



Identifizierung und Charakterisierung funktionell relevanter kardialer Faktoren

Identification and characterization of functionally
relevant cardiac factors

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von
Claudia Jentzsch

aus
Magdeburg

Würzburg 2011

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Manfred Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt

2. Betreuer: Prof. Dr. Martin Lohse

3. Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Nieswandt

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANP	engl. <i>Atrial natriuretic peptide</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	engl. <i>Arbitrary units</i>
BALT	engl. <i>Bronchial associated lymphoid tissue</i>
BNP	engl. <i>Brain natriuretic peptide</i>
bp	Basenpaare
Ci	Curie
CM	engl. <i>Cardiomyocyte</i>
Cre	engl. <i>Cyclization recombination</i> (Rekombinase aus Bakteriophage P1)
Cy3	Cyanin 3
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
E.coli	Escherichia coli
FCS	engl. <i>Fetal calf serum</i>
FLPe	engl. <i>Flippase recombinase, enhanced</i> (Rekombinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Frt	engl. <i>Flp recognition target</i> (Flp-Erkennungssequenz)
G418	Geneticin
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HCS	engl. <i>High content screening</i>
HRP	engl. <i>Horseradish peroxidase</i>
HW	engl. <i>Heart weight</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFU	engl. <i>Infectious unit</i>
IHC	Immunohistochemie
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LoxP	engl. <i>Locus of crossing of P1</i> (Cre-Erkennungssequenz)
MCS	engl. <i>Multiple cloning site</i>
miRNA/miR	microRNA
Neo	Neomycin
NO	Stickstoffmonoxid
Non-CM	engl. <i>Non-cardiomyocyte</i>
NRCM	engl. <i>Neonatal rat cardiomyocyte</i>
n.s.	nicht signifikant
Nt	Nukleotide
PGK	Phosphoglyceratkinase
PI16	Protease Inhibitor 16
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SD	engl. <i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> -Polyacrylamid-Gradientengel Elektrophorese
SEM	engl. <i>Standard error of mean</i>
siRNA	engl. <i>Short interfering RNA</i>

TAC	engl. <i>Transverse aortic constriction</i>
TG	Transgen
TL	engl. <i>Tibia length</i>
3'UTR	3'untranslatierte Region
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
vs	lat. <i>versus</i>
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp
w/v	Masse / Volumen

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	7
1.1.1	Die chronische Herzinsuffizienz.....	7
1.1.2	Das kardiale Remodeling.....	7
1.1.3	Medikamentöse Behandlung: Etablierte Therapie.....	9
1.1.4	Neue mögliche Therapieformen.....	9
1.2	MicroRNAs als post-transkriptionelle Regulatoren	11
1.2.1	Biologie der microRNAs und ihre Relevanz im Herz	11
1.2.2	<i>High content screening</i> (HCS) - Analysen	14
1.3	Protease Inhibitor 16 als sezernierter Faktor	15
1.3.1	Interzelluläre Kommunikation im Myokard durch sezernierte Faktoren	15
1.3.2	Identifizierung und erste Charakterisierung des Protease Inhibitors 16.....	16
1.3.3	Cre/LoxP-vermittelte Deletion von PI16 <i>in vivo</i>	18
1.3.4	Ziele der Arbeit.....	20
2	MATERIALIEN	21
3	METHODEN	31
3.1	Methoden zur DNA Analyse	31
3.1.1	Analyse von Nukleinsäuren über Agarose-Gelelektrophorese	31
3.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> Zellen.....	31
3.1.3	Plasmidpräparation und DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	31
3.1.4	DNA-Sequenzierung	32
3.2	Arbeiten mit primären Kardiomyozyten	32
3.2.1	Isolierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	32
3.2.2	Isolierung von adulten Rattenkardiomyozyten	33
3.2.3	Kovalente Bindung des Cy3-Fluorophors an synthetische miRNAs	33
3.2.4	miRNA-Transfektion und pro-hypertrophe Stimulation	34
3.2.5	Isoleucin-Inkorporation.....	34
3.2.6	Immunfluoreszenz.....	35
3.2.7	Automatisierte Bestimmung der Kardiomyozytenhypertrophie.....	35
3.3	Methoden zur RNA Analyse	36
3.3.1	RNA-Isolierung.....	36
3.3.2	Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription (RT).....	36
3.3.3	Quantitative <i>real time</i> – PCR (qRT-PCR)	37
3.4	Methoden zur Protein Analyse	39
3.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	39
3.4.2	Isolierung von Blutserum	39
3.4.3	Quantifizierung der Proteinkonzentration	39
3.4.4	Western Blot	40
3.5	Generierung von <i>Pi16^{floxneo/+}</i> embryonalen Stammzellen	41
3.5.1	Elektroporation des <i>Pi16 Targeting</i> Vektors und Selektion der Stammzellen	41
3.5.2	Genotypisierung muriner genomischer DNA	44
3.6	Methoden zur kardiovaskulären Phänotypisierung von Mäusen	46
3.6.1	Echokardiographie.....	46
3.6.2	Konstriktion der thorakalen Aorta.....	47
3.6.3	Histologische Untersuchung von Organen.....	47
3.7	Expression eines humanen PI16 Fusionsproteins in <i>Spodoptera frugiperda</i> 9 – Zellen mittels Baculovirusinfektion	49
3.7.1	Transfektion von Sf9 – Zellen für die Generierung des Baculovirus.....	49
3.7.2	Amplifikation des Baculovirus und Infektion von Sf9 – Zellen.....	50
3.8	Statistische Auswertung der Ergebnisse	50

4	ERGEBNISSE	51
4.1	MiRNAs und ihr Einfluss auf das Größenwachstum von Kardiomyozyten	51
4.1.1	Entwicklung eines <i>High content screening</i> (HCS) -Verfahrens	51
4.1.2	Charakterisierung der Datenaufnahme mit automatisierter Mikroskopie	53
4.1.3	Ergebnisse der HCS-Analyse hinsichtlich Zellwachstum regulierender miRNAs	54
4.1.4	Validierung Hypertrophie-modulierender miRNAs	56
4.1.5	Korrelation von miRNA Expressionsänderungen mit funktionellen Effekten in NRCMs	60
4.2	Generierung und phänotypische Charakterisierung PI16-defizienter Mäuse	62
4.2.1	Generierung des <i>Pi16^{floxneo}</i> Allels	62
4.2.2	Globale Rekombination der Frt- und LoxP-Sequenzen	63
4.2.3	PI16 Protein Expression in den genetisch modifizierten Mäusen	66
4.2.4	Kardiale Funktionsanalyse PI16-defizienter Mäuse	67
4.2.5	Gewebemorphologische Untersuchung der PI16-defizienten Mäuse	68
4.2.6	Zelluläre Lokalisation von PI16	68
5	DISKUSSION	72
5.1	Identifizierung Hypertrophie-modulierender miRNAs	72
5.1.1	Die Anwendung eines HCS-Verfahrens mit dem Ausleseparameter zelluläres Größenwachstum von primären Kardiomyozyten	72
5.1.2	Was ist zu den identifizierten miRNAs bisher bekannt?	73
5.2	Aufklärung der Funktion von PI16	79
5.2.1	Die Generierung von PI16-defizienten Tieren und ihr basaler kardialer Phänotyp	80
5.2.2	Modelle zur Charakterisierung der kardialen Funktion globaler PI16-defizienter Mäuse unter chronischem Stress	81
5.2.3	Modelle für konditionale <i>Pi16</i> Gendeletionen <i>in vivo</i>	83
5.2.4	Weitere Strategien zur Identifizierung der Funktion von PI16	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	88
7	SUMMARY	89
8	ANHANG	90
8.1	Tabellarische Ergebnisse der HCS-Analyse	90
8.2	DNA-Sequenz des <i>Pi16^{floxneo}</i> Targeting Vektors	95
8.3	Liste der 24 untersuchten Organe in <i>Pi16^{+/+}</i> vs. <i>Pi16^{floxneo/floxneo}</i> Mäusen	99
9	REFERENZEN	100
10	DANKSAGUNG	116
11	PUBLIKATIONEN	117

1 EINLEITUNG

1.1 Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

1.1.1 Die chronische Herzinsuffizienz

Herz-Kreislauf-Erkrankungen (HKL) sind die Ursache knapp 30% aller Todesfälle weltweit und damit laut der Statistik der *World Health Organization* (WHO) wiederholt Todesursache Nummer eins im Jahr 2011. Prognostiziert wird ein weiterer globaler Anstieg bis 2030 von derzeit 17,1 Millionen auf 23,6 Millionen Todesfälle ¹. Der Begriff der Herz-Kreislauf-Erkrankung dient als Sammelbegriff für eine Anzahl von Pathologien, deren Ursachen und Erscheinungsbilder vielfältig sind, aber allesamt zur Beeinträchtigung der Herzfunktion und des Kreislaufs führen (siehe Auflistung der HKL durch die WHO ²). In vielen Fällen führen diese Erkrankungen zu einer nachhaltigen Schwächung des Herzens, die sich in Form der Herzinsuffizienz manifestiert. In diesem Stadium ist das Herz durch ein verringertes Herzzeitvolumen nicht mehr in der Lage den Körper mit ausreichend Blut zu versorgen. Es existieren zwei Ausprägungen der Herzinsuffizienz, der akute (Stunden bis Tage) und der chronische (Monate bis Jahre) Verlauf. Die akute Herzinsuffizienz bezeichnet das plötzliche Auftreten von Anzeichen einer gestörten Herzfunktion und kann entweder eine Neumanifestation oder – wie in der Mehrzahl der Fälle - die Folge einer dekompensierten chronischen Herzinsuffizienz darstellen ³.

Hypertonie und koronare Herzerkrankung sind die häufigsten Ursachen einer chronischen Herzinsuffizienz ⁴. Zusammen mit einer neurohumoralen Aktivierung kommt es zunächst zu Kompensationsprozessen (z.B. Konstriktion der Blutgefäße, Erhöhung der Schlagfrequenz, Hypertrophie des Herzmuskels), um die Minderfunktion des Herzens über einen gewissen Zeitraum auszugleichen. Dieselben Adaptionen führen jedoch letztendlich zur Dekompensation und dem unausweichlichen Abfall der Pumpfunktion. Dieser Kreislauf wird auch als *circulus vitiosus* bezeichnet ⁴. Trotz etablierter medikamentöser Therapie ⁵ lässt sich die chronische Herzinsuffizienz bisher nicht kausal behandeln und führt in mehr als 50% der diagnostizierten Fälle innerhalb von fünf Jahren zum Tod ⁶.

1.1.2 Das kardiale Remodeling

Im Zuge der kompensatorischen Veränderungen des Herzmuskels zur Wiederherstellung seiner Pumpfunktion kommt es zu drastischen Veränderungen auf der zellulären und auf der organischen Ebene. Die Gesamtheit dieser wird als kardiales Remodeling bezeichnet. Drei mikroskopische Prozesse sind charakteristisch für das Remodeling: (1) Zellgrößenzunahme der Kardiomyozyten (= pathologische Hypertrophie), (2) programmierter/pathologischer

Zelltod von Kardiomyozyten (= Apoptose/Nekrose) und (3) Einlagerung von interstitiellem Bindegewebe (= Fibrose) (Abb. 1).

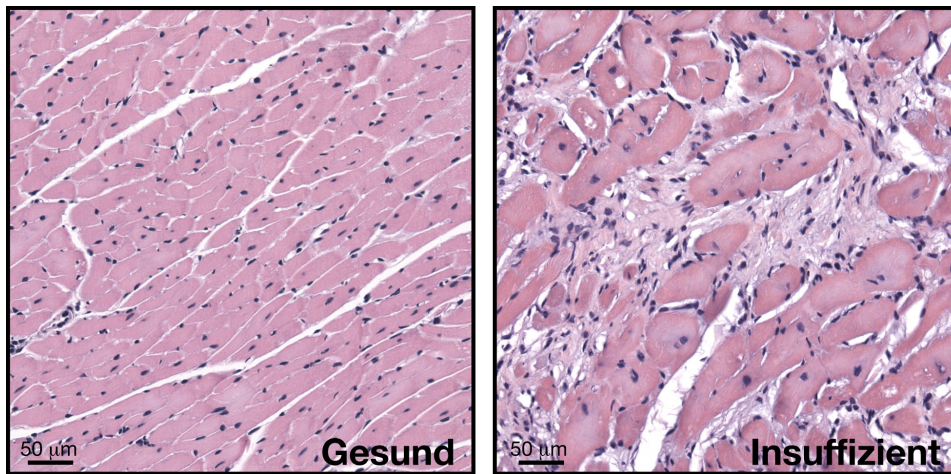


Abb. 1. Charakteristische Zunahme der Kardiomyozytenzellgröße und Einlagerung von interstitiellem Bindegewebe bei Herzinsuffizienz.

H&E gefärbte Paraffinschnitte von 10 Monate alten *Myh6-Adrb1^{0/0}* (gesund) und *Myh6-Adrb1^{tg/0}* (insuffizient) Mäusen.

Kardiomyozyten sind als ausdifferenzierte Muskelzellen zuständig für die Kontraktionskraft des Myokards. Kommt es zu einer Schwächung des Herzens, nimmt die Muskelmasse kompensatorisch zu, indem verstärkt kontraktile Einheiten (Sarkomerstrukturen) in den einzelnen Kardiomyozyten ausgebildet werden. Kardiomyozytäre Proliferation ⁷ oder die Ausdifferenzierung von residenten Stammzellen ⁸ scheint für die Kompensation eine untergeordnete Rolle zu spielen. Wie die Anordnung der Sarkomere (parallel oder in Serie) erfolgt, richtet sich nach der Art der Belastung (Druck- oder Volumenbelastung). Parallel angeordnete Sarkomere führen zu einer Zunahme des Zellquerschnitts (konzentrische Hypertrophie), in Serie angeordnete Sarkomere verlängern die Zelle (exzentrische Hypertrophie) ⁹. Beide Formen der Hypertrophie haben unterschiedliche makroskopische Folgen. Während bei konzentrischer Hypertrophie die Wanddicke des Ventrikels zunimmt, folgt aus der exzentrischen Hypertrophie eine Ventrikeldilatation. Parallel zum Wachstum einzelner Kardiomyozyten stirbt jedoch auch eine signifikante Anzahl durch Apoptose oder Nekrose ab ¹⁰. An den Stellen mit vorangegangenen kardiomyozytären Zelltod kommt es zur Einlagerung von interstitiellem Bindegewebe, das die Funktionalität des Herzens zusätzlich beeinträchtigt. Anhaltende Fibrose setzt die myokardiale Kontraktilität herab, da das Herz durch die schlechten Dehnungseigenschaften des eingelagerten Bindegewebes in der Folge versteift ^{11,12} und die elektrische Kopplung der Kardiomyozyten durch Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kontakte herabgesetzt wird ¹³.

Die intrazellulären Signalwege und Moleküle, die zur Ausprägung von pathologischer kardiomyozytärer Hypertrophie, Apoptose/Nekrose und Fibrose führen, stehen aufgrund

ihrer Bedeutung für die Progression der Herzinsuffizienz im Zentrum der Erforschung der Erkrankung und stellen damit ein attraktives Ziel für den Ansatz neuer Therapien dar.

1.1.3 Medikamentöse Behandlung: Etablierte Therapie

Bisher steht die anhaltende Aktivierung des neuroendokrinen Systems im Zentrum der medikamentösen Standardtherapie der chronischen Herzinsuffizienz. Welche Präparate eingesetzt bzw. kombiniert werden, wird nach Feststellung des Schweregrads der Erkrankung mit Hilfe von international anerkannten Klassifizierungen der *New York Heart Association (NYHA)* anhand von entsprechenden Leitlinien bestimmt¹⁴. Um den Folgen der Aktivierung entgegen zu wirken und/oder den Organismus aufgrund mangelnder Kompensation zu unterstützen, werden folgende Ansätze verfolgt¹⁵:

(1) Anhaltende Sympathikusaktivierung: Die persistierende Katecholaminausschüttung (Adrenalin, Noradrenalin) trägt neben einer initialen Steigerung der Kontraktilität zu Hypertrophie, Fibrose und Zelltod bei. Mit der Applikation von Betablockern wird versucht, dieses zu verhindern bzw. zu verzögern. (2) Verstärkte Gefäßkonstriktion: Mit der erhöhten Ausschüttung von vasokonstriktorisches Mediatoren (Endothelin, Vasopressin) und der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS, siehe (3)) versucht der Organismus den Blutdruck, der durch die verringerte Pumpfunktion abfällt, aufrecht zu erhalten. Um den Organismus gegen den zunehmenden Blutdruck zu unterstützen, werden Diuretika verabreicht. Durch verstärkte Wasserausscheidung wird der Blutdruck gesenkt und der Blutstau (Ödembildung) verringert. (3) Anhaltende Aktivierung des RAAS: Mit *Angiotensin-converting-enzyme (ACE)* – Hemmern, Angiotensin 1-Rezeptor-Blockern und Aldosteron-Antagonisten soll die anhaltende Flüssigkeitsretention blockiert und damit eine Senkung des Blutdrucks erzielt werden.

Zahlreiche klinische Studien belegen, dass die beschriebenen therapeutischen Eingriffe die Lebenssituation der Patienten erheblich verbessern, die Progression der Erkrankung grundsätzlich jedoch nicht aufhalten können^{16,17}.

1.1.4 Neue mögliche Therapieformen

Die intensive Erforschung der intrazellulären Signalwege im Herzen führte zu einem umfassenderen Verständnis der krankheitsrelevanten molekularen Mechanismen in den Zellen des Myokards. Gleichzeitig eröffnete das die Möglichkeit, neue Therapieformen zu entwickeln. Dazu gehören die Gen- und Stammzelltherapie¹⁷, die Applikation von sezernierten Faktoren oder die Blockierung ihrer Signalwege sowie RNA-basierte Technologien¹⁷. So konnte die erste gentherapeutische Humanstudie Phase I mit der Administration der *Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2A (SERCA2A)* in einem kardiotropen adeno-assoziierten Vektor (AAV) bereits erfolgreich beendet werden. Sie

beruht auf zahlreichen früheren Analysen in denen gezeigt werden konnte, dass die Herunterregulation der SERCA-Expression bei Herzinsuffizienz und der zum Abfall der Kontraktionskraft beitragende gestörte Ca^{2+} - Zyklus im Kardiomyozyt kausal zusammen hängen¹⁸. Diese Studie findet nun in einer klinischen Phase II ihre Fortsetzung¹⁹. Weitere intrazelluläre Proteine werden hinsichtlich ihres gentherapeutischen Potentials bereits getestet (zusammengefasst in Vinge *et al.*²⁰).

Trotz erheblicher Fortschritte bleiben die Erfolge in der Stammzelltherapie bisher moderat^{21,22}. Transdifferenzierung und Zellfusion stellen dabei nicht mehr die einzigen Erklärungen für die beobachtete Neovaskularisierung und die graduelle kardiale Regeneration nach Stammzellinjektion dar; eine sehr wichtige Rolle scheinen auch parakrine Faktoren zu spielen^{23,24}. Daher wird mittlerweile der Überlegung nachgegangen, statt der Stammzellen nur die sezernierten protektiven Faktoren therapeutisch einzusetzen^{23,24,25}. Das würde den Aufwand und die Schwierigkeiten bezüglich der direkten Zellinjektion in das Myokard erheblich minimieren. So wurden bereits zwei klinische Humanstudien Phase I initiiert, in denen das Cytokin *Stromal cell-derived factor-1* (SDF1) auf dessen regenerative Wirkung in Patienten mit ischämischen Herzkrankheiten hin getestet werden soll²⁶. Auch außerhalb der Stammzell-Forschung werden sezernierte Faktoren als wichtige therapeutische Moleküle angesehen. Angiotensin II ist bereits ein etabliertes Zielmolekül bei der Behandlung gegen Bluthochdruck und einer Vielzahl an Kardiomyopathien²⁷. Als weitere wichtige Faktoren, vor allem für die Behandlung der Fibrose, werden die Cytokine *Transforming growth factor* (TGF) β , *Connective tissue growth factor* (CTGF/CCN2) und *Platelet-derived growth factor* (PDGF) sowie das Hormon Endothelin-1 (ET-1) angesehen²⁷. Letztere wurden als profibrotische Mediatoren beschrieben, da sie eine Aktivierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten bewirken, die verstärkt Extrazellulärmatrix bilden²⁸. Studien zu Endothelin-Rezeptorblockern sind vielversprechend. So wurde bereits der erste duale Antagonist gegen den Rezeptor-Subtyp A und B für die Behandlung von pulmonalem Bluthochdruck zugelassen^{29,30}. Auch die Kombinationstherapie aus Endothelin- und Angiotensin II-Rezeptorblockern ist vielversprechend. Erste Humanstudien belegen eine hohe Sicherheit und gute Toleranz dieser Substanzen; im Tiermodell sowie in Patienten konnte damit der Bluthochdruck entscheidend gesenkt werden^{31,32}.

RNA-basierte Technologien wie die Nutzung der RNA-Interferenz (RNAi) oder der Eingriff in endogene regulatorische RNA-Systeme (z.B. microRNAs) bilden ein weiteres wichtiges Feld für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Die Plasmastabilität und die Überwindung der Zellmembran stellten zunächst große Probleme bei der Anwendung der RNAi *in vivo* dar. Die jüngsten Erfolge wurden mit der Verwendung der kardiotropen AAVs als Transportmoleküle erreicht. So konnte mit der Applikation von *short hairpin* (*sh*) RNAs in

Tiermodelle der viralen Myokarditis und der Herzinsuffizienz nach Konstriktion der Aorta eine Verbesserung der Herzfunktion erzielt werden^{33,34}. Membrangängige, äußerst stabile Inhibitoren der microRNAs (miRNAs), sogenannte *Antagomire*³⁵, konnten bereits in verschiedenen Tiermodellen erfolgreich angewendet werden³⁶⁻⁴⁰ und stellen eine neue Generation von möglichen RNA-basierten Therapiemolekülen für das kardiovaskuläre System dar^{41,42} (siehe Abschnitt 1.2.1). Für die Behandlung der chronischen Hepatitis C mit miRNA Inhibitoren existieren sogar schon Belege für eine erfolgreiche Anwendung in Primaten⁴³.

Zusammenfassend kann man sagen, dass viele neue Ansätze, die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz zu verbessern, existieren und bereits evaluiert werden. Die Identifizierung und Charakterisierung neuer Moleküle, die maßgeblich an pathophysiologischen Prozessen im Herzen beteiligt sind, stehen hierbei im Fokus. Die vorliegende Arbeit kombiniert Untersuchungen an therapeutisch potentiell interessanten miRNAs sowie an einem sezernierten Faktor.

1.2 MicroRNAs als post-transkriptionelle Regulatoren

1.2.1 Biologie der microRNAs und ihre Relevanz im Herz

1993 im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt^{44,45}, haben die miRNAs unser Verständnis von der Regulation der Proteinsynthese seither wesentlich erweitert. Als endogen exprimierte, durchschnittlich 22 Nukleotide lange RNA-Moleküle greifen sie entscheidend in des Expressionsprofil einer Zelle ein. Sie binden spezifisch an komplementäre Bindungssequenzen, die sich in der Regel in der 3'untranslatierten Region (UTR) ihrer Ziel-mRNAs befinden, und regulieren damit deren Translation bzw. Stabilität. Dabei entscheidet der Grad der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, auf welche Art die Expression reguliert wird: kommt es zu einer Bindung über die komplette Länge der miRNA, wird die mRNA degradiert; bindet die miRNA nur partiell an die mRNA, so wird die mRNA destabilisiert oder die Translation inhibiert (Abb. 2)⁴⁶. In Metazoa kommt es vornehmlich zur partiellen Bindung der miRNA an die mRNA, wodurch die Vorhersage spezifischer Ziel-mRNAs wesentlich erschwert wird^{47,48}. Mit Hilfe der sogenannten *seed* Region der miRNA (Basen 2-7), die essentiell für die Erkennung der miRNA-Bindungsstelle und die folgende Herunterregulation der Ziel-mRNA ist⁴⁹, lässt sich die Zahl potentieller Ziel-mRNAs meist nur auf mehrere hundert eingrenzen.

Dass die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression durch miRNAs essentiell für die Herzentwicklung und -funktion ist, zeigten verschiedene Mausmodelle mit Deletionen von Proteinen, die in die miRNA Prozessierung involviert oder Bestandteil der *miRNA-containing ribonucleoprotein* (miRNP)- bzw. *miRNA-induced silencing* (miRISC)-Komplexe

sind (Abb. 2). *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8) liegt im Zellkern mit der RNase III Endonuklease DROSHA als Komplex vor (auch *Microprocessor complex* genannt) und ist für die Bindung der um die 1000 Nukleotide langen pri-miRNA zuständig. Diese wird anschließend von DROSHA in die einzelne(n) pre-miRNAs von 70-80 Nukleotiden Länge geschnitten (Abb. 2). Die muskelspezifische Deletion (*Creatin kinase, muscle (Ckm)-Cre*) von DGCR8 führte zu einer ventrikulären Fehlfunktion, die in einer dilatativen Kardiomyopathie mit einer Lebenserwartung von weniger als zwei Monaten resultierte⁵⁰. Die umfassendsten Analysen im Herzen wurden bisher zu DICER1 unternommen. DICER1 ist eine RNase III Endonuklease, die die pre-miRNA im Zytoplasma zur reifen miRNA prozessiert (Abb. 2). Unabhängig voneinander und unter Verwendung unterschiedlicher *Targeting* Strategien, berichteten zwei Gruppen von einem embryonal letalen Phänotyp, wenn DICER1 ubiquitär ausgeschaltet wird^{51,52}. Auch konditionale Deletion in embryonalen (mittels *Nkx2.5-Cre*) und postnatalen Herzen (mittels *Myh6-Cre*) resultierte in lethalen Phänotypen. Während die *Nkx2.5-Cre* vermittelte Ausschaltung in kardialen Progenitorzellen zu perikardialen Ödemen und kaum ausgebildeten linken Ventrikeln führte⁵³, entwickelten Neugeborene mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Gendeletion (*Myh6-Cre*) eine progressive dilatative Kardiomyopathie sowie Herzinsuffizienz, woran sie spätestens am vierten Tag nach ihrer Geburt starben⁵⁴. Die induzierte Deletion von DICER1 in Kardiomyozyten in jungen und adulten Mäusen (*Myh6-MerCreMer*) führte zu unterschiedlichen Phänotypen. Während die Deletion im juvenilen Stadium in Arrhythmien und weniger in Hypertrophie resultierte, zeigten adulte Mäuse eine schwerwiegende pathologische Hypertrophie⁵⁵. In allen drei konditionalen Modellen konnten massive Veränderungen im miRNA Expressionsprofil festgestellt werden⁵⁵. Ähnlich der ubiquitären DICER1 Deletion führte auch die Ausschaltung des *Eukaryotic translation initiation factor 2C, 2* (EIF2C2), auch *Argonaute2* (AGO2) genannt, zu embryonaler Letalität⁵⁶. Die *Ago2*^{-/-} Embryonen zeigten stark vergrößerte Herzen mit einer häufigen Schwellung der Perikardhöhle.

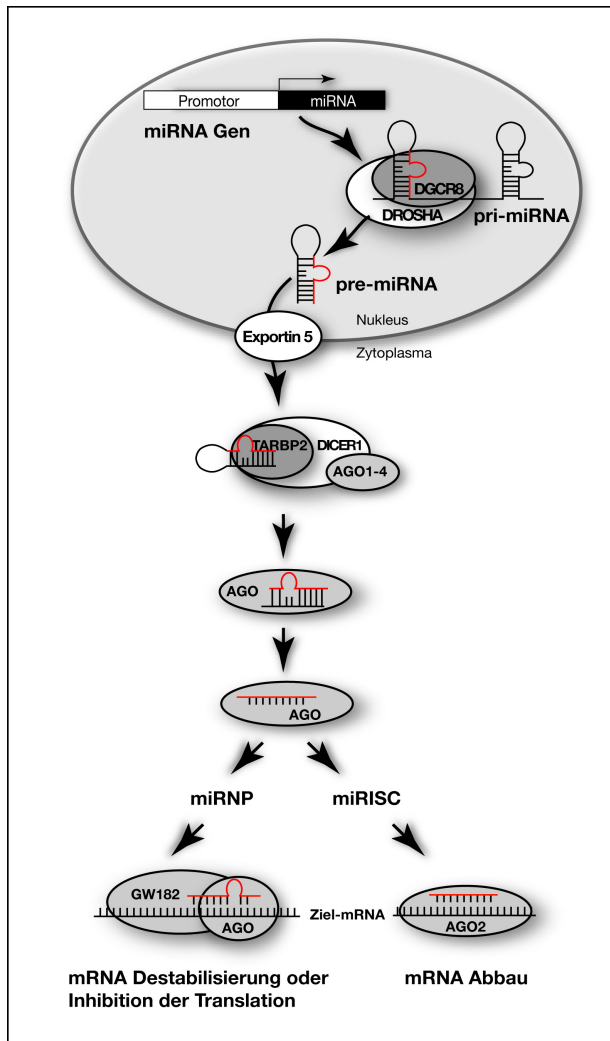


Abb. 2. Biogenese und Funktion der miRNAs.

Modifiziert nach Farazi *et al.* ⁴⁶.

Pri-miRNA = *primary* miRNA, pre-miRNA = *precursor* miRNA, miRNP = *miRNA-containing ribonucleoprotein complex*, miRISC = *miRNA-induced silencing complex*, DGCR8 = *DiGeorge syndrome critical region gene 8*, TARBP2 = *Tar (HIV-1) RNA binding protein 2*, AGO1-4 entspricht EIF2C1-4 (eukaryotic translation initiation factor 2c, 1-4), GW182 entspricht TNRC6A (*Trinucleotide repeat containing 6a*).

Die funktionelle Bedeutung einzelner spezifischer miRNAs im Myokard konnte erstmalig durch Zhao *et al.* im Jahr 2005 bewiesen werden ⁵⁷. Sie konnten zeigen, dass miR-1 entscheidend in die Differenzierung des Muskelgewebes während der Kardiogenese eingreift. Kurz danach wurde die erste Studie publiziert, die miRNAs als wichtige Regulatoren des kardiomyozytären Größenwachstums beschrieb. Hier führte die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von miR-195 in transgenen Tieren über eine Myokardhypertrophie zu einem dilatativen Phänotyp ⁵⁸. In den folgenden Jahren konnten verschiedene Arbeiten die funktionelle Bedeutung spezifischer miRNAs im kardiovaskulären System aufklären (zusammengefasst durch Small *et al.* ^{59,60}). Beeindruckend sind darunter die Erkenntnisse hinsichtlich der präventiven und therapeutischen Anwendung spezifischer miRNA Inhibitoren, den *Antagomiren*, im Mausmodell. Durch die *in vivo* Inhibition der miR-21 ³⁷ und der miR-199b ³⁸ konnte die Entwicklung einer Herzfehlfunktion nach Konstriktion der Aorta im Vergleich zur Kontrollgruppe reprimiert werden. Dies ging einher mit einer verringerten Hypertrophie der Kardiomyozyten und einer Reduktion der interstitiellen Fibrose. Beide Arbeiten stellten erste vielversprechende Ansätze in Hinblick auf die

Entwicklung einer möglichen miRNA-basierten Therapie der Herzinsuffizienz dar. Daher gilt es, weitere miRNAs funktionell zu überprüfen, um sie möglicherweise therapeutisch nutzen zu können.

Für die Identifizierung von möglicherweise funktionell bedeutenden miRNAs im kardiovaskulären System bediente sich die Mehrzahl bisheriger Publikationen einer differentiellen Genexpressionsanalyse ausgehend von der Annahme, dass Deregulierung und Krankheitsrelevanz in einem engen Zusammenhang stehen^{36-38,58,61,62,63}. Der geringe Anteil der miRNAs mit nachgewiesener funktioneller Relevanz im Vergleich zur Vielzahl der identifizierten deregulierten miRNAs wirft die Frage auf, ob dieser Ansatz in jedem Fall berechtigt ist oder ob man damit nicht das Risiko eingeht, nicht-regulierte, aber trotzdem funktionell relevante miRNAs von vornherein auszuschließen. Möchte man miRNAs und ihre zelluläre Funktion im großen Maßstab korrelieren, so sind Analysemethoden notwendig, mit denen man parallel mehrere hundert Moleküle untersuchen kann⁶⁴.

1.2.2 *High content screening (HCS) - Analysen*

Die Entwicklung von *High throughput screening* (HTS) - und *High content screening* (HCS) - Analysen wurde vor allem durch ihre industrielle Nutzung vorangetrieben. Beide haben das Ziel, große Substanzbibliotheken auf spezifische Ausleseparameter hin zu untersuchen, um die potentesten Moleküle heraus zu filtern. Im Gegensatz zu HTS-Analysen, deren Ausleseparameter eher einfach gehalten werden, um eine größtmögliche Effizienz zu erreichen, sind HCS-Analysen zell-basiert und zeichnen sich durch die parallele Bestimmung meist mehrerer Ausleseparameter aus. Die dafür notwendige Bildaufnahme und -analyse ist das Schlüsselkriterium für eine HCS-Analyse, um einen reichhaltigen Informationsgehalt bei gleichzeitig hoher Effizienz zu gewährleisten⁶⁵. Gleichmäßige Zellaussaat im Multiwell Format, optimale Assay- und Kulturbedingungen und eine verlässliche automatisierte Datenerhebung sowie -analyse stellen dabei große Anforderungen an die Durchführung einer HCS-Analyse^{66,67}. Neben der industriellen Anwendung mit einem Umfang von teilweise mehr als 100.000 untersuchten Substanzen pro HCS⁶⁶ gibt es mittlerweile auch verschiedene Anwendungsbeispiele in der akademischen Forschung. So wurden bereits Bibliotheken von chemischen Substanzen^{68,69}, *small molecules*^{70,71} und kleinen RNAs (siRNAs⁷², miRNA-*mimics*^{73,74}/-Inhibitoren^{74,75}) im Großmaßstab untersucht, wobei sich die Ausleseparameter hier im Grad ihrer Anforderungen an die automatisierte Analyse teilweise deutlich unterscheiden. So reichten diese von der Induktion/Repression eines Fluoreszenzreporters über die Quantifizierung der Zellproliferation bis zur Detektion von Ca²⁺-Fluktuationen in lebenden Zellen oder morphologischen Veränderungen von neuronalen Zellkulturen.

HCS-Analysen von miRNA-Bibliotheken mit primären Zellen aus dem Myokard wurden bisher noch nicht beschrieben⁶⁴. So wurden miRNA Bibliotheken bisher ausschließlich in Zelllinien hinsichtlich deren Einfluss auf die Zellviabilität⁷³ und virale Aktivität⁷⁴ untersucht. Die Verwendung von primären Kardiomyozyten beschränkt sich bisher auf die Studie von Monovich *et al.*⁷⁶. Sie untersuchten an neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten eine Bibliothek von chemischen Verbindungen nach Substanzen, die die Translokation von Histon Deacetylase 5 (HDAC5) aus dem Nukleus in das Cytosol inhibieren sollten; selektiert wurde je nach Lokalisation des Fluoreszenz-markierten HDAC5. Die hier etablierte HCS-Analyse zur Identifizierung von miRNAs, die in das Größenwachstum von Kardiomyozyten eingreifen, stellt die erste Arbeit dar, die einen pathologischen Mechanismus des kardialen Remodelings als Auslesekriterium für eine automatisierte HCS-Analyse im Multiwell Format an primären Kardiomyozyten verwendet.

1.3 Protease Inhibitor 16 als sezernierter Faktor

1.3.1 Interzelluläre Kommunikation im Myokard durch sezernierte Faktoren

Neben der direkten Zell-Zell-Kommunikation über *Gap Junctions* und der Extrazellulärmatrix-basierten Interaktion stellt die parakrine Kommunikation mit Hilfe von sezernierten Faktoren die dritte Form der Wechselwirkung zwischen kardialen Zelltypen – hauptsächlich Kardiomyozyten und Fibroblasten – dar⁷⁷. So induziert konditioniertes Medium von Fibroblastenkulturen hypertrophes Wachstum von Kardiomyozyten, während konditioniertes Medium von Kardiomyozyten die Fibroblastenproliferation stimuliert⁷⁸. Kokultiviert man adulte Fibroblasten mit embryonalen Kardiomyozyten, so führt das ebenfalls zum Größenwachstum der Kardiomyozyten, obwohl diese in der Entwicklungsphase normalerweise Proliferationspotential besitzen statt zu hypertrophieren⁷⁹. Der protektive Effekt von implantierten Stammzellen bei Myokardischämie konnte ebenfalls teilweise auf parakrin-vermittelte Signaltransduktion zurückgeführt werden⁸⁰. Eine mögliche klinische Anwendung von sezernierten Faktoren wird bereits getestet (siehe Abschnitt 1.1.4).

Bisher wurden nur wenige parakrine Faktoren im Herz identifiziert und funktionell erforscht. Darunter sind neben den bisher genannten Cytokinen (Abschnitt 1.1.4) der *Fibroblast growth factor 2* (FGF2), die Interleukin (IL)-6 Familie und das Cytokin IL-33 die bisher wohl am besten studiertesten Proteine⁷⁷. Eine systematische Analyse zur Identifizierung des kardialen Sekretoms könnte die Basis für die Identifizierung von neuen parakrin wirkenden, womöglich auch therapeutisch nutzbaren Molekülen bilden. Eine solche Analyse fehlte bisher in der Literatur.

1.3.2 Identifizierung und erste Charakterisierung des Protease Inhibitors 16

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde durch unsere Arbeitsgruppe anhand einer murinen kardialen cDNA-Bibliothek ein genetischer Hefe-Screen speziell für die Identifizierung von sezernierten Faktoren durchgeführt. Basierend auf der Existenz eines Sekretionssignals konnten 54 kardiale Proteine identifiziert werden⁸¹. Darunter zeigte der Protease Inhibitor 16 (PI16) neben dem Natriuretischen Peptid A (engl. *Atrial natriuretic peptide, ANP*) die stärkste Hochregulation im insuffizienten Herz (Abb. 3A).

Das murine PI16 besteht aus 489 Aminosäuren und hat eine prognostizierte molekulare Masse von 53,6 kDa. An das N-terminale Sekretionssignal schließt die sogenannte CAP (**CAP: C**ystein reiche sekretorische Proteine aus dem männlichen Reproduktionstrakt der Säuger (CRISPs), die **Antigen (Ag) 5** Proteine der Insekten, die **Pathogenese-verwandten 1** (engl.: *Pathogenesis-related, Pr-1*) Proteine in den Pflanzen⁸²) Domäne an, aufgrund derer PI16 der CAP Superfamilie zugeordnet wird. Ein zweites Mitglied dieser Familie, CRISP2, konnte ebenfalls in unserem Hefe-Screen identifiziert werden. Jedoch zeigte es keine differentielle Regulation im kranken Herz. Innerhalb dieser Superfamilie existiert neben PI16 auch PI15⁸³. Ob die Namensgebung wirklich der Funktion beider Proteine entspricht, muss jedoch erst noch bewiesen werden.

In Bezug auf eine funktionelle Charakterisierung von PI16 im Myokard wurden verschiedene experimentelle Ansätze *in vitro* und *in vivo* in den letzten Jahren verfolgt. Im Fokus lag dabei vor allem die Rolle von PI16 im Kardiomyozyt. In primären Kardiomyozytenkulturen wurde ein wachstumsinhibierender Effekt nach kombinierter Isoprenalin (Iso)/Phenylephrin (PE) – Stimulation durch adenoviral-vermittelte PI16 Überexpression erreicht (Abb. 3B). Wobei man an dieser Stelle darauf hinweisen sollte, dass dieser Phänotyp bereits nur bei Infektion jeder zehnten Zelle auftrat und daher auch durch ein parakrin-vermitteltes Signal verursacht worden sein könnte. Der entgegengesetzte Phänotyp – eine Zunahme des kardiomyozytären Wachstums – konnte bei der Herunterregulation des endogenen PI16 durch siRNAs beobachtet werden⁸¹. Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von PI16 in transgenen Mäusen unterstützte diesen Phänotyp; in Myokardschnitten konnte eine Verkleinerung der Kardiomyozytenzellgröße festgestellt werden (Abb. 3C).

Mit Hilfe von Antikörpern gegen das gesamte Protein, Exon 5 und ein Peptid von 10 Aminosäuren (AS 84-94) konnten wir die PI16 Expression in verschiedenen Organlysaten (Abb. 3D), in isolierten Kardiomyozyten (Abb. 3E) im Kulturmedium und Blutserum (Abb. 3F) sowie die Lokalisation im Myokard genauer untersuchen (Abb. 3G). Interessanterweise detektierten alle drei Antikörper spezifisch drei Banden im Gewebelysat (Abb. 3A und 3D). Einzelne Banden wurden entweder nur im Zellysat (primär unterste Bande entspricht dem

intrazellulären PI16; Abb. 3E) oder im Kulturmedium (einzelne obere Bande, entspricht dem sezernierten PI16; Abb. 3F) erkannt. In der Maus liegt PI16 unter normalen Bedingungen vor allem in der Aorta, dem Fettgewebe und in der Haut vor; eine vergleichbare Akkumulation kann man im Myokard erst nach Induktion der Herzinsuffizienz beobachten (Vgl. Abb. 3A und 3D). Betrachtet man sich die Lokalisation innerhalb des Herzens, so detektiert man PI16 vor allem in interzellulären Bereichen zwischen den Kardiomyozyten (Abb. 3G).

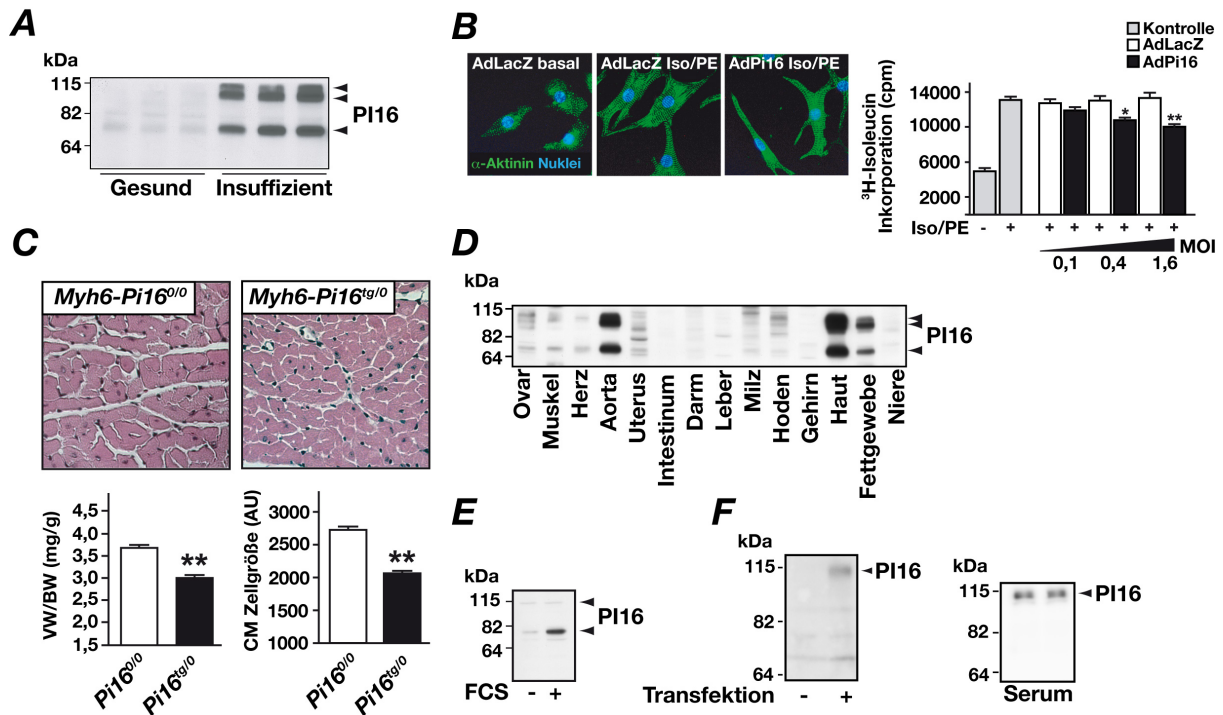


Abb. 3. Ausgewählte Studien zur bisherigen Charakterisierung des PI16 Proteins.

(A) Untersuchung der PI16 Abundanz im gesunden bzw. insuffizienten Myokardgewebe (aus 12 Monate alten Tieren). (B) Untersuchungen zur Kardiomyozytenhypertrophie nach adenoviral-vermittelter Expression von PI16 in neonatalen Rattenkardiomyozyten und (C) in transgenen Mäusen. (D) Determinierung der PI16 Expression in verschiedenen Organen von Wildtyp Mäusen. (E) Detektion von PI16 in Zelllysaten von neonatalen Rattenkardiomyozyten vor und nach Stimulation mit 5% FCS für 24 h. (F) Detektion von sezerniertem PI16 im Kulturmedium von HEK293 Zellen 48 h nach deren Transfektion mit einem PI16 kodierenden Expressionsplasmid (links), und im Serum von Wildtyp Mäusen (rechts). (G) Immunfärbung von PI16 auf einem Myokardschnitt (Wildtyp). Ad = Adenovirus, BW = *Body weight*,

CM = *Cardiomyocyte*, cpm = *counts per minute*, FCS = *Fetal calf serum*, Iso = *Isoprenalin*, kDa = *Kilodalton*, MOI = *Multiplicity of infection*, PE = *Phenylephrin*, VW = *Ventricular weight*. (A) bis (E) und (G) wurden nach Frost *et al.*⁸¹ modifiziert.

Die intrazellulären Signalwege über die PI16 funktionell aktiv ist, konnten bisher noch nicht charakterisiert werden. Den einzigen Anhaltspunkt hinsichtlich eines möglichen Interaktionspartners bildet die Publikation von Reeves *et al.*⁸⁴, die das humane Homologe von PI16 (Synonym: *Prostate secretory protein of 94 amino acids binding protein* (PSPBP)), als direkten Interaktor von *Microseminoprotein, beta*, (MSMB, Synonym: *Prostate secretory*

protein of 94 amino acids (PSP94)) identifizierten. Beide im humanen Blutkreislauf zirkulierenden Proteine konnten als Komplex aus männlichen Serumproben isoliert werden. PI16 stellt ein neu identifiziertes, sezerniertes Protein im Herzen dar, das bei Herzinsuffizienz verstärkt im Myokard akkumuliert. Erste Analysen belegten eine funktionelle Relevanz von PI16 im Myokard.

1.3.3 Cre/LoxP-vermittelte Deletion von PI16 *in vivo*

Ein gezieltes Gen in der Maus zu verändern, ohne in das restliche Genom einzugreifen, eröffnete die Möglichkeit, funktionelle Analysen auf physiologischer Ebene im Kontext des Gesamtorganismus durchzuführen. Dafür muss das Genom von embryonalen Stammzellen zunächst lokusspezifisch durch homologe Rekombination verändert werden. Die veränderten Zellen werden anschließend in die Maus eingebracht, und die Modifikation wird bei Keimbahntransmission der injizierten Zellen an die Nachkommen weiter gegeben. Martin Evans, Mario Capecchi und Oliver Smithies trugen mit ihren Erkenntnissen zur homologen Rekombination, zu embryonalen Stammzellen sowie zur Mausentwicklung entscheidend zur Etablierung dieses Systems bei und erhielten dafür 2007 den Nobelpreis der Medizin⁸⁵.

Die lokusspezifische Veränderung von embryonalen Stammzellen erfolgt über den sogenannten *Targeting* Vektor, nach dessen Elektroporation in die kultivierten Zellen. Dafür sorgen mehrere Kilobasen lange, homologe Sequenzen, die in den Vektor inseriert werden (5' und 3' Arm, siehe Abb. 4). Um die positiven Stammzellen, in denen die Rekombination stattgefunden hat, selektionieren zu können, enthält der Vektor einen positiven Resistenzmarker (Phosphoglyceratkinase (*Pgk*)-Promotor/Neomycin). Der *Targeting* Vektor für die zielgerichtete genetische Veränderung des *Pi16* Locus wurde in meiner Diplomarbeit⁸⁶ begonnen. Wir entschieden uns für eine Veränderung, die eine globale oder konditionale (gewebs- und/oder zeitspezifische) Ausschaltung von PI16 in der Maus ermöglicht. Der Vorteil gegenüber einer konventionellen (globalen) Deletion ist (1) die mögliche Vermeidung eines komplexen bzw. lethalen Phänotyps aufgrund der Expression von PI16 in verschiedenen Organen und (2) die mögliche Erforschung der Herkunft und Funktion des zirkulierenden PI16 im Blut; neben der Identifizierung des sezernierenden Gewebes nach spezifischer Deletion könnte man PI16 vielleicht eine endokrine Funktion in der Peripherie nachweisen. Für die konditionale Ausschaltung wurde das Cre/LoxP-System entwickelt. Dieses basiert auf der Beobachtung von Sauer *et al.* aus dem Jahr 1988⁸⁷, dass Cre (engl. *Cyclization Recombination*) aus dem Bakteriophagen P1 die Rekombination ihrer Erkennungssequenzen (engl. *Locus of crossing over*, *LoxP*) auch in Säugetierzellen katalysiert. Flankiert man demnach eine DNA-Sequenz, die für die Funktion oder Struktur des finalen Zielproteins essentiell ist, mit LoxP-Sequenzen, dann wird dieses Segment bei Cre Expression durch Rekombination entfernt und resultiert in einem Expressionsverlust des

Zielproteins. Aufgrund der gewebs- und/oder zeitspezifischen Kontrolle⁸⁸ der Cre Expression durch entsprechende Promotoren kann man den Expressionsverlust des Zielproteins kontrollieren. So existieren mittlerweile viele verschiedene transgene Cre Mauslinien, die für spezifische Deletionen mit der generierten Linie verpaart werden können (http://nagy.mshri.on.ca/cre_new/index.php, 2011). Es ist ebenfalls möglich Cre in der Keimbahn zu exprimieren, um schließlich eine globale Deletion in den Nachkommen unabhängig von einer Cre Expression zu erhalten (z.B. *Nestin (Nes)-Cre*⁸⁹). Aufgrund von bioinformatischen Analysen wurde entschieden, Exon 3 und 4 der *Pi16* Sequenz mit LoxP-Sequenzen zu flankieren, die zusammen mit Exon 1 und 2 die konservierte CAP-Domäne bilden. Zusätzlich flankierten wir die Resistenzkassette mit Frt (engl. *FLP recognition target*) – Sequenzen (Abb. 4). Diese werden spezifisch von der FLP Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* erkannt und bilden eine Alternative zum Cre/LoxP-System. Bei globaler Expression dieser Rekombinase⁹⁰, ist es möglich, die Resistenzkassette in allen Zellen des Organismus im nachhinein zu entfernen und somit mögliche Interferenzen mit der Expression des modifizierten Gens aufzuheben.

Die erfolgreiche Fertigstellung des *Targeting* Vektors während und nach Beendigung meiner Diplomarbeit legte den Grundstein für die Generierung einer Mauslinie, in der PI16 variabel hinsichtlich Zelltyp und Zeitpunkt ausgeschaltet werden kann.

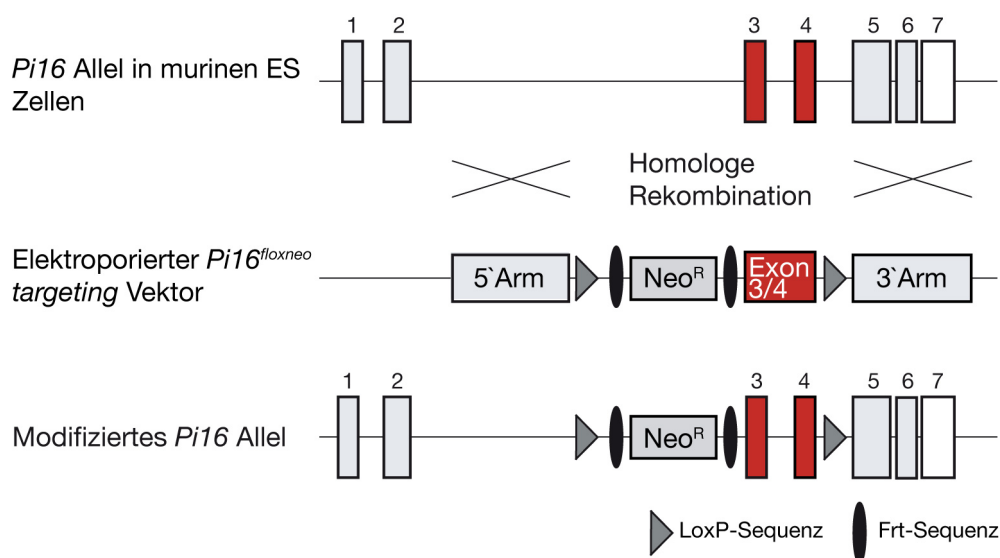


Abb. 4. Modifikation des *Pi16* Allels nach homologer Rekombination mit dem *Targeting* Vektor.

Das PI16 Protein wird von sechs Exons codiert; Exon 7 wird aufgrund eines Stopcodons in Exon 6 nicht translatiert. Über die homologen Arme (5' und 3' Arm) kommt es zur homologen Rekombination zwischen *Targeting* Vektor und genomischer *Pi16* Sequenz, es resultiert das LoxP-flankierte *Pi16*-Allel. Die inserierten Frt-Sequenzen dienen der Deletion des Selektionsmarkers (Neo^R) bei Expression der FLP-Rekombinase. Wird die Cre-Rekombinase exprimiert, so katalysiert sie die Rekombination zwischen den beiden LoxP-Sequenzen (modifiziert nach einer Abbildung in meiner Diplomarbeit⁸⁶). ES = embryonale Stammzellen.

1.3.4 Ziele der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine 96 Well-basierte HCS-Analyse für primäre neonatale Rattenkardiomyozyten zur Untersuchung von 230 synthetischen miRNA-*mimics* in Hinblick auf ihre Funktion beim Größenwachstum von Kardiomyozyten zu etablieren. Als Auslesekriterium sollte die Zellgrößenveränderung als direkter Parameter für pro- oder anti-hypertrophes Wachstum dienen. Die potentesten Kandidaten sollten außerdem eine sehr gute endogene Expression aufweisen. Im Anschluss an den initialen Screen sollte die Bestätigung der ausgewählten Kandidaten in Validierungsexperimenten hinsichtlich Zellgröße und weiterer etablierter Ausleseparameter für die kardiomyozytäre Hypertrophie (Proteinsynthese, *Nppa*-Expression) erfolgen. Die anschließende Bestimmung der Zellgrößenveränderung nach Inhibition der endogenen miRNA sollte die physiologische Relevanz der identifizierten miRNAs weiter unterstreichen. Im Gegensatz zu bisherigen Studien sollte diese Arbeit eine unvoreingenommene Auswahl von miRNAs auf ihren Einfluss bezüglich kardiomyozytärer Hypertrophie untersuchen.

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit der *Pi16^{floxneo} Targeting* Vektor in murine embryonale Stammzellen elektroporiert werden. Nach Selektion der positiven Klone sollten diese in die Blastozyste einer schein-schwangeren Maus injiziert und die resultierenden chimären Mäuse mit C57BL/6 – Wildtyp-Mäusen gekreuzt werden. Kam es zur Integration der Stammzellen in die Keimbahn der chimären Mäuse, so wurde das *Pi16* Allel mit der gezielten genetischen Modifikation an die Nachkommen weiter gegeben. Nach erfolgreicher Rekombination der Frt- und LoxP-Sequenzen *in vivo* sollten erste phänotypische Analysen – mit Hauptaugenmerk auf das Herz - neue wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der kardialen Bedeutung von PI16 erbringen.

2 MATERIALIEN

Antikörper

Antikörper	Gerichtet gegen	Hergestellt in	Verdünnung/ finale Konz.	Firma
Alexa488-anti-Maus IgG	Maus	Ziege	IF: 1:200 (10 µg/ml)	Invitrogen
α-Aktinin (monoklonal, Klon EA-53)	Maus	Maus	IF: 1:1000	Sigma-Aldrich
Albumin	Maus	Kaninchen	WB: 1:1000 (100 ng/ml)	Abcam
GNB (T-20, sc-378)	Maus	Kaninchen	WB: 1:5000 (40 ng/ml)	Santa Cruz
HRP-anti-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	WB 1:10.000	Jackson ImmunoResearch
PI16	Human	Maus	WB 1:1000	Abnova
PI16 - Volllänge - Exon 5 - AS 84-94	Maus	Kaninchen	IHC: 1:1000 (1 µg/ml) WB: 1:5000 (200 ng/ml)	Eigene Herstellung in Kooperation mit ImmunoGlobe Antikörper GmbH
Biotin-anti-Kaninchen HRP-Streptavidin	Kaninchen	Ziege	2 µg/ml 2 µg/ml	KPL (HistoMark Biotin Streptavidin-HRP Systems)

Chemikalien

Agar	AppliChem (Darmstadt, D)
Agarose	Peqlab (Erlangen, D)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Antibody diluent	Ventana (Tucson, USA)
BaculoGold™	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem (Darmstadt, D)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D)
Chelex® 100	Biorad (München, D)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)
Complete Mini, Proteinaseinhibitoren	Roche (Mannheim, D)
DePex	Serva (Amstetten, A)
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
DOTAP	Roche (Mannheim, D)

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	GIBCO (Karlsruhe, D)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	KPL (Gaithersburg, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, D)
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth (Karlsruhe, D)
Direct Red 80	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Dobutamin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Eosin Y Lösung, wässrig	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem (Darmstadt, D)
Essigsäure 100 %	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)
Ethanol	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Fetales bovines Serum (FCS)	PAN (Aidenbach, D), GIBCO (Karlsruhe, D)
Geneticin (G418)	GIBCO (Karlsruhe, D)
Glukose	Merck (Darmstadt, D)
Glycerol	Merck (Darmstadt, D)
Glycin	AppliChem (Darmstadt, D)
$^3\text{H(N)}$ -Isoleucin L	Hartmann (Agoutischweig, D)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt, D)
Hematoxylin-Lösung	Roth (Karlsruhe, D)
HEPES	AppliChem (Darmstadt, D)
Hering Sperma DNA	Sigma (Deisenhofen, D)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem (Darmstadt, D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth (Karlsruhe, D)
Kanamycin	Fluka (Seelze, D)
<i>Leukemia Inhibitory Factor</i> (LIF)	Chemicon (Hampshire, UK)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Lithiumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Magermilch	AppliChem (Darmstadt, D)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck (Darmstadt, D)
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck (Darmstadt, D)
<i>Minimum Essential Eagle</i> (MEM)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
2-Mercaptoethanol	AppliChem (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D)
Methanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumcitrat (Na-Citrat)	AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumlaurylsarcosin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Nicht-essentielle Aminosäuren	GIBCO (Karlsruhe, D)
Nuklease-freies Wasser	GIBCO (Karlsruhe, D)
Oligofectamine™	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Opti-MEM® I	GIBCO (Karlsruhe, D)
Paraffin (Parablast)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
(Steriles) <i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	GIBCO (Karlsruhe, D)
$\alpha^{32}\text{P}$ -Desoxycytosintriphosphat (dCTP)	Hartmann (Agoutischweig, D)

Penicillin/Streptomycin	GIBCO (Karlsruhe, D), PAN (Aidenbach, D)
Pepton	AppliChem (Darmstadt, D)
Pertex	Medite (Burgdorf, D)
Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)
Phenylephrin (PE)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Pikrinsäure Lösung (1,3%)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
RNAse Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Roti-Histol	Roth (Karlsruhe, D)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1 Acrylamid-Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure 37% (HCl)	Merck (Darmstadt, D)
Tertiärer Amylalkohol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Toluol	Roth (Karlsruhe, D)
2,2,2 Tribromethanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem (Darmstadt, D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem (Darmstadt, D)
TriFast, peqGold	Peqlab (Erlangen, D)
Tween® 20	AppliChem (Darmstadt, D)
Trypanblau	AppliChem (Darmstadt, D)
Vitamin B12	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt, D)
Xylol	Roth (Karlsruhe, D)
Ziegenserum	GIBCO (Karlsruhe, D)

Enzyme

AccuPrime Pfx DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Benzonase	Merck (Darmstadt, D)
Difco Trypsin 250	BD (Heidelberg, D)
DNase	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Kollagenase	Worthington (Lakewood, USA)
Proteinase K	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Restriktionsendonukleasen	AppliChem (Darmstadt, D)
	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Taq DNA Polymerase	GenScript (Piscataway, USA)
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypsin	GIBCO (Karlsruhe, D)
Trypsin 1:250	PAN (Aidenbach, D)

Kits

BCA Kit	Thermo Scientific (Bonn, D)
DAB Reagent Set	KPL (Gaithersburg, USA)
ECL Plus	GE Healthcare (Freiburg, D)
GeneAmp XL PCR Kit	AppliedBiosystems (New Jersey, USA)
GeneAmp High Fidelity PCR System	AppliedBiosystems (New Jersey, USA)
HistoMark Biotin Streptavidin-HRP Systems	KPL (Gaithersburg, USA)
Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen (Hilden, D)

Power SYBR Green PCR Master Mix	AppliedBiosystems (New Jersey, USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, D)
Rediprime II Random Prime Labelling System	GE Healthcare (Freiburg, D)
Silencer [®] siRNA Labeling Kit	AppliedBiosystems (New Jersey, USA)
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (New Jersey, USA)
2x TaqMan Universal PCR Master Mix II, no UNG	Applied Biosystems (New Jersey, USA)

Puffer, Lösungen und Nährmedien

Allgemeine Puffer und Lösungen

Blockpuffer

Tris (1 M; pH 7,5)	3 ml
NaCl	1,75 g
Tween® 20	0,3 ml
ddH ₂ O	ad 300 ml
Magermilchpulver	5%

Church Puffer

Phosphat Puffer (0,5 M; pH 7,2)	500 ml
SDS (20%)	330 ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	0,1%
Hering Sperma DNA	1%
BSA	10 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Church Wash Puffer

Phosphat Puffer (0,5 M; pH 7,2)	40 ml
SDS (20%)	50 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Denaturierungspuffer

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

EDTA-Puffer

EDTA (1 mM, pH 8,0)	
Tween® 20	0,05%

Eosin-Lösung

Eosin Y Lösung, wässrig	20 ml
ddH ₂ O	80 ml
Essigsäure (100%)	3 Tropfen

Ladepuffer

- für Agarosegele

Bromphenolblau	25 mg
EDTA (0,5 M)	1,4 ml
Glycerol	3,6 ml
ddH ₂ O	ad 12 ml

- für Polyacrylamidgele

Bromphenolblau	0,001 % (m/v)
Glycerol	50%
ddH ₂ O	50%

Laufpuffer (10x)

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	15 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Lysispuffer für Schwanzbiopsien

- Analyse über PCR

Natriumlaurylsarcosin (10%)	5 ml
NaCl (5 M)	2 ml
Chelex® 100	5 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

- Analyse über Southern Blot

Tris (100 mM)	12,1 g/l
EDTA (5 mM)	1,87 g/l
NaCl (200 mM)	11,7 g/l
ddH ₂ O	ad 1 l

Lysispuffer für Proteinlysate

Tris (pH 6,7)	50 mM
SDS	2%
Na ₃ VO ₄	1 mM
Complete Mini, Proteinaseinhibitoren	1 Tablette/10 ml Puffer

Neutralisierungspuffer

NaCl	1,5 M
Tris	0,5 M
HCl (37%) bis pH 7,2	

Paraformaldehyd (4%)

PFA	20 g
PBS (1x)	480 ml
Lösung auf 60°C erhitzen	
NaOH (1 M) bis pH 7,2	
PBS (1x)	ad 500 ml
Lagerung bei -20°C	

PBS (10x)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
ddH ₂ O	ad 1 l

PBST

PBS (10x)	100 ml
Tween® 20	1 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Perfusionspuffer

NaCl	113 mM
KCl	4,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄	0,6 mM
MgSO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	12 mM
KHCO ₃	10 mM
HEPES	10 mM
Taurin	30 mM

Phosphat Puffer (0,5%; pH 7,2)

68,4% Lösung A (1 M)	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1 M
31,6% Lösung B (1 M)	
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1 M

Puffer für Sammelgel (4x)

Tris	61 g
SDS (10%)	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
HCl (37%) bis pH 6,7	

Puffer für Trenngel (4x)

Tris	182 g
SDS (10%)	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
HCl (37%) bis pH 8,8	

Puffer P1

Perfusionspuffer	9 ml
FCS (PAN)	1 ml
CaCl ₂ (10 mM)	12,5 µl

Puffer P2

Perfusionspuffer	47,5 ml
FCS (PAN)	2,5 ml
CaCl ₂ (10 mM)	62,5 µl

Sirius Rot-Lösung

Direct Red 80	0.125 g
ddH ₂ O	15 ml
Lösung filtrieren	
Pikrinsäure Lösung (1,3%)	235 ml

Saline Sodium Citrate (SSC) - Puffer (10x)

NaCl	1,5 M
Na-Citrat	0,25 M

Tribromethanol

2,2,2 Tribromethanol	2,5 g
tertiärer Amylalkohol	2,5 ml
Inkubation im Wasserbad, Amylalkohol verdampfen lassen	
NaCl (0,9%)	ad 100 ml
Lagerung bei -20°C	

Tris-Acetat-EDTA (TAE) - Puffer (50x)

Tris	0,2 M
Essigsäure	5,7%
EDTA (0,5M)	10%
ddH ₂ O	ad 1 l

Tris Buffered Saline (TBS) - Puffer (10x)

Tris	61 g
NaCl	90 g
ddH ₂ O	1000 ml
HCl (37%) bis pH to 8,4	

Tris-EDTA (TE) - Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Transferpuffer

Tris (1 M, pH 8,3)	25 ml
Glycin	11,26 g
Methanol	100 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Verdünnungspuffer

2-Mercaptoethanol	1,25 ml
Ladepuffer (Western Blot)	5 ml
Lysispuffer für Proteinlysate	ad 50 ml

Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

BrdU

BrdU	230 mg
ddH ₂ O	74,8 ml
Lagerung bei -20°C	

Calicum- and bicarbonate free Hanks with Hepes (CBFHH)

NaCl (3 M)	40 ml
KCl (0,5 M)	10 ml
MgSO ₄ ·x7H ₂ O (8,1 M)	10 ml
KH ₂ PO ₄ (0,05 M)	10 ml
Na ₂ HPO ₄ ·x7H ₂ O (0,03 M)	10 ml
HEPES	4,76 g
Glucose	1 g
ddH ₂ O	ad 1 l
NaOH bis pH 7,3	
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Lagerung bei 4°C	

DNase

DNase	100 mg
NaCl (0,9%)	50 ml
Lagerung bei -20°C	

Trypsinlösung

Trypsin 1:250	50 mg
Difco Trypsin 250	250 mg
CBFHH	200 ml
DNase	2 ml

Vitamin B12

Vitamin B12	100 mg
ddH ₂ O	50 ml
Lagerung bei -20°C	

Nährmedien

Die folgenden Nährmedien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und bei 4°C gelagert.

EF-Medium

DMEM	
FCS (GIBCO)	10%

ES-Medium

DMEM	
FCS (GIBCO)	20%
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
2-Mercaptoethanol (Roth)	3,5 µl
LIF	1000 U/ml

ES+G418 - Medium

ES-Medium	
Geneticin	500 mg

ES+P/S - Medium

ES-Medium	
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Freezing-Medium

DMEM	
FCS	20%
DMSO	10%

LB-Medium

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
NaOH (1 N)	1 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

LB-Agar

Agarose	15 g
LB-Medium	ad 1 l

NRCM Basismedium

MEM	10,8 g
Vitamin B12	1 ml
NaHCO ₃	350 mg
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 7,3	

NRCM Kulturmedium

FCS – 0,1%, 1% oder 5% (PAN)	0,5 ml, 5 ml oder 25 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
BrdU	5 ml
NRCM Basismedium	ad 500 ml

Pre-plating Medium

FCS (PAN)	25 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
NRCM Basismedium	ad 500 ml

Oligodesoxynukleotide

Die für die Anfertigung dieser Arbeit erforderlichen Primer wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe, D), MWG Biotech (Martinsried, D) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D) verwendet.

	Name	Sequenz (5' → 3')	Länge
<i>Actb</i> (rno)	rat beta-Actin F rat beta-Actin R	CTCTGAACCCTAAGGCCAAC ACCAGAGGCATACAGGGACA	113 bp
<i>Actb-Flpe^{tg/0}</i> Mäuse	IMR0042 IMR0043 IMR1348 IMR1349	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC CTAGTGC GAAGTAGTGATCAGG	324 bp (0) 724 bp (tg)
cDNA Synthese	Oligo(dT)	TTTTTTTTTTTTTTTT	
ES-Zell Screening	PCRSscreenloxp pi16EprobeR	GAATTCGATAACTGCAGATATAAC CACAGCGCATACAAGGATGG	3,8 kB

<i>Gapdh</i> (mmu)	m_Gapdh(new)_fwd m_Gapdh(new)_rev	GTGAAGGTCGGTGTGAACG TCGTTGATGGCAACAATCTC	96 bp
<i>Nes-Cre^{tg/0}</i> Mäuse	TK140 TK142	ATCCGAAAAGAAAACGTTGA ATCCAGGTTACGGATATAGT	629 bp
<i>Nppa</i> (mmu)	Mm Nppa-51F Mm Nppa-176R	GCTTCCAGGCCATATTGGAG GGGGGCATGACCTCATCTT	185 bp
<i>Nppa</i> (rno)	rNppa For rNppa Rev	CTCCAGGCCATATTGGAG TCCAGGTGGTCTAGCAGGTT	148 bp
<i>Pi16^{flox/+}</i> Mäuse	5`flloxp1 Delfrt1R	ACCAACCAACCGAATAACCA CTCAGCCTCAAGCCTCAGAT	265 bp (flox) 128 bp (+)
<i>Pi16^{floxneo/+}</i> Mäuse	LoxpF LoxpR	GACAGATTCCATCCTTAAGTCCC CCCGGCCACGGGCCCTTCGCAC	249 bp (floxneo) 88 bp (+)
<i>Pi16^{lox/+}</i> Mäuse	5`flloxp1 LoxpF Delloxp4R	ACCAACCAACCGAATAACCA GACAGATTCCATCCTTAAGTCCC TCCGCTTAGAGGACTGCCTA	(1119 bp)* (+) 341 bp (lox) 146 bp (+)

* Bande wird aufgrund der Länge nicht zuverlässig bei der PCR amplifiziert.

3 METHODEN

3.1 Methoden zur DNA Analyse *

3.1.1 Analyse von Nukleinsäuren über Agarose-Gelelektrophorese

Mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe in Abhängigkeit der Agarosekonzentration aufgetrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (interkaliert sequenzunspezifisch in die DNA) versetzt, um die resultierenden Bandenmuster anschließend mit UV-Licht (312 nm) visualisieren zu können.

Ein 1%iges Agarosegel setzte sich aus Agarose (1 g), 1x TAE-Puffer (100 ml) und Ethidiumbromid (1 mg/ml, 8 µl) zusammen. Vor der Zugabe des Ethidiumbromids wurde die Agarose in 1x TAE Puffer erhitzt, bis zur Handwärme abgekühlt und in Gelschlitten mit den entsprechenden Taschenformern (Peqlab, Erlangen, D) gegossen. Die Proben wurden mit Agarose-Ladepuffer versetzt und zusammen mit dem Größenstandard (New England Biolabs, Frankfurt am Main, D) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE gefüllten Laufkammern (Peqlab, Erlangen, D) bei 120 mA. Sollten aufgetrennte DNA-Fragmente zurückgewonnen werden, dann erfolgte die Extraktion des ausgeschnittenen Gelstücks mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte mit ddH₂O. Die Menge und Reinheit der Probe wurde mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND 1000 (Peqlab, Erlangen, D) bestimmt.

3.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* Zellen

Nachdem die bei -80°C gelagerten elektrokompetenten DH10B-Zellen (50 µl Aliquot) auf Eis aufgetaut worden waren, wurde die Plasmid-DNA (max. 100 ng) zur Zellsuspension gegeben und diese in eine Küvette (Gene Pulser^R 0,1 cm Cuvette; BIO-RAD, München, D) überführt. Der Ansatz wurde anschließend einem kurzen elektrischen Puls (1,8 kV) ausgesetzt (MicroPulserTM, BIO-RAD, München, D), sofort danach in 400 µl LB Medium (Raumtemperatur, 37°C) aufgenommen. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37°C im Thermomixer (400 rpm) geschüttelt, und schließlich das gewünschte Volumen auf einer LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin; 33 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Die Inkubation der Platte erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.1.3 Plasmidpräparation und DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe der Midi- bzw. Maxi-Plasmidpräparation (Qiagen Plasmid Midi / Maxi Kit, Qiagen) lässt sich reine Plasmid-DNA in großen Mengen gewinnen. Dafür wurden 100 ml

* Die Methoden zur DNA Analyse wurden nach den Angaben in meiner Diplomarbeit⁸⁶ modifiziert.

antibiotikumhaltiges LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin; 33 µg/ml Kanamycin) mit dem Bakterienklon angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die weiteren Schritte wurden anhand der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration an gewonnener Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.1).

Für den Restriktionsverdau wurde die gewünschte DNA-Menge mit dem entsprechenden Enzym und 1/10 Vol des entsprechenden 10x Reaktionspuffer inkubiert. In der Regel wurden 1 bis 2 U Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt. Die Inkubationsdauer, Reaktionstemperatur und -pufferzusammensetzung richteten sich nach den Herstellerangaben. Die Reaktionen wurden in der Regel 1 h bei 37°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels eines Agarosegels kontrolliert und das gewünschte Fragment aus der Matrix eluiert (Abschnitt 3.1.1).

3.1.4 DNA-Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung wurde durch die Firma MWG Biotech (Martinsried, D) durchgeführt. Dazu wurden 2 µg der DNA in 20 µl ddH₂O gelöst und verschickt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Online Programm *Seqtool* (<http://seqtool.sdsc.edu>).

3.2 Arbeiten mit primären Kardiomyozyten

3.2.1 Isolierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Neonatale Rattenkardiomyozyten (engl. *NRCM*) wurden von 1-2 Tage alten Sprague Dawley Ratten durch enzymatischen Verdau isoliert⁶⁴. Alle Vorbereitungen wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Die Herzen wurden explantiert und in eine 10 cm Zellkulturschale mit CBFHH überführt, die für die nächsten Schritte auf Eis gestellt wurde. Nach dem Entfernen der Vorhöfe wurden die Herzen klein geschnitten und mit 15 ml Trypsinlösung auf dem Magnetrührer inkubiert (20 min, RT). Die Trypsinlösung wurde verworfen und das Gewebe für weitere 10 min in frischer Enzymlösung (10 ml) unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Suspension wurde vorsichtig 10x auf- und abpipettiert und der Überstand in ein 50 ml Röhrchen, das mit 7,5 ml FCS gefüllt war, überführt und bis zum nächsten Schritt bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt bis die Herzen fast komplett verdaut waren (jeweils 10 min Inkubation mit Trypsin). Die isolierten Zellen in den Röhrchen wurden pelletiert (800x g, 10 min, RT) und in 10 ml *NRCM Pre-plating* Medium resuspendiert. Die gesamte Suspension wurde filtriert (40 µm Porengröße; BD, Heidelberg, D), je 10 ml des Filtrats in eine 10 cm Zellkulturschale transferiert und in einem befeuchteten Inkubator inkubiert (1 h, 1% CO₂, 37°C). Während dieses Schritts adherierten die Fibroblasten an dem Boden der Zellkulturschale, wobei die Kardiomyozyten im Überstand verblieben. Somit konnten beide

Zelltypen voneinander separiert werden. Der Kardiomyozyten-haltige Überstand wurde in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und die Zellzahl ermittelt (Countess Cell Counter, Invitrogen, Karlsruhe, D). Dafür wurden 30 μ l der Zellsuspension mit 30 μ l Trypanblau gemischt und in die dafür vorgesehene Zellzählkammer pipettiert. Letztendlich wurde die Zellsuspension mit 1% FCS NRCM Medium auf die gewünschte finale Zellmenge verdünnt und in das entsprechende Plattenformat ausgesät. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C/1% CO₂ inkubiert.

3.2.2 Isolierung von adulten Rattenkardiomyozyten

Die Isolierung erfolgte von geschulten Mitarbeitern. Adulte Kardiomyozyten wurden von Sprague Dawley Ratten, wie bereits zuvor beschrieben⁶⁴, isoliert. Die Tiere wurden mit Isofluran (4%) und einer intraperitonealen Injektion von Xylazin (80 mg/kg) und Ketamin (12 mg/kg) anästhesiert, die Herzen extrahiert, die Aorta kanüliert und die Koronararterien retrograd mit Perfusionspuffer für 3 min perfundiert. Anschließend wurde Kollagenase (Typ II) zum Puffer hinzugefügt (248 U/ml), um die ventrikulären Zellen zu dissoziieren, und für weitere ca. 45 min perfundiert. Anschließend wurde das Herz in kleine Teile geschnitten und 2,5 ml Puffer P1 hinzugefügt. Das Homogenat wurde für 10 min bei 37°C inkubiert, damit sich die Zellen absetzen konnten. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert (1 min, 900 rpm) und das Pellet mit dem Sediment im Puffer P2 vereinigt. Anschließend erfolgte die Ca²⁺ (CaCl₂)-Rekonstitution (2x 50 μ l 10 mM, 100 μ l 10 mM, 30 μ l 100 mM, 50 μ l 100 mM; nach jeder Zugabe 4 min Inkubation), um eine finale Ca²⁺-Konzentration von 100 μ M zu erreichen. Nach erneuter Sedimentation (10 min, 37°C) und anschließender Pelletierung des Überstands (1 min, 900 rpm) wurden die Zellen in 5% FCS Medium für 1-2 h bei 37°C und 1% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Kardiomyozyten pelletiert (1 min, 900 rpm). Für eine anschließende RNA-Isolierung wurden sie direkt in TriFast (Peqlab, Erlangen, D; Abschnitt 3.3.1) resuspendiert.

3.2.3 Kovalente Bindung des Cy3-Fluorophors an synthetische miRNAs

Die kovalente Bindung des Farbstoffs CyTM3 an synthetische miRNA *mimics* (reife miRNA als Duplex) erfolgte mit dem *Silencer^R siRNA Labeling Kit* (Applied Biosystems). Pro Reaktion wurden 20 μ M miRNA eingesetzt. Die Reaktion erfolgte laut den Angaben des Herstellers. Das resultierende miRNA-Pellet wurde in dem entsprechenden Volumen an Nuklease-freiem Wasser gelöst, so dass die Ausgangskonzentration von 20 μ M wieder erlangt wurde.

3.2.4 miRNA-Transfektion und pro-hypertrophe Stimulation *

NRCMs wurden isoliert und je nach Versuch in dem gewünschten Plattenformat ausgesät (siehe Abschnitt 3.2.1). 18 h später erfolgte die Transfektion der Zellen mit einer synthetischen humanen miRNA Bibliothek (pre-miRTM miRNA Precursor Library (Ambion, Austin, U.S.A.), Annotationen laut *miRBase Sequence Database Version 8.0* (<http://miRNA.sanger.ac.uk/sequences>)), einzeln erworbenen synthetischen miRNA *mimics* (Applied Biosystems, New Jersey, USA) oder miRNA Inhibitoren (alle mit einer finalen Konzentration von 50 nM; Exiqon, Vedbaek, DK). Die humane Bibliothek wurde auf 230 miRNAs, deren kanonische (7-8 Nukleotide (Nt) lange Übereinstimmung der *seed* Sequenz), marginale (6 Nt lange Übereinstimmung der *seed* Sequenz) und atypische (13-16 Nt lange Übereinstimmung in Ergänzung zur *seed* Region) Bindungsstellen⁴⁸ homolog zur Sequenz in *Rattus norvegicus* sind, eingegrenzt.

Vor der Transfektion wurde das Medium von 1% FCS zu 5% FCS ohne Antibiotikum gewechselt. Die Transfektion erfolgte ausschließlich mit LipofectamineTM 2000 laut den Angaben des Herstellers. Nur zum Vergleich der Transfektionseffizienz wurde auch mit OligofectamineTM (laut den Angaben des Herstellers) transfiziert. Nach 4-6 h Inkubation (37°C, 1% CO₂) wurde das Medium zu 0,1% FCS gewechselt und die Zellen wiederum 48 h inkubiert. Dann erfolgte die Stimulation der ausgewählten Versuchsgruppen mit Phenylephrin mit einer finalen Konzentration von 50 µM (verdünnt in 0,1% FCS haltigem NRCM Medium). Bei den nicht stimulierten Versuchsgruppen wurde frisches 0,1%iges NRCM Medium auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte jetzt für weitere 48 h bei den zuvor angegebenen Konditionen. Im Fall der miRNA Inhibitoren wurde die PE Stimulation mit einer finalen Konzentration von 10 µM vorgenommen. Die Zellen wurden anschließend entweder für den ³H-Isoleucin-Inkorporationsversuch (Abschnitt 3.2.5) oder die mikroskopische Zellgrößenbestimmung verwendet (Abschnitt 3.2.6 und 3.2.7).

3.2.5 Isoleucin-Inkorporation *

Für den Isoleucin-Inkorporationsversuch wurden isolierte NRCMs im 48 Well-Plattenformat mit 300.000 Zellen pro Well ausplattiert. Sie wurden mit den entsprechenden miRNA *mimics* oder -Inhibitoren transfiziert (4 Wells pro Gruppe) und anschließend wie im Abschnitt 3.2.4 beschrieben inkubiert. Die Zugabe des ³H(N)-Isoleucin (1 mCi/ml) verdünnt in 0,1%igen NRCM Medium (1 µCi/ml) erfolgte 48 h nach Transfektion mit dem Beginn der Phenylephrin-Stimulation. Die Zellen wurden anschließend für weitere 48 h inkubiert (37°C, 1% CO₂). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zunächst drei Mal mit 1x PBS gewaschen; dann erfolgte die Präzipitation der Proteine mit 400 µl pro Well 5%

* Die Methode wurde nach den Angaben in Jentzsch *et al.*⁶⁴ modifiziert.

Trichloressigsäure (TCA; mind. 1 h auf Eis). Um die Proteine für die Messung zugänglich zu machen, wurden die Zellen anschließend mit 400 µl pro Well 0,5 M NaOH lysiert (mind. 30 min, 37°C). Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe, D) konnten die *counts per minute* (cpm) der einzelnen Wells im β-Zähler (TriCarb 2100 TR, PerkinElmer, Rodgau, D) bestimmt werden.

3.2.6 Immunfluoreszenz *

Für die mikroskopische Zellgrößenbestimmung wurden NRCMs im 96 Well-Plattenformat mit 0,4 - 1,0x 10⁶ Zellen pro Well ausplattiert. 48 h nach Phenylephrin-Stimulation wurden die transfizierten Zellen (Abschnitt 3.2.4) mit 100 µl 4% Paraformaldehyd (PFA) pro Well fixiert (5 min, RT) und anschließend drei Mal mit 1x PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen mit 100 µl 0,2% Triton-X (verdünnt in 1x PBS) pro Well für 5 min bei RT inkubiert und wiederum drei Mal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Immunfärbung durch zwei aufeinander folgende Antikörper-Inkubationen (je 30 min, 37°C), die jeweils von drei Waschschrritten mit 1x PBS unterbrochen wurden. Die primäre Antikörper-Verdünnung enthielt den Antikörper gegen das Kardiomyozyten-spezifische Protein α-Aktinin (Sigma, 1:1000 in 1x PBS); die sekundäre Antikörper-Verdünnung bestand aus dem Alexa 488-konjugierten anti-Maus IgG (Invitrogen, 1:300 in 1x PBS) sowie DAPI (20 mg/ml, 1:200 in 1x PBS). Zum Abschluss wurden die Zellen dann mit 200 µl pro Well 50% Glycerol überschichtet und bis zu ihrer Vermessung bei 4°C gelagert.

3.2.7 Automatisierte Bestimmung der Kardiomyozytenhypertrophie *

Die Zellgrößenanalyse wurde von der Vermessung der 96 Well-Platte bis zur Analyse der akquirierten Daten als ein voll automatisiertes Mikroskopieverfahren für die Zellgrößen- und Zellzahldeterminierung etabliert. Das folgende Mikroskopiesystem wurde für die Bildaufnahme mit einem 10x Objektiv verwendet: AxioObserver.Z1 (Zeiss, Jena, D), motorisierter Scan Tisch (130x85; Märzhäuser, Wetzlar, D), Lumen200 Fluoreszenz Beleuchtung (Prior, Cambridge, UK) und Retiga-4000DC CCD Kamera (QImaging, Surrey, Kanada). Wir haben die Bildaufnahme und -analyse über Makro Funktionen (benannt als *Journal mode*) des *MetaMorph Basic Imaging Software* Packets (Molecular Devices, Downingtown, USA) automatisiert. Es wurde ein Hauptjournal generiert, dass aus drei Subjournalen besteht. Das erste Subjournal steuert das positionierte Abfahren der 96 Well - Platte, die Fokussierung mit dem 10x Objektiv und die Aufnahme der vier Fotos pro Well in zwei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen. Das zweite Subjournal kombiniert die 384 Bilder

* Die Methode wurde nach den Angaben in Jentzsch *et al.* ⁶⁴ modifiziert.

pro 96 Well Platte und Fluoreszenzkanal in jeweils einem *Stack* und legt die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen für potentielle Illustrationen übereinander. Das letzte Subjournal determiniert die Zellgröße und -zahl mit Hilfe des MetaMorph Plug-Ins *Cell scoring* (angepasst an die erwarteten Diameter und Fluoreszenzintensitäten), welches auf die zuvor generierten *Stacks* angewendet wird.

3.3 Methoden zur RNA Analyse

3.3.1 RNA-Isolierung

RNA aus Myokardgewebe und primären Zellen wurde ausschließlich mit TriFast (Peqlab, Erlangen, D) nach Angaben des Herstellers isoliert. Das RNA-Pellet wurde letztendlich in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND 1000 (Peqlab, Erlangen, D) bestimmt.

3.3.2 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription (RT)

Bei der Herstellung von cDNA macht man sich die Tatsache zunutze, dass prä-mRNAs an ihrem 3'-Ende polyadenyliert sind. Nach Bindung von Oligo(dT)-Primern (MWG Biotech, Ebersberg, D), an diesen sogenannten poly(A)-Schwanz, synthetisiert die Reverse Transkriptase den komplementären Strang (cDNA) zur mRNA-Sequenz. Die cDNA kann anschließend für Genexpressionsstudien mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) als Template verwendet werden. Um eine Detektion genomischer DNA in der anschließenden qRT-PCR auszuschließen, wurde immer ein Ansatz mit gepoolter RNA (vier RNA-Proben aus einer Isolation) ohne Reverse Transkriptase parallel zu den restlichen Proben entsprechend dem Protokoll behandelt.

Reaktionsansatz:

Substanz	Masse / Volumen
RNA	0,5 µg
Oligo(dT) Primer (10 mM)	2 µl
RNAse freies Wasser	ad 11,9 µl
Inkubation für 10 min bei 70°C	
5x First Strand Puffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
dNTPs (1 mM)	1 µl
RNAse Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor	0,1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

Der gesamte Ansatz wurde für 1 h min bei 42°C inkubiert und anschließend hitzeinaktiviert (10 min, 70°C). Zum Abschluss wurden für ein finales Volumen von 50 µl noch 30 µl Wasser zugegeben.

3.3.3 Quantitative *real time* – PCR (qRT-PCR)

Die quantitative *real time* PCR beruht auf der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction, PCR*) mit der Erweiterung, dass bei dieser Methode die Quantifizierung der Amplifikation möglich ist. Dies wird durch die Detektion von Fluoreszenzsignalen ermöglicht, die proportional mit der Menge des PCR-Produkts zunehmen.

3.3.3.1 SYBR Green basierte qRT-PCR

Hier wird die sequenzunspezifische Interkalation des Fluorophors *SYBR Green* in doppelsträngige DNA ausgenutzt. Mit jedem Zyklus steigt dessen emittiertes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu einem Referenzfluorophor (häufig: 5-Carboxy-X-Rhodamin (5-ROX)) an. Der Zyklus, an dem das *SYBR Green* Signal zum ersten Mal signifikant über das detektierte Signal des Referenzfluorophors ansteigt, wird als *Cycle threshold (Ct)* – Wert bezeichnet. Dieser ist ausschlaggebend für die anschließende Quantifizierung mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ - Methode ($=2^{-(\Delta C_t(\text{Gruppe X})-\Delta C_t(\text{Kontrollgruppe}))}$).

Reaktionsansatz:

Substanz	Volumen
Power SYBR Green PCR Master Mix	10 μ l
5' Primer (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
3' Primer (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
cDNA (1:4 verdünnt)	2,5 μ l
ddH ₂ O	7 μ l

Temperaturprogramm (StepOne Plus, Applied Biosystems. New Jersey, USA):

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Stufe 1	Vordenaturierung	95°C	600 s	1x
Stufe 2	Denaturierung	95°C	15 s	40x
Stufe 3	Hybridisierung/Elongation	60°C	60s	

3.3.3.2 TaqMan basierte qRT-PCR für die Detektion von reifen miRNAs

Für die Detektion der reifen miRNA in der qRT-PCR ist es zunächst notwendig diese mit Hilfe eines *stem loop* – Primers (im TaqMan Assay für die spezifische miRNA enthalten) revers zu transkribieren.

Reaktionsansatz (Komponenten aus *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit*, Applied Biosystems):

Substanz	Masse / Volumen
10x Puffer	1,5 µl
5x RT-Primer	3 µl
dNTPs (10mM)	0,15 µl
RNase Inhibitor	0,19 µl
Transkriptase	1 µl
RNA (2 ng/µl)	5 µl
ddH ₂ O	4,16 µl

Temperaturprogramm (Mastercycler pro, Eppendorf, Hamburg, D):

	Temperatur	Zeit
Stufe 1	16°C	30 min
Stufe 2	42°C	30 min
Stufe 3	85°C	5 min

Bei der TaqMan-basierten qRT-PCR werden sequenzspezifische Sonden verwendet, die an ihrem 5`-Ende einen Reporter- und an ihrem 3`-Ende einen Quencher-Fluorophor enthalten. In der Elongationsphase hydrolysiert die Polymerase durch ihre 5`-3`-Exonukleaseaktivität die Sonde, wobei der Reporter-Fluorophor freigesetzt und dadurch nicht weiter gequencht wird. Pro Zyklus nimmt das Fluoreszenzsignal des Reporter-Fluorophors zu.

Reaktionsansatz:

Substanz	Masse / Volumen
2x TaqMan Universal PCR Master Mix II, no UNG	10 µl
20x TaqMan RNA Assay	1 µl
RT-Reaktion	1,33 µl
ddH ₂ O	7,67 µl

Temperaturprogramm (StepOne Plus, Applied Biosystems, New Jersey, USA):

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Stufe 1	Vorinkubation	50°C	2 min	1x
Stufe 2	Enzymaktivierung	95°C	10 min	1x
Stufe 3	Denaturierung	95°C	15 s	40x
Stufe 4	Hybridisierung/Elongation	60°C	60 s	

3.3.3.3 Erstellung eines miRNA Expressionsprofils

Mit Hilfe quantitativer *real time* PCR im 384 Well-Format (miRNome microRNA Profilers QuantiMir Rat, Cat: RA680A-1, Version 14, Biocat, Heidelberg, Germany) wurde das miRNA Expressionsprofil von adulten Kardiomyozyten (500 ng Input pro Probe) bestimmt⁶⁴. Die Abundanz jeder einzelner miRNA inklusive Kontrollen (waren auf jeder 384-Well Platte vorhanden) wurde mit Hilfe des *Cycle threshold* (Ct) und folgender Gleichung bestimmt:

$$y=2^{-(Ct(miRNA)-Ct(ctrl))}$$

3.4 Methoden zur Protein Analyse

3.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Tiefgefrorenes Gewebe (Lagerung bei -80°C) wurde mit 400 µl frisch hergestelltem Lysispuffer versetzt, sofort homogenisiert (T10 basic ULTR-TURRAX, Ika, Staufen, D) und bis zum nächsten Schritt auf Eis gelagert. Konnte das Gewebe nicht ausreichend genug zerkleinert werden, wurde dieses abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen. Frische oder tiefgefrorene Zellen wurden nach Zugabe des Lysispuffers (Volumen abhängig von Zelldichte, max. 400 µl) von der Zellkulturplatte mit einem sterilen Schaber gesammelt, in ein Reaktionsgefäß überführt und sonifiziert (Sonoplus, Bandelin, Berlin, D). Bis zum nächsten Schritt wurden auch diese Proben auf Eis gelagert. Von hier an wurden Homogenate und Sonifikate gleich behandelt. Für den Abbau von Nukleinsäuren in den Proben wurde 1/10 Vol Benzonase (5%) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben in einem Ultraschallbad 5 min bei 4°C inkubiert. Nach Entnahme der entsprechenden Menge (10 µl) für die Bestimmung der Proteinkonzentration (Abschnitt 3.4.3) wurden die Proben mit 1/40 Vol 2-Mercaptoethanol und 1/10 Vol Ladepuffer versetzt. Die Lagerung erfolgte kurzfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C.

3.4.2 Isolierung von Blutserum

Die Mäuse wurden mit Isofluran (2%) anästhesiert, und das Blut mit einer Glaskapillare aus dem inneren Augenwinkel durch Punktion des Venenplexus abgenommen. Das Blut wurde sofort in *SST™ Tubes* (BD Microtainer, Heidelberg, D) überführt und 1 min 30 s bei 14.000 x g für die Separation des Serums zentrifugiert. Das Serum wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

3.4.3 Quantifizierung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einer kolorimetrischen Methode, dem *Bicinchoninic Acid* (BCA) Kit. Diese Methode beruht auf der Linearität der Farbentwicklung zur Proteinkonzentration in der Probe. Dafür wurde die entnommene Menge aus dem

Proteinlysate (= 10 µl) zunächst 1:10 mit ddH₂O verdünnt und die Reagenzien A und B (im Kit enthalten) in einem Verhältnis 50:1 gemischt. Zusammen mit den im Kit enthaltenen Standards und der Blindprobe wurden die zu vermessenden Proben in Triplikaten (je 20 µl) auf eine transparente 96 Well-Platte (Thermo Scientific, Bonn, D) aufgetragen. Dazu wurden je 200 µl der A/B-Mischung gegeben und die Proben 30 min bei 37°C inkubiert. Die Vermessung der Proben erfolgte beim Absorptionsoptimum von 562 nm (Tecan, Infinite M200, Männedorf, CH).

3.4.4 Western Blot

3.4.4.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen und Gelelektrophorese

Für die Western Blot Analysen wurden ausschließlich 10%ige Gele verwendet. Dafür wurden folgende Ansätze für Sammel- und Trenngel verwendet:

Sammelgel	Substanz	Menge
	Rotiphorese Gel 30	0,5 ml
	Puffer für Sammelgel	1,25 ml
	ddH ₂ O	3,2 ml
	TEMED	6 µl
	APS (10%)	48 µl
Trenngel	Rotiphorese Gel 30	7,5 ml
	Puffer für Trenngel	5,7 ml
	Glycerol	3,75 ml
	ddH ₂ O	5,55 ml
	TEMED	18 µl
	APS (10%)	108 µl

Nach Zugabe von TEMED und APS wurde das Gemisch für das Trenngel zügig zwischen zwei vorbereitete Glasplatten (Mini PROTEAN® System, BIO-RAD, München, D), die in der entsprechenden Gelgießstation (BIO-RAD, München, D) fixiert waren, bis zu einer 3/4 –Höhe der Platten gegossen und mit ddH₂O überschichtet. Sobald die Polymerisation vollständig war, wurde das ddH₂O abgegossen und das Trenngel mit dem Gemisch für das Sammelgel überschichtet. Zügig wurde dann der gewünschte Taschenformer (BIO-RAD, München, D) eingesetzt. Das fertig polymerisierte Gel wurde entweder sofort verwendet oder über Nacht bei 4°C gelagert.

Für die horizontale Gelelektrophorese wurden die Proben zunächst mit Verdünnungspuffer auf dieselbe Konzentration (i.d.R. 30 µg) eingestellt und anschließend 10 min bei 60°C denaturiert. In der Zwischenzeit wurde das Gel in der Laufkammer (BIO-RAD, München, D) fixiert und mit Laufpuffer überschichtet. Zusammen mit der Protein-Leiter (5 µl pro Tasche, Fermentas, St. Leon-Rot, D) wurden die Proben in die Taschen übertragen und die Gelelektrophorese gestartet (30 mA, 1,5 h).

3.4.4.2 Membrantransfer und Detektion von Proteinen

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran (Millipore, Schwalbach, D) erfolgte mit einer *semi-dry* – Blotapparatur (GE Healthcare, Freiburg, D). Die Membran musste zuerst durch Methanol aktiviert werden (2 min, RT), um dann anschließend zusammen mit 6 Blättern Whatman® 3MM (1,3 mm Stärke), die zuvor in Transferpuffer getränkt wurden, überführt zu werden. Der Blot setzte sich dann folgendermaßen zusammen: 3 Lagen Whatman® 3MM Papier, die PVDF-Membran, das Acrylamidgel und wiederum 3 Lagen Whatman® 3MM Papier. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 1,5 h bei 10 V. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran in Blockpuffer (versetzt mit Magermilchpulver (5%)) überführt und entweder für 3-4 h oder auch über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Blockpuffer wurde anschließend verworfen und durch die primäre Antikörperverdünnung mit demselben Puffer als Basis ersetzt. Hier erfolgte die Inkubation idealerweise über Nacht oder ansonsten 3-4 h bei 4°C. Die primäre Antikörper-Verdünnung wurde für mehrmalige Wiederverwendung bei -20°C weggefroren. Anschließend folgten drei Waschdurchläufe mit PBST Puffer (jeweils 10 min, RT) bevor der HRP (engl. *horseradish peroxidase*) - gekoppelte sekundäre Antikörper, verdünnt in Blockpuffer ohne Magermilchpulver-Zusatz, zugegeben wurde. Hier reichte eine Inkubation von 1 h (RT) aus. Nach wiederholtem Waschen (3x jeweils 10 min, RT) erfolgte dann die Detektion mit ECL Plus (lt. den Angaben des Herstellers; GE Healthcare, Freiburg, D) und die Visualisierung der Proteinbanden (LAS 4000 Mini, Fujifilm, Düsseldorf, D).

3.5 Generierung von *Pi16^{floxneo/+}* embryonalen Stammzellen

3.5.1 Elektroporation des *Pi16 Targeting* Vektors und Selektion der Stammzellen

3.5.1.1 Aufreinigung des linearisierten Vektors

Der *Pi16 Targeting* Vektor wurde zunächst in Bakterien amplifiziert (Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3) und mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) laut den Herstellerangaben aufgereinigt. 100-150 µg des Vektors wurden anschließend mit dem NotI-Restriktionsenzym (NEB) linearisiert (Abschnitt 3.1.3). Zur Überprüfung der vollständigen Hydrolyse wurden 2 µl des Ansatzes zusammen mit dem unverdauten Konstrukt als Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (Abschnitt 3.1.1). War der Verdau vollständig, so wurden zu dem kompletten Ansatz 400 µl Phenol/Chloroform gegeben und die resultierenden Phasen voneinander getrennt (10 min, 14.000 rpm). Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, nochmals mit 400 µl Chloroform versetzt und zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm). Zu dem wässrigen Überstand wurden 30 µl NaAcetat (3 M, pH 5,2) gegeben und 700 µl 100% Ethanol aufgeschichtet. Nach kurzem Schütteln waren DNA-Fäden zu erkennen. Diese wurden mit einer Pipettenspitze in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für

die Reinigung der DNA wurden 1 ml 70% Ethanol zugegeben, die DNA abzentrifugiert (5 sec, 14.000 rpm) und der Ethanol unter sterilen Bedingungen abgenommen. Das Reaktionsgefäß wurde mind. 30 min offen stehen gelassen, damit der restliche Ethanol verdampfen konnte. Letztendlich wurde die linearisierte Plasmid-DNA in 700 µl sterilem 1x PBS gelöst.

3.5.1.2 Expansion von embryonalen Stammzellen

Vor der Expansion der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen; R1 Klon, Passage 13⁹¹) wurde zunächst das ES-Medium (Volumen je nach Zellkulturformat) gewechselt, die Zellkulturschale vorsichtig geschüttelt und das Medium wieder abgesaugt. Anschließend erfolgten zwei Waschstschritte mit PBS (Invitrogen) bevor Trypsin (5 ml pro 175 cm² Flasche) zugegeben wurde. Nach Ablauf der Inkubation (5-10 min, 37°C) wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt, 20 ml ES-Medium hinzugefügt, gemischt und die Zellen pelletiert (5 min, 900 rpm). Das Pellet wurde anschließend in 5 ml ES-Medium resuspendiert und auf das gewünschte Zellkulturformat ausplattiert.

3.5.1.3 Elektroporation des *Pi16 Targeting* Vektors in ES-Zellen

ES-Zellen können nur auf einer Schicht (engl. *Monolayer*) von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) kultiviert werden. Diese müssen von einer Mauslinie stammen, deren Genom ein Neomycin-Resistenzgen enthält, damit sie die spätere Selektion der positiven ES-Zellen überleben. In dieser Arbeit wurden embryonale Fibroblasten aus LAT^{-/-} (engl. *Linker for activation of T cells*) Mäusen verwendet (E13,5-14,5). Grundsätzlich wurden die MEFs immer mind. 1 h vor den ES-Zellen auf das gewünschte Plattenformat ausgesät, damit sie genügend Zeit zum adhären hatten.

Drei Tage vor der Elektroporation der ES-Zellen (R1 Klon, Passage 13) wurden 0,5 ml MEFs und 0,5 ml ES-Zellen zügig bei 37°C aufgetaut, jeweils in ES-Medium (ad 35 ml) resuspendiert und anschließend pelletiert (5 min, 900 rpm). Die Zellpellets wurden in je 5 ml ES-Medium aufgenommen und zusammen in einer 25 cm² Zellkulturflasche kultiviert (über Nacht, 37°C/5% CO₂). Nach einem Mediumwechsel am nächsten Tag erfolgte die Expansion der ES-Zellen (in eine 175 cm² Flasche) am darauffolgenden Tag. Dafür mussten zunächst frische MEFs (2 ml) aufgetaut, mit ES-Medium gewaschen (5 min, 900 rpm) und das Pellet resuspendiert (in 2,5 ml ES-Medium) werden. Zusammen mit den trypsinisierten ES-Zellen (Abschnitt 3.5.1.2) wurden sie in eine 175 cm² Flasche gegeben und mit 20 ml zusätzlichem ES-Medium verdünnt. Die Elektroporation erfolgte am nächsten Tag. Dafür mussten die kultivierten ES-Zellen zunächst trypsinisiert (Abschnitt 3.5.1.2), mit 10 ml ES-Medium verdünnt, abzentrifugiert (5 min, 900 rpm) und in 3 ml ES-Medium aufgenommen werden. Nach Quantifizierung betrug die Anzahl der Zellen ca. 6 x 10⁷/ml. Die Zellen wurden nochmals pelletiert (5 min, 900 rpm) und in der Verdünnung des linearisierten

Vektors (in 700 µl PBS) resuspendiert. Die Elektroporation erfolgte in einer Küvette (BIO-RAD, München, D) mit 0.8 kV (Gene Pulser II, BIO-RAD). Die elektroporierten ES-Zellen wurden mit 8 ml ES-Medium verdünnt und auf acht Zellkulturschalen (d=10 cm; 1 ml pro Schale) mit MEFs als *Monolayer* (0,5 ml aufgetaute Zellen pro Schale) ausplattiert.

3.5.1.4 Selektion und Auslese von ES-Zellen

Am Tag nach der Elektroporation begann bereits die Selektion mit dem Antibiotikum Geneticin (G418). Dafür erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit 10 ml ES+G418 -Medium pro Platte. Je nach Zellwachstum erfolgte die Selektion innerhalb von fünf bis sieben Tagen. Für die Auslese der vermeintlich positiven Stammzellen wurden 24 Well-Platten mit MEFs vorbereitet. Dabei wurden für eine 24 Well-Platte 1 ml MEFs benötigt, die nach dem Auftauen mit ES+G418 -Medium gewaschen, pelletiert (5 min, 900 rpm), in 24 ml ES+G418 - Medium resuspendiert und gleichmäßig auf die 24 Well-Platte verteilt wurden. Die Auslese der Zellen erfolgte mit einer 200 µl – Pipette unter einem LEICA MS5 Mikroskop (63x Objektiv; Wetzlar, D). Es wurden nur die Klone gepickt, die nicht differenziert oder nekrotisch aussahen. Die ausgewählten Klone wurden zunächst kurz in Trypsin in einem Well einer 96 Well Platte inkubiert (3 min, 37°C/5% CO₂), resuspendiert und in ein Well der vorbereiteten 24 Well-Platte übertragen (Inkubation über Nacht bei 37°C/5% CO₂). Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit ES+G418-Medium und anschließend wurden die Zellen für 3 bis 4 Tage ohne weiteren Mediumwechsel wachsen gelassen.

3.5.1.5 Einfrieren, Lyse und Präzipitation der ausgelesenen Stammzell-Klone

Nach kurzer Trypsinierung der ausgelesenen Stammzell-Klone in der 24 Well-Platte wurden die Zellen in jeweils 1 ml *Freezing*-Medium resuspendiert. 600 µl der Zellen wurden in ein nummeriertes Kryo-Röhrchen übertragen und sofort bei -80°C eingelagert. Die restlichen Zellen im Well erhielten daraufhin dieselbe Bezeichnung, wurden mit zusätzlichem ES+G418 - Medium aufgefüllt und weitere 12-16 h inkubiert (37°C/5% CO₂). Nach Ende dieser Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel mit 1 ml ES+G418-Medium. Normalerweise dauerte es 1-6 Tage (37°C/5% CO₂) bis das Medium einen gelben Farbton annahm. War das der Fall, wurde das Medium abgesaugt und 0,5 ml Lysispuffer mit 2,5 µl Proteinase K (Fermentas, 1000 U/ml) hinzugefügt. Die anschließende Präzipitation der DNA erfolgte mit 1 ml Isopropanol pro Well und einer anschließenden Inkubation von 6-8 h bei RT auf einem Orbitalschüttler. Während dieser Zeit wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße mit den entsprechenden Klonnummern bezeichnet und mit 150 µl TE Puffer gefüllt. Die präzipitierten DNA-Fäden wurden in die entsprechenden 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, kurz gemischt (1 min, Vortexer) und 12-16 h bei 55°C inkubiert. Anschließend war es möglich die Klone mit Hilfe der PCR oder des Southern Blots (Abschnitt 3.5.2) zu analysieren.

3.5.1.6 Rekultivierung der positiven Stammzellklone

Nach abgeschlossener PCR- und Southern Blot-Analyse wurden die als positiv identifizierten Klone aufgetaut und rekultiviert, um genügend Zellaliquots für die anschließende Blastozysteninjektion zu bekommen. Die eingefrorenen Zellaliquots (Abschnitt 3.5.1.5) wurden zunächst - wie bereits oben beschrieben - aufgetaut, gewaschen, pelletiert und in ES+P/S - Medium resuspendiert (Abschnitt 3.5.1.3), um dann in ein Well einer 6 Well-Platte mit einem *Monolayer* aus MEFs ausgesät zu werden. Je nach Zellwachstum wurden die Zellen für 1 bis 2 Tage bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert, bis sie dicht genug waren, um auf eine 25 cm² Zellkulturflasche expandiert zu werden (Abschnitt 3.5.1.2). Wiederum zwei Tage später erfolgte dann die Expansion auf eine 175 cm² Zellkulturflasche. Sobald eine ES-Zellschicht herangewachsen war, wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert und in 2,5 ml *Freezing*-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf fünf Kryoröhrchen aufgeteilt und bei -80°C weggefroren. Die Zellen waren nun bereit für die bevorstehende Blastozysteninjektion.

3.5.2 Genotypisierung muriner genomischer DNA

3.5.2.1 Aufreinigung genomischer DNA aus Mausschwänzen

Für die Genotypisierung von transgenen Mäusen wurde zunächst eine distale Schwanzbiopsie mit einer Länge von ca. 2 mm entnommen. Es wurden zwei verschiedene Protokolle für die Aufreinigung der Mausschwanz-DNA verwendet, je nachdem, welche der zwei Analysen vorgenommen werden sollte – PCR oder Southern Blot.

DNA für die PCR-basierte Analyse

Der Mausschwanz wurde mit 200 µl Lysispuffer versetzt mit Proteinase K (AppliChem, 10 mg/ml) über Nacht unter ständigem Schütteln im Plattformschüttler (Heidolph, Schwabach, D) inkubiert (250 rpm, 55°C). Am folgenden Tag wurden die Proben zunächst erhitzt (10 min, 99°C) und anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 4 min). Von dem Überstand wurden direkt 0,5 µl in die PCR eingesetzt.

DNA für die Southern Blot-Analyse

Der Mausschwanz wurde mit 500 µl Lysispuffer versetzt mit 2,5 µl Proteinase K (Fermentas, 1000 U/ml) über Nacht im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, D) unter ständigem Schütteln inkubiert (900 rpm, 55°C). Am nächsten Tag wurden zu dem Ansatz 500 µl Phenol/Chloroform gegeben und kräftig geschüttelt, so dass sich die verschiedenen Phasen gut durchmischten. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt (14.000 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde anschließend mit 500 µl

70% Ethanol gewaschen (14.000 rpm, 10 min, 4°C) und letztendlich in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

3.5.2.2 Polymerase chain reaction (PCR) - Analyse

Es wurde folgender **Reaktionsansatz** hergestellt:

Substanz	End-Konzentration/Volumen
10x Puffer	1x
dNTP Mix	10 mM
3'-Primer	10-20 pmol
5'-Primer	10-20 pmol
DNA-Polymerase	0,1-0,25 µl
Template-DNA	0,5 µl
Aqua dest.	ad 20 oder 25 µl

Die anschließende Amplifikationsreaktion erfolgte im Thermocycler (Mastercycler pro, Eppendorf, Hamburg, D) mit folgendem **Temperaturprogramm**:

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Stufe 1	Vordenaturierung	94/95°C	120 s	1x
Stufe 2	Denaturierung	94/95°C	30 s	34-40x
Stufe 3	Hybridisierung	Abhängig von Primer-Sequenzen		
Stufe 4	Elongation	Abhängig von Template-Länge (1 min / 1000 Nt)		
Stufe 5	End-Elongation	72°C	180-300 s	1x

3.5.2.3 Southern Blot

Es wurde folgender Reaktionsansatz für die Hydrolyse der genomischen DNA aus ES-Zellen und Mausschwänzen verwendet:

Substanz	End-Konzentration/Volumen
DNA	20 µl
10x Puffer	4 µl
HindIII (Fermentas, 10 U/µl)	4 µl
ddH ₂ O	ad 40 µl

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Agarosegels (Abschnitt 3.1.1) nach ihrer Größe aufgetrennt und der Southern Blot-Analyse unterzogen (Protokoll anhand der Angaben in meiner Diplomarbeit ⁸⁶ modifiziert):

Übertragung der DNA auf die Membran

Das Agarosegel wurde anschließend auf einem Orbitalschüttler in Denaturierungspuffer und anschließend in Neutralisierungspuffer inkubiert (je 2x 20 min, RT). Die Übertragung der DNA-Fragmente von dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nitrocellulose Membran (Hybond XL, GE Healthcare, Freiburg, D) erfolgte durch aufwärts gerichteten Kapillartransfer. Dazu wurde das Agarosegel mit den Taschen nach unten auf das mit Transferpuffer (10x SSC) durchfeuchtete Whatman® 3MM Papier (0,35 mm Stärke) gelegt. Es folgten die Nitrocellulose Membran, trockenes Whatman® 3MM Papier und eine größere Anzahl an Papiertüchern. Ein Gewicht ermöglichte, dass der Transferpuffer das kompakte System von unten nach oben durchfeuchten und die DNA aus dem Gel eluieren konnte. Der gesamte Aufbau wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die auf die Membran übertragene DNA wurde durch *crosslinking* permanent daran gebunden (120.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$; HL-2000 HybriLinker, UVP) und war nun für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde vorbereitet.

Radioaktive Markierung der Sonde und Hybridisierung der Membran

Die Matrize für die Herstellung der Sonde wurde aus dem entsprechenden Vektor mit dem Enzym EcoRI herausgeschnitten (Abschnitt 3.1.3). Von dem Produkt wurden 10 bis 100 ng (in 10 μl) entnommen und mit 35 μl TE Puffer verdünnt. Für die Denaturierung der DNA wurde der Ansatz anschließend kurzzeitig im Thermoblock inkubiert (3 min, 96°C), auf Eis abgekühlt (2 min) und in das Reaktionsgefäß des *Rediprime II Random Prime Labelling System* gegeben. Nach Zugabe von 5 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP erfolgte die Inkubation der Reaktion für 20 min bei 37°C. Für die Gewinnung der radioaktiv markierten Sonde aus dem Reaktionsansatz wurde dieser über eine Sephadex Säule (ProbeQuant G50 Micro Columns, GE Healthcare, Freiburg, D) aufgereinigt (1000x g, 1 min). Währenddessen wurde die Membran bereits in *Church Wash* Puffer kurz vorinkubiert und anschließend in *Church* Puffer überführt. Dazu wurde schließlich die denaturierte Sonde (3 min, 96°C) gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C im Schüttelwasserbad. Am nächsten Tag wurde die Membran mit *Church Wash* Puffer gewaschen (2x 20 min, 68°C, Schüttelwasserbad). Die Detektion erfolgte über Autoradiographie (Röntgenkassette, mind. 24 h gelagert).

3.6 Methoden zur kardiovaskulären Phänotypisierung von Mäusen

Die folgenden Methoden wurden von geschulten Mitarbeitern durchgeführt.

3.6.1 Echokardiographie

Die zu untersuchenden Mäuse wurden mittels Inhalationsnarkose (Mischung aus 2% Isofluran und 98% Sauerstoff) anästhesiert und auf einer Wärmeplatte (40°C) fixiert. Für die

Ultraschalluntersuchung wurde der Vevo 700 (Visualsonics, Ontario, CAN) verwendet. Nach der Rasur des Brustkorbs wurde die Ultraschallsonde parasternal auf diesen aufgesetzt und der linke Ventrikel in der langen Achse (B-Mode) für die Messung optimal ausgerichtet. Für die Aufnahme des Echokardiogramms in der kurzen Achse (M-Mode) wurde der Schallkopf um 90° gedreht. Aus dem Echokardiogramm wurden folgende Parameter in der Diastole (d) und Systole (s) ausgelesen: *right ventricular internal diameter* (RVID d/s), *interventricular septum* (IVS d/s), *left ventricular internal diameter* (LVID d/s) und *left ventricular posterior wall* (LVPW d/s). Weitere Parameter (*fractional shortening* (FS), *ejection fraction* (EF)) wurden mit den entsprechenden Formeln quantifiziert.

3.6.2 Konstriktion der thorakalen Aorta

Die Konstriktion der thorakalen Aorta erfolgte wie zuvor beschrieben⁶⁴. Sechs bis acht Wochen alte Mäuse wurden intubiert, durch Inhalationsnarkose (Mischung aus 2% Isofluran und 98% Sauerstoff) anästhesiert und auf einer Wärmeplatte fixiert (40°C). Anschließend wurde die Aorta transversa für die Bandligatur freipräpariert. Diese erfolgte mit einem 7-0 Nylonfaden um eine 27 Gauge Kanüle. Nach einem spezifischen Zeitraum wurden die Herzen für weitere Analysen entnommen. Im Fall der *sham* Operation wurde nur der Brustkorb geöffnet ohne die Aorta zu ligieren.

3.6.3 Histologische Untersuchung von Organen

3.6.3.1 PFA-Fixierung, Einbettung und Entparaffinierung von Gewebe

Für die histologische Untersuchung von Organen erfolgte zunächst deren Fixierung mit 4%igem PFA (mind. 24 h, 4°C). Dafür wurde entweder nur das zu untersuchende Gewebe aus der Maus isoliert und in PFA überführt oder der gesamte Organismus mit PFA perfundiert und die entsprechenden Organe anschließend isoliert. Die fixierten Organe wurden daraufhin gewaschen (3x 1 h in 1x PBS), bevor sie die folgenden Schritte vollautomatisiert im *Spin Tissue Processor* (STP 120, Thermo Scientific, Bonn, D) durchlaufen sind. In einer ansteigenden Ethanolreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2x 100%; je 2 h) wurden sie zunächst dehydriert und in Roti-Histol (2x 2 h) überführt. Für die Einbettung wurde das Gewebe daraufhin in flüssigem Paraffinwachs inkubiert (3x 2 h) und zum Aushärten in Blöcke gegossen. Es wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt (Mikrotom HM 335 E, Microm, Walldorf, DH), auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 42°C getrocknet. Für die einzelnen Färbungen wurden die Schnitte dann 2x 10 min in Toluol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100%: 2x 5 min, 90%: 5 min, 70%: 5 min, 50%: 5 min, ddH₂O: 4x 1 min).

3.6.3.2 Sirius Rot-Färbung

Für die Färbung von interstitiellem Bindegewebe wurden entparaffinierte, rehydrierte Gewebeschnitte mit Sirius Rot gefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert in die Kollagenfasern, während das restliche Gewebe gelb erscheint. Dafür wurden die Schnitte in Sirius Rot-Lösung inkubiert (60 min, RT) und anschließend kurz in ddH₂O gewaschen (10 sec). Anschließend wurden die Schnitte einer Dehydrierung mit einer aufsteigender Ethanolreihe unterzogen (70%: 1 min, 100%: 3x 1 min), in Toluol inkubiert (3 min), mit DePex eingedeckt und über Nacht bei RT getrocknet. Die Quantifizierung erfolgte mit dem *MetaMorph Basic Imaging Software Packet* (Molecular Devices, Downingtown, USA).

3.6.3.3 Hämatoxylin & Eosin-Färbung

Hämatoxylin (H) dient zur Blaufärbung der Zellkerne, während Eosin (E) das Zytoplasma rot färbt. Entparaffinierte, rehydrierte Gewebeschnitte wurden in Hematoxylin-Lösung inkubiert (1 min, RT), mit ddH₂O in 3 Schritten gewaschen (kurz, 2x 2 min), in 0,1%iger Eosin-Lösung (1 min, RT) inkubiert und wiederum kurz gewaschen (ddH₂O: 10 sec). Es folgte eine aufsteigende Ethanolreihe zur Dehydrierung (80%: 10-30 sec, 100%: 1 min), ein Inkubationsschritt in Toluol (3 min) und die Eindeckung mit DePex. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht bei RT getrocknet.

3.6.3.4 Immunhistochemische Färbung von PI16

Die immunhistochemische Färbung von PI16 erfolgte mit der *Labeled Streptavidin Biotin (LSAB)* Methode. Dafür wurden die Paraffinschnitte nach Inkubation in Xylol (2x 10 min) zunächst durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert (je 2 min; 100%, 96%, 70%, 50%, ddH₂O) und zum Abschluss in TBS-Puffer (1x) überführt. Im Anschluss erfolgte eine Hitzebehandlung der Schnitte, indem sie in EDTA-Puffer überführt und für 20 min bei 95°C inkubiert wurden. Nach kurzem Waschen in TBS-Puffer (1x) erfolgte eine Inkubation in Wasserstoffperoxid (3%, in Methanol) für 5 min bei RT. Nach kurzem Waschen mit ddH₂O wurden die Schnitte mit Ziegen Serum (3%, in 1x TBS) abgesättigt (20 min, RT), der Objektträger um den Schnitt herum trocken gewischt und 2-3 Tropfen der primären Antikörperlösung (1:1000 in Antibody Diluent) dazu gegeben. Die Schnitte wurden dann über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag folgten verschiedene Inkubationsschritte, die jeweils durch einen kurzen Waschschrift mit 1x TBS unterbrochen wurden. Zunächst wurde der biotinylierte sekundäre Antikörper auf die Schnitte gegeben (HistoMark Biotin Streptavidin-HRP System; 1 Tropfen, 32 min, 37°C); anschließend erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Streptavidin (HistoMark Biotin Streptavidin-HRP System; 1 Tropfen, 8 min, 37°C). Nach Zugabe des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, 1 Tropfen) zusammen mit einem Tropfen H₂O₂ (DAB Reagent

Set; 8 min, 37°C), diente die Inkubation mit Hämatoxylin (4 min, 37°C) und einer 0,1%igen Ammoniaklösung (in H₂O; 4 min, 37°C) als Gegenfärbung. Nach kurzem Waschen (1% TBS) erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%: 2x 2 min, 96%: 2x 2 min, 100%: 2x 2 min) und die Überführung in Xylol (2x 2 min). Die Schnitte wurden abschließend mit Pertex eingedeckt.

3.7 Expression eines humanen PI16 Fusionsproteins in *Spodoptera frugiperda* 9 – Zellen mittels Baculovirusinfektion

Die Herstellung des Baculovirus beruhte auf der homologen Rekombination zwischen der Plasmid-DNA, die unter anderem das PI16 Fusionsprotein kodierte (Verwendung des pVL1392 Plasmids als Baculovirus Transfer Vektor), und der rekombinant hergestellten Virus-DNA (BaculoGold™, BD Biosciences, Heidelberg, D) die beide zusammen in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) – Zellen transfiziert wurden. Aufgrund einer lethalen Deletion in der Virus-DNA kann diese *per se* keinen Virus hervorbringen. Erst durch die Rekombination mit der Plasmid-DNA, die die Sequenz des PI16 Fusionsproteins mit einschloss, konnte der Defekt aufgehoben und der Virus produziert werden.

3.7.1 Transfektion von Sf9 – Zellen für die Generierung des Baculovirus

2x 10⁶ Sf9 – Zellen (Sf9 785) wurden in einer Zellkulturflasche ausgesät und 30 min bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium (TNM-FH Medium, BD Biosciences, Heidelberg, D) abgesaugt, und die Zellen wurden mit Antibiotika-freiem Medium gewaschen. Anschließend wurde das folgende Transfektionsgemisch in Polystyrolröhrchen vorbereitet:

Substanz	Volumen / Menge
TNM-FH Medium	100 µl
DOTAP	20 µl
BaculoGold™	1,5 µl
Plasmid-DNA	4 µg

Das Transfektionsgemisch wurde 15 – 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Gemisch wurden anschließend 1,3 ml Medium hinzugefügt; der gesamte Ansatz wurde dann auf die Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 4 h bei 27°C bevor das Medium gewechselt wurde. Die Zellen wurden dann weitere 96 h bei 27°C inkubiert bevor das Medium abgenommen, zentrifugiert (3 min bei 1200 rpm) und der Überstand in ein neues Falconröhrchen überführt wurde. Dieser wurde dann direkt für die Amplifikation des Virus verwendet.

3.7.2 Amplifikation des Baculovirus und Infektion von Sf9 – Zellen

Für die erste Amplifikation wurden 2 ml vom Überstand nach Transfektion (siehe 3.7.1) auf einen neuen *Monolayer* von 2×10^6 Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte für sieben Tage bei 27°C. Das Medium wurde - wie oben beschrieben - von der Zellkultur abgenommen und zentrifugiert; 0,5 ml des gewonnenen Überstands wurden anschließend für die zweite Amplifikation mit 6×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden wiederholt für sieben Tage bei 27°C inkubiert. Für die dritte Amplifikation wurden 100 µl des gewonnenen Überstands der zweiten Amplifikation auf 15×10^6 Zellen gegeben. Nach sechs Tagen Inkubation bei 27°C erfolgte wiederum die Gewinnung des Überstands.

Vom gewonnenen Überstand nach Abschluss der dritten Amplifikation wurden entweder 65 µl oder 300 µl für die Infektion von Sf9-Zellen verwendet und zum Kulturmedium gegeben. 48 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert (3 min bei 1200 rpm), in 1x PBS resuspendiert, wiederum pelletiert (3 min bei 1200 rpm) und bei -80°C bis zur Expressionsanalyse mittels Western Blot gelagert.

3.8 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Durchschnittswerte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) abgebildet. Die statistischen Analysen wurden mit dem *Prism Software Packet* (GraphPad, San Diego, U.S.A.) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde durch die einfache Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt vom Bonferroni Test ermittelt. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ und * $P < 0,05$ war.

4 ERGEBNISSE

4.1 MiRNAs und ihr Einfluss auf das Größenwachstum von Kardiomyozyten *

4.1.1 Entwicklung eines *High content screening* (HCS) -Verfahrens

Für die parallele Analyse von 230 verschiedenen miRNAs bezüglich ihres Einfluss auf die Zellgröße von Kardiomyozyten wurde ein System benötigt, mit dem die Zellen auf diesen spezifischen Ausleseparameter hin zuverlässig untersucht werden konnten (Schematischer Überblick Abb. 5A). Da primäre Zellen aus neonatalen Rattenherzen verwendet wurden, sollte das Isolierungsprotokoll zwar eine akzeptable Zellreinheit aufweisen, die Detektionsmethode aber trotzdem in der Lage sein, Kardiomyozyten von anderen Zelltypen zu unterscheiden. Daher verwendeten wir für die automatisierte Fluoreszenz-basierte Mikroskopie den Kardiomyozyten-spezifischen Antikörper α -Aktinin und DAPI für die Färbung der Nuklei. Die Präsenz von α -Aktinin-gefärbtem Zytoplasma definierten wir als Selektionskriterium für die zu quantifizierenden Zellen. Nicht-Kardiomyozyten wurden aufgrund ihrer nukleären Färbung detektiert und nicht mit in die Analyse einbezogen (Abb. 5A). Damit konnten wir einen Anteil von durchschnittlich 80-90% Kardiomyozyten in unseren Kulturen identifizieren. Die Mehrheit an nicht-kardiomyozytären Zellen stellten in diesen Kulturen kardiale Fibroblasten dar ($16 \pm 2 \%$, $n = 6$ unabhängige Zellpräparationen) (Abb. 5B).

Für die Kultur der Zellen in 96 Well-Platten waren einige Anpassungen der Aussaat- und Transfektionsbedingungen notwendig. Die primären Zellen wurden im Bereich von $0,4-1,0 \times 10^6$ /Well ausgesät, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Nach Phenylephrin (PE) Stimulation (am Tag 3 nach Aussaat, $50 \mu\text{M}$ für 48 h) zeigten Kontroll-miRNA transfizierte Kardiomyozyten typischerweise einen zweifachen Anstieg ihrer Zellgröße relativ zu nicht stimulierten Zellen (Anstieg der Zellgröße um $1,91 \pm 0,06$, $P < 0,001$, SEM, Abb. 5C).

* Dieser Abschnitt (inklusive Abbildungen) wurde bis auf kleine Änderungen in der vorliegenden Fassung in Jentsch *et al.* im *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2011 veröffentlicht ⁶⁴.

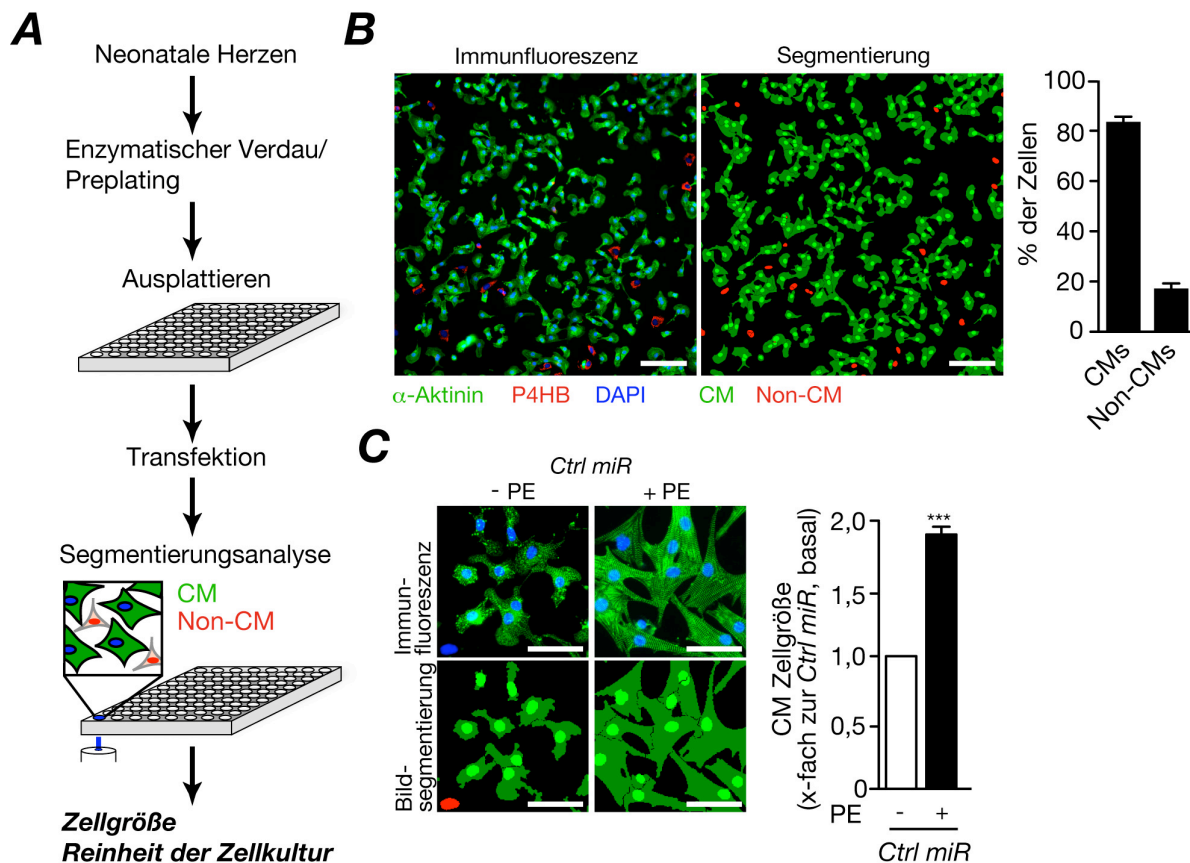


Abb. 5. Etablierung des HCS - Verfahrens.

(A) Schematischer Überblick zum HCS-Verfahren. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz der Kardiomyozytenkultur; Kardiomyozyten (α -Aktinin) und kardiale Fibroblasten (P4HB) wurden für ihre Markerproteine gefärbt (Skalierung: 100 μ m). Quantifizierung von Kardiomyozyten (CM) und nicht-Kardiomyozyten (non-CM) entsprechend der Präsenz von α -Aktinin-positivem Zytoplasma, $n = 7$ Zellpräparationen. (C) Repräsentative Immunfluoreszenzen und entsprechende Segmentierungen von *Ctrl-miR* - transfizierten Kardiomyozyten kultiviert unter basaler Bedingung und stimuliert mit PE (Skalierung: 50 μ m). Quantifizierung der NRCM Zellgröße unter den angegebenen Bedingungen mit Hilfe des automatisierten Detektionssystems, $n = 5$ unabhängige Experimente mit > 40.000 analysierten Zellen pro Gruppe. CM = Kardiomyozyt, *Ctrl miR* = Kontroll-miRNA, P4HB = Prolyl 4-hydroxylase beta, PE = Phenylephrin *** $P < 0,001$.

Um eine optimale Transfektionseffizienz zu erzielen, wurde die Transfektion von synthetischen miRNAs mit verschiedenen Reagenzien verglichen. Dafür wurde an die Kontroll-miRNA der fluoreszierende Farbstoff Cyanin 3 (Cy3) konjugiert, was eine Visualisierung der transfizierten miRNA mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte. Dabei achteten wir primär auf eine optimale Transfektionsrate. Mit beiden gezeigten Reagenzien (Abb. 6) war es möglich, miRNAs in NRCMs einzubringen, wobei die Transfektion typischerweise zu lokalen Akkumulationen der aufgenommenen Moleküle führte. Im direkten Vergleich war die Effizienz mit Oligofectamine™ jedoch deutlich schlechter (Abb. 6).

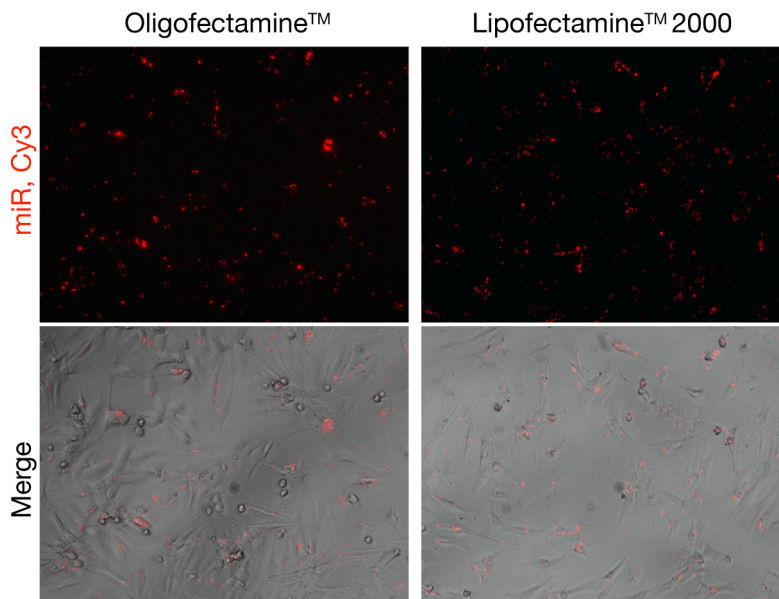


Abb. 6. Vergleich der Transfektionseffizienz von Lipofectamine 2000 und Oligofectamine.

Fluoreszenz- (oben) und Hellfeldaufnahme (unten) von NRCMs, die mit einer Cy3-konjugierten Kontroll-miRNA transfiziert wurden.

4.1.2 Charakterisierung der Datenaufnahme mit automatisierter Mikroskopie

Die Aussaat von Kardiomyozyten in 96 Well-Platten führte potentiell zu einer ungleichen Verteilung der Zellen entlang der Wand eines Wells. Um dadurch resultierende Fehler in der Detektion und damit auch der Interpretation der Daten zu vermeiden, nahmen wir nur Fotos im Zentrum eines Wells auf. Dort waren die Zellen sehr gleichmäßig verteilt (Abb. 7A). Mit dieser Vorgehensweise konnten wir bis zu 2700 Zellen (2468 ± 309) pro Well analysieren. Weiterhin bestimmten wir die Variation der Zellgröße zwischen verschiedenen Wells und Platten. Wie in Abbildung 7B gezeigt ist, war die Abweichung sehr gering, was eine hohe Reproduzierbarkeit und statistische Relevanz der Daten beweist. Um die Validität unseres HCS-Verfahrens weiter zu erhöhen, wurden im Screen vier Replikate jeder miRNA gemessen (jedes Replikat auf einer anderen Platte).

Damit konnten wir in einem Bereich von $0,4-1,0 \times 10^6$ Zellen/Well eine zuverlässige Zellgrößenbestimmung gewährleisten (Abb. 7C). Im häufigsten Fall wurde die Analyse auf den optimalen Bereich von $0,4-0,6 \times 10^6$ Zellen/Well beschränkt. Eine Zellgrößenbestimmung bei Zelldichten, die über den angegebenen Bereich hinausgingen, war nicht mehr zuverlässig durchführbar (Abb. 7C).

Zusammen genommen zeigen unsere Ergebnisse, dass NRCMs im 96 Well-Format kultiviert, mit miRNAs transfiziert und parallel mit einem robusten automatisierten Detektionssystem auf ihre Zellgröße hin analysiert werden können.

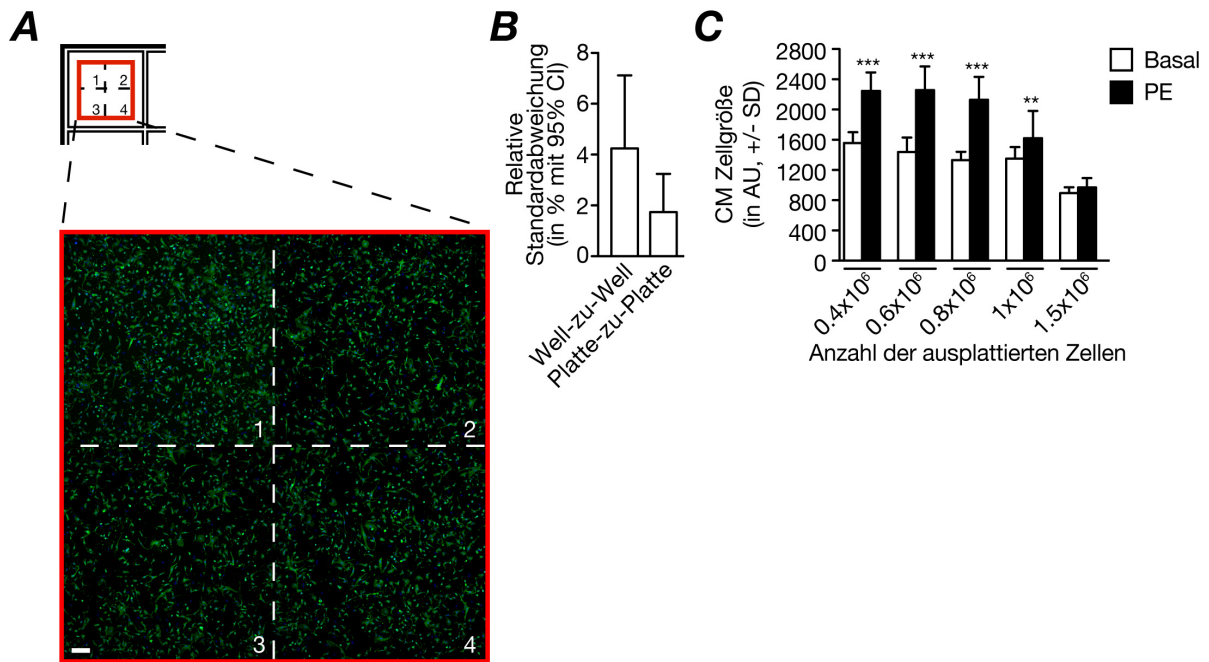


Abb. 7. Charakterisierung der automatisierten Datenaufnahme.

(A) Vier repräsentative Fotos (10x Objektiv) mit denen das Zentrum eines Wells für die Analyse abgedeckt wird (Skalierung: 100 μ m). Die NRCMs wurden zuvor mit einer Kontroll-miRNA transfiziert. (B) Die angegebenen Daten sind von vier unterschiedlichen Kardiomyozyten Isolationen. Es wurden 4-5 Wells pro Platte pro Isolation analysiert (Well-zu-Well); es wurden Daten von zwei Platten pro Isolation vereint (Platte-zu-Platte). (C) Bestimmung der CM Zellgröße bei unterschiedlichen Zelldichten. Die NRCMs wurden zuvor mit einer Kontroll-miRNA transfiziert. AU = *Arbitrary units*, CI = *Confidence interval*, SD = *Standard deviation*.

4.1.3 Ergebnisse der HCS-Analyse hinsichtlich Zellwachstum regulierender miRNAs

Abbildung 8A zeigt die Ergebnisse des HCS-Verfahrens als die relative Änderung der durchschnittlichen Zellgröße nach Transfektion einer spezifischen miRNA im Vergleich zur durchschnittlichen Zellgröße von Kontroll-miRNA transfizierten Zellen, die auf denselben Platten wie die entsprechende miRNA lokalisiert waren (tabellarische Darstellung der Ergebnisse siehe Anhang 7.1). 11% (= 25 miRNAs) der 230 miRNAs induzierten eine relative Zellgrößenzunahme von mehr als 1,5-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der stärkste Effekt ($\geq 2,0$ -fachen Anstieg) wurde durch die Transfektion der miR-212, miR-365, miR-500 und miR-505 erzielt (Abb. 8A). Es gab auch miRNAs, die die Zellgröße der Kardiomyozyten verkleinerten, obwohl dieser Effekt generell weniger ausgeprägt war als die prohypertrophen Effekte (6% der miRNAs reduzierten die Zellgröße zu $\leq 80\%$ relativ zur Kontrolle).

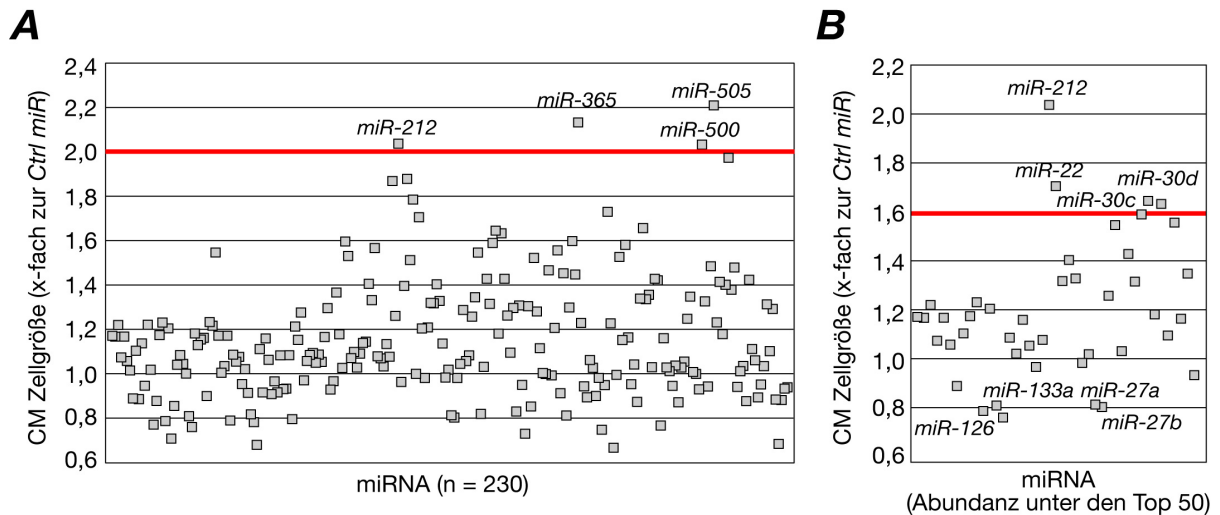


Abb. 8. Ergebnisse des HCS-Verfahrens.

(A) Relative Änderung der Zellgröße der Kardiomyozyten aufgetragen gegen die annotierte miRNA Nummer. (B) Relative Änderung der Zellgröße der Kardiomyozyten aufgetragen gegen die annotierte miRNA Nummer; begrenzt auf die Top 50 exprimierten miRNAs.

Anschließend fragten wir uns, ob die potente Hypertrophie-modulierende Aktivität der transfizierten miRNAs mit einer starken endogenen Expression *in vivo* korreliert. Wir isolierten RNA aus adulten Rattenkardiomyozyten und bestimmten mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Thomas Thum (Hannover Medical School, Hannover, D) das miRNA Expressionsprofil dieser Zellen. Basierend auf einer quantitativen *real-time PCR* (qPCR) Analyse identifizierten wir die 50 miRNAs, deren endogene kardiomyozytäre Expression die höchste unter den 230 phänotypisch analysierten miRNAs darstellte. Wir verglichen dann diese Liste von miRNAs mit den hypertrophen Effekten, die sie in unserem HCS-Verfahren gezeigt haben. Interessanterweise wiesen von den stark exprimierten miRNAs nur miR-22, Mitglieder der miR-30 Familie und miR-212 einen ausgeprägten prohypertrophen Effekt ($\geq 1,6$ -fach) sowie die miR-27 Familie, miR-126 und miR-133a einen deutlichen anti-hypertrophen Effekt ($\leq 0,8$ -fach) auf (Abb. 8B und 9).

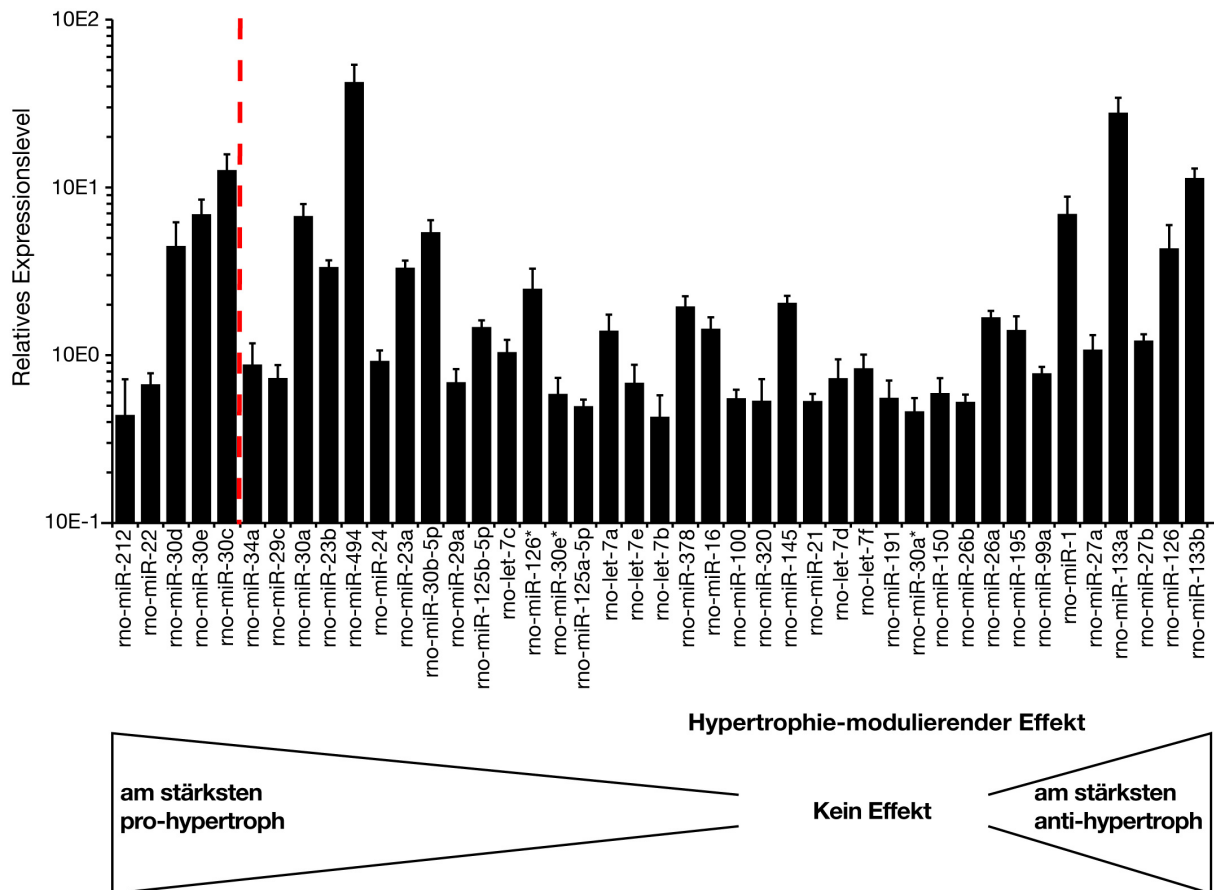


Abb. 9. Die am stärksten exprimierten miRNAs geordnet entsprechend ihres Hypertrophie-modulierenden Effekts.

QRT-PCR Analyse der Expression von miRNAs in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten. Gezeigt sind die 50 am stärksten exprimierten miRNAs (+/- Standardabweichung). MiRNAs, die links von der rot gestrichelten Linie gelistet sind, zeigten eine $\geq 1,6$ -fache Änderung der Zellgröße in der automatisierten HCS-Analyse.

4.1.4 Validierung Hypertrophie-modulierender miRNAs

4.1.4.1 Validierung pro-hypertropher miRNAs

Basierend auf dem Ausmaß der Hypertrophie Induktion (miR-212, miR-365, miR-500, miR-505, Abb. 8A) und der endogenen Expression (miR-22, miR-30c, miR-30d, miR-212, Abb. 8B) wählten wir sieben pro-hypertrophe miRNAs für die anschließende Validierung aus. Zwei experimentelle Strategien wurden verfolgt, um die Effekte dieser miRNAs zu validieren. Zunächst wiederholten wir die ursprüngliche Prozedur der optischen Zellgrößendeterminierung mit den ausgewählten Kandidaten-miRNAs und konnten die Ergebnisse des Screens bestätigen (Abb. 10A-G). Wir haben zudem Inhibitoren verwendet, die die endogene miRNA spezifisch inaktivieren. Wir inhibierten miR-22, miR-30, miR-212 sowie miR-365 und konnten nach Inhibition der miR-30, miR-212 und miR-365 den erwarteten anti-hypertrophen Effekt unter Stimulation mit Phenylephrin feststellen (Abb. 11). Der Effekt nach Inhibition der miR-22 war weniger prominent bzw. nicht erkennbar. Dies

geht mit Beobachtungen von anderen Autoren einher, dass die Effekte nach Inhibition häufig nicht dem erwarteten Resultat entsprechen^{74,92}. Weiterhin bestätigten wir die Effekte der fünf miRNAs durch ³H-Isoleucin Inkorporation, einem zweiten anerkannten Assay für die Bestimmung von Zellwachstum. Der Einbau von aufgenommenem ³H-Isoleucin bei der Translation von Proteinen ist ein verlässlicher Indikator für die Proteinsynthese, welche verstärkt bei Hypertrophie auftritt. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit unserer HCS-Ergebnisse. Alle sieben selektierten miRNAs konnten als pro-hypertroph bestätigt werden (Abb. 10A-G). Davon induzierten miR-22, miR-212, miR-365, miR-500 und miR-505 einen Anstieg des Zellgrößenwachstums und – bis auf miR-505 – der Proteinsynthese um das ≥ 2 -fache im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Damit konnten Werte erreicht werden, die vergleichbar waren mit der starken pro-hypertrophen Stimulation durch den α_1 -adrenergen Rezeptor Agonisten Phenylephrin (Abb 5B).

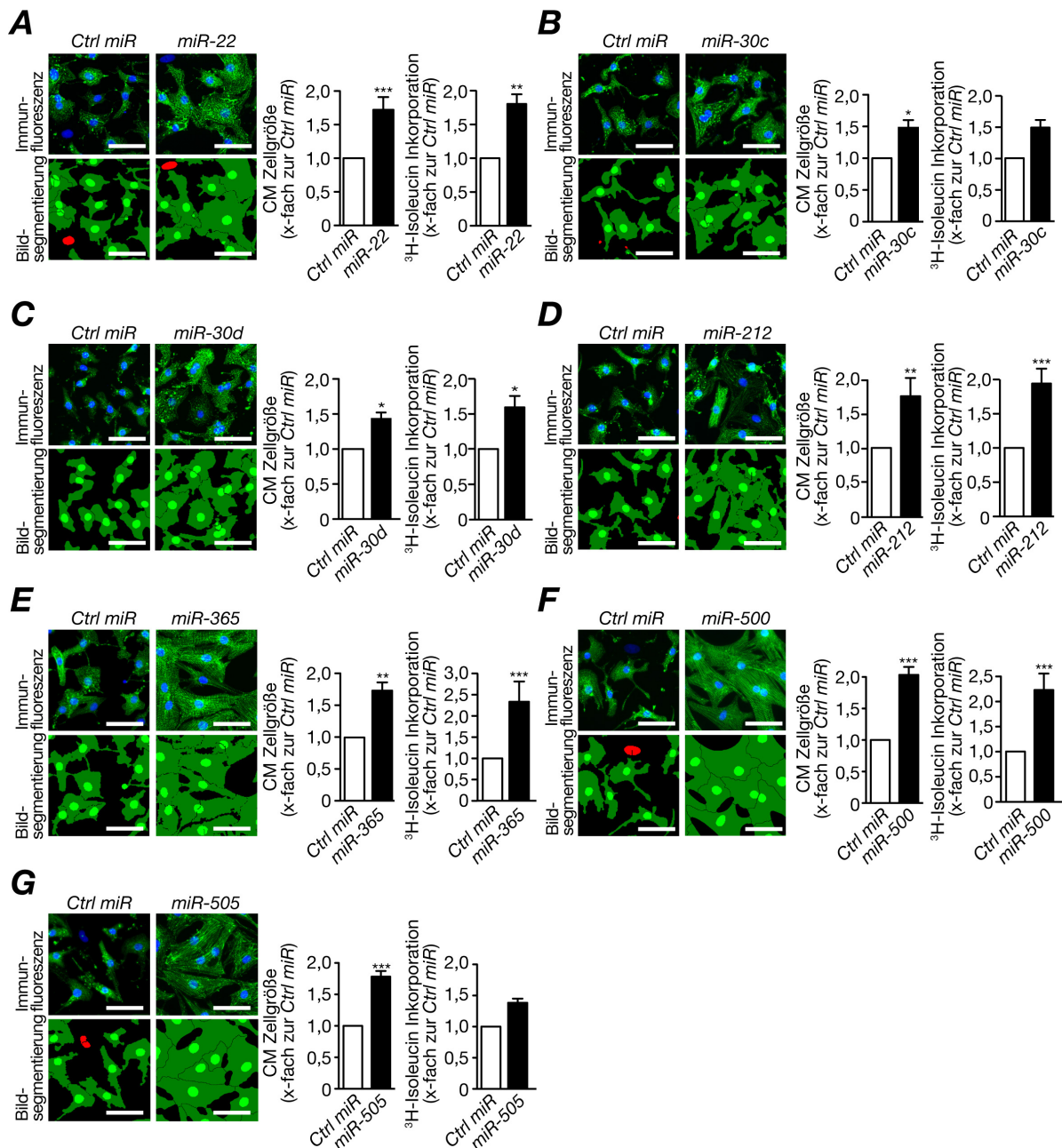


Abb. 10. Validierung der Effekte der pro-hypertrophen Kandidaten miRNAs.

(A-G) Repräsentative Immunfärbungen, ihre entsprechenden Segmentierungen und normalisierte Werte der Zellgröße nach Transfektion der angegebenen miRNAs, $n = 4-5$ unabhängige Experimente (Skalierung: $50 \mu\text{m}$). Zusätzlich wurde die ^3H -Isoleucin Inkorporation bestimmt, $n = 3-5$ unabhängige Experimente, > 40.000 Zellen wurden pro Gruppe analysiert, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

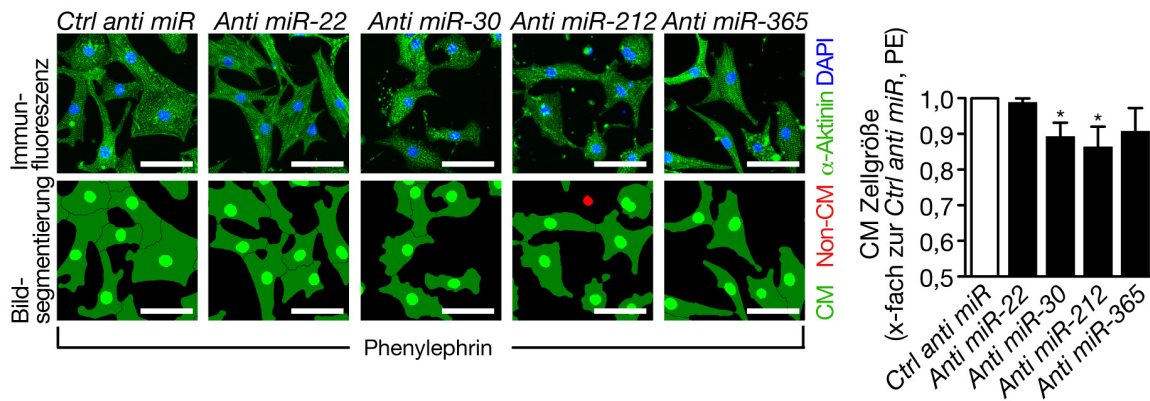


Abb. 11. Inhibition von pro-hypertrophen Kandidaten miRNAs unter PE-Stimulation.

Repräsentative Immunfärbungen, ihre entsprechenden Segmentierungen und Quantifizierungen der CM Zellgröße nach Suppression der angegebenen miRNAs unter PE-Stimulation. Das Zellgrößenwachstum wurde in der Kontrollgruppe um das 1,62-fache \pm 0,05 ($P < 0,001$) mit PE erhöht. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Statistische Unterschiede wurden gegen Kontroll-miRNA transfizierte Zellen getestet, * $P < 0,05$.

Neben der direkten Bestimmung der Zellgröße und Proteinsynthese gilt als ein dritter, indirekter Parameter für den Nachweis hypertrophen Wachstums die Determinierung der Expression des *Natriuretischen Peptids A (Nppa)*. Bis auf miR-212 zeigten alle pro-hypertrophen miRNAs den erwarteten Anstieg in der *Nppa* Expression (Abb. 12).

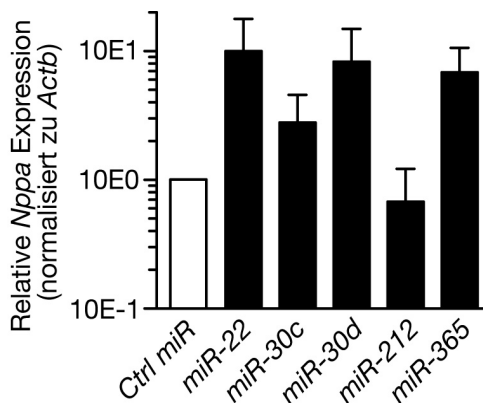


Abb. 12. *Nppa* Expression nach Transfektion der pro-hypertrophen miRNAs.

Die *Nppa* Expression wurde per qRT-PCR Analyse bestimmt und zur *Actb* Expression normalisiert. Angegebene Werte \pm SEM, $n = 3-6$ unabhängige Experimente.

4.1.4.2 Validierung anti-hypertropher miRNAs

Zudem wurden unter den stark exprimierten miRNAs diejenigen ausgewählt, die das Zellgrößenwachstum am stärksten reprimierten ($\leq 0,8$ -fach; miR-27a, -27b, -126 und -133a, Abb. 8B). Mit Hilfe der automatisierten Zellgrößendeterminierung wurden diese miRNAs in mehreren unabhängigen Experimenten validiert. Bis auf miR-126 konnte alle miRNAs als anti-hypertroph bestätigt werden (Abb. 13A-D).

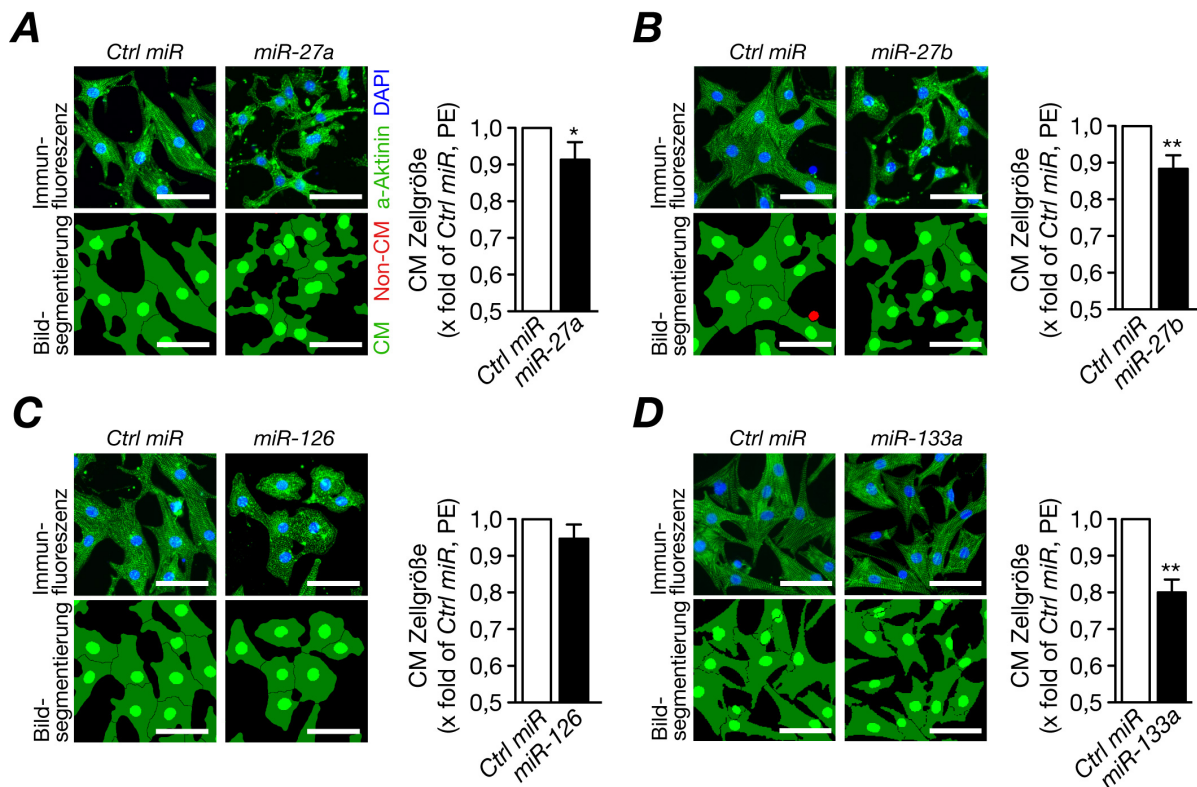


Abb. 13. Validierung der Effekte der anti-hypertrophen Kandidaten miRNAs unter PE-Stimulation.

(A-D) Repräsentative Immunfärbungen, ihre entsprechenden Segmentierungen und quantitative Analyse der Zellgröße nach Transfektion der angegebenen miRNAs und Stimulation mit PE. Das Zellgrößenwachstum wurde in der Kontrollgruppe um das 1,6-fache \pm 0,1 ($P < 0,001$) mit PE erhöht, $n = 3-5$ unabhängige Experimente (Skalierung: 50 μ m), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

4.1.5 Korrelation von miRNA Expressionsänderungen mit funktionellen Effekten in NRCMs

Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Effekte der synthetischen miRNAs auf das Größenwachstum der Kardiomyozyten aufgrund einer schwankenden Transfektionseffizienz zustande kamen, determinierten wir die Abundanz von zwei stark pro-hypertrophen miRNAs (miR-22, miR-365) im Vergleich zu zwei miRNAs, die keinen Phänotyp in unserer HCS-Analyse zeigten (miR-21, miR-150). Die Abundanz aller vier miRNAs 48 h nach Transfektion zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14A). Weiterhin haben wir uns gefragt, ob das Maß der Hypertrophie-Induktion durch miR-22, miR-30c, miR-30d, miR-212 und miR-365 mit deren Regulation bei myokardialer Hypertrophie korreliert. Dafür führten wir an jeweils fünf Tieren entweder eine Konstriktion der thorakalen Aorta (engl. *TAC*) oder eine *sham*-Operation (öffnen und schließen des Brustkorbs ohne Konstriktion der Aorta) durch. Vier Wochen nach dem operativen Eingriff konnten wir die erwartete signifikante Zunahme des Herzgewichts (engl. *Heart weight/Tibia length*, HW/TL) sowie der Expression des *Natriuretischen Peptids A* (*Nppa*) feststellen (Abb. 14B und C). Isolierte RNA aus diesen

Herzen wurde für die Bestimmung der relativen Expressionsänderung von miR-22, -30c, -30d, -212 und -365 verwendet. Zusätzlich wurden zwei miRNAs (miR-150, miR-191) ausgewählt, die keine zellulären Größeneffekte in unserem HCS-Verfahren hatten. Mit Ausnahme der miR-212, die als einzige merklich hochreguliert war (n.s.), konnten wir keine signifikanten Expressionsunterschiede nach TAC beobachten und somit keine Korrelation beider Parameter feststellen (Abb. 14C).

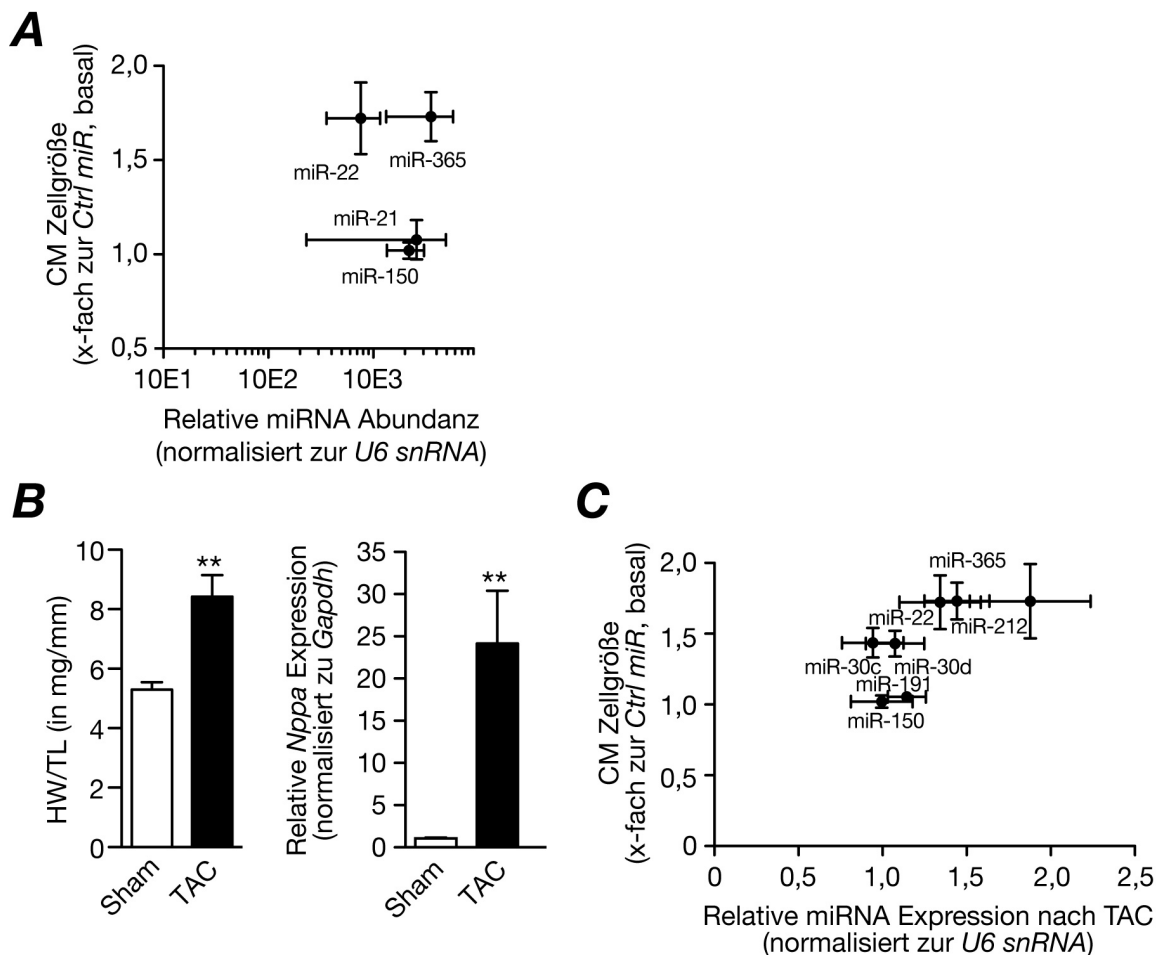


Abb. 14. Korrelation des pro-hypertrophen Phänotyps der miRNAs in NRCM mit der Abundanz nach Transfektion und der Expression bei myokardialer Hypertrophie.

(A) Korrelation der Abundanz nach Transfektion und der pro-hypertrophen Effekte in NRCMs. Die Abundanz der transfizierten miRNAs wurde per qRT-PCR Analyse bestimmt. Die Zellgröße wurde zu *Ctrl miR*-transfizierten Zellen, die unter basalen Konditionen kultiviert wurden, normalisiert. Angegebene Werte +/- SEM. (B) Verhältnis des Herzgewichts (*HW*) zur Tibialänge (*TL*) und die Bestimmung der Expression des *Natriuretischen Peptids A (Nppa)* vier Wochen nach TAC. Die erhobenen Daten stammen von 5 Tieren pro Gruppe. (C) Korrelation der Änderungen der miRNA Expression nach TAC und der pro-hypertrophen Effekte in NRCMs. Expressionsänderungen wurden mit qRT-PCR bestimmt; jede miRNA wurde in RNA Proben von 3-5 Tieren in Triplikaten bestimmt. TAC = engl. *Transverse aortic constriction*.

4.2 Generierung und phänotypische Charakterisierung *Pi16*-defizienter Mäuse

4.2.1 Generierung des *Pi16*^{floxneo} Allels

Der generierte *Pi16*^{floxneo} Targeting Vektor wurde mit Unterstützung der Gruppe von Prof. Dr. Bernhard Nieswandt (Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg, Würzburg, D) in embryonale Stammzellen des 129/Sv-Mausstamms elektroporiert. Im dritten Elektroporationsverfahren konnten vier Klone über PCR und Southern Blot identifiziert werden, in denen die homologe Rekombination des Vektors in die endogene *Pi16*-Sequenz erfolgreich war (Abb. 15A-C). Der Klon 9 führte zur erfolgreichen Generierung von acht chimären Mäusen nach Blastozysteninjektion in pseudo-schwangere Mäuse der Linie C57Bl/6 (in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie, München, D) (Abb. 15D). Der Chimärismus wurde je nach Zusammensetzung des Fells aus agouti (129/Sv-Hintergrund) und schwarzen (C57Bl/6-Hintergrund) Farbbereichen grob eingeschätzt. So erhielten wir je eine 60%, 70%, 80% und 90% sowie vier 100% chimäre Mäuse, die fast ausschließlich agouti gefärbt waren. Die chimären Männchen wurden im Anschluss mit C57Bl/6J-Weibchen verpaart (Abb. 15E). Im Fall einer Integration der genetisch veränderten Stammzellen in die Keimbahn der chimären Mäuse kam es zur Geburt von Nachkommen, die entweder eine komplett agouti oder schwarze Fellfärbung aufwiesen (Abb. 15E). Nur die agouti gefärbten Nachkommen, die in jeder Zelle ein modifiziertes *Pi16* Allel trugen (*Pi16*^{floxneo/+} Mäuse), wurden für die weitere Zucht verwendet.

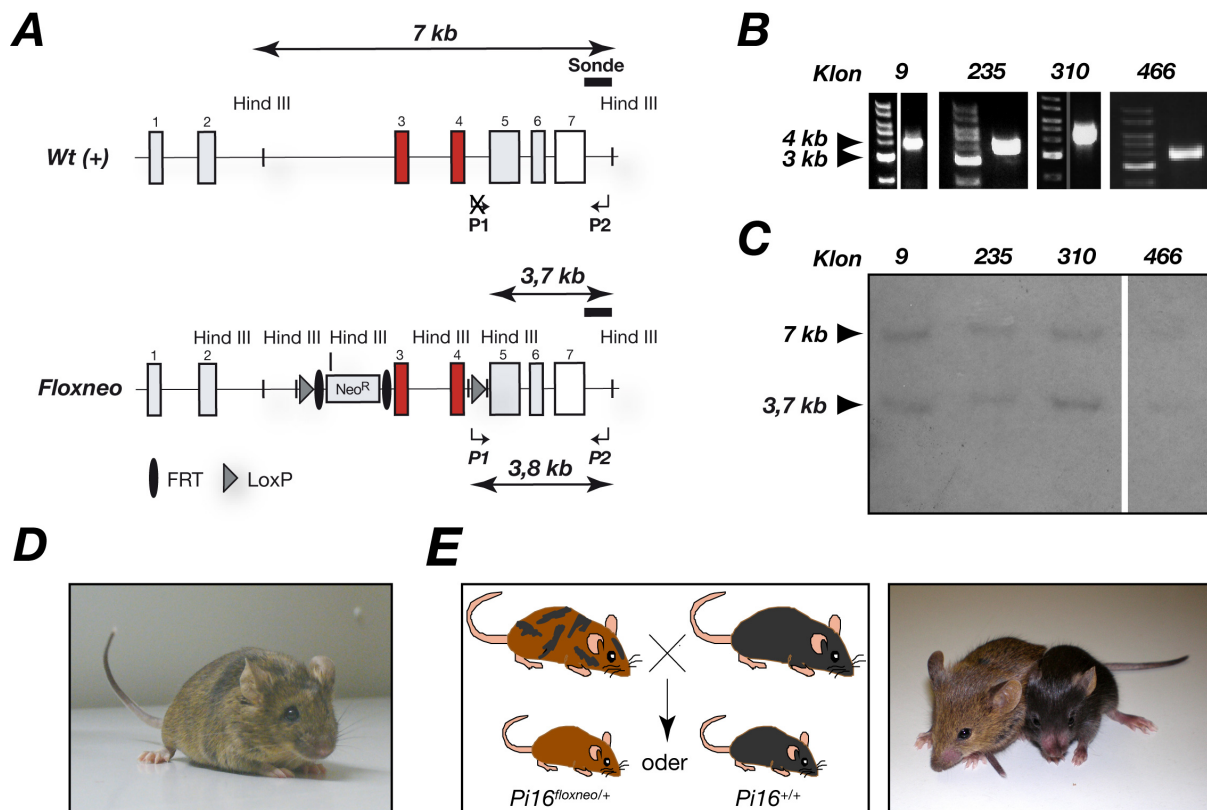


Abb. 15. Generierung des $Pi16^{floxneo}$ Allels *in vivo*.

(A) Schema zur Genotypisierung des $Pi16^{+}$ und $Pi16^{floxneo}$ Allels mit PCR und Southern Blot. Die PCR-Strategie basierte auf der (Nicht-)Bindung des Primers P1, dessen 3'-Ende zur LoxP-Sequenz komplementär war. Bei einem positiven Klon wäre eine 3,8 kb Bande detektierbar. Für den Southern Blot musste die genomische DNA zunächst mit Hind III verdaut werden, um das Wt- (7 kb) bzw. floxneo- (3,7 kb) Allel mit der externen Sonde detektieren zu können. (B-C) PCR- (B) bzw. Southern Blot-Ergebnisse (C) der vier positiven Klone. (D) Resultierende chimäre Maus nach Blastozysteninjektion des Klons 9. (E) Verpaarungsschema der chimären Mäuse mit C57Bl/6J-Weibchen und resultierende Nachkommen mit agouti ($Pi16^{floxneo/+}$) oder schwarzer ($Pi16^{+/-}$) Fellfärbung. Wt = Wildtyp, Neo^R = Neomycin-Resistenzgen, P1/P2 = Primer, kb = Kilobasen.

4.2.2 Globale Rekombination der Frt- und LoxP-Sequenzen

Die globale Rekombination der Frt- sowie LoxP-Sequenzen erfolgte *in vivo* durch Kreuzung der generierten $Pi16^{floxneo/+}$ Mäuse mit FLP (*Actb-FLPe*⁹⁰) bzw. Cre (*Nestin (Nes)–Cre*^{93, 94}) transgenen Mauslinien. Da das FLPe Transgen bereits ab dem embryonalen Tag 10,5 aktiv ist, konnte die F1-Generation erfolgreich auf den Verlust des Selektionsmarkers getestet werden ($Pi16^{flox/+}$, Abb. 16 und 18). $Pi16^{flox/+}$ Mäuse ohne zusätzliches FLPe-Transgen wurden zur Homozygotie verpaart und sollen für zukünftige konditionelle $Pi16$ Gendelektionen verwendet werden.

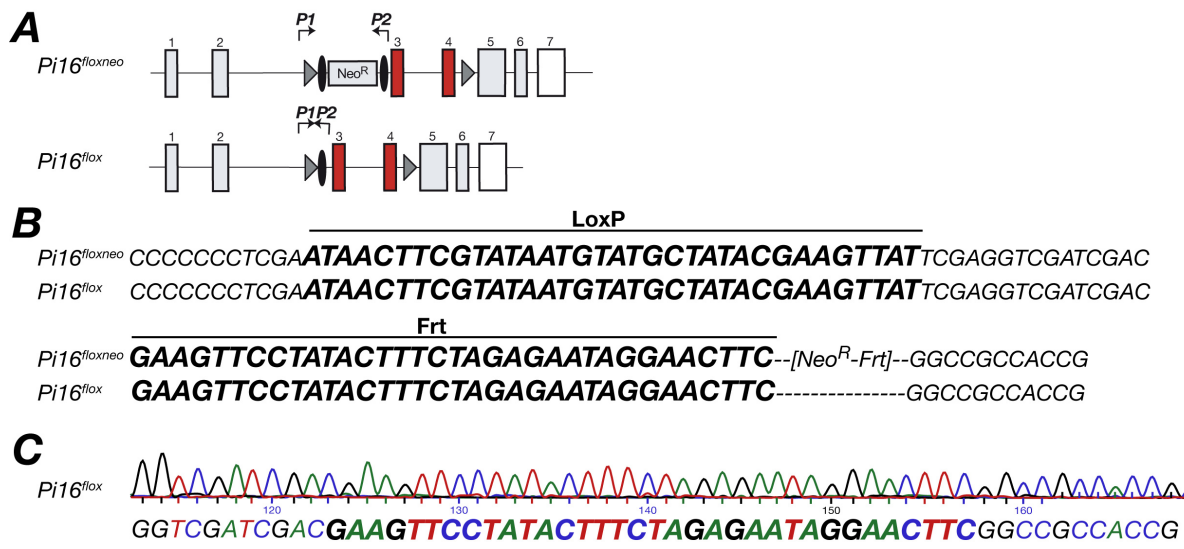


Abb. 16. Sequenz des *Pi16* Allels nach Rekombination der Frt-Sequenzen *in vivo* (*Pi16^{lox}*).

(A) Schematische Darstellung der amplifizierten Sequenzen mit den Primern P1 und P2 für die Sequenzierung. (B) Sequenzvergleich des amplifizierten Fragments mit P1 und P2 vor (*Pi16^{loxneo}*) und nach (*Pi16^{lox}*) Rekombination der Frt-Sequenzen *in vivo*. Hervorgehoben sind die LoxP- und Frt-Sequenz. Der fehlende Sequenzabschnitt im *Pi16^{loxneo}* - Allel ([Neo^R-Frt]) ist in der Sequenz des Targeting Vektors (Anhang 8.2) angegeben. (C) Ausschnitt aus der Sequenzierung des *Pi16^{lox}* - Allels um die rekombinierte Frt-Sequenz.

Neben einigen anderen Organen exprimieren *Nes-Cre* Mäuse die Rekombinase auch in der männlichen Keimbahn⁸⁹. Das machten wir uns für die Generierung der globalen *Pi16* Gendelektion zunutze (Verpaarungsschema Abb. 18C) und kreuzten *Nes-Cre^{Tg/0}*; *Pi16^{loxneo/+}* Männchen, die in ihren Spermien bereits das rekombinierte *Pi16^{lox}* Allel trugen, mit Wildtyp Weibchen (*Nes-Cre^{0/0}*; *Pi16^{+/+}*). Nun waren 50% der Nachkommen heterozygot für die *Pi16* Deletion (*Pi16^{lox/+}*, Abb. 17 und 18). *Pi16^{lox/+}* Mäuse ohne zusätzliches *Nes-Cre*-Transgen (*Nes-Cre^{0/0}*; *Pi16^{lox/+}*) wurden untereinander gekreuzt, um homozygote Tiere zu erhalten (*Pi16^{lox/lox}*, Abb. 18D).

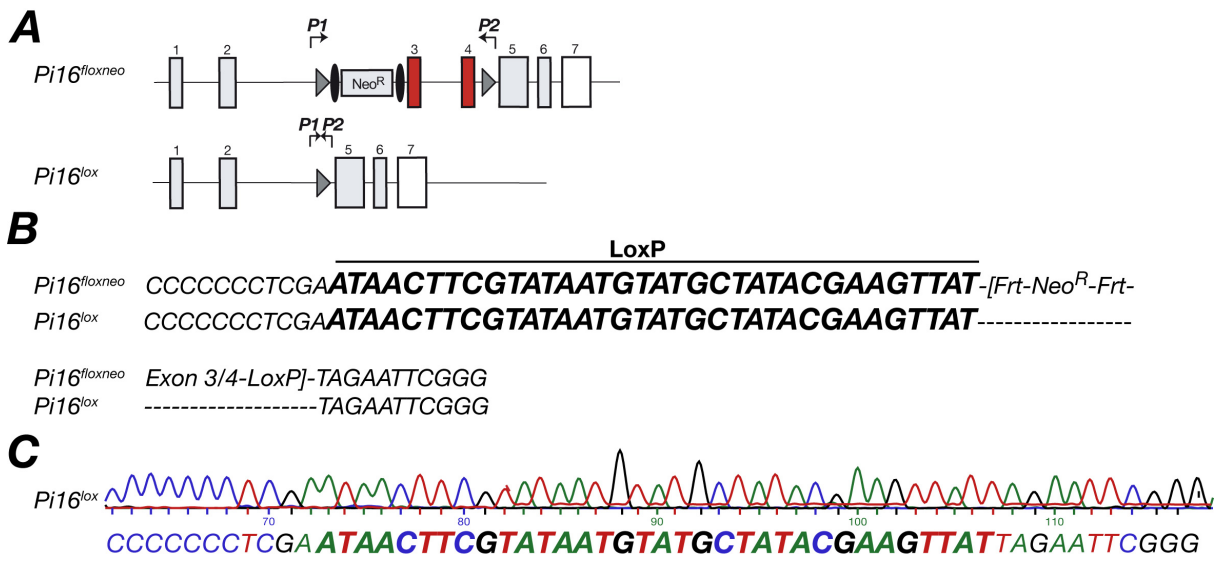


Abb. 17. Sequenz des *Pi16* Allels nach Rekombination der LoxP-Sequenzen *in vivo* (*Pi16^{lox}*). (A) Schematische Darstellung der amplifizierten Sequenzen mit den Primern P1 und P2 für die Sequenzierung. (B) Sequenzvergleich des *Pi16* Allels vor (*Pi16^{loxneo}*) und nach (*Pi16^{lox}*) Rekombination der LoxP-Sequenzen *in vivo*. Hervorgehoben ist die LoxP-Sequenz. Der fehlende Sequenzabschnitt im *Pi16^{loxneo}* – Allel ([Frt-Neo^R-Frt-Exon 3/4-LoxP]) ist in der Sequenz des Targeting Vektors (Anhang 8.2) angegeben. (C) Ausschnitt aus der Sequenzierung des *Pi16^{lox}* – Allels um die rekombinierte LoxP-Sequenz.

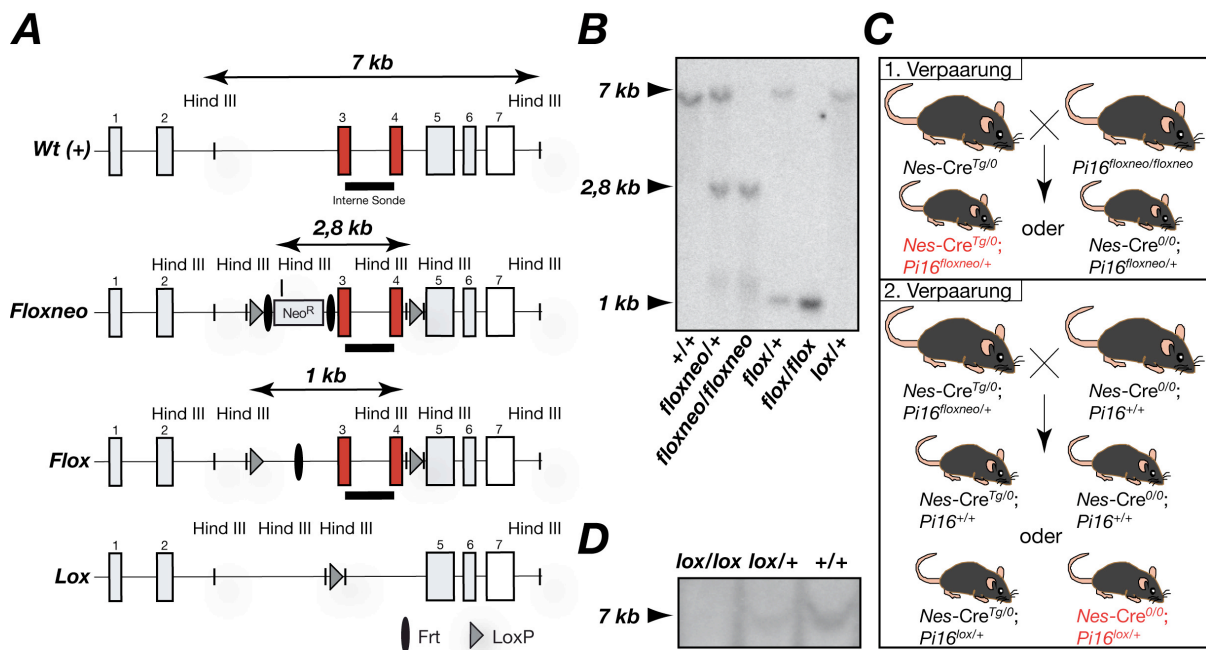


Abb. 18. Die *Pi16* Allele nach Rekombination der Frt- und LoxP-Sequenzen *in vivo*. (A) Schema zur Genotypisierung der verschiedenen Allelvarianten mit der internen Sonde im Southern Blot. (B) Southern Blot mit der internen Sonde an isolierter Mausschwanz-DNA der angegebenen Genotypen. (C) Zweistufiges Verpaarungsschema zur Generierung der globalen *Pi16* Gendeletion. Die hervorgehobenen Genotypen (rot) wurden für die weiteren Verpaarungen verwendet. (D) Southern Blot von *Pi16^{+/+}*, *Pi16^{lox/+}* und *Pi16^{lox/lox}* Mäusen mit der internen Sonde.

4.2.3 PI16 Protein Expression in den genetisch modifizierten Mäusen

Die Expression von PI16 in den verschiedenen Mauslinien wurden mit Hilfe von Western Blot Analysen überprüft. Aus eigenen Arbeiten wussten wir bereits, dass PI16 im Gegensatz zum Herz unter basalen Konditionen eine sehr hohe Abundanz u.a. in der Haut⁸¹ und im Serum aufweist. Daher verwendeten wir für unsere Expressionsanalysen Hautlysate und Serumproben. Der PI16 Antikörper detektierte die charakteristischen drei Banden im Gewebelysat (74, 100, 108 kDa), die mit der globalen Deletion des *Pi16* Gens (*Pi16*^{lox/lox}) komplett verschwanden (Abb. 19A). Dieser Western Blot belegte zudem, dass hier nicht nur die CAP-Domäne, sondern das gesamte PI16 Protein fehlt, da die Detektion außerhalb dieser Domäne mit dem Antikörper gegen Exon 5 erfolgte (die CAP Domäne wird von Exon 1-4 kodiert). In früheren Analysen konnten wir bereits zeigen, dass PI16 im Serum eine sehr hohe Abundanz aufweist (für die Detektion reicht 1 µl Serum aus) und nur als einzelne Bande (ca. 100 kDa) detektiert wird. Auch diese verschwand spezifisch in Serumproben von *Pi16*^{lox/lox} Mäusen (Abb. 19B). Überraschenderweise war die PI16 Expression auch in *Pi16*^{floxneo/floxneo} Mäusen im Vergleich zu *Pi16*^{+/+} Mäusen stark reduziert (Abb. 19A). Dieses Phänomen konnte auch schon in anderen Arbeiten beobachtet werden und wurde mit der Interferenz der Selektionsmarkers mit der Expression des Zielgens erklärt^{95,96}. Die Wiederherstellung der PI16 Expression auf Wildtyp-Niveau nach Rekombination der Frt-Sequenzen in *Pi16*^{flox/flox} Mäusen bewies (Abb. 19C), dass auch hier der Selektionsmarker mit der *Pi16* Genexpression in *Pi16*^{floxneo/floxneo} Mäusen interferiert und zur Expression eines hypomorphen Allels führt.

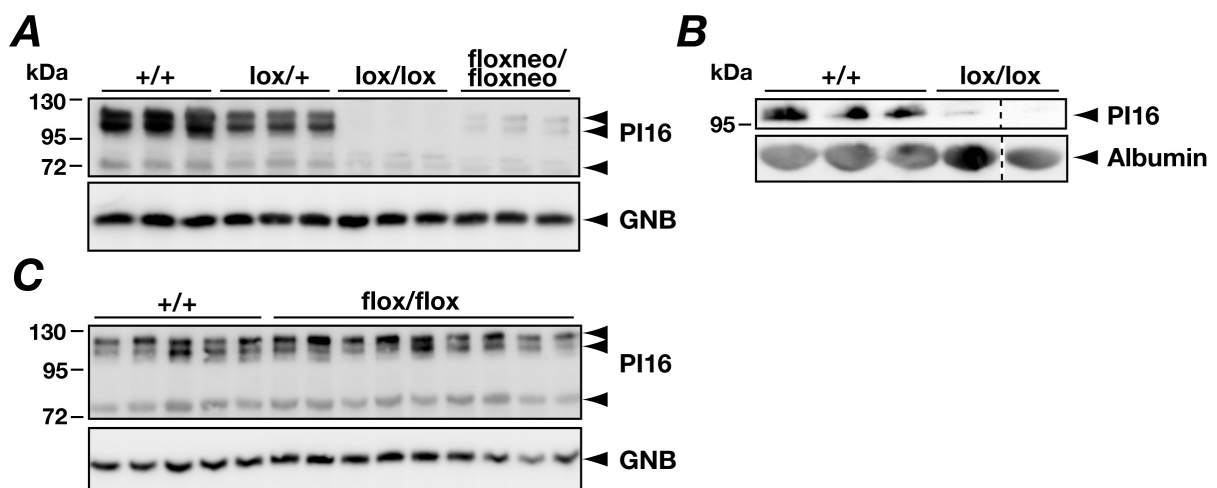


Abb. 19. Western Blot Analyse der PI16 Expression.

(A-C) Western Blot Analyse an Hautlysaten (A und C) und Serumproben (B) von den entsprechenden Genotypen. Guanin Nucleotid Bindungsprotein, beta Untereinheit, (GNB) und Albumin dienten jeweils als Ladekontrolle.

4.2.4 Kardiale Funktionsanalyse PI16-defizienter Mäuse

Makroskopisch wiesen die $Pi16^{floxneo/floxneo}$ sowie die $Pi16^{lox/lox}$ Mäuse im Vergleich zu ihren $Pi16^{+/+}$ Wurfgeschwistern keine Auffälligkeiten auf. $Pi16^{lox/lox}$ Mäuse wurden in der erwarteten Mendelschen Verteilung geboren (29% $Pi16^{+/+}$, 25% $Pi16^{lox/lox}$, 46% $Pi16^{lox/+}$, n = 534) und zeigten dieselbe Überlebensrate wie $Pi16^{+/+}$ Mäuse. Wir untersuchten die kardiale Funktion von $Pi16^{+/+}$ - vs. $Pi16^{lox/lox}$ - Mäusen über einen Zeitraum von 8 Monaten. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede in der Kontraktilität ermitteln (Abb. 20A). Die unveränderte Relation des Herz- zum Körpergewicht als Parameter für eine Hypertrophie zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen (Abb. 20B). H&E- und Sirius Rot- gefärbte Paraffinschnitte ließen keine Anzeichen einer verstärkten Hypertrophie oder Fibrose erkennen (Abb. 20C und D).

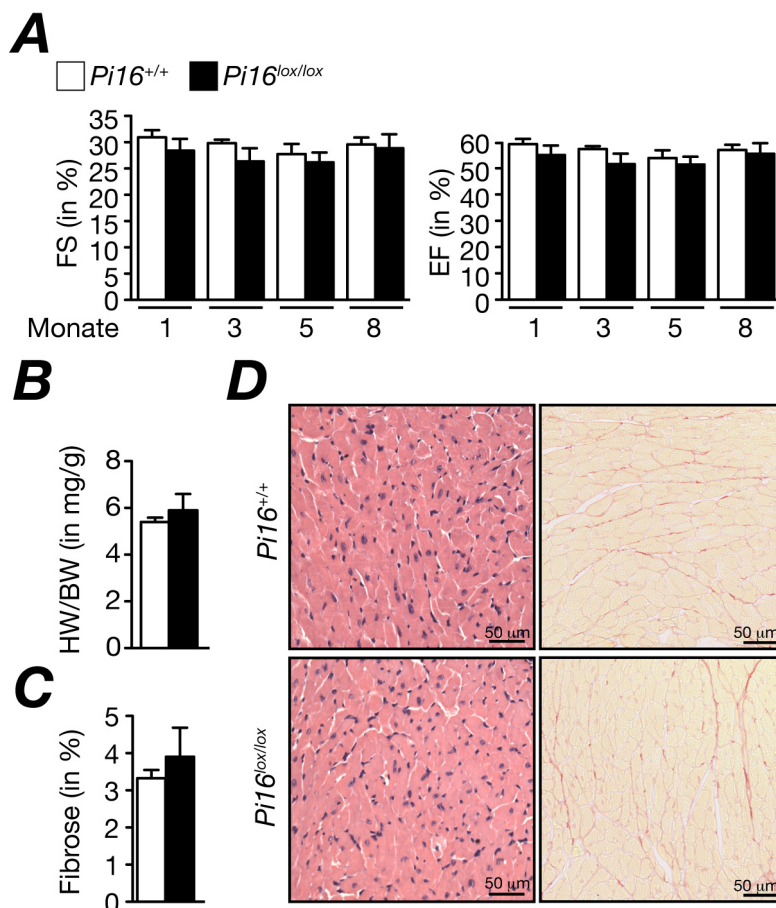


Abb. 20. Kardiale Phänotypisierung über einen Zeitraum von 8 Monaten.

(A) Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (engl. *Fractional shortening (FS)*) und Ejektionsfraction (EF) als zwei Parameter der echokardiographischen Analyse über einen Zeitraum von 8 Monaten, n = 7/5. (B) Verhältnis des Herz- (engl. *Heart weight, HW*) zum Körpergewicht (engl. *Body weight, BW*) in 8 Monate alten Mäusen, n = 6/4. (C) Quantifizierung der Sirius Rot-Färbung an Paraffinschnitten von 8 Monate alten Mäusen, n = 7/5. (D) H&E - (links) und Sirius Rot (rechts) - gefärbte Paraffinschnitte von 8 Monate alten Mäusen.

4.2.5 Gewebemorphologische Untersuchung der PI16-defizienten Mäuse

Tiere höheren Alters (14 bis 17 Monate) untersuchten wir in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pathologie des Helmholtz Zentrums (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, München) auf mögliche morphologische Veränderungen und die Lokalisation von PI16 in 24 verschiedenen Geweben und Organen. Dafür perfundierten wir Mäuse ($Pi16^{+/+}$ vs. $Pi16^{floxneo/floxneo}$, je $n = 6$) mit PFA, führten H&E-Färbungen an Paraffinschnitten durch und untersuchten sie mikroskopisch. In Hinblick auf die Morphologie konnten neben kleineren Auffälligkeiten keine gruppenspezifischen Veränderungen festgestellt werden (Anhang 8.3). Damit bestätigen diese Daten den *per se* pathologisch unauffälligen makroskopischen Phänotyp der $Pi16^{floxneo/floxneo}$ Mäuse.

4.2.6 Zelluläre Lokalisation von PI16

An den im Anhang 8.3 aufgeführten Gewebe- und Organschnitten wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um die zelluläre Lokalisation von PI16 in 24 verschiedenen Geweben und Organen zu bestimmen.

4.2.6.1 Lokalisation im Herz

Mit Fluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten von Wildtyp-Myokard konnten wir PI16 in früheren Analysen außerhalb der Kardiomyozyten im Extrazellulärraum lokalisieren (Abb. 3G)⁸¹. In den immunhistochemischen Färbungen gelang es uns nun ein PI16 spezifisches Signal in zellulären Strukturen außerhalb der Kardiomyozyten zu lokalisieren (Abb. 21A). Teilweise war zwar auch eine bräunliche Färbung der Kardiomyozyten zu erkennen, allerdings trat diese zu einem gewissen Grad auch in den defizienten Tieren auf (Abb. 21C). Um zu testen, ob es sich bei den spezifisch gefärbten Bereichen um kardiale Fibroblasten handeln könnte, isolierten wir diese aus Herzen von $Pi16^{+/+}$ und $Pi16^{lox/lox}$ Mäusen und analysierten die Proben per Western Blot. Separiert man die Fibroblasten vom restlichen Organ, so lässt sich in der Fibroblastenfraction spezifisch ausschließlich die migrierende PI16 Bande von 74 kDa detektieren, die im defizienten Tier verschwindet (Abb. 21B). Zelluläres PI16 trat zuvor schon ausschließlich als singuläre Bande von 74 kDa in isolierten Zellen auf⁸¹.

Da PI16 bei Herzinsuffizienz stark im Herzen akkumuliert, führten wir die Färbungen auch an Schnitten von insuffizienten Herzen durch. Hierbei bedienten wir uns dem Modell der Kardiomyozyten-spezifischen Überexpression des *Adrb1* Gens, das im Endstadium von massiver Kardiomyozytenhypertrophie und Fibrose gekennzeichnet ist⁹⁷. In diesen Schnitten konnten wir eine starke Zunahme des Signals vor allem in fibrotischen Bereichen erkennen (Abb. 21C). Eine Färbung der Kardiomyozyten war hier sowohl mit als auch ohne Inkubation mit dem ersten Antikörper sichtbar.

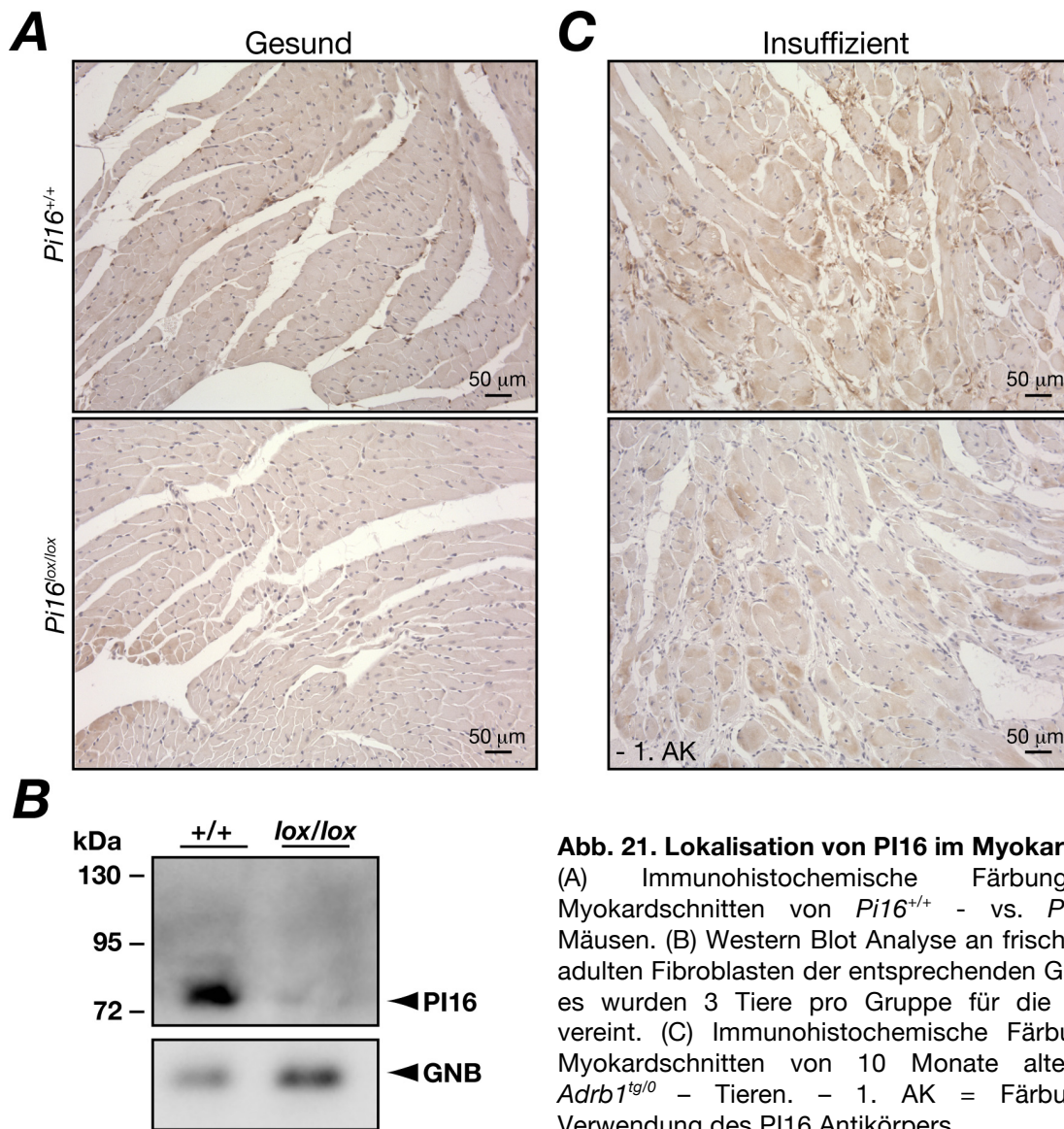


Abb. 21. Lokalisation von PI16 im Myokard.

(A) Immunohistochemische Färbungen an Myokardschnitten von $Pi16^{+/+}$ - vs. $Pi16^{lox/lox}$ - Mäusen. (B) Western Blot Analyse an frisch isolierten adulten Fibroblasten der entsprechenden Genotypen; es wurden 3 Tiere pro Gruppe für die Detektion vereint. (C) Immunohistochemische Färbungen an Myokardschnitten von 10 Monate alten $Myh6-Adrb1^{tg/0}$ - Tieren. - 1. AK = Färbung ohne Verwendung des PI16 Antikörpers.

4.2.6.2 Lokalisation in anderen Geweben und Organen

Bezüglich der Organexpression wussten wir bereits von früheren Western Blot Analysen, dass sich PI16 in gesunden Mäusen vor allem in der Aorta, im Fettgewebe und in der Haut befindet⁸¹. Mit einer immunhistochemischen Färbung von PI16 auf den hergestellten Gewebeschnitten war es nun möglich dessen Expression in diesen und 20 weiteren Geweben zu lokalisieren. In der Aorta war PI16 vor allem in der Adventitia, der fibroblasten- und kollagenreichen äußersten Begrenzungsschicht, detektierbar (Abb. 22). Das einzeln oder mit anderen Geweben zusammen isolierte Fettgewebe (Abb. 22) zeigte durchgängig ein PI16 spezifisches Signal außerhalb der Adipozyten in zellulären Strukturen, die Fibroblasten gleichen könnten. In der Haut konnte eine bräunliche Färbung in den Haarfollikelzellen detektiert werden, jedoch war diese auch in der Kontrollgruppe sichtbar.

Ob es sich hier nun um ein spezifisches, durch eine restliche hypomorphe PI16 Expression in der Kontrollgruppe hervorgerufenen Signal oder eine unspezifische Färbung handelte, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht unterschieden werden, da eine zweite Kontrolle ohne den ersten Antikörper nicht mit einbezogen wurde (Abb. 22).

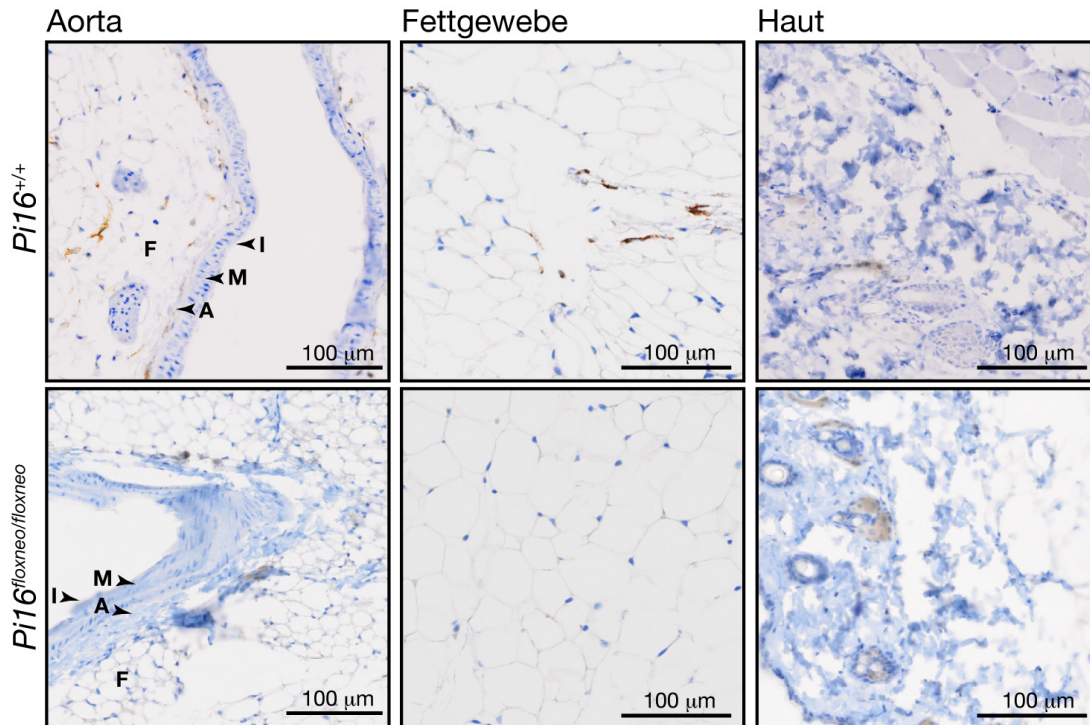


Abb. 22. Lokalisation von PI16 in der Aorta, im Fettgewebe und in der Haut.

A = Adventitia, I = Intima, M = Media, F = Fettgewebe.

Zudem detektierten wir auch in der Epididymis, der Schilddrüse und der Trachea eine kräftige PI16 Expression (Abb. 23 und 24).

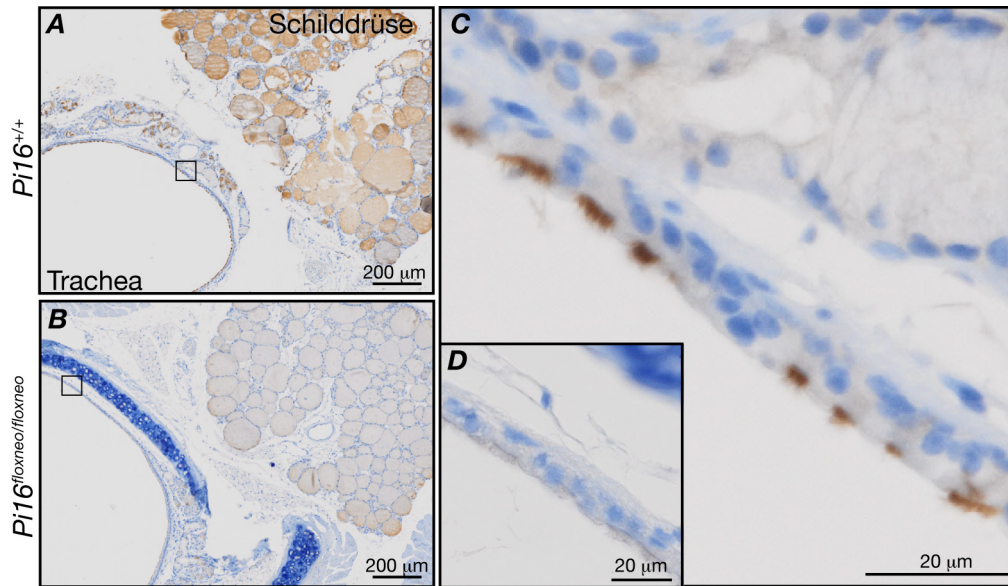


Abb. 23. Lokalisation von PI16 in der Trachea und der Schilddrüse.
(C und D) Bildausschnitte aus den Aufnahmen A und B (wie eingezeichnet).

Während die Follikel der Schilddrüse eine heterogene Färbung ihres kolloidhaltigen Lumens zeigten, war in der Epididymis und Trachea eine auffällige Gemeinsamkeit sichtbar. Hier lokalisierte PI16 in Zilien (Abb. 23C und 24).

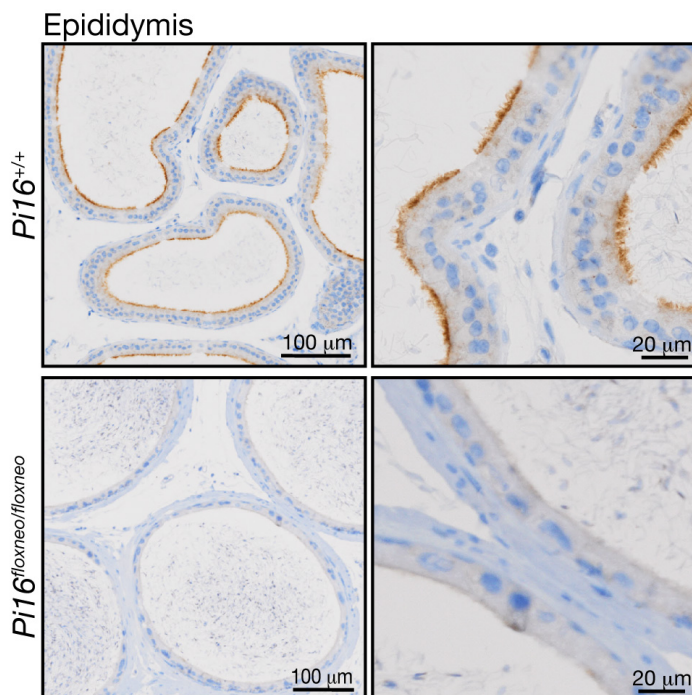


Abb. 24. Lokalisation von PI16 in der Epididymis.
Spezifische Färbung der Stereozilien in der Epididymis.

5 DISKUSSION

5.1 Identifizierung Hypertrophie-modulierender miRNAs *

Kardiomyozytäre Hypertrophie ist ein zentrales Merkmal des kardialen Remodelings bei Herzinsuffizienz. Die zunächst kompensatorisch erhöhte Ausbildung von Muskelmasse durch das Größenwachstum der Kardiomyozyten trägt jedoch langfristig zum Kontraktibilitätsabfall des Myokards bei und wird daher als maladaptiver Prozess angesehen⁹⁸. So steht die Erforschung von möglichen anti-hypertrophen Therapien, sei es durch die Blockierung von pro-hypertroph wirkenden oder die Unterstützung von anti-hypertrophen Molekülen, im Fokus der Forschung⁹⁹. So konnte in den letzten Jahren auch einzelnen miRNAs eine Funktion bei der kardiomyozytären Hypertrophie zugewiesen werden. Ausgangspunkt für die Identifizierung dieser miRNAs war in den meisten Studien eine Expressionsanalyse von gesundem im Vergleich zu insuffizientem Herzgewebe. Ein Ansatz, der eine große Zahl an miRNAs hinsichtlich ihres Einflusses auf das kardiomyozytäre Größenwachstum parallel untersucht, fehlte bisher. In der vorliegenden Arbeit wurde eine unvoreingenommene Auswahl von 230 synthetischen miRNAs mittels eines HCS-Ansatzes erfolgreich nach potenten pro- und anti-hypertrophen Kandidaten untersucht⁶⁴.

5.1.1 Die Anwendung eines HCS-Verfahrens mit dem Ausleseparameter zelluläres Größenwachstum von primären Kardiomyozyten

Die primäre Zellkultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten ist das am weitesten verbreitete und am besten studierte *in vitro* Modell für die Erforschung der kardiomyozytären Hypertrophie. 1982 etabliert¹⁰⁰, stellt dessen Anwendung bis heute einen hohen Standard in der kardiovaskulären Grundlagenforschung dar. Die Verwendung von neonatalen Rattenkardiomyozyten in einem HCS-Verfahren wurde neben dieser Arbeit nur noch von einer weiteren Studie berichtet⁷⁶. Das steht im engen Zusammenhang mit den Anforderungen, die eine Primärzellkultur an ein Analysenformat im Großmaßstab stellt. So muss eine möglichst homogene Präparationsqualität und Zellreinheit gewährleistet werden. Zelllinien kardiomyozytären Ursprungs (HL-1¹⁰¹ und H2C9¹⁰²) scheinen hierzu eine gute Alternative bieten. So konnte gezeigt werden, dass sie einen robusten hypertrophen Phänotyp nach entsprechender Stimulation ausbilden; außerdem existieren Hinweise, dass sie ähnliche Signalwege wie primäre Kardiomyozyten besitzen^{103,104}. Jedoch scheinen sie eine Tendenz zur Dedifferenzierung zu besitzen, was einen schwer kontrollierbaren

* Dieser Abschnitt wurde in Auszügen in Jentzsch *et al.* im *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2011 veröffentlicht⁶⁴.

Parameter darstellt ^{101,105}. Mit etablierten Zellmarkern und dem in dieser Arbeit beschriebenen Mikroskopiesystem waren wir dagegen in der Lage, die primären Zellkulturen kontinuierlich auf ihre Reinheit zu überprüfen (mehr als 80% Kardiomyozyten in der Kultur). Nichtsdestotrotz wäre es sicherlich von Interesse Zelllinien für diese Anwendung zu testen.

Entscheidend für die Etablierung dieses HCS-Verfahrens war die Automatisierung der Zellgrößenanalyse. Die reproduzierbare Detektion der Zellgrößenzunahme unter Phenylephrin Stimulation diente als Kontrollparameter für die Optimierung des Systems. Im Vergleich zu bisherigen Studien, die sich einer manuellen Auswertung der Zellgröße bedienten, erreichten wir ein vergleichbares Größenwachstum ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ bei erheblich größerer Anzahl an analysierten Zellen pro Well (durchschnittlich 2700 Zellen). Ein weiterer Vorteil der beschriebenen Methode ist zudem, dass grundsätzlich alle Zellen in einem festgelegten Bereich, der für jedes Well konstant bleibt, analysiert werden, was eine voreingenommene Auswahl an Zellen für eine Quantifizierung ausschließt.

Damit ist es uns erstmals gelungen, die Bestimmung der Zellgröße als robusten Ausleseparameter für eine HCS-Analyse zur Identifizierung Hypertrophie-modulierender Moleküle zu verwenden. Zwei bereits publizierte Studien mit derselben Zielstellung basierten auf der Induktion von *Nppa*-¹⁰⁹ bzw. *Mcip1*-Fluoreszenzreportern ¹¹⁰, um nach Aktivatoren dieser Hypertrophie-relevanten Proteine zu suchen. Die Verlässlichkeit dieser Parameter ist jedoch nicht in jedem Fall gegeben. Unseren eigenen Beobachtungen (im Fall der miR-212) ⁶⁴ und derer anderer ⁹² zufolge, muss Kardiomyozytenhypertrophie nicht unbedingt mit einer Induktion der *Nppa* Genexpression einhergehen. Zum anderen kann selbst eine Entlastung des Herzens zur Induktion von Hypertrophie-assoziierten Genen führen ¹¹¹.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Grad der Hypertrophieantwort in einer primären Zellkultur gewissen Schwankungen unterliegt, was sicherlich die Sensitivität dieser Methode beeinträchtigen kann. Daher besteht die Möglichkeit, dass zuvor identifizierte krankheitsrelevante miRNAs aufgrund eines nur moderaten Effekts nicht detektiert worden sind.

5.1.2 Was ist zu den identifizierten miRNAs bisher bekannt?

Nach Abschluss des HCS-Verfahrens wurden insgesamt neun miRNAs für Validierungsexperimente ausgewählt. Mit Ausnahme von miR-126, die trotz tendenziellem Rückgang der Zellgröße keinen signifikanten anti-hypertrophen Phänotyp induzierte, wurden alle Effekte der selektierten miRNAs bestätigt. Für die Mehrzahl dieser miRNAs wurde damit

erstmalig beschrieben, dass diese einen entscheidenden Einfluss auf die Zellgröße von Kardiomyozyten haben. Lediglich drei miRNAs (miR-22, miR-133a, miR-212) wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen schon in Zusammenhang mit kardiomyozytärer Hypertrophie untersucht.

MiRNAs mit bekannter Funktion bei kardiomyozytärer Hypertrophie

MiR-22 wurde bis vor kurzem hauptsächlich in Zusammenhang mit verschiedenen Krebstypen untersucht¹¹²⁻¹¹⁵. Dort wurde sie als ein Regulator des *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN)/AKT Signalwegs beschrieben^{116,117}. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Transfektion einer synthetischen miR-22 in Kardiomyozyten *per se* – wie auch in unseren Versuchen – zu einer signifikanten Zunahme der Zellgröße führt. Dieser Zellgrößenzunahme soll auch hier die direkte Inhibition der Expression des Proteins PTEN zugrunde liegen¹¹⁸. Dieselben Autoren konnten auch eine erfolgreiche Suppression des Kardiomyozytenwachstums unter PE Stimulation nach Inhibition von miR-22 zeigen, nachdem 100 Zellen pro Gruppe ausgewertet worden waren. Wir konnten mit dem applizierten Inhibitor und unserer automatisierten Analyse mit durchschnittlich 2700 vermessenen Zellen pro Well keinen konsistenten anti-hypertrophen Effekt erzielen. Da Xu *et al.*¹¹⁸ keine Details zu ihren Inhibitoren angeben, ist es zugegebenermaßen schwierig die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Besonders aufgrund möglicher chemischer Modifikationen (Phosphorothioate anstatt Phosphodiester im Rückgrat, *Locked nucleic acid* (LNA) Nukleotide oder auch Cholesterol-Modifikationen) können in der Effizienz der Inhibitoren sehr große Unterschiede bestehen. Der applizierte Inhibitor in unserer Studie enthielt zwischen den ersten und letzten vier Basen Phosphorothioate statt Phosphodiester im Rückgrat. Phosphorothioate über die gesamte Sequenz führten in unserer Primärzellkultur zu toxischen Effekten. Aufgrund der bestehenden Diskrepanz zwischen Xu *et al.*¹¹⁸ und unseren Daten wäre es notwendig weitere miR-22 Inhibitoren hinsichtlich ihres Effekts auf das hypertrophe Wachstum zu testen.

Untersuchungen zur miR-133a als Mitglied der miR-133 Familie sind wohl bisher am weitesten fortgeschritten im Vergleich zu anderen kardialen miRNAs. Zusammen mit miR-1, miR-133b, miR-206, miR-208, miR-208b und miR-499 gehört sie zu den muskelspezifischen miRNAs¹¹⁹⁻¹²³. Beide Familienmitglieder werden als bicistronisches Transkript exprimiert - miR-133a zusammen mit miR-1 und miR-133b zusammen mit miR-206^{120,122,124} - und scheinen bereits für die Entwicklung und Differenzierung von Herz- und Skelettmuskulatur essentiell zu sein^{119,125,126}. In unabhängigen Untersuchungen zur Charakterisierung der miR-133a im adulten Herzen konnte für diese - als einzige der identifizierten miRNAs - eine

konsistente Deregulierung (Herunterregulierung) in verschiedenen Tiermodellen kardiovaskulärer Erkrankungen und humanen Proben von Patienten mit unterschiedlichen Herzerkrankungen nachgewiesen werden^{36,127,128}. Die adenovirale Überexpression von miR-133 in Kardiomyozyten führte zu einer reduzierten Zellgröße¹²⁹ und Proteinsyntheserate³⁶ (neben der Zellgrößenbestimmung ein zweites direktes Maß für die Kardiomyozytenhypertrophie). Diesen anti-hypertrophen Effekt konnten wir mit unseren Zellgrößenbestimmungen bestätigen. Hier zeigte miR-133a im Vergleich zu den anderen validierten anti-hypertrophen miRNAs den stärksten Effekt. Als ein möglicher Mechanismus für die beobachteten anti-hypertrophen Effekte der miR-133a wurde die Inhibition des prohypertrophen Calcineurin/*Nuclear factor of activated T cells* (NFAT) Signalwegs in der Literatur suggeriert. Dabei scheint miR-133 direkt die Translation von Calcineurin¹³⁰ als auch von NFAT¹²⁹ zu inhibieren. Neben dem hypotrophen Effekt wurde für miR-133a auch eine anti-apoptotische Funktion in Kardiomyozyten beschrieben¹³¹.

In vivo konnte der hypotrophe Phänotyp nur bei einer transienten Inhibition der miR-133 Expression bestätigt werden. So führte die Applikation eines miR-133 Antagomirs in Mäusen *per se* zur erwarteten Zunahme des Herzgewichts, der linksventrikulären Wand- und interventrikulären Septumdicke³⁶. Die genetische Deletion beider genomischer Loci für miR-133a (miR-133a-1 und -2) resultierte bereits pränatal in ventrikulären septalen Defekten, so dass nur ca. ¼ der Neugeborenen mit Homozygotien für die Doppeldeletion den Tag 10 überlebten. Die Mäuse, die das adulte Stadium erreichten, entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie mit Abnahme der ventrikulären Wanddicke und starker Fibrose, hatten aber keine Anzeichen einer kardialen Hypertrophie¹²⁴. Auch in zwei generierten *gain-of-function* Mausmodellen, in denen miR-133a zum einen Muskel-¹³² zum anderen Kardiomyozyten-spezifisch¹³³ überexprimiert wurde, konnte - selbst nach Applikation eines kardialen Stressmodells (Konstriktion der thorakalen Aorta, engl. TAC)¹³³ - kein hypotropher Phänotyp identifiziert werden. Lediglich Fibrose und Apoptose waren nach der TAC-Intervention signifikant reduziert¹³³. Die Diskrepanz zwischen dem Phänotyp nach *in vivo* Applikation eines synthetischen Antagomirs und in genetisch modifizierten Mäusen ist für miR-133a keine Ausnahme. So wurden erst kürzlich ebensolche Unterschiede auch für miR-21 beschrieben^{37,134}. Als Erklärungsmöglichkeiten wurden hier kompensatorische Mechanismen, die durch eine konstitutive Deletion hervorgerufen werden können, oder auch potentielle *off-target* - Effekte der Inhibitoren angeführt¹³⁵. Kompensatorische Mechanismen könnten womöglich durch Tamoxifen-induzierte und damit kurzfristige Deletionen umgangen werden. Zwar wurde für miR-21 ein solches Mausmodell generiert und der Phänotyp als derselbe wie bei der konventionellen miR-21 Deletion beschrieben,

allerdings liegen dazu bisher keine quantitativen Daten vor (*Response to Thum et al.*¹³⁵). In Hinblick auf mögliche *off-target* – Effekte der miRNA Inhibitoren wurden bereits Untersuchungen zur Spezifität von *in vivo* applizierten Antagomiren unternommen. Ein Mismatch von einem Nukleotid im Antagomir gegen miR-122 konnte – je nach Basenposition – bereits eine spezifische Bindung an miR-122 und eine Derepression der Ziel-mRNAs in der Leber unterbinden¹³⁶. Trotz erstaunlich hoher Spezifität dieses Antagomirs wiesen die Autoren daraufhin, dass diese Erkenntnis nicht unbedingt auf jede miRNA übertragbar ist und individuell getestet werden müsste. Beide *loss-of-function* Modelle - genetische Deletion und transiente Inhibition - müssen daher hinsichtlich der Aufklärung der biologischen Funktion der miRNAs sowie der möglichen therapeutischen Anwendung der Inhibitoren in Zukunft weiter detailliert untersucht werden.

MiR-212 wurde bereits 2007 als pro-hypertrophe und am stärksten hochregulierte miRNA in humanen Proben von Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium beschrieben¹³⁷. In unseren Versuchen zählte miR-212 zu den miRNAs mit dem stärksten pro-hypertrophen Potential bei gleichzeitig hoher Abundanz in adulten (laut unseren Daten) und neonatalen¹²⁷ Kardiomyozyten. MiR-212 gehört zur miR-212/miR-132 Familie und wurde außerhalb des kardiovaskulären Systems vor allem in der Hirnforschung beschrieben^{138,139-142}. Erst kürzlich wurde eine Mauslinie mit einer Deletion des genomischen Locus von miR-212/miR-132 generiert, die schwere Defekte in der Entwicklung der Milchdrüsen aufwies¹⁴³. Eine umfassende Analyse des kardiovaskulären Systems dieser Mauslinie unter Applikation der entsprechenden Krankheitsmodelle wäre hier sehr aufschlussreich. Man muss jedoch einräumen, dass die Generierung und phänotypische Untersuchung von Gendeletionen der einzelnen miRNAs, die im Falle kompensatorischer Effekte des jeweils anderen Familienmitglieds gekreuzt werden könnten, besser wäre, um den beiden miRNAs spezifische Effekte zuordnen zu können.

MiRNAs mit unbekannter Funktion bei kardiomyozytärer Hypertrophie

Der miR-27 Familie (miR-27a und -27b) wurde neben der Adipogenese¹⁴⁴, der Osteoblasten Differenzierung¹⁴⁵ und der Angiogenese¹⁴⁶ bisher eine Funktion bei der Reifung der Herzventrikel zugeschrieben, indem sie den Transkriptionsfaktor *Myocyte enhancer factor 2C* (MEF2C) posttranskriptionell regulieren soll¹⁴⁷. MEF2C wurde neben seiner wichtigen Funktion in der Kardiogenese¹⁴⁸ auch als pro-hypertropher Faktor beschrieben¹⁴⁹⁻¹⁵¹, womit sich der beobachtete anti-hypertrophe Effekt bei Überexpression der miR-27 Familie in Kardiomyozyten sehr gut erklären ließe. Im Fall dieser Familie wäre die Applikation einer miRNA *mimic* statt des Inhibitors das entsprechende *in vivo* Modell, um einer induzierten

Hypertrophie entgegen wirken zu können. Die Überexpression von protektiven miRNAs wurde in der kardiovaskulären Forschung jedoch noch nicht berichtet. Bisher existieren nur in der Krebsforschung zwei Studien bezüglich der Verwendung einer miRNA *mimic in vivo* ^{152,153}.

Die miR-30 Familie ist bisher als negativer Regulator von zwei Proteinen in Zellen des Myokards beschrieben worden. Zum einen inhibiert miR-30c zusammen mit miR-133 die Expression des *Connective tissue growth factor* (CTGF) ¹²⁷, einem pro-fibrotischen Protein. Zum anderen interferiert miR-30 mit dem programmierten Zelltod (Apoptose) und der mitochondrialen Zellteilung, indem es p53 posttranskriptional reguliert ¹⁵⁴. Weiterhin wurde berichtet, dass diese Familie bei der zellulären Seneszenz ¹⁵⁵, der Nierenentwicklung ¹⁵⁶, Differenzierung ¹⁵⁷ und bei Krebs ¹⁵⁸ eine Rolle spielt. Da alle fünf Familienmitglieder (miR-30a bis -30e) dieselbe *seed*-Sequenz besitzen und sich nur außerhalb dieser Region in einzelnen Basenpaaren unterscheiden, ist es momentan unklar, ob alle fünf miRNAs generell dieselben Proteine regulieren und damit funktionell redundant sind. Unsere Ergebnisse zeigten, dass alle fünf miRNAs – mit miR-30c und miR-30d als signifikant stärkste Mediatoren - das Kardiomyozytenwachstum induzierten (Anhang 7.1). Daher wählten wir für die Inhibition einen „17mer“ Inhibitor (Base 2 bis 18), der zu einer signifikanten Reduktion der Zellgröße führte. Weiterführende Untersuchungen, inwieweit der Inhibitor die einzelnen miR-30 Familienmitglieder in ihrer Abundanz reprimiert, wären hier von großem Interesse.

Hinsichtlich einer *in vivo* Studie stellt diese miRNA Familie eine große Herausforderung an ein entsprechendes Modell: (1) Die Generierung einer genetischen Deletion im Mausmodell: Die fünf miRNAs werden von sechs genomischen Loci kodiert (miR-30c wird von 2 Genen, miR-30c-1 und miR-30c-2, kodiert), die auf drei Chromosomen verteilt sind. Trotzdem miR-30b/miR-30d und miR-30c-1/miR-30e als Cluster vorliegen, müßten immernoch mindestens vier Loci zielgerichtet ausgeschaltet werden. (2) Die transiente Inhibition: Da Base 1 bis 11 der fünf Familienmitglieder komplett identisch sind, wäre hier die Applikation eines „8-mer“ Inhibitors (bindet nur an Base 2-9 der entsprechenden miRNA) ideal. Jedoch konnte im Fall von miR-21 gezeigt werden, dass diese kurzen Inhibitoren im direkten Vergleich zu Inhibitoren, die über die komplette Länge an die miRNA binden („22-mer“), therapeutisch uneffektiv sind ¹³⁵. Das bedeutet allerdings, dass man im Fall von miR-30 einen Cocktail von fünf 22-mer Inhibitoren verabreichen oder die Effizienz eines kürzeren Inhibitors - wie er in unserer *in vitro* Studie verwendet wurde – *in vivo* evaluiert werden müßte. (3) Die Anwendung der miRNA *sponge* Technologie: Als eine Alternative zur genetischen und transienten Deletion für die Aufklärung der biologischen Funktion wurde die Anwendung von sogenannten miRNA *sponges* beschrieben ¹⁵⁹. Hier werden vier bis zehn komplementäre

Bindungsstellen zur entsprechenden miRNA als Tandem unter die Kontrolle eines starken ubiquitären (vorwiegend für die Zellkultur) oder gewebespezifischen (für *in vivo* Modelle) Promotors gestellt. Dieses Konstrukt konkurriert mit den Ziel-mRNAs um die Bindung der endogenen miRNA und je präsenter es ist, desto stärker fällt die Derepression der Ziel-Proteine aus. Aufgrund der großen Sequenzübereinstimmung bei miRNA Familien ist dieses *loss-of-function* Modell gerade für diese interessant ¹⁶⁰. So wurde ein solcher *sponge* bereits für miR-30e entwickelt und im Vergleich zu einem spezifischen synthetischen miR-30e Inhibitor in HeLa Zellen auf die Derepression eines miR-30c *target* Fluoreszenzreporters getestet ¹⁵⁹. Während der synthetische Inhibitor nur zu einer geringfügigen Derepression führte (was eine direkte Inhibition nur der miR-30e suggerierte), stieg das Fluoreszenzsignal mit dem *sponge* auf das ca. 4-fache an. Das legte eine Kreuzreaktion des *sponge* mit den anderen Familienmitgliedern, in diesem Fall für miR-30c direkt gezeigt, nahe. Komplette heterogene miRNAs (in dem Fall miR-20 und miR-21) interagierten dagegen nur mit ihren spezifischen Konstrukten ¹⁵⁹. Die Generierung eines miR-30 *sponge* unter Kontrolle des *Myh6* Promotors wäre für die detaillierte Analyse der biologischen Funktion der miR-30 Familie in Kardiomyozyten daher sehr naheliegend. Nichtsdestotrotz müsste für eine therapeutische Intervention die Applikation eines entsprechenden Inhibitor Cocktails oder Familieninhibitors optimiert werden.

Zur miR-365, miR-500 und miR-505 ist am wenigsten bekannt. In Bezug auf miR-365 existiert bisher nur eine funktionelle Studie, in der gezeigt wurde, dass das miRNA Cluster miR-193b-365 ein Schlüsselregulator bei der Entwicklung des braunen Fettgewebes ist ¹⁶¹. Sonstige Untersuchungen beschränken sich auf Expressionsdaten aus Zelllinien ^{162,163}, Krebszellen ¹⁶⁴ und der Gebärmutter ¹⁶⁵. Hinsichtlich ihrer Expression in adulten Rattenkardiomyozyten lag miR-365 (wie auch miR-500 und miR-505) nicht unter den Top 50 exprimierten miRNAs. Trotzdem konnten wir immerhin eine anti-hypertrophe Tendenz nach Applikation des Inhibitors erkennen. Zur miR-500 existieren ausschließlich deskriptive Studien in Bezug auf ihre Expression im Nervensystem ^{166,167}, auf eine mögliche Rolle bei der interstitiellen Zystitis ¹⁶⁸ sowie bei Brustkrebs ¹⁶⁹ und auf die Verwendung als putativer diagnostischer Marker bei Leberkrebs ¹⁷⁰. Neben der Expression in murinen Brustkrebstumoren ¹⁷¹ wurde miR-505 als anti-proliferativ und pro-apoptotisch in embryonalen Mausfibroblasten beschrieben ¹⁷². Der Inhibitor führte in diesen Zellen zum entgegengesetzten Effekt. Wir testeten keinen miR-505 und miR-500 Inhibitor, da sie hinsichtlich ihrer endogenen Expression in früheren Analysen (Microarray Analysen mit adulten Mauskardiomyozyten, qRT-PCR Analysen mit murinem Myokardgewebe) nur knapp über dem Detektionslimit lagen oder gar nicht detektiert werden konnten. Trotzdem führte

die Transfektion von miR-500 und miR-505 zu einem stark pro-hypertrophen Effekt. Hier liegt die Vermutung nahe, dass es sich auch um einen *off-target* Effekt handeln könnte, den man bei einer Überexpressionsstudie nicht von vornherein ausschließen kann. Mit entsprechenden Selektionskriterien bei Analysen im großen Maßstab – wie eine ausreichend hohe endogene Expression in unserem Fall – ist es jedoch möglich potentielle Kandidaten für anschließende detailliertere Studien herauszufiltern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bereits beschriebenen Effekte der miR-22, miR-133a und miR-212 hinsichtlich ihres Einfluss auf das Größenwachstum von Kardiomyozyten mit unserem Ansatz nicht nur bestätigt werden konnten, sondern auch deren Potential als stärkste pro- bzw. anti-hypertrophe Mediatoren aus insgesamt 230 untersuchten miRNAs untermauert werden konnte. Die Mehrzahl der identifizierten miRNAs wurde jedoch erstmalig bezüglich ihrer Rolle bei der Kardiomyozytenhypertrophie beschrieben. Das gesamte Spektrum der beschriebenen miRNAs hätten wir allerdings nicht identifiziert, wenn wir den Fokus am Beginn der Analyse auf die am stärksten deregulierten miRNAs bei myokardialer Hypertrophie gesetzt hätten. Schlussendlich gilt es nun die identifizierten miRNAs genauer funktionell zu charakterisieren mit dem langfristigen Ziel, ihr therapeutisches Potential zu evaluieren.

5.2 Aufklärung der Funktion von PI16

Sezernierte Faktoren spielen eine große Rolle bei der Kommunikation zwischen den Zellen des Myokards⁷⁷. Dabei sind sie nicht nur für die normale Entwicklung und Funktion wichtig, sondern auch für das Remodeling und die potentielle Regeneration im erkrankten und geschädigten Herz¹⁷³. In Hinblick auf eine therapeutische Intervention wären sezernierte Faktoren aufgrund ihrer Lokalisation auf der Zelloberfläche bzw. im extrazellulären Raum oder ihre Rezeptoren für die Regulation des intrazellulären Signalwegs ideale Zielmoleküle. Mittels systematischer Analyse des murinen myokardialen Sekretoms identifizierten wir in einer früheren Arbeit erstmalig PI16 als sezerniertes Protein im Herzen⁸¹. Neben dem Natriuretischen Peptid A (NPPA) erwies sich PI16 als ein sehr stark hochreguliertes Protein in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen. Überexpressionsstudien in Kardiomyozyten haben gezeigt, dass PI16 hier eine hypotrophe Funktion besitzt. Um das Protein im physiologischen Kontext detaillierter charakterisieren zu können, generierten wir ein Mausmodell, in dem die endogene *Pi16* Expression variabel (global, gewebe- und/oder zeitspezifisch) ausgeschaltet werden kann.

5.2.1 Die Generierung von PI16-defizienten Tieren und ihr basaler kardialer Phänotyp

Für die erfolgreiche Deletion eines Proteins *in vivo* muss ein Sequenzabschnitt ausgewählt werden, der für die Struktur und/oder Funktion des Proteins von essentieller Bedeutung ist. Der einzige Anhaltspunkt für eine erfolgreiche Ausschaltung von PI16 bildete die konservierte CAP-Domäne, von der bisher jedoch noch keine Funktion bekannt ist⁸². Lediglich mit Hilfe bioinformatischer Untersuchungen entschieden wir uns für die Deletion von Exon 3 und 4, die laut einer putativen 3D-Struktur zwei zentrale β -Faltblätter innerhalb der CAP-Domäne kodieren und damit strukturell von Bedeutung sein könnten⁸⁶. Anhand von Western Blot Analysen konnten wir schließlich eine erfolgreiche Deletion des gesamten PI16 Proteins - und nicht nur der CAP-Domäne - nach Cre Expression mit unserer gewählten Strategie belegen und haben dieses Modell einer ersten kardialen Phänotypisierung unter basalen Bedingungen unterzogen. Über einen Zeitraum von acht Monaten konnten wir keine signifikanten Veränderungen in der kardialen Funktion beobachten. Ob das auch in älteren Stadien der Fall ist, muss weiter verfolgt werden. Von früheren Analysen wussten wir bereits, dass PI16 unter basalen Bedingungen im Herz nur sehr gering exprimiert ist; deutlich stärker ist es dagegen in der Aorta, der Haut und auch im Fettgewebe vorhanden. Erst im kranken Herz kommt es zu einer Akkumulation von PI16⁸¹. Das würde eine Erklärung bieten, warum *Pi16^{lox/lox}* Mäuse *per se* keinen auffälligen kardialen Phänotyp besitzen. Erst bei Applikation eines chronischen Stressmodells könnte PI16 daher seine kardiale Funktion entfalten. So wurde es auch für andere sezernierte Faktoren beschrieben. *Secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC, auch als Osteonectin bekannt)¹⁷⁴, *Secreted Frizzled-related protein 2* (SFRP2)¹⁷⁵ und Periostin (POSTN)¹⁷⁶ sind Beispiele für Proteine, deren stressinduzierte Akkumulation erst zu einem kardialen Effekt führt. Dies konnte in allen drei Fällen mit genetischen *loss-of-function* Modellen bewiesen werden. Während die Deletion unter normalen Bedingungen keinerlei Auswirkungen auf das Herz hatte, führte die Applikation eines Myokardinfarkts im Falle von SPARC (als Extrazellulärmatrix-Protein) zu einer defizienten Narbenheilung und erhöhter Mortalität¹⁷⁴. *Sfrp2^{-/-}* und *Postn^{-/-}* Mäuse dagegen zeigten nach Infarkt bzw. TAC-Operation einen protektiven Phänotyp mit reduzierter Fibrose und verbesserter kardialer Funktion^{175,176}. Daher ist es durchaus möglich, dass sich erst durch Stressinduktion ein kardialer Phänotyp in den *Pi16^{lox/lox}* Mäusen ausprägt.

5.2.2 Modelle zur Charakterisierung der kardialen Funktion globaler PI16-defizienter Mäuse unter chronischem Stress

Die Akkumulation von PI16 bei Herzinsuffizienz ist ein auffälliges Merkmal dieses Proteins. Zentrale Fragestellungen sind neben der Analyse der kardialen Funktion PI16-defizienter Mäuse unter chronischem Stress, ob das akkumulierende PI16 lokal im Herzen exprimiert wird oder ob es aus dem Blutkreislauf stammt. Im folgenden werden Möglichkeiten aufgezeigt, wie man hier mit verschiedenen experimentellen Modellen differenzieren könnte. Unter basalen Bedingungen konnten wir PI16 in adulten kardialen Fibroblasten lokalisieren. Auch eine unabhängige Untersuchung belegte diese Erkenntnis. In einem globalen Expressionsprofil von adulten Kardiomyozyten und nicht-Kardiomyozyten war die Detektion von PI16 in den Fibroblasten deutlich höher als in den Kardiomyozyten¹⁷⁷. Daher wäre es naheliegend, dass die Akkumulation bei chronischem Stress mit der basalen Expression in Fibroblasten im engen Zusammenhang steht; zumal der Anstieg der PI16 Abundanz in zwei Monate alten ADRB1 transgenen Mäusen einsetzt und kontinuierlich im Verlauf der Erkrankung zunimmt, was mit dem zunehmenden Grad an Fibrose in diesem Modell einhergehen könnte⁸¹. Hierbei müsste zwischen einer Hochregulation der *Pi16* Genexpression in den einzelnen Fibroblasten oder einer Zunahme der PI16 Abundanz durch Fibroblastenproliferation unterschieden werden. Mit Hilfe der Bestimmung des PI16 Proteins in frisch isolierten Zellen aus gesundem und insuffizientem Herzgewebe würde man zwischen den beiden Möglichkeiten differenzieren können. Hier müsste man allerdings auch noch Kardiomyozyten hinzunehmen, um eine Hochregulation in diesen Zellen ausschließen zu können. Die immunhistochemischen Färbungen am insuffizienten Myokard waren diesbezüglich noch nicht eindeutig. Unter Verwendung entsprechender Zellmarkerproteine (α -Aktinin für Kardiomyozyten, P4HB oder Vimentin für Fibroblasten) könnte man auch mit Fluoreszenzfärbungen an Myokardschnitten die Lokalisation von PI16 eindeutig zwischen den einzelnen Zelltypen abgrenzen. Sollte PI16 im insuffizienten Herz ausschließlich in den Fibroblasten exprimiert werden, so müsste man ein Modell wählen, das zu einer Fibroblastenaktivierung und den daraus folgenden pro-fibrotischen Mechanismen *in vivo* führt (z.B. Infusion von Angiotensin II über osmotische Minipumpen, TAC-Operation oder Myokardinfarkt). Hierbei sollte sich die Analyse jedoch nicht nur auf die Fibrose beschränken, da PI16 durchaus parakrine Effekte auf andere Zelltypen (vor allem Kardiomyozyten) haben könnte.

Außerhalb des Myokards liegt PI16 in sehr hoher Konzentration im Blutserum vor. Ähnlich wie es schon für Adiponectin¹⁷⁸ beschrieben wurde, könnte daher auch für PI16 ein endokriner Charakter in Bezug auf das Herz gelten. Adiponectin, ein ausschließlich vom

Fettgewebe sezerniertes Cytokin (Adipocytokin), konnte eine kardioprotektive Funktion zugeschrieben werden, nachdem Mäuse mit einer globalen Deletion¹⁷⁹ eine verstärkte konzentrische Hypertrophie sieben Tage nach TAC-Operation aufwiesen^{178,180}. Längerfristig (vier Wochen nach TAC) führte die Defizienz zu einer Dilatation des linken Ventrikels und reduzierter Kontraktilität¹⁸⁰. Unter normalen Bedingungen zeigte das Myokard dagegen keine signifikanten Veränderungen^{178,179,180}. Als direkter Beweis, dass es sich hier um einen endokrinen Effekt handelte, erfolgte die Rückführung von Adiponectin mittels eines Adiponectin kodierenden Adenovirus. Dieser infizierte Zellen der Leber, die Adiponectin aufgrund des Sekretionssignals in den Blutkreislauf sezernierten. Das zirkulierende Adiponectin führte schließlich zu einer verringerten Hypertrophie und Mortalität nach TAC-Operation¹⁷⁸. Für PI16 gibt es bisher keinen eindeutigen Beweis, dass das akkumulierende PI16 lokal exprimiert wird oder auch aus dem Blutkreislauf stammen könnte. Dafür würde sich ebenfalls eine Injektion des *Pi16* kodierenden Adenovirus in TAC-operierte Mäuse mit PI16 defizientem Hintergrund und eine anschließende Detektion von PI16 im Herz anbieten. Als ersten Vorversuch haben wir bereits *Pi16*^{+/+} Mäusen an drei aufeinanderfolgenden Tagen entweder einen Kontrollvirus (AdLacZ) oder einen PI16 kodierenden Adenovirus (AdPi16) injiziert, und die PI16 Abundanz eine Woche nach der Injektion analysiert. Wir erhielten tatsächlich eine ca. 2-fach erhöhte Menge an PI16 im Serum (Abb. 25). Ob das ausreichen würde, um eine Akkumulation von zirkulierendem PI16 im erkrankten Herzen von defizienten Tieren zu erreichen oder vielleicht sogar einen funktionellen Effekt zu erzielen, sollte in weiterführenden Analysen genauer untersucht werden.

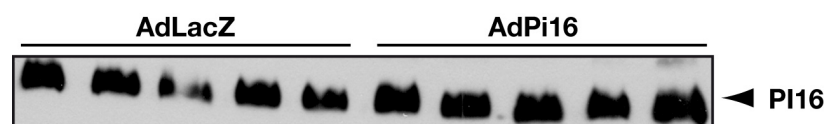


Abb. 25. Western Blot Analyse zur PI16 Abundanz nach Injektion eines PI16 kodierenden Adenovirus.

Pi16^{+/+} Mäuse (je 5 Mäuse pro Gruppe) wurden mit einem Kontroll-Adenovirus (AdLacZ) oder PI16 kodierenden Adenovirus über die Schwanzvene an drei aufeinanderfolgenden Tagen injiziert ($3 \times 2,95 \times 10^9$ ifu/ml). Eine Woche später wurde Blut abgenommen, das Serum abgetrennt und per Western Blot Analyse hinsichtlich der PI16 Abundanz untersucht. LacZ kodiert das Gen β -Galactosidase. Ad = Adenovirus.

Zur PI16 Akkumulation im chronisch gestressten Herz könnten außerdem infiltrierende T Lymphozyten aus dem Blutkreislauf beitragen. Vor kurzem wurde PI16 in einer Expressionsanalyse humaner *Forkhead box P3* (FOXP3)⁺ regulatorischer T (Treg) Zellen identifiziert und konnte in der Folge auf der Oberfläche von mehr als 80% dieser Zellen lokalisiert werden¹⁸¹. Die Autoren gingen sogar so weit, PI16 (neben CD25) als neuen

Marker für FOXP3⁺ Tregs zu suggerieren. Sollte man auf Myokardschnitten von insuffizienten Herzen PI16 mit FOXP3 als Markerprotein für Tregs¹⁸² kolokalisieren können, so wäre es sicherlich interessant, ein pro-inflammatorisches Modell bei PI16 defizienten Tieren anzuwenden (Myokardinfarkt, Ischämie-Reperfusion, Myokarditis-Modell). In einer kürzlich erschienenen Studie wurde zudem zum ersten Mal der direkte Einfluss von applizierten Tregs in Angiotensin II – infundierte Mäuse untersucht. Sie führte u.a. zu einem signifikant reduziertem Remodeling mit anti-hypertrophen und -fibrotischen Effekten sowie einer Inhibierung der Inflammation des Myokardgewebes bei kontinuierlichem Bluthochdruck¹⁸³. Damit unterstreicht sie die Einschätzung, dass Tregs wie auch andere T-Lymphozyten einen direkten Einfluss auf kardiale Fibrose haben können¹⁸⁴. Ob PI16 hierbei eine Rolle spielt, könnte man mit einem ersten analogen Versuch unter Applikation von *Pi16*^{+/+} vs. *Pi16*^{lox/lox} Tregs unter persistierender Angiotensin II – Infusion von *Pi16*^{+/+} Mäusen ausprobieren.

5.2.3 Modelle für konditionale *Pi16* Gendelektionen *in vivo*

Neben der bereits existierenden globalen PI16 Defizienz würden sich konditionelle Gendelektionen für Untersuchungen zur Herkunft des zirkulierenden PI16 oder die Funktion von PI16 in spezifischen Geweben oder Zelltypen eignen. Grundvoraussetzung hierfür ist die Existenz transgener Cre Linien, die spezifisch sind für die PI16 exprimierenden Gewebe bzw. Zelltypen. Eindeutige Erkenntnisse zur Lokalisation von PI16 haben wir bisher anhand eigener immunhistochemischer Untersuchungen von kardialen Fibroblasten, Zilien in der Epididymis und Trachea sowie dem kolloidhaltigen Lumen der Schilddrüse. Trotzdem konnten wir in keinem der Gewebe/Organe pathologische Veränderungen bei PI16 Defizienz feststellen. Hier muss man allerdings den Einwand gelten lassen, dass die restliche hypomorphe *Pi16* Expression das Ergebnis möglicherweise beeinflusst haben könnte, und sollte *Pi16*^{lox/lox} Mäuse im entsprechenden Alter – auch unter Applikation spezifischer Krankheitsmodelle - nochmals untersuchen. Spekulativ bleibt die Expression im Fettgewebe, der Adventitia (der Aorta) und der Haut. Während es sich im Fettgewebe und der Adventitia ebenfalls um Fibroblasten handeln könnte, bleibt die Lokalisation in der Haut bisher komplett offen. Alle drei Gewebe bzw. Organe müssen diesbezüglich genauer untersucht werden.

Unter anderem da kardiale Fibroblasten eine sehr heterogene Zellpopulation darstellen, stellt die Identifizierung von spezifischen Markerproteinen ein ernsthaftes Problem dar¹⁸⁵. Bisher konnte noch kein Promotor identifiziert werden, der ausschließlich in kardialen Fibroblasten aktiv ist. Die Promotoren des *Fibroblast-specific-protein 1* (FSP1)¹⁸⁶ und von

Periostin (POSTN)¹⁸⁷ wurden zwar bereits für Gendelektionen in Fibroblasten verwendet, jedoch ist die Expression beider Proteine nicht auf das Herz beschränkt^{186,188}. So wurde *Postn-Cre* in einer kardiovaskulären Studie zum *Krüppel-like factor 5* (KLF5) angewendet¹⁸⁷. Hier führte die Deletion von KLF5 in adulten Fibroblasten, und nicht in Kardiomyozyten (*Myh6-Cre*), zu einer signifikanten Reduktion von Fibrose, Hypertrophie und linksventrikulärer Wanddicke. Da die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von PI16 in transgenen Mäusen (*Myh6-Pi16^{tg/0}*) zu einem hypotrophen Effekt führte⁸¹, müsste man auch im Fall von PI16 parallel zu einer Deletion in adulten Fibroblasten die *Pi16* Expression in adulten Kardiomyozyten ausschalten und die kardiale Funktion beider Linien umfassend untersuchen.

Trotz ähnlichem Erscheinungsbild unterscheiden sich die Zilien in Epididymis und Trachea grundsätzlich in ihrem Ursprung, Aufbau und in ihrer Funktion voneinander. Die sogenannten Stereozilien in der Epididymis sind Mikrovilli und werden aus Aktinfilamenten gebildet. Sie sind nicht beweglich und dienen vor allem der Aufnahme und Abgabe von Stoffen (vor allem auch Glykoproteine), deren Transport entlang der Aktinfilamente verläuft und die zur Reifung der Spermien beitragen. Bei den Kinozilien in der Trachea handelt es sich dagegen um „echte“ Zilien, die aus Mikrotubuli gebildet werden. Dadurch sind ATP-abhängige aktive, gerichtete Bewegungen möglich, die in der Trachea dazu dienen, Fremdstoffe, Schleim etc. heraus zu befördern¹⁸⁹. Ein Indiz für eine spezifische Funktion von PI16 in der Epididymis könnte die Tatsache sein, dass bereits mehrere Mitglieder der CAP-Superfamilie hier lokalisiert werden konnten. So sind sowohl CRISP1 als auch CRISP4 im Nebenhoden vorhanden. Im Unterschied zu PI16 begrenzte sich ihre Expression jedoch nicht nur auf die Stereozilien, sondern sie konnten auch im Zytoplasma der Epithelzellen und im Lumen detektiert werden¹⁹⁰. Die globale Gendelektion von *Crisp1* führte schließlich zu einer reduzierten Fähigkeit der Spermien mit Eizellen zu fusionieren, während die Akrosomreaktion, als wichtigster Parameter der männlichen Fertilität, jedoch nicht signifikant unterschiedlich war¹⁹¹. Erst kürzlich wurde auch von einer globalen Gendelektion von *Crisp4* berichtet; hier zeigten die defizienten Spermien eine reduzierte Progesteron-induzierte Akrosomreaktion¹⁹². Um einen ersten Anhaltspunkt zu bekommen, ob die Fertilität der *Pi16^{lox/lox}* Mäuse eingeschränkt sein könnte, haben wir männliche und weibliche *Pi16^{lox/lox}* Mäuse miteinander verpaart. Bisher konnten wir jedoch keine eindeutige Erkenntnis erhalten. Während eine Verpaarung regelmäßig durchschnittlich sieben Nachkommen pro Wurf hatte, warfen drei weitere Verpaarungen nur maximal drei Mal mit durchschnittlich nur 2-3 Nachkommen pro Wurf. Hier sollte man zukünftig die n-Zahl an Verpaarungen noch weiter erhöhen, um eine genaue Aussage treffen zu können. Hinsichtlich der Interpretation

der Ergebnisse sollte man außerdem bedenken, dass CRISP1 und CRISP4 bei Defizienz von PI16 kompensatorisch wirken könnten, und sollte daher ihre Expression in der Epididymis von *Pi16^{lox/lox}* Mäusen auf eine mögliche Hochregulation überprüfen. Eine Cre-Linie für die spezifische Rekombination im Epithelgewebe von Epididymis oder Trachea wurde nur für den Nebenhoden beschrieben. Hier beschränkt sich die Aktivität des verwendeten Promotors jedoch nur auf den proximalen Abschnitt der Epididymis (*Ribonuclease, RNase A family, 10 (Rnase10) - Cre* Linie¹⁹³). Da PI16 jedoch im *Caput*, im *Corpus* und in der *Cauda epididymidis* gleichmäßig stark exprimiert ist, wäre es mit diesem Modell wahrscheinlich schwierig, eine klare Aussage zur Sekretion ins Blut oder zur lokalen Funktion zu treffen. Für die Schilddrüse wurden dagegen bereits Cre-Linien für die Follikelepithelzellen beschrieben, die sehr hilfreich für die Ausschaltung von PI16 sein könnten^{194,195}. Da PI16 in sehr großen Mengen im Lumen der Follikel vorliegt, ist es durchaus naheliegend, dass es – ähnlich den Schilddrüsenhormonen - von den Follikelepithelzellen in das Lumen sezerniert wird und von dort dann ins Blut gelangt. Eine Kreuzung der *Pi16^{lox/flox}* Mäuse mit der *Thyroid peroxidase (Tpo) - Cre*¹⁹⁴ oder *Thyroglobulin (Tg) - Cre*¹⁹⁵ Maus würde darüber Aufschluss geben. Zur *Tpo-Cre* Maus muss man allerdings einschränkend sagen, dass eine ektopische Cre Expression in der Niere beobachtet wurde¹⁹⁶.

Mit den aufgezeigten Modellen stößt man teilweise an die Grenzen der Möglichkeiten hinsichtlich konditionaler Gendelektionen von PI16. Nichtsdestotrotz würden sie in einigen Fällen sicherlich wertvolle Informationen liefern und zusammen mit der globalen Deletion und entsprechenden Krankheitsmodellen wesentlich zu einem umfassenden Verständnis der Funktion von PI16 *in vivo* beitragen.

5.2.4 Weitere Strategien zur Identifizierung der Funktion von PI16

Neben dem von mir generierten konditionalen Mausmodell gibt es eine Reihe von experimentellen Ansätzen, die zur Identifizierung der Funktion von PI16 beitragen könnten. Die Aufklärung des charakteristischen Musters im Western Blot (drei Banden) könnte hierfür einen wichtigen Ausgangspunkt bieten. Die Identität dieser Banden konnte bisher weder auf Genvarianten, alternatives Spleißen oder eine geringe Antikörperspezifität noch auf die posttranslationale Modifikation der N-Glykosylierung zurückgeführt werden⁸¹. Wie für PI16 konnte auch für das humane Homolog nach Deglykosylierung eine Veränderung in der Migration aller spezifischen Banden festgestellt werden, wobei sich das Muster nicht änderte⁸⁴. Für andere Proteine, wie z.B. dem Zymogen Corin, konnte dagegen nachgewiesen werden, dass nach Deglykosylierung nur die höchste molekulare Bande ein anderes Laufverhalten zeigt¹⁹⁷. Eine Erklärungsmöglichkeit für das Bandenmuster könnten

Interaktionspartner bzw. Proteinkomplexe bieten, die die atomare Masse von PI16 im SDS-PAGE heraufsetzen. Deren Identifizierung würde mit hoher Wahrscheinlichkeit wesentlich zur Aufklärung der Funktion von PI16 beitragen. So könnte man in weiterführenden Studien einen solchen Interaktionspartner überexprimieren oder dessen endogene Expression inhibieren und mit den phänotypischen Effekten von PI16 korrelieren. Ein potentieller Kandidat ist zunächst der in menschlichem Serum bereits identifizierte Interaktionspartner MSMB (Synonym: *Prostate secretory protein of 94 amino acids* (PSP94))⁸⁴. In der Maus wird MSMB fast ausschließlich in der Prostata exprimiert¹⁹⁸, jedoch ist unklar, ob es in anderen Geweben eine Funktion ausübt. Um zu überprüfen, ob es zwischen dem murinen PI16 und MSMB ebenfalls zu einer Protein-Protein-Interaktion kommt, könnte man beide zunächst in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin *in vitro* translatieren und anschließend mittels Autoradiographie überprüfen, ob MSMB mit PI16 co-immunopräzipitiert. Weiterführende Studien sind allerdings zunächst nicht unmittelbar möglich, da ein Antikörper gegen das murine MSMB nicht kommerziell erhältlich ist. In der Literatur wurde zwar die Generierung von zwei Antikörpern beschrieben¹⁹⁸, jedoch sind diese laut den Angaben des Gruppenleiters (Email von Dr. Jim Xuan, Lawson Health Research Institute, London, Kanada, inzwischen im Ruhestand) nicht mehr verfügbar. Erschwerend kommt hinzu, dass das humane und sein murines Homolog nur eine geringe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz besitzen¹⁹⁹, wodurch der kommerziell erhältliche Antikörper gegen das humane Protein sehr wahrscheinlich nicht für die Detektion der murinen Form geeignet sein dürfte. Somit wären Kolokalisationsstudien von MSMB und PI16 auf murinen Myokardschnitten oder Antikörper-basierte Co-Immunopräzipitationen der endogenen Proteine aus murinen Zellen oder murinem Gewebe zunächst nicht möglich bzw. würden zunächst die Herstellung eines Antikörpers gegen MSMB bedürfen.

Zur Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern könnte man die Banden einer massenspektrometrischen Untersuchung unterziehen. Dafür wäre zunächst eine Aufreinigung der längeren PI16 Proteinbanden notwendig. Um den Proteinhintergrund weitestgehend zu minimieren, könnte man versuchen sezerniertes PI16 in serum-freiem konditionierten Medium von PI16 überexprimierenden Fibroblasten massenspektrometrisch zu untersuchen. Wir konnten bereits zeigen, dass sich sezerniertes PI16 nach Überexpression in Zellkultur im konditionierten Medium als einzelne Bande (Molekulargewicht ca. 100 kDa) detektieren lässt (Abb. 3F). Alternativ könnte man PI16 auch aus Mausserum isolieren und Serum aus PI16-defizienten Tieren als Kontrolle verwenden.

Rekombinant hergestelltes PI16 wäre für Zellkulturstudien oder die Injektion in Mäuse nach Applikation von kardialen Stressmodellen sehr hilfreich. So könnte man durch dessen Zugabe zum Zellkulturmedium unterscheiden, ob zelluläre Effekte, wie z.B. der hypotrophe Effekt auf Kardiomyozyten, von intrazellulärem oder sezerniertem PI16 herrühren. Im Vergleich zur zuvor beschriebenen Verwendung eines für PI16 kodierenden Adenovirus *in vivo* wäre die Injektion eines rekombinanten PI16 Proteins aufgrund verschiedener Gesichtspunkte die bessere Strategie: 1) Die Konzentration von PI16 im Blutkreislauf wäre nicht von der Transfektionseffizienz des Virus abhängig. 2) PI16 würde unmittelbar in den Blutkreislauf gelangen. 3) Die Anwendung könnte bei protektiven Effekten von PI16 direkt als eine mögliche therapeutische Interventionsstrategie evaluiert werden. Als ersten Schritt zur Herstellung eines rekombinanten humanen PI16 Fusionsproteins klonierten wir sechs Histidinsequenzen gefolgt von der *Tobacco etch virus* (TEV) Protease Schnittstelle N-terminal vor die PI16 cDNA-Sequenz (Abb 26A). Abb. 26B zeigt die erfolgreiche Expression des PI16 Fusionsproteins mit Hilfe des Baculovirus/*Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf9*) – Zellen - Expressionssystems. Die kürzere Bandenlänge des humanen PI16 im Vergleich zur murinen Form (74 kDa) lässt sich mit einer etwas kürzeren Aminosäuresequenz erklären (463 statt 489 AS, Abb. 26B). Analog dazu könnte man denselben Ansatz für die Herstellung eines rekombinanten murinen PI16 durchführen.

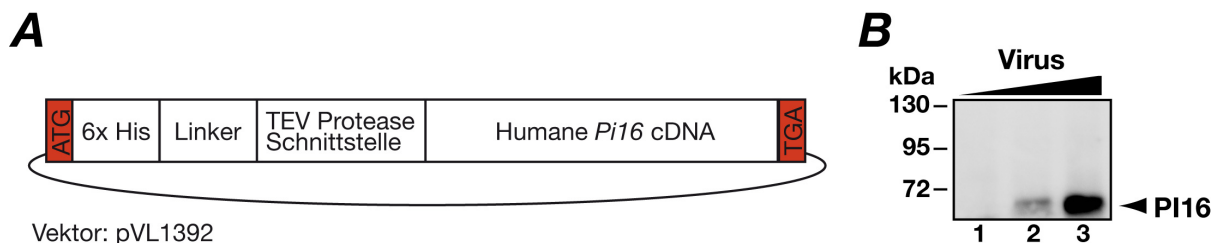


Abb. 26. Western Blot Analyse zur Expression des PI16 Fusionsproteins in *Sf9*-Zellen nach Baculovirusinfektion.

(A) Schematische Darstellung des Konstrukts zur Überexpression eines humanen PI16 Fusionsproteins. Die N-terminale Sequenz bestehend aus 6x His, Linker und TEV Protease Schnittstelle wurde nach dem Vorbild des kommerziell erwerblichen pDESTTM10 Vektors von Invitrogen (Karlsruhe, D) konstruiert. (B) *Sf9* Zellen wurden gar nicht (Spur 1) oder mit zwei verschiedenen Baculoviruskonzentrationen infiziert (Spur 2 und 3). 48 h später wurden die Zellen geerntet, lysiert und einer Western Blot Analyse mit einem humanen PI16 Antikörper unterworfen. ATG = Startkodon, 6x His = 6 Histidinsequenzen, TEV = *Tobacco etch virus*, TGA = Stoppkodon.

Zusammen mit dem von mir generierten konditionalen Mausmodell würden die aufgezeigten biochemischen Ansätze und Studien mit rekombinantem PI16 die experimentellen Ansätze zur Funktionsaufklärung von PI16 komplettieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die chronische Herzinsuffizienz stellt nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar. Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht möglich die pathophysiologischen Prozesse aufzuhalten. Es wird nach neuen Strategien gesucht, hier therapeutisch eingreifen zu können.

Kleine nicht-kodierende RNAs, sogenannte microRNAs (miRNAs), wurden als wichtige Faktoren bei verschiedenen Herzkrankheiten beschrieben. Die Mehrzahl der bisherigen Studien fokussierte sich dabei auf die am stärksten deregulierten miRNAs im erkrankten Herz. In einer automatisierten Analyse im 96 Well-Format untersuchten wir 230 miRNAs auf ihr Potential, in das Größenwachstum von primären Kardiomyozyten einzugreifen. Aus den miRNAs mit den größten Effekten selektierten wir diejenigen, die eine hohe endogene Expression aufwiesen, und unterzogen sie einem Validierungsprozess. Hier konnten wir die Effekte aller pro- (miR-22, miR-30c, miR-30d, miR-212, miR-365) und anti-hypertrophen (miR-27a, miR-27b, miR-133a) miRNAs bestätigen. Die Mehrzahl dieser miRNAs wurde hiermit erstmalig beschrieben, dass sie eine wichtige Rolle beim Größenwachstum von Kardiomyozyten spielen. Sie wären daher interessante Kandidaten für detaillierte funktionelle Studien mit dem Ziel ihr therapeutisches Potential zu evaluieren.

In einem früheren genetischen Screen zur Identifizierung von kardialen, sezernierten Faktoren wurde der Protease Inhibitor 16 (PI16) entdeckt, der sich im insuffizienten Herz durch eine starke Akkumulation auszeichnet. Gegenstand des zweiten Teils dieser Arbeit war es, eine Mauslinie zu generieren, in der PI16 global oder konditionell mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems ausgeschaltet werden kann. Nach Elektroporation des *Pi16^{floxneo}* Targeting Vektors in embryonale Stammzellen und Blastozysteninjektion erhielten wir eine Mauslinie, die Träger der zielgerichteten Modifikation des *Pi16* Allels war. Mit der globalen genetischen Deletion des LoxP-flankierten Abschnitts von Exon 3 bis 4 konnten wir die Expression des *Pi16* Gens komplett unterbinden. Die PI16 Defizienz führte weder im Herz noch in anderen Organen *per se* zu pathologischen Veränderungen. Zudem war unbekannt, dass PI16 in der gesunden Maus in der kardialen Fibroblastenfraktion enthalten sowie in den Zilien der Epididymis und der Trachea und im Lumen der Schilddrüse lokalisiert ist. Im insuffizienten Herz bestätigten wir eine Akkumulation von PI16, die sich vor allem auf die fibrotischen Bereiche beschränkte. Das lässt Grund zur Annahme, dass die kardiale Funktion von PI16 erst dann offensichtlich wird, wenn man die defizienten Mäuse zukünftig entsprechenden Stressmodellen aussetzt. Das wird zu einem umfassenden Verständnis der kardialen Funktion von PI16 und dessen Potential als therapeutisches Zielmolekül führen.

7 SUMMARY

Chronic heart failure is one of the main causes of death worldwide. Although the pathophysiological processes have been intensely studied within the past they are still detrimental. New therapeutic interventions have to be identified to interfere with these processes.

Small non-coding RNAs, so-called microRNAs (miRNAs), have been described to be important factors in several cardiac diseases. The majority of these studies focussed on miRNAs that are deregulated under disease conditions. In an unbiased screening approach we investigated 230 miRNAs for their potential to either promote or inhibit hypertrophy of primary cardiomyocytes. Using an automated system and a 96 well format we identified several miRNAs with strong effects on hypertrophic growth. From these we selected five pro- (miR-22, miR-30c, miR-30d, miR-212, miR-365) and three anti-hypertrophic (miR-27a, miR-27b, miR-133a) miRNAs for validation experiments, all of which displayed strong expression. All of these selected miRNAs could be confirmed in independent validation experiments with the majority not yet been described to be involved in cardiomyocyte hypertrophy. Detailed analysis of these candidate miRNAs will provide insights into the understanding of cardiac hypertrophy and their therapeutic potential for treatment of cardiac disease.

In a previous study that used a genetic yeast screen to identify cardiac secreted factors we had identified Protease Inhibitor 16 (PI16) that is strongly accumulating in failing myocardium. In the second part of this work we generated a mouse line where PI16 expression can be deleted globally or conditionally using the Cre/LoxP recombination system. After electroporation of the *Pi16^{floxneo}* targeting vector in embryonic stem cells and successful injection into murine blastocysts we gained a mouse line that carried the targeted modification of the *Pi16* allele. Upon global deletion of the floxed region from Exon 3 to 4 we could completely delete PI16 expression. PI16 deficiency *per se* led to a phenotype neither in the heart nor in other organs of these mice. Furthermore it was unknown that PI16 localizes to cardiac fibroblasts, the cilia of the epididymis and trachea as well as to the lumen of the thyroid gland in healthy tissue. In the failing heart we could confirm accumulation of PI16 preferentially in fibrotic areas. Therefore we assume that PI16's function could only become obvious as soon as one applies respective cardiac stress models. Applying such models will contribute to a broader understanding of the function of PI16 and its potential as a therapeutic target molecule.

8 ANHANG

8.1 Tabellarische Ergebnisse der HCS-Analyse *

miRNA (Annotation miRBase 8.0)	miRNA (Annotation miRBase 16.0)	CM cell size (x fold)
let-7a		1.17
let-7b		1.17
let-7c		1.22
let-7d		1.07
let-7e		1.17
let-7f		1.06
let-7i		1.01
miR-1		0.89
miR-100		1.10
miR-101	miR-101a	0.89
miR-103		1.14
miR-106b		0.95
miR-107		1.22
miR-10a	miR-10a-5p	1.02
miR-122a	miR-122	0.77
miR-124a	miR-124	0.88
miR-125a		1.17
miR-125b	miR-125b-5p	1.23
miR-126		0.79
miR-126*		1.20
miR-127		0.71
miR-128a	miR-128	0.85
miR-129		1.04
miR-130a		1.08
miR-130b		1.04
miR-132		1.00
miR-133a		0.81
miR-133b		0.76
miR-134		1.18
miR-135a		1.13
miR-135b		1.15
miR-136		1.16
miR-137		0.90
miR-138		1.23
miR-139	miR-139-5p	1.22
miR-140		1.55
miR-141		1.17
miR-142		1.00
miR-142-5p		1.03
miR-143		1.17

* Dieser Anhang wurde in Jentzsch *et al.* im *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2011 veröffentlicht ⁶⁴.

miR-144		0.79
miR-145		1.09
miR-146a		1.05
miR-146b		1.08
miR-148b	miR-148b-3p	0.95
miR-150		1.02
miR-151	miR-151*	0.91
miR-152		0.82
miR-153		0.78
miR-154		0.68
miR-154*		1.11
miR-15b		0.92
miR-16		1.16
miR-17-3p		1.06
miR-17-5p		0.91
miR-181a		0.97
miR-181a*	miR-181a-1*	0.92
miR-181b		1.08
miR-181c		0.93
miR-181d		0.93
miR-182		1.08
miR-183		0.80
miR-184		1.21
miR-185		1.15
miR-186		1.28
miR-187		0.97
miR-188		1.06
miR-189	miR-24*	1.08
miR-18a		1.09
miR-18a*		1.05
miR-190		1.09
miR-191		1.05
miR-192		1.17
miR-193a		1.30
miR-194		0.93
miR-195		0.97
miR-196a		1.37
miR-196b		1.18
miR-199a	miR-199a-5p	1.03
miR-19a		1.60
miR-19b		1.53
miR-200a		1.07
miR-200a*		1.10
miR-200b		1.03
miR-200c		1.09
miR-202	miR-202*	1.14
miR-202*	miR-202	1.14
miR-203		1.41

miR-204		1.33
miR-205		1.57
miR-206		1.08
miR-208		1.07
miR-20a		1.03
miR-20b	miR-20b-5p	1.13
miR-21		1.08
miR-210		1.87
miR-211		1.26
miR-212		2.04
miR-214		0.96
miR-215		1.40
miR-216		1.88
miR-217		1.51
miR-218		1.78
miR-219	miR-219-5p	1.00
miR-22		1.71
miR-221		1.20
miR-222		0.98
miR-223		1.21
miR-224		1.32
miR-23a		1.32
miR-23b		1.40
miR-24		1.33
miR-25		1.14
miR-26a		0.98
miR-26b		1.02
miR-27a		0.81
miR-27b		0.80
miR-28		0.98
miR-296	miR-296*	1.04
miR-297		1.29
miR-299-3p	miR-299*	1.06
miR-299-5p		1.08
miR-29a		1.26
miR-29b		1.34
miR-29c		1.55
miR-301	miR-301a	0.82
miR-30a-3p	miR-30a*	1.03
miR-30a-5p	miR-30a	1.43
miR-30b	miR-30b-5p	1.31
miR-30c		1.59
miR-30d		1.64
miR-30e-3p	miR-30e*	1.18
miR-30e-5p		1.63
miR-31		1.43
miR-32		1.26
miR-320		1.09

miR-323		1.30
miR-324-3p		0.83
miR-324-5p		1.31
miR-326		0.95
miR-328	miR-328a	0.73
miR-329		1.30
miR-33		0.85
miR-330	miR-330*	1.52
miR-331		1.28
miR-335		1.11
miR-338		1.00
miR-339	miR-339-5p	1.00
miR-340	miR-340-3p	1.47
miR-342	miR-342-3p	0.99
miR-346		1.21
miR-34a		1.56
miR-34b		0.91
miR-34c		1.45
miR-361		0.81
miR-362		1.30
miR-363		1.60
miR-363-5p	miR-363*	1.45
miR-365		2.13
miR-369-3p		1.23
miR-369-5p		0.94
miR-370		0.89
miR-375		1.06
miR-376a*		1.03
miR-378	miR-378*	0.90
miR-379		0.98
miR-380-5p		0.75
miR-381		0.95
miR-382		1.73
miR-384	miR-384-3p	1.23
miR-409-5p		0.67
miR-410		0.99
miR-411		1.53
miR-412		1.15
miR-421	miR-421*	1.58
miR-422b	miR-378	1.16
miR-423		0.95
miR-424	miR-322	1.04
miR-425-3p	miR-425*	0.87
miR-425-5p	miR-425	1.34
miR-429		1.66
miR-431		1.34
miR-433		1.36
miR-448		1.03

miR-449	miR-449a	1.43
miR-450	miR-450a	1.42
miR-451		0.77
miR-455		1.16
miR-483		1.03
miR-484		1.01
miR-485-5p		0.94
miR-487b		1.04
miR-488	miR-488*	0.87
miR-490		1.03
miR-493-3p		1.05
miR-493-5p	miR-493*	1.25
miR-494		1.35
miR-495		1.01
miR-497		1.00
miR-499		0.93
miR-500		2.03
miR-501		1.33
miR-503		0.94
miR-504		1.48
miR-505		2.21
miR-532		1.23
miR-539		1.41
miR-542-3p		1.18
miR-542-5p		1.40
miR-544		1.97
miR-551b		1.38
miR-568		1.48
miR-582		0.94
miR-592		1.01
miR-598	miR-598-3p	1.03
miR-652		0.88
miR-668		1.42
miR-675		1.11
miR-7	miR-7a	1.06
miR-758		0.89
miR-802		0.95
miR-9a	miR-9	1.03
miR-9*		1.31
miR-92		1.10
miR-92b		1.29
miR-93		0.88
miR-96		0.68
miR-98		0.88
miR-99a		0.93
miR-99b		0.94

8.2 DNA-Sequenz des *Pi16^{floxneo}* Targeting Vektors

1	GTCGAGATGA	GGGGTGGGTC	CACGTGCACC	TTGGGCGGAG	CCTGGCTGGG	CCCTTCTGGT
61	GTTGGGTGGA	GCCACCTGGT	CCCTGGGCGG	GGCCGGAGGG	CTCTCCAGAT	GGGTGGAGTC
121	ACGTGCTGGG	CCAGGTGGAA	TGTTTGTGAC	CTCTTGGCTC	CACTCAGAGC	AGCCTCGCTT
181	TAAACCGGTC	CTCTCCCTTA	CAGTATCCCT	TAATAATCTA	CACAGCAGTT	AGCGCGCAGT
241	CAGCGGCCAT	AAACTGTCTG	TTCATCTTC	TCAAAAAGGC	ACATCTTTTG	AAAACCCAGG
301	TCACCCATTT	TATCCAGCTG	AGAACGCAGG	TGTCACAGCG	CCTATATACC	GAATGCAAAG
361	ATTGTCTGG	GTGACCGAGG	ACTCTGAGTG	GTGCAAAGCT	TTGCCTCAG	CCGCAGAGGC
421	CTCTCCCGC	TCACCTCGCC	TTTCTACCA	GTGTCGCTCT	TGGCACTTCC	CTTTGTAATT
481	TGCTGTTTCT	AATCTGCCAA	ATTGATGACG	CAAATAGACA	AATTTAATTC	ATTTTTGCAT
541	TAGAAAAAAA	ATAAACTGTG	TTTCAGACGG	CGGGCCTCAG	CCAGGCTTGG	TGGCCAGGC
601	CTTTAATCCC	AATTTGGGAG	GCAGAGGTAG	GCCAGCCTGG	TCTACAAAGT	GAGTTCAGAA
661	ACAGCCAGGG	CTACAGAGAA	ACCCTGTCTC	GAAAAGAAAA	AAGAAAACAA	CAACAACAAA
721	AAACCAAGAA	GGCAGGCCAG	ATGGCCCAGT	GGGTAAAGGC	AAACGCCACC	AAGCCTGACA
781	GAGTAGGATC	CCCTCGACCC	CAATTAATAA	AAAAATGTTT	TGCCGGGCAG	TGGTGGCACA
841	CGCCTTAAT	CCCAACACTT	GGGAGGCAGA	GGCAGGCAGA	TTTCTGAGTT	CAAGGCCAGC
901	CTGGTCTACA	GAGTGAGTTC	CAGGACAGCC	AGGGCTACAC	AGAGAAACCC	TATCTTGAAA
961	AACCAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	GTTTCTAAAA	ACACTGTGTA	GGCAGAAAGC
1021	CTACTTTCTC	ACTGGAGAAA	GGTTTCTGGA	ACCTTCTGAC	AGTGTTTCTG	GCCTCTCTTA
1081	GATAACCTTG	GCTTACCACT	CAGTTCGGGA	TGCTTCTGCA	AAGTTCAGTC	TTGGGGAGTG
1141	ACGCTAGCCT	TAGTTTTAAA	GGGACTGTTT	TCTCTTCCCA	ATGCTGATTG	TACAACCGAT
1201	TACACCAGAA	ACCAAAAGGG	GGGGGGGGGA	ATCAACAGTC	CCCTCCCATT	TCCAGTGCCT
1261	TTTTGAGCTG	GTATTTTTAG	CCCTAATCTT	AAGGAAATAC	AATCACCCAC	CCAAGCTGGG
1321	AAGTTGAAGG	TCCAGCACC	CTCCCTGCCG	GGACATCCCA	GCCCACCCTC	ACCCAAGATA
1381	CTGGTGAAGG	ACCAAGATAT	CTGACTTGGT	GACCAGCTGA	CTGACCAAGA	TATCTGTGGC
1441	TCCTTCTAA	GCTGGGAGCC	ATTTCTATCC	CAAACCTACC	TGCTCAAACA	GGAATCCAAG
1501	GAGCCATAGC	TATTGCGAGC	AGGACTCCCT	GACAACCTGA	GCTAGAAATT	CAGGAAGACA
1561	TGGCATCTGC	ACCCTGAGAT	CTGCCTGCTT	CTGCCCGGAG	TGCTGAGATT	AACAGAGTTG
1621	GTTTTTTGAA	TTTAGGAAGA	AATTATTCTA	GCAGCCAGGC	TGATCCCCAA	AAGAGGCAGA
1681	ACAAAGTTA	GCTAAATTGT	TAGTTGGAAT	GGGGAACCTT	TCAAATAAC	TCCTCCTTGG
1741	ATTTTCTTG	TGGCTGAATG	AAGATCTCCA	CTATCTCTGA	TCCTTTGCAT	AGGCCCCCTG
1801	TTTAAACCT	TGTTTGGGTG	CTGGAGAGAT	GGCTCAGTGA	TTAAGAGCAT	TGACTGCTTT
1861	TCCAGAGGCC	CTGAGTTCAA	TTCCAGCAA	CTACATGGTG	GCTTACAACC	ATTTGTATTG
1921	GGATCCAATG	CCCTCTTCTG	GTGTGTCTGA	AGACAGCTAC	AGTGTACTCA	TATACATGAA
1981	AAAATCCTTT	TGTTGTTGGT	AGTGGTAGTG	ATGATTTTGA	ATGATTGGTT	GTTGGGAATT
2041	GAACCTCAGG	CACCTGGAAG	AACAGTCAGT	GCTCTCAACT	GCTGAGCCAT	CTCTCCAGCC
2101	CCGAATAAAT	AATCTTTTAA	AAACAACAAC	AACAAAACCT	GTTTAAAGGG	ATCAAGCTGG
2161	TCGGAGGTGG	CACACACCTC	TAATCCCAGC	ACTTGGGAGG	CAGAGGCGAG	CGGATTCTGA
2221	GTTTGAGGCC	AGCCTGGTCT	ACAGAGTGAG	TTCCAGGATA	GTCAGGACTA	TACAGAGAAA
2281	CCCTGTCTCG	AAAAACCAA	ACCGTTTGGA	GCTGAGACAA	AAGGATGGAC	CATCTAGAGA
2341	CTGCCATATC	CAGGGATCCA	TCCATAATT	AGCCTCCAAA	CGATGACACC	ATTGCATACA
2401	CTAGCAAGTG	TTTGCTGAAA	GGACCCTGAT	ATAGCTGTCT	CTTGTGAGAC	TAGGCCGGGG
2461	CCTAGCAAAC	ACATAAGTGG	ATGCTCACAG	TCAGCTATTG	GATGGATCAC	AGGGCCCCTG
2521	ATGGAGAAGC	TAGAGAAAGT	ATCCAAGGAG	CTAAAGAGAT	CTGCAACCCT	ATAGGTGGAA
2581	CAACATTATG	AACTAACCAG	TACCCAGAG	CTTTTACTC	TAGCTGCATA	TGTATCAAAA
2641	GATGGCCTAG	TCGGCCATCA	CTGAAAAGAG	AGGCCATTG	GACACGCAAA	CTTTATATGC

2701	CCCAGTACAG	GGGAACGCCA	GGGCCAAAAA	GTGGGAATGG	GTGGGTAGGG	GAGTGGGGGG
2761	GGGAGGATTT	GGGGGACTTT	TGGGATAGCA	TTGGAAATGT	AATTGAGGAA	AATACGTAAT
2821	AAAAAAAATA	TGTACTTTTG	AAATTTAAAT	AAATAAATAA	ATAAATAAAT	AAATAAATAA
2881	AATAAAGTTG	CAAACCTAAA	AAGAAAAAAG	AAAAACCAAA	ACCAAACAAA	ACCAACCAAC
2941	CGAATAACCA	AAAAACCCTA	AATATCTCTA	GAAAGAGGTC	ACAGGAGAGT	GGCCAGGGAA
3001	TTCGATATCA	AGCTTATCGC	GGGCCCCCCC	TCGA ATAACT	TGGTATAATG	TATGCTATAC
3061	GAAGTTATTC	GAGGTCGATC	GAC GAAGTTC	CTATACTTTC	TAGAGAATAG	GAACCTCCTC
3121	GACGGTATCG	CGATAAGCTT	CTGATGGAAT	TAGAACTTGG	CAAAACAATA	CTGAGAATGA
3181	AGTGTATGTG	GAACAGAGGC	TGCTGATCTC	GTTCTTCAGG	CTATGAAACT	GACACATTTG
3241	GAAACCACAG	TACTTAGAAC	CACAAAGTGG	GAATCAAGAG	AAAAACAATG	ATCCCACGAG
3301	AGATCTATAG	ATCTATAGAT	CATGAGTGGG	AGGAATGAGC	TGGCCCTTAA	TTTGGTTTTG
3361	CTTGTTTAAA	TTATGATATC	CAACTATGAA	ACATTATCAT	AAAGCAATAG	TAAAGAGCCT
3421	TCAGTAAAGA	GCAGGCATTT	ATCTAATCCC	ACCCACCCC	CACCCCGTA	GCTCCAATCC
3481	TTCATTCAA	AATGTAGGTA	CTCTGTTCTC	ACCCTTCTTA	ACAAAGTATG	ACAGGAAAAA
3541	CTTCCATTTT	AGTGGACATC	TTTATTGTTT	AATAGATCAT	CAATTTCTGC	AGACTTACAG
3601	CGGATCCCCT	CAGAAGAACT	CGTCAAGAAG	GCGATAGAAG	GCGATGCGCT	GCGAATCGGG
3661	AGCGGCGATA	CCGTAAGCA	CGAGGAAGCG	GTCAGCCCAT	TCGCCGCCAA	GCTCTTCAGC
3721	AATATCACGG	GTAGCCAACG	CTATGTCCTG	ATAGCGGTCC	GCCACACCCA	GCCGGCCACA
3781	GTCGATGAAT	CCAGAAAAGC	GGCCATTTTC	CACCATGATA	TTCGGCAAGC	AGGCATCGCC
3841	ATGGGTCACG	ACGAGATCAT	CGCCGTCGGG	CATGCGCGCC	TTGAGCCTGG	CGAACAGTTC
3901	GGCTGGCGCG	AGCCCCTGAT	GCTCTTCGTC	CAGATCATCC	TGATCGACAA	GACCGGCTTC
3961	CATCCGAGTA	CGTGCTCGCT	CGATGCGATG	TTTCGCTTGG	TGGTCGAATG	GGCAGGTAGC
4021	CGGATCAAGC	GTATGCAGCC	GCCGCATTGC	ATCAGCCATG	ATGGATACTT	TCTCGGCAGG
4081	AGCAAGGTGA	GAGACAGGAG	ATCCTGCCCC	GGCACTTCGC	CCAATAGCAG	CCAGTCCCTT
4141	CCCGCTCAG	TGACAACGTC	GAGCACAGCT	GCGCAAGGAA	CGCCCGTCGT	GGCCAGCCAC
4201	GATAGCCGCG	CTGCCTCGTC	CTGCAGTTCA	TTCAGGGCAC	CGGACAGGTC	GGTCTTGACA
4261	AAAAGAACCG	GGCGCCCCTG	CGCTGACAGC	CGGAACACGG	CGGCATCAGA	GCAGCCGATT
4321	GTCTGTTGTG	CCCAGTCATA	GCCGAATAGC	CTCTCCACCC	AAGCGGCCGG	AGAACCTGCG
4381	TGCAATCCAT	CTTGTTCAAT	GGCCGATCCC	ATATTGGCTG	CAGGTCGAAA	GGCCCGGAGA
4441	TGAGGAAGAG	GAGAACAGCG	CGGCAGACGT	GCGCTTTTGA	AGCGTGCAGA	ATGCCGGGCC
4501	TCCGGAGGAC	CTTCGGGCGC	CCGCCCCGCC	CCTGAGCCCG	CCCCTGAGCC	CGCCCCCGGA
4561	CCCACCCCTT	CCCAGCCTCT	GAGCCAGAA	AGCGAAGGAG	CAAAGCTGCT	ATTGGCCGCT
4621	GCCCAAAGG	CCTACCCGCT	TCCATTGCTC	AGCGGTGCTG	TCCATCTGCA	CGAGACTAGT
4681	GAGACGTGCT	ACTTCCATTT	GTCACGTCTT	GCACGACGCG	AGCTGCGGGG	CGGGGGGGAA
4741	CTTCTGACT	AGGGGAGGAG	TAGAAGGTGG	CGCGAAGGGG	CCACCAAAGA	ACGGAGCCGG
4801	TTGGCGCCTA	CCGGTGGATG	TGGAATGTGT	GCGAGGCCAG	AGGCCACTTG	TGTAGCGCCA
4861	AGTGCCAGC	GGGGCTGCTA	AAGCGCATGC	TCCAGACTGC	CTTGGGAAAA	GCGCCTCCCC
4921	TACCCGGTAG	AATTGGCCGC	GAAGTTCCTA	TACTTTCTAG	AGAATAGGAA	CTTCGGCCGC
4981	CACCGCGGTG	GCGATACCGT	CGACAAGAGG	TCACAGGAGA	GTGGCCAGGG	TATATCTGAG
5041	GCTTGAGGCT	GAGGGAAGAC	TCAAATAAGC	CTGGTGAGTT	CTCTATTTGG	CAGAGAGGGT
5101	AGACACTGTT	GTCATCTGCC	TCTAACCCCC	AGCAGTTTTG	GCCTGCCGCT	ATAGGATCCC
5161	GCGGGGACAG	ACAATGTTAC	ACAGCCCGGG	GCTAACCTGC	TAGGTTTTCC	CTCATTAGG
5221	TAGTGTGGAG	CAAGACTGAG	AGAATTGGCT	GTGGCTCCCA	CTTCTGCGAG	ACGCTCCAGG
5281	GAGTGAAGA	AGCTAACATC	CATTTGCTGG	TGTGCAACTA	TGAGCCTCCG	TAAGTGCTGA
5341	GCGGCCAGAG	GCGTAGGGCA	GGATGGAAC	GGGCACAGCT	CAATGAAGCT	GTGGGCTGCT
5401	GATGTGGGCC	CTGTCCCTTC	TGGCAGCTGT	GATGGACCCA	GAAGGGGCC	AATTTGTTA
5461	GCCTGAGAAG	GGGAGGGAGA	AAGCCCGTGA	TCCCCGGGAA	GCAACTTGTG	GGGACAGCA

5521	TCCCCGTGGG	CTCCTGTGGA	CGGACCTGCC	GTGCGTCTGG	GGAAGGTGAG	AATCGGTAGG
5581	AAGGCCCGGG	CCTTCCTGTC	AGCAATGCCT	TCTCATTTAG	GGGGAACGTG	AAGGGCCGTA
5641	AGCCCTACCA	GGAGGGGACT	CCTTGCTCCC	AGTGCCCTCT	TGGCTACAGC	TGTGAGAACT
5701	CTCTCTGTGG	TGAGTAGCAG	GCGAGAGCTG	AGATGGGGTG	GGGTCTCCCC	CACCCACCC
5761	CGGGCCTGGG	TGATTTAGCA	TCTCAGGACT	CTCGCCCTGA	GAAGCAGGAG	AGGGGCCTAC
5821	GGGATGTGAT	GGTGGACACC	CTCTGTGACT	TTCTGCCTTC	CTTGCACAGC	CGCCTTGGCG
5881	ACTCGTTAAC	TCCAAGTGAC	AGATTCCATC	CTTAAGTCCC	TACAGAGAGT	TGAAGCTTTT
5941	GGGCTGCAGG	AATTCGATAA	CTGCAGATAT	AAC TTCGTAT	AATGTATGCT	ATACGAAGTT
6001	A7TAGAATTC	GGGATCAAGC	TAGCTTATCG	ATACCGTCGA	CCTCGACCTG	CAGGCATGCA
6061	AGCTTCAGCT	GCTCGACCTG	CAGGCATGCA	AGCTTCAGCT	GCTCGAGGGA	GGCGCTGGAG
6121	TGCCGTGCGA	AGGGCCCGTG	GCCGGGCGGG	AAGGTCCCGG	TGGTGGGCGA	ATGGGCGGGG
6181	CCTGCTAGGC	AGTCTCTAA	GCGGAGTTTG	GGCATGGCGG	TGGGTGGAGG	AGTTAGTCTT
6241	GTCAATGACA	AGAAGTTACA	TTACCAGAGG	GACACACCCG	CTGCAGAGGA	GTATGGCTCG
6301	CGCATCCGGG	TGGGATATCG	TGCGGCCGGG	TGGGGTCCGC	TAATGCTTGG	CCTTGCCAAA
6361	CAGAGCCCAT	GAGAAACCCG	GAAAAGGCGC	AGGATTCCGC	TCCAAGGGTG	ACCGAGGTCC
6421	CTTCCACCCG	CGCAACTGAA	GCCCCAAGCT	CCAGGGAAAC	CGGTACTCCA	TCCCTAGCAA
6481	CCTCTGAGAC	TCTACATTTT	TCGGTAACAA	AGGTCTCGGA	CTCCCTGGCA	ACCGAGTCTT
6541	CACCTGCAGT	AGAAACAAAG	GCACCATCTT	CCTTAGCAAC	CGAAGGCCCC	TCCTCCATGG
6601	CAACAGAGGC	TCAGGCTTTT	GTAAGTGGAG	TCCCTTGGT	TTCTGCAAGG	CACATGCAGC
6661	CCTCGGTGGA	TGAAGGGCCA	GTTAACTTCC	TCACATCAAC	ACATATCCCT	GTCCCAAAT
6721	CTATGGACGA	AGAAGCCAGC	AAGTCGAGCG	CAACCTCCGT	GAGCCCAAAG	AAATCGCTGT
6781	ACCCAAGAT	GTCCCTGACA	GAGTCAGGAG	AGTCCGTACC	CCAAATCCAG	GAGGAGGCTG
6841	AACCCAAGGA	CGAGTTGTCT	GAGCCCAGAG	CCATATTGCC	CGAGGCAGAG	GCCGCACCGA
6901	CTGAGGCAGA	GGTCGAGTTG	CGGGAACCCG	AGGCTGAGTC	TCCAAGGCC	GAGTCGCCAG
6961	AGGCAGAGGC	TGAGTCGCCT	CTTCCAGTG	AGGCTTTGGT	CCCAGTTCTT	CCAGCCCAGG
7021	AGCGTGGTGG	GCAGAAGGCC	TCACTGGAAC	ACTCTGGCCA	CCCTGCCTCC	CCATCCCTGC
7081	CCACCTTCCC	TAGTGCTTCG	GGTAATGCCA	CAGGTGGGCG	CACCCTGGCC	CTACAATCAT
7141	CCTGGACAGG	TAAGGCCCAA	AGTCCGCATT	TTCCTTCTG	GCTCCAGAAT	GCTGGTACCC
7201	TGTGCTGGCA	CCTGGAACCA	GTGGTTGGGG	CATGGTAAAG	CATGCGCCGT	CTGGAAAATG
7261	CTTCTCCTT	GGCTGCCGCC	CGCACCTTGC	ATGGAGTGAG	TGGAGAGTCT	GGGCTGTTTT
7321	CAAGCTGAAG	TACAGCCCCC	TTCCTTCTG	CAGGTGCTGA	GAACCCCGAA	AAGGCCGACT
7381	GGGATTTGAA	GAATTCTGCT	CACGTGTGGG	GACCTTCTCT	GGGACTGCTG	CTGCCTTCCC
7441	TGCTGCTGTT	GGCTGGCATG	GTCTGAGGGG	GACACCCAAA	GGCCTGGTGA	GGAGACTGGC
7501	CTCATGCCCA	TTCTGGAATC	TCTTCCAAAG	CCAGAGCTTC	TGGAGCAGGT	CATGCTCCCC
7561	CGGCCACCCG	TGCCCTCCCC	TCTCCTCTCT	GCCACCCAGT	GCCAGCCCGA	AACGCTAAAC
7621	GCGCCTCCCC	CAGCGCTTCT	TCCTTCACGA	GGGTGGTGAT	GTACCTGTTG	TTCTGAGCTG
7681	TGTTCTACTG	GCCACATGTA	CCTAGTTTCT	TAAGGACAGA	GGATCTTAGC	CTCCTCAGGA
7741	ACTTGGCTCT	TCTAGTCCCC	TGAGCGCTTT	CTTCTTTCT	TTTTTTTTCG	TTTCTGTTTT
7801	TTTCTTTTCT	TTTTTGTTTT	TTTGAGACAG	GGTTCCCTG	TGTAGCCCTG	GCTGTCCTGG
7861	AACTCACTTT	GTAGACCAGG	CTGACCTCGA	ACTCAGAAAT	CTGCCTGCCT	CTGCCTCCTG
7921	AGTGCTGGGA	GCATGTGCGC	CACCACGCC	GGCTTCCCTG	AGCTCTTCT	TGAGCCATCT
7981	GAGTGAGGCA	AGGAATATCT	GAAGTGCCCTG	CTGCCTTCCC	AGGGAGAAGA	GGTCAGCTGA
8041	TCAACTGCTG	TGTCCTATCC	TATCGCTCAA	ACAAGATACC	ACCGCCTGTC	CAAAGCCCGT
8101	CTGGAAGGGA	AAGGCTGTGT	GGTCCAGCCC	ATCAGTAACT	GCACACCAGG	GCCCTCCCTT
8161	GCCCTTACA	GTGGAGTTCT	ACAGAGGACA	TGATTCTGGG	GATACTTGTC	TGCTTCCCAG
8221	GGGATGGAGG	GGTGGGGTGG	GGGAGGGGCT	GTCTGCCTGC	AGGCTCTAGG	GCTCCCCATC
8281	TCTGAGTGCC	CATGTAGCTT	GGACAGCAGA	CCCTGAGGGC	AGGTGAAGAA	CAAGCCCCAA

8341	CGAAGTGGGG	TTCTGTGGGT	GGGGAGACAG	GGAATGGAGG	CAGCCTTGAC	TCCTGAATAA
8401	AGCCTGTCTG	AGAGCCTGTC	TCAGTGCTTT	GCATGAGGTA	GGGTGGGTGT	TGTGAGAAAG
8461	CTGGTCTGCC	CACCCATGCA	ACTCTTCTGT	CTTCTTTCTT	CCTCTTTCCC	CACTACCCTC
8521	CAACTCTCTG	AGCCATCCCA	TTCCTTCTGG	TAACTTCCAC	TCCACCCAAG	CCAAGCCACA
8581	GGTTGCCTTG	CAGGAAGAAG	AGCAGAAGGA	AGGACCAAAA	GTTATCAGTG	GGGTTTACCC
8641	CTATGGCTTT	GGGGATTGAG	ACATTTTCCA	CAAGGGGACT	GATGCTCAGG	CCTGTCCTGG
8701	TCACAAGTTT	CAACTTGGCA	AGGTTTTGGG	CAACTTAGGT	GCTTTGAAGG	AGCCCTGAGA
8761	CAGAGCTCCG	AGGCCAGAA	ACCTCTCTGG	GGATCAGAAT	GGAGTGGTCC	AGAAGTTCTG
8821	TGTGGTCAGG	AACACAAGGG	ACAGGAAGTA	AGAGGGGCTA	GGAAGGAGTC	TTGGCCAGGC
8881	TAGTACAGCA	TGGCTACTTC	TCTCAATAAA	GACCCAGAAG	TCACCCATTG	ATCTATGTGT
8941	CTGGGGCCAA	TGTGACAGCT	CATGGGTAAA	AGCACACAGC	CCTCCATCCT	CCATTCATGT
9001	GTAACAGTAC	ACAAGTACCG	TGTTCCCATC	ATCTTTATTT	GAGTGTATTT	GTTGTTGTTG
9061	TTGTTTTTTT	TTGTTTTGTT	TTGTTTTTTT	CTGAGATCAG	GTCTCTGTGT	AGCTCTGGCT
9121	GTCCTGGAAT	GCTATCTGTA	GACCAGGCTA	GCCTCGAACT	CAGAGATCCA	CCACACCTGG
9181	CTGGAATAAA	CCTGAAGCCT	ACAACCTCAGA	GTTCTGGCTC	GAG	

Legende:

GAG

5'- bzw. 3'-flankierender Arm

GAG

Neomycin-Resistenzkassette

GAG

Exon 3/4 (separiert durch Intron)

GAG

MCS-Sequenzen aus Subvektoren

ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT

LoxP-Sequenz

GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTC

FRT-Sequenz

8.3 Liste der 24 untersuchten Organe in *Pi16^{+/+}* vs. *Pi16^{floxneo/floxneo}* Mäusen

Die tabellarische Auflistung der Organ- und Gewebemorphologie wurde in enger Zusammenarbeit von der Pathologie des Helmholtz Zentrums (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, München, D) erstellt.

Organ	Veränderung	Organ	Veränderung
Niere	Infiltrat im Becken und perivaskulär in einer <i>Pi16^{+/+}</i> - und einer <i>Pi16^{floxneo/floxneo}</i> - Maus	Bauchspeicheldrüse	Keine Veränderungen
Milz	Reaktive Hyperplasie in einer <i>Pi16^{floxneo/floxneo}</i> - Maus	Halslymphknoten	Keine Veränderungen
Leber	Inflammatorisches Infiltrat in einer <i>Pi16^{+/+}</i> - und einer <i>Pi16^{floxneo/floxneo}</i> - Maus	Thymus	Keine Veränderungen
Lunge	Lokale Lungenaufblähung in einer <i>Pi16^{floxneo/floxneo}</i> - Maus Hyperplasie im BALT in einer <i>Pi16^{floxneo/floxneo}</i> - Maus	Schilddrüse	Keine Veränderungen
Herz	Nekrotischer Bereich in einer <i>Pi16^{floxneo/floxneo}</i> - Maus	Nebenschilddrüse	Keine Veränderungen
Abdominale Aorta	Keine Veränderungen	Nebenniere	Keine Veränderungen
Luftröhre	Keine Veränderungen	Großhirn	Keine Veränderungen
Speicheldrüse	Keine Veränderungen	Kleinhirn	Keine Veränderungen
Magen	Keine Veränderungen	Haut	Keine Veränderungen
Dünndarm	Keine Veränderungen	Hoden	Keine Veränderungen
Dickdarm	Keine Veränderungen	Nebenhoden	Keine Veränderungen
Harnblase	Keine Veränderungen	Speiseröhre	Keine Veränderungen

9 REFERENZEN

1. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html>. (2011).
2. WHO. Kapitel IX. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD)*.
3. Nieminen, M.S., Brutsaert, D., Dickstein, K., Drexler, H., Follath, F., Harjola, V.P., Hochadel, M., Komajda, M., Lassus, J., Lopez-Sendon, J.L., Ponikowski, P. & Tavazzi, L. EuroHeart Failure Survey II (EHFS II): a survey on hospitalized acute heart failure patients: description of population. *Eur Heart J* **27**, 2725-2736 (2006).
4. Weil, J. & Schunkert, H. [Pathophysiology of chronic heart failure]. *Clin Res Cardiol* **95 Suppl 4**, 1-15; quiz 16-7 (2006).
5. Fleg, J.L., Aronow, W.S. & Frishman, W.H. Cardiovascular drug therapy in the elderly: benefits and challenges. *Nat Rev Cardiol* **8**, 13-28 (2011).
6. Owan, T.E., Hodge, D.O., Herges, R.M., Jacobsen, S.J., Roger, V.L. & Redfield, M.M. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* **355**, 251-259 (2006).
7. Soonpaa, M.H. & Field, L.J. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* **83**, 15-26 (1998).
8. Angert, D., Berretta, R.M., Kubo, H., Zhang, H., Chen, X., Wang, W., Ogorek, B., Barbe, M. & Houser, S.R. Repair of the Injured Adult Heart Involves New Myocytes Potentially Derived From Resident Cardiac Stem Cells. *Circ Res* (2011).
9. Wakatsuki, T., Schlessinger, J. & Elson, E.L. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci* **29**, 609-617 (2004).
10. Whelan, R.S., Kaplinskiy, V. & Kitsis, R.N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* **72**, 19-44 (2010).
11. Cokkinos, D.V. & Pantos, C. Myocardial remodeling, an overview. *Heart Fail Rev* **16**, 1-4 (2011).
12. Shahbaz, A.U., Sun, Y., Bhattacharya, S.K., Ahokas, R.A., Gerling, I.C., McGee, J.E. & Weber, K.T. Fibrosis in hypertensive heart disease: molecular pathways and cardioprotective strategies. *J Hypertens* **28 Suppl 1**, S25-32 (2010).
13. Spach, M.S. & Boineau, J.P. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol* **20**, 397-413 (1997).
14. Association, T.C.C.o.t.N.Y.H. *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels*. **9th ed**, 253-256 (1994).
15. Krum, H. & Teerlink, J.R. Medical therapy for chronic heart failure. *Lancet* **378**, 713-721 (2011).
16. Landmesser, U. & Drexler, H. Chronic heart failure: an overview of conventional treatment versus novel approaches. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **2**, 628-638 (2005).

17. Mudd, J.O. & Kass, D.A. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* **451**, 919-928 (2008).
18. Lompre, A.M., Hajjar, R.J., Harding, S.E., Kranias, E.G., Lohse, M.J. & Marks, A.R. Ca²⁺ cycling and new therapeutic approaches for heart failure. *Circulation* **121**, 822-830 (2010).
19. Jaski, B.E., Jessup, M.L., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K.M. & Hajjar, R.J. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail* **15**, 171-181 (2009).
20. Vinge, L.E., Raake, P.W. & Koch, W.J. Gene therapy in heart failure. *Circ Res* **102**, 1458-1470 (2008).
21. Tang, W.H. & Francis, G.S. The year in heart failure. *J Am Coll Cardiol* **55**, 688-696 (2010).
22. Herrmann, J.L., Abarbanell, A.M., Weil, B.R., Wang, Y., Wang, M., Tan, J. & Meldrum, D.R. Cell-based therapy for ischemic heart disease: a clinical update. *Ann Thorac Surg* **88**, 1714-1722 (2009).
23. Gneocchi, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* **103**, 1204-1219 (2008).
24. Burchfield, J.S. & Dimmeler, S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **1**, 4 (2008).
25. Lionetti, V., Bianchi, G., Recchia, F.A. & Ventura, C. Control of autocrine and paracrine myocardial signals: an emerging therapeutic strategy in heart failure. *Heart Fail Rev* **15**, 531-542 (2010).
26. Ghadge, S.K., Muhlstedt, S., Ozcelik, C. & Bader, M. SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther* **129**, 97-108 (2011).
27. Leask, A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* **106**, 1675-1680 (2010).
28. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* **200**, 500-503 (2003).
29. Cheng, T.H., Cheng, P.Y., Shih, N.L., Chen, I.B., Wang, D.L. & Chen, J.J. Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts. *J Am Coll Cardiol* **42**, 1845-1854 (2003).
30. Mucke, H.A. Pulmonary arterial hypertension: on the way to a manageable disease. *Curr Opin Investig Drugs* **9**, 957-962 (2008).
31. Kowala, M.C., Murugesan, N., Tellew, J., Carlson, K., Monshizadegan, H., Ryan, C., Gu, Z., Kane, B., Fadnis, L., Baska, R.A., Beyer, S., Arthur, S., Dickinson, K., Zhang, D., Perrone, M. *et al.* Novel dual action AT1 and ETA receptor antagonists reduce blood pressure in experimental hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 275-284 (2004).

32. Palaniswamy, C., Selvaraj, D.R. & Palaniappan, D. Dual angiotensin II and endothelin receptor antagonists. *Am J Ther* **18**, e67-70 (2011).
33. Suckau, L., Fechner, H., Chemaly, E., Krohn, S., Hadri, L., Kockskamper, J., Westermann, D., Bisping, E., Ly, H., Wang, X., Kawase, Y., Chen, J., Liang, L., Sipo, I., Vetter, R. *et al.* Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation* **119**, 1241-1252 (2009).
34. Fechner, H., Sipo, I., Westermann, D., Pinkert, S., Wang, X., Suckau, L., Kurreck, J., Zeichhardt, H., Muller, O., Vetter, R., Erdmann, V., Tschope, C. & Poller, W. Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. *J Mol Med* **86**, 987-997 (2008).
35. Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M. & Stoffel, M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **438**, 685-689 (2005).
36. Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V., Hoydal, M., Autore, C., Russo, M.A. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* **13**, 613-618 (2007).
37. Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A. *et al.* MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* **456**, 980-984 (2008).
38. Martins, P.A., Salic, K., Gladka, M.M., Armand, A.S., Leptidis, S., el Azzouzi, H., Hansen, A., Coenen-de Roo, C.J., Bierhuizen, M.F., van der Nagel, R., van Kuik, J., de Weger, R., de Bruin, A., Condorelli, G., Arbones, M.L. *et al.* MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat Cell Biol* **12**, 1220-1227 (2010).
39. Lu, Y., Zhang, Y., Wang, N., Pan, Z., Gao, X., Zhang, F., Zhang, Y., Shan, H., Luo, X., Bai, Y., Sun, L., Song, W., Xu, C., Wang, Z. & Yang, B. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation* **122**, 2378-2387 (2010).
40. Ren, X.P., Wu, J., Wang, X., Sartor, M.A., Qian, J., Jones, K., Nicolaou, P., Pritchard, T.J. & Fan, G.C. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* **119**, 2357-2366 (2009).
41. van Rooij, E., Marshall, W.S. & Olson, E.N. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* **103**, 919-928 (2008).
42. Poller, W., Hajjar, R., Schultheiss, H.P. & Fechner, H. Cardiac-targeted delivery of regulatory RNA molecules and genes for the treatment of heart failure. *Cardiovasc Res* **86**, 353-364 (2010).
43. Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S. & Orum, H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**, 198-201 (2010).

44. 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).
45. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855-862 (1993).
46. Farazi, T.A., Spitzer, J.I., Morozov, P. & Tuschl, T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* **223**, 102-115 (2011).
47. Thomas, M., Lieberman, J. & Lal, A. Desperately seeking microRNA targets. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1169-1174 (2010).
48. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233 (2009).
49. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. & Cohen, S.M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**, e85 (2005).
50. Rao, P.K., Toyama, Y., Chiang, H.R., Gupta, S., Bauer, M., Medvid, R., Reinhardt, F., Liao, R., Krieger, M., Jaenisch, R., Lodish, H.F. & Blelloch, R. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* **105**, 585-594 (2009).
51. Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V. & Hannon, G.J. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**, 215-217 (2003).
52. Yang, W.J., Yang, D.D., Na, S., Sandusky, G.E., Zhang, Q. & Zhao, G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* **280**, 9330-9335 (2005).
53. Zhao, Y., Ransom, J.F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A.N., Tsuchihashi, T., McManus, M.T., Schwartz, R.J. & Srivastava, D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* **129**, 303-317 (2007).
54. Chen, J.F., Murchison, E.P., Tang, R., Callis, T.E., Tatsuguchi, M., Deng, Z., Rojas, M., Hammond, S.M., Schneider, M.D., Selzman, C.H., Meissner, G., Patterson, C., Hannon, G.J. & Wang, D.Z. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2111-2116 (2008).
55. da Costa Martins, P.A., Bourajjaj, M., Gladka, M., Kortland, M., van Oort, R.J., Pinto, Y.M., Molkenin, J.D. & De Windt, L.J. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* **118**, 1567-1576 (2008).
56. Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. & Hannon, G.J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-1441 (2004).
57. Zhao, Y., Samal, E. & Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets *Hand2* during cardiogenesis. *Nature* **436**, 214-220 (2005).

58. van Rooij, E., Sutherland, L.B., Liu, N., Williams, A.H., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A. & Olson, E.N. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18255-18260 (2006).
59. Small, E.M., Frost, R.J. & Olson, E.N. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* **121**, 1022-1032 (2010).
60. Small, E.M. & Olson, E.N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* **469**, 336-342 (2011).
61. Sayed, D., Hong, C., Chen, I.Y., Lypowy, J. & Abdellatif, M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* **100**, 416-424 (2007).
62. Wang, J.X., Jiao, J.Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J.P., Li, Y.R. & Li, P.F. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med* **17**, 71-78 (2011).
63. Lin, Z., Murtaza, I., Wang, K., Jiao, J., Gao, J. & Li, P.F. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12103-12108 (2009).
64. Jentsch, C., Leierseder, S., Loyer, X., Flohrschutz, I., Sassi, Y., Hartmann, D., Thum, T., Laggerbauer, B. & Engelhardt, S. A phenotypic screen to identify hypertrophy-modulating microRNAs in primary cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* (2011).
65. www.andrew.cmu.edu/course/42731/handouts/BioimageInformatics_Spring2011_Lecture21.pdf. (2011).
66. Krausz, E. High-content siRNA screening. *Mol Biosyst* **3**, 232-240 (2007).
67. Conrad, C. & Gerlich, D.W. Automated microscopy for high-content RNAi screening. *J Cell Biol* **188**, 453-461 (2010).
68. Wu, C., Schulte, J., Sepp, K.J., Littleton, J.T. & Hong, P. Automatic robust neurite detection and morphological analysis of neuronal cell cultures in high-content screening. *Neuroinformatics* **8**, 83-100 (2010).
69. Takahashi, T., Lord, B., Schulze, P.C., Fryer, R.M., Sarang, S.S., Gullans, S.R. & Lee, R.T. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* **107**, 1912-1916 (2003).
70. Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., Huangfu, D., Akutsu, H., Liu, D.R., Rubin, L.L. & Eggan, K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* **5**, 491-503 (2009).
71. Desbordes, S.C., Placantonakis, D.G., Ciro, A., Socci, N.D., Lee, G., Djaballah, H. & Studer, L. High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 602-612 (2008).

72. Brandman, O., Liou, J., Park, W.S. & Meyer, T. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell* **131**, 1327-1339 (2007).
73. Lam, L.T., Lu, X., Zhang, H., Lesniewski, R., Rosenberg, S. & Semizarov, D. A microRNA screen to identify modulators of sensitivity to BCL2 inhibitor ABT-263 (navitoclax). *Mol Cancer Ther* **9**, 2943-2950 (2010).
74. Santhakumar, D., Forster, T., Laqtom, N.N., Fragkoudis, R., Dickinson, P., Abreu-Goodger, C., Manakov, S.A., Choudhury, N.R., Griffiths, S.J., Vermeulen, A., Enright, A.J., Dutia, B., Kohl, A., Ghazal, P. & Buck, A.H. Combined agonist-antagonist genome-wide functional screening identifies broadly active antiviral microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13830-13835 (2010).
75. Cheng, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J. & Ford, L.P. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* **33**, 1290-1297 (2005).
76. Monovich, L., Koch, K.A., Burgis, R., Osimboni, E., Mann, T., Wall, D., Gao, J., Feng, Y., Vega, R.B., Turner, B.A., Hood, D.B., Law, A., Papst, P.J., Koditek, D., Chapo, J.A. *et al.* Suppression of HDAC nuclear export and cardiomyocyte hypertrophy by novel irreversible inhibitors of CRM1. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 422-431 (2009).
77. Kakkar, R. & Lee, R.T. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ Res* **106**, 47-57 (2010).
78. Fredj, S., Bescond, J., Louault, C. & Potreau, D. Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation. *J Cell Physiol* **202**, 891-899 (2005).
79. Ieda, M., Tsuchihashi, T., Ivey, K.N., Ross, R.S., Hong, T.T., Shaw, R.M. & Srivastava, D. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell* **16**, 233-244 (2009).
80. Uemura, R., Xu, M., Ahmad, N. & Ashraf, M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* **98**, 1414-1421 (2006).
81. Frost, R.J. & Engelhardt, S. A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. *Circulation* **116**, 1768-1775 (2007).
82. Gibbs, G.M., Roelants, K. & O'Bryan, M.K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev* **29**, 865-897 (2008).
83. Yamakawa, T., Miyata, S., Ogawa, N., Koshikawa, N., Yasumitsu, H., Kanamori, T. & Miyazaki, K. cDNA cloning of a novel trypsin inhibitor with similarity to pathogenesis-related proteins, and its frequent expression in human brain cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1395**, 202-208 (1998).

84. Reeves, J.R., Xuan, J.W., Arfanis, K., Morin, C., Garde, S.V., Ruiz, M.T., Wisniewski, J., Panchal, C. & Tanner, J.E. Identification, purification and characterization of a novel human blood protein with binding affinity for prostate secretory protein of 94 amino acids. *Biochem J* **385**, 105-114 (2005).
85. Mak, T.W. Gene targeting in embryonic stem cells scores a knockout in Stockholm. *Cell* **131**, 1027-1031 (2007).
86. Jentsch, C. Konditionale Ausschaltung von PI16 in transgenen Mäusen. *Fakultät für Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg*. (2006).
87. Sauer, B. & Henderson, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5166-5170 (1988).
88. Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D. & Chambon, P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10887-10890 (1996).
89. Betz, U.A., Vosshenrich, C.A., Rajewsky, K. & Muller, W. Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol* **6**, 1307-1316 (1996).
90. Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F. & Dymecki, S.M. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* **25(2)**, 139-140 (2000).
91. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8424-8428 (1993).
92. Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.P., Chen, J.F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M.S., Selzman, C.H. & Wang, D.Z. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* **119**, 2772-2786 (2009).
93. Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R. & Schutz, G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* **23**, 99-103 (1999).
94. Saller, F., Brisset, A.C., Tchaikovski, S.N., Azevedo, M., Chrast, R., Fernandez, J.A., Schapira, M., Hackeng, T.M., Griffin, J.H. & Angelillo-Scherrer, A. Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood* **114**, 2307-2314 (2009).
95. Fritsch, A., Loeckermann, S., Kern, J.S., Braun, A., Bosl, M.R., Bley, T.A., Schumann, H., von Elverfeldt, D., Paul, D., Erlacher, M., Berens von Rautenfeld, D., Hausser, I., Fassler, R. & Bruckner-Tuderman, L. A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *J Clin Invest* **118**, 1669-1679 (2008).
96. Qu, X., Tompkins, K., Batts, L.E., Puri, M. & Baldwin, S. Abnormal embryonic lymphatic vessel development in Tie1 hypomorphic mice. *Development* **137**, 1285-1295 (2010).

97. Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. & Lohse, M.J. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7059-7064 (1999).
98. Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N. & Hill, J.A. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* **109**, 1580-1589 (2004).
99. Frey, N. & Olson, E.N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* **65**, 45-79 (2003).
100. Simpson, P., McGrath, A. & Savion, S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* **51**, 787-801 (1982).
101. Claycomb, W.C., Lanson, N.A.J., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A. & Izzo, N.J.J. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2979-2984 (1998).
102. Kimes, B.W. & Brandt, B.L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* **98**, 367-381 (1976).
103. Landstrom, A.P., Kellen, C.A., Dixit, S.S., van Oort, R.J., Garbino, A., Weisleder, N., Ma, J., Wehrens, X.H. & Ackerman, M.J. Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium-handling. *Circ Heart Fail* **4**, 214-223 (2011).
104. Watkins, S.J., Borthwick, G.M. & Arthur, H.M. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **47**, 125-131 (2011).
105. Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W. & Schultz, G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res* **69**, 1476-1486 (1991).
106. Zhang, C.G., Jia, Z.Q., Li, B.H., Zhang, H., Liu, Y.N., Chen, P., Ma, K.T. & Zhou, C.Y. beta-Catenin/TCF/LEF1 can directly regulate phenylephrine-induced cell hypertrophy and Anf transcription in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 258-262 (2009).
107. Cao, D.J., Wang, Z.V., Battiprolu, P.K., Jiang, N., Morales, C.R., Kong, Y., Rothermel, B.A., Gillette, T.G. & Hill, J.A. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4123-4128 (2011).
108. Usui, S., Maejima, Y., Pain, J., Hong, C., Cho, J., Park, J.Y., Zablocki, D., Tian, B., Glass, D.J. & Sadoshima, J. Endogenous Muscle Atrophy F-Box Mediates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy Through Regulation of Nuclear Factor- κ B. *Circ Res* (2011).
109. Song, K., Backs, J., McAnally, J., Qi, X., Gerard, R.D., Richardson, J.A., Hill, J.A., Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. The transcriptional coactivator CAMTA2 stimulates cardiac growth by opposing class II histone deacetylases. *Cell* **125**, 453-466 (2006).

110. Bush, E., Fielitz, J., Melvin, L., Martinez-Arnold, M., McKinsey, T.A., Plichta, R. & Olson, E.N. A small molecular activator of cardiac hypertrophy uncovered in a chemical screen for modifiers of the calcineurin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2870-2875 (2004).
111. Depre, C., Shipley, G.L., Chen, W., Han, Q., Doenst, T., Moore, M.L., Stepkowski, S., Davies, P.J. & Taegtmeyer, H. Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat Med* **4**, 1269-1275 (1998).
112. Patel, J.B., Appaiah, H.N., Burnett, R.M., Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Mehta, R., Badve, S., Thomson, M.J., Hammond, S., Steeg, P., Liu, Y. & Nakshatri, H. Control of EVI-1 oncogene expression in metastatic breast cancer cells through microRNA miR-22. *Oncogene* (2010).
113. Li, J., Liang, S., Yu, H., Zhang, J., Ma, D. & Lu, X. An inhibitory effect of miR-22 on cell migration and invasion in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **119**, 543-548 (2010).
114. Zhang, J., Yang, Y., Yang, T., Liu, Y., Li, A., Fu, S., Wu, M., Pan, Z. & Zhou, W. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumourigenicity. *Br J Cancer* **103**, 1215-1220 (2010).
115. Ting, Y., Medina, D.J., Strair, R.K. & Schaar, D.G. Differentiation-associated miR-22 represses Max expression and inhibits cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* **394**, 606-611 (2010).
116. Bar, N. & Dikstein, R. miR-22 forms a regulatory loop in PTEN/AKT pathway and modulates signaling kinetics. *PLoS One* **5**, e10859 (2010).
117. Poliseno, L., Salmena, L., Riccardi, L., Fornari, A., Song, M.S., Hobbs, R.M., Sportoletti, P., Varmeh, S., Egia, A., Fedele, G., Rameh, L., Loda, M. & Pandolfi, P.P. Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal* **3**, ra29 (2010).
118. Xu, X.D., Song, X.W., Li, Q., Wang, G.K., Jing, Q. & Qin, Y.W. Attenuation of microRNA-22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy. *J Cell Physiol* (2011).
119. Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L. & Wang, D.Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* **38**, 228-233 (2006).
120. Williams, A.H., Liu, N., van Rooij, E. & Olson, E.N. MicroRNA control of muscle development and disease. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 461-469 (2009).
121. Chen, J.F., Callis, T.E. & Wang, D.Z. microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci* **122**, 13-20 (2009).
122. van Rooij, E., Liu, N. & Olson, E.N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet* **24**, 159-166 (2008).
123. McCarthy, J.J. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 682-691 (2008).

124. Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A.H., Qi, X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* **22**, 3242-3254 (2008).
125. Liu, N., Williams, A.H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L.B., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20844-20849 (2007).
126. Mishima, Y., Abreu-Goodger, C., Staton, A.A., Stahlhut, C., Shou, C., Cheng, C., Gerstein, M., Enright, A.J. & Giraldez, A.J. Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization. *Genes Dev* **23**, 619-632 (2009).
127. Duisters, R.F., Tijssen, A.J., Schroen, B., Leenders, J.J., Lentink, V., van der Made, I., Herias, V., van Leeuwen, R.E., Schellings, M.W., Barenbrug, P., Maessen, J.G., Heymans, S., Pinto, Y.M. & Creemers, E.E. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res* **104**, 170-8, 6p following 178 (2009).
128. Bostjancic, E., Zidar, N., Stajer, D. & Glavac, D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology* **115**, 163-169 (2010).
129. Li, Q., Lin, X., Yang, X. & Chang, J. NFATc4 is negatively regulated in miR-133a-mediated cardiomyocyte hypertrophic repression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H1340-7 (2010).
130. Dong, D.L., Chen, C., Huo, R., Wang, N., Li, Z., Tu, Y.J., Hu, J.T., Chu, X., Huang, W. & Yang, B.F. Reciprocal repression between microRNA-133 and calcineurin regulates cardiac hypertrophy: a novel mechanism for progressive cardiac hypertrophy. *Hypertension* **55**, 946-952 (2010).
131. Xu, C., Lu, Y., Pan, Z., Chu, W., Luo, X., Lin, H., Xiao, J., Shan, H., Wang, Z. & Yang, B. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci* **120**, 3045-3052 (2007).
132. Deng, Z., Chen, J.F. & Wang, D.Z. Transgenic overexpression of miR-133a in skeletal muscle. *BMC Musculoskelet Disord* **12**, 115 (2011).
133. Matkovich, S.J., Wang, W., Tu, Y., Eschenbacher, W.H., Dorn, L.E., Condorelli, G., Diwan, A., Nerbonne, J.M. & Dorn, G.W.n. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. *Circ Res* **106**, 166-175 (2010).
134. Patrick, D.M., Montgomery, R.L., Qi, X., Obad, S., Kauppinen, S., Hill, J.A., van Rooij, E. & Olson, E.N. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest* **120**, 3912-3916 (2010).
135. Thum, T., Chau, N., Bhat, B., Gupta, S.K., Linsley, P.S., Bauersachs, J. & Engelhardt, S. Comparison of different miR-21 inhibitor chemistries in a cardiac disease model. *J Clin Invest* **121**, 461-2; author reply 462-3 (2011).

136. Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Braich, R., Rajeev, K.G., Pena, J., Tuschl, T., Manoharan, M. & Stoffel, M. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Res* **35**, 2885-2892 (2007).
137. Thum, T., Galuppo, P., Wolf, C., Fiedler, J., Kneitz, S., van Laake, L.W., Doevendans, P.A., Mummery, C.L., Borlak, J., Haverich, A., Gross, C., Engelhardt, S., Ertl, G. & Bauersachs, J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* **116**, 258-267 (2007).
138. Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F.C. & Werge, T. MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS One* **4**, e7225 (2009).
139. Remenyi, J., Hunter, C.J., Cole, C., Ando, H., Impey, S., Monk, C.E., Martin, K.J., Barton, G.J., Hutvagner, G. & Arthur, J.S. Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins. *Biochem J* **428**, 281-291 (2010).
140. Wibrand, K., Panja, D., Tiron, A., Ofte, M.L., Skaftnesmo, K.O., Lee, C.S., Pena, J.T., Tuschl, T. & Bramham, C.R. Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci* **31**, 636-645 (2010).
141. Hollander, J.A., Im, H.I., Amelio, A.L., Kocerha, J., Bali, P., Lu, Q., Willoughby, D., Wahlestedt, C., Conkright, M.D. & Kenny, P.J. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature* **466**, 197-202 (2010).
142. Im, H.I., Hollander, J.A., Bali, P. & Kenny, P.J. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* **13**, 1120-1127 (2010).
143. Ucar, A., Vafaizadeh, V., Jarry, H., Fiedler, J., Klemmt, P.A., Thum, T., Groner, B. & Chowdhury, K. miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. *Nat Genet* **42**, 1101-1108 (2010).
144. Lin, Q., Gao, Z., Alarcon, R.M., Ye, J. & Yun, Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J* **276**, 2348-2358 (2009).
145. Wang, T. & Xu, Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **402**, 186-189 (2010).
146. Zhou, Q., Gallagher, R., Ufret-Vincenty, R., Li, X., Olson, E.N. & Wang, S. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8287-8292 (2011).
147. Chinchilla, A., Lozano, E., Daimi, H., Esteban, F.J., Crist, C., Aranega, A.E. & Franco, D. MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: a role for miR-27 modulating Mef2c expression. *Cardiovasc Res* **89**, 98-108 (2011).
148. Bruneau, B.G. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res* **90**, 509-519 (2002).
149. Kolodziejczyk, S.M., Wang, L., Balazsi, K., DeRepentigny, Y., Kothary, R. & Megeney, L.A. MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol* **9**, 1203-1206 (1999).

150. Pereira, A.H., Clemente, C.F., Cardoso, A.C., Theizen, T.H., Rocco, S.A., Judice, C.C., Guido, M.C., Pascoal, V.D., Lopes-Cendes, I., Souza, J.R. & Franchini, K.G. MEF2C silencing attenuates load-induced left ventricular hypertrophy by modulating mTOR/S6K pathway in mice. *PLoS One* **4**, e8472 (2009).
151. Zhang, Z.Y., Liu, X.H., Hu, W.C., Rong, F. & Wu, X.D. The calcineurin-myocyte enhancer factor 2c pathway mediates cardiac hypertrophy induced by endoplasmic reticulum stress in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H1499-509 (2010).
152. Taulli, R., Bersani, F., Foglizzo, V., Linari, A., Vigna, E., Ladanyi, M., Tuschl, T. & Ponzetto, C. The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation. *J Clin Invest* **119**, 2366-2378 (2009).
153. Iorio, M.V., Casalini, P., Piovan, C., Di Leva, G., Merlo, A., Triulzi, T., Menard, S., Croce, C.M. & Tagliabue, E. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res* **69**, 2195-2200 (2009).
154. Li, J., Donath, S., Li, Y., Qin, D., Prabhakar, B.S. & Li, P. miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS Genet* **6**, e1000795 (2010).
155. Martinez, I., Cazalla, D., Almstead, L.L., Steitz, J.A. & DiMaio, D. miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 522-527 (2011).
156. Agrawal, R., Tran, U. & Wessely, O. The miR-30 miRNA family regulates *Xenopus* pronephros development and targets the transcription factor *Xlim1/Lhx1*. *Development* **136**, 3927-3936 (2009).
157. Joglekar, M.V., Patil, D., Joglekar, V.M., Rao, G.V., Reddy, D.N., Mitnala, S., Shouche, Y. & Hardikar, A.A. The miR-30 family microRNAs confer epithelial phenotype to human pancreatic cells. *Islets* **1**, 137-147 (2009).
158. Yu, F., Deng, H., Yao, H., Liu, Q., Su, F. & Song, E. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene* **29**, 4194-4204 (2010).
159. Ebert, M.S., Neilson, J.R. & Sharp, P.A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* **4**, 721-726 (2007).
160. Ebert, M.S. & Sharp, P.A. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* **16**, 2043-2050 (2010).
161. Sun, L., Xie, H., Mori, M.A., Alexander, R., Yuan, B., Hattangadi, S.M., Liu, Q., Kahn, C.R. & Lodish, H.F. Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol* **13**, 958-965 (2011).
162. Guo, L., Huang, Z.X., Chen, X.W., Deng, Q.K., Yan, W., Zhou, M.J., Ou, C.S. & Ding, Z.H. Differential expression profiles of microRNAs in NIH3T3 cells in response to UVB irradiation. *Photochem Photobiol* **85**, 765-773 (2009).

163. Maes, O.C., Sarojini, H. & Wang, E. Stepwise up-regulation of microRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts. *J Cell Physiol* **221**, 109-119 (2009).
164. Wang, X.Y., Wu, M.H., Liu, F., Li, Y., Li, N., Li, G.Y. & Shen, S.R. Differential miRNA expression and their target genes between NGX6-positive and negative colon cancer cells. *Mol Cell Biochem* **345**, 283-290 (2010).
165. Ohlsson Teague, E.M., Van der Hoek, K.H., Van der Hoek, M.B., Perry, N., Wagaarachchi, P., Robertson, S.A., Print, C.G. & Hull, L.M. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol* **23**, 265-275 (2009).
166. Wheeler, G., Ntounia-Fousara, S., Granda, B., Rathjen, T. & Dalmay, T. Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs. *FEBS Lett* **580**, 2195-2200 (2006).
167. Zhou, S., Yu, B., Qian, T., Yao, D., Wang, Y., Ding, F. & Gu, X. Early changes of microRNAs expression in the dorsal root ganglia following rat sciatic nerve transection. *Neurosci Lett* **494**, 89-93 (2011).
168. Sanchez Freire, V., Burkhard, F.C., Kessler, T.M., Kuhn, A., Draeger, A. & Monastyrskaya, K. MicroRNAs may mediate the down-regulation of neurokinin-1 receptor in chronic bladder pain syndrome. *Am J Pathol* **176**, 288-303 (2010).
169. Janssen, E.A., Slewa, A., Gudlaugsson, E., Jonsdottir, K., Skaland, I., Soiland, H. & Baak, J.P. Biologic profiling of lymph node negative breast cancers by means of microRNA expression. *Mod Pathol* **23**, 1567-1576 (2010).
170. Yamamoto, Y., Kosaka, N., Tanaka, M., Koizumi, F., Kanai, Y., Mizutani, T., Murakami, Y., Kuroda, M., Miyajima, A., Kato, T. & Ochiya, T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers* **14**, 529-538 (2009).
171. Zhu, M., Yi, M., Kim, C.H., Deng, C., Li, Y., Medina, D., Stephen, R. & Green, J.E. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of mouse mammary tumor models identifies miRNA signatures associated with mammary tumor lineage. *Genome Biol* **12**, R77 (2011).
172. Verduci, L., Simili, M., Rizzo, M., Mercatanti, A., Evangelista, M., Mariani, L., Rainaldi, G. & Pitto, L. MicroRNA (miRNA)-mediated interaction between leukemia/lymphoma-related factor (LRF) and alternative splicing factor/splicing factor 2 (ASF/SF2) affects mouse embryonic fibroblast senescence and apoptosis. *J Biol Chem* **285**, 39551-39563 (2010).
173. Doroudgar, S. & Glembotski, C.C. The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. *Trends Mol Med* **17**, 207-214 (2011).
174. Schellings, M.W., Vanhoutte, D., Swinnen, M., Cleutjens, J.P., Debets, J., van Leeuwen, R.E., d'Hooge, J., Van de Werf, F., Carmeliet, P., Pinto, Y.M., Sage, E.H. & Heymans, S. Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction. *J Exp Med* **206**, 113-123 (2009).

175. Kobayashi, K., Luo, M., Zhang, Y., Wilkes, D.C., Ge, G., Grieskamp, T., Yamada, C., Liu, T.C., Huang, G., Basson, C.T., Kispert, A., Greenspan, D.S. & Sato, T.N. Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol* **11**, 46-55 (2009).
176. Oka, T., Xu, J., Kaiser, R.A., Melendez, J., Hambleton, M., Sargent, M.A., Lorts, A., Brunskill, E.W., Dorn, G.W.n., Conway, S.J., Aronow, B.J., Robbins, J. & Molkentin, J.D. Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling. *Circ Res* **101**, 313-321 (2007).
177. Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R., Wang, L., Wakimoto, H., Naylor, M., Konno, T., Gorham, J.M., Wolf, C.M., Kim, J.B., Schmitt, J.P., Molkentin, J.D., Norris, R.A., Tager, A.M. *et al.* Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *J Clin Invest* **120**, 3520-3529 (2010).
178. Shibata, R., Ouchi, N., Ito, M., Kihara, S., Shiojima, I., Pimentel, D.R., Kumada, M., Sato, K., Schiekofer, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Colucci, W.S. & Walsh, K. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med* **10**, 1384-1389 (2004).
179. Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K. *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* **8**, 731-737 (2002).
180. Denzel, M.S., Scimia, M.C., Zumstein, P.M., Walsh, K., Ruiz-Lozano, P. & Ranscht, B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest* **120**, 4342-4352 (2010).
181. Sadlon, T.J., Wilkinson, B.G., Pederson, S., Brown, C.Y., Bresatz, S., Gargett, T., Melville, E.L., Peng, K., D'Andrea, R.J., Glonek, G.G., Goodall, G.J., Zola, H., Shannon, M.F. & Barry, S.C. Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *J Immunol* **185**, 1071-1081 (2010).
182. Zheng, Y. & Rudensky, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* **8**, 457-462 (2007).
183. Kvakan, H., Luft, F.C. & Muller, D.N. Role of the immune system in hypertensive target organ damage. *Trends Cardiovasc Med* **19**, 242-246 (2009).
184. Wei, L. Immunological aspect of cardiac remodeling: T lymphocyte subsets in inflammation-mediated cardiac fibrosis. *Exp Mol Pathol* **90**, 74-78 (2011).
185. Zeisberg, E.M. & Kalluri, R. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res* **107**, 1304-1312 (2010).
186. Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H. & Neilson, E.G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* **110**, 341-350 (2002).

187. Takeda, N., Manabe, I., Uchino, Y., Eguchi, K., Matsumoto, S., Nishimura, S., Shindo, T., Sano, M., Otsu, K., Snider, P., Conway, S.J. & Nagai, R. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest* **120**, 254-265 (2010).
188. Snider, P., Standley, K.N., Wang, J., Azhar, M., Doetschman, T. & Conway, S.J. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res* **105**, 934-947 (2009).
189. Wikipedia. <http://de.wikipedia.org/wiki/Zilien>. (2011).
190. Reddy, T., Gibbs, G.M., Merriner, D.J., Kerr, J.B. & O'Bryan, M.K. Cysteine-rich secretory proteins are not exclusively expressed in the male reproductive tract. *Dev Dyn* **237**, 3313-3323 (2008).
191. Da Ros, V.G., Maldera, J.A., Willis, W.D., Cohen, D.J., Goulding, E.H., Gelman, D.M., Rubinstein, M., Eddy, E.M. & Cuasnicu, P.S. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev Biol* **320**, 12-18 (2008).
192. Gibbs, G.M., Orta, G., Reddy, T., Koppers, A.J., Martinez-Lopez, P., Luis de la Vega-Beltran, J., Lo, J.C., Veldhuis, N., Jamsai, D., McIntyre, P., Darszon, A. & O'Bryan, M.K. Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7034-7039 (2011).
193. Krutskikh, A., De Gendt, K., Sharp, V., Verhoeven, G., Poutanen, M. & Huhtaniemi, I. Targeted inactivation of the androgen receptor gene in murine proximal epididymis causes epithelial hypotrophy and obstructive azoospermia. *Endocrinology* **152**, 689-696 (2011).
194. Kusakabe, T., Kawaguchi, A., Kawaguchi, R., Feigenbaum, L. & Kimura, S. Thyrocyte-specific expression of Cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* **39**, 212-216 (2004).
195. Kero, J., Ahmed, K., Wettschureck, N., Tunaru, S., Wintermantel, T., Greiner, E., Schutz, G. & Offermanns, S. Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest* **117**, 2399-2407 (2007).
196. Kusakabe, T., Kawaguchi, A., Hoshi, N., Kawaguchi, R., Hoshi, S. & Kimura, S. Thyroid-specific enhancer-binding protein/NKX2.1 is required for the maintenance of ordered architecture and function of the differentiated thyroid. *Mol Endocrinol* **20**, 1796-1809 (2006).
197. Gladysheva, I.P., Robinson, B.R., Houng, A.K., Kovats, T. & King, S.M. Corin is co-expressed with pro-ANP and localized on the cardiomyocyte surface in both zymogen and catalytically active forms. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 131-142 (2008).
198. Thota, A., Karajgikar, M., Duan, W., Gabriel, M.Y., Chan, F.L., Wong, Y.C., Sakai, H., Chin, J.L., Moussa, M. & Xuan, J.W. Mouse PSP94 expression is prostate tissue-specific as demonstrated by a comparison of multiple antibodies against recombinant proteins. *J Cell Biochem* **88**, 999-1011 (2003).

-
199. Xuan, J.W., Kwong, J., Chan, F.L., Ricci, M., Imasato, Y., Sakai, H., Fong, G.H., Panchal, C. & Chin, J.L. cDNA, genomic cloning, and gene expression analysis of mouse PSP94 (prostate secretory protein of 94 amino acids). *DNA Cell Biol* **18**, 11-26 (1999).

10 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt möchte ich für die mehrjährige, intensive Zusammenarbeit danken. Mit seinem Optimismus und seiner Leidenschaft für wissenschaftliches Arbeiten verstand er es immer wieder, mich zu begeistern. Außerdem möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, dass ich meine Arbeiten auf diversen Kongressen und Symposien vorstellen konnte. Damit hat er meine Fähigkeit zur Präsentation und Diskussion vor/mit Fachpublikum entscheidend gefördert.

Herrn Prof. Dr. Martin Lohse möchte ich sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit danken. Darüber hinaus gilt ihm mein Dank für seine Unterstützung in Form von motivierenden Gesprächen und Diskussionen. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit, die ersten Versuche zur Expression des humanen PI16 Fusionsproteins in seinen Laboren zusammen mit Martina Fischer durchgeführt haben zu können.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Nieswandt danke ich sehr herzlich neben der Betreuung meiner Dissertation für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe (mit großer Unterstützung durch Herrn Dr. Attila Braun) den Grundstein für die Generierung der PI16-defizienten Mäuse gelegt haben zu können.

Herrn Prof. Manfred Gessler danke ich dafür, den Vorsitz meines Promotionskomitees übernommen zu haben.

Allen ehemaligen und jetzigen Arbeitsgruppenmitgliedern danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit sowie für die wirklich tolle Atmosphäre im Team. Allen voran möchte ich an dieser Stelle ganz besonders Sabine Merkle, Petra Göbel und Andrea Ahles danken. Sie waren in der gesamten Zeit nicht nur im Labor sondern auch im privaten Bereich sehr wichtige Ansprechpartner für mich. Isabell Floherschütz, Deepak Ramanujam, Simon Leierseder, Francesca Rochias und Julia Schittl haben mich ebenfalls in vielerlei Hinsichten sehr unterstützt und hatten immer ein offenes Ohr, wofür ich sehr dankbar bin. Darüber hinaus möchte ich Isabell Floherschütz und Nadine Yurdagül-Hemrich für die wöchentlichen Kardiomyozytenpräparationen danken, die eine essentielle Basis für zahlreiche Experimente darstellten. Simon Leierseder möchte ich außerdem für die immense Unterstützung bei der automatisierten Zellgrößenbestimmung danken. Ohne ihn wäre diese Methode sicherlich nicht in dieser ausgereiften Form in der Arbeitsgruppe etabliert worden. Bernhard Lagerbauer danke ich neben der wertvollen Zusammenarbeit bei meiner Erstautor Publikation für seine zahlreichen Tipps und Ratschläge in allen Belangen, mit der er mich und die Gruppe wesentlich bereichert hat. Jayavarshni Ganesan danke ich für die Einrichtung von hilfreichen Datenbanksystemen. Ihr und Yassine Sassi danke ich außerdem für die Bearbeitung von miRNA Projekten, die aus dem beschriebenen *Screen* hervorgegangen sind. Astrid Vens, Sabine Brummer und Lydia Vlaskin danke ich für die wirklich professionelle Zusammenarbeit und die schöne Zeit auf Labor- oder privaten Ausflügen.

Der Pathologie des Helmholtz Zentrums, insbesondere Frau Prof. Dr. Esposito und Frau Dr. Calzada-Wack, möchte ich für die konstruktive Zusammenarbeit bei der morphologischen Analyse von Geweben und Organen der PI16-defizienten Tiere und der immunhistochemischen Lokalisationsstudie zum PI16 Protein danken.

Dass ich soweit gekommen bin, verdanke ich zu einem sehr großen Teil meinen Eltern und meinem Bruder. Sie haben mir immer alle Möglichkeiten offen gehalten und mich bei meinen Entscheidungen ausnahmslos unterstützt. Gerade in den schwierigen Phasen haben sie mir immer wieder den Rücken gestärkt, wofür ich Ihnen unglaublich dankbar bin. Christoph danke ich außerdem für seine optimistische Lebenseinstellung und Unbeschwertheit, mit der er mir ständig ein Vorbild ist. Ohne ihn wären die schwierigen Phasen noch sehr viel schwieriger gewesen. DANKE!

11 PUBLIKATIONEN

Ahmet Ucar^{1,2,*}, Shashi K. Gupta^{3,*}, Jan Fiedler³, Erdem Erikci¹, Michal Kardasinski³, Angelika Holzmann³, Claudia Bang³, **Claudia Jentsch**⁴, Stefan Engelhardt^{4,5}, Sabine Geisendorf¹, Carolina Glas², Thomas G. Hofmann², Karsten Richter⁶, Mario Schiffer^{7,8}, Johann Bauersachs⁹, Kamal Chowdhury^{1,#}, and Thomas Thum^{3,10,#}. The miRNA-212/132 family regulates cardiac hypertrophy and autophagy. *Submitted*.

Jentsch, C., Leierseder, S., Loyer, X., Flohrschutz, I., Sassi, Y., Hartmann, D., Thum, T., Lagerbauer, B. & Engelhardt, S. A phenotypic screen to identify hypertrophy-modulating microRNAs in primary cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* (2011).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Identifizierung und Charakterisierung funktionell relevanter kardialer Faktoren“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

München, 26.09.2011 _____

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Identification and characterization of functionally relevant cardiac factors“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

München, 26.09.2011 _____