviert ist[49]. In den Atrien der KO-Tiere waren keine Veränderungen hinsichtlich der mRNA-Expression feststellbar. Dennoch wäre eine miR-144-5p-abhängige Regulation von CHD11 durch translationale Suppression mit Beeinflussung des Phänotyps denkbar. Cadherine sind essenzielle transmembranöse Oberflächenproteine, deren Hauptfunktion in der Regulation der Zelladhäsion besteht.[49] CDH11 verstärkt sowohl die Effekte des TGFβ_1-Signalwegs[212], als auch des WNT/β-Catenin-Signalwegs[213]. Eine hohe Expression von CDH11 ist mit zahlreichen fibrotischen Erkrankungen assoziiert[49], einschließlich kardialer Fibrose[214]. Das Protein wird physiologisch von kardialen Fibroblasten und Myofibroblasten exprimiert und konnte zudem im Rahmen einer akuten Schädigung von murinem Herzgewebe in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden.[49] Bei Patienten mit VHF ist im Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollpatienten eine erhöhte CDH11-Expression im fibrotischem Vorhofgewebe feststellbar.[75,215] Eine Untersuchung von CDH11-defizienten Mäusen zeigte zudem, dass das Fehlen des Proteins die Tiere unter fettreicher Diät oder nach AngII-Behandlung vor einer kardialen Fibrose schützte.[75,215] Im Vergleich zu WT-Mäusen, wiesen die CDH11-defizienten Tiere darüber hinaus ein reduziertes Ausmaß an atrialem Remodeling sowie eine geringere Vulnerabilität für VHF auf.[75,215] Außerdem konnten Cao et al. beobachten, dass CDH11-defiziente Tiere im Vergleich zu WT-Tieren nach AngII-Behandlung ein kleineres linkes Atrium aufwiesen und profibrotische Gene (COLI, COLIII, CTGF, α-SMA) weniger stark exprimiert wurden.[75] Es ist erwiesen, dass murine primäre atriale Fibroblasten unter physiologischen Bedingungen durch CDH11 zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 angeregt werden, was sowohl die Differenzierung der Fibroblasten, als auch die Produktion von EZM-Genen begünstigt.[215] Atriale Fibroblasten von CDH11-defizienten Mäusen zeigten nach AngII-Behandlung dahingegen eine geringere Proliferations- und Migrationsaktivität und produzierten weniger EZM als Fibroblasten von WT-Mäusen.[75] Zudem sind wichtige profibrotische Signalwege, wie der Smad2/3/4- und der MAPK-Signalweg (ERK1/2, JNK) teilweise abhängig von CDH11.[75] CDH11 kann demnach als essenzieller Faktor für strukturelles Remodeling bei VHF betrachtet werden

und es scheint möglich, dass CDH11 durch eine Stimulation von Fibroblasten oder durch eine Aktivierung von Entzündungszellen zum Phänotyp der miR-144-5p KO-Tiere beigetragen haben könnte. Western Blots könnten Informationen zum Phosphorylierungszustand von Smad2/3/4 und der MAPKs (ERK1/2, JNK), als Aktivitätsmarker der jeweiligen Signalwege sowie zur Expression von IL-6 als CDH11-abhängigen Entzündungsmarker liefern und somit Hinweise auf eine potenziell gesteigerte CDH11-Aktivität in unseren Versuchstieren geben. Da zudem gezeigt werden konnte, dass die Hochregulation von CDH11 während der TGFβ_1-vermittelten Myofibroblasten-Differenzierung mit einer Herabregulation von CDH2 einhergeht[216], wäre es von weiterem Interesse bei unseren Versuchstieren das Verhältnis der Cadherin-Expression zu bestimmen.

Auch der „Muscleblind Like Splicing Regulator 2“ (Mbnl2) stellt ein neu validiertes Zielgen der miR-144-5p dar. Mittels qPCR konnte bei unseren Versuchstieren zwar kein signifikanter Expressions-Unterschied auf mRNA-Ebene festgestellt werden, jedoch zeichnete sich im RA der KO-Tieren ein deutlicher Trend nach oben ab, während im LA ein leichter Aufwärtstrend zu verzeichnen war. Die Rolle von Mbnl2 bei kardialen strukturellen Remodeling-Prozessen ist noch nicht eindeutig geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass sowohl das Fehlen als auch eine Überexpression von Mbnl2 pathologische Remodeling-Prozesse fördern können.[217] Dies legt nahe, dass eine potenzielle Überexpression auf Proteinebene zu fibrotischen Umbauprozessen und Arrhythmien bei unseren KO-Tieren beigetragen haben könnte. Mbnl2 ist ein RNA-bindendes Protein, das auf transkriptionaler und translationaler Ebene eine zentrale Rolle als Regulator der Genexpression spielt.[217] Darüber hinaus beeinflusst Mbnl2 die mRNA-Translokation, das alternative Splicing sowie die Proteinsekretion.[217] Im Rahmen einer Studie von Chothani et al. konnte eine Überexpression von Mbnl2 im fibrotischen Herzgewebe von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie festgestellt werden[217], was eine Assoziation mit kardialer Fibrose nahelegt. Zudem konnte in humanen Fibroblasten, während der TGFβ_1-abhängigen Differenzierung zu α-SMA-Myofibroblasten, eine signifikante Erhöhung der Mbnl2-Expression sowie eine signifikante Anreicherung seiner Zielgene gemessen werden, was darauf hindeutet, dass Mbnl2 im Rahmen der profibrotischen Reaktion die Effizienz der Translation zahlreicher Gentranskripte reguliert.[217] Es konnten bereits multiple Zielgene von Mbnl2 identifiziert werden. Darunter befinden sich beispielsweise Fibronektin1[218], als Faktor für strukturelles Remodeling oder SERCA1[218] und SCN5A[219], als Beispiele für elektrisches Remodeling. Auf der anderen Seite konnten bestimmte Mutationen im Mbnl1- und Mbnl2-Gen, die eine Dysfunktion nach sich ziehen, als Ursache der genetischen Erkrankung der Myotonen Dystrophie identifiziert werden.[218,220] Patienten mit Myotoner

Dystrophie erleiden häufig einen plötzlichen Herztod, welcher meist auf einen Leitungsblock oder Arrhythmien zurückzuführen ist.[221] In der Herzmuskulatur sowie im kardialen Reizleitungssystem dieser Patienten zeigt sich häufig eine Infiltration mit Fibrose oder Fettgewebe.[221] Sowohl Patienten mit dysfunktionalen Mbnl-Proteinen als auch Mbnl Knockout-Tiere zeichnen sich durch einen arrhythmogenen Phänotyp aus[219], was auf eine potenziell protektive Funktion der Proteine hindeutet. In einem Mbnl1-KO/Mbnl2-heterozygoten Mausmodell zur Imitation der Myotonen Dystrophie beobachteten Chou et al. zudem das Auftreten permanenter atrialer Tachykardien und hochgradiger AV-Blockierungen, während bei WT-Tieren keine spontanen Arrhythmien auftraten.[219] Optical Mapping-Analysen zeigten in der Mbnl1-KO/Mbnl2-heterozygoten-Gruppe ferner eine verlängerte APD, eine herabgesetzte Leitungsgeschwindigkeit, sowie eine steilere Restitutionskurve.[219] Zukünftig könnten Expressionsanalysen von Fibronektin1, SERCA1 und SCN5A einen Hinweis auf den Einfluss von Mbnl2 auf strukturelle und elektrische Remodelingprozesse bei den miR-144-5p KO-Tieren geben.

Obwohl das TGFBR1-Gen im Rahmen unserer dualen Luciferase Reporter Assays nicht als Zielgen der miR-144-5p identifiziert wurde, konnte im RA der KO-Tiere eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression des TGFBR1-Gens festgestellt werden. Auch im Herzgewebe von Patienten mit VHF kann eine verstärkte Expression des TGFBR1 gemessen werden.[222] Anhand eines Rattenmodells für Isoprenalin-induziertes VHF konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass TGFBR1 einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung von atrialer Fibrose leistet.[222] Angesichts der Tatsache, dass der TGFBR1 in die Signalvermittlung diverser profibrotischer Signalwege involviert ist[68,71], könnte die erhöhte Expression als Indikator für eine insgesamt gesteigerte Aktivität besagter Signalwege interpretiert werden. Es wird beispielsweise angenommen, dass die Transaktivierung zwischen dem TGFβ_1- und dem WNT-Signalweg im Kontext der kardialen Fibrose mitunter auf eine Modulation des TGFBR1 zurückzuführen ist.[91] Insgesamt erscheint es demnach denkbar, dass verschiedene profibrotische Faktoren die Transkription von TGFBR1 bei den miR-144-5p Knockout-Tieren gefördert haben und das Gen somit zur Entstehung der atrialen Fibrose und des arrhythmogenen Phänotyps beigetragen haben könnte.

4.1.2.2 Dilatation des linken Atriums

Im Rahmen der echokardiographischen Untersuchung der Versuchstiere konnte eine signifikante Dilatation des LAs als Folge des miR-144-5p Knockouts festgestellt werden. Im Vergleich zu WT-Tieren war der LA-Durchmesser bei KO-Tieren durchschnittlich um ca. 14% größer. Angesichts der Tatsache, dass KO-Tiere zudem ein geringeres Körper-

und Herzgewicht, erscheint die Dilatation des LAs im Verhältnis zur übrigen Anatomie der Tiere umso ausgeprägter.

In Anbetracht der VHF zugrundeliegenden Mechanismen ist anzunehmen, dass die linksatriale Dilatation bei den KO-Tieren in einem engen Zusammenhang mit der erhöhten Suszeptibilität für atriale tachykarde Rhythmusstörungen steht. Ein dilatiertes Atrium kann wertvolle Hinweise auf Gewebeschäden und Remodeling-Prozesse liefern.[158] Um das Risiko für VHF einzuschätzen, wird daher sowohl im experimentellen als auch im klinischen Setting seit langem routinemäßig auf die echokardiographische Größenbestimmung der Atrien zurückgegriffen.[158] Eine LA-Dilatation kann sowohl Ursache, als auch Konsequenz von VHF sein.[223] Die atriale Hypokontraktilität bei VHF begünstigt eine zunehmende Dilatation des linken Atriums, welche reziprok eine proarrhythmogene Wirkung entfalten kann.[66,158,223] Sowohl elektrische, als auch strukturelle Remodeling-Prozesse spielen dabei eine bedeutende Rolle.[58,224] Infolge von elektrischem Remodeling kommt es häufig zu einer Heterogenität der AP-Morphologie und zu einer Verkürzung der APD sowie der zellulären Refraktärzeiten.[58,224] Im Rahmen struktureller Remodeling-Prozesse können Leitungsblockierungen entstehen, die Reizleitungswege verlängern sich und die Gewebefläche, welche Reentry-Mechanismen unterhalten kann, vergrößert sich durch die Dilatation.[58] Darüber hinaus zählt die mechanische Dehnung des kardialen Gewebes zu den wesentlichen Aktivatoren der Fibroblasten und kann auf diese Weise zelluläre Hypertrophie und Fibrose fördern.[69] Eine atriale Dehnung kann zudem inflammatorische Prozesse induzieren, was darauf zurückzuführen ist, dass im Rahmen der Dilatation Immunzellen mobilisiert werden, welche die profibrotischen Effekte weiter verstärken können.[224] Die genauen Mechanismen sind bislang nicht vollständig entschlüsselt, jedoch weiß man, dass Abnormitäten im zellulären Kalziumhandling eine zentrale Rolle spielen.[224] In die Signaltransduktion im Kontext einer LA-Dilatation sind mechanisch-aktivierte Ionenkanäle, intrazelluläre second messenger Kaskaden (cAMP, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), NO, IP_3), Kinasen (PKA, PKC, CaMKII) und Wachstumsfaktoren (Angiotensin II, Endothelin-1, Fibroblast Growth Factor) involviert.[224] Darunter ist AngII einer der bedeutendsten profibrotischen Faktoren in Verbindung mit VHF.[74,225] Auch das Atriale natriuretische Protein (ANP) leistet einen relevanten Beitrag.[224] Es stellt nicht nur einen Mediator im Kontext von elektrischem Remodeling, sondern auch ein validiertes Zielgen der miR-144 dar.[224]

Es stellte sich jedoch die Frage welche genauen Faktoren der Regulation durch die miR-144-5p unterliegen und somit potenziell zum Phänotyp der KO-Tiere beigetragen haben könnten. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten mithilfe einer *in silico*

Targetscan-Zielgenanalyse und Luciferase Reporter Assays verschiedene Zielgene der miR-144-5p identifiziert und validiert werden, die bei den KO-Tieren möglicherweise einen Einfluss auf die LA-Dilatation ausgeübt haben. Auf mRNA-Ebene konnte bei den ausgewählten Zielgenen zwar lediglich ein Trend in Richtung einer erhöhten mRNA-Expression beobachtet werden, jedoch schließt dies potenzielle Unterschiede hinsichtlich der Proteinexpression nicht aus.

Zu den neu identifizierten Zielgenen der miR-144-5p zählt beispielsweise die „Rho-assoziierte Coiled-Coil-beinhaltende Protein-Kinase 2“ (ROCK2) – ein wichtiger Signalstoff im Kontext struktureller Remodelingprozesse im Herzen. Auf mRNA-Ebene zeigte sich zwar kein signifikanter Expressions-Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch fiel im RA der KO-Tiere ein Trend zu höheren Expressionswerten auf, was auf einen potenziell signifikanten Unterschied auf Proteinebene hindeuten kann. ROCK2 gehört zur Familie der Serin/Threonin Protein-Kinasen und vermittelt die Effekte des kleinen GTP-bindenden Proteins RhoA, welches in einem engen Zusammenhang mit einer LA-Dilatation steht.[226-228] Die RhoA/ROCK-Signaltransduktion unterliegt dem Einfluss verschiedener wichtiger profibrotischer Faktoren, wie TGFβ_1, PDGF, CTGF und AngII.[226,227] Durch die Aktivität des Signalwegs wird die Expression zahlreicher profibrotischer Gene beeinflusst, worunter beispielsweise COL1A1, CTGF und der Serum-Response-Faktor zählen.[123,226,229] Darüber hinaus reguliert der RhoA/ROCK-Signalweg neben der Differenzierung von Fibroblasten in α-SMA-Myofibroblasten auch elektrische Remodeling-Prozesse im Herzen.[123,226,229] Es ist bekannt, dass die RhoA/ROCK-Signaltransduktion eine wichtige Rolle im Kontext von VHF und einer damit verbundenen LA-Dilatation einnimmt.[228] So zeigte eine Untersuchung von Tsai et al., dass die Expression von RhoA im atrialen Herzgewebe von Patienten mit VHF signifikant erhöht war.[228] Interessanterweise korrelierte die Höhe der RhoA-Expression dabei mit dem Durchmesser des LAs, welcher bei VHF-Patienten vergrößert war.[228] Auch in Leukozyten von Patienten mit nicht-valvulärem VHF konnte auf mRNA-Ebene eine erhöhte Expression von ROCK1 und ROCK2 nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass Rho-Kinasen möglicherweise auch über proinflammatorische Kaskaden zur Pathogenese von VHF beitragen können.[230] Eine Studie von Sah et al. beschäftigte sich mit den Effekten einer selektiv kardialen Überexpression von RhoA bei Mäusen.[123] Im Vergleich zu WT-Tieren zeigten die transgenen Tiere eine ausgeprägte Vergrößerung des LAs, gepaart mit VHF-Episoden und AV-Blöcken.[123] Zudem starben transgene Tiere gehäuft an einer dilatativen Kardiomyopathie mit Herzversagen.[123] Die postmortale Untersuchung der Herzen offenbarte eine signifikant stärkere Gewichtszunahme der Atrien im Vergleich zu den Ventrikeln.[123] Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das Herzversagen der transgenen Tiere möglicherweise auf eine ausgeprägte atriale

Dilatation zurückzuführen ist.[123] Ein vergleichbarer Phänotyp wurde bei transgenen Mäusen mit herzspezifischer Überexpression von MURK (engl.: muscle-restricted putative coiled-coil protein) beobachtet.[231] Die gesteigerte MURK-Expression führte, in Abhängigkeit des RhoA/ROCK-Signalwegs, zur mRNA-Induktion von ANP, einem essenziellen Biomarker für VHF.[231] In Assoziation mit einer gesteigerten RhoA/ROCK-Aktivität, wiesen transgene Tiere neben einer kardialen kontraktilen Dysfunktion, zudem vergrößerte Atrien, eine diffuse interstitielle Fibrose in allen Kammern sowie eine erhöhte Vulnerabilität für atriale Arrhythmien auf.[232] Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass keine der Studien die isolierten Effekte der ROCK2 betrachtete.[226,231] Erst vor kurzer Zeit gelang es von Liu et al. erstmals die spezifische Wirkung der ROCK2 im Herzen mithilfe selektiver Inhibitoren systematisch zu untersuchen.[229] Der ROCK2-Inhibitor Belumosudil führte bei Mäusen mit kardialer Druckbelastung nach transverser aortaler Verengung (TAC) zu einer signifikanten Verbesserung der Herzfunktion.[229] Darüber hinaus reduzierte das Medikament im Vergleich mit unbehandelten Mäusen das Ausmaß der kardialen Hypertrophie und Fibrose nach TAC.[229] Im Zuge einer weiteren Untersuchung wurden kardiale Fibroblasten einer Behandlung mit Belumosudil unterzogen und anschließend mit TGFβ_1 stimuliert.[229] Die Stimulation regte lediglich unbehandelte Zellen zur Proliferation an, was nahelegt, dass ROCK2 auch unabhängig der ROCK1 eine wesentliche Rolle bei strukturellen Remodeling-Prozessen im Herzen einnimmt.[229] Insgesamt scheint es daher denkbar, dass eine potenziell gesteigerte Proteinexpression von ROCK2 möglicherweise auch im miR-144-5p Knockout-Mausmodell einen Einfluss auf den LA-Durchmesser sowie auf profibrotische Remodeling-Prozesse in den Atrien hatte. Sollten zukünftige Untersuchungen eine Überexpression auf Proteinebene ergeben, könnten zudem mögliche Expressionsunterschiede von Smad2/3, ERK1/2, CTGF, Serum Response Faktor, α-SMA und ANP als Aktivitätsmarker evaluiert werden.

Auch in Bezug auf MARCKS, einem mehrfach validierten Zielgen der miR-144-5p[186], ist eine Beteiligung an den strukturellen Veränderungen im LA denkbar. In den Atrien der miR-144-5p Knockout-Tiere zeigte sich zwar kein signifikanter Expressionsunterschied auf transkriptionaler Ebene, jedoch besteht die Möglichkeit, dass potenzielle Veränderungen auf Proteinebene einen Einfluss auf den Phänotyp der Versuchstiere hatten. MARCKS ist ein zentraler Regulator des PI3K/AKT-Signalwegs, welcher eng mit strukturellem Remodeling und VHF verknüpft ist.[187,188] In verschiedenen Studien konnte beobachtet werden, dass eine herzspezifische Unterfunktion der PI3K(p110α) bei transgenen Mäusen die Suszeptibilität für VHF erhöht und essenziell zur Vergrößerung des linken Atriums sowie zur Ausprägung einer atrialen Fibrose beiträgt.[187,188,190,233] Eine gezielte Steigerung der PI3K-Aktivität bei diesen Tieren führte dahingegen zu einer Reduktion des kardialen Fibrose-Grades und verbesserte die kardialen

Reizleitungseigenschaften.[233] Interessanterweise konnte auch im atrialen Gewebe von Patienten mit VHF eine verringerte PI3K/AKT-Aktivität festgestellt werden.[234] Darüber hinaus wurde eine MARCKS-abhängige Herabregulation des kardioprotektiven PI3K(p110α)-Subtyps mit einem 10-fach erhöhten Risiko für das Auftreten von VHF bei Patienten unter Ibrutinib-Behandlung in Verbindung gebracht.[234] Da MARCKS im unphosphorylierten Zustand eine hemmende Wirkung auf die PI3K(p110α) ausübt[189], erscheint es denkbar, dass eine verstärkte Proteinexpression von unphosphoryliertem MARCKS bei den mir-144-5p Knockout-Tieren zu der LA-Dilatation beigetragen haben könnte.

4.1.3 Elektrisches Remodeling

In der Pathophysiologie von VHF besteht eine enge Verknüpfung zwischen strukturellen und elektrischen Remodeling-Prozessen.[25] Unsere Targetscan-Zielgenanalyse legt im Hinblick auf diese Wechselbeziehung nahe, dass die miR-144-5p vermutlich auch an der Regulation diverser Gene des elektrischen Remodelings beteiligt ist. Die Versuchstiere wurden mithilfe eines EKGs sowie einer EPU auf potenzielle Veränderungen untersucht. Zu den charakteristischen Indikatoren für elektrisches Remodeling zählen eine Veränderung der APD, welche im Rahmen der Untersuchungen nicht gemessen wurde, sowie abweichende Refraktärzeiten in den Atrien.[66,121,223] Jedoch konnten weder im EKG noch bei den Basisparametern der EPU, Auffälligkeiten oder signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es ist allerdings zu bedenken, dass bestimmte Anästhesieverfahren oder Stress feine Veränderungen in der kardialen Elektrophysiologie verschleiern oder kompensieren können.[145,151] Da bei hESC-CMs unter dem Einfluss eines miR-144-5p-Inhibitors im Rahmen der Pilotstudie eine Verlängerung der APD beobachtet werden konnte, besteht dennoch die Möglichkeit, dass detailliertere Untersuchungen am miR-144-5p Knockout-Mausmodell zukünftig auch Veränderungen auf elektrischer Ebene aufdecken könnten.

Da VHF typischerweise mit einer APD-Verkürzung assoziiert ist[25], stellte sich die Frage, welche Mechanismen der APD-Verlängerung bei hESC-CMs unter dem Einfluss des miR-144-5p-Inhibitors zugrunde liegen könnten. Interessanterweise konnte in bestimmten Patientengruppen, wie etwa bei Diabetes mellitus, Testosteron-Mangel, nach Applikation von AngII oder bei Vorliegen eines Long-QT-Syndroms, ein Zusammenhang zwischen einer APD-Verlängerung und VHF beobachtet werden.[235-238] Häufiger tritt eine APD-Verlängerung jedoch bei ventrikulären Arrhythmien wie dem Long-QT-Syndrom auf.[25] Eine Verlängerung der APD ist als Ausdruck einer verspäteten Repolarisation zu interpretieren.[239] Dabei verlängert sich die vulnerable Phase, in der

das Herz besonders anfällig für Arrhythmien ist.[239] Eine APD-Verlängerung begünstigt insbesondere das Auftreten von ektopen Triggern und EADs[240], während eine APD-Verkürzung vorwiegend Reentry-Aktivität fördert.[25,239] Beide Phänomene stellen wesentliche Faktoren in der Pathogenese von Arrhythmien dar[25,239], weshalb es plausibel erscheint, dass sowohl eine Verlängerung als auch eine Verkürzung der APD mit VHF assoziiert sein kann.

Mit dem „Nitric Oxide Synthase 1 Adaptor Protein“ (NOS1AP/CAPON) konnte im Rahmen unserer Luciferase Reporter Assays zudem ein relevantes Zielgen der miR-144-5p validiert werden, welches elektrisches Remodeling im miR-144-5p Knockout-Mausmodell potenziell beeinflussen könnte. In beiden Atrien der KO-Tiere war die mRNA-Expression von NOS1AP signifikant gesteigert, weshalb ein Einfluss auf den Phänotyp wahrscheinlich ist. NOS1AP ist ein Regulator der neuronalen Nitric Oxide Synthase (nNOS/NOS1).[241,242] Mithilfe genomweiter Analysen bei Patienten mit abnormem QT-Intervall konnten bereits verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in Bezug auf das NOS1AP-Gen identifiziert werden, die eine starke Assoziation mit Veränderungen des QT-Intervalls und ventrikulären Arrhythmien zeigen.[241,242] Laut unserem Kenntnisstand wurden die Auswirkungen einer veränderten NOS1AP-Expression im Kontext von VHF bislang nicht untersucht. Anhand verschiedener Modelle konnte hingegen festgestellt werden, dass eine gesteigerte Aktivität der NOS1 in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten Arrhythmien induzieren kann.[241,243,244] Untersuchungen zu den Auswirkungen einer modifizierten NOS1AP-Expression oder NOS1-Aktivität ergaben jedoch interessanterweise teilweise gegenteilige Ergebnisse.[243,245-247] So konnte eine APD-Verkürzung beispielsweise sowohl in ventrikulären Kardiomyozyten von Meerschweinchen mit NOS1AP-Überexpression[243], als auch in den Herzen von Zebrafisch-Embryos eines NOS1AP-Knockdown-Modells[248] beobachtet werden. Es ist demnach anzunehmen, dass den vielfältigen Wirkweisen von NOS1AP- bzw. der NOS1 verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Neben diversen Ionenkanälen (L-Typ Kalzium-Kanal ($I_{Ca,L}$) und dem verspätet auswärts gleichrichtenden Kaliumkanal (I_{Kr}))[243,244,249] beeinflusst NOS1AP bzw. die NOS1 vermutlich auch die Architektur der Glanzstreifen, welche der elektrischen Kopplung von Kardiomyozyten über Gap Junctions dienen.[241] Gap Junctions können durch den intrazellulären NO-Spiegel und folglich durch die NOS1 reguliert werden.[250] Bei Patienten mit VHF ist häufig eine Umstrukturierung der Gap Junctions sowie der Connexine in den Glanzstreifen zu beobachten.[251,252] Die daraus resultierenden Störungen in der elektrischen Zellkopplung können wiederum die Reizleitungseigenschaften beeinträchtigen und eine Ursache für Abweichungen im QT-Intervall, einen plötzlichen Herztod, sowie für das Auftreten von VHF darstellen.[25,241] Die überwiegende Mehrheit der publizierten Studien deutet darauf

hin, dass eine Überexpression von NOS1AP/NOS1 mit einer Verkürzung der APD assoziiert ist und nicht zu deren Verlängerung führt.[243,244,253] Daraus lässt sich schließen, dass das Gen vermutlich keinen kausalen Beitrag zur Verlängerung der APD bei hESC-CMs im Rahmen der Pilotstudie leistete. Insgesamt betrachtet scheint es jedoch denkbar, dass NOS1AP andere elektrische Veränderungen bei den miR144-5p Knockout-Tieren hervorgerufen haben könnte, welche mittels EKG und EPU nicht messbar waren. Insbesondere Untersuchungen des zellulären Kalziumhandlings, sowie der Glanzstreifen könnten zukünftig genauere Einblicke in die potenziellen Auswirkungen einer gesteigerten NOS1AP-Expression auf die kardiale Elektrophysiologie ermöglichen.

4.1.4 Anatomische und funktionelle Aspekte des Herzens

MiR-144-5p Knockout-Tiere wurden ohne strukturelle Defekte geboren und zeigten keine Auffälligkeiten hinsichtlich ihrer Entwicklung. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen aus anderen Studien am miR-144/451 Knockout-Mausmodell[95]. Im Vergleich zu WT-Tieren wiesen Tiere der KO-Gruppe und der KO/+-Gruppe jedoch ein signifikant geringeres Körper- und Herzgewicht auf, während die Länge des Tibiaknochens einheitlich zwischen den Gruppen war. Bei Normalisierung des Herzgewichts in Relation zum Körpergewicht waren die Unterschiede zwischen den Gruppen aufgehoben, was gegen eine isolierte Hypotrophie des Herzens spricht. Insofern legen die Daten nahe, dass KO- und KO/+-Tiere insgesamt zwar keine geringere Körpergröße hatten, jedoch leichter als WT-Tiere veranlagt waren. Da in erster Linie Übergewicht als Risikofaktor für VHF angesehen wird[22], wurde der potenzielle Einfluss eines verringerten Körper- und Herzgewichts auf die Ausprägung des kardialen Phänotyps als vernachlässigbar betrachtet. Im Rahmen anderer Studien am miR-144/451 Knockout-Mausmodell konnten, bis auf eine Splenomegalie, zudem keine weiteren signifikanten Unterschiede hinsichtlich der anatomischen Eigenschaften festgestellt werden.[101,102,136]

In der echokardiographischen Untersuchung fiel bei KO-Tieren gegenüber den anderen Gruppen ein signifikant geringeres Schlagvolumen und Herzminutenvolumen auf. Die Werte lassen sich am ehesten durch die insgesamt geringere Herzgröße der transgenen Tiere erklären. Zur Berechnung der funktionalen Parameter wurden das endsystolische sowie das enddiastolische Volumen der linken Herzkammer verwendet (vgl. 2.1.5.2.). Da diese mit der absoluten Herzgröße korrelieren, spiegelt sich eine geringere Gesamtgröße des Herzens in einer Abnahme des Schlagvolumens und folglich des Herzminutenvolumens wider. Ferner lässt das Fehlen eines signifikanten Unterschieds

hinsichtlich der Ejektionsfraktion und der fraktionellen Verkürzung darauf schließen, dass die relative Herzleistung der KO-Tiere im Verhältnis zur Herzgröße konstant und somit unbeeinträchtigt war.

Es fällt jedoch auf, dass zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Wanddicken des IVS und der PW festgestellt werden konnte. In Anbetracht des geringeren Herzgewichts sowie des kleineren Herzminutenvolumens, wäre bei KO-Tieren folglich auch eine Reduktion der ventrikulären Wanddicken zu erwarten gewesen. Im Gegensatz dazu erscheinen die Messwerte im Verhältnis zu den anderen Parametern jedoch relativ vergrößert zu sein. Dies könnte auf potenzielle Veränderungen in den Ventrikeln hindeuten. Da die histologische Untersuchung keinen Hinweis auf eine ventrikuläre Fibrose ergab, könnte eine Hypertrophie der Herzwände einen möglichen Erklärungsansatz darstellen. Eine linksventrikuläre Hypertrophie gilt als signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung von VHF und begünstigt bei Patienten mit VHF die Krankheitsprogression.[254] Eine Pubmed-Literaturrecherche legte diesbezüglich nahe, dass eine Herabregulation der miR-451 sowohl beim Menschen als auch in verschiedenen *in vivo* Tiermodellen mit hypertrophen Veränderungen im Herzen in Verbindung steht.[255-259] Es erscheint somit denkbar, dass der Knockout der miR-451 hypertrophe Stimuli im linksventrikulären Herzgewebe der KO-Tiere vermittelt haben könnte. Gegen eine voll ausgeprägte kardiale Hypertrophie sprechen jedoch das unveränderte Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht sowie die uneingeschränkte Herzfunktion der transgenen Tiere.

Da sich im LV der KO-Tiere eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression des validierten miR-144-5p-Zielgens MARCKS zeigte, stellte sich die Frage, ob das Protein möglicherweise eine Rolle in diesem Zusammenhang spielen könnte. Aufgrund fehlender ventrikulärer Veränderungen unter dem selektiven Einfluss des miR-144-5p-Inhibitors im Rahmen der Pilotstudie, erscheint es insgesamt unwahrscheinlich, dass MARCKS eine prohypertrophe Wirkung in den Ventrikeln der miR-144-5p KO-Tiere vermittelt. MARCKS fungiert als zentraler Regulator des PI3K/AKT-Signalwegs.[189] Im unphosphorylierten Zustand übt MARCKS eine hemmende Wirkung auf die PI3Ks aus, wohingegen phosphoryliertes MARCKS den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert.[189] Es ist bekannt, dass die Aktivität des PI3K(p110γ)-Subtyps bei kardialer Hypertrophie eine wichtige Rolle spielt.[260,261] Aber auch der kardioprotektive PI3K(p110α)-Subtyp scheint in die Mechanismen der kardialen Hypertrophie involviert zu sein.[262,263] Tomita et al. konnten zudem feststellen, dass eine N-Myristoylierung von MARCKS auch unabhängig des PI3K/AKT-Signalwegs einen kardioprotektiven Schlüsselfaktor gegen hypertrophe Veränderungen in Kardiomyozyten in vitro darstellt.[264] Die erhöhte mRNA-Expression

von MARCKS im LV der KO-Tiere könnte insofern auf eine kardioprotektive, antihypertrophe Gegenregulation hindeuten. Es ist denkbar, dass es sich dabei um eine reaktive Expressionssteigerung handeln könnte, beispielsweise als Antwort auf hypertrophe Reize anderer Faktoren, wie möglicherweise etwa der miR-451. Eine synchrone Wirkung von pro- und antihypertrophen Faktoren könnte partielle Kompensationsmechanismen zur Folge haben und insgesamt möglicherweise lediglich latente Veränderungen hervorrufen. Dies könnte erklären, warum die ventrikulären Wanddicken der transgenen Tiere, trotz eines geringeren Herzgewichts und eines verminderten Herzminutenvolumens, nicht verkleinert messbar waren. Zukünftige Untersuchungen zum Phosphorylierungs- und N-Myristoylierungs-Zustand von MARCKS sowie eine Aktivitätsmessung der PI3K-Subtypen im ventrikulären Herzgewebe könnten tiefere Einblicke in potenziell zugrundeliegende Mechanismen ermöglichen.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Das miR-144-5p Knockout-Mausmodell zur Untersuchung der kardialen Elektrophysiologie

Um die Auswirkungen einer Herabregulation der miR-144-5p auf die kardiale Elektrophysiologie und Remodeling zu untersuchen, wurde für diese Arbeit ein transgenes Mausmodell verwendet. In der Literatur wurden bereits zahlreiche genetisch modifizierte Mausmodelle beschrieben, die erfolgreich zur Untersuchung der Effekte eines miRNA-Knockouts im Kontext von Herzrhythmusstörungen eingesetzt wurden.[265,266] Im Vergleich zu größeren Tiermodellen wie dem Schwein oder dem Hund, weisen Mäuse größere anatomische und physiologische Unterschiede gegenüber dem menschlichen Organismus auf.[109] Dennoch bieten die vielfältigen Methoden zur Untersuchung der murinen Elektrophysiologie im Herzen und die Möglichkeiten zur Erschaffung transgener Modelle optimale Voraussetzungen zur Untersuchung unserer Fragestellung.[109] Das miR-144-5p Knockout-Mausmodell eignet sich als Modellorganismus insbesondere für initiale Untersuchungen zu den Auswirkungen einer Herabregulation der miR-144-5p auf die kardiale Elektrophysiologie und Remodeling. Es sollte jedoch beachtet werden, dass Studien am Kleintiermodell lediglich als Ausgangspunkt für die Forschung dienen, da im Rahmen der Translation weitere Untersuchungen an größeren Modellorganismen sowie an humanem Gewebe erforderlich sind.[109]

Das für die Untersuchungen eingesetzte Knockout-Mausmodell wies einen spezifischen Genknockout für das miR-144/451-Cluster auf, welcher mithilfe des Cre-*loxP* Systems geschaffen wurde. Durch genetische Modifikation wurden *loxP*-Sequenzen ins Mausgenom integriert, welche das zu entfernende DNA-Fragment (in diesem Fall die Gene des miR-144/451-Clusters) flankierten. Anschließend wurden die Tiere mit einer weiteren transgenen Maus verpaart, welche die sogenannte Cre-Rekombinase exprimierte. Die Cre-Rekombinase ist ein Enzym, das *loxP*-Sequenzen erkennt und dazwischenliegende Gensequenzen gezielt herausschneidet.[132] In dem verwendeten Mausmodell resultierte der besagte Ansatz in einem Knockout der miR-144 sowie der benachbarten miR-451. Eine Analyse des kardialen microRNA-Profils der Versuchstiere mittels qPCR konnte das vollständige Fehlen der miR-144-5p sowie der miR-451-3p im Gewebe aller vier Herzregionen der KO-Tiere bestätigen, was zeigt, dass der gewünschte Knockout im Genom der Versuchstiere vollständig vorlag. Die heterozygoten Tiere wiesen entsprechend ihres Genotyps eine Rest-Expression der beiden miRNAs in allen Herzregionen auf.

Eine alternative Methode zur Herabregulation der miRNA-Expression bietet die systemische Verabreichung von miRNA-Antagonisten (z.B. miRNA-Inhibitoren). Auf diese Herangehensweise wurde im Rahmen der Pilotstudie zurückgegriffen. Ein Gen-Knockout bietet jedoch den Vorteil, dass das Risiko eines unzureichenden Knockdowns minimiert und Off-Target-Effekte vermieden werden können.[130,131,267,268] In vergangenen Studien am miR-144/451-Knockout-Mausmodell zeigten sich jedoch noch diverse weitere Auswirkungen auf verschiedene Organsysteme[105,127,129,136,186,269], weshalb diese bei der Interpretation der Daten unbedingt berücksichtigt werden sollten.

Eine potenzielle Einschränkung des vorgestellten Mausmodells ist das Doppel-KO der miR-144-5p mit der miR-451-3p im Rahmen des miR-144/451-Clusters (vgl. Kapitel 1.2.3). Eine Beeinflussung des Phänotyps durch den Knockout der miR-451 kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, zumal bekannt ist, dass beide miRNAs individuelle Effekte vermitteln, welche sich bei einer gemeinsamen Überexpression sogar synergistisch verstärken können.[95] Bisherige Studien am miR-144/451 Knockout-Mausmodell beschäftigten sich maßgeblich mit verschiedenen Modellen der myokardialen Ischämie. Dabei stellte sich heraus, dass die miR-451 vorrangig über die Regulation von oxidativem Stress[101] und Autophagie-Prozessen[270] wirkt, wohingegen eine Herabregulation der miR-144 vor allem fibrotische Umbauprozesse, Apoptose sowie Inflammation im Herzen fördert.[102,137] Dies verdeutlicht nicht nur die Vielfalt der kardioprotektiven Mechanismen des miR-144/451-Clusters, sondern auch die Komplexität des miRNA-Netzwerks. Die selektive Wirkung eines miR-144-5p-Inhibitors

führte bei Mäusen im Rahmen der Pilotstudie (vgl. Kapitel 1.5.2) zu einer LA-Dilatation und einer gesteigerten Vulnerabilität für atriale tachykarde Rhythmusstörungen. Die miR-144-5p Knockout-Tiere, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, zeigten einen vergleichbaren Phänotyp, was darauf hindeutet, dass die Herabregulation der miR-144 als wahrscheinlichste Ursache für die beobachteten Veränderungen anzusehen ist. Im Zuge einer PubMed Literaturrecherche zur miR-451 konnten zudem keine relevanten Hinweise auf eine bekannte direkte Interaktion mit den Zielgenen oder Signalwegen der mir-144-5p festgestellt werden, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden (Stand: 06.07.2025). Lediglich bei den Zielgenen MARCKS[271] und RICTOR[272] kann ein möglicher Einfluss der miR-451 nicht ausgeschlossen werden. Um potenzielle Effekte der miR-451 sicher ausschließen zu können, wäre die Etablierung eines Mausmodells mit selektivem Knockout der miR-144 erforderlich. Doch auch Knock-In-Strategien könnten eine detailliertere Analyse der isolierten Effekte beider miRNAs ermöglichen.

4.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung mittels transvenöser elektrischer Stimulation

Für die elektrophysiologische Untersuchung der Versuchstiere wurde die Methode der transvenösen elektrischen Stimulation eingesetzt, da diese gut etabliert ist und Protokolle eine standardisierte Durchführung ermöglichen.[141,142] Dabei wurde ein achtpoliger EP-Katheter über die rechte Jugularvene in die Kammern des rechten Herzens eingeführt, um mithilfe elektrischer Stimulationen gezielt VHF-Episoden zu induzieren.[125] Die Methode eignet sich ideal zur Untersuchung eines Knockouts als potenziellen Vulnerabilitätsfaktor für VHF, da Wildtyp-Mäuse ohne zusätzlichen Vulnerabilitätsfaktor in der Regel keine VHF-Episoden entwickeln.[125,149] Zudem ermöglicht die intrakardiale Position des Katheters eine präzisere Reizableitung, im Vergleich zu einer transösophagealen Ableitung.[141] Ein Nachteil der transvenösen Herangehensweise ist jedoch die Invasivität, mit dem Risiko, dass einzelne Versuchstiere vor Abschluss der Untersuchung verbluten.[141] Eine alternative Herangehensweise stellt die transösophageale Stimulation des Atriums dar.[149] Zwar bietet diese Methode Vorteile hinsichtlich der geringeren Invasivität und umgeht mechanische Alterationen im Atrium, jedoch birgt sie das Problem einer übermäßigen Induktion von VHF.[149] In einer Studie von Schrickel et al. konnten mittels transösophagealer Stimulation bei 90% der WT-Mäuse auch ohne zusätzlichen Vulnerabilitätsfaktor VHF-Episoden induziert werden.[149] Zudem existiert kein standardisiertes Protokoll, welches reproduzierbare Ergebnisse

zwischen verschiedenen Mausmodellen gewährleisten könnte[273], was die Untersuchung von Risikofaktoren wie einem miRNA-Knockout insgesamt erschweren würde.

4.2.3 Fibrose-Quantifizierung mittels Masson-Trichrom-Färbung und semi-automatisierter computergestützter Analyse

Im klinischen Setting stehen verschiedene Verfahren zur Visualisierung und Quantifizierung von Fibrose zur Verfügung. Darunter zählen beispielsweise die kardiale Magnetresonanztomographie mittels „Late Gadolinium Enhancement (LGE MRI)[274] oder moderne elektro-anatomischer Mapping-Verfahren im Rahmen der VHF-Ablation[275]. Dennoch dient die Histologie als Goldstandard zur Quantifizierung von fibrotischem Gewebe auf mikroskopischer Ebene[157], weshalb wir uns für eine histologische Untersuchung des Herzgewebes mittels Masson-Trichrom-Färbung entschieden. Die Fibrose-Quantifizierung erfolgte mittels semi-automatisierter computergestützter Analyse, welche uns den Vorteil einer objektiven, Untersucher-unabhängigen Auswertung bot.

4.2.4 Relative Quantifizierung der Zielgen-Expression mittels qPCR

Die qPCR stellt eine etablierte Methode zur Quantifizierung von RNA dar. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um potenzielle Unterschiede in der mRNA-Expression spezifischer Zielgene, die einer Regulation durch die miR-144-5p unterliegen, festzustellen. In den durchgeführten qPCR-Analysen konnte nicht bei allen validierten Zielgenen der miR-144-5p ein signifikanter Expressionsunterschied auf Ebene des Transkriptoms festgestellt werden. Dabei darf jedoch nicht vergessen werden, dass Unterschiede in der mRNA-Expression ausschließlich einen Hinweis auf das Ausmaß des miRNA-bedingten mRNA-Abbaus liefern, welcher jedoch lediglich einen geringen Anteil der miRNA-mRNA-Interferenz ausmacht.[276] Da die Hauptwirkung von miRNAs durch eine Suppression der Translation erfolgt[276], ist es dennoch denkbar, dass auch Zielgene mit unveränderter mRNA-Expression einen Einfluss auf den Phänotyp der KO-Tiere ausübten. Im Rahmen der translationalen Suppression nimmt eine miRNA keinen direkten Einfluss auf die mRNA, sondern unterdrückt lediglich die Initiation des Translationsprozesses.[276] Verschiedene Studien verdeutlichen, dass supprimierte Zielgene sogar wieder zur Translation reaktiviert werden können.[276] Daher kann sich die Genexpression auf mRNA- und Proteinebene signifikant voneinander unterscheiden und potenzielle Expressionsunterschiede können bei ausschließlicher Betrachtung der mRNA-Ebene unentdeckt bleiben.[277,278] Hinzu kommt, dass biologische *in vitro* Analysen zur zellulären Proliferation, Invasion und Migration suggerieren, dass die Effekte des

miR-144/451-Clusters eng mit Phosphorylierung verknüpft sind und hauptsächlich post-transkriptionell vermittelt werden.[97] Auch Gao et al. konnten bei der Untersuchung der Effekte des miR-144/451-Clusters lediglich kleine Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene feststellen.[97] Mithilfe von Untersuchungen auf Proteinebene konnten jedoch weitere Effekte des miR-144-5p Knockouts auf die Translation aufgedeckt werden.[97] Um die Auswirkungen des miR-144-5p-Knockouts vollständig zu erfassen sind demzufolge weiterführende Analysen wie beispielsweise Western Blots zur Analyse der Proteinexpression erforderlich.

Es ist außerdem zu bedenken, dass das gesamte regionsspezifische Herzgewebe für die qPCRs verwendet wurde. Demzufolge ist es möglich, dass Zelltyp-spezifische Effekte der miR-144-5p in weniger stark vertretenen Zellpopulationen überlagert wurden. Untersuchungen am Mausherz haben gezeigt, dass Kardiomyozyten insgesamt lediglich 25-35% der Gesamtzellzahl ausmachen. Fibroblasten repräsentieren sogar nur unter 20% der nicht-kardiomyozytären Zellen im gesunden Mausherz.[279] Die mittels qPCR messbaren Expressionsunterschiede waren vorwiegend im RA lokalisiert, was auf Kammer-spezifische Wirkungsmechanismen der miR-144-5p hinweisen könnte.[280] Im Rahmen der histologischen Betrachtung fiel jedoch zudem ein deutlicher Größenunterschied zwischen den Vorhöfen auf. Während das linke Atrium (Hochdrucksystem) eine ausgeprägte myokardiale Wanddicke aufwies, zeigte die Wand des rechten Atriums (Niederdrucksystem) eine äußerst schwache Ausprägung und bestand teilweise lediglich aus einer einzigen Zellschicht (vgl. Abbildung 31). Potenzielle Veränderungen der Genexpression in Fibroblasten oder Makrophagen könnten außerhalb des RAs demnach durch die Dominanz der anderen Zelltypen maskiert worden sein. Da Fibroblasten und Makrophagen jedoch eine zentrale Rolle bei strukturellem Remodeling im Herzen einnehmen[56,281] und es denkbar wäre, dass die profibrotischen Effekte der miR-144-5p möglicherweise vorrangig über diese Zelltypen vermittelt werden, sind zukünftige Untersuchungen zu zellspezifischen Expressionsunterschieden auf mRNA- und Proteinebene von großem Interesse. Diese könnten beispielsweise mithilfe einer Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) oder im Rahmen einer Zellkultur realisiert werden.

4.3 Limitationen

Eine wesentliche Limitation des verwendeten Mausmodells stellt das Doppelknockout des miR-144/451-Clusters dar. Ein potenzieller Einfluss der miR-451 auf den Phänotyp kann nicht ausgeschlossen werden. Bei den Versuchstieren der Pilotstudie unter dem Einfluss eines selektiven miR-144-5p-Inhibitors konnte jedoch ein vergleichbarer

Phänotyp beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Effekte im miR-144-5p Knockout-Mausmodell wahrscheinlich vorrangig auf das Fehlen der miR-144-5p zurückzuführen sind.

Eine weitere Einschränkung betrifft die Unterschiede in den Gruppengrößen. Die Erhebung einzelner Messwerte war im Rahmen der EPU teilweise nicht möglich, wenn die intrinsische Herzfrequenz des Versuchstiers schneller war als die untersuchte Basiszykluslänge der Stimulationen. Aufgrund von Prozedur-assoziierten Komplikationen mussten zudem einzelne Tiere von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Auch das Fehlen von Western Blot-Analysen stellt eine Limitation dieser Arbeit dar, da nicht die gesamten Effekte der miRNA-abhängigen post-transkriptionellen Regulation erfasst wurden. Die Daten der qPCR reflektieren ausschließlich die Effekte des miRNA-abhängigen mRNA-Abbaus, die jedoch nur einen geringen Anteil der miRNA-mRNA-Interferenz ausmacht.[276]

Darüber hinaus spiegeln die Ergebnisse der qPCR lediglich die durchschnittlichen Veränderungen im gesamten Zellverband ab. Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass potenzielle Expressionsunterschiede in weniger stark vertretenen Zellpopulationen, wie beispielsweise Fibroblasten oder Makrophagen, überlagert wurden.

4.4 Ausblick und Relevanz

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein Knockout der miR-144-5p bei transgenen Mäusen zu einer signifikant **gesteigerten Vulnerabilität für atriale tachykarde Rhythmusstörungen** führt. Darüber hinaus zeigten miR-144-5p Knockout-Tiere eine **atriale Fibrose** in der histologischen Untersuchung sowie eine **Dilatation des linken Atriums** in der Echokardiographie. Diese beiden für VHF charakteristischen Merkmale können maßgeblich zur Entstehung eines vulnerablen Substrats beitragen. Daher erscheint es plausibel, dass sie signifikant zur Entstehung des arrhythmogenen Phänotyps der KO-Tiere beigetragen haben könnten. Überdies ist es uns gelungen, verschiedene **Zielgene der miR-144-5p** zu validieren, die mit Remodeling-Prozessen im Herzen assoziiert sind. Bei KO-Tieren wurde zudem eine **signifikant gesteigerte mRNA-Expression** der Zielgene **WNT5A**, **Smad6**, **NOS1AP** und **MARCKS**, jeweils auf atrialer oder ventrikulärer Ebene, beobachtet, was auf ein Fehlen von miRNA-bedingtem mRNA-Abbau hinweist. Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit die Relevanz einer **Herabregulation der miR-144-5p als Risikofaktor für strukturelles Remodeling und VHF** im transgenen Mausmodell. In Anbetracht der signifikanten

Herabregulation der miR-144-5p im Herzgewebe von Patienten mit VHF erscheint es plausibel, dass die miR-144-5p auch bei diesen Patienten an der Regulation struktureller Remodeling-Prozesse und der Entstehung von Arrhythmien beteiligt sein könnte.

Die Erkenntnisse dieser Dissertation stellen jedoch lediglich ein einzelnes Puzzlestück innerhalb der komplexen Pathophysiologie von VHF dar. Es ist nicht möglich die zugrundeliegenden Mechanismen dieser komplexen Erkrankung in ihrer Gesamtheit zu erfassen, indem ausschließlich die Effekte eines isolierten miRNA-Knockouts analysiert werden. Dennoch bieten die Daten dieser Arbeit neue und interessante Einblicke in die Mechanismen des strukturellen Remodelings bei VHF. Darüber hinaus bilden sie eine wertvolle Grundlage für zukünftige Forschungsvorhaben, die darauf abzielen, bestehende Wissens- und Verständnislücken zu schließen.

Eine Ergänzung der qPCR-Daten mithilfe von Western Blots, würde beispielsweise ermöglichen die Effekte der miRNA-mRNA-Interferenz vollständig abzubilden. Untersuchungen zur Expression sowie zum Aktivitätszustand von Schlüsselfaktoren der involvierten Signalwege könnten zusätzliche Einblicke in die genauen Mechanismen bieten. Um zu analysieren, ob die Auswirkungen der miR-144-5p auf bestimmte Zelltypen, wie etwa Fibroblasten oder Makrophagen, konzentriert sind und ob potenzielle Expressionsunterschiede in weniger stark vertretenen Zellpopulationen im Rahmen der qPCR-Analysen möglicherweise überlagert wurden, würde sich zudem eine Zellsortierung der kardialen Zellen mittels FACS mit einer anschließenden Western Blot-Analyse eignen. Auf diese Weise könnte außerdem erfasst werden, inwiefern ein Knockout der miR-144-5p die zelluläre Komposition des Gewebes beeinflusst, beispielsweise durch die Rekrutierung von Makrophagen oder eine verstärkte Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten. Darüber hinaus könnten immunhistochemische Färbungen Informationen über die Zusammensetzung des fibrotischen Gewebes und die Beteiligung verschiedener Zelltypen ermöglichen. Insbesondere die Expression der Kollagene I und III sowie von α-SMA als Aktivitätsmarker für Fibrose und differenzierte Myofibroblasten wären hierbei von Interesse.[76,282] Mithilfe von Knock-in Modellen könnte darüber hinaus festgestellt werden, ob eine Wiederherstellung der miR-144-5p Expression die Ausprägung des arrhythmogenen Phänotyps bei Mäusen verhindern oder den Schweregrad der strukturellen Veränderungen im Herzen einschränken kann.

Die Verabreichung eines miR-144-5p-Inhibitors führte bei humanen embryonalen Stammzellen zu einer Verlängerung der APD *in vitro* und bei miR-144-5p KO-Tieren war mit NOS1AP ein Zielgen für elektrisches Remodeling signifikant hochreguliert. Demzufolge erscheint es sinnvoll, zukünftig auch den potenziellen Beitrag von

elektrischem Remodeling im miR-144-5p Knockout-Mausmodell genauer zu untersuchen. Zum Beispiel wären eine Untersuchung der Glanzstreifen sowie das „High Resolution Optical Mapping“-Verfahren von Interesse. Mithilfe fluoreszierender Indikatoren könnte dabei eine hochauflösende Analyse der zellulären elektrischen Aktivität, der Repolarisation sowie des Kalziumhandlings ermöglichet werden.[283,284] Des Weiteren könnte die Patch-Clamp-Technik präzisere Einblicke in die zelluläre Elektrophysiologie auf Ebene des Membranpotentials sowie in die Funktion und Expression relevanter Ionenkanäle ermöglichen.[285] Außerdem wären zukünftige Untersuchungen unter Verwendung von Telemetrie-Systemen sinnvoll, um eine Anästhesie-unabhängige Aufzeichnung von Langzeit-EKG-Daten bei wachen Tieren zu ermöglichen.[145]

Kausale Therapieansätze für VHF sind ein dringend benötigtes Instrument im Rahmen des Krankheitsmanagements. Sie könnten entscheidend zur Vermeidung von Komplikationen sowie zur Reduktion der Krankheitslast beitragen. Angesichts der Tatsache, dass die miR-144-5p bei Patienten mit VHF herabreguliert ist, erscheint es plausibel, dass die Beeinflussung der miRNA-Expression einen potenziellen Angriffspunkt für therapeutische Interventionen bieten könnte. Sollte sich beispielsweise herausstellen, dass eine Wiederherstellung der miR-144-5p Expression strukturelle Remodeling-Prozesse abschwächen oder sogar umkehren kann, so könnte bei Patienten mit einem verminderten miR-144-5p-Spiegel eine therapeutische Gegenregulation in Erwägung gezogen werden. Dies könnte möglicherweise durch den Einsatz von miRNA-Mimics erzielt werden.[87] Eine solche Behandlungsmöglichkeit könnte die Effektivität der Therapie fördern, die Morbidität und Mortalität verringern sowie die Lebensqualität von Patienten mit VHF verbessern. Bevor jedoch die Praktikabilität von therapeutischen Interventionen geprüft werden kann, gilt es zunächst die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Beobachtungen zu vertiefen und an geeigneten Großtiermodellen zu validieren.

Literaturverzeichnis

1 Wyndham, C. R. Atrial fibrillation: the most common arrhythmia. *Tex Heart Inst J* **27**, 257-267 (2000).

2 Chugh, S. S. *et al.* Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* **129**, 837-847 (2014). https://doi.org:10.1161/circulationaha.113.005119

3 Goette, A. *et al.* EHRA White Paper: knowledge gaps in arrhythmia management-status 2019. *Europace* **21**, 993-994 (2019). https://doi.org:10.1093/europace/euz055

4 Krahn, A. D., Manfreda, J., Tate, R. B., Mathewson, F. A. & Cuddy, T. E. The natural history of atrial fibrillation: incidence, risk factors, and prognosis in the Manitoba Follow-Up Study. *Am J Med* **98**, 476-484 (1995). https://doi.org:10.1016/s0002-9343(99)80348-9

5 Woods, C. E. & Olgin, J. Atrial fibrillation therapy now and in the future: drugs, biologicals, and ablation. *Circ Res* **114**, 1532-1546 (2014). https://doi.org:10.1161/circresaha.114.302362

6 Nattel, S. *et al.* Early management of atrial fibrillation to prevent cardiovascular complications. *Eur Heart J* **35**, 1448-1456 (2014). https://doi.org:10.1093/eurheartj/ehu028

7 Bhatt, H. V. & Fischer, G. W. Atrial Fibrillation: Pathophysiology and Therapeutic Options. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **29**, 1333-1340 (2015). https://doi.org:10.1053/j.jvca.2015.05.058

8 Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004). https://doi.org:10.1016/s0092-8674(04)00045-5

9 Weckbach, L. T., Grabmaier, U., Clauss, S. & Wakili, R. MicroRNAs as a diagnostic tool for heart failure and atrial fibrillation. *Curr Opin Pharmacol* **27**, 24-30 (2016). https://doi.org:10.1016/j.coph.2016.01.001

10 Clauss, S., Sinner, M. F., Kääb, S. & Wakili, R. The Role of MicroRNAs in Antiarrhythmic Therapy for Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev* **4**, 146-155 (2015). https://doi.org:10.15420/aer.2015.4.3.146

11 Kiyosawa, N. *et al.* Exploratory Analysis of Circulating miRNA Signatures in Atrial Fibrillation Patients Determining Potential Biomarkers to Support Decision-Making in Anticoagulation and Catheter Ablation. *Int J Mol Sci* **21** (2020). https://doi.org:10.3390/ijms21072444

12 Leyton-Mange, J. S. *et al.* Rapid cellular phenotyping of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes using a genetically encoded fluorescent voltage sensor. *Stem Cell Reports* **2**, 163-170 (2014). https://doi.org:10.1016/j.stemcr.2014.01.003

13 Joglar, J. A. *et al.* 2023 ACC/AHA/ACCP/HRS Guideline for the Diagnosis and Management of Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* **149**, e1-e156 (2024). https://doi.org:10.1161/cir.0000000000001193

14 Tsao, C. W. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **147**, e93-e621 (2023). https://doi.org:10.1161/cir.0000000000001123

15 Cheng, S. *et al.* Global burden of atrial fibrillation/atrial flutter and its attributable risk factors from 1990 to 2021. *Europace* **26** (2024). https://doi.org:10.1093/europace/euae195

16 Roth, G. A. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* **76**, 2982-3021 (2020). https://doi.org:10.1016/j.jacc.2020.11.010

17 Hindricks, G. *et al.* 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special

contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J* **42**, 373-498 (2021). https://doi.org:10.1093/eurheartj/ehaa612

18 Krijthe, B. P. *et al.* Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J* **34**, 2746-2751 (2013). https://doi.org:10.1093/eurheartj/eht280

19 Zoni-Berisso, M., Lercari, F., Carazza, T. & Domenicucci, S. Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol* **6**, 213-220 (2014). https://doi.org:10.2147/clep.S47385

20 Van Gelder, I. C. *et al.* 2024 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J* (2024). https://doi.org:10.1093/eurheartj/ehae176

21 Go, A. S. *et al.* Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *Jama* **285**, 2370-2375 (2001). https://doi.org:10.1001/jama.285.18.2370

22 Camm, A. J. *et al.* Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace* **12**, 1360-1420 (2010). https://doi.org:10.1093/europace/euq350

23 Wang, T. J. *et al.* A risk score for predicting stroke or death in individuals with new-onset atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study. *Jama* **290**, 1049-1056 (2003). https://doi.org:10.1001/jama.290.8.1049

24 Wattigney, W. A., Mensah, G. A. & Croft, J. B. Increasing trends in hospitalization for atrial fibrillation in the United States, 1985 through 1999: implications for primary prevention. *Circulation* **108**, 711-716 (2003). https://doi.org:10.1161/01.Cir.0000083722.42033.0a

25 Wakili, R., Voigt, N., Kääb, S., Dobrev, D. & Nattel, S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* **121**, 2955-2968 (2011). https://doi.org:10.1172/jci46315

26 Camm, A. J. *et al.* Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* **31**, 2369-2429 (2010). https://doi.org:10.1093/eurheartj/ehq278

27 Friberg, L., Hammar, N. & Rosenqvist, M. Stroke in paroxysmal atrial fibrillation: report from the Stockholm Cohort of Atrial Fibrillation. *Eur Heart J* **31**, 967-975 (2010). https://doi.org:10.1093/eurheartj/ehn599

28 Potpara, T. S., Polovina, M. M., Marinkovic, J. M. & Lip, G. Y. A comparison of clinical characteristics and long-term prognosis in asymptomatic and symptomatic patients with first-diagnosed atrial fibrillation: the Belgrade Atrial Fibrillation Study. *Int J Cardiol* **168**, 4744-4749 (2013). https://doi.org:10.1016/j.ijcard.2013.07.234

29 Siontis, K. C. *et al.* Typical, atypical, and asymptomatic presentations of new-onset atrial fibrillation in the community: Characteristics and prognostic implications. *Heart Rhythm* **13**, 1418-1424 (2016). https://doi.org:10.1016/j.hrthm.2016.03.003

30 Fuster, V. *et al.* 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol* **57**, e101-198 (2011). https://doi.org:10.1016/j.jacc.2010.09.013

31 McCabe, P. J., Rhudy, L. M. & DeVon, H. A. Patients' experiences from symptom onset to initial treatment for atrial fibrillation. *J Clin Nurs* **24**, 786-796 (2015). https://doi.org:10.1111/jocn.12708

32 Goette, A. *et al.* EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: definition, characterization, and clinical implication. *Europace* **18**, 1455-1490 (2016). https://doi.org:10.1093/europace/euw161

33 de Vos, C. B. *et al.* Progression from paroxysmal to persistent atrial fibrillation clinical correlates and prognosis. *J Am Coll Cardiol* **55**, 725-731 (2010). https://doi.org:10.1016/j.jacc.2009.11.040

34 Aronow, W. S. & Banach, M. Atrial Fibrillation: The New Epidemic of the Ageing World. *J Atr Fibrillation* **1**, 154 (2009). https://doi.org:10.4022/jafib.154

35 Mairesse, G. H. *et al.* Screening for atrial fibrillation: a European Heart Rhythm Association (EHRA) consensus document endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), and Sociedad Latinoamericana de Estimulacion Cardiaca y Electrofisiologia (SOLAECE). *Europace* **19**, 1589-1623 (2017). https://doi.org:10.1093/europace/eux177

36 Steinberg, J. S., O'Connell, H., Li, S. & Ziegler, P. D. Thirty-Second Gold Standard Definition of Atrial Fibrillation and Its Relationship With Subsequent Arrhythmia Patterns: Analysis of a Large Prospective Device Database. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **11**, e006274 (2018). https://doi.org:10.1161/circep.118.006274

37 Jabaudon, D., Sztajzel, J., Sievert, K., Landis, T. & Sztajzel, R. Usefulness of ambulatory 7-day ECG monitoring for the detection of atrial fibrillation and flutter after acute stroke and transient ischemic attack. *Stroke* **35**, 1647-1651 (2004). https://doi.org:10.1161/01.STR.0000131269.69502.d9

38 Brignole, M. *et al.* Indications for the use of diagnostic implantable and external ECG loop recorders. *Europace* **11**, 671-687 (2009). https://doi.org:10.1093/europace/eup097

39 Heijman, J., Guichard, J. B., Dobrev, D. & Nattel, S. Translational Challenges in Atrial Fibrillation. *Circ Res* **122**, 752-773 (2018). https://doi.org:10.1161/circresaha.117.311081

40 Connolly, S. J. *et al.* Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* **361**, 1139-1151 (2009). https://doi.org:10.1056/NEJMoa0905561

41 Ruff, C. T. *et al.* Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **383**, 955-962 (2014). https://doi.org:10.1016/s0140-6736(13)62343-0

42 Israel, C. W., Grönefeld, G., Ehrlich, J. R., Li, Y. G. & Hohnloser, S. H. Long-term risk of recurrent atrial fibrillation as documented by an implantable monitoring device: implications for optimal patient care. *J Am Coll Cardiol* **43**, 47-52 (2004). https://doi.org:10.1016/j.jacc.2003.08.027

43 Jahangir, A. *et al.* Long-term progression and outcomes with aging in patients with lone atrial fibrillation: a 30-year follow-up study. *Circulation* **115**, 3050-3056 (2007). https://doi.org:10.1161/circulationaha.106.644484

44 Wijesurendra, R. S. & Casadei, B. Mechanisms of atrial fibrillation. *Heart* **105**, 1860-1867 (2019). https://doi.org:10.1136/heartjnl-2018-314267

45 Willems, S. *et al.* [Interventional therapy of atrial fibrillation: possibilities and limitations]. *Dtsch Med Wochenschr* **135 Suppl 2**, S48-54 (2010). https://doi.org:10.1055/s-0030-1249209

46 Gaita, F. *et al.* Long-term clinical results of 2 different ablation strategies in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **1**, 269-275 (2008). https://doi.org:10.1161/circep.108.774885

47 Dewire, J. & Calkins, H. Update on atrial fibrillation catheter ablation technologies and techniques. *Nat Rev Cardiol* **10**, 599-612 (2013). https://doi.org:10.1038/nrcardio.2013.121

48 Mack, M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol* **68-69**, 106-121 (2018). https://doi.org:10.1016/j.matbio.2017.11.010

49 Chavula, T., To, S. & Agarwal, S. K. Cadherin-11 and its role in tissue fibrosis. *Cells Tissues Organs* (2022). https://doi.org:10.1159/000525359

50 Gillis, A. M., Krahn, A. D., Skanes, A. C. & Nattel, S. Management of atrial fibrillation in the year 2033: new concepts, tools, and applications leading to personalized medicine. *Can J Cardiol* **29**, 1141-1146 (2013). https://doi.org:10.1016/j.cjca.2013.07.006

51 Nerbonne, J. M. & Kass, R. S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* **85**, 1205-1253 (2005). https://doi.org:10.1152/physrev.00002.2005

52 Murphy, C. & Lazzara, R. Current concepts of anatomy and electrophysiology of the sinus node. *J Interv Card Electrophysiol* **46**, 9-18 (2016). https://doi.org:10.1007/s10840-016-0137-2

53 Nattel, S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* **415**, 219-226 (2002). https://doi.org:10.1038/415219a

54 Kennedy, A. *et al.* The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse. *Crit Care Nurs Clin North Am* **28**, 269-279 (2016). https://doi.org:10.1016/j.cnc.2016.04.001

55 Verheule, S. & Schotten, U. Electrophysiological Consequences of Cardiac Fibrosis. *Cells* **10** (2021). https://doi.org:10.3390/cells10113220

56 Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P. & Goette, A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* **91**, 265-325 (2011). https://doi.org:10.1152/physrev.00031.2009

57 Iwasaki, Y. K., Nishida, K., Kato, T. & Nattel, S. Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management. *Circulation* **124**, 2264-2274 (2011). https://doi.org:10.1161/circulationaha.111.019893

58 Nattel, S., Burstein, B. & Dobrev, D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **1**, 62-73 (2008). https://doi.org:10.1161/circep.107.754564

59 Dobrev, D. & Nattel, S. New antiarrhythmic drugs for treatment of atrial fibrillation. *Lancet* **375**, 1212-1223 (2010). https://doi.org:10.1016/s0140-6736(10)60096-7

60 Burashnikov, A. & Antzelevitch, C. Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. *Circulation* **107**, 2355-2360 (2003). https://doi.org:10.1161/01.Cir.0000065578.00869.7c

61 Calkins, H. *et al.* 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: Executive summary. *Europace* **20**, 157-208 (2018). https://doi.org:10.1093/europace/eux275

62 Calkins, H. *et al.* HRS/EHRA/ECAS expert Consensus Statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: recommendations for personnel, policy, procedures and follow-up. A report of the Heart Rhythm Society (HRS) Task Force on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. *Heart Rhythm* **4**, 816-861 (2007). https://doi.org:10.1016/j.hrthm.2007.04.005

63 Wakili, R., Clauß, S. & Kääb, S. [Molecular mechanisms of atrial fibrillation: potential role of microRNAs as new therapeutic targets and potential biomarkers]. *Herz* **37**, 166-171 (2012). https://doi.org:10.1007/s00059-012-3594-0

64 Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S. & Yeh, Y. H. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* **87**, 425-456 (2007). https://doi.org:10.1152/physrev.00014.2006

65 Sun, H., Gaspo, R., Leblanc, N. & Nattel, S. Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation* **98**, 719-727 (1998). https://doi.org:10.1161/01.cir.98.7.719

66 Andrade, J., Khairy, P., Dobrev, D. & Nattel, S. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ Res* **114**, 1453-1468 (2014). https://doi.org:10.1161/circresaha.114.303211

67 Verheule, S. *et al.* Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* **94**, 1458-1465 (2004). https://doi.org:10.1161/01.RES.0000129579.59664.9d

68 Burstein, B. & Nattel, S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* **51**, 802-809 (2008). https://doi.org:10.1016/j.jacc.2007.09.064

69 Nattel, S. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol* **3**, 425-435 (2017). https://doi.org:10.1016/j.jacep.2017.03.002

70 Harada, M. & Nattel, S. Implications of Inflammation and Fibrosis in Atrial Fibrillation Pathophysiology. *Card Electrophysiol Clin* **13**, 25-35 (2021). https://doi.org:10.1016/j.ccep.2020.11.002

71 Działo, E., Tkacz, K. & Błyszczuk, P. Crosstalk between the TGF-β and WNT signalling pathways during cardiac fibrogenesis. *Acta Biochim Pol* **65**, 341-349 (2018). https://doi.org:10.18388/abp.2018_2635

72 Yousefi, F. *et al.* TGF-β and WNT signaling pathways in cardiac fibrosis: non-coding RNAs come into focus. *Cell Commun Signal* **18**, 87 (2020). https://doi.org:10.1186/s12964-020-00555-4

73 Lijnen, P. J., Petrov, V. V. & Fagard, R. H. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab* **71**, 418-435 (2000). https://doi.org:10.1006/mgme.2000.3032

74 Serra, J. L. & Bendersky, M. Atrial fibrillation and renin-angiotensin system. *Ther Adv Cardiovasc Dis* **2**, 215-223 (2008). https://doi.org:10.1177/1753944708092111

75 Cao, W. *et al.* Cadherin-11 Deficiency Attenuates Ang-II-Induced Atrial Fibrosis and Susceptibility to Atrial Fibrillation. *J Inflamm Res* **14**, 2897-2911 (2021). https://doi.org:10.2147/jir.S306073

76 Zhang, Q. *et al.* Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 78 (2022). https://doi.org:10.1038/s41392-022-00925-z

77 Qin, W., Cao, L. & Massey, I. Y. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis. *Mol Cell Biochem* **476**, 4045-4059 (2021). https://doi.org:10.1007/s11010-021-04219-w

78 Yang, D. C. *et al.* Tackling MARCKS-PIP3 circuit attenuates fibroblast activation and fibrosis progression. *Faseb j* **33**, 14354-14369 (2019). https://doi.org:10.1096/fj.201901705R

79 Horowitz, J. C. *et al.* Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J Biol Chem* **279**, 1359-1367 (2004). https://doi.org:10.1074/jbc.M306248200

80 Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**, 843-854 (1993). https://doi.org:10.1016/0092-8674(93)90529-y

81 Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**, e85 (2005). https://doi.org:10.1371/journal.pbio.0030085

82 Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**, 92-105 (2009). https://doi.org:10.1101/gr.082701.108

83 Vidigal, J. A. & Ventura, A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol* **25**, 137-147 (2015). https://doi.org:10.1016/j.tcb.2014.11.004

84 Kooshkaki, O. *et al.* MiR-144: A New Possible Therapeutic Target and Diagnostic/Prognostic Tool in Cancers. *Int J Mol Sci* **21** (2020). https://doi.org:10.3390/ijms21072578

85 Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. & Kim, Y. Y. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 1231-1243 (2010). https://doi.org:10.1016/j.bbamcr.2010.06.013

86 Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 509-524 (2014). https://doi.org:10.1038/nrm3838

87 Wojciechowska, A., Braniewska, A. & Kozar-Kamińska, K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv Clin Exp Med* **26**, 865-874 (2017). https://doi.org:10.17219/acem/62915

88 Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233 (2009). https://doi.org:10.1016/j.cell.2009.01.002

89 Dawson, K. *et al.* MicroRNA29: a mechanistic contributor and potential biomarker in atrial fibrillation. *Circulation* **127**, 1466-1475, 1475e1461-1428 (2013). https://doi.org:10.1161/circulationaha.112.001207

90 Shan, H. *et al.* Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. *Cardiovasc Res* **83**, 465-472 (2009). https://doi.org:10.1093/cvr/cvp130

91 Seo, H. H. *et al.* Multipoint targeting of TGF-β/Wnt transactivation circuit with microRNA 384-5p for cardiac fibrosis. *Cell Death Differ* **26**, 1107-1123 (2019). https://doi.org:10.1038/s41418-018-0187-3

92 Ma, J., Chen, Q. & Ma, S. Left atrial fibrosis in atrial fibrillation: Mechanisms, clinical evaluation and management. *J Cell Mol Med* **25**, 2764-2775 (2021). https://doi.org:10.1111/jcmm.16350

93 Fitzgerald, K. *et al.* A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med* **376**, 41-51 (2017). https://doi.org:10.1056/NEJMoa1609243

94 Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S. & Ghaffari, S. H. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* **234**, 5451-5465 (2019). https://doi.org:10.1002/jcp.27486

95 Zhang, X. *et al.* Synergistic effects of the GATA-4-mediated miR-144/451 cluster in protection against simulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death. *J Mol Cell Cardiol* **49**, 841-850 (2010). https://doi.org:10.1016/j.yjmcc.2010.08.007

96 Chen, J. Y. *et al.* MiR-144-5p/CCL12 Signaling Axis Modulates Ischemic Preconditioning-Mediated Cardio-protection by Reducing Cell Viability, Enhancing Cell Apoptosis, Fibrosis, and Pyroptosis. *Appl Biochem Biotechnol* (2022). https://doi.org:10.1007/s12010-022-04208-9

97 Gao, Z. *et al.* miR-144/451 cluster plays an oncogenic role in esophageal cancer by inhibiting cell invasion. *Cancer Cell Int* **18**, 184 (2018). https://doi.org:10.1186/s12935-018-0679-8

98 Velle-Forbord, T. *et al.* Circulating microRNAs as predictive biomarkers of myocardial infarction: Evidence from the HUNT study. *Atherosclerosis* **289**, 1-7 (2019). https://doi.org:10.1016/j.atherosclerosis.2019.07.024

99 E, L., Jiang, H. & Lu, Z. MicroRNA-144 attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting FOXO1. *Exp Ther Med* **17**, 2152-2160 (2019). https://doi.org:10.3892/etm.2019.7161

100 Yang, G. *et al.* Upregulation of miR-144-3p protects myocardial function from ischemia-reperfusion injury through inhibition of TMEM16A Ca(2+)-activated chloride channel. *Hum Cell* **34**, 360-371 (2021). https://doi.org:10.1007/s13577-020-00482-z

101 Wang, X. *et al.* Loss of the miR-144/451 cluster impairs ischaemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting Rac-1. *Cardiovasc Res* **94**, 379-390 (2012). https://doi.org:10.1093/cvr/cvs096

102 He, Q. *et al.* Loss of miR-144 signaling interrupts extracellular matrix remodeling after myocardial infarction leading to worsened cardiac function. *Sci Rep* **8**, 16886 (2018). https://doi.org:10.1038/s41598-018-35314-6

103 Hao, H. *et al.* Atrial myocyte-derived exosomal microRNA contributes to atrial fibrosis in atrial fibrillation. *J Transl Med* **20**, 407 (2022). https://doi.org:10.1186/s12967-022-03617-y

104 Xu, Y. *et al.* circ-AKT3 aggravates renal ischaemia-reperfusion injury via regulating miR-144-5p /Wnt/β-catenin pathway and oxidative stress. *J Cell Mol Med* **26**, 1766-1775 (2022). https://doi.org:10.1111/jcmm.16072

105 Zhang, L. Y. *et al.* MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN. *Carcinogenesis* **34**, 454-463 (2013). https://doi.org:10.1093/carcin/bgs346

106 Wang, J. *et al.* Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Acta Pharm Sin B* **12**, 18-32 (2022). https://doi.org:10.1016/j.apsb.2021.07.023

107 Shaheen, N. *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Cell Sheets Expressing Genetically Encoded Voltage Indicator for Pharmacological and Arrhythmia Studies. *Stem Cell Reports* **10**, 1879-1894 (2018). https://doi.org:10.1016/j.stemcr.2018.04.006

108 Shinnawi, R. *et al.* Monitoring Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes with Genetically Encoded Calcium and Voltage Fluorescent Reporters. *Stem Cell Reports* **5**, 582-596 (2015). https://doi.org:10.1016/j.stemcr.2015.08.009

109 Schüttler, D. *et al.* Animal Models of Atrial Fibrillation. *Circ Res* **127**, 91-110 (2020). https://doi.org:10.1161/circresaha.120.316366

110 Hulsmans, M. *et al.* Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* **169**, 510-522.e520 (2017). https://doi.org:10.1016/j.cell.2017.03.050

111 Nishida, K., Michael, G., Dobrev, D. & Nattel, S. Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities. *Europace* **12**, 160-172 (2010). https://doi.org:10.1093/europace/eup328

112 Clauss, S. *et al.* Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals. *Nat Rev Cardiol* **16**, 457-475 (2019). https://doi.org:10.1038/s41569-019-0179-0

113 Frydrychowski, P., Michałek, M., Sławuta, A. & Noszczyk-Nowak, A. Large animals as models of atrial fibrillation. *Adv Clin Exp Med* **29**, 757-767 (2020). https://doi.org:10.17219/acem/122130

114 Kaese, S. & Verheule, S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol* **3**, 345 (2012). https://doi.org:10.3389/fphys.2012.00345

115 Vandamme, T. F. Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci* **6**, 2-9 (2014). https://doi.org:10.4103/0975-7406.124301

116 Waterston, R. H. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562 (2002). https://doi.org:10.1038/nature01262

117 Charpentier, F., Demolombe, S. & Escande, D. Cardiac channelopathies: from men to mice. *Ann Med* **36 Suppl 1**, 28-34 (2004). https://doi.org:10.1080/17431380410032508

118 Dobrev, D. & Wehrens, X. H. T. Mouse Models of Cardiac Arrhythmias. *Circ Res* **123**, 332-334 (2018). https://doi.org:10.1161/circresaha.118.313406

119 Appleton, G. O. *et al.* Determinants of cardiac electrophysiological properties in mice. *J Interv Card Electrophysiol* **11**, 5-14 (2004). https://doi.org:10.1023/b:Jice.0000035922.14870.56

120 Garrey, W. The nature of fibrillary contractions of the heart: its relation to tissue mass and form. *Am J. Physiol.* **33**, 397-414 (1914).

121 Byrd, G. D. *et al.* Importance of geometry and refractory period in sustaining atrial fibrillation: testing the critical mass hypothesis. *Circulation* **112**, I7-13 (2005). https://doi.org:10.1161/circulationaha.104.526210

122 Qu, Z. Critical mass hypothesis revisited: role of dynamical wave stability in spontaneous termination of cardiac fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H255-263 (2006). https://doi.org:10.1152/ajpheart.00668.2005

123 Sah, V. P. *et al.* Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *J Clin Invest* **103**, 1627-1634 (1999). https://doi.org:10.1172/jci6842

124 Wang, Y. X., Zheng, Y. M., Tan, Y. H. & Sheng, B. H. Effects of cycloprotobuxine-A on atrial fibrillation. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **18**, 245-250 (1997).

125 Wakimoto, H. *et al.* Induction of atrial tachycardia and fibrillation in the mouse heart. *Cardiovasc Res* **50**, 463-473 (2001). https://doi.org:10.1016/s0008-6363(01)00264-4

126 Lüss, I. *et al.* Expression of cardiac calcium regulatory proteins in atrium v ventricle in different species. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 1299-1314 (1999). https://doi.org:10.1006/jmcc.1999.0962

127 Rasmussen, K. D. *et al.* The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med* **207**, 1351-1358 (2010). https://doi.org:10.1084/jem.20100458

128 Fu, W. *et al.* Effect of miR-144-5p on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells by targeting RICTOR and its related mechanisms. *Exp Ther Med* **19**, 1817-1823 (2020). https://doi.org:10.3892/etm.2019.8369

129 Wu, F. *et al.* Deletion of the miR-144/451 cluster aggravates lethal sepsis-induced lung epithelial oxidative stress and apoptosis. *Ann Transl Med* **10**, 538 (2022). https://doi.org:10.21037/atm-22-1024

130 Diener, C., Keller, A. & Meese, E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends Genet* **38**, 613-626 (2022). https://doi.org:10.1016/j.tig.2022.02.006

131 Sarvestani, S. T. *et al.* Sequence-dependent off-target inhibition of TLR7/8 sensing by synthetic microRNA inhibitors. *Nucleic Acids Res* **43**, 1177-1188 (2015). https://doi.org:10.1093/nar/gku1343

132 Kim, H., Kim, M., Im, S. K. & Fang, S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* **34**, 147-159 (2018). https://doi.org:10.5625/lar.2018.34.4.147

133 Liu, J. *et al.* Integrin α5 Is Regulated by miR-218-5p in Endothelial Progenitor Cells. *J Am Soc Nephrol* **33**, 565-582 (2022). https://doi.org:10.1681/asn.2021020140

134 Sweeney, M. *et al.* Cardiomyocyte-Restricted Expression of IL11 Causes Cardiac Fibrosis, Inflammation, and Dysfunction. *Int J Mol Sci* **24** (2023). https://doi.org:10.3390/ijms241612989

135 Keefe, J. A., Hulsurkar, M. M., Reilly, S. & Wehrens, X. H. T. Mouse models of spontaneous atrial fibrillation. *Mamm Genome* (2022). https://doi.org:10.1007/s00335-022-09964-x

136 Yu, D. *et al.* miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3zeta. *Genes Dev* **24**, 1620-1633 (2010). https://doi.org:10.1101/gad.1942110

137 Li, J. *et al.* Intravenous miR-144 reduces left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* **113**, 36 (2018). https://doi.org:10.1007/s00395-018-0694-x

138 Yan, Y. *et al.* Identification of atrial fibrillation-associated microRNAs in left and right atria of rheumatic mitral valve disease patients. *Genes Genet Syst* **94**, 23-34 (2019). https://doi.org:10.1266/ggs.17-00043

139 Percie du Sert, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* **18**, e3000410 (2020). https://doi.org:10.1371/journal.pbio.3000410

140 National Research Council Committee for the Update of the Guide for the, C. & Use of Laboratory, A. in *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academies Press (US) Copyright © 2011, National Academy of Sciences., 2011).

141 Favere, K. *et al.* Cardiac electrophysiology studies in mice via the transjugular route: a comprehensive practical guide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **323**, H763-H773 (2022). https://doi.org:10.1152/ajpheart.00337.2022

142 Navarro-Garcia, J. A. *et al.* In Vivo Cardiac Electrophysiology in Mice: Determination of Atrial and Ventricular Arrhythmic Substrates. *Curr Protoc* **4**, e994 (2024). https://doi.org:10.1002/cpz1.994

143 Lee, J. M. *et al.* Prolonged atrial refractoriness predicts the onset of atrial fibrillation: A 12-year follow-up study. *Heart Rhythm* **13**, 1575-1580 (2016). https://doi.org:10.1016/j.hrthm.2016.03.037

144 van Staveren, L. N. & de Groot, N. M. S. Exploring Refractoriness as an Adjunctive Electrical Biomarker for Staging of Atrial Fibrillation. *J Am Heart Assoc* **9**, e018427 (2020). https://doi.org:10.1161/JAHA.120.018427

145 Calvet, C. & Seebeck, P. What to consider for ECG in mice-with special emphasis on telemetry. *Mamm Genome* **34**, 166-179 (2023). https://doi.org:10.1007/s00335-023-09977-0

146 Doevendans, P. A., Daemen, M. J., de Muinck, E. D. & Smits, J. F. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* **39**, 34-49 (1998). https://doi.org:10.1016/s0008-6363(98)00073-x

147 Sakata, Y. *et al.* Transforming growth factor-beta receptor antagonism attenuates myocardial fibrosis in mice with cardiac-restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Basic Res Cardiol* **103**, 60-68 (2008). https://doi.org:10.1007/s00395-007-0689-5

148 Boettcher, M. & McManus, M. T. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell* **58**, 575-585 (2015). https://doi.org:10.1016/j.molcel.2015.04.028

149 Schrickel, J. W. *et al.* Induction of atrial fibrillation in mice by rapid transesophageal atrial pacing. *Basic Res Cardiol* **97**, 452-460 (2002). https://doi.org:10.1007/s003950200052

150 Poon, Y. Y. *et al.* Disproportional cardiovascular depressive effects of isoflurane: Serendipitous findings from a comprehensive re-visit in mice. *Lab Anim (NY)* **50**, 26-31 (2021). https://doi.org:10.1038/s41684-020-00684-w

151 Tomsits, P. *et al.* Medetomidine/midazolam/fentanyl narcosis alters cardiac autonomic tone leading to conduction disorders and arrhythmias in mice. *Lab Anim (NY)* **52**, 85-92 (2023). https://doi.org:10.1038/s41684-023-01141-0

152 Freeman, L. C., Ack, J. A., Fligner, M. A. & Muir, W. W., 3rd. Atrial fibrillation in halothane- and isoflurane-anesthetized dogs. *Am J Vet Res* **51**, 174-177 (1990).

153 Li, D., Fareh, S., Leung, T. K. & Nattel, S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* **100**, 87-95 (1999). https://doi.org:10.1161/01.cir.100.1.87

154 Verheule, S. *et al.* Alterations in atrial electrophysiology and tissue structure in a canine model of chronic atrial dilatation due to mitral regurgitation. *Circulation* **107**, 2615-2622 (2003). https://doi.org:10.1161/01.Cir.0000066915.15187.51

155 Shi, Y., Li, D., Tardif, J. C. & Nattel, S. Enalapril effects on atrial remodeling and atrial fibrillation in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res* **54**, 456-461 (2002). https://doi.org:10.1016/s0008-6363(02)00243-2

156 Everett, T. H. t. & Olgin, J. E. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Rhythm* **4**, S24-27 (2007). https://doi.org:10.1016/j.hrthm.2006.12.040

157 Sohns, C. & Marrouche, N. F. Atrial fibrillation and cardiac fibrosis. *Eur Heart J* **41**, 1123-1131 (2020). https://doi.org:10.1093/eurheartj/ehz786

158 Delgado, V. *et al.* Structure and Function of the Left Atrium and Left Atrial Appendage: AF and Stroke Implications. *J Am Coll Cardiol* **70**, 3157-3172 (2017). https://doi.org:10.1016/j.jacc.2017.10.063

159 Frustaci, A. *et al.* Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* **96**, 1180-1184 (1997). https://doi.org:10.1161/01.cir.96.4.1180

160 Kostin, S. *et al.* Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* **54**, 361-379 (2002). https://doi.org:10.1016/s0008-6363(02)00273-0

161 Burstein, B., Libby, E., Calderone, A. & Nattel, S. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation* **117**, 1630-1641 (2008). https://doi.org:10.1161/circulationaha.107.748053

162 Rahmutula, D. *et al.* Molecular basis of selective atrial fibrosis due to overexpression of transforming growth factor-β1. *Cardiovasc Res* **99**, 769-779 (2013). https://doi.org:10.1093/cvr/cvt074

163 Zeisberg, M. *et al.* BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* **9**, 964-968 (2003). https://doi.org:10.1038/nm888

164 Wang, S. *et al.* Up-regulation of BMP-2 antagonizes TGF-β1/ROCK-enhanced cardiac fibrotic signalling through activation of Smurf1/Smad6 complex. *J Cell Mol Med* **16**, 2301-2310 (2012). https://doi.org:10.1111/j.1582-4934.2012.01538.x

165 Hanyu, A. *et al.* The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol* **155**, 1017-1027 (2001). https://doi.org:10.1083/jcb.200106023

166 Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**, 233-241 (2004). https://doi.org:10.1080/08977190412331279890

167 Ku, M., Howard, S., Ni, W., Lagna, G. & Hata, A. OAZ regulates bone morphogenetic protein signaling through Smad6 activation. *J Biol Chem* **281**, 5277-5287 (2006). https://doi.org:10.1074/jbc.M510004200

168 Hata, A., Lagna, G., Massagué, J. & Hemmati-Brivanlou, A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* **12**, 186-197 (1998). https://doi.org:10.1101/gad.12.2.186

169 Miyamoto, T. *et al.* Overexpression of Smad6 exacerbates pancreatic fibrosis in murine caerulein-induced chronic pancreatic injuries. *Pancreas* **39**, 385-391 (2010). https://doi.org:10.1097/MPA.0b013e3181bb9603

170 Qu, X. *et al.* BMP10 preserves cardiac function through its dual activation of SMAD-mediated and STAT3-mediated pathways. *J Biol Chem* **294**, 19877-19888 (2019). https://doi.org:10.1074/jbc.RA119.010943

171 Jin, Y., Cheng, X., Lu, J. & Li, X. Exogenous BMP-7 Facilitates the Recovery of Cardiac Function after Acute Myocardial Infarction through Counteracting TGF-β1 Signaling Pathway. *Tohoku J Exp Med* **244**, 1-6 (2018). https://doi.org:10.1620/tjem.244.1

172 Miyazono, K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci* **113 (Pt 7)**, 1101-1109 (2000). https://doi.org:10.1242/jcs.113.7.1101

173 Vuga, L. J. *et al.* WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 583-589 (2009). https://doi.org:10.1165/rcmb.2008-0201OC

174 Feng, R. *et al.* Angiotensin-receptor blocker losartan alleviates atrial fibrillation in rats by downregulating frizzled 8 and inhibiting the activation of WNT-5A pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **50**, 19-27 (2023). https://doi.org:10.1111/1440-1681.13715

175 Kumawat, K. & Gosens, R. WNT-5A: signaling and functions in health and disease. *Cell Mol Life Sci* **73**, 567-587 (2016). https://doi.org:10.1007/s00018-015-2076-y

176 Newman, D. R. *et al.* Expression of WNT5A in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Its Control by TGF-beta and WNT7B in Human Lung Fibroblasts. *J Histochem Cytochem* **64**, 99-111 (2016). https://doi.org:10.1369/0022155415617988

177 Yeganeh, B. *et al.* Novel non-canonical TGF-β signaling networks: emerging roles in airway smooth muscle phenotype and function. *Pulm Pharmacol Ther* **26**, 50-63 (2013). https://doi.org:10.1016/j.pupt.2012.07.006

178 Singla, A., Reuter, S., Taube, C., Peters, M. & Peters, K. The molecular mechanisms of remodeling in asthma, COPD and IPF with a special emphasis on the complex role of Wnt5A. *Inflamm Res* (2023). https://doi.org:10.1007/s00011-023-01692-5

179 Li, X. *et al.* Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition of tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Genes Cells* **18**, 608-619 (2013). https://doi.org:10.1111/gtc.12064

180 Du, J. *et al.* MiR-146a-5p suppresses activation and proliferation of hepatic stellate cells in nonalcoholic fibrosing steatohepatitis through directly targeting Wnt1 and Wnt5a. *Sci Rep* **5**, 16163 (2015). https://doi.org:10.1038/srep16163

181 Abraityte, A. *et al.* Wnt5a is elevated in heart failure and affects cardiac fibroblast function. *J Mol Med (Berl)* **95**, 767-777 (2017). https://doi.org:10.1007/s00109-017-1529-1

182 Sen, M. *et al.* Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2791-2796 (2000). https://doi.org:10.1073/pnas.050574297

183 Blumenthal, A. *et al.* The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* **108**, 965-973 (2006). https://doi.org:10.1182/blood-2005-12-5046

184 Tan, W. *et al.* LncRNA HOTAIR promotes myocardial fibrosis in atrial fibrillation through binding with PTBP1 to increase the stability of Wnt5a. *Int J Cardiol* **369**, 21-28 (2022). https://doi.org:10.1016/j.ijcard.2022.06.073

185 Hu, H. H. *et al.* New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact* **292**, 76-83 (2018). https://doi.org:10.1016/j.cbi.2018.07.008

186 Uchida, A. *et al.* Involvement of dual-strand of the miR-144 duplex and their targets in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **110**, 420-432 (2019). https://doi.org:10.1111/cas.13853

187 Wang, G. *et al.* MicroRNA-132 attenuated cardiac fibrosis in myocardial infarction-induced heart failure rats. *Biosci Rep* **40** (2020). https://doi.org:10.1042/bsr20201696

188 Ezeani, M. & Prabhu, S. PI3K(p110α) as a determinant and gene therapy for atrial enlargement in atrial fibrillation. *Mol Cell Biochem* (2022). https://doi.org:10.1007/s11010-022-04526-w

189 Ziemba, B. P., Burke, J. E., Masson, G., Williams, R. L. & Falke, J. J. Regulation of PI3K by PKC and MARCKS: Single-Molecule Analysis of a Reconstituted Signaling Pathway. *Biophys J* **110**, 1811-1825 (2016). https://doi.org:10.1016/j.bpj.2016.03.001

190 Ezeani, M. & Prabhu, S. Pathophysiology and therapeutic relevance of PI3K(p110α) protein in atrial fibrillation: A non-interventional molecular therapy strategy. *Pharmacol Res* **165**, 105415 (2021). https://doi.org:10.1016/j.phrs.2020.105415

191 Rose, R. A., Kabir, M. G. & Backx, P. H. Altered heart rate and sinoatrial node function in mice lacking the cAMP regulator phosphoinositide 3-kinase-gamma. *Circ Res* **101**, 1274-1282 (2007). https://doi.org:10.1161/circresaha.107.158428

192 Pretorius, L., Owen, K. L. & McMullen, J. R. Role of phosphoinositide 3-kinases in regulating cardiac function. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 2221-2229 (2009). https://doi.org:10.2741/3374

193 Oudit, G. Y. & Kassiri, Z. Role of PI3 kinase gamma in excitation-contraction coupling and heart disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* **7**, 295-304 (2007). https://doi.org:10.2174/187152907782793545

194 Li, Y. *et al.* MicroRNA-142-3p attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via targeting of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *Pharmacol Res* **156**, 104783 (2020). https://doi.org:10.1016/j.phrs.2020.104783

195 Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101 (2005). https://doi.org:10.1126/science.1106148

196 Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J. W., Akhurst, R. J. & Derynck, R. TGF-β-induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J Cell Sci* **125**, 1259-1273 (2012). https://doi.org:10.1242/jcs.095299

197 Dany, M., Rimmani, H. H., Matar, S. A. & Hajj Hussein, I. mTORC2-Akt signaling axis is implicated in myocardial compensation and fibrosis. *J Biol Regul Homeost Agents* **29**, 745-753 (2015).

198 Pena, A. *et al.* Pharmacological Inhibition of mTOR Kinase Reverses Right Ventricle Remodeling and Improves Right Ventricle Structure and Function in Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **57**, 615-625 (2017). https://doi.org:10.1165/rcmb.2016-0364OC

199 Sundararaj, K. *et al.* mTOR Complexes Repress Hypertrophic Agonist-Stimulated Expression of Connective Tissue Growth Factor in Adult Cardiac Muscle Cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **67**, 110-120 (2016). https://doi.org:10.1097/fjc.0000000000000322

200 Chang, K. *et al.* TGFB-INHB/activin signaling regulates age-dependent autophagy and cardiac health through inhibition of MTORC2. *Autophagy* **16**, 1807-1822 (2020). https://doi.org:10.1080/15548627.2019.1704117

201 Völkers, M. *et al.* Mechanistic target of rapamycin complex 2 protects the heart from ischemic damage. *Circulation* **128**, 2132-2144 (2013). https://doi.org:10.1161/circulationaha.113.003638

202 Shende, P. *et al.* Cardiac mTOR complex 2 preserves ventricular function in pressure-overload hypertrophy. *Cardiovasc Res* **109**, 103-114 (2016). https://doi.org:10.1093/cvr/cvv252

203 Abeyrathna, P., Kovacs, L., Han, W. & Su, Y. Calpain-2 activates Akt via TGF-β1-mTORC2 pathway in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **311**, C24-34 (2016). https://doi.org:10.1152/ajpcell.00295.2015

204 Kim, S. W., Kim, H. I., Thapa, B., Nuwormegbe, S. & Lee, K. Critical Role of mTORC2-Akt Signaling in TGF-β1-Induced Myofibroblast Differentiation of Human Pterygium Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**, 82-92 (2019). https://doi.org:10.1167/iovs.18-25376

205 Li, J. *et al.* Rictor/mTORC2 signaling mediates TGFβ1-induced fibroblast activation and kidney fibrosis. *Kidney Int* **88**, 515-527 (2015). https://doi.org:10.1038/ki.2015.119

206 Ren, J. *et al.* Rictor/mammalian target of rapamycin complex 2 promotes macrophage activation and kidney fibrosis. *J Pathol* **242**, 488-499 (2017). https://doi.org:10.1002/path.4921

207 Zhou, L. *et al.* miR-185 Inhibits Fibrogenic Activation of Hepatic Stellate Cells and Prevents Liver Fibrosis. *Mol Ther Nucleic Acids* **10**, 91-102 (2018). https://doi.org:10.1016/j.omtn.2017.11.010

208 Chang, W. *et al.* A critical role for the mTORC2 pathway in lung fibrosis. *PLoS One* **9**, e106155 (2014). https://doi.org:10.1371/journal.pone.0106155

209 Inomata, M. *et al.* Rictor-targeting exosomal microRNA-16 ameliorates lung fibrosis by inhibiting the mTORC2-SPARC axis. *Exp Cell Res* **398**, 112416 (2021). https://doi.org:10.1016/j.yexcr.2020.112416

210 Rao, S. S. *et al.* Calpain-activated mTORC2/Akt pathway mediates airway smooth muscle remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* **47**, 176-189 (2017). https://doi.org:10.1111/cea.12805

211 You, Y. *et al.* Ketogenic diet aggravates cardiac remodeling in adult spontaneously hypertensive rats. *Nutr Metab (Lond)* **17**, 91 (2020). https://doi.org:10.1186/s12986-020-00510-7

212 Schneider, D. J. *et al.* Cadherin-11 contributes to pulmonary fibrosis: potential role in TGF-β production and epithelial to mesenchymal transition. *Faseb j* **26**, 503-512 (2012). https://doi.org:10.1096/fj.11-186098

213 Dong, J., Li, L., Fang, X. & Zang, M. Exosome-Encapsulated microRNA-127-3p Released from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviates Osteoarthritis Through Regulating CDH11-Mediated Wnt/β-Catenin Pathway. *J Pain Res* **14**, 297-310 (2021). https://doi.org:10.2147/jpr.S291472

214 Schroer, A. K. *et al.* Cadherin-11 blockade reduces inflammation-driven fibrotic remodeling and improves outcomes after myocardial infarction. *JCI Insight* **4** (2019). https://doi.org:10.1172/jci.insight.131545

215 Fang, G. *et al.* Cadherin-11 deficiency mitigates high-fat diet-induced inflammatory atrial remodeling and vulnerability to atrial fibrillation. *J Cell Physiol* **236**, 5725-5741 (2021). https://doi.org:10.1002/jcp.30257

216 Black, M. *et al.* FOXF1 Inhibits Pulmonary Fibrosis by Preventing CDH2-CDH11 Cadherin Switch in Myofibroblasts. *Cell Rep* **23**, 442-458 (2018). https://doi.org:10.1016/j.celrep.2018.03.067

217 Chothani, S. *et al.* Widespread Translational Control of Fibrosis in the Human Heart by RNA-Binding Proteins. *Circulation* **140**, 937-951 (2019). https://doi.org:10.1161/circulationaha.119.039596

218 Wang, E. T. *et al.* Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* **150**, 710-724 (2012). https://doi.org:10.1016/j.cell.2012.06.041

219 Chou, C. C., Chang, P. C., Wei, Y. C. & Lee, K. Y. Optical Mapping Approaches on Muscleblind-Like Compound Knockout Mice for Understanding Mechanistic Insights Into Ventricular Arrhythmias in Myotonic Dystrophy. *J Am Heart Assoc* **6** (2017). https://doi.org:10.1161/jaha.116.005191

220 Schiano, C., Rienzo, M., Casamassimi, A., Soricelli, A. & Napoli, C. Splicing regulators in endothelial cell differentiation. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **18**, 742-749 (2017). https://doi.org:10.2459/jcm.0000000000000536

221 Lee, K. Y. *et al.* Mice lacking MBNL1 and MBNL2 exhibit sudden cardiac death and molecular signatures recapitulating myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **31**, 3144-3160 (2022). https://doi.org:10.1093/hmg/ddac108

222 Wang, H. *et al.* Quercetin improves atrial fibrillation through inhibiting TGF-β/Smads pathway via promoting MiR-135b expression. *Phytomedicine* **93**, 153774 (2021). https://doi.org:10.1016/j.phymed.2021.153774

223 Schotten, U., Neuberger, H. R. & Allessie, M. A. The role of atrial dilatation in the domestication of atrial fibrillation. *Prog Biophys Mol Biol* **82**, 151-162 (2003). https://doi.org:10.1016/s0079-6107(03)00012-9

224 Medvedev, R. Y., Afolabi, S. O., Turner, D. G. P. & Glukhov, A. V. Mechanisms of stretch-induced electro-anatomical remodeling and atrial arrhythmogenesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **193**, 11-24 (2024). https://doi.org:10.1016/j.yjmcc.2024.05.011

225 Ock, S. *et al.* IGF-1 protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting αSMA. *Cell Death Dis* **12**, 688 (2021). https://doi.org:10.1038/s41419-021-03965-5

226 Shimizu, T. & Liao, J. K. Rho Kinases and Cardiac Remodeling. *Circ J* **80**, 1491-1498 (2016). https://doi.org:10.1253/circj.CJ-16-0433

227 Lavall, D. *et al.* The mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *J Biol Chem* **289**, 6656-6668 (2014). https://doi.org:10.1074/jbc.M113.519256

228 Tsai, F. C. *et al.* Proinflammatory gene expression in patients undergoing mitral valve surgery and maze ablation for atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg* **151**, 1673-1682.e1675 (2016). https://doi.org:10.1016/j.jtcvs.2015.12.003

229 Liu, Q. *et al.* Belumosudil, ROCK2-specific inhibitor, alleviates cardiac fibrosis by inhibiting cardiac fibroblasts activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **323**, H235-h247 (2022). https://doi.org:10.1152/ajpheart.00014.2022

230 Düzen, I. V. *et al.* Investigation of leukocyte RHO/ROCK gene expressions in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Exp Ther Med* **18**, 2777-2782 (2019). https://doi.org:10.3892/etm.2019.7929

231 Ogata, T. *et al.* MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Mol Cell Biol* **28**, 3424-3436 (2008). https://doi.org:10.1128/mcb.02186-07

232 Oikonomou, E. *et al.* Biomarkers in Atrial Fibrillation and Heart Failure. *Curr Med Chem* **26**, 873-887 (2019). https://doi.org:10.2174/0929867324666170830100424

233 Pretorius, L. *et al.* Reduced phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) activation increases the susceptibility to atrial fibrillation. *Am J Pathol* **175**, 998-1009 (2009). https://doi.org:10.2353/ajpath.2009.090126

234 McMullen, J. R. *et al.* Ibrutinib increases the risk of atrial fibrillation, potentially through inhibition of cardiac PI3K-Akt signaling. *Blood* **124**, 3829-3830 (2014). https://doi.org:10.1182/blood-2014-10-604272

235 Liao, J. *et al.* TRPV4 blockade suppresses atrial fibrillation in sterile pericarditis rats. *JCI Insight* **5** (2020). https://doi.org:10.1172/jci.insight.137528

236 Sun, Y. L. *et al.* Valsartan reduced the vulnerability to atrial fibrillation by preventing action potential prolongation and conduction slowing in castrated male mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* **29**, 1436-1443 (2018). https://doi.org:10.1111/jce.13697

237 Zhan, G. *et al.* Dapagliflozin: A sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, attenuates angiotensin II-induced atrial fibrillation by regulating atrial electrical and structural remodeling. *Eur J Pharmacol* **978**, 176712 (2024). https://doi.org:10.1016/j.ejphar.2024.176712

238 Kirchhof, P. *et al.* Prolonged atrial action potential durations and polymorphic atrial tachyarrhythmias in patients with long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* **14**, 1027-1033 (2003). https://doi.org:10.1046/j.1540-8167.2003.03165.x

239 Schmitt, N., Grunnet, M. & Olesen, S. P. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev* **94**, 609-653 (2014). https://doi.org:10.1152/physrev.00022.2013

240 Lemoine, M. D. *et al.* Arrhythmogenic left atrial cellular electrophysiology in a murine genetic long QT syndrome model. *Cardiovasc Res* **92**, 67-74 (2011). https://doi.org:10.1093/cvr/cvr166

241 Kapoor, A. *et al.* An enhancer polymorphism at the cardiomyocyte intercalated disc protein NOS1AP locus is a major regulator of the QT interval. *Am J Hum Genet* **94**, 854-869 (2014). https://doi.org:10.1016/j.ajhg.2014.05.001

242 Arking, D. E. *et al.* A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nat Genet* **38**, 644-651 (2006). https://doi.org:10.1038/ng1790

243 Chang, K. C. *et al.* CAPON modulates cardiac repolarization via neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4477-4482 (2008). https://doi.org:10.1073/pnas.0709118105

244 Jänsch, M. *et al.* Inducible over-expression of cardiac Nos1ap causes short QT syndrome in transgenic mice. *FEBS Open Bio* **13**, 118-132 (2023). https://doi.org:10.1002/2211-5463.13520

245 Ronchi, C. *et al.* NOS1AP polymorphisms reduce NOS1 activity and interact with prolonged repolarization in arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* **117**, 472-483 (2021). https://doi.org:10.1093/cvr/cvaa036

246 Arking, D. E. *et al.* Genetic association study of QT interval highlights role for calcium signaling pathways in myocardial repolarization. *Nat Genet* **46**, 826-836 (2014). https://doi.org:10.1038/ng.3014

247 Sotoodehnia, N. *et al.* Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nat Genet* **42**, 1068-1076 (2010). https://doi.org:10.1038/ng.716

248 Milan, D. J. *et al.* Drug-sensitized zebrafish screen identifies multiple genes, including GINS3, as regulators of myocardial repolarization. *Circulation* **120**, 553-559 (2009). https://doi.org:10.1161/circulationaha.108.821082

249 Smith, J. G. *et al.* Impact of ancestry and common genetic variants on QT interval in African Americans. *Circ Cardiovasc Genet* **5**, 647-655 (2012). https://doi.org:10.1161/circgenetics.112.962787

250 Sauer, H. *et al.* NOS inhibition synchronizes calcium oscillations in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by increasing gap-junctional coupling. *J Cell Physiol* **226**, 1642-1650 (2011). https://doi.org:10.1002/jcp.22495

251 Takeuchi, S. *et al.* Disorganization of gap junction distribution in dilated atria of patients with chronic atrial fibrillation. *Circ J* **70**, 575-582 (2006). https://doi.org:10.1253/circj.70.575

252 Firouzi, M. *et al.* Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res* **95**, e29-33 (2004). https://doi.org:10.1161/01.RES.0000141134.64811.0a

253 Cheng, J. *et al.* Caveolin-3 suppresses late sodium current by inhibiting nNOS-dependent S-nitrosylation of SCN5A. *J Mol Cell Cardiol* **61**, 102-110 (2013). https://doi.org:10.1016/j.yjmcc.2013.03.013

254 Xiang, H. *et al.* The Association Between Left Ventricular Hypertrophy and the Occurrence and Prognosis of Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis. *Front Cardiovasc Med* **8**, 639993 (2021). https://doi.org:10.3389/fcvm.2021.639993

255 Lopes, E. C. P. *et al.* Relationship Between Circulating MicroRNAs and Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Patients. *Front Cardiovasc Med* **9**, 798954 (2022). https://doi.org:10.3389/fcvm.2022.798954

256 Song, L. *et al.* MiR-451 is decreased in hypertrophic cardiomyopathy and regulates autophagy by targeting TSC1. *J Cell Mol Med* **18**, 2266-2274 (2014). https://doi.org:10.1111/jcmm.12380

257 Song, X. W. *et al.* Plasma miR-451 with echocardiography serves as a diagnostic reference for pulmonary hypertension. *Acta Pharmacol Sin* **39**, 1208-1216 (2018). https://doi.org:10.1038/aps.2018.39

258 Gan, M. *et al.* The Expression of microRNA in Adult Rat Heart with Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy. *Cells* **9** (2020). https://doi.org:10.3390/cells9051173

259 Gan, M. *et al.* Genistein reverses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by regulating miR-451/TIMP2. *Biomed Pharmacother* **112**, 108618 (2019). https://doi.org:10.1016/j.biopha.2019.108618

260 Oudit, G. Y. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation* **108**, 2147-2152 (2003). https://doi.org:10.1161/01.Cir.0000091403.62293.2b

261 Li, J. *et al.* Arctiin protects against cardiac hypertrophy through inhibiting MAPKs and AKT signaling pathways. *J Pharmacol Sci* **135**, 97-104 (2017). https://doi.org:10.1016/j.jphs.2017.05.012

262 Yang, L. *et al.* CpG-ODN attenuates pathological cardiac hypertrophy and heart failure by activation of PI3Kα-Akt signaling. *PLoS One* **8**, e62373 (2013). https://doi.org:10.1371/journal.pone.0062373

263 Sun, G. W., Qiu, Z. D., Wang, W. N., Sui, X. & Sui, D. J. Flavonoids Extraction from Propolis Attenuates Pathological Cardiac Hypertrophy through PI3K/AKT Signaling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* **2016**, 6281376 (2016). https://doi.org:10.1155/2016/6281376

264 Tomita, Y. *et al.* Targeting N-Myristoylation Through NMT2 Prevents Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci* **8**, 1263-1282 (2023). https://doi.org:10.1016/j.jacbts.2023.06.006

265 Chiang, D. Y. *et al.* Loss of microRNA-106b-25 cluster promotes atrial fibrillation by enhancing ryanodine receptor type-2 expression and calcium release. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **7**, 1214-1222 (2014). https://doi.org:10.1161/circep.114.001973

266 Yang, D. *et al.* MicroRNA-1 Deficiency Is a Primary Etiological Factor Disrupting Cardiac Contractility and Electrophysiological Homeostasis. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **17**, e012150 (2024). https://doi.org:10.1161/circep.123.012150

267 Zimmer, A. M., Pan, Y. K., Chandrapalan, T., Kwong, R. W. M. & Perry, S. F. Loss-of-function approaches in comparative physiology: is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing? *J Exp Biol* **222** (2019). https://doi.org:10.1242/jeb.175737

268 Bereczki, Z. *et al.* Mitigating off-target effects of small RNAs: conventional approaches, network theory and artificial intelligence. *Br J Pharmacol* (2024). https://doi.org:10.1111/bph.17302

269 Ye, Y. *et al.* Screening of differentially expressed microRNAs of essential hypertension in Uyghur population. *Lipids Health Dis* **18**, 98 (2019). https://doi.org:10.1186/s12944-019-1028-1

270 Lv, X. W. *et al.* miR-451-3p alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting MAP1LC3B-mediated autophagy. *Inflamm Res* **70**, 1089-1100 (2021). https://doi.org:10.1007/s00011-021-01508-4

271 Mateu-Jimenez, M. *et al.* Profile of epigenetic mechanisms in lung tumors of patients with underlying chronic respiratory conditions. *Clin Epigenetics* **10**, 7 (2018). https://doi.org:10.1186/s13148-017-0437-0

272 Assalin, H. B., Gontijo, J. A. R. & Boer, P. A. miRNAs, target genes expression and morphological analysis on the heart in gestational protein-restricted offspring. *PLoS One* **14**, e0210454 (2019). https://doi.org:10.1371/journal.pone.0210454

273 Murphy, M. B., Kim, K., Kannankeril, P. J. & Murray, K. T. Optimization of Transesophageal Atrial Pacing to Assess Atrial Fibrillation Susceptibility in Mice. *J Vis Exp* (2022). https://doi.org:10.3791/64168

274 Kholmovski, E. G., Morris, A. K. & Chelu, M. G. Cardiac MRI and Fibrosis Quantification. *Card Electrophysiol Clin* **11**, 537-549 (2019). https://doi.org:10.1016/j.ccep.2019.04.005

275 Yamaguchi, T. *et al.* Atrial Structural Remodeling in Patients With Atrial Fibrillation Is a Diffuse Fibrotic Process: Evidence From High-Density Voltage Mapping and Atrial Biopsy. *J Am Heart Assoc* **11**, e024521 (2022). https://doi.org:10.1161/jaha.121.024521

276 Wilczynska, A. & Bushell, M. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ* **22**, 22-33 (2015). https://doi.org:10.1038/cdd.2014.112

277 Baek, D. *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64-71 (2008). https://doi.org:10.1038/nature07242

278 Reich, J., Snee, M. J. & Macdonald, P. M. miRNA-dependent translational repression in the Drosophila ovary. *PLoS One* **4**, e4669 (2009). https://doi.org:10.1371/journal.pone.0004669

279 Pinto, A. R. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* **118**, 400-409 (2016). https://doi.org:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778
280 Lipovsky, C. E. *et al.* Chamber-specific transcriptional responses in atrial fibrillation. *JCI Insight* **5** (2020). https://doi.org:10.1172/jci.insight.135319
281 Zhou, P. & Pu, W. T. Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* **118**, 368-370 (2016). https://doi.org:10.1161/circresaha.116.308139
282 Liu, M., López de Juan Abad, B. & Cheng, K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies. *Adv Drug Deliv Rev* **173**, 504-519 (2021). https://doi.org:10.1016/j.addr.2021.03.021
283 O'Shea, C. *et al.* Cardiac optical mapping - State-of-the-art and future challenges. *Int J Biochem Cell Biol* **126**, 105804 (2020). https://doi.org:10.1016/j.biocel.2020.105804
284 O'Shea, C. *et al.* High resolution optical mapping of cardiac electrophysiology in pre-clinical models. *Sci Data* **9**, 135 (2022). https://doi.org:10.1038/s41597-022-01253-1
285 Hill, C. L. & Stephens, G. J. An Introduction to Patch Clamp Recording. *Methods Mol Biol* **2188**, 1-19 (2021). https://doi.org:10.1007/978-1-0716-0818-0_1

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn PD Dr. med. Sebastian Clauß meinen herzlichsten Dank aussprechen. Für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung dieser spannenden Themenstellung bin ich Ihnen sehr dankbar. Ihre Unterstützung und Ihr Vertrauen haben maßgeblich zu meinem erfolgreichen Abschluss beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Philipp Tomsits, der meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten maßgeblich geweckt hat. Durch seine stete Erreichbarkeit bei jeder noch so kleinen Fragestellung und seine konstruktive Kritik während der Durchsicht meiner Arbeit hat er mich begleitet und gefördert. Seine Motivation und unermüdliche Unterstützung bei der gemeinsamen Arbeit an den Wochenenden waren eine große Hilfe und Inspiration.

Ein herzliches Dankeschön gilt ebenfalls Bianca Hildebrand, die mich gewissenhaft in die Laborarbeit eingeführt, bei der Versuchsplanung unterstützt und mir die Methodik vermittelt hat. Ihre saubere und präzise Arbeitsweise, ihre grenzenlose Geduld und die bereichernden Gespräche haben meine Laborerfahrungen außerordentlich geprägt und meine Freude an der Laborarbeit wurde durch sie maßgeblich verstärkt.

Mein Dank gilt außerdem den Mitgliedern der AG Clauß, die mich stets mit ihrer Unterstützung, Hilfsbereitschaft und den guten Gesprächen begleitet haben. Dr. med. vet. Julia Vlcek möchte ich für die umfassende Einführung in das Thema danken, da sie mir den Weg für den Einstieg geebnet hat. Aparna Sharma Chivukula hat mir bedeutend bei der computergestützten Auswertung der histologischen Präparate geholfen und war stets eine große Hilfe bei jeglicher Fragestellung. Ihre Unterstützung und Freundschaft waren für mich bis zum letzten Tag sehr wertvoll. Auch Ruibing Xia möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei den EPUs sowie bei den Organentnahmen danken.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihr unermüdliches Interesse, ihr Verständnis und ihre Geduld danken. Ohne sie wäre dieser Weg nicht möglich gewesen. Vielen Dank an alle, die mich auf meinem Weg begleitet und immer wieder ermutigt haben.

Affidavit

LMU LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro

Eidesstattliche Versicherung

Volz, Lina-Sophie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung eines miR-144-5p Knockout-Mausmodells im Hinblick auf strukturelle Remodelingprozesse bei Vorhofflimmern

selbständig 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.

Neu-Ulm, 21.05.2026

Ort, Datum

Lina-Sophie Volz

Unterschrift Lina-Sophie Volz

Übereinstimmungserklärung

LMU LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro

Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Volz, Lina-Sophie

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Charakterisierung eines miR-144-5p Knockout-Mausmodells im Hinblick auf strukturelle Remodelingprozesse bei Vorhofflimmern

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Neu-Ulm, 21.05.2026

Ort, Datum

Lina-Sophie Volz

Unterschrift Lina-Sophie Volz

Lebenslauf

Publikationsliste

Tomsits P, **Volz L**, Xia R, Chivukula A, Schüttler D, Clauß S. Medetomidine/midazolam/fentanyl narcosis alters cardiac autonomic tone leading to conduction disorders and arrhythmias in mice. Lab Anim (NY). 2023 Apr;52(4):85-92. doi: 10.1038/s41684-023-01141-0. Epub 2023 Mar 23. PMID: 36959339; PMCID: PMC10063441.

Zhang Z, Vlcek J, Pauly V, Hesse N, Bauer J, Chataut KR, Maderspacher F, **Volz LS**, Buchberger K, Xia R, Hildebrand B, Kääb S, Schüttler D, Tomsits P, Clauss S. Atrial fibrosis heterogeneity is a risk for atrial fibrillation in pigs with ischaemic heart failure. Eur J Clin Invest. 2024 Apr;54(4):e14137. doi: 10.1111/eci.14137. Epub 2023 Nov 27. PMID: 38012826.

Plötz SG, Schuch A, **Volz L**, Ullmann V, Plötz J, Hein R, Ring J, Biedermann T. (2019). Hautkrebsvorsorge. In *Springer eBooks* (S. 17–24). https://doi.org/10.1007/978-3-662-57371-6_2

Volz T, Plötz SG, **Volz L**, Ullmann V, Kneißl D, Hein R, Ring J, Biedermann T. (2019). Epitheliale maligne Hauttumoren („Weißer Hautkrebs“). In *Springer eBooks* (S. 103–123). https://doi.org/10.1007/978-3-662-57371-6_14