Physiologische und molekularbiologische Untersuchung der kardialen miR-1 und miR-133a miRNA Cluster in der Maus (*Mus musculus*)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Justus-Liebig-Universität Gießen Fachbereich 08 (Biologie und Chemie)

> vorgelegt von Angela Bachmann aus Leisnig Dezember 2010

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung (W.G. Kerckhoff Institut) in Bad Nauheim angefertigt

Dekan :	Prof. Dr. Volkmar Wolters
1. Gutachter:	Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn
2 Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Thomas Braun

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Wert davon, daß man zeitweilig eine strenge Wissenschaft streng betrieben hat, beruht nicht gerade in den Ergebnissen: denn diese werden, im Verhältnis zum Meere des Wissenswerten, ein verschwindend kleiner Tropfen sein. Aber es ergibt einen Zuwachs an Energie, an Schlußvermögen, an Zähigkeit der Ausdauer; man hat gelernt, einen Zweck zweckmäßig zu erreichen. Insofern ist es sehr schätzbar, in Hinsicht auf Alles, was man später treibt, einmal ein wissenschaftlicher Mensch gewesen zu sein.

(Nietzsche, aus: Menschliches, Allzumenschliches)

INHALTSVERZEICHNIS

1 EI	NLEITUNG	8
1.1	MicroRNAs	8
1.1.1	Prozessierung von miRNAs	9
1.1.2	Interaktion von mRNAs und miRNAs	9
1.1.3	Nomenklatur der microRNAs1	2
1.2	MicroRNAs in Herz- und Skelettmuskelzellen12	2
1.2.1	miR-1 und miR-133a als muskelspezifische microRNAs: myoMirs1	3
1.2.2	MiR-1 und 133a während der Herzentwicklung1	5
1.3	MicroRNAs und Herzschlag 1	6
1.3.1	Entstehung des Herzschlages1	6
1.3.2	Analyse des Herzschlages1	7
1.3.3	Einfluss von miR-1 und miR-133 auf kardiale Ionenkanäle1	8
1.4	Zielsetzung der Arbeit 19	9
2 M	ATERIAL UND METHODEN	0
2.1	Materialien	0
2.1.1	Lösungen2	0
2.1.2	Größenstandards2	1
2.1.3	Plasmide und Vektoren2	1
2.1.4	Software/Datenbanken2	1
2.2	Methoden	2
2.2.1	Erzeugung und Handhabung von genetisch veränderten Mäusen2	2
2.2.1.1	Klonierung der Knock out Vektoren	2
2.2.1.2	Maushaltung und -verwendung	3
2.2.1.3	Organentnahmen	3
2.2.2	Bakterienkultur und Verwendung2-	4
2.2.2.1	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	4

2.2.3	Molekularbiologische Standardmethoden	.25
2.2.3.1	Restriktionsverdau	. 25
2.2.3.2	Modifiaktion von DNA Fragmenten	. 25
2.2.4	Analyse von Nukleinsäuren	.26
2.2.4.1	Isolation von Nukleinsäuren	. 26
2.2.4.2	Southern Blot	. 27
2.2.5	Analyse von Genexpression	.29
2.2.5.1	Reverser Transkription und semiquantitative PCR	. 29
2.2.5.2	TaqMan Analyse miRNA	. 30
2.2.5.3	DNA Array Affymetrix	31
2.2.5.4	miRNA Array	31
2.2.6	Whole Mount in situ Hybridisierung WMISH	.33
2.2.6.1	WMISH mit LNA Sonden	. 33
2.2.7	Analyse von Proteinen	.35
2.2.7.1	Extraktion von Proteinen aus Geweben	35
2.2.7.2	Anreicherung von Membranproteinen	36
2.2.7.3	Western Blot: Elektrophorese von Proteinen in NuPAGE Gelen	36
2.2.7.4	Nachweis von Proteinen nach Western Blot	. 37
2.2.7.5	SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture)	. 38
2.2.8	Histologie	.43
2.2.8.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	43
2.2.8.2	Anfertigung von Cryoschnitten	43
2.2.8.3	H&E-Färbung (Hämatoxylin/Eosin)	. 44
2.2.8.4	Immunhistologie	. 44
2.2.8.5	LacZ Färbung von Organen und Schnitten	45
2.2.9	Zellkultur von murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen)	.46
2.2.9.1	Medien und Lösungen für die mES Zellkultur	46

2.2.9.2	Kultur der Feeder-Zellen
2.2.9.3	Kultur von murinen ES-Zellen
2.2.10	Elektrokardiogramm (EKG) Messungen an Mäusen50
2.2.10.1	Aufnahme eines EKGs 50
2.2.10.2	2 Telemetrische EKG Messung 50
2.2.10.3	Analyse der ermittelten EKG-Daten 51
2.2.11	MRT Messung an Mausherzen
3 Er	GEBNISSE
3.1	Generierung von miRNA Knock-Out Mäusen 54
3.1.1	Knock-out miRNA Cluster miR-1-2/miR-133a-154
3.1.2	Knock-out miRNA Cluster miR-1-1/miR-133a-2
3.2 1	miR-1 und miR-133a sind in den KOs um die Hälfte reduziert 58
3.2.1	MicroArray der microRNAs
3.2.1.1	TaqMan Real Time PCR
3.3	Histologische Untersuchungen der miR-KO Cluster
3.3.1	miR1/133a- Cluster KO zeigt keine histologischen Veränderungen60
3.3.2	LacZ Expression in Locus von miR-1-1/133a-260
3.3.3	miRNA <i>in situ</i> Hybridisierung in beiden miR1/133a Cluster KOszeig unterschiedliche Muster
3.4	Physiologische Analyse der Einzel-Cluster KO 64
3.4.1	miR-1/133a KO Tiere zeigen keine Veränderungen im MRT64
3.4.2	Verlust der miR-1/133a Cluster führt zu LongQT Phänotyp66
3.5	Molekulare Analyse 69
3.5.1	Veränderte Genexpression nach Deletion von miR-1 und miR-133a69
3.5.1.1	Die Expression von vorausgesagten Ziel-mRNAs ist in den KOs nur teilweise verändert
3.5.2	Veränderte Proteinexpression nach Deletion miR-1 und miR-133a70

3.5.3	Veränderte Expression von LongQT-assoziierten Genen und Proteinen 70
3.5.4	Untersuchungen zum β-adrenergen Signalweg75
3.5.4.1	Die kardiale cAMP Konzentration im WT und KOs ist gleich
3.5.4.2	2 Differentielle Expression von Genen des β -adrenergen Signalweges 77
3.5.4.3	B Differentielle Expression von Proteinen des β -adrenergen Signalweges 77
3.6	Verlust beider miR-1/133a Clustern führt zu embryonaler Letalität 78
4 E	DISKUSSION
4.1	Expression von miR-1/133a
4.2	Verlust von miR-1/133a
4.3	Morphologische und histologische Veränderungen nach Deletion der miR-
	Cluster
4.4	Veränderte Gen-Expression nach Deletion der miR-1/133a Cluster 88
4.5	Veränderte Proteinexpression nach Deletion
4.6	Elektrophysiologische Veränderungen der miR-1/133a KO Tiere
4.6.1	Kammererregung- QT Dauer und LongQT93
4.6.2	Einfluss des β-adrenergen Signalweges auf QT Dauer97
5 Z	USAMMENFASSUNG
6 A	NHANG
6.1	Verwendete DNA Oligomere für PCR
6.2	Abkürzungsverzeichnis 100
6.3	Gene und Proteine 101
6.4	Affymetrix Analyse der miR-1/133a KOs 102
7 L	ITERATUR
Dank	xsagung
EIDES	STATTLICHE ERKLÄRUNG114

1 EINLEITUNG

1.1 MicroRNAs

Als Rosalind Lee und Rhonda Feinbaum 1993 bei Untersuchungen der Larvalentwicklung von C. elegans lin4 entdeckten, stellten sie fest, dass dieses Gen nicht für ein Protein codiert, dass das Fehlen dieser RNA aber zu einem Defekt während dem Übergang von einem Larvalstadium zum nächsten führt. Es wurden zwei Transkripte gefunden, die eine Länge von 61 nt und 22 nt aufwiesen. Diese Fragmente enthielten komplementäre Bereiche zur 3' UTR (untranslatierte Region der mRNA) des Genes lin14 (Lee et al, 1993). Diese Moleküle wurden zunächst als stRNA, "small temporal", also "kleine zeitlich begrenzte" RNAs bezeichnet. Erst 2001 wurde deutlich, dass es weitere kleine RNA Molekülen gibt, die nicht für Proteine codieren, sondern regulatorische Eigenschaften aufweisen (Lagos-Quintana et al, 2001; Lau et al, 2001). Diese endogenen RNAs wurden schließlich auch bei anderen Tierstämmen, Pflanzen, in Algen, Pilzen und Viren nachgewiesen. In weiteren Arbeiten wurde deutlich, dass microRNAs (Abkürzung: miR-NAs) wichtige Rollen in vielen biologischen Prozessen spielen, unter anderem während der Embryonalentwicklung und des Wachstums, aber auch bei der Entstehung von Krebs.

microRNAs sind kurze einzelsträngige RNA Moleküle, mit einer Länge von 18-22 nt (Bartel, 2004). Die Basenfolge des 2.-7. Nukleotids am 5' Ende der miRNA bezeichnet man als Seed-Sequenz. Dieser Bereich spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Ziel-mRNA (Lewis et al, 2003). Eine bestimmte miRNA kann an viele Ziel-mRNAs binden und so deren Translation beeinflussen (Lim et al, 2005). MicroRNAs werden in allen Zellen und Geweben synthetisiert, wobei verschiedene Zelltypen verschiedene Kombinationen von miRNAs aufweisen (Thomson et al, 2004). Stammzellen exprimieren andere microRNAs als adulte Zellen, und während der Embryonalentwicklung verändert sich das Expressionsmuster der miRNAs im Embryo, abhängig vom Entwicklungsstadium (Wienholds et al, 2005). Der Verlust aller miRNAs führt bei Mäusen zu embryonaler Letalität (Bernstein et al, 2003)

1.1.1 Prozessierung von miRNAs

MiRNAs können in Introns von Genen oder zwischen Genen lokalisiert sein. Sie können einzeln transkribiert werden oder als miRNA-Cluster. Die Synthese von miRNA-Transkripten erfolgt durch die RNA Polymerase II oder III (Borchert et al, 2006; Lee et al, 2004). Das Primärtranskript enthält neben der 7-Methylguanosin-Kappe am 5' Ende und einem PolyA-Schwanz am 3' Ende (Cai et al, 2004) eine (monocystronisch) oder mehrere (polycistronisch, bei miRNA Clustern) primäre miRNA-Schleifen. Diese Schleifen werden von dem RNAseIII Enzym Drosha und weiteren Partnern des Proteinkomplexes (u.a. Pasha/DGCR8; zusammen bilden diese Proteine den sogenannten Mikroprozessor-Komplex) im Zellkern aus dem Transkript herausgeschnitten und es entsteht die haarnadelförmige prä-miRNA (Lee et al, 2003). Durch das Enzym Exportin5 wird das Molekül in einem GTP-abhängigen Transportvorgang in das Zytoplasma der Zelle transportiert (Yi et al, 2003).

Im Zytoplasma wird die prä-miRNA im RLC (RISC Loading complex, bestehend aus den Proteinen Dicer (DCR), TRBT, PACT und AGO2) gebunden, und die Schleife der Haarnadelstruktur von Dicer entfernt. So entsteht ein doppelsträngiger miRNA Duplex, mit je zwei überhängenden Nukleotiden an den 3' Enden (Hutvagner et al, 2001; Ketting et al, 2001). Der RLC dissoziiert und die noch doppelsträngige miRNA wird von einer Helikase entwunden (Chu & Rana, 2006; Salzman et al, 2007). Ein Strang des RNA Duplexes wird zur reifen, maturen, microRNA, der komplementäre Strang wird in den meisten Fällen degradiert (Schwarz et al, 2003). Aus einigen miRNA-Duplexen werden beide Stränge zu einer funktionellen miRNA (Czech et al, 2009, Okamura et al, 2009). Die funktionelle miRNA wird in den RISC eingebaut kann dann ihre Ziel-mRNAs regulieren. (Abbildung 1).

1.1.2 Interaktion von mRNAs und miRNAs

Erste Arbeiten zur Funktionsweise von miRNA zeigten, dass zwar die Menge an Ziel-Protein der miRNAs herabgesetzt war, dass aber die Menge an mRNA unverändert blieb (Wightman et al, 1993). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass miRNA und deren Ziel-mRNA co-lokalisiert in Polyribosomen vorkommen.



Deswegen wurde vermutet, dass die miRNA die Expression auf posttranslationeller Ebene beeinflusst (Maroney et al, 2006; Nottrott et al, 2006).

Abbildung 1 Der microRNA Prozessierungsweg

Das von der RNA-Polymerase II/III hergestellte Primärtranskript wird nach erster Spaltung durch den Mikroprozessor Drosha/DGCR8 zur pre-miRNA, die dann durch GTP abhängigen Transport von Exportin5 ins Zytoplasma transportiert wird. Dort tritt die RNA mit Dicer im RISC (RNA induced silencing complex) in Kontakt und das RNAse III Enzym Dicer (aus Winter et al, 2009)

Der Kontakt von mRNA und miRNA wird über den Proteinkomplex RISC (RNA induced silencing complex) vermittelt. Dieser Proteinkomplex besteht aus mehreren Proteinen und RNA Molekülen und ist das Schlüsselelement im RNAi–Weg, der letztendlich zum Abbau bzw. zur Destabilisierung der RNA dient. Die Struktur des RISC wurden in S2 *Drosophila* Zellen untersucht, wobei verschiedene Proteine beschrieben werden konnten (Caudy & Hannon, 2004). RISC besteht aus mindestens einem Vertreter der Argonaute Protein Familie, welches den Kontakt der miRNA zur mRNA vermittelt. Die mRNA wird in dem Komplex zur miRNA geführt und bei vollständiger Komplementarität von miRNA Sequenz zur mRNA Sequenz findet ein Abbau der mRNA statt. Unvollständige Komplementarität führt zur Hemmung der Translation durch den Proteinkomplex, bzw. zur Deadenylierung der mRNA und somit zur Destabilisierung. Die Initiation der Translation wird durch verschiedene Proteine (eukaryotische Initiationsfaktoren eIFs) aktiviert. Die Bindung der Protein-Komplexe eIF3 und eIF4F an die 5'-Kappe der mRNA führt zur Bildung des prä-Initiationskomplexes (Lamphear et al, 1995), die schließlich zur Beladung des ersten Triplets AUG mit Methionin-tRNA führt und die Translation startet. Andere Wechselwirkungen zwischen den Proteinen des Inititationskomplexes und Poly(A)-bindenden-Proteinen führen aber auch zur Zirkularisierung der mRNA, sodass das 3' Ende in Nähe des 5' Endes der mRNA kommt (Wells et al, 1998). So kann die Bindung von regulatorischen Sequenzen (z.B. am 3' Ende der mRNA, die Initiation der Translation am 5' Ende der beeinflussen (Gebauer & Hentze, 2004). Eine weitere Möglichkeit, wie Faktoren am 3' Ende den Start der Translation beeinflussen, beschreibt die Wechselwirkung von RISC Proteinen mit der 5'-Kappe der mRNA. Es konnte gezeigt werden, dass eine modifizierte 5'-Kappe die Effizienz des RNAi Weges senken kann (Mathonnet et al, 2007). Das im RISC vorhandene Protein Ago2 weist ein Protein-Motiv auf, das die 5'-Kappe der mRNA erkennt und binden kann. Durch die am 3' Ende der mRNA gebundene miRNA ist Ago2 an die mRNA spezifisch gebunden, der Kontakt zum Translation-Initiationskomplex wird über die Bindung von AGO2 zur 5'-Kappe erzielt. Somit verhindert AGO2 die Bindung der Inititaionsfaktoren und verhindert so die Translation (Kiriakidou et al, 2007).

Genomweite MicroArray basierte Analysen zeigten, dass eine miRNA mehr als eine Ziel-mRNA reguliert, und dass die Stabilität der mRNA beeinflussbar war (Lewis et al, 2003). Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Rolle von miR-430 bei der Midblastula Transition des Zebrabärblings: maternale Gene werden abgeschaltet, es werden ab diesen Zeitpunkt zygotische Gene exprimiert. Giraldez et al. konnten zeigen, dass miR-430 direkt hunderte von maternal exprimierten Genen reguliert, unter anderem durch De-Adenylierung und somit Destabilisierung der mRNA (Giraldez et al, 2006). So bewirkt eine einzelne miRNA dass ein ganzes Set von mRNAs degradiert wird und keine weiteren Proteine von diesen mRNAs synthetisiert werden. Mittlerweile werden auch Modelle beschrieben, die die Bindung von miRNA an die 3' UTR sowie 5' UTR und damit verbundene translationelle Repression zeigen (Lytle et al, 2007), als auch die Möglichkeit, dass eine miRNA gleichzeitig an beide UTRs bindet, und so eine Brücke bildet (miRBridge; (Lee et al, 2009)). MicroRNAs können ebenso im Proteincodierenden Teil der mRNA binden und so die Translation beeinflussen (Rigoutsos et al, 2009).

1.1.3 Nomenklatur der microRNAs

Der Name für eine MicroRNA beginnt mit einem drei- oder vierbuchstabigem Kürzel, der die Spezies bezeichnet (z.B. "mmu" für Mus musculus, "hsa" für Homo sapiens). Die mature Form wird mit "miR" bezeichnet, während für die Vorläufer Haarnadelform "mir" verwendet wird. MicroRNAs werden durchnummeriert, wobei gleiche Ziffern bei unterschiedlichen Spezies auf orthologe Sequenzen hinweisen. Ein an die Zahl angefügter Kleinbuchstabe benennt paraloge Sequenzen, sofern sich diese nicht um mehr als zwei Basen voneinander unterscheiden (miR-133a und miR-133b). Sind im Genom zwei microRNAs codiert, die beide dieselbe mature Sequenz aufweisen werden sie durch eine weitere Zahl unterschieden (miR-1-1 und miR-1-2). Es gibt auch prä-microRNAs, die sowohl im 3' Bereich als auch im 5' Bereich microRNAs codieren. Diese miRNAs werden dann durch "-5p" und "-3q" unterschieden (miR-17-5p und miR-17-3q) (Griffith-Jones et al, 2005).

1.2 MicroRNAs in Herz- und Skelettmuskelzellen

In Expressionsanalysen mittels miRNA-MicroArray-Chips konnte der Nachweis erbracht werden, dass einige miRNAs ubiquitär exprimiert werden, andere miR-NAs nur in bestimmten Organen vorkommen. So wurde das Vorhandensein von miR-1 und miR-133a im Herzen und Skelettmuskel nachgewiesen, jedoch nicht in anderen Geweben wie Lunge oder Niere (Thomson et al, 2004).

Weitere Analysen zeigten, dass sie Herz- und Skelettmuskelzellen in ihrer Expression von miRNAs unterscheiden. So wird miR-1/133a zwar in beiden Zelltypen transkribiert, das Cluster miR206/133b wird aber ausschließlich in Skelettmuskelzellen exprimiert (Beuvink et al, 2007; Kim et al, 2006). Weitere miRNAs werden momentan als sogenannte myoMirs diskutiert (McCarthy, 2008). So wurde z.B. miR-138 als miRNA im Ventrikel des Zebrafisches beschrieben (Morton et al, 2008).

1.2.1 miR-1 und miR-133a als muskelspezifische microR-NAs: myoMirs

Im Genom der Maus befinden sich zwei Bereiche, die sowohl miR-1 als auch miR-133a kodieren. Auch andere Organismen weisen eine redundante miRNA Expression für miR-1 und miR-133a auf. So ist auch beim Menschen miR-1-1 und 133a-2 als Cluster auf Chromosom 20 und miR-1-2 und miR-133a-1 auf Chromosom 18 doppelt vorhanden. Ebenfalls findet man diese Redundanz beim Schimpansen (*Pan troglodytes*) und Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), nicht aber beim Orang Utah (*Pongo pygmaeus*). Ebenso tritt die Verdopplung beim Hausrind (*Bos taurus*) und Pferd (*Equus caballus*) auf. Beim Hühnchen (*Gallus gallus*) wurden vier miR-1 Formen entdeckt (miR-1-a-1, 1a-2, 1b und 1c) und dazu vier miR-133 Formen (miR-133a-1, a-2, b und c). Als Cluster liegen miR-1-2/133-a-1 und miR-1b/133c vor. Die Wanderratte (*Rattus norvegicus*) als Vertreter der Unterfamilie *Murinae* ein Verwandter der Maus, zeigt keine Verdopplung des miR-1/133 Clusters. Das Cluster miR-206/133b, welches in Skelettmuskelzellen exprimiert wird, findet sich bei allen erwähnten Gattungen.

MiR-1-1 und 133a-2 der Maus sind auf Chromosom 2 außerhalb bekannter Gene lokalisiert, zwischen beiden miRs befindet sich ein Bereich von 9,3 kb. MiR-1-2 und miR-133a-1 befindet sich in *antisense* Orientierung im Intron zwischen dem zwölften und 13. Exon von *mib1 (mindbomb)*, getrennt von einem Bereich von 2,5 kb.

Die Expression von miR-1 und miR-133a (und miR206) kann in vitro während der Differenzierung von C2C12 Myoblasten zu Myotuben (Myogenese) bereits zwei Tage nach Induktion der Differenzierung detektiert werden. Die Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin treiben die Expression der microRNAs an (Rao et al, 2006). Beide miR-1/133a-Cluster können außerdem durch Bindung des Transkriptionsfaktors SRF (Serum response factor) aktiviert werden (Zhao et al, 2005). Für das miR-1-2/133a-1 Cluster konnte im intragenischen Bereich ein Bindungsmotiv für Mef2 nachgewiesen werden, welches die Expression des Bereiches unterstützt (Liu et al, 2007). Die genannten Transkriptionsfaktoren sind Aktivatoren des muskelspezifischen Differenzierungsweges. Überexpression von miR-1 in C2C12 Zellen verstärkt Myogenese, es werden verstärkt muskelspezifische Gene wie β -Myosin schwere Kette (β -MHC) oder MyoD exprimiert und die Proliferationsrate sinkt. Den umgekehrten Fall erhält man, wenn miR-133a überexprimiert wird: die Proliferationsrate der Myoblasten erhöht sich, die Expression muskelspezifischer Gene wird reduziert. Beide Effekte lassen sich durch Blockierung der microRNAs zeigen: Blockierung von miR-133 führt zu erhöhter Synthese muskelspezifischer Gene (Chen et al, 2006). Das in Abbildung 2 gezeigte Modell fasst diese Aussagen zusammen: miR-1 wirkt auf die Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben während miR-133 die Proliferation von Myoblasten fördert.



Abbildung 2 Model von miR-1 und miR-133 vermittelter Regulation von Proliferation und Differenzierung der Skelettmuskeln

Gewebsspezifische Expression von miR-1 und miR-133 wird durch SRF und myogene Transkriptionsfaktoren wie MyoD reguliert. Die microRNAs wiederum regulieren ihre Zielgene SRF und HDAC4 (aus Chen et al, 2006)

1.2.2 MiR-1 und 133a während der Herzentwicklung

Das Herz ist das erste Organ, welches in der Embryonalentwicklung entsteht. Ab Tag E7.5 wandern Zellen aus dem Mesoderm durch die Organisatorregion und dem Primitivstreifen und werden zu zukünftigen Herzzellen. Diese Zellen mesodermalen Ursprungs werden als primäres Herzfeld bezeichnet. Sie bilden unterhalb der Kopffurche eine halbmondförmige Herzanlage, dessen Zellen frühe herzspezifische Transkriptionsfaktoren wie Gata4, Nkx2.5, Mef2c oder Hand1/ Hand2 exprimieren. Die Zellen des Halbmonds proliferieren und schließen sich zum Herzschlauch zusammen. Weitere Zellen wandern aus dem Bereich hinter dem Herzschlauch nach anteriorer und posteriorer Richtung. Der Herzschlauch beginnt zu dem Zeitpunkt eine Rechts-Drehung zu vollführen (*looping*). Diese Zellen gehören dem sekundären oder anterioren Herzfeld an, und sind Vorläufer des späteren Ausflusstraktes und rechten Ventrikels.

Expressionsanalysen mit LacZ-Konstrukten unter der Kontrolle der umgebenden genomischen Bereiche von miR-1-1 bzw. miR-1-2 zeigen, dass während der Mausentwicklung ab Tag E8.5 miR-1-1, ebenso wie miR-1-2, in der inneren Schleife des sich entwickelnden Herzens auftritt. In der weiteren Entwicklung wird diese Expression auf Ventrikel und Atrien ausgedehnt, weiterhin kann die Expression ab Tag E9.5 ebenfalls in den Somiten nachgewiesen werden (Zhao et al, 2005).

Der Verlust von miR-1-2 führt zur Fehlregulierung von Hand2, ein Transkriptionsfaktor, der im sekundären Herzfeld exprimiert wird. Hand2 spielt eine Rolle bei der Ausbildung des intraventrikulären Septums sowie der Ausbildung des rechten Ventrikels. Durch den Verlust von miR-1 findet eine erhöhte Synthese von HAND2 statt, das dann wiederum zu Defekten der Septumbildung führt. Etwa 50% der miR-1-2 defekten Tiere sterben kurz vor oder nach der Geburt. Überexpression von miR-1 führt ebenfalls zu Entwicklungsstörungen des Herzens. Die Tiere sterben am Tag E13.5. Die Proliferation der Ventrikelzellen ist eingeschränkt (Zhao et al, 2005).

1.3 MicroRNAs und Herzschlag

1.3.1 Entstehung des Herzschlages

Der Herzschlag ist die rhythmische Bewegung der gesamten Muskelmasse, die durch die Kontraktion und Relaxation der einzelnen Kardiomyozyten entsteht. In jeder Zelle muss dazu ein Aktionspotential (AP) generiert und ausgelöst werden. Die Steuerung dieser Aktivität wird von der Schrittmacherregion kontrolliert. In den Zellen des primären Schrittmachers (Sinoatrialknoten) wird ein AP generiert und durch elektrische Kopplung der Kardiomyozyten weitergeleitet. Der elektrische Impuls wird beginnend von Sinusknoten an der Basis des Herzens über den Atrioventrikulär-Knoten in die Ventrikel weitergeleitet. Von da leiten Strukturen wie die Purkinje-Fasern und Hiss'sche Bündel das Signal über die Ventrikel.

Das Schrittmacherpotential ist autogen: es wird ausgelöst indem die K⁺- Leitfähigkeit abnimmt aber die Na⁺- Leitfähigkeit gleichbleibt. Dadurch kommt es zum Einstrom von Na⁺-Ionen, die zu einer stärkeren Depolarisation und somit weiteren Erhöhung der Na-Leitfähigkeit führen (Hodgkin-Zyklus), bis schließlich das Aktionspotential ausgelöst wird.

Die elektrische Erregbarkeit und das generierte Aktionspotential in Herzmuskelzellen unterscheiden sich von denen der Schrittmacherregion. Die Na⁺-Leitfähigkeit vor der Depolarisation ist erhöht. Die Repolarisationsphase weist nach kurzer Repolarisation ein Plateau auf. Dies ist nötig, um die Kardiomyozyten im kontrahierten Zustand zu halten. So wird gewährleistet, dass das gesamte Kammermyokard kontrahiert ist, und das Blut ausgetrieben ist, bevor die nächste Kontraktion einsetzt. Dieses Plateau wird hauptsächlich durch Ca²⁺ Ionen getragen. Im Maus-Herz ist die Plateau-Phase nicht stark ausgeprägt.

Die Repolarisation wird hauptsächlich durch K⁺- Ströme getragen, die durch spannungsabhängige Kaliumkanäle erzeugt werden. Die wichtigsten Kalium-Ströme sind der transient auswärtsgerichtete Strom (I_{to}) und der verzögert gleichgerichtete Strom (I_K). Diese Bezeichnungen der Ströme können nur als Oberbegriffe angesehen werden, elektrophysiologisch lassen sie sich weiter aufteilen und unterschieden. (u.a. $I_{to,s}$ (slow) und $I_{to,f}$ (fast), sowie I_{Kr} , I_{Ks} und weitere) (Nerbonne et al, 2001). Die Kontraktion der Kardiomyozyten wird durch Ca²⁺ erreicht. Man spricht von Erregungs-Kontraktions-Kopplung. Durch den Na Einstrom kommt es zu einer Spannungsänderung, die das Öffnen der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle (*L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel*, LTCC) bewirkt. Dadurch öffnen sich intrazelluläre Ca²⁺- Kanäle (z.B. Ryanoidinrezeptor 2) des sarkoplasmatischen Retikulums und weiteres Ca²⁺ strömt in die Zelle. Durch diesen Ca²⁺-induzierte Ca²⁺ Freisetzung verändert sich die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von anfangs 10 mol/l auf 10 mol/l. Durch die Bindung des freien Ca²⁺ an Troponin C wird die Kontraktionsmaschinerie ausgelöst (Carafoli et al, 2001). Das Ende der Kontraktion wird durch das Herauspumpen des freien Ca²⁺ durch die Ca²⁺-ATPase SERCA, den Natrium-Calcium Austauscher NCX, sowie mitochondriale Ca²⁺-Transporter herbeigeführt.

Der Herzschlag wird durch das vegetative Nervensystem beeinflusst. Durch das parasympatische Nervensystem wird über die Transmitterstoffe Acetylcholin die Herzfrequenz gesenkt (negativ chronotrop) Da die cholinergen Fasern des *Nervus Vagus* auch den Sinusknoten und Atrioventrikulärknoten innervieren, wird nicht nur die Herzfrequenz vermindert sondern ebenso die Überleitungsgeschwindigkeit am Atrioventrikulären Knoten (positiv dromotrop). Positiv chronotrope und positiv inotrope (Kontraktionskraft) Effekte werden durch das Sympathische Nervensystem mit den Transmittern Adrenalin und Noradrenalin vermittelt. Die Erhöhung der Herzfrequenz wird durch den Einfluss der adrenergen Stimulanzien auf die Schrittmacherregion erzielt, die erhöhte Schlagkraft resultiert aus der Wirkung aller Myokardzellen.

1.3.2 Analyse des Herzschlages

Der Schlag des Herzens kann mit Hilfe eines Elektrokardiogramms untersucht werden (Abbildung 3). Dabei handelt es sich um eine Methode, die Potentialänderungen, die in den einzelnen Myokardzellen entstehen aufzeichnet.

Man unterscheidet zwischen Wellen und Strecken. Die P-Welle zeigt die De- und Repolarisation der Atrien, die PQ-Strecke ist ein Ausdruck über die atrioventrikulkäre Erregungsausbreitung. Der QRS-Komplex zeigt den Beginn und die Ausbreitung der Ventrikelerregung an, diese endet mit der Erregungsrückbildung der Ventrikel, die im EKG als T-Welle dargestellt ist. Die QT-Dauer umfasst die Dauer der Kammererregung, vom Einsetzen der Depolarisation (Q-Zacke) bis zum Ende der Repolarisation (Ende der T- Welle).



Abbildung 3 Elektrokardiogramm Schema eines EKGs, aus http://www.davita.de/mobiles-ekg.html

1.3.3 Einfluss von miR-1 und miR-133 auf kardiale Ionenkanäle

Die bisher bekannte miR-1-2 KO Maus zeigt Veränderungen im Elektrokardiogramm. Die Gruppe um Zhao zeigt, dass die Tiere einen verlängerten QRS Komplex aufweisen und einige Tiere plötzlich sterben. Diesen Effekt führen sie auf eine verminderte Expression von *Kcnd2* zurück. Die Expression von *Kcnd2* wird durch den Transkriptionsfaktor IRX5 kontrolliert, der wiederum ein Zielgen von miR-1 darstellt. Somit kann durch den Verlust von miR-1 die Translation von *Irx5* verstärkt werden, was dann zur Verminderung von *Kcnd2* und so zur Verlängerung des QT Intervalls führt (Zhao et al, 2007; Costantini et al, 2005).

Der Einfluss von miR-1 und miR-133 auf Kanäle des auswärtsgerichteten Stromes I_{to} wurde in Zellkultur-Experimenten untersucht. So wurde gezeigt, dass *Kcne1* ein Zielgen von miR-1 ist und *Kcnq1* Bindestellen für miR-133 aufweist. Der Verlust beider miRNAs könnte somit *in vivo* zur erhöhten Synthese beider Kanäle und damit zu veränderten Kalium-Strömen im Herzen führen (Luo et al, 2007).

In Herzen von Diabetes Patienten konnte ebenfalls eine vermehrte Abundanz von miR-1 und miR-133 nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigen diese Herzen eine verminderte Proteinmenge von hERG auf, einem Kanal der ebenfalls für den I_{to} -Strom ursächlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass miR-133 Bindungsstellen auf der 3' UTR von hERG besitzt und in vitro die Translation inhibieren kann (Xiao et al, 2007). So ist eine weitere Möglichkeit gezeigt worden, wie kardiale miRNAs Einfluss auf die Erregung und somit den Herzschlag ausüben können.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, Mäuse zu generieren, denen die Muskel/Herz-spezifischen microRNAs miR-1 und miR-133a fehlen und diese Tiere physiologisch, histologisch und molekularbiologisch zu untersuchen.

Es wurde zunächst entschieden, Mäuse zu generieren, in denen je ein Cluster von miR-1/133a entfernt wurde. Diese beiden Einzel-Cluster-KO sollten dann untereinander verpaart werden, um die Deletion der Gesamtheit von miR-1 und miR-133a zu erzielen.

Mittels *Affymetrix*-MicroArray Technologie wurden veränderte Expression von Genen gefunden, die eine Rolle bei der Reizweiterleitung im Herzen spielen. Diese molekularen Befunde sollten dann physiologisch mittels Elektrokardiogramm untersucht und verifiziert werden. Dazu wurde eine Kooperation mit Prof. B. Fleischmann und Dr. P. Sasse an der Universität Bonn eingegangen, die weitere elektrophysiologische Untersuchungen vornahmen.

Durch die Deletion eines Clusters konnte das Expressionsmuster des jeweils anderen durch in situ Hybridisierung mit speziellen Sonden dargestellt werden. So konnten Angaben zur räumlichen und zeitlichen Expression von miR-1-1 und miR-1-2 gemacht werden.

Die Verpaarung der beiden Einzelcluster-KO zeigte, dass der komplette Verlust von miR-1 und miR-133a dazu führt, dass keine lebenden Nachkommen geboren wurden. Die weitere Analyse sollte dann durch histologische und molekularbiologische Untersuchungen zeigen, wie der Verlust der microRNA die Entwicklung stört und so zur Letalität führt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Spezielle Chemikalien werden besonders erwähnt. Wenn nicht anders angegeben wurden die Lösungen in ddH₂O angesetzt. Hier erwähnt werden ausschließlich Standard-Lösungen. Spezielle Lösungen und Reagenzien stehen den einzelnen Protokollen voran.

MAB: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5

NTMT: 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1 % Tween-20, pH 9,5

PFA 4%: 4 g Para-Formaldehyd in 100 ml PBS

PBS 20x: 160 g NaCl (2,7 M), 4 g KCl (100 mM), 26,94 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (200 mM) (oder 21,48 g Na₂HPO₄), 1,95 g NaH₂PO₄ x H₂O (14,1 mM), 4 g KH₂PO₄ (40 mM)

PBT: 1x PBS, 0,1% Tween-20

20 x SSC: 3 M NaCl, 300 mM NatriumCitrat, pH 7,0 (für Blot-Hybridisierung), pH 4,5-5 für *Whole mount Hybridisierung*

SSCT: 1x SSC, 0,1% Tween-20

TE: 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA

T¹/₁₀**E**: 10 mM Tris pH 8, 0,1 mM EDTA

TBS 10x: 120,5 g Tris, 400 g NaCl, pH 7,4

TBS-T: 100 ml 10x TBS, 1 ml Tween20, 900 ml H₂O

2.1.2 Größenstandards

Proteinmarker: Bio-Rad All Blue, #161-0373 Magic Marker , Invitrogen, #LC 5600 DNA Marker 1 kb ladder: Fermentas, Gene Ruler pUC Marker: pUC Plasmid x Sau3a

2.1.3 Plasmide und Vektoren

pKO Scrambler V901 (Lexicon Genetics) mit DTA Kassette aus pKO SelectDT
V840 (Lexicon Genetics) in RsrII Schnittstelle

• pCRII-TOPO Invitrogen

2.1.4 Software/Datenbanken

LaserGene 6 LabChart 6 ADI Instruments Adobe Photoshop 7 Adobe Illustrator Microsoft Office microRNA.org http://www.microrna.org/microrna/home.do mirBase.org (jetzt MicroCosm.org) http://www.ebi.ac.uk/enrightsrv/microcosm/ htdocs/ targets/v5/ targetScan http://www.targetscan.org/mmu_50/

2.2 Methoden

2.2.1 Erzeugung und Handhabung von genetisch veränderten Mäusen

2.2.1.1 Klonierung der Knock out Vektoren

2.2.1.1.1 MiR-1-1/miR-133a-2 Knock out Konstrukt

Aus dem Cosmid 121L153001Q2 wurde durch Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI ein Bereich von 6,177 kb gewonnen. Dieser wurde in die BamHI Schnittstelle des durch eine DTA Kassette veränderten Vektors pKO Scrambler V901 eingesetzt. In die XhoI Schnittstelle dieses Vektors wurde dann ein 4,0 kb Fragment (mit BamHI, NdeI ausgeschnitten) des Cosmides 1221C12407Q2 eingesetzt. Zwischen die beiden Armen in die AscI Schnittstelle des Vektors wurde eine mit loxP Stellen flankierte Kassette eingefügt, die aus IRES, LacZ-polyA, und pgk-Neo bestand.

2.2.1.1.2 MiR-1-2/miR-133a-1 Knock out Konstrukt

Für dieses Konstrukt erwies es sich als unmöglich, eine Klonierungsstrategie über Restriktionsverdau durchzuführen. Die beiden Arme des KO Vektors wurden aus diesem Grund mittels PCR amplifiziert. Für die Amplifikation der Klonierungsarme wurde die Pfu-Polymerase (Promega, M7741) verwendet. Dieses Enzym weist eine sogenannte proofreading- Aktivität auf, d.h. dass Misinsertionen in den neu synthetisieren Strang durch das Enzym erkannt werden und durch eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität eliminiert werden können. Nach Ligation in den pKO Scrambler V901 + DTA Kassette wurden die eingesetzten Fragmente sequenziert um die DNA Sequenz zu überprüfen.

Der 3' Arm des KO Vektors wurde durch PCR durch die Primer AB15 und AB18 von dem Cosmid 121J01648Q01 amplifiziert, das Fragment in die SmaI Schnittstelle des pKO Scrambler V901+ DTA Kassette eingesetzt. Die Amplifizierung des 5' Bereiches erfolgte mit den DNA Oligomeren AB19 und AB22 von Cosmid 121J01648Q01. Das Fragment wurde in die HpaI Schnittstelle des Vektors eingefügt. Zwischen die beiden Armen in die AscI Schnittstelle des Vektors wurde eine mit loxP Stellen flankierte Kassette eingefügt, die aus IRES, LacZ-polyA, und pgk-Neo-polyA bestand. Die Vektoren wurden in ES Zellen eingebracht, in denen die Homologe Rekombination erfolgte und somit der Einbau der veränderten DNA in das Genom der Zelle (siehe 2.2.9.3.2). Der Rekombinationserfolg wurde mit Southern Blot überprüft (siehe 2.2.4.2). Positive ES-Zell Klone wurden in Blastozysten injiziert.

2.2.1.2 Maushaltung und -verwendung

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei 21°C und 55% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Der Wechsel von Tag zu Nacht erfolgte nach 14 h Helligkeit. Die Tiere wurden mit Wasser und Qualitätsfutter *ad libidum* gefüttert.

Zur Genotypisierung wurden DNA aus Schwanzbiopsien, bzw. Embryosäcken gewonnen. Schwanzbiopsien wurden im Alter von 14-20 Tagen entnommen.

Die Schwanzbiopsien/Embryosäcke wurden in Lyse Puffer (100 mM TrisHCL, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 0,1 µg Proteinase K/ml Lysepuffer (Proteinase K Roth 7156.2)) über Nacht bei 55°C verdaut. Durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 10 min wurden unverdaute Haare und Knorpelreste von der Lösung abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dazu wurde 500 µl Isopropanol gegeben und die Eppendorfgefäße zur Fällung der DNA mehrmals invertiert. Die weitere Fällung der DNA erfolgte bei 20.000 x g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde die DNA in $T^{1}_{10}E$ über Nacht bei 55°C gelöst.

Die DNA wurde anschließend für PCR bzw. Southern Blot eingesetzt.

2.2.1.3 Organentnahmen

Zur Organentnahme wurden die Tier zunächst mit 600 mg Chloralhydrat/kg Körpergewicht betäubt. Nachdem geprüft wurde, ob die Maus auf Schmerzreize keine Reaktion mehr zeigt, wurde der Brustkorb geöffnet und das Herz freigelegt. Zur Perfusion der Maus wurde zuerst mit einer Kanüle PBS in den linken Ventrikel gespritzt, Blut und PBS konnte durch Öffnung im rechten Ventrikel austreten. Für histologische Untersuchungen konnte anschließend 4% PFA perfundiert werden, um eine gleichmäßige und schnelle Fixierung der Gewebe zu erzielen. Die gewünschten Organe wurden anschließend aus der Maus heraus präpariert und weiterbearbeitet.

Zur Entnahme von Embryonen aus trächtigen Weibchen wurde diese durch Genickbruch getötet und der Bauchraum geöffnet. Die Embryonen wurden freipräpariert und anschließend fixiert.

2.2.2 Bakterienkultur und Verwendung

- SOB Medium: 1 Liter: 20 g Baeto-Tryptone, 5 g Baeto-yeast extract, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1M KCl, pH 7 mit KOH einstellen, mit dH₂O auffüllen, autoklavieren
- SOC Medium 10 ml: 9,6 ml SOB Medium, 100 µl 1 M MgCl₂, 100 µl 1 M MgSO₄. 200 µl 1 M Glukose
- Antibiotikum
- *Ampicillin* Natriumsalz Roth, #HP62.x, Stammlösung 50 mg/ml, Arbeitskonzentration 50-100 µg/ml
- *Kanamycinsulfat* Roth, #T832.x, Stammlösung 10 mg/ml, Arbeitskonzentration 100 μg/ml
- *Tetracyclin*-Hydrochlorid Roth #0237.x, Stammlösung 10 mg/ml, Arbeitskonzentration 10-50 µg/ml

Bakterien dienen zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA. Es wurde der Stamm *Escherichia coli* (Stamm XL-blue1) verwendet. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde Bakterien auf LB-Agar Platten (Lennox, Roth #X965.x) ausgestrichen, und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Für größere Mengen an Bakterien (für Plasmid-Präparationen, siehe 2.2.4.1.2) wurden Einzelkolonien in die unten angegebene Menge LB-Medium (Lennox, Roth #964.x) gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

2.2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Zur Transformation mit Plasmid DNA wurde 1 ng Plasmid DNA eingesetzt, zur Transformation mit DNA aus einem Ligationsansatz wurde 2-4 µl Ligationsansatz verwendet. Die DNA-Lösung wurde zu den elektrokompetenten Zellen gegeben und 1 min inkubiert. Die Bakterien wurden in eine Elektroporationsküvette gegeben und im Elektroporator mit den Bedingungen elektroporiert. Die Bakterien wurden sofort in vorgewärmten SOC Medium aufgenommen und bei 37°C 20 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf eine LB-Platte

mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Bei einer Re-Transformation wurde ein Austsrich angefertigt, für eine Transformation einer Ligation wurde die Bakterien bei 1000 rpm 2 min pelletiert und komplett auf eine LB-Agar Platte aufgebracht. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Molekularbiologische Standardmethoden

2.2.3.1 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von z.B. Plasmid oder Cosmid DNA diente zum einen zur Untersuchung des vorhanden Vektors (analytischer Verdau) oder zur Gewinnung von Fragmenten und linearisierten Plasmiden zur weiteren Klonierung. Dazu wurde DNA mit 1-2 u Enzym/µg DNA, 1x Puffer (abhängig vom verwendeten Enzym), 1x BSA (optional, abhängig vom Enzym) versetzt und bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur mind. 3 h inkubiert. Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Jena Bioscience oder NEB (Deutschland) bezogen. Wenn keine weiteren Modifikationen (2.2.3.2) an der DNA vorgenommen werden sollte, wurde der Reaktionsansatz in einem Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert. Für die weitere Verwendung wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten und mit dem High Pure PCR Product Purification-Kit nach Angaben des Herstellers eluiert (Roche, 11 696 505 001).

2.2.3.2 Modifiaktion von DNA Fragmenten

2.2.3.2.1 Klenow Behandlung

Die meisten DNA Restriktionsenzyme produzieren 3' oder 5' Überhänge an der DNA. Diese sind für die weitere Klonierung oft hinderlich. Um diese Überhänge zu eliminieren wurde die DNA nach dem Restriktionsverdau mit Klenow Enzym behandelt. Dabei handelt es sich um eine Untereinheit der DNA Polymerase von E. coli, die sowohl über eine 5'-3'-Polymerase-Funktion, als auch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Somit werden die überhängenden einzelsträngigen DNA Abschnitte aufgefüllt, und es entstehen sogenannte *blunt-ends*.

Dem Restriktionsverdau wurde nach der Inkubation 10 u Klenow Enzym (Promega, M2181) zugegeben und der Ansatz 10 min bei 37°C inkubiert.

2.2.3.2.2 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid DNA

Die Ligation von DNA -DNA erfolgt über eine Phosphodiesterbindung eines 5' Phosphatrestes eines Nukleotides und der 3' OH Gruppe des anderen Nukleotid. Um zu verhindern, dass in einer Ligationsreaktion linearisierte Vektoren religieren, ohne ein Fragment zu intergrieren, wird den linearisierten Plasmiden mit Hilfe des Enzyms CIAP (Calf Intestine Alcalic Phosphatase, Promaga M1821) die 5' Phosphatgruppe hydolysiert. Dazu wird dem Reaktionsansatz (nach Restriktionsansatz und evtl. Klenow Behandlung) 1 u Enzym zugegeben bei 37°C 30 min inkubiert.

2.2.3.2.3 Ligation von DNA Fragmenten und Plasmiden

Die Vektor DNA und die Insert DNA wurden zusammen mit 2 u T4 DNA Ligase und 1x Ligase Puffer (Promega M1801) über Nacht bei 4°C in einer Styrophor Box inkubiert.

2.2.4 Analyse von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.4.1.1 Isolation von RNA aus Geweben und Zellen

Zur Isolation von RNA wurde Trizol (Invitrogen, 15596-xxx) verwendet. Gewebe wurden mittels Ultrathorax in Trizol homogenisiert, Zellen wurden direkt in Trizol aufgenommen und durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren zerkleinert. Die Isolierung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Die RNA wurde in dH₂O aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Isolation von RNA aus Herzen von Embryonen (E10.5) erfolgte mit Hilfe des RNEasy Kits. Die Herzen wurden aus dem Embryo herauspräpariert und Blutreste weggespült. Das Gewebe wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, in dem 20 µl Lyse-Puffer vorgelegt waren. Mit einem Mikro-Pistill wurde das Gewebe im Eppendorf-Gefäß zerkleinert und das Pistill mit weiteren 330 µl Lyse-Puffer gespült. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Diese Lagerung sollte allerdings nicht länger als ein Tag durchgeführt werden, da längere Aufbewahrung die Qualität der isolierten RNA beeinflusst. Nach Genotypisierung der Embryonen konnten die RNA Proben weiter bearbeitet werden. Die Isolierung erfolgte mit dem RNEasy Kit nach Angaben des Herstellers. Die Elution aus den Säulen erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer, das Eluat wurde anschließend ein weiteres Mal auf die Säule gegeben um so die Ausbeute der RNA zu Erhöhen.

2.2.4.1.2 Plasmidaufreinigungen aus Bakterien

Maxipräparation von Plasmiden

Nach Angaben des Herstellers wurden 100-250 ml LB Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die DNA Präparation erfolgte mit dem NucleoBond PC 500 Kit (Macherey-Nagel, Bestell-Nr. 740574.x) nach Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde in 100-200 μ l T¹/₁₀E gelöst.

Minipräparation von Plasmiden

- Resuspendierungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM 0,5 M EDTA
- Lyse Puffer: 1 % SDS, 200 mM NaOH
- Neutralisierungspuffer: 2,55 M pH 4,8

Bakterienkolonien wurden in 3 ml LB Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln angezogen. Die Bakterien wurden pelletiert, und in Resuspendierungspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von Lyse-Puffer wurden die Zellen aufgeschlossen, durch Zugabe von Neutralisierungspuffer wurde diese Reaktion abgestoppt. Die lysierten Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol und Zentrifugation bei 14.000x g. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 μ l T¹/₁₀E aufgenommen.

2.2.4.2 Southern Blot

- **SpeedHybII** 7% SDS, 10% Polyethylenglycol 4.000 (Fluka#95904), 1,5x SSPE, vor Verwendung 0,1 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA zugeben
- SSPE 20x: 175,3 g NaCl, 27,6 g Na₂HPO₄ x H₂O bzw. 31,3 g Na₂HPO₄ · 2 x H₂O, 74 g EDTA, in 800 ml Wasser lösen, auf pH 7,5 mit ca. 6,5 ml 10 N NaOH einstellen, auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren
- **Rediprime** [™] II DNA labeling system: GE Healthcare, #RPN1633
- Hybond XL Membran GE Healthcare, RPN203S
- 3MM Papier Whatman, #3030-931
- Quick Spin Columns Sephadex G50, Roche, #1 273 973

Beim Southern Blot handelt es sich um eine Methode, ein bestimmter Bereich aus komplexer DNA spezifisch nachgewiesen werden kann. Die DNA wird dazu elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einer spezifischen Sonde der Zielbereich detektiert. (Southern, 1975)

2.2.4.2.1 Restriktionsverdau und Auftrennung der genomischen DNA

Zum Nachweis der Rekombination wurden 10-20 µg genomsiche DNA von ES Zell-Klonen bzw. Schwanz-Biopsien von Mäusen mit 5-10 u Restriktionsenzym versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei der 37°C. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 0,8% Agarose Gel, ebenfalls über Nacht bei 25-30 V.

Konstrukt	DNA Oligo zur Amplifikation der Sonde	Enzym zur DNA Restriktion	WT Bande [kb]	KO Bande [kb]
miR-1-2/133-a1	80/81	Banll	7,7	4,3
miR-1-1/133-a2	37/38	Sspl	5,6	7

Tabelle 1 Enzyme und Sonden für Southern Blot

2.2.4.2.2 Blot der genomsichen DNA

Es wurde die Methode des alkalischen Blottens angewendet (Koetsier, Schorr et al. 1993). Dazu wurde das Gel zunächst 15 min in 0,25 N HCl unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, um Strangbrüche in der DNA zu verursachen, was dann das Blotten der DNA auf die Membran erleichtern soll. Anschließend wurde das Gel kurz mit Wasser gespült, dann in 0,4 M NaOH-Lösung überführt. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: auf einen Stapel saugfähigen Papiers wurden 3 Lagen 3MM Papier gelegt, wobei das äußere Papier mit 0,4 M NaOH getränkt war. Darauf wurde luftblasenfrei die Membran gelegt, die auf die Größe des Gels zugeschnitten war. Darauf wurden das Gel gelegt, darüber drei weitere 3MM Papiere, das untere wiederum in 0,4 M NaOH getränkt war. Dieser Stapel wurde mit Klarsichtfolie abgedeckt, aus der dann ein Fenster von der Größe des Gels/der Membran ausgeschnitten wurde. Dies sollte verhindern, dass der Blotpuffer direkt von den Papiertüchern aufgesaugt wird und nicht über das Gel läuft. Anschließend wurden zwei weitere in 0,4 N NaOH getränkte 3MM Papiere auf das Gel gelegt. Der Puffertransfer wurde über eine Brücke 3MM Papier gewährleistet. Dazu wurde das Papier in Laufpuffer (0,4 N NaOH) getränkt, über den Blot und mit beiden Enden in ein Vorratsgefäß mit Laufpuffer gelegt. Der Blot erfolgte über 3,54 Stunden. Die so geblottete Membran wurde anschließend kurz in 2x SSC gewaschen

2.2.4.2.3 Hybridisierung der Membran

Die Prähybridisierung erfolgte in SpeedHybII mit 0,1% Heringssperma DNA (Sigma, D-1626) für mindestens 1 h bei 68°C. Zur radioaktiven Markierung der Sonde mit α -32P-dCTP wurde das Rediprime II DNA Labeling System nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Aufreinigung der markierten Sonde erfolgte mit Hilfe von Quick Spin Columns nach Angaben der Herstellers. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C.

2.2.4.2.4 Stringenzwaschschritte

Nach der Hybridisierung wurde die Sondenlösung abgegossen und die Membran zweimal mit 2x SSC/0,1% SDS, und einmal mit 0,1% SSC/0,1% SDS für je 15-20 min bei Hybridisierungstemperatur unter Rotation gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Klarsichtfolie verpackt und mittels Phosphoimager analysiert (Kodak BioMax MS Film #822 2648).

2.2.5 Analyse von Genexpression

2.2.5.1 Reverse Transkription und semiquantitative PCR

Mit der Technik der Reversen Transkription wird mit dem Enzym RNAabhängige DNA Polymerase aus mRNA cDNA (complementary DNA) geschrieben. Mit einer anschließenden PCR kann die Expressionsrate der zu untersuchenden mRNA nachgewiesen werden. Um verschiedene RNA-Proben untereinander vergleichen zu können, wird von allen Proben ein "Haushaltsgen" mittels PCR nachgewiesen. Von diesem Gen wird angenommen, dass es in allen Zellen des untersuchten Gewebes in gleichen Mengen vorkommt, und nicht reguliert ist. Hier wurde der Abgleich auf das Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) durchgeführt.

Für die quantitative PCR wurde die isolierte RNA zunächst durch Verdau mit DNAse von eventuellen DNA Verunreinigungen befreit. Dazu wurden zu der RNA 1 µl DNAse Puffer, 1 µl RQ DNAse (Promega M6101) gegeben und die Reaktion auf ein Volumen von 10 µl mit Wasser gebracht. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Reaktion mit DNase Stop Solution versetzt und weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Diese so gereinigte RNA wurde in die Reverse Transkription eingesetzt.

Für die Reverse Transkription wurden 1000 ng Gesamt-RNA aus der Trizol Aufreinigung eingesetzt. Diese wurde mit 10 pmol dNTP-Mix und 10 pmol Oligo-dT Primer (Promega #C1101) versetzt, mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl eingestellt und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und mit 4 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNasin (40 U, Promega N2611) versetzt und 2 min bei 42°C äquilibriert. Anschließend wurde 200 U des Enzyms (Superscript II, Invitrogen, #18064-014, im Kit mit First Strand Puffer und DTT) dazugegeben. Die Synthese der cDNA erfolgte für 50 min bei 42°C. Durch Erhitzen auf 70°C für 15 min wurde die Reaktion gestoppt. Die so hergestellte cDNA konnte dann für die semiquantitative PCR verwendet werden.

Für semiquantitative PCR wurden 2 μl cDNA, je 2 pmol Primer, 2 mM dNTP-Mix, 1x PCR Puffer und 5-10 pmol MgCl eingesetzt. Die Anneling Bedingungen der Primer wurden für das jeweilige Primerpaar ausgetestet. Die Elongation wurde bei 72°C durchgeführt, die Anzahl der Zyklen wurde ebenfalls nach Primerpaar/ Gewebetyp etc. ausgewählt.

2.2.5.2 TaqMan Analyse miRNA

- miRNA Assay : #4427975
- 002222hsa-miR-1
- 002246hsa-miR-133a
- 001979U6 snRNA
- TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG 1-Pack (1 x 5 mL) #4440040

Mit dieser Methode wird die Spezifität der PCR Reaktion verbessert. Die cDNA Synthese erfolgt bereits mit einem spezifischen Primer für die entsprechende miRNA. In der anschließenden PCR wird mit einem weiteren spezifischen Primer und einer miRNA-spezifischen Sonde die miRNA detektiert. Die Sonde enthält den Farbstoff, der jedoch durch den ebenfalls an der Sonde befindlichen *Quencher* nicht fluoresziert. Die in der PCR eingesetzte Polymerase weist eine Hydrolyse-Funktion auf. Dadurch wird bei der Amplifikation die Sonde abgebaut und das Fluorophor freigesetzt. Die Fluoreszenz wird detektiert und gibt Aussagen über die Menge der eingesetzen miRNA wider.

Die TaqMan[™] PCR wurde nach Angaben des Herstellers mit Gesamt-RNA aus Herzen von WT und den beiden KO Linien durchgeführt.

2.2.5.3 DNA Array Affymetrix

Zur Analyse der mRNA Expression wurde ein *Affymetrix GeneChip* verwendet (Mouse Genome 430 2.0). Die RNA wurde wie vom Hersteller verarbeitet und auf den Chip hybridisiert. Die ermittelten Daten wurden mit dem RMA Algorithmus ausgewertet (*Affymetrix Expression Console*). Um signifikante Unterschiede in der Expression zu ermitteln, wurden mit den log₂- transformierten Expressionswerten ein ungepaarter einseitiger t-test durchgeführt (DNA Star ArrayStar 3.0 software).

2.2.5.4 miRNA Array

Der miRNA *Array* enthielt ein Set von 384 miRNA-Sonden (3'-C6 amino-linked DNA Oligonukleotide) (miRBase; http://microrna.sanger.ac.uk.). Diese wurden synthetisiert und auf einen Nexterion E-*Slide* mit jeweils 8 Replikaten *gespottet*.

Zwei zu untersuchende miRNA Populationen wurden unterschiedlich markiert und zusammen in einer Reaktion auf den miRNA *Array* hybridisiert und anschließend analysiert. Die beiden Proben sind mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelt, die in verschiedenen Bereichen Licht absorbieren und emittieren. Die Überlagerung beider Signale, bzw. durch die Stärke der einzelnen Signale kann eine Aussage über die Menge der eingesetzten RNA getroffen werden.

Für eine Markierungsreaktion wurden 100 ng Gesamt-RNA dephosphoriliert (TaKaRa CIAP #2250A, 10 u, 30 min bei 37°C) und anschließend durch Zugabe von 100 % DMSO (5 μ l DMSO auf 7 μ l Reaktionsansatz) bei 100°C für 5 min denaturiert. Die Proben wurden sofort auf Eis überführt und mit der Ligation des Farbstoffs an die RNA- Moleküle begonnen.

Es wurden verschiedenen Farbstoffe getestet und verwendet:

- Cyanine 3-Cytidine Bisphosphate im Agilent miRNA Labeling Reagent and Hybridization Kit Agilent #5190-0408
- Dharmacon 5p~CU~CY547-3 deprotected
- MWG Alexa555 und Alexa647 (Synthesis scale 0.2 μmol, Endkonzentration der Oligos 0,5 μg/μl)

Die Ligation der Farbstoffe an die RNA erfolgte mit T4 RNA Ligase1 (NEB #M0204S) für 2 h bei 16°C. Durch Überführung der Reaktion in 65°C (15 min) wurde die Ligation abgestoppt. Die markierten RNA Proben wurden mit MicroSpin Säulen (BioRad #732-6221) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Der Array (Chip) wurde mit 1x Nexterion Blocking Solution mit 8 μ l 37% HCl - (Nexterion Block E (4x) PeqLab 39-1066071) 15 min bei 50°C vorbehandel, mit ddH₂O gespült und trocken zentrifugiert. Die markierten miRNA Proben wurden 3 min bei 95°C inkubiert und nach Angaben des Herstellers auf den Chip gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C unter Rotation (10 rpm).

Der Chip wurde zweimal 1 Minute mit 1% SDS/0,5x SSC und viermal 1 min mit 0,05x SSC gewaschen. Der Chip wurde getrocknet und mit dem Genepix Scanner (Agilent) ausgewertet.

2.2.5.4.1 Auswertung des Datensatzes

Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Acuity Die Daten wurden normalisiert, so dass die Mittelwerte der Mediane des Verhältnisses von Signal 635/532 der let-7 Familie gleich 1 ist. Der Mittelwert der Median des Verhältnisses von KO/WT Signal und der DyeSwap¹ der Mediane des Verhältnisses von WT/KO wurden berechnet und der log₂ wurde berechnet. Diese Werte wurden gegen die Signal-Intensität des WT Signals aufgetragen. Werte mit einer Intensität

¹ Methode um Färbeartefakte auszuschließen, dazu wird die Färbung von KO und WT in einem weiteren Experiment umgekehrt. Die ermittelten Werte werden dann miteinander verrechnet.

des WT Signals unter 500 wurden ausgeschlossen, genau wie Daten mit einer größeren Standardabweichung als 75% des Mittelwertes.

2.2.6 Whole Mount *in situ* Hybridisierung WMISH

Bei der *in situ* Hybridisierung wird mRNA bzw. miRNA im Tier am Ort der Expression nachgewiesen. Dazu wird eine Sonde benutzt, die "antisense" zur mRNA ist, also die komplementäre Sequenz zur Ziel-mRNA aufweist. Die Sonde ist mit Digoxigenin markiert, welches von einem Antikörper erkennt werden kann. Dieser Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt. Im Standardfall ist das Alkalische Phosphatase. Diese wiederum katalysiert die Umsetzung von NBT/BCIP wobei ein unlöslicher Niederschlag entsteht. Dieser bildet sich am Ort des SondenmRNA Hybrides und gibt somit den Ort der Expression des untersuchten Gens wider.

2.2.6.1 WMISH mit LNA Sonden

- Hybridisierungspuffer : 50% Formamide, 5x SSC, 0,1% Tween-20, 9,2 mM Zitronensäure, 50 μg/ml Heparin, 500 μg/ml Torula-RNA
- NTT: 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 1% Tween-20, pH 9,5

Die Sonde für die miRNA in situ Hybridisierung wurde bereits Digoxigenin (DIG)- markiert bestellt (Exiqon). Die Sonde besteht aus sogenannter Locked Nucleic Acid (LNA), also modifizierter RiboNukleinSäure (RNA). Durch diese Modifikation wird eine Erhöhung der Affinität von Sonde zum Zielbereich erzielt. Die Sonde war am 3' und 5' Ende mit DIG markiert.

Embryonen im Alter von E9.5 bzw. E10.5 wurden für die Analyse aus dem Uterus präpariert und über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Nach Waschen in PBS wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Methanol/PBS-Reihe entwässert und mindestens über Nacht bei -20°C gelagert.

Zur Hybridisierung wurden die Proben in einer absteigenden Methanol-Reihe rehydriert, und mit Proteinase K behandelt (10 μ g/ μ l, 45 min bei 37°C, Roth, 7165.2). Nach mehrmaligem Waschen in PBT wurden die Proben kurz in Wasser inkubiert und dann mit 0,1 M tri-Ethanolamin/2,5% Acetic-Anhydrid behandelt. Nach weiteren Waschschritten mit PBT wurden die Proben in Prä-Hybridisierungspuffer (Hybridisierungspuffer ohne Sonde) überführt und 1-2 h bei Hybridisierungstemperatur inkubiert. Zur Hybridisierung wurden eine Konzentration von 10 nM eingesetzt, die Hybridisierungstemperatur wurde so gewählt, dass sie ca. 20°C unter der Schmelztemperatur der Sonde (Angabe des Herstellers) lag. Die Hybridisierung mit der miR-1 Sonde erfolgte bei 38°C.

Am nächsten Tag wurden folgende Waschschritte bei Hybridisierungstemperatur wie folgt durchgeführt (je 15 min): Hybridisierunspuffer ohne tRNA und Heparin (HM); 75% HM/25% SSCT; 50% HM/50% SSCT; 25% HM/75% SSCT, zweimal 2x SSCT und zweimal 0,2x SSCT. Weitere Waschschritte erfolgten dann bei Raumtemperatur: jeweils 10 min 75% 0,2x SSCT/ 25% PBS, 50% 0,2x SSCT/ 50% PBS, 25% 0,2x SSCT/ 75% PBS, PBS.

Der Nachweis der markierten Sonde erfolge mittels Antikörperdetektion. Dazu wurden die Proben zunächst eine Stunde in PBST inkubiert, anschließend mit α -DIG Alkaline Phosphatase Antibody (Roche #1 093 274, nach Angabe des Herstellers 1:2000 in Blocking Puffer verdünnt (Roche #11 096 176 001 in MAB)) versetzt und über Nacht bei 4°C belassen.

Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Proben mehrmals über mehrere Tage hinweg in PBST gewaschen (je länger desto besser!).

Die Färbung erfolgte in Färbepuffer (100 mM TrisHCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20) mit NBT/BCIP (Roche #11 681 451 001). Das Protokoll wurde aus Kloosterman et al. (2006) entnommen.

Wenn die Färbung zu viel Hintergrund erzeugt hat, konnte dieses durch inkubieren in 5x TBS-T entfärbt werden (5x TBS mit 5% Tween-20, nach Sweetman et al, 2008)

2.2.7 Analyse von Proteinen

- Extraktionspuffer Protein: 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,01 M EDTA, 10% SDS; 1x Complete (Mini Tabletten, Roche #04693124 001), (optional 0,04 M DTT), ad. 10 ml H2O
- Homogenisierungspuffer: 125 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH8, 4,5 mM EDTA, optional 1x Complete, zusätzlich optional weitere Proteinase- und Phosphataseinhibitoren
 - \circ Benzamidine 0,5 mg/ml
 - $\circ \quad A protinin \qquad 2 \ \mu g/ml$
 - \circ Leupeptin 2 µg/ml
 - $\circ \quad PMSF \ 0,75 \ \mu M$
 - \circ Na₃VO₄ 1 μ M
 - \circ NaF 20 μ M
- MES Laufpuffer Western: 100 ml 20x MES SDS Laufpuffer, 1900 ml H₂O
- Probenpuffer Western: 5,7 μl Extraktionspuffer/Complete, 3,8 μl Sample Puffer, 0,2 μl DTT, 0,3 μl Bromphenolblau
- Sample (Lämmli) Puffer Western 5x: 3 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8, 14 ml 50% Glycerin, 10 ml 10% SDS, 18 ml H2O
- Transferpuffer 20x: 500 mM Bicine (Fluka), 500 mM BisTris (Fluka), 20,5 mM EDTA
- Transferpuffer : 1x Transferpuffer, 20% Methanol,
- Red Alert Färbelösung: Merck, #71078-3
- Proteinbestimmung : BioRad DC Assay, #500-0116
- NuPAGE Vovex-Bis-Tris Gel, Invitrogen, NP0329BOX

2.2.7.1 Extraktion von Proteinen aus Geweben

Zur Präparation der Proteine aus Organen und Geweben wurden diese zunächst tiefgekühlt und in einem Mörser unter N₂₁ zerkleinert. Ca. 100 mg des Homogenates wurden mit 300 µl Extraktionspuffer versetzt und mit dem Ultraschallstab (5 Zyklen à 20 sec, Power 20) weiter homogenisiert. Anschließend wurde die Probe 5 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorff-Gefäß überführt und gevortext. 10 µl davon wurden für die Proteinbestimmung abgenommen, der Rest mit DTT versetzt (0,04 M), gevortext und 1 min bei 99°C gekocht. nach Zugabe von Die so isolierten Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers (BioRad DC).

2.2.7.2 Anreicherung von Membranproteinen

Die Organe wurden nach Perfusion mit PBS dem Tier entnommen und entweder direkt in Homogenisierungspuffer überführt und mittels Ultrathurax zerkleinert, oder das Organ wurde sofort in N_{21} überführt und anschließend unter N_{21} gemörsert, und anschließend in Homogenisierungspuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde zunächst mit Ultraschall behandelt, um Zelltrümmer etc. zu zerstören. Das Lysat wurde zweimal bei 1000 x g 5 min abzentrifugiert und der Überstand dann 1 h bei 50.000 rpm in der Ultrazentrifuge pelletiert. Das so entstandene Proteinpellet wurde in Extraktrionspuffer aufgenommen, die Proteine evtl. nochmal durch Ultraschall gelöst und anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Angaben des Herstellers durchgeführt (BioRad DC)..

2.2.7.3 Western Blot: Elektrophorese von Proteinen in NuPAGE Gelen

10 µg Protein wurden mit Probenpuffer versetzt (mind. im Verhältnis von 1:1, oder mit Probenpuffer auf 10 µl auffüllen) und 10 Minuten bei 70°C gekocht. Nach Erkalten der Proben wurde diese auf ein PAGE-Gel aufgetragen und die Proben zunächst bei 75 V für 15 min in das Gel einlaufen lassen, dann bei 180 V für ca. 1 h (Elektrophoresekammer im Eisbad) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x MES verwendet. Der Lauf wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblaubande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde aus der Gelkammer herausgelöst und für den Western Blot weiterverwendet. Blot der Proteine auf Nitrocellulose-Membran 3 Lagen BlottingPads wurden mit 1x Transferpuffer getränkt und in ein Blot Modul gelegt. Darauf wurde ein in 1x Transferpuffer getränktes 3MM Filterpapier gelegt, anschließend das Gel, dann die Nitrocellulose-Membran, ein weiteres in Transferpuffer getränktes 3MM Filterpapier sowie 3 Lagen BlottingPads. Mit einer Pipette wurde nach jeder Lage über den Stapel gerollt, um mögliche Luftblasen zwischen Membran und Gel zu eliminieren. Das Blotmodul wurde dann zusammengedrückt in eine Blotkammer eingesetzt. In das Blotmodul wurde Transferpuffer eingefüllt, in die umliegende Kammer Wasser. Der Blot erfolgte bei 30 V für 2 h. Anschließend wurde der Blot auseinandergebaut und die Membran kurz mit RedAlert Färbelösung gefärbt und dokumentiert. Die Membran wurde dann getrocknet und bis zur weiteren Verwendung trocken und lichtgeschützt bei RT gelagert.
2.2.7.4 Nachweis von Proteinen nach Western Blot

Die Membran wurde 20 min in H₂O geschüttelt, anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit 5% Milchpulver in TBS-T für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgten 6 Waschschritte à 5 min. Der erste Antikörper wurde in 3% Milchpulver/TBS-T (Skim Milk Powder Fluka 70166) verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht unter Schütteln bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Membran sechsmal 5 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper (*Horse-radish* Peroxidase (HRP)- gekoppelt) wurde 1:5000 in 3% Milchpulver/TBS-T verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h unter Schütteln bei RT. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper abgenommen und die Membran erneut sechsmal 5 min in TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Femto Western Kits im VersaDoc (Pierce #34096).

Tabelle 2 Verwendete Antikörper für Western BlotHRP Horse-radish-Peroxidase

	Bezeichnung	Referenz/ Firma	Bestellnr.	Reaktivität	Größe [kDa]
primäre Antikörper	α-Cavβ2	Link et al, 2009	-	Kaninchen	~68/72
	α-Cav1.2 (Cavα1)	Berkefeld et al, 2006	-	Kaninchen	~260
	α-Vdac/Porin	MitoScience	MSA03	Maus	~40
läre per	α-Maus-HRP	Pierce, Thermo Scientific	1858413	Ziege	-
sekunc Antikör	α -Kaninchen-HRP	Pierce, Thermo Scientific	1858415	Ziege	-

2.2.7.5 SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture)

- Novex Stainer A Colloidal Blue, Invitrogen, 46-7015
- Novex Stainer B Colloidal Blue, Invitrogen, 46-7016
- ABC 50 mM Ammoniumbicarbonat (NH₄HCO₃)
- IAA Iodacetamid 550 mM in 50 mM ABC
- IAA Lösung 0,05 M Iodacetamid in UA Puffer
- UA 8 M Urea in 0,1 M Tris/HCl pH8,5
- Urea 6 M Urea und 2 M Thiourea
- LysC 5µg/µl, Endoproteinase Lys-C von Wako Bioproducts (Richmond, VA)
- AC Acetonitril (C_2H_3N)
- TFA Trifluoressigsäure ($C_2HF_3O_2$)
- Lösungen für Anionenaustausch
- 0,02 M CH₃COOH, 0,02 M H₃PO₄, 0,02 M H₃BO₃,
- Mit 1 M NaOH daraus Lösungen mit pH 3,4,5,6,8, und 11 herstellen
- zu der pH3 Lösung NaCl geben in einer finalen Konzentration von 0,25 M
- C18 Empore C18, 3M, #2215, IVA Analysentechnik
- Empore/Disk Anion Exchanger (Varian, #1214-5012)
- Amicon Filter Ultra Filter-0.5 Centrifugal Filter Unit, 30 kDa, #UFC503024, Millipore

Das Prinzip der SILAC Analyse wurde ursprünglich in Zellkultur-System entwickelt. Essentielle Aminosäuren können von eukaryotischen Zellen nicht de novo synthetisiert werden, sondern werden mit der Nahrung aufgenommen. Bietet man den Zellen künstlich hergestellte Aminosäuren an, die mit anderen Isotopen als den natürlich vorkommenden Isotopen (z.B. ¹³C statt ¹²C) markiert sind, werden diese "schweren" Aminosäuren in die neu synthetisierten Proteine eingebaut. Nach einigen Zellverdopplungen sollte dann das gesamte Proteom der Zelle aus "schweren" Proteinen bestehen. Proteine aus der eingentlichen zu untersuchenden (experimentell veränderten) Zell-Population werden dann mit Proteinen der "schweren" Zell-Population gemischt und massenspektrometrisch untersucht. Dieses gibt Auskunft über Intensität und dem Masse-zu- Ladungsverhältnis (m/z) der Peptide. Die Intensität gibt Auskunft über die Abundanz der Peptidsequenz in der Probe. Mit "schweren" Aminosäuren markierte Proteine/Peptide haben ein höheres m/z Verhältnis als natürliche ("leichte") Proteine/Peptide. Somit kann in einer Probe, in einer Messung, gleichzeitig Kontrolle und die zu untersuchende Probe analysiert werden und Auskunft über die Menge des Proteins in Kontrolle und Versuch erhalten (Ong et al, 2002).

Durch Fütterung von Mäusen mit synthetischem Futter, welches die mit ${}^{13}C_{6}$ - substituierte Aminosäure Lysin enthält, kann diese Methode auch mit ganzen Geweben und Organen von Mäusen durchgeführt werden (Krüger et al, 2008). Da die vollständige Markierung einer Maus mit Isotopen-markierten Aminosäure aufwendiger ist, als die Markierung von Zellen in Kultur, wurden hier die Proteine-Proben der "schweren" Maus mit Proteinen der "leichten" Wildtyp-Maus sowie mit der "leichten" Knock Out Maus gemischt. Somit diente die schwere Maus als Referenz für WT und KO Probe. Man erhält zwei Werte: das Verhältnis WT = Signal der "schwere" Probe/Signal der "leichten" KO Probe. Setzt man diese beide Werte wiederum ins Verhältnis zueinander erhält man Auskunft über Art und Stärke der Veränderung des Proteins: Proteinregulierung = Ratio WT/Ratio KO).

2.2.7.5.1 Vorbereitung - in solution Digest

Der "in der Lösung stattfindende Verdau" dient der Abschätzung des einzusetzenden Verhältnisses der beiden Proteinproben. Im Idealfall sollte die äquivalente Mischung der Proteinmenge zu einem gemessenen Verhältnis von "1" führen. Empirische Daten zeigen aber, dass immer eine größere Menge von "schweren" Protein eingesetzt werden muss. Deswegen wurden "leichte" Proteine der Probe (KO und WT) und "schwere" Proteine im Verhältnis 1:1,1 gemischt. Die Proteinmischung wurde mit Aceton gefällt, mit 20 µl Urea gelöst und mit 1 µl 1 M DTT versetzt. DTT zerstört Disulfidbrücken und so die Tertiärstruktur der Proteine. Die anschließende Inkubation mit 1 µl IAA blockiert die freien Thiolgruppen und verhinderte so eine Zurückfaltung der Proteine. Anschließend wurden die Proteine mit Lys-C verdaut und auf StaGE-Tipps (Stop and Go Extraction Spitzen, mit C18 Material gefüllte gelbe Pipettenspitzen (Ishihama et al, 2006)) gebracht, wo sie bis zu Messung im Massenspektrometer gelagert wurden.

Die Proben wurden gemessen und das Verhältnis von "schwer" zu "leichten" Peptiden bestimmt. Lag dieses Verhältnis bei ungefähr 1, wurden die Proteine im selben Mischungsverhältnis wie oben für die eigentliche Analyse eingesetzt. Abweichungen von mehr als 10% wurden durch Korrektur des Mischungsverhältnisses ausgeglichen.

2.2.7.5.2 Massenspektroskopische Analyse In Gel Digest

Für die Analyse wurden insgesamt 60-90 µg Protein eingesetzt. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel fixiert (40% Methanol, 10% Essigsäure) und mit Coomasie gefärbt (Novex Stainer Kit, nach Angaben des Herstellers). Das Bandenmuster wurde dokumentiert und anschließend die Protein"spur" in 15 Stücke aufgeteilt, diese in ca. 1-2 mm große Stücke geschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Die Proben wurden zweimal gewaschen in 50 % ABC/50 % EtOH, dann erfolgte die Dehydrierung mit zwei Schritten abs. EtOH. Nach kurzer Trocknung der Gelstücke in der SpeedVac wurde 10 mM DTT in 50 mM ABC zur Reduzierung (bei 56°C für 40 min) dazugegeben und anschließend erfolgte die Alkylierung mit IAA. Die Gelstücke wurden anschließend erneut gewaschen, dehydriert und getrocknet. Der Verdau der Proteine zu Peptiden erfolgte mit Lys-C (12 ng/µl in 50 mM ABC) über Nacht bei 37°C.

Die Elution der Peptide aus dem Gel erfolgte durch Inkubation mit Acetonitril (ACN). Zunächst wurde durch Zugabe von 30 % ACN/3 % TFA die Abstoppung der Verdau-Reaktion bewirkt. Mit je zweimaligem Inkubieren in 70 % ACN und 100 % ACN wurden die Peptide aus dem Gel gelöst und die Überstände für jede der 15 Proben gesammelt. Diese vereinigten Überstände wurden eingeengt, mit gleichem Volumen 5% ACN/1% TFA versetzt, gevortext und auf StaGE-Tipps (Ishihama et al, 2006) gebracht. Die anschließende Messung und Datenbereitstellung wurde von Dr. Marcus Krüger ausgeführt.

2.2.7.5.3 FASP: Filter Aided Sample Preparation

Der Verdau der Proteine erfolgt auf einem Zentrifugationsfilter. Die anschließende Auftrennung der Peptide erfolgt durch Anionenaustauschchromatographie mit unterschiedlichen pH Werten (Wisniewski et al, 2009).

Für diese Methode wurden bis zu 250 μ g Protein mit 200 μ l Puffer UA versetzt, gemischt auf den Filter gegeben und bei 14.000 x g 15 min zentrifugiert. Der Filter wurde mit 250 μ l Puffer UA gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde auf den Filter 200 μ l IAA Lösung gegeben und der Filter 1 min bei 600 rpm geschüttelt, dann erfolgte eine weitere Inkubation bei RT für 30 min im Dunkeln. Der Filter wurde wie o.a. zentrifugiert und mit 250 μ l Puffer UA gewa-

schen (14.000 x g 20 min). Danach wurde der Filter zweimal mit 250 µl 50 mM ABC gewaschen und jeweils bei 14.000 x g 20 min zentrifugiert. Der Verdau wurde in 20 mM ABC durchgeführt. Das Lys-C Enzym wurde im Verhältnis 1:50 (Enzym: Protein) eingesetzt, der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C.

Am nächsten Tag wurde der Filter in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und die jetzt verdauten Peptide zentrifugiert (14.000 x g 20 min). Der Filter wurde nochmal mit 200 μ l 40 mM ABC gewaschen und das Eluat gesammelt. Die gesammelte Peptidlösung wurde in der SpeedVac bei RT 1 h eingeengt, anschließend mit Puffer auf pH 11 eingestellt. Zur weiteren Aufbereitung der Peptide wurden diese in Anionen-Austausch Säulen mit unterschiedlichen pH Werten aufgetrennt. Die Anionen Austausch Säulen bestehen aus 6 Lagen von Empore/Disk Anion Exchanger in gelben 200 μ l-Pipettenspitzen.

Die Anionen Austauscher wurden zunächst mit Methanol, 1 M NaOH gespült, anschließend zweimal mit Puffer pH 11 aquilibriert (je 100 µl Lösung auf Spitze, dann bei 7000 x g 3 min zentrifugiert). Die Stage Tips bestehen hier aus 3 Lagen des C18 Materials. Sie wurden mit Methanol, 80 % Methanol/3 % TFA und H₂O gespült (je 50 µl Lösung auf Spitze, dann 5000 x g 3 min zentrifugiert). Die Anionenaustauschspitze (AAS) wurde in die StaGE Spitze gesteckt und diese Einheit in Eppendorfgefäßen befestigt. Die Peptidlösung wurde in die AAS gegeben und die Einheit bei 7000 x g 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde in die AAS 100 µl Puffer pH 11 gegeben und erneut zentrifugiert. Ein Großteil der Peptide sind bei pH 11 maximal negativ geladen und binden an die positiv geladene Matrix. Die Peptide, die nicht binden, werden beim Zentrifugieren durch die Matrix gedrückt und werden vom C18 Material des StaGE Tips gebunden. Anschließend wurde die AAS in ein neues StaGE Tip gegeben und mit Puffer pH 8 versetzt, wieder bei 7000 x g 3 min zentrifugiert. So werden alle Peptide gelöst, die auf Grund ihrer Ladung bei pH 8 nicht mehr negativ geladen vorliegen. Dies wurde mit den Puffer pH 6, pH 5, pH 4 und pH 3 fortgesetzt. Zuletzt wurden die Sta-GE Tips mit 50 µl 0,1 % TFA gewaschen und bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt. Die anschließende Messung und Datenbereitstellung wurde von Dr. Marcus Krüger ausgeführt.

2.2.7.5.4 Anreicherung von Proteinen der Membranen für SILAC FASP Herzen von KO, WT und SILAC Tier wurden in N₂₁ eingefroren und anschließend unter N₂₁ gemörsert. Das Gewebepulver wurde mit Puffer (2 M NaCl, 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 1 mM EDTA, Protease Inhibitoren (siehe 2.2.6) versetzt, so dass alle das gleiche Verhältnis Gewebe/Puffer (w/v) aufwiesen. Anschließend wurden zu einem Teil Gewebelösungen der KO und WT Proteine 1,1 Teile Gewebelösung des SILAC Herzens gegeben. Die Lösungen wurden sonifiziert und bei 16.000 x g und 4°C 20 min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 1 ml 0.1 M ABC und 1 mM EDTA, pH 11,3 resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolge die Pelletierung wie oben angegeben. Danach wurden die Pellets mit 5 M Urea, 100 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7,4, resuspendiert, und wiederum pelletiert. Dieses Pellet wurde zweimal mit 0,1 M Tris/HCl gewaschen und anschließend in 2 % SDS, 50 mM DTT und 0,1 M Tris/HCl pH 7,6 aufgenommen (Wisniewski et al, 2009) Die so isolierten Proteinfraktion wurde mit FASP weiterbearbeitet.

2.2.7.5.5 Verrechnung der Daten

Die Datentabelle, die von der Proteomics-Serviceeinheit bereitgestellt wurde, enthielt unter anderem Angaben über die Anzahl der detektierten Peptide, Anzahl der eindeutig detektierten Peptide, das Verhältnis von Schweren/Leichten Protein der jeweiligen Probe und die Normalisierung dieses Verhältnisses.

Zunächst wurden alle Werte gelöscht, in denen die gefundenen eindeutigen Peptide weniger als "2" betrug, um sicher zu gehen, dass die ermittelten Werte nicht auf Zufall beruhten. Diese Proteine wurden als "nicht detektiert" ausgeschlossen.

Die Membranfraktion wurde als eigene Methode angesehen, und nicht in die Verrechnung der "Gel-Aufreinigung" und "FASP-Methode" einbezogen. Proteine die in der Membranfraktion gefunden wurden, sind oft nicht im Gesamt-Protein detektierbar, insofern ist eine Verrechnung nicht sinnvoll.

Es waren jeweils Werte von Gel und FASP Methode von zwei WT, zwei miR-1-2/133a-1 und zwei Tieren miR-1-1/133a-2 vorhanden. Die normalisierten Verhältnisse "Schwer/Leicht" der WT wurden gemittelt, ebenso die der KOs. Proteine mit einem WT Verhältnis von >1,5 oder < 0,6 wurden ausgeschlossen. Um die relative Veränderung der Proteinexpression zu ermittelt, wurde das WT Verhältnis durch das KO Verhältnis dividiert.

Schwer _{WT}	Schwer _{WT}	Leicht _{ko}	Leicht _{KO}
Schwer _{KO}	Leicht _{WT}	Schwer _{WT}	Leicht _{wr}

Eine verringerte Proteinexpression in KO wird so durch eine Zahl <1 ausgedrückt.

Um eine Aussage über die Signifikanz der ermittelten Werte zu treffen, wurden die Einzelverhältnisse (für WT: 2 Tiere je *in Gel* und *FASP* \rightarrow 4 Einzelwerte, für die beiden KOs ebenso) der WT und eines KOs im zweiseitigen, ungepaarten Student's T-Test verrechnet.

Als signifikant verändert wurden Proteine angesehen, wenn die relative Veränderung <0,6 oder >1,45 war und der p-Wert des t-Test kleiner als 0,05 war.

2.2.8 Histologie

2.2.8.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Organe und Embryonen (siehe 2.2.1.3) wurden für Paraffinschnitte zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % Ethanol) Embryonen weiter in Isopropanol, 1:1 Isopropanol: Paraffin (65°C), Paraffin (65°C); Organe weiter in Toluol, dann Paraffin (65°C). Abhängig von Größe des Organs wurden die Proben unterschiedlich lang in den einzelnen Lösungen belassen.

Die Proben wurden dann in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom wurden Schnitte angefertigt (8-12 µm). Die Schnitte wurden zum Aufspannen auf 42°C temperiertes Wasser gelegt, von da aus auf Objektträger gezogen. Damit die Schnitte trocken konnten und die Schnitte so besser an der Oberfläche des Objektträgers haften, wurden sie über Nacht bei 42°C getrocknet.

2.2.8.2 Anfertigung von Cryoschnitten

Organe und Embryonen (siehe 2.2.1.3) wurden über Nacht in 30% Succrose/PBS inkubiert, am nächsten Tag im Tissue-Tek (Polyscience, Inc) eingebettet. Die

Schnitte wurden in einem Cryotom angefertigt und auf HistoBond Objektträger (Marienfeld, #08 000 01) aufgenommen. Die Temperatur der Kältekammer wurde den Objekten angepasst. Bis zur Verwendung wurden die Schnitte bei -20°C gelagert.

2.2.8.3 H&E-Färbung (Hämatoxylin/Eosin)

- Eosin-Stocklösung: 1 g Eosin G in 100 ml ddH₂O (Eosin G Merck 921 K11 613835)
- Eosin-Gebrauchslösung: 30 ml 1 % Eosin G , 270 ml ddH₂O, 150 µl Eisessig
- Hämatoxylin Lösung: Gills Nr. 3 Sigma #GHS332

Bei der HE Färbung werden mit den Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin Gewebestrukturen angefärbt. Die Methode dient vorwiegend als Übersichtsfärbung. Hämalaun (aufbereitetes Hämatoxilin) reagiert dabei mit sauren Zellbestandteilen zu einer blauen Färbung (u.a. Zellkern und endoplasmatisches Retikulum (DNA)), Eosin färbt basische Strukturen der Zelle rot (Zellplasmaproteine).

Zunächst wurden Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden dann mit Xylol zweimal 5 min entparaffiniert, anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100 % EtOH, 90 %, 80 %, 70 %, je 2 min). Nach 2 min in ddH₂O wurden die Schnitte 10 min in Hämalaun belassen, dann zweimal in ddH₂O ge-taucht. Zum Bläuen der Schnitte wurden diese 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Dieser Schritt bewirkt dass der zunächst rote Farbstoff des Hämalauns durch Erhöhen des pH-Wertes blau wird. Die Eosin-Färbung erfolgt zunächst mit dippen der Schnitte in einer Lösung aus 70 % EtOH/1 % HCl, anschließend mehrmaliges Dippen in Leitungswasser. Die Schnitte wurden dann 7 min in Eosin-Färbelösung belassen, und durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe geführt. (70 %, 80 %, 90 % EtOH, jeweils zweimal getaucht, 100 % EtOH für 10 min). Darauf folgend wurden die Schnitte zweimal 5 min in Xylol belassen und mit Entellan (Merck #1.07961.0500) eingedeckelt.

2.2.8.4 Immunhistologie

Nach einer 15-minütigen Trocknung der Cryoschnitte bei Raumtemperatur wurde die Schnitte zweimal je 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolge die Refixierung für 5 min mit 4 % PFA, 0,01 % Natriumdesoxycholat, 0,2 % NP40, dann erneutes Waschen mit PBS (zweimal 5 min). Der Blockierschritt zur Abdeckung unspezifischer Bindungen erfolgte mit Blockierlösung (3 % Normal Goat Serum, 2 % BSA, 0,2 % NP40 in PBS) für 30 bis 60 min. Der primäre Antikörper (Myosin, MF-20, Hybridoma Bank, Universität Iowa) wurde in Carrier-Lösung (2% BSA, 0,2% NP40 in PBS) verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde der erste Antikörper abgenommen und der Schnitt mehrmals mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Ziege- α -Maus ~Alexa488, Invitrogen #A11001) wurde ebenfalls in Carrier verdünnt und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf dem Schnitt belassen. Anschließend wurde diese Lösung abgenommen und eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt (1:1000 verdünnt in PBS, Inkubationszeit 5 min,). Durch mehrmaliges Waschen mit PBS wurde überschüssiges DAPI und sekundärer Antikörper abgewaschen. Die Schnitte wurden dann mit Fluoromount (Fluka #F4680-25ML) eingedeckelt und um zu verhindern, dass die Präparate austrocknen, die Deckgläser mit Nagellack umrandet.

2.2.8.5 LacZ Färbung von Organen und Schnitten

Durch den *Knock-In* des lacZ-Genes (β -Galaktosidase) kann die Expressionsstelle des zu untersuchenden Genes dargestellt werden. Da das lacZ-Gen unter dem Promoter und den Transkriptionselementen des zu untersuchenden Genes steht, ist der räumliche und zeitliche Expression die gleiche wie des Genes, welches durch den *Knock-In* verändert wurde. Bei der Deletion der miRNAs wurden ganze genomische Bereiche deletiert, und stattdessen eine Selektionskassette mit einer IRES (internal ribosomal entry site)-LacZ Kassette einkloniert (siehe 3.1). Eine Färbung mit X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) sollte also an den Stellen nachzuweisen sein, wo die deletierten miRNAs bzw. die miRNA Cluster deletiert wurden. Dabei hydrolysiert β -Galaktosidase das X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol, welches dann zu dem Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird.

Zur Fixierung wurde folgende Lösung verwendet: 0.2% Glutaraldehyd, 1% Formaldehyd, 0,2 % NP40 und 0,1 % Desoxycholat in PBS. Die Färbung erfolge in einem Puffer aus 2 mM MgCl₂, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 1 mg/ml X-Gal (Roth #2315.4), 0,2 % NP40, 0,1 % Natriumdesoxycholat in PBS bei 30°C. Embryonen jünger als Tag E12.5 wurden ohne Zugabe von Detergenzien fixiert und gefärbt.

2.2.9 Zellkultur von murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen)

2.2.9.1 Medien und Lösungen für die mES Zellkultur

2.2.9.1.1 Kommerzielle Lösungen und Chemikalien

- β-Mercaptoethanol Gibco, Invitrogen, 31350-010
- DMEM Gibco, Invitrogen, 42430-025
- DMSO Sigma, D2438
- EDTA Sigma# E-5134
- FCS Gibco, Invitrogen, 10270-106
- Gelatine Sigma, G-1890
- Glutamin Gibco, Invitrogen, 25030-024
- NAA Nicht-essentielle Aminosäuren, Gibco, Invitrogen, 100x 11140-035
- PBS Tabletten Gibco, Invitrogen 18912-014
- Pen/Strep Penicillin/Streptomycin Gibco, Invitrogen, 15140-122
- Trypsin: Gibco, Invitrogen, 25200-056

2.2.9.1.2 Medien und Lösungen

- Einfriermedium Feeder-Zellen: Feedermedium + 0,1 % DMSO
- Einfriermedium mES-Zellen: mES-Zell Medium mit final 10% DMSO, 20% FCS
- Feedermedium: DMEM, 10 % FBS, 1 x NAA , 1 x Pen/Strep
- Feedermedium für initale Kultur (P0): DMEM, 15 % FBS, 1 x NAA, 1 x Pen/Strep, 1 x Glutamin
- Embryo-Suspensions-Medium: DMEM, 1 x Pen/Strep
- Gelatine: 0,1 % in H₂O
- Lyse-Puffer: 100 mM Tris pH 8,5 mM EDTA 0,2 % SDS, 200 mM NaCl, 80 μg/ml Proteinase K (Roth #7156.2)
- mES-Zell Medium: DMEM, 15 % FCS, 1 x Glutamin, 1 x NAA, 1 x Nukleoside, 1 x Pen/Strep, 50 mM β-Mercaptoethanol, Leukemia Inhibition Factor (LIF, 107 u/ml; ESGRO #13275-029)
- Nukleoside 100 x: 80 mg Adenosine (# A-4036), 85 mg Guanosine (# G-6264), 73 mg Cytidine (C-4654), 73 mg Uridine (# U-3003), 24 mg Thymidine (# T-1895, alle Sigma) in 100 ml PBS lösen, steril filtrieren, Aliquots bei -20°C lagern
- PBS-EDTA: PBS und 0,02 % EDTA
- Wachstumsbedingungen: 37°C, 10% CO2,

2.2.9.2 Kultur der Feeder-Zellen

Murine embryonale Fibroblasten dienen bei der Kultur embryonaler Mausstammzellen (mES-Zellen) als sogenannte Fütterungszellen. Diese Zellen geben unter anderem Differenzierungshemmer in das umgebende Medium ab, das so verhindert, dass die mES Zellen beginnen zu differenzieren.

2.2.9.2.1 Gewinnung der Fibroblasten

Mausstämme, die in ihrem Genom bereits Resistenzgene gegen Neomycin besitzen, wurden auf Heterozygotie miteinander, unter Plug Kontrolle, verkreuzt. Die Embryonen im Alter von E14.5. wurden unter sterilen Bedingungen aus dem Uterus präpariert, und der obere Teil des Kopfes sowie innere Organe der Bauchhöhle (Leber, retikulo-endotheliales System) entfernt. Die Rümpfe der Tiere wurden in 5 ml Embryo-Suspensionsmedium überführt und mit einem Skalpell zerkleinert. Dieser Gewebebrei wurde durch mehrmaliges Pressen durch eine Kanüle weiter homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 15 ml Falcon überführt, mit DNAse Lösung (1:100 Verdünnung von DNAse I 10000U, Roche # 776 785) und 5 mlTrypsin versetzt und 15 min bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Suspension wurde zum Absetzen fester Bestandteile 1 min stehen gelassen, 5 ml des Überstandes wurden in 20 ml Feedermedium P0 in ein 50 ml Falcon überführt. Zu der Gewebesuspension wurde erneut 5 ml Trypsinlösung gegeben. Dieser Trypsinverdau mit Überführung von 5 ml Überstand aus der Suspension wurde insgesamt noch dreimal wiederholt (Falls die Suspension zu viskös wurde, wurde die DNAse Behandlung ebenfalls wiederholt). Die so gesammelten Überstände enthielten die Fibroblasten. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer bestimmt und die Zellen mit einer Dichte von 5 x 10⁶ Zellen in 15 cm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht, nach zwei bis drei weiteren Tagen, bei Erreichen von optimal 90% Konfluenz, wurden die Zellen trypsinisiert und mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml eingefroren.

2.2.9.2.2 Inaktivierung muriner Fibroblasten

Die isolierten Feederzellen wurden aufgetaut und nach einer weiteren Passage bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Am Tag der Inaktivierung wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, welches mit 1 % Mitomycin (w/v) versetzt war (Sigma# M-0503). Mit diesem Medium wurden die Zellen 2-3 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abtrypsinisert, vereinzelt und in geeigneten Aliquots eingefroren. Eine Langzeitlagerung erfolgte über N_{21} .

2.2.9.3 Kultur von murinen ES-Zellen

Es wurden murine Embryonale Stammzellen (mES-Zellen) der Linie MPI II verwendet (Voss et al, 1997). Die Zellen wurden auf Gelatine beschichteten Zellkulturplatten (0,1 % Gelatine, auf Platte geben, absaugen und antrocknen lassen) mit inaktivierten Feeder-Zellen kultiviert. Die Zellen wuchsen bei 37°C, 5 % CO₂, das Medium wurde täglich gewechselt.

2.2.9.3.1 Auftauen von mES-Zellen

mES Zellen in Cryo-Vials wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, anschließend wurden sie im fünffachem Volumen mES-Zellmedium in einem Falcon aufgenommen und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt soll das vorhandene DMSO entfernen. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und auf die Feeder-Platte ausgesät. Das Auftauen von 96-well Platten erfolgte ebenfalls im Wasserbad bei 37°C.

2.2.9.3.2 Splitten von mES-Zellen

Bei Erreichen von Konfluenz wurden die mES-Zellen gesplittet. Dazu wurden sie mit PBS-EDTA gespült und mit Trypsin-EDTA überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei 37°C wurden die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Diese Zellsuspension wurde dann bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in einem geeigneten Volumen Medium resuspendiert. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben von der Platte gelöst und vereinzelt. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 20 ml PBS aufgenommen und ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, anschließend in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen /0,8 ml in PBS resuspendiert. In dieser Konzentration wurden die Zellen in Elektroporationsküvetten überführt (4 mm Küvetten) und die linearisierte, phenolisierte Vektor-DNA (10-25 µg DNA) dazugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min erfolgte die Elektroporation (BTX-Square-Porator: Mode=LV, Voltage=250 V, P-Length=001 ms, #Pulses=01). Die Zellen wurden sofort in Medium überführt und auf drei 10 cm Kulturschalen mit Feeder-Zellen verteilt. 18-24 h nach der Elektroporation das Medium gegen ES-Zell Medium mit aktivem Geneticin (Gibco# 10131-019, Endkonzentration 200–250 µg/ml) ausgetauscht, um nach Zellen zu selektionieren, die den Vektor in die DNA integriert hatten, und so eine Resistenz gegen Geneticin erworben hatten

Je nach Wachstum der mES-Zell-Kolonien erfolgte das Picken einzelner Kolonien 5 - 6 Tage nach Beginn der Selektion. Die Zellen wurden mit PBS gespült und überschichtet. Einzelkolonien wurden mit einer Pipette abgelöst und in 25 µl Trypsin-EDTA in je ein Well einer 96-well Platte überführt. Nach dreiminütigen Inkubieren bei 37°C wurden die Zellen mit Medium versetzt, vereinzelt und auf neue 96-well Platten mit Feedern umgesetzt. Nach drei Tagen wurden die Zellen gesplittet, wobei 1/3 der Zellen wiederum auf 96-well Platten kultiviert wurden (mit Feederzellen), 2/3 des jeweiligen Klons auf 24-well Kulturschalen (ohne Feederzellen) umgesetzt wurden. Die Zellen der 96-well Platten wurden nach weiteren zwei Tagen trypsinisiert und vereinzelt, anschließend mit Einfriermedium versetzt, mit Mineralöl (Sigma, M8410) überschichtet und langsam bei -80°C eingefroren. Die Zellkolonien auf den 24-well Platten wurden zur DNA Gewinnung 6-8 Tage nach dem Splitten lysiert (einmal waschen mit PBS, 500 µl Lyse-Puffer, 2 Tage bei 55°C inkubiert). Das Lysat wurde dann mit 500 µl Isopropanol versetzt und die Platten 15 min vertikal rotiert. Die DNA fiel dabei aus und konnte so "gefischt" werden. Die DNA wurde in 100 μ l T¹/₁₀E überführt und über Nacht bei

55°C gelöst. Zur Überprüfung der Rekombination wurde ein Southern Blot angefertigt (siehe . 2.2.4.2)

2.2.10 Elektrokardiogramm (EKG) Messungen an Mäusen

2.2.10.1 Aufnahme eines EKGs

Die EKG-Aufzeichnung erfolgte mittels bipolarer Oberflächenableitung mit Hilfe von Silber-Elektroden. Dazu wurde je eine Elektrode am linken Rippenbogen und in Höhe des rechten Brustmuskels angebracht. Eine weitere Elektrode wurde am unteren Abdomen der Maus befestigt. Die Elektroden waren mit einem Analog-Digital-Wandler verbunden, dieser wiederum mit einem PowerLab 8/30 (# ML870/P Adi Instruments). Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der LabChart 6 Software. Die Mäuse befanden sich während der Messung auf einer Wärmeplatte, um die Reduktion der Körpertemperatur zu verhindern.

Weitere EKG Messungen wurden in einer EKG-Röhre vorgenommen. Diese Apparatur wurde freundlicherweise von Dr. Philipp Sasse und Prof. Bernd Fleischmann (Physiologisches Institut, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

Die Apparatur besteht aus einer am Ende geschlossenen Röhre, das andere Ende der Röhre konnte, nachdem die Maus hineingelaufen war, ebenfalls verschlossen werden, so dass das Tier sich nicht mehr bewegen konnte. Die Füße der Maus sollten dann auf den vier Elektoden"platten" stehen. Mit diesen Platten wurden die drei bipolaren Ableitungen nach Einthoven abgeleitet. (I: rechtes Vorderbeinlinkes Vorderbein; II rechtes Vorderbein-linkes Hinterbein; III linkes Vorderbein - linkes Hinterbein). Der Vorteil dieser Apparatur lag darin, dass Tiere im wachen Zustand untersucht werden konnten, bei Bedarf konnten die Tiere anästhesiert werden. Dazu wurde 2% Isofluran/Sauerstoff in die Kammer geleitet. Die Aufnahme der Ableitung und weitere Analyse erfolgte mit LabChart6 Software (AdiInstruments).

2.2.10.2 Telemetrische EKG Messung

Die telemetrische Messung von EKG ermöglicht es, die Messung durchzuführen ohne die Maus einer Stresssituation auszusetzen. Es wurden Transmitter der Firma Data Science International, Model TA 10EA-F20, verwendet. Die Elektroden wurden subkutan so platziert, dass sie sich links unter dem Rippenbogen und rechts auf dem Brustkorb der Maus befanden.

Für die Langezeitanalyse wurden die Daten aller 30 min für 300 sec aufgezeichnet und ausgewertet. Um Artefakte die durch die OP bedingt sein könnten auszuschließen wurde mit der Datenerhebung erst sieben Tage nach OP begonnen. Zur Datenaufzeichnung wurde die Dataquest A.R.T 4.0 Software von DSI (Sample rate = 500 Hz; Filter cut off = 100 Hz) verwendet.

Für die Analyse der Auswirkung von Carbachol wurde die gesamte Zeit Daten erhoben. Nach einer Messung der basalen EKG Parameter für eine Stunden wurden den Tieren Carbachol 0,1 mg/kg Körpergewicht appliziert.

2.2.10.3 Analyse der ermittelten EKG-Daten

Mit der Lab Chart 6 Software konnten die Dauer einzelner EKG Komponenten genau ausgemessen werden. Das Programm erkennt dabei automatisch die einzelnen Wellen und Zacken der EKG-Kurve (P-welle, Q/R/S Zacken (zusammen als QRS-Komplex bezeichnet), T-Welle) und ermittelt die Dauer der Wellen untereinander und zueinander. Jede Ableitung wurde einzeln analysiert. Dazu wurde im Menü ECG-Analysis die folgenden Settings gewählt: Preset: Mouse, Die Voreinstellungen für dieses Preset wurden beibehalten, außer bei folgenden Parametern: typical QRS:8 ms; Maximum PR 60 ms; Maximum RT zwischen 60-350 ms (abhängig von der Herzrate, je niedriger die Herzrate desto größer die RT-Länge). Zur automatischen Erkennung der T-Welle wurde das Kontrollkästchen rodent T wave deaktiviert. Die Mittelung der einzelnen Schläge erfolgte über die Zeit (Mittlung aller 15 sec -30 sec). Die Auswertung musste manuell korrigiert werden. Dazu wurden im Averaging View die gemittelten Kurven sowie die Punkte angezeigt, die die Wellen und Zacken begrenzen. Diese Markierungen konnten manuell verschoben werden. Das Ende der T-Welle wurde so gewählt, dass es der Punkt auf der Zeitachse war, an dem die EKG Kurve nach einer Depolarisation wieder die Grundlinie überschritt (Abbildung 4).





P Start, 2) P Ausschlag, 3) P Ende, 4) QRS Start, 5) QRS Ende, 6) T Ausschlag, 7) T Ende, a) Grundlinie, b) Null-Linie. X-Achse: Zeit, Y-Achse: Ausschlag des EKGs [mV] A) Lage der Markierungen nach automatischer Detektion durch die Software. Sowohl die P als auch die T Welle wird falsch detektiert, in B) ist die Lage der Markierungen nach manueller Korrektur dargestellt. Die T Welle endet am Übertritt der Polarisation durch die Grundlinie

2.2.10.3.1 Berechnung des deltaQT/deltaRR Anstieges

Die Längen der QT Intervalle (in msec) wurden in ein Ecxel-Diagramm gegen die Dauer der RR Intervalle (in msec) aufgetragen. In das Diagramm wurde eine Trendlinie eingefügt und deren Gleichung (y=mx+n; m.. Anstieg, n.. Schnittpunkt mit Y-Achse, x.. RR Intervall, y.. QT Dauer) von Excel berechnet. Δ QT/ Δ RR ist der Anstieg m.

2.2.11 MRT Messung an Mausherzen

Die Messungen wurden an einem 7.0 T (300 MHz für H¹) Kernspintomographen (Pharmascan 70/16, Bruker, Ettlingen, BRD), ausgestattet mit einem 300 mT/m Gradientensystem mit einer Öffnung von 9 cm, durchgeführt. Als Sende- und Empfangsspule wurde ein zirkular polariserter *birdcage*-Resonator (Eigenbau des Instituts) mit einem Innendurchmesser von 2,5 cm benutzt. Zur Lokalisation und Bildgebung wurde eine FLASH (Fast Low Angle Shot)-Sequenz (Echozeit TE = 2.6 ms; Repetitionszeit TR = 6.2 ms; FOV = 2,2 x 2,2 cm²; Matrix = 128x128; Schichtdicke = 1,0 mm) verwendet. Statt der klassischen Methoden über Triggerung des EKG- und Atemsignals, wurde die sog. "self-gating" Methode IntragateTM der Firma Bruker BioSpin, Ettlingen, BRD angewandt (Larson et al, 2004) die aus einem jeder Bildzeile im k-Raum vorgeschalteten Navigatorecho die Herzphase bestimmt.

Die Herzfunktion der 7-12 Monate alten Tiere konnte so ermittelt werden und die linksventrikulären Parameter wie enddiastolische und endsystolische Volumina (EDV, ESV), Schlagvolumen (SV) und Ejektionsfraktion (EF) über Segmentierung der einzelnen Schichten mittels einer Auswertesoftware (Mass4Mice, Medis, Leiden, NL) bestimmt werden.

Während der Messung wurde die Maus auf einer speziellen Haltevorrichtung fixiert und die Anästhesie mit 1,5 bis 2,0 % Isofluran in 0,5 l/min Luft und 0,5 l/min Sauerstoff über eine Inhalationsmaske aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wurde mit einem thermostatisch regulierenden Wasserflusssystem bei 37°C gehalten.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von miRNA Knock-Out Mäusen

3.1.1 Knock-out miRNA Cluster miR-1-2/miR-133a-1

Das miRNA Cluster miR-1-2/133a-1 ist auf Chromosom 18 lokalisiert (mir-1-2 stem loop: Chromosom 18: 10785479-10785550 [-], mir-133a-1: Chr.18: 10782907-10782974 [-]). Es liegt zwischen dem 12. und 13. Intron des Gens Mindbomb1 (mib1). Zwischen den miRNAs befindet sich ein genomischer Bereich von 2,5 kb.

Zur Herstellung des Injektionsvektors wurde der 3' und 5' Bereich des miRNA Clusters in einen modifizierten pKO Scrambler Vektor (siehe 2.2.1.1) subkloniert. Beide Klonierungsarme wurden mittels PCR amplifiziert. Zwischen den beiden Klonierungsarmen wurde in die AscI-Schnittstelle der Multiplen Klonierungsstellen eine Kassette einkloniert, die eine IRES (internal ribosomal entry site), das Gen
ß-Galaktosidase sowie das Gen für eine Neomycin-Resistenz enthielt. Die Neomycin-Resistenz dient der Selektion der mit der Vektor-DNA elektroporierten mES-Zellen (murine embryonale Stammzellen) (siehe 2.2.9). Das Gen für β -Galaktosidase wurde als Reportergen gewählt, um die Expression des miRNA Cluster zu verfolgen. Da dieses Gen unter möglichen Promoter- und Transkriptionselementen des miRNA-Cluster steht, könnte die Expression von β-Galaktosidase räumlich und zeitlich die Expression des Cluster widerspiegeln. Die IRES-Sequenz bildet als mRNA eine spezielle Sekundärstruktur die der Anheftung des Transkripts an Ribosomen dient, und so die Translation nachfolgender Proteine ohne weitere Faktoren aktiviert. Die Selektionskassette ist von loxP-Sequenzen flankiert. Diese Sequenz dient der Cre-Rekombinase als Erkennungssequenz. Bei Expression der Rekombinase kann das Enzym den genomischen Bereich zwischen den loxP-Stellen deletieren (Nagy, 2000).



Abbildung 5 Generierung des Knock Out für miRNA Cluster miR-1-2/miR-133a-1 A Der genomische Bereich zwischen miR-133a-1 und miR-1-2 wurde deletiert, an dessen Stelle wurde eine Kassette kloniert, die eine IRES, das LacZ Gen sowie das Gen für die Neomycin-Resistenz enthielt. Die Kassette ist von loxP-Sites flankiert. **B** Die Sonde für den Southern Blot wurde so gewählt, dass nach Restriktionsverdau mit BanII im WT (+/+) eine Bande in der Größe von 7,7 kb detektiert werden konnte, im KO(-/-) zeigt der Southern Blot eine Bande in der Größe von 4,3 kb. **C** Mib1, in dessen Intron das miR-Cluster liegt, ist in seiner Expression nicht beeinflusst (RT PCR).

Der Nachweis der positiven homologen Rekombination in den ES-Zellen, sowie die Genotypisierung der Mäuse erfolgten mittels Southern Blot. Nach Restriktionsverdau der genomischen DNA mit BanII zeigt das WT-Allel eine Größe von 7,7 kb, das KO-Allel eine Bande von 4,3 kb (Abbildung 5).

Es wurde ein positiver Klon im Screen der ES-Zell Klone gefunden. Die Zellen des Klones 239-E-10 wurden in Blastozysten eingebracht und die daraus resultierenden Chimären wurden mit C57/Bl6 Tieren verkreuzt. Die Nachkommen dieser Verpaarung wurden durch Southern Blot Analyse genotypisiert. Heterozygote Tiere wurden weiterverpaart. Die Nachkommen aus der Verpaarung von heterozygoten Tieren zeigten eine typische 1:2:1 Verteilung nach Mendel (Tabelle 3). Homozygote miR-1-2/133a-1 Mutanten waren vital, fertil und zeigten keine Verhaltensunterschiede oder Unterschiede in der embryonalen bzw. postnatalen Entwicklung im Vergleich zu WT- oder heterozygoten Geschwistertieren.

3.1.2 Knock-out miRNA Cluster miR-1-1/miR-133a-2

Das Cluster der miRNAs 1-1 und 133a-2 liegt auf Chromosom 2 (stem loop mir-1-1:2: 180123753-180123829 [+], stem loop mir-133a-2: 2: 180133084-180133187 [+]). Die microRNAs dieses Clusters sind durch einen genomischen Bereich von 9,3 kb getrennt. Das Cluster liegt nicht innerhalb eines bekannten Genes.

Der Vektor zur Generierung der KO Maus wurde durch ein 6,1 kb Fragment im 5' Bereich von miR-1-1 durch Restriktionsverdau mit BamHI und EcoRI erhalten, der 3' Arm durch Restriktionsverdau mit BamHI und NdeI (4,0 kb). Die Arme wurden in den modifizierten pKO Scrambler Vektor (siehe 2.2.1.1) eingebracht. In die Asc Schnittstelle der MCS wurde die unter 3.1.1 beschriebene IRES-LacZpgkNEO Kassette eingesetzt (Abbildung 6).





A Der genomische Bereich zwischen miR-133a-2 und miR-1-1 wurde vollständig deletiert, und wie bei dem Cluster von Chromosom 18 an dessen Stelle eine Kassette kloniert, die eine IRES, das LacZ Gen sowie das Gen für die Neomycin-Resistenz enthielt. **B** Die Sonde für den Southern Blot wurde so gewählt, dass nach Restriktionsverdau mit SspI eine Bande in der Größe von 5,6 kb WT (+/+) detektiert werden konnte, der KO(-/-) wies eine Bande bei 7 kb auf.

Mittels Southern Blot wurde die homologe Rekombination in den ES-Zellen und in den generierten Mäusen kontrolliert. Durch Restriktionsverdau der genomischen DNA mit SpeI und anschließender Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde wurde für den WT eine Bande von 5,6 kb detektiert, die KO Bande hat eine Größe von 7,0 kb.

Es wurden vier positive Klone im Screen der ES-Zell Klone gefunden. Die Zellen der Klone wurden in Blastozysten eingebracht und die daraus resultierenden Chimären wurden mit C57/Bl6 Tieren verkreuzt. Die Nachkommen dieser Verpaarung wurden mittels Southern Blot genotypisiert. Heterozygote Tiere wurden dann weiterverpaart. Zur weiteren Analyse wurde nur ein Klon verwendet (Klon ID 203_10-C1).

Die Nachkommen von heterozygoten Eltern wiesen eine 1:2:1 Mendelsche-Verteilung auf (Tabelle 3). Homozygote Tiere zeigten in Bezug auf Vitalität, Fertilität oder Verhalten keine Unterschiede zu wildtypischen oder heterozygoten Geschwistertieren. Die embryonale Entwicklung sowie die postnatale Entwicklung der Tiere wiesen keine Unterschiede zu WT Tieren auf.

	miR-1	-1/133a-2	miR-1-2/133a-1			
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent		
Wildtyp	25	20,80%	32	23,60%		
heterozygot	52	50,00%	77	49,10%		
Knock Out	29	29,60%	45	27,40%		
Gesamt	106	100%	154	100%		

Tabelle 3 Anzahl der Nachkommen nach Verpaarung heterozygoter Elterntiere

3.2 miR-1 und miR-133a sind in den KOs um die Hälfte reduziert

Auf Grund des zweimaligen Auftretens von miR-1 und miR-133a im Genom der Maus führt die Deletion eines Clusters nicht zum vollständigen Verlust der miR-NAs, sondern nur zu einer Reduktion. Um diese Verminderung zu analysieren wurden zwei verschiedenen Methoden angewendet: MicroArray Technik und *Real Time* PCR mittels *TaqMan* Sonden.

Beim *Array* wird die Gesamt-miRNA Fraktion auf einen Mikrochip hybridisiert und anhand von Signal-Intensität Aussagen über die Expression getroffen. Die PCR Reaktion verwendet spezifische Primer für die jeweils zu untersuchenden miRNA.

3.2.1 MicroArray der microRNAs

Es wurde jeweils Gesamt-RNA aus Herzen von WT und KO Tieren für die Analyse verwendet. Die miRNAs wurden unterschiedlich farbig markiert, anschließend die WT und KO Probe gemischt und auf den Chip hybridisiert (siehe 2.2.5.4). Nach der Verrechnung der Daten (siehe 2.2.5.4.1) wurde das log₂ Verhältnis des WT/KO Signals gegen die WT Signal Intensität aufgetragen. Die Diagramme sind in Abbildung 7 A/B dargestellt. In beiden Clustern kann man die Verminderung der Expression sowohl von miR-1 als auch von miR-133a um etwa 50% erkennen.

3.2.1.1 TaqMan Real Time PCR

Mit der Real Time PCR konnte gezeigt werden, dass in beiden KOs sowohl miR-1 als auch miR-133a signifikant reduziert ist. Angegeben ist die relative Expression in Bezug auf die Expression von U6 snRNA (Untereinheit des Spliceosoms). Die Expression im WT wurde als "1" angenommen und die Expression der miRNAs in den KOs darauf bezogen. In miR-1-1/133a-2 KO ist miR-1 um 80% reduziert, miR-133a um 50%. Die Reduktion von miR-1 im miR-1-2/133a-1 KO beträgt 25%, miR-133a ist auf 60% reduziert. Alle Veränderungen der Expression sind signifikant verändert im Vergleich zur WT-Expression (einseitiger Student's t-Test, ungepaart) (Abbildung 7 C).



Abbildung 7 Expressionsanalyse von miR-1 und miR-133a in Herzen von adulten Tieren A/B Blot der relativen Expression der miRNAs im Vergleich zur WT Expression. grün Hervorhebung der miR-1, 133a und 133b Signale, grau alle detektierten miRNAs, blau Signale der let7 Familie, diese Werte wurden zur Normalisierung verwendet C *Real Time* PCR: Hier wurde die Expression wurde mittels *TaqMan* (Applied Biosience) ermittelt. Die relative Expression wurde in Bezug zur Expression der U6 Expression ermittelt. Die WT Expression wurde als 1 gesetzt.

3.3 Histologische Untersuchungen der miR-KO Cluster

3.3.1 miR1/133a- Cluster KO zeigt keine histologischen Veränderungen

Die histologische Analyse von adulten Herzen der miR-1-1/133a-2 und miR-1-2/133a-1 Cluster ist in Abbildung 8 dargestellt. Es konnten keine pathologischen Veränderungen detektiert werden.



Abbildung 8 Histologische Schnitte von adulten Herzen H&E Färbung, Maßstab 100 μm.

3.3.2 LacZ Expression in Locus von miR-1-1/133a-2

Das bei der Klonierung eingebrachte *lacZ*-Gen wurde im miR-1-1/133a-2 exprimiert so dass mittels X-Gal Färbung der Ort der Expression nachgewiesen werden konnte.

Die Expression ist im Herz- und Skelettmuskeln erkennbar (Abbildung 9, A/B), Niere, Leber, Milz oder Darm zeigten keine Färbung nach X-Gal Inkubation. Die Färbung ist sehr schwach. Schnitte von Organen (Abbildung 9, C/D) die nach der Färbung angefertigt wurden zeigen die Blau-Färbung nicht im Zytoplasma sondern in "Punkten" konzentriert. Die Gegenfärbung mit dem Kernfarbstoff DAPI zeigt, dass die Färbung nicht im Zellkern, sondern in anderen Zellorganellen lokalisiert ist. Es wurden auch Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien gefärbt. Die Embryonen wurden anschließend in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt. Die Färbung ist deutlich in den Atrien erkennbar, schwache Markierungen sind im Ventrikel lokalisiert. In den Somiten oder in weiteren Organen ist keine LacZ Färbung detektierbar (Abbildung 9, E/F).

In den Tieren des miR-1-2/133a-1 Cluster konnte trotz des LacZ- Knock In keine Färbung mit X-Gal gezeigt werden.

3.3.3 miRNA *in situ* Hybridisierung in beiden miR1/133a Cluster KOs zeigt unterschiedliche Muster

Die *in situ* Hybridisierung dient zum Nachweis der Expression eines Gens oder einer miRNA am Ort der Transkription. Mit Hilfe von LNA Sonden konnte hier die Expression von miR-1 in ganzen Embryonen (*Whole Mount in situ Hybridisierung*) gezeigt werden. Der Nachweis der Expression von miR-133 schlug fehl.

In WT-Embryonen konnte die Expression im gesamten Herzen gezeigt werden, sowohl das Atrium als auch die Ventrikel weisen eine Färbung auf. Ebenso ist eine deutliche Färbung in den Somiten erkennbar (Abbildung 10).

Die Expression in den KO-Embryonen spiegelt das Vorhandensein der jeweils homologen miRNA wider: so ist die nachgewiesene Färbung im miR-1-1/133a-2 KO auf die Expression von miR-1-2 zurückzuführen und umgekehrt.

Die untersuchten Embryonen des mir-1-2/133a-1 Cluster KOs wiesen unterschiedliche Färbemuster auf. So zeigten einige eine Färbung im gesamten Herzen (Abbildung 10), andere nur im Atrium. Die Expression in den Somiten war immer erkennbar.

Alle untersuchten Embryonen des miR-1-1/133a-2 KO zeigten eine Färbung wie im WT: Ventrikel, Atrium und Somiten färbten und zeigen somit eine Expression von miR-1-2 in den betreffenden Gebieten.

Ergebnisse



Abbildung 9 LacZ-Expression von Organen der miR-1-1/133a-2 KO Tiere (*lacZ Knock in*) A/C Herz und Muskel von lacZ Tieren (miR-1-1/133a-2 KO) wurden mit X-Gal gefärbt. Die Blaufärbung zeigt die Expression des miR-1-1 Cluster. **B** Schnitt des Herzens nach X-Gal Färbung (Pfeile) und Gegenfärbung mit dem Kernfarbstoff DAPI (hellblau, Pfeilköpfe) **D** miR-1-1/133a-1 KO Embryo E10.5 nach X-Gal Färbung **E** Sagittalschnitt von D, die Expression ist in den Atrien lokalisiert. A Atrium, V Ventrikel, Maßstab A/C/D 1 mm, B/E 100 μm.



Abbildung 10 miR-1 in situ Hybridisierung von E10.5 Embryonen

A Wildtyp Embryo, **B** *Whole mount in situ* Hybridisierung eines miR-1-1/133a-2 KO Embryos, **b** Sagittalschnitt des Embryos, die Expression von miR-1 ist im Atrium und Ventrikel nachweisbar ebenso in den Somiten. **C/D** *Whole mount in situ* Hybridisierung von miR-1-2/133a-1 KO Embryos, **c/d** Sagittalschnitte der Embryonen. Färbungen wurden sowohl im ganzen Herz nachgewiesen, als auch nur im Atrium. A Atrium, V Ventrikel, S Somiten. Maßstab A-D 1 mm, b-d 100 µm.

3.4 Physiologische Analyse der Einzel-Cluster KO

3.4.1 miR-1/133a KO Tiere zeigen keine Veränderungen im MRT

Um physiologische Veränderungen der funktionellen Parameter des Herzschlags sichtbar zu machen, wurden narkotisierte Tiere im MRT untersucht. Die Herzrate der untersuchten Tiere war vergleichbar (Tabelle 4). Die makroskopischen Bilder (Abbildung 11) zeigen, dass die Herzen sowohl im Axialschnitt als auch im Koronarschnitt keine pathologischen Veränderungen aufweisen.

Die Analyse der enddiastolischen und endsystolischen Volumina und die damit ermittelbaren Werte wie Schlagvolumen (Menge des ausgeworfenen Blutes pro Schlag) und Auswurffraktion (Menge des ausgeworfenen Blutes pro Schlag im Verhältnis zum enddiastolischen Volumens) sowie die Verkürzung des linken Ventrikels (*fractional shortening*) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Knock-Out Tieren (Abbildung 11).

Das Blutvolumen während der Enddiastole scheint im KO miR-1-1/133a-2 vergrößert zu sein, was man sowohl in der Höhe des Enddiastolischen Volumens als auch im Schlagvolumen erkennen kann. Daraus resultiert ebenfalls die Vergrößerung der Auswurfsfraktion. Ein signifikanter Unterschied bei je vier untersuchten WT und miR-1-2/133-a1 sowie fünf miR-1-1/133a-2 KO Tieren konnte aber nicht ermittelt werden



Abbildung 11 MRT Untersuchung der miR-1/133a Cluster KOs

Axial- und Koronarschnitt in der enddiastolischen Phase, Axialschnitt in Höhe der Papillarmuskeln. Maßstab 5 mm

Tabelle 4 MRT Untersuchung der miR-1/133a Cluster KOs

Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Parameter der MRT Messung. EDV Enddiastolisches Volumen, ESD Endsystolisches Volumen, SV Schlagvolumen= ESV-EDV; EF Ejektions Fraktion (ventrikuläre Auswurfsfraktion) = Schlagvolumen/ EDV, FrS (Fractional Shortening) linksventrikuläre Verkürzung = (Durchmesser Enddiastole-Durchmesser Endsystole)/ Durchmesser Enddiastole, p-Wert Student's T-Test, zweiseitig, ungepaart.

		N	/ilc	ltyp	miR-1-1/ KC	133a-2)	p-Wert	miR-1-2/133 KO	a-1	p-Wert
EDV links	[µl]	86,97	±	11,75	97,81 ±	32,24	0,55	91,00 ± 5,6	62	0,56
ESV links	[µl]	45,69	±	9,87	47,71 ±	17,13	0,84	52,16 ± 3,2	25	0,26
EDV rechts	[µl]	75,61	±	13,71	73,19 ±	23,63	0,86	78,89 ± 6,5	50	0,68
ESV rechts	[µl]	40,53	±	5,40	41,01 ±	19,86	0,96	49,14 ± 7,1	71	0,12
SVL	[µl]	41,19	±	8,55	51,29 ±	16,14	0,30	38,84 ± 4,3	34	0,64
SVR	[µl]	35,08	±	9,40	32,04 ±	11,33	0,68	29,75 ± 5,0	05	0,36
EF links	[%]	47,61	±	8,01	51,82 ±	4,42	0,35	42,63 ± 3,0	09	0,29
EF rechts	[%]	45,87	±	5,02	44,70 ±	13,45	0,87	39,33 ± 8,1	14	0,22
FrS	[%]	28,93	±	10,07	27,68 ±	2,80	0,80	22,72 ± 3,7	72	0,29
Herzschlag	[bpm]	440	±	45	398 ±	17	0,10	425 ± 2	26	0,59
Anzahl Tiere				4			5			4

3.4.2 Verlust der miR-1/133a Cluster führt zu LongQT Phänotyp

Im Elektrokardiogramm (EKG) werden räumliche und zeitliche Potentialveränderungen dargestellt. Diese geben Auskunft über die elektrische Weiterleitung der Erregung über das Herz.

Es wurden verschiedene Parameter des EKGs analysiert und dabei wurde festgestellt, das KO Tiere unter Narkose eine längere QT-Zeit aufwiesen als WT. Für weitere Analysen wurde eine Kooperation mit AG Prof. Fleischmann (Physiologisches Institut II, Universitätsklinik Bonn) eingegangen.

Die QT-Dauer umfasst die Zeit von der Depolarisation der Ventrikel bis zur Repolarisation. Mit Beginn der Kammererregung beginnen die Ventrikel zu kontrahieren. Die völlige Relaxation der Ventrikel folgt dem Ende der Kammererregung.

Durch Fixation der Mäuse in einer EKG Röhre (2.2.10.1) konnte zunächst das EKG der wachen Maus abgeleitet werden. Durch Einleitung von Isofluran wurde die Maus dann anästhesiert und das EKG konnte bei niedrigerer Herzrate aufgenommen werden.

Unter physiologischen Herzraten (600-700 bpm) war kein Unterschied zwischen WT und KOs in Bezug auf die QT-Dauer nachweisbar. Unter Narkose bei niedrigen Herzraten (300-500 bpm) verlängert sich die QT Dauer in den KOs stärker als im WT. Abbildung 13 A-C zeigt typische EKG Linien bei einer Herzrate von ca. 400 bpm (RR= 166 ms). In beiden KOs ist die T-Welle länger als im WT, die Länge der T-Welle ist im mir-1-1/133a-2 KO größer als im miR-1-2/133a-1 KO

Um die Abhängigkeit der verlängerten T-Welle von der Herzrate zu zeigen, wurden die QT Zeiten gegen die RR Intervalle aufgetragen. In Abbildung 13 D ist je ein typischer linearer Trend dieser Werte pro Genotyp dargestellt. Man kann sehen, dass der Anstieg, und damit die Verlängerung der QT Dauer in Abhängigkeit der Herzrate(Δ QT/ Δ RR) am stärksten im miR-1-1/133a-2 KO ist.

Abbildung 13 E zeigt die Zusammenfassung der Daten. Zur Auswertung wurden mindestens zwei von drei Ableitungen herangezogen. Die Anstiege von

 $\Delta QT/\Delta RR$ wurden berechnet und pro Tier gemittelt. Diese Werte wurden von mehreren Tieren ermittelt und dann wiederum das arithmetische Mittel gebildet. Der größte Anstieg ist im miR-1-1/133a-2 KO zu beobachten



Abbildung 12 Veränderung der Herzrate und der daraus resultierenden QT Dauer ohne Narkose

A Anstieg Herzrate nach Gabe des Parasympathomimetika Carbachol (Herzrate basal zwischen 400 und 600 bpm, Herzrate nach Carbachol 150-250 bpm) **B** Anstieg von $\Delta QT/\Delta RR$ in nicht narkotisierten Tieren, unterschiedliche Herzraten ergeben sich aus dem Wach/Schlafrhythmus der Mäuse.

Die Verlängerung der QT Dauer konnte auch unter physiologischen Bedingungen mit Hilfe telemetrischer Daten gezeigt werden. Den Tieren wurde dazu ein Transmitter eingesetzt. So konnte das EKG ununterbrochen aufgenommen werden, ohne dass die Tiere Stressfaktoren ausgesetzt waren. Unterschiedliche Herzraten ergeben sich hier durch den Wach/Schlafrhythmus (Herzrate Tag: WT 494 bpm, KO 440, Herzrate Nacht WT 539 bpm, KO 573). Auch hier konnte gezeigt werden, dass die QT Dauer bei niedrigeren Herzraten in den KOs verlängert ist (Abbildung 12). Nach Gabe des Parasympathomimetika Carbachol, das ein Sinken der Herzrate bewirkt, wurde ebenfalls eine Verlängerung der QT-Dauer in den KO Tieren beobachtet.



Abbildung 13 Elektrophysiologische Untersuchung der miR-1/133a KO

A Typische EKG Linien von WT und miR-1/133a KOs bei einer Herzrate von ca. 400 bpm. Das Ende der T Welle wurde gewählt, wenn die EKG Linie die Grundlinie wieder kreuzte (schwarze Pfeilspitze). Die QT Länge ist im KO von miR-1-2/133a-1 kürzer als miR-1-1/133a-2 KO, aber beide KO Tiere zeigen eine Verlängerung der QT Zeit im Verglich zum WT. **B** Anstieg der QT Dauer gegen RR Intervall. Dargestellt ist jeweils eine Datenreihe pro Genotyp. Der Anstieg im WT ist am flachsten, der für KO miR-1-1/133a-2 am stärksten, der Anstieg von Δ QT/ Δ RR des miR-1-2/133a-1 KOs liegt dazwischen. **C** Gemittelte Anstiege Δ QT/ Δ RR der einzelnen Genotypen, Es wurden die Anstieg der auswertbaren Ableitungen gemittelt, und pro Tier ein gemittelter Wert in die Auswertung einbezogen. Der größte Anstieg ist im miR-1-1/133a-2 KO zu finden, der Anstieg im miR-1-2/133a-1 KO ist ebenfalls signifikant stärker als im WT (WT n= 4, miR-1-1/133a-2 KO n= 3, miR-1-2/133a-1 n= 4, Student's t-Test, zweiseitig, * p>0,05, ***p>0,005).

3.5 Molekulare Analyse

3.5.1 Veränderte Genexpression nach Deletion von miR-1 und miR-133a

Mit Hilfe von *Affymetrix GeneChips* kann ein Großteil der exprimierten Gene auf ihre relative Expression untersucht werden. Es wurden sechs WT, vier miR-1-2/133a-2 KO Tiere und drei miR-1-1/133a-1 KO Tiere untersucht.

Im miR-1-1/133a-2 KO sind 216 Genen mit einer signifikanten Veränderung der Expression über 1,5fach (stärker oder schwächer) detektiert wurden, im miR-1-2/133a-1 KO 101 Gene. Davon sind 44 Gene, deren Expression in beiden KOs gleich signifikant reguliert waren. Diese Gene sind im Anhang aufgelistet.

Das Gen mindbomb1, in dessen Intron miR-1-2/133a-1 lokalisiert ist, ist in seiner Expression nicht beeinflusst. Dies konnte mit RT PCR (Abbildung 5), als auch mit den *Affymetrix* Daten (ProbeSet ID 1451818_at: veränderte Expression log2= 0,98, p-Wert = 0,5) gezeigt werden.

3.5.1.1 Die Expression von vorausgesagten Ziel-mRNAs ist in den KOs nur teilweise verändert

MiRNAs wirken, in dem sie an die 3' UTR ihrer Zielgene binden und dadurch die Translation hemmen. Mit verschiedenen Algorithmen können Ziel-mRNAs vorhergesagt werden. Diese "Zielgene" müssen aber mit weiteren, biologischen Test bestätigt und beschrieben werden. Nach Beginn dieser Arbeit wurden von anderen Arbeitsgruppen Gene und Proteine beschrieben, die direkt oder indirekt von miR-1 und/oder miR-133a beeinflusste werden.

In unseren KOs konnte die mRNA Expression beschriebener Zielgene mittels *Affymetrix* dargestellt werden. So kann für die miR1/133a Cluster auf mRNA Ebene nur für *Irx5* und *Kcnd2* eine Veränderung gezeigt werden, allerdings nur im miR-1-1/133a-2 KO. Andere beschriebenen Zielgene wie *Srf*, *Hand2*, *Hdac4* oder *Ccnd2* sind in der Expression nicht verändert (Abbildung 14).

Gene, die hauptsächlich in Glattmuskel-Zellen exprimiert werden konnten in den hier analysierten KOs ebenfalls nur bedingt als differentiell exprimiert detektiert werden. *Tagl2* ist signifikant in beiden Cluster-KO schwächer exprimiert, aber mit einer Veränderung von nur 0,3x (log₂). *Tagl* ist stärker im miR-1-1/133a-1 KO exprimiert, weitere Glattmuskel-spezifische Gene wie *Acta2*, *Cald1*, *Tagln3* und *Cald1* sind in ihrer Expression nicht verändert (Abbildung 14).

3.5.2 Veränderte Proteinexpression nach Deletion miR-1 und miR-133a

Da miRNAs unter anderem durch Bindung an die 3' UTR der Ziel-mRNA die Translation hemmen, bedeutet eine veränderte oder mRNA Expression nicht automatisch auch eine veränderte Proteinexpression. Aus diesem Grund war es nötig, auch die Proteinexpression zu untersuchen.

Mit der SILAC Methode (*Stable Isotop Labeling of Amino Acids in Cell Culture*) lassen sich Teile des Proteoms ganzer Gewebe und Organe darstellen. Durch die Mischung von "leicht" und "schwer" markierten Proteinen (siehe 2.2.7.5.5) kann man die Expression normalisieren und besser vergleichen.

Zur Analyse der veränderten Proteinexpression wurden sowohl Proteine aus SDS-Aufreinigung (Gesamtproteinextraktion) als auch aus Membrananreicherungen analysiert. In Tabelle 5 sind die am stärksten regulierten Proteine dargestellt. Im KO für miR-1-1/133a-2 wurden 17 Proteine gefunden, die signifikant reguliert waren, im KO für miR-1-2/133a-1 58 Proteine. Davon waren elf Proteine in beiden Cluster KOs reguliert. Diese Proteine sind in Tabelle 5 dargestellt. (Zur Berechnung der Expressionsveränderung und Signifikanzen siehe 2.2.7.5.5)

3.5.3 Veränderte Expression von LongQT-assoziierten Genen und Proteinen

Das Zusammenspiel von vielen verschiedenen Kanälen und Transportern in Kardiomyozyten sorgt für die richtige Weiterleitung von elektrischen Signalen in den Zellen und damit zur Kontraktion des gesamten Herzens. Funktionsstörungen eines kardialen Ionenkanals können unter Umständen zu einem veränderten EKG führen. Durch die Daten der EKG Messung konzentrierte sich die weiteren Analysen auf Gene bzw. Proteine, deren Expressionsveränderungen zum LongQT Syndrom führen. Die mRNA Expression bekannter LongQT assoziierter Kanäle ist in Abbildung 14 D dargestellt.

Das Gen Scn5, welches einen Natriumkanal codiert, wird mit dem LQT Syndrom 3 in Verbindung gebracht. Veränderte Kalium-Ströme von mERG (Kcnh2) führen zu LQT Syndrom 2. Für beide Gene konnte in der mRNA Analyse kein signifikanter Unterschied in der Expression festgestellt werden.

Für die Kalium Kanäle Kcnq1 und Kcne1 konnten signifikante Veränderungen der mRNA Expression gezeigt werden. So ist Kcnq1 im miR-1-2/133a-1 KO signifikant stärker exprimiert als im WT (1,2x reguliert p-Wert 0,012). Kcne1, das für die regulatorische Untereinheit von KCNQ1 codiert, ist signifikant in beiden KOs erhöht ist (KCNE1 miR-1-1/133a-2: 1,9x reguliert, p-Wert 0,001, miR-1-2/133a-1: 1,5x reguliert, p Wert 0,048) (Abbildung 14 D). Die Proteine konnten in SILAC Ansatz nicht nachgewiesen werden. Auch Versuche, die Proteinexpression mit Hilfe von Western Blot zu untersuchen, schlugen auf Grund nicht funktionierender Antikörper, fehl. Die Messung der Ströme an embryonalen Kardiomyozyten zeigt einen Strom, der unter Gabe von Isoproterenol noch verstärkt werden kann. In adulten Kardiomyozyten war weder im WT noch im miR-1-2/133a-KO ein Strom messbar (Abbildung 15).



Abbildung 14 Relative mRNA Expression in den miR-1/133a Cluster KO Tieren Dargestellt ist jeweils die log relative mRNA Expression im Verhältnis zur Expression in den WT (log WT = 0), Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, * signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,05), A Expression von Genen die in Publikationen als direkt von miR-1 und/oder miR-133 reguliert beschrieben sind B Expression Glattmuskel-spezifischer Gene C Expression Stressmarker-Gene D Expression LQT assoziierter Gene.
	-		
	e	÷	1
	÷	ίN	
		ρĎ	1
	G	Q	
	٠Ē	Π	
		n	
	st	•=	
	. –	u	
	5	.9	l
	ĕ	.2	
	G	S	
	pD	Ĕ	
	9	8	
	\triangleleft	r H	,
	<u>.</u> :	щ	
	5	e	
	Ľ	Ę.	
_	<u>'a</u>	le le	
S.	5	ĕ	
8	+	:E	
¥.	G	H	
\leq	: <u> </u>	ž	
Ξ.	ī	ت	
Ż	þΩ	e	2
Ξ	5 E	ã	
8	2	- <u>e</u>	
2		Ċ	5
H	ē		
X	S	Ð	1
1	lu	q	
Ξ	$\overline{\mathbf{O}}$	5	
.н	_	fe	1
E	5	H	1
Ť.	ğ	H	
ž	·5	G	
Ξ	ĕ	ã.	
-			1
ੁ	Ξ.	e)	j
5	e O	р	
Ħ	÷Ē	e	
E	0	\sim	
0	Ļ,	\mathbf{T}	
S.	G	Ia	
ŝ	Ħ	R	
ž	.н	<,	
<u>d</u>	Ξ	κ	,
×	Ð	Ľ.	
e e	d)	St.	
.E	ă	ŭ	ĥ
e	. <u>9</u>	ž	
5	Ĕ	£	
Ă.	2	Ą	•
Α.	È,		
e	4	ē	
÷	F	Ð	•
5		S	
Ð	Ë	Ц	
Ē	de	а	
3	Ĕ	п	
5	ŭ	e)	ļ
5	3	at	
	٢)	\Box	1
5	\leq	_	2
e	4	ie.	i
Ē		d.	'
e	5	-	
9	<u> </u>	N	

Tabelle 5 Veränderte Proteinexpression nach Deletion von miR-1/133a
Im SILAC wurden Elf Proteine ermittelt, die in beiden Clustern reguliert waren. Angeben ist hier die veränderte Expression in Log2,
dazu die Daten aus der Affymetrix Analyse der betreffenden Gene (veränderte Expression in Log2). * Signifikanter Unterschied in
der mRNA Expression im Vergleich zum WT. Ziel mRNA für die angegebenen Gene nach MO (microRNA.org) und MB
Mirbase.org.

Ziel-mRNA für	iiR-1 miR-133			MO	MO MB					MO		O MB
	5											Š
	×	*			*	*	*	*			*	*
l/133a-2	Affymetri	1,35	0,06	0,09	0,37	0,39	0,18	0,26	-0,06	0,06	0,59	-0,31
miR-1-1	SILAC	2,14	0,85	0,77	0,77	0,77	0,68	0,58	0,49	0,49	0,49	-0,51
	v	*			*		*	*				*
	stri	2	5	ω	S	4	e	ω	Ξ	N	02),13
2/133a-	Affym∈	0,7	0,0	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,0	0,0	Ó	Ŷ
miR-1-2/133a-	SILAC Affyme	1,49 0,7	0,77 0,0	1,00 0,1	0,68 0,2	0,58 0,3	0,58 0,3	0,49 0,1	0,38 0,0	0,58 -0,0	1,07 0,	-0,74 -0
Gene Symbol miR-1-2/133a-	SILAC Affyme	Myh7 1,49 0,7	Dstn 0,77 0,0	Nme1 1,00 0,1	Slc25a5 0,68 0,2	Pgam1 0,58 0,3	Cfl1 0,58 0,3	Ppia 0,49 0,1	Prdx3 0,38 0,0	Hnrnpa3 0,58 -0,0	Tpm2 1,07 0,	Slc25a20 -0,74 -0





A in embryonalen **B** adulten WT- und **C** miR-1-2/133a-1 KO Kardiomyozyten. Durch Stimulation mit dem Sympathomimetika Isoproterenol wird der Strom verstärkt, Chromanolol blockt spezifisch die langsame Komponente des I_{Ks}

Mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen unserer Kooperationspartner in Bonn konnte gezeigt werden, dass der durch den LTCC erzeugte Cav1.2 Strom verändert ist. Auf mRNA-Ebenen konnte für die Untereinheiten des Kanals (*Cacna1c* codiert für Cava1, *Cacnb2* codiert die regulatorische Untereinheit Cav β 2) keine veränderte Expression nachgewiesen werden (Tabelle 6). Auch im Western-Blot wurde keine veränderte Expression der Untereinheiten detektiert (Abbildung 16, Western Blot wurde von Dipl.-Biol. Johannes Besser durchgeführt).

Die mRNA-Expression weiterer LQT assoziierten Gene ist in Abbildung 14 D angezeigt. Für diese Gene konnte keine Veränderung der Expression nachgewiesen werden.



Abbildung 16 Proteinexpression des L-Typ Kalzium Kanals

A/B Western Blot von Cav β 2 und Cav α 1 auf Membranpräparation adulter Herzen. Myosin wird von den hier verwendeten α -Cav β 2-Antikörper erkannt und wurde als Ladekontrolle verwendet, als Ladekontolle für die Cav α 2 Expression wurde VDAC verwendet **C** relative Proteinexpression von Cav β 2, normalisiert auf die Expression von Myosin, **D** relative Proteinexpression von Cav α 1, normalisiert auf die Expression von Vdac,WT Expression wurde jeweils als 1 gesetzt, Die Veränderungen zur WT- Proteinexpression sind nicht signifikant verschieden

3.5.4 Untersuchungen zum β-adrenergen Signalweg

Durch Messungen die von unseren Kooperationspartnern in Bonn durchgeführt wurden, war bekannt, dass der Strom, der durch den L-Type Kalzium Kanal (Cacna1c, CAV1.2, im folgenden LTCC) herbeigeführt wird, verändert war. Dies führte zur Vermutung, dass der Signalweg, der durch β -adrenerge Stimulation ausgelöst wird, beeinflusst ist.

3.5.4.1 Die kardiale cAMP Konzentration im WT und KOs ist gleich

Die Konzentration von cAMP in der Zelle steigt durch β -adrenerge Stimulation an. Durch die Aktivierung von G-Proteinen durch adrenerge Agonisten wird das Enzym Adenylatzyklase aktiviert. Dieses Enzym wandelt ATP zu zyklischem AMP (cAMP) um. Die cAMP Konzentration dient als molekularer Schalter für nachgeschaltete Enzyme und potenziert so die Wirkung der Signalkaskade. Aktivierte Enzyme (z.B. Proteinkinase) aktivieren daraufhin wiederum ihre Zielgene. Um zu testen, ob der β -adrenerge Signalweg möglicherweise durch eine veränderte cAMP Konzentration beeinflusst ist, bzw. ob die cAMP Konzentration in der Zelle verändert ist, sollte die Menge von cAMP in Herzen bestimmt werden.

In beiden KOs konnte kein Anstieg der cAMP Konzentration im unstimulierten Zustand ermittelt werden (Abbildung 17). Im WT betrug die durchschnittliche cAMP Konzentration 527,7 \pm 40,76 fmol/mg Herz, bei den KOs 554,6 \pm 73,31 fmol/mg Herz (miR-1-1/133a-2) und 451,8 \pm 49,87 fmol/mg Herz (miR-1-2/133a-1) bei einer Anzahl von fünf Tieren für WT und miR-1-1/133a-2 KO, sowie 4 Tiere für miR-1-2/133a-1.

Die cAMP Konzentration ist in den KO Tieren nicht verändert, und kann nicht als ein Indiz für ein veränderten β-adrenergen Signalweg angenommen werden.





3.5.4.2 Differentielle Expression von Genen des β-adrenergen Signalweges

Die Expression von Genen des β -adrenergen Signalweges konnte aus den Daten der *Affymetrix* Analyse entnommen werden. In Tabelle 6 sind ausgewählte Gene des Signalweges aufgeführt (in log₂, normalisiert auf die WT Expression (log₂ WT = 0): eine schwache Verminderung der mRNA Expression ist für Kalzium/Calmodulin Proteinkinase 2 (*CamKII*) sowie den Ryanoidinrezeptor 3 (*Ryr3*) erkennbar. Die Expression von Kcnip2 (*Kchip2*; Kv channel interacting protein) ist im miR-1-1/133a-2 KO fast signifikant verdoppelt, allerdings ist die Expression im miR-1-2/133a-1 KO nicht erhöht. Umgekehrt verhält es sich mit der δ -Untereinheit des L-Typ Kalzium Kanals (*Cacna1d*), diese ist nur im miR-1-2/133a-1 KO leicht erhöht, nicht aber im miR-1-1/133a-2 KO. Außer bei *Kcnip2* und *Camk2d* ist die Veränderung der Expression der ausgewählten Gene so niedrig, dass man diese für eine physiologische Relevanz vernachlässigen kann.

Weitere Genen des β-adrenergen Signalweges wie Proteinkinase A (*Prkaca*), Adenylatcyclase (*Adcy6, Adcy5*), *Cacna1c, Cacnb2* (L-Typ Kalzium Kanal), *Slc8A1* (NCX, Na-Ca-Ausstauscher), Phospholamban (*Pln*), Ryanoidinrezeptor 2 (*Ryr2*), Atpa2a1 (SERCA) und muskariner Rezeptor 3 (*Chrm3*) sind in der mRNA Expression in beiden KOs nicht verändert.

3.5.4.3 Differentielle Expression von Proteinen des β-adrenergen Signalweges

Um zu untersuchen, ob Proteine, anders als ihre korrespondierende mRNA, unterschiedlich stark exprimiert sind, wurde SILAC (siehe 3.5.2) durchgeführt.

Es konnten nur einige wenige Proteine des β -adrenergen Signalweges im Massenspektrometer detektiert werden (Tabelle 6). Für SERCA, Proteinkinase A, NCX (Slc8a1) und CAMK2D konnte gezeigt werden, dass die Proteine nicht stärker oder schwächer im Vergleich zum WT exprimiert werden.

Andere Proteine des β -adrenergen Signalweges konnten mit den gewählten Bedingungen im SILAC Ansatz nicht detektiert werden.

	miR-1-2/133a-1 KO				miR-1-1/133a-2 KO			
	Affymetrix		SILAC		Affymetrix		SILAC	
			Gesamt	Membran			Gesamt	Membran
	log FC		log FC	log FC	log FC		log FC	log FC
Kcnip2	0,34	ns	nd	nd	0,89	*	nd	nd
Camk2b	-0,23	ns	nd	nd	-0,33	*	nd	nd
Camkk2	-0,16	*	nd	nd	-0,05	*	nd	nd
Ryr3	-0,18	*	nd	nd	-0,19	*	nd	nd
Cacna1d	0,19	ns	nd	nd	0,36	*	nd	nd
Camk2d	0,07	ns	-0,39	0,16	-0,78	*	-0,24	-0,25
Atp2a1	-0,13	ns	-0,09	-0,13	0,00	ns	-0,12	-0,04
Ryr2	0,19	ns	nd	nd	0,00	ns	nd	nd
Cacna1d	0,04	ns	nd	nd	0,01	ns	nd	nd
Pln	0,05	ns	nd	nd	0,03	ns	nd	nd
Cacnb2	0,05	ns	nd	nd	-0,03	ns	nd	nd
Chrm3	-0,07	ns	nd	nd	0,06	ns	nd	nd
Ryr2	0,14	ns	nd	nd	-0,07	ns	nd	nd
Cacna1c	0,27	ns	nd	nd	0,07	ns	nd	nd
Prkaca	0,01	ns	0,21	0,08	-0,07	ns	0,06	0,11
Cacnb1	0,00	ns	nd	nd	0,07	ns	nd	nd
Slc8a1	0,01	ns	-0,29	0,16	-0,15	ns	-0,11	0,17
Cacnb2	0,05	ns	nd	nd	-0,17	ns	nd	nd
Adcy6	0,09	ns	nd	nd	0,29	ns	nd	nd

Tabelle 6 Expression von Genen und Proteinen des β-adrenergen Signalweges

Angegeben ist die relative \log_2 mRNA Expression im Verhältnis zum WT (\log_2 WT = 0). Die Proteinexpression ist in \log_2 des Verhältnisses WT/KO Expression angegeben. SILAC Gesamt: SDS-Aufreinigung von Gesamtprotein, Membran: Membrananreicherung, * p-Wert <0,05, ns nicht signifikant, nd nicht detektiert.

3.6 Verlust beider miR-1/133a Clustern führt zu embryonaler Letalität

Durch Verpaaren der KO Tiere für das Cluster miR-1-1/133a-2 und miR-1-2/133a-1 wurde der vollständige Verlust von miRNA-1 und miRNA-133a erreicht. Durch Verpaarung doppelt-heterozygoter Tiere, wird ein Doppel-KO mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:16 erwartet. Nach 18 Würfen wurde kein lebender Doppel-KO gefunden (Abbildung 18).

Für die weitere Analyse wurden die Tiere zeitlich angepaart und zu bestimmten Zeiten Embryonen präpariert. Dabei konnte durch makroskopische und histologische Betrachtung die Letalität der Doppel-Cluster-KOs für den Entwicklungspunkt zwischen E10.5 und E12.5 festgestellt werden. Doppelt-homozygote Embryonen wirken kleiner als ihre einfach-homozygoten Geschwistertiere. Makroskopisch konnte man erkennen, dass das Herz zwar schlug, allerdings befand sich im Herzschlauch mehr Blut als in den Kontrolltieren. Mikroskopisch wurde deutlich, dass die Trabekulation vermindert ist und die Ventrikelwand aus weniger Zellen besteht. Die Ventrikelwand im Kontrolltier besteht aus fünf Zellreihen, die im doppelt-homozygoten Tier nur aus zwei Zellreihen (Abbildung 20).



Abbildung 18 Nachkommen aus doppelt-hetero Verpaarung

Doppelt-heterozygote Tiere wurden verpaart und die Nachkommen genotypisiert. Das Diagramm zeigt die Verteilung der Genotypen nach 18 Würfen (n=116). Es wurden keine Tiere geboren, die den Verlust beider miRNA 1/133 Cluster aufwiesen.

Immunhistologische Untersuchung mit Antikörper gegen mit MF20 (α-Myosin schwere Kette) zeigt keinen Unterschied der räumlichen und zeitlichen Expression und in Kontroll- und Doppel-KO Tieren (Abbildung 19).



Abbildung 19 Myosin Färbung an Transversalschnitten von Doppel KO Embryonen (E10.5) grün Myosin (MF20), blau DAPI, A Atrium, V Ventrikel, * Somiten.

Um die veränderte Genexpression in Herzen von Doppel-Cluster KOs zu untersuchen wurde RNA aus Herzen von E10.5 Embryonen präpariert und mit *Affymetrix Chip* Analyse untersucht. Es wurden drei Kontrolltiere (miR-1-1/133a-2, miR-1-2/133a-1 bzw. miR-1-1/133a-2, miR-1-2/133a-1) und vier KO Tiere miR-1-1/133a-2, miR-1-2/133a-1. Es wurden 320 Gene gefunden, deren Expression signifikant um mindesten das 1,5 fache der Kontrolltiere verändert war. 213 Gene waren signifikant stärker exprimiert, 107 wiesen eine schwächere Expression auf als in den Kontrolltieren.

Unter den schwächer exprimierten Genen befanden sich viele Transkriptionsfaktoren mit Homöobox-Domäne wie *Prrx1* (paired related homeobox 1), *Pax1* (paired box gene 1), *Foxf2* (forkhead box F2) homeobox, *Msx-2; Msx- 1 (mshlike*) distal-less homeobox 1 und 2 (*Dlx*) und homeo box D3 (*Hoxd3*). Stärker exprimierte Gene sind unter anderem *Bmp2* und *Bmp10* (bone morphogenetic protein), *Bmp2k* (BMP2 inducible kinase) *Mef2c* (myocyte enhancer factor 2C), *Twist1* (twist gene homolog 1 (*Drosophila*)) *Myocd* (myocardin), *Tagln* (transgelin), *Ly6a* (lymphocyte antigen 6 complex, locus A, *Sca1*) *Myo6*(myosin VI) *Itga1*(integrin alpha 1) *Tpm2*(tropomyosin 2, beta) *Myh11* (myosin, heavy polypeptide 11, Glatte Muskulatur).

Glattmuskel-spezifische Gene *Cald1* und *Tagln* sind ebenfalls stärker exprimiert als in den Kontrolltieren, für *Acta2*, *Tagln2* gilt dies aber nicht. Es wurde keine veränderte Expression von Genen des Zellzyklus' detektiert. Der L-Typ Calcium Kanal ist in seiner Expression ebenfalls verstärkt (*Cacna1c* 1,6x erhöht, *Cacnb2* signifikant um 1,4x erhöht). Andere Kanäle (speziell die, die mit LQT assoziiert sind) sind in ihrer Expression im Doppel-Cluster-KO nicht verändert.



Abbildung 20 H&E Färbung von Sagittal-Schnitten der Doppel KO Embryonen E11.5

Doppel Cluster KO A Kontroll- Tier B DoppelCluster KO. Der KO ist im Alter von E10.5 bereits deutlich kleiner als das Kontrolltier. Auf Abbildung A1/B1 wird deutlich, dass das Herz in der Größe nicht verändert ist, allerdings ist die Trabekulation vermindert und dieVentrikelwand dünner (Pfeile). A Atrium, V Ventrikel, AVP Atrio-ventrikuläres Polster, Maßstab A/B 1 mm, 1/2 100 µm.

4 DISKUSSION

MicroRNAs werden als wichtige Regulatoren in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Organen und Geweben angesehen. Ein Großteil der miRNAs wird gewebespezifisch exprimiert. Die am stärksten exprimierten miRNAs von Herzund Skelettmuskelzellen sind microRNA-1 und microRNA-133a (Thomson et al, 2004, Mishima et al., 2009, Reddy et al, 2009)

Erste Arbeiten über die Deletion von muskelspezifischen miRNAs wurden 2005 an *Drosophila melanogaster* beschrieben. Der Verlust vom miR-1 führt zur Letalität adulter Individuen, die Larven sterben im Alter von 2-7 Tagen nach dem Schlupf. Die Muskelanordnung des ersten Larvenstadiums ist vergleichbar mit der des WTs, erst im zweiten Larvenstadium ist ein kompletter Zusammenbruch der Körpermuskulatur erkennbar (Sokol & Ambros, 2005). Muskelproteine wie Myosin heavy chain (MHC) sind in den miR-1 Mutanten missexprimiert (Kwon et al, 2005).

Im Maus-Genom kommen die muskelspezifischen miRNAs miR-1 und miR-133a zweimal vor (miR-1-1 und miR-133a-2 auf Chromosom 2 sowie miR-1-2 und miR-133a-1auf Chromosom 18). Die miRNAs miR-1 und miR-133a eines Chromosoms liegen als Cluster vor, werden also zusammen als ein Transkript abgelesen, dann wird jede miRNA einzeln weiter prozessiert (Rao et al, 2006). Zu Beginn meiner Doktorarbeit war über die Funktion der miRNAs miR-1 und miR-133a sehr wenig bekannt. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die miRNAs auf Entwicklung und Physiologie haben, sollten Knock out Mäuse hergestellt werden, denen die miR-1/133a-Cluster entfernt wurden. Diese beiden Linien sollten dann analysiert werden.

In der Zeit während meiner Doktorarbeit wurde verschiedenen Arbeiten publiziert, die sich mit den muskelspezifischen miRNAs beschäftigen. So wurde de Deletion muskelspezifischer miRNA in der Maus von Zhao et al. 2007 am Beispiel von miR-1-2 beschrieben. Die Gruppe zeigt eine veränderte Entwicklung des Herzens mit ventrikulären Septumdefekten bei Embryonen im Alter von E15.5. Weiterhin wird veränderte Erregungsweiterleitung die zu einer Verbreiterung des QRS Komplexes führt, beschrieben. Die Gruppe zeigt, dass IRX5 als Zielgen von miR-1 verstärkt exprimiert wird. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert unter anderem die Expression des Kaliumkanal-Gens *Kcnd2*. Durch die erhöhte Expression von IRX5 kommt es zu einer verminderten Expression von KCND2, was wiederum zu den elektrophysiologischen Veränderungen führt (Zhao et al, 2007). Der Verlust von miR-1-1 bei der Maus wurde bisher nicht beschrieben.

Eine weitere Arbeit zeigte die Deletion von miR-133a. Der Verlust eines miR-133a Locus' führte zu keinen Veränderungen in der Entwicklung oder Physiologie der KO Tiere. Erst nach Erzeugung Doppel-miR-133a Mutanten konnte schwere Defekte nachgewiesen werden. Die 133a-Doppel-KOs starben zum Teil kurz nach der Geburt, nur etwa 24% wurden mehrere Monate alt. Die Untersuchung der Herzentwicklung zeigte eine dünnere Ventrikelwand der Embryonen (E12.5 - E17.5). Herzen von verstorbenen P1 Tieren zeigten ebenfalls Dilatationen und Blutpfropfen im Herz, ein Zeichen für verminderte Kontraktion. Die Feinstruktur der Sarkomere in den KOs war zerstört. Stressmarker wie Myh7, Nppa und Nppb waren auf mRNA Ebene hochreguliert. In den KO Tieren wurde sowohl eine erhöhte Proliferation als auch verstärkte Apoptose nachgewiesen. Gene die typisch für glatte Muskelzellen sind waren stärker exprimiert (z.B. SM-Aktin, Tagln, Tagln2, Cnn1 und Cald1). Weiterhin wurde die Erhöhte Expression von Zellzyklusgenen gezeigt (Ccnd1, Ccnd2, Ccnb1). Cyclin2 konnte als ein Zielgen von miR-133a belegt werden (Liu et al, 2008).

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression der Cluster miR-1-1/133a-2 und miR-1-2/133a-1, sowie die molekularen und physiologischen Veränderungen die nach Deletion der miRNA Cluster auftreten beschrieben und analysiert werden.

4.1 Expression von miR-1/133a

MiR-1 und miR-133a werden in Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert (Thomson et al, 2004).

In *Drosophila* Larven ist das Transkript von miR-1 bereits vor der Gastrulation in mesodermalen Bereichen nachweisbar. Später konnte es in Zellen des Kopfmesoderms und Vorläuferzellen sowie des viszeralen und somatischen Mesoderms und im Dorsalgefäß nachgewiesen werden. MiR-1 Expression war ausschließlich in Muskel-Vorläuferzellen nachweisbar, nicht in Zellen, die zwar mesodermalen Ursprungs waren, aber keine Muskelzellen bildeten, wie Fettkörper oder Mesoderm der Gonaden (Sokol & Ambros, 2005).

Im Hühnchen (*Gallus gallus*) wird miR-1 ab Stadium HH9-10 in den ersten Herzmuskelzellen detektiert, das Transkript kann bis Stadium HH22 weiter nachgewiesen werden. MiR-133 wird im Herz exprimiert. Beide microRNAs konnten im Hühnchen auch in den Somiten nachgewiesen werden (Darnell et al, 2006).

Durch lacZ-Expression unter dem Promoter von miR-1-1 oder miR-1-2 konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass die Expression von miR-1 in der Mausentwicklung am Tag E8.5 im Herz beginnt, und ab Tag E9.5 auch in den Somiten detektierbar ist. Dieses Experiment zeigt die miR-1 Expression in allen Bereichen des sich entwickelnden Herzens, die stärkste Färbung wurde in der inneren Krümmung der Herzschleife und den Atrien gefunden. Die Expression von miR-1 wurde also sowohl in Bereichen die aus dem sekundären Herzfeld entstehen (Ausflussbereich), als auch in Bereichen des primären Herzfeldes (Atrien, Ventrikel) detektiert (Zhao et al, 2005).

In den von mir generierten miR1-1/133a-2 und miR-1-2/133a-1 Mutanten sollte zunächst mit Hilfe des LacZ *Knock In* in den genomischen Bereich des miR-Clusters die Expression der miR-1/133a Cluster in situ verfolgt werden.

In den beiden KO-Linien konnte die Expression von β -Galaktosidase nach der Färbung mit X-Gal nur im miR-1-1/133a-2 KO detektiert werden. Die Färbung im adulten Tier ist im Herz- und Skelettmuskel nachweisbar. Die Färbung ist sehr schwach, was vermutlich an einer Lokalisation des lacZ Proteins in Zellorganellen liegt (pünktchenartige Färbung im Querschnitt). Da es sich bei der exprimierten β -Galaktosidase um ein bakterielles Protein handelt, besteht die Möglichkeit, dass es als fremd erkannt wurde und zum Abbau in Lysosomen aufgenommen wird. Die Färbung ist deswegen auf diese Organellen begrenzt.

Die β -Galaktosidase Färbung in Embryonen zeigt eine Expression im Bereich der Atrien und Ventrikel im sich entwickelnden Herzen. Die Färbung ist nicht in allen Teilen des Herzens vorhanden. Dies könnte für eine zeitlich versetzte Expression sprechen, oder dass das andere Cluster (miR-1-2/133a-1) in diesen, hier nicht gefärbten Bereichen, ausschließlich exprimiert ist.

Im miR-1-2/133a-1 KO konnte die lacZ Expression des *Knock In* nicht nachgewiesen werden. Im Bereich zwischen miR-1-2 und miR-133a-1 befindet sich eine MEF2-ähnlichen Bindestelle und eine E-Box. Diese Bindestellen für Transkriptionsfaktoren treiben die Expression des Clusters an (Liu et al, 2007). Das Versagen des LacZ *Knock In* könnte am Verlust dieser Bindestellen liegen. Im Cluster miR-1-1/133a-2 befindet sich ebenfalls eine MEF2-Bindestelle sowie eine E-Box und Bindestelle für SRF, die für die Transkription des Clusters nötig sind (Liu et al, 2007). Hier findet trotz des Verlustes dieser Bindestellen die Transkription des genomischen Bereiches und somit die Expression der β -Galaktosidase statt. Möglicherweise wird hier die Initiation der Transkription durch weitere, Gen-aufwärts gelegene, Elemente reguliert. Weiterhin ist es aber auch nicht auszuschließen, dass die IRES (internal ribosomal entry site) der lacZ Kassette (siehe 3.1) gestört ist, und somit keine Translation des lacZ Proteins stattgefunden hat.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Gen- bzw. miRNA Expression stellt die *in situ* Hybridisierung dar. Mit Hilfe dieser Methode konnte sowohl im WT die Gesamtexpression von miR-1 gezeigt werden, als auch im miR-1-1/133a-s- KO die Expression miR-1-2 und andersherum (der Nachweis von miR-133 schlug fehl).

Die Expression von miR-1 konnte in dieser Arbeit im gesamten Herz nachgewiesen werden, ebenso in den Somiten. Durch die Analyse der KOs konnte die Expression von miR-1-1 und miR-1-2 getrennt dargestellt werden. So sieht man, dass im miR-1-1/133a-2 KO die Färbung im gesamten Herzen des E10.5 alten Embryos vorhanden ist, und somit miR-1-2 an dieser Stelle exprimiert ist. Die Färbungen des miR-1-2/133a-1 Cluster KOs zeigen variierende Muster. So gibt es Tiere die sowohl im Atrium und Ventrikel als auch nur im Atrium eine Expression von miR-1 zeigen.

Der Verlust eines einzelnen miR-1/133a-Clusters hat keinen ausgeprägten Einfluss auf die Entwicklung des Herzens. Nach den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung kann man sagen, dass die beiden Cluster überlappend exprimiert werden und der Verlust des einen Clusters kann durch das andere miRNA Cluster kompensiert werden.

Mit beiden Methoden konnte die Färbung in Atrien dargestellt werden. Mit der *in situ* Hybridisierung konnte ebenfalls die Expression von miR-1 im Ventrikel und den Somiten dargestellt werden. MiR-1 wird im Embryo im Herz und in den Somiten exprimiert, im adulten Tier in Herz-und Skelettmuskelzellen.

4.2 Verlust von miR-1/133a

Der verminderte Expression der miRNA-1 und miR-133a konnte sowohl mit Hilfe von *MicroArrays* als auch mit *TaqMan* Real Time PCR gezeigt werden. Im *MicroArray* ist erkennbar, dass sowohl miR-1 als auch miR-133a um etwa 50% reduziert ist. MiR-133b, welches sich von miR-133a um drei Nukleotide unterscheidet, ist hier aber ebenfalls in seiner Expression reduziert. Auf Grund der Sequenz-ähnlichkeit von miR-133a und miR-133b gehen wir davon aus, dass auf Grund von Kreuzreaktion die Reduktion von miR-133a nicht eindeutig dargestellt werden kann.

Genauere Ergebnisse erzielt die PCR Reaktion. Auf Grund der Spezifität der Primer gegen eine bestimmte miRNA (lt. Anbieter), wird hier im Falle von miR-133 nur miR-133a nicht aber miR-133b detektiert.

Die Real Time Analyse ist der Methode des microRNA-Chips vorzuziehen, da hier sowohl die Spezifität von miR-133a gegeben ist, als auch durch die Erhöhung der Anzahl der untersuchten Proben eine bessere Aussage getroffen werden konnte.

Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass miR-1 und mir-133a in beiden Linien reduziert ist.

Das Cluster miR-1-2/133a-1 liegt innerhalb des mindbomb1 (*mib1*) Genes. Die Expression von *mib1* ist nicht verändert, was man sowohl mit *Affymetrix GenChip* als auch mit RT PCR nachweisen kann. Der Verlust, bzw. die Verkürzung des genomischen Bereiches des Introns führt also nicht zu einer veränderten Expressi-

on von mindbomb1, so dass der beschriebene Phänotyp auf den Verlust des miR-1-2/133a-1 Cluster zurückzuführen ist.

4.3 Morphologische und histologische Veränderungen nach Deletion der miR-1/133a-Cluster

Der Verlust von miR-1-2 ist mit Entwicklungsstörungen des Herzens verbunden, beschrieben sind ventrikuläre Septumdefekte (Zhao et al, 2007). In den hier analysierten miR-1/133a Cluster KO Tieren konnte keine veränderte Histologie und Morphologie gezeigt werden. Adulte Herzen zeigen histologisch (HE Färbung) oder morphologisch (MRT-Bildgebung) keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtypen. Ebenso weisen die Daten der *Affymetrix* Analyse nicht auf eine erhöhte Proliferation oder Apoptose hin, was Veränderungen der Morphologie zur Folge haben könnte.

Bei Verlust von miR-133a-1 und miR-133a-2 wurden ebenfalls schwere Entwicklungsstörungen in den KO Tieren nachgewiesen. So wurde bei 133a-Doppel-KO Embryonen im Alter von E12.5 eine dünne rechte Ventrikelwand festgestellt, der linke Ventrikel wies keine Veränderungen auf. Auch hier wurden ventrikuläre Septumsdefekte beschrieben. In P1 Tieren der 133a-Doppel-KOs wurde sowohl eine erhöhte Proliferation als auch Apoptoserate ermittelt (Liu et al, 2008).

In den hier analysierten miR-1/133a Doppel-Cluster KOs wurde bei der histologischen Untersuchung der E11.5 alten Embryonen ebenfalls eine dünne Ventrikelwand beobachtet (2-3 Zellreihen).

Überexpression von miR-1 (Zhao et al, 2005) sowie miR-133 (Liu et al, 2008) führt ebenfalls zu dünneren Ventrikelwänden in Embryonen. Beide Autoren führen diese Veränderung auf verminderte Proliferation zurück.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines miR-1/133a-Clusters keine Auswirkung auf die Morphologie oder Entwicklung des Herzens hat. Der Verlust beider miR-1/133a Cluster führt aber im frühen Entwicklungsstadium (E11.5) zum Tod. Das Herz beginnt sich also ohne die miRNAs zu entwickeln, die Zellen differenzieren zu schlagenden Kardiomyozyten. Die Proteinexpression von α -Myosin Schwere Kette zeigt im Alter von E10.5 kein verändertes Muster in den miR1/133a-Doppel-Clustern. Nur die dünne Ventrikelwand ist morphologisch ein Indiz für die Auswirkungen, die der Verlust beider miRNA-Cluster bewirkt.

Die Missexpression der herzspezifischen miRNAs führt zu Veränderungen der Morphologie. Der Verlust eines miRNA Homologs ruft dabei weniger starke Effekte hervor als der Verlust beider Homologe. Erhöhte Expression der miRNAs führt zu ähnlichen Veränderungen der Histologie und Morphologie wie der Verlust von miRNAs.

4.4 Veränderte Gen-Expression nach Deletion der miR-1/133a Cluster

Der Verlust der miR-1/133a Cluster führt zu Veränderungen der Genexpression. Mittels *Affymetrix GenChip* Analyse konnten diese Veränderungen für das Transkriptom quantifiziert werden. Vergleicht man bereits beschriebene Zielgene oder durch die Missregulation von miR-1 und/oder miR-133 veränderte Gene mit den Ergebnissen die hier erzielt wurden, stellt man Gemeinsamkeiten und Unterschiede fest.

In den ersten Arbeiten über miR-1 und miR-133 in Skelettmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung von C2C12-Zellen (Myoblasten-Zelllinie) die Menge von miR-1 und miR-133a zunahm. Die Transkriptmenge der als mögliche Zielgene beschriebenen Gene *Hdac4* (Histon Deacetylase 4) und *Srf* (Serum response factor) nahmen während der Differenzierung der C2C12 Zellen ab. Weitere Versuche konnten diese Gene als Zielgene für miR-1 (Hdac4) und miR-133a (Srf) bestätigen (Chen et al, 2006). Zusammen mit der Arbeit von Zhao et al. (2005) wurde ein Model der Rückkopplungsschleife entworfen (Abbildung 2). MiR-1 hemmt danach *Hdac4*, *Srf* wird von miR-133a in seiner Expression unterdrückt. Nach diesem Modell sollte sowohl in den von mir generierten Cluster-KOs und als auch den miR-1/133a-Doppel-KO *Srf* und *Hdac4* er Fall, beide Gene sind in ihrer Expression weder in den Cluster-KOs noch im miR-1/133a-Doppel-KO verändert. In einer der ersten Arbeiten über microRNAs im Herzen wurde Hand2 (Heartand neural crest derivatives-expressed protein 2) als Zielgen für miR-1 beschrieben. Nach Überexpression der miRNA konnte eine reduzierte Proteinexpression von Hand2 in den Mutanten mittels Western Blot gezeigt werden. Mittels Luziferase-Assay wurde Hand2 als Zielgen von miR-1 nachgewiesen (Zhao et al, 2005). In den von mir untersuchten miR-1/133a KO Tieren konnte auf mRNA Ebene kein Expressionsunterschied des Hand2 Transkripts im Vergleich zum WT gefunden werden. Diese vermeintliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der oben erwähnten Arbeit und den hier vorliegenden Daten beruht auf den unterschiedlichen Modellen. In der Arbeit von Zhao wurde zur Analyse der microRNA-1 ein Überexpressionsmodel (gain of function) gewählt, in meiner Arbeit ein Knock Out-Model, also der Verlust des Moleküls (loss of function). Die Überexpression eines Gens findet ektopisch statt, sowohl die räumliche als auch die zeitliche Expression werden dadurch verändert. Das kann zu Veränderungen führen, die nicht ausschließlich auf die erhöhte Expression des Gens zurückzuführen ist. Die Fehlexpression kann Auswirkungen auf andere Gene oder gar Signalwege ausüben, die den dann beobachteten Phänotyp hervorrufen. Nach dem Verlust einer Genfunktion durch einen gerichteten Knock Out können alle resultierenden Phänotypen auf den Verlust genau dieses Genes zurückgeführt werden. So kann die veränderte Expression von Hand2 nach Überexpression von miR-1 auch durch andere Faktoren als miR-1 hervorgerufen wurden sein.

Nach der Deletion von miR-133a-1 und miR-133a-2 wurde in diesen 133a-Doppel-KOs eine erhöhte Expression von einigen Genen der glatten Muskulatur gefunden (Liu et al, 2008). Vergleicht man dazu die Expression von Glattmuskelspezifischen Genen in den hier untersuchten miR-1/133a Doppel-Cluster KOs, findet man einige dieser Gene stärker exprimiert (*Tagln, Acta2, Cald1*) vor, aber andere Glattmuskel-spezifische Gene wie z.B. *Acta2, Tagln2* nicht. Die Expressionsdaten der publizierten miR-133a-Doppel-KOs spiegelt die Expression im Alter von P1 wider, die Analyse der Expression der hier untersuchten Cluster-KOs fand mit Herzproben von Embryonen im Alter von E10.5 statt. Allein aus diesem Grund kann die Expression einzelner Gene schon verschieden sein. Weiterhin kann die Expression von Glattmuskel-spezifischen Genen durch Sekundäreffekte ausgelöst werden. Weitere Untersuchungen hierzu müssen folgen.

Cyclin2 (*Ccnd2*) wurde ebenfalls als Zielgen für miR-133a beschrieben werden. Durch den Verlust von miR-133a erhöht sich die Menge des Cyclin und eine verstärkte Zellproliferation findet statt (Liu et al, 2008). Interessanterweise ist in den miR-1/133a Cluster-KOs im Alter von E10.5 Ccnd2 signifikant vermindert. Sollte aber miR-133a die mRNA von *Ccnd2* beeinflussen, sollte auch hier schon eine erhöhte Expression messbar sein. In den Cluster-KOs findet sich ebenfalls keine Veränderung der *Ccnd2* Expression.

4.5 Veränderte Proteinexpression nach Deletion der miR-1/133a-Cluster

Da miRNAs Expression von Proteinen durch posttranskriptionelle Bindung an die mRNA beeinflussen, spiegeln die Ergebnisse der *Affymetrix* GeneChip Analyse nicht unbedingt die Proteinexpression des Gewebes wider. Um einen Überblick über Veränderungen des Proteoms des Herzens in den KO Tieren zu erhalten, wurde die SILAC Methode gewählt. Die Veränderungen der Proteinexpression, die mit dieser Methode detektiert wurden, zeigen aber nur einen Teil des Proteoms. Viele Proteine sind mit der Massenspektrometrie nicht detektierbar, bzw. mit den hier gewählten Anreicherung und Aufbereitungsmethoden nicht messbar.

Vergleicht man die stark exprimierten Proteine mit den korrespondierenden Daten der *Affymetrix* Analyse kann man den Unterschied der mRNA Abundanz zur tatsächlichen Proteinmenge zum Teil erkennen: so ist Destrin (Dstn) oder die Nukleosid Diphospaht Kinase A (Nme) auf mRNA Ebene fast gar nicht reguliert, die Proteinmenge ist aber in den KOs mehr als verdoppelt. Die Expression von β -Myosin heavy chain 7 (Myh7) ist sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene verstärkt. Um also den Phänotyp erklären zu können, reicht es nicht aus, sich auf die mRNA Expression zu verlassen, sondern auch die Proteinexpression zu untersuchen. Exemplarisch sollen hier einige der signifikant verändert exprimierten Proteine der miR-1/133a Cluster KOs diskutiert werden: Stärker exprimierte Proteine sind unter anderem Destrin (DSTN) und Cofilin1 (CFL1). DSTN, oder ADF (actin depolymerization factor) baut F- Actin in der Zelle ab (Maekawa et al, 1984). Die Depolymerisierung des Actins wird dabei von CFL1 in einer pH-Wert abhängigen Reaktion unterstützt. (Yonezawa et al, 1985). Beide Proteine sind als Modulatoren des L-Typ Calcium Kanals (LTCC) beschrieben: durch den Abbau von F-Actin wird der mechanische Stress der durch Actin über Linker-Proteine auf den LTCC ausgeübt wird reduziert, was zu einer Verringerung des Ca²⁺-Stromes führt (Rueckschloss und Isenberg, 2001). In den KOs sind beide Proteine allerdings hochreguliert, was vermuten lässt, dass durch die erhöhte Expression mehr Actin abgebaut wird und somit der LTCC Strom viel schwächer ist. In den elektrophysiologischen Messungen wurde aber ein erhöhter Ca²⁺-Strom ermittelt. Dieser verstärkte Ca²⁺-Strom ist allerdings nicht unter basalen Bedingungen messbar, sondern erst nach Stimulation mit Isoproterenol. ADF liegt in seiner aktiven Form nicht phosphoryliert vor, die Phosphorylierung des Proteins führt aber zum Funktionsverlust (Morgan et al, 1993). Durch Stimulation des β-adrenergen Signalweges wird ADF/CFL1 phosphoryliert, und wird daraufhin deaktiviert wird. Es kommt dadurch zu einem verminderten Abbau von F-Actin, welches dann eine mechanische Belastung auf den LTCC erzeugt und so den Ca²⁺-Strom verstärken könnte.

Ebenfalls auf Proteinebene signifikant erhöht ist das Protein NME1 (Nukleosid Diphosphat Kinase A). Die mRNA von Nme1 ist als Zielgen von miR-1 (nach microRNA.org Algorithmus) ermittelt. Die erhöhte Protein Expression könnte also eine direkte Folge der Deletion der miRNA sein. NME1 oder NM23, eine Nukleosid Diphospaht Kinase, katalysiert die Phosphorylierung von GDP zu GTP von G-Proteinen und führt so zu deren Aktivierung. Diese Proteine sind in der Zellmembran lokalisiert und werden durch Adrenalin und Norardrenalin bzw. deren Antagonisten aktiviert. Es gibt sowohl akivierende als auch hemmende G-Proteine. NME1 phosphoryliert beide (Lutz et al, 2003). Dadurch ist es möglich, dass die Adenylatyclase gehemmt oder aktiviert wird (abhängig ob inhibitorische oder aktivierende G-Proteine von der Kinase phosphoryliert wurde) was dann Einfluss auf die cAMP Konzentration hat. Da bei der Untersuchung der cAMP Konzentration in den miR-1/133a Cluster KO Tieren keine Veränderung der cAMP Konzentration unter basalen Bedingungen gefunden wurde, könnte der Effekt der erhöhten Proteinexpression von NME1 nicht physiologisch relevant sein oder aber wieder erst durch Stimulation des Signalweges an Bedeutung gewinnen.

Ein Protein wurde für beide Cluster-KOs als schwächer exprimiert gefunden: SLC25A20. Auch auf mRNA Ebene ist es als weniger stark exprimiert nachgewiesen. Die mRNA ist nach den Algorithmen von microRNA.org und mirBase.org als Zielgen für miR-1 vorhergesagt. Wenn miR-1 ein Regulator der mRNA wäre und die Translation hemmt, sollte das Protein aber stärker exprimiert werden. Dieses Beispiel zeigt die Diskrepanz zwischen den *in silicio* Vorhersagen und den physiologischen Ergebnissen. Um zu zeigen, dass eine miRNA eine mRNA tatsächlich beeinflusst, bedarf es mehr als einer Berechnung.

Die SILAC Methode stellt eine vergleichsweise schnelle, wenn auch aufwendige Methode dar, einen Überblick über das Proteom der Zelle zu erhalten. Durch technische und methodische Einschränkungen ist nur ein Teil das Proteoms analysierbar. Eine Erhöhung der n-Zahl könnte statistisch verlässlichere Aussagen erbringen. So lässt sich also abschließend nicht klären, welche Proteine oder welche veränderte Proteinexpression letztendlich zu dem Phänotyp führen.

4.6 Elektrophysiologische Veränderungen der miR-1/133a KO Tiere

Nachdem die histologische Analyse der miR-1/133a Ko Tiere keine pathologischen Veränderungen aufzeigte, wurden physiologische Untersuchungen durchgeführt.

Bereits publizierte Arbeiten beschrieben, dass der Verlust von miR-1-2 zu einer Verlängerung des QRS-Komplexes sowie zu einer veränderten Form des QRS-Komplexes (R-Zacke zweigeteilt) führt (Zhao et al, 2007). Die Gruppe führt die Veränderung des QRS Komplexes in den miR-1-2-KOs auf die Überexpression des Kaliumkanals KCND2 zurück, der durch den Transkriptionsfaktor IRX5 (der

als Zielgen von miR-1 benannt ist) reguliert wird. In den von mir analysierten miR-1/133a Cluster KOs konnte zwar die erhöhte mRNA-Expression von Irx5 gezeigt werden (1,5x im KO miR-1-1/133a-2) allerdings ist das Transkript des Kaliumkanals Kcnd2 in seiner Expression nicht verändert und kann hier somit nicht als Grund für die elektrophysiologischen Veränderungen angesehen werden.

Durch Injektion von miR-1 in Rattenherzen konnten Arrhythmien ausgelöst werden. Es kam zu einer Verlängerung des QRS Komplexes und der QT Strecke. Nach Blockierung der endogenen miR-1 mit synthetische miRNA (Antago-miRs) wurde ein schmalerer QRS Komplex im EKG festgestellt. (Yang et al, 2006). Diese Ergebnisse sind gegensätzlich zu den Befunden die in den hier untersuchten miR1/133a Cluster KOs gefunden werden. Durch den Verlust der beiden miRNAs kommt es zu einer Verlängerung des QT Intervalls, eine Veränderung im QRS Komplex konnte nicht gefunden werden. Auch die in der Arbeit beschriebenen Zielgene von miR-1, Connexin43 (*Gja1*) und *Kcnj2* sind in den miR-1/133a-KOs nicht verändert.

In den EKG Messungen der miR-1/133a Cluster-KOs konnte gezeigt werden, dass die KO Tiere bei niedrigen Herzraten (400 bpm) im EKG eine verlängerte QT Strecke (LongQT) aufwiesen. Unter physiologischen Herzraten (600 bpm) war dies nicht der Fall. Die Verlängerung der QT Dauer ist nicht ausschließlich auf die veränderte Herzrate zurückzuführen sondern nimmt mit sinkender Herzrate linear zu. Um auszuschließen, dass diese Verlängerung nicht durch das Narkosemittel Isofluran hervorgerufen wird, wurde den Tieren durch Gabe des Parasympathomimetika Carbachol Bradykardie ausgelöst. Ebenso wurden EKG-Messungen telemetrisch vorgenommen. Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung des QT kein Artefakt der Narkose, sondern ein physiologischer Effekt ist.

Die miR-1/133a KO Tiere zeigen bei hohen Herzraten keine Veränderung der QT Dauer, erst bei Bradykardie wird die verlängerte QT Dauer sichtbar.

4.6.1 Kammererregung- QT Dauer und LongQT

Die QT-Dauer umfasst die Zeit vom Beginn der Kammererregung am Atrioventrikulären Knoten, über die Ausbreitung der Erregung über die Kammer bis zur Relaxation des Kammermyokards. Von LongQT spricht man bei einer pathologischen Verlängerung dieses Abschnittes im EKG. Es gibt verschiedene Ursachen des LongQT Syndroms, beim Menschen sind zwölf Formen beschrieben (Tabelle 7). Die zelluläre Ursache für die Verlängerung der Repolarisation liegt hauptsächlich an veränderten Verhalten von Ionenkanälen, die die Ionenströme über die Zellmembran regulieren. Dadurch kommt es zu einer Verlängerung des Aktionspotentials in den Zellen, wodurch die Zellen länger im depolarisierten, kontrahierten Zustand bleiben.

 Tabelle 7 Bekannte LongQT Formen und die hauptsächlichen Verursacher

 (aus Szeliga et al, 2010), RWS Romano-Ward Syndrom, JLNS Jervel-und-Lange-Nielsen-Syndrom.

Form	Syndrom	Transkript	Protein	Funktion M	lechanismus
LQT1	RWS, JLNS	Kcnq1	KV7.1/	α Untereinheit I_{Ks}	Verlust
LQT2	RWS	Kcnh2	KV11.1	α Untereinheit I_{Kr}	Verlust
LQT3	RWS	Scn5a	NAV1.5	α Untereinheit I _{Na}	Zunahme
LQT4	RWS	Ank2	AnkyrinB	Adapter für I _{Na-K} , I _{Na-Ca} , I _{Na}	Verlust
LQT5	RWS, JLNS	Kcne1	MINK	β Untereinheit I_{Ks}	Verlust
LQT6	RWS	cne2	MIRP1	β Untereinheit I_{Kr}	Verlust
LQT7		Kcnj2	KIR2.1	α Untereinheit I_{K1}	Verlust
LQT8		Cacna1c	CAV1.2	α Untereinheit I_{Ca}	Zunahme
LQT9	RWS	Cav3	M-Caveolin	Adapter für <i>I</i> _{Na}	Verlust
LQT10	RWS	Scn4b	NAVβ4	β Untereinheit I_{Na}	Verlust
LQT11	RWS	Akap9	ΥΟΤΑ ΙΟ	Adapter Protein I _{Ks}	Verlust
LQT12	RWS	Snta1	α -Syntrophin	Gerüstprotein	Verlust

Beim Menschen unterscheidet man zwischen erworbenem und vererbtem LongQT Syndrom. Das autosomal-rezessiv vererbte Jervell-und-Lange-Nielsen-Syndrom beruht auf Mutationen der Kalium-Kanäle minK und KV7.1 (LQT5 und LQT1). Durch den Funktionsverlust der Kanäle kommt es zusätzlich zu einem Hörverlust der betroffenen Patienten. Das Romano-Ward-Syndrom wird ebenfalls autosomalrezessiv vererbt. Es wird durch Veränderungen verschiedener Kanäle ausgelöst (siehe Tabelle 7). Erworbenes LongQT Syndrom kann durch Medikamente oder Entzündungen (Myokarditis) ausgelöst werden. Durch die Verlängerung der QT Dauer und damit die verlängerte Kontraktion des Ventrikels können Rhythmusstörungen ausgelöst werden, die zu sogenannten Plötzlichem Herztod führen können.

Das LongQT Syndrom in den analysierten miR-1/133a KO Mäusen könnte durch veränderte Expression der in Tabelle 7analysierten miR-1/133a KO Mäusen könnte durch veränderte Expression der in Tabelle 7 angeführten Gene/Proteine hervorgerufen werden. Die Expressionsanalysen von mRNA und Proteinen der LongQT-assoziierten Gene ist im Folgenden zusammengestellt.

Kcne1 codiert für eine Untereinheit (MINK) des KVLQT1 Kanals (Kcnq1 Transkript). Für Kcne1 konnte in der *Affymetrix* Analyse für beide miR-1/133a KO Tiere eine vermehrte Expression der mRNA nachgewiesen werden. Im SILAC-Versuch konnte das KCNE1-Protein vermutlich auf Grund seiner Größe nicht detektiert werden. Mit Hilfe von Western Blot konnte zwar eine Bande nachgewiesen werden, allerdings konnte die Spezifität des Antikörpers nicht bestätigt werden. Kcnq1 ist auf mRNA Ebene signifikant nur im miR-1-2/133a-1 KO leicht erhöht. Auch dieses Protein ließ sich im SILAC nicht nachweisen. KCNE1 und KCNQ1 müssen zusammen in die Membran vorliegen, um einen funktionellen Kalium-Kanal zu bilden (Barhanin et al 1996; Sanguinetti et al 1996).

Beide Kanäle sind als Zielgene von miR-1 (Kcnq1) und miR-133 (Kcne1) beschrieben. Im Luziferase Assay, in dem die 3' UTR des Zielgens hinter das Luziferase-Gen kloniert war, konnte nach Zugabe von miRNA gezeigt werden, dass die Luziferase Aktivität abnahm und somit die miRNAs an die 3' UTR binden und die Translation des Proteins verhindern (Luo et al 2007). Durch den Verlust von miR-1 und miR-133 in den Cluster-KOs fällt diese translationelle Hemmung der miRNAs auf die Transkripte der beiden Kanäle weg und es kommt somit zu einer erhöhten Abundanz der mRNA.

Der Kanal KCNE1 bildet den Strom I_{Ks} . Dieser Strom konnte von unseren Kooperationspartnern nur in embryonalen Kardiomyozyten gezeigt werden, der Nachweis in adulten Zellen gelang nicht. Es ist bekannt, dass das Kcne1 Transkript im embryonalen Herzen stärker exprimiert ist, als in jungen oder adulten Tieren. Im adulten Kardiomyozyten ist der resultierende Strom I_{Ks} nur schwer darstellbar (Drici et al, 1998).

Die miR-1/133a KO Tiere zeigen eine Verlängerung der QT Dauer. Dieser Effekt tritt aber nur bei Funktionsverlust der Kalium-Kanäle KCNQ1 und KCNE1 auf. Es kommt dann zu einem verlangsamten Kalium-Ausstrom und damit zu der Verlängerung der QT Zeit. Nach den *Affymetrix* und PCR Ergebnissen handelt es sich hier aber um eine verstärkte Expression und somit eine Art Überexpression der Kanal-Komponenten. Somit müsste man von einem vermehrten Kalium-Ausstrom aus der Zelle ausgehen. Dies würde zu einer Verkürzung des QT Intervall führen, da die Kardiomyozyten schneller repolarisieren würden und somit die spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle schneller wieder schließen. In den Cluster-KOs findet man zwar Zielgene von miR-1 (Kcnq1) und miR-133 (Kcne1) stärker exprimiert, allerdings konnte hier keine daraus resultierende physiologische Veränderung gemessen werden.

Das Gen *Scn5*, welches für den Natrium Kanal codiert, ist auf in seiner Expression auf mRNA-Ebene nicht verändert. Das für die Untereinheit des Natrium-Kanals codierende Gen *Scn4b* ist aber in beiden KOs auf mRNA Ebene signifikant vermindert. Ein Verlust der Funktion des Proteins NAVβ4 führt zu LQT10 (Medeiros-Domingo et al 2007). Die Daten der physiologischen Messung des Natrium-Kanals, die von unseren Kooperationspartnern in Bonn angefertigt wurden, liegen uns bisher noch nicht vor.

Veränderungen im L-Typ Kalzium Kanal führen ebenfalls zu einem verlängerten QT Intervall (Splawski et al, 2004). Bei den elektrophysiologischen Messungen in Bonn konnte gezeigt werden, dass der I_{Ks} Strom verändert ist. Die verschiedenen Untereinheiten des LTCC sind auf mRNA Ebene nicht verändert, im SILAC Experiment wurden die Untereinheiten nicht detektiert. Erste Untersuchungen mit Hilfe von Western Blot konnten zeigen, dass die β 2-Untereinheit nicht reguliert ist, allerdings fanden wir eine erhöhte Expression der β 1-Untereinheit auf Proteinebene. Diese ist normalerweise in Skelettmuskelzellen exprimiert (Ruth et al, 1989). Dort dient die Untereinheit ebenfalls der Erregungs-Kontraktionskopplung (Gregg et al, 1996).

4.6.2 Einfluss des β-adrenergen Signalweges auf QT Dauer

In den elektrophysiologischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass der L-Typ-Kalzium-Kanal (LTCC) in den KOs unter Isoproterenol Stimulation einen höheren Strom produziert als im WT. Dies legt die Vermutung nahe, dass *in vivo* die β adrenerge Stimulation erhöht sein könnte, oder dass die Kardiomyozyten stärker darauf ansprechen. Aus diesem Grund wurde die cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) Konzentration bestimmt. Durch β-adrenerge Stimulation wird cAMP über eine G-Protein gekoppelte Aktivierung der Adenylatzyklase erhöht. Zyklisches Adenosinmonophosphat dient in der Zelle als molekularer Schalter und aktiviert durch seine Konzentration nachgeschaltete Proteine, vor allem Proteinkinase (cAMP abhängige Proteinkinase). Die Proteinkinase wiederum kann dann durch Phosphorylierung nachgeschaltete Proteine, wie den LTCC, Ryanoidinrezeptor, oder Phospholamban (Pln) aktivieren, durch deren Wirkung Ca^{2+} in die Zelle transportiert wird bzw. bei Aktivierung von Pln wird Ca^{2+} aus den Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum von SERCA gepumpt. Da in den KO-Linien kein signifikanter Unterschied der cAMP Konzentration im Vergleich zum WT messbar ist, kann vermutet werden, dass es keine verstärkte β-adrenerge Stimulation der Herzzellen gibt.

Mit Hilfe der SILAC Methode wurden nur sehr wenige Proteine des klassischen Ca²⁺ Signalweges detektiert. Die gefundenen Proteine sind in den KOs nicht reguliert. Allerdings ist es nicht die Menge des Proteins, sondern oftmals deren Status. So muss ein Protein nicht nur in der Zelle vorhanden sein, sondern es muss an der richtigen Stelle platziert sein. Kanäle die sich im Cytoplasma befinden, werden zwar detektiert, haben physiologisch aber keinen Einfluss, wenn sie nicht da sind, wo sie gebraucht werden, nämlich in der Zellmembran. Oder aber sie sind an der Stelle, wo sie hingehören, sind aber nicht aktiviert/ aktivierbar zum Beispiel durch Phosphorylierung. Oder, wie im Fall von KCNE1/KCNQ1 beide Einheiten sind vielleicht in der Membran, da sie aber nicht zusammen sind, bilden sie keine funktionelle Einheit.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann nicht davon ausgegangen werden, dass auf Grund eines veränderten β-adrenergen Signalweges LongQT in den miR-1/133a-KO Tieren ausgelöst wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

MicroRNAs sind kleine Moleküle, die die Expression von Proteinen beeinflussen, indem sie die Translation der mRNA hemmen.

Die microRNAs miR-1 und miR-133a werden hauptsächlich in Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert. Beide miRNAs werden als ein Cluster transkribiert. Im Genom der Maus gibt es zwei miR-1/133a Cluster.

Die Expression der miRNAs miR-1/133a ist ab Tag E8.5 der Embryonalentwicklung detektierbar. In der hier vorliegenden Arbeit konnte mittels *in situ* Hybridisierung die Expression von miR-1 in Atrien, Ventrikel und Somiten dargestellt werden.

Mit Affymetrix- und SILAC Analyse sollten mögliche Kandidaten gefunden werden, die auf Grund des Verlustes der microRNAs missexprimert sind und ursächlich für den Phänotyp sind. Verschiedenen Gene und Proteine wurde daraufhin näher untersucht.

Die Reduktion um die Hälfte von miR-1/133a führt zu einem elektrophysiologischen Phänotyp: bei hohen Herzraten zeigt das EKG keine Auffälligkeiten, analysiert man den Herzschlag bei niedrigen Herzraten stellt man eine Verlängerung der QT Dauer fest.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust jeweils eines miR-1/133a Clusters keinen Einfluss auf die Herzentwicklung hat, dass aber der Verlust beider miR-1/133a Cluster zur embryonalen Letalität mit Stopp der Entwicklung etwa bei Tag E11.5 führt.

Die miR-1/133a Cluster spielen in der Physiologie der Herzens eine wichtige Rolle. Fehlen beide microRNAs komplett, hat dies schwerwiegende Auswirkungen auf die Entwicklung des Herzens.

6 ANHANG

6.1 Verwendete DNA Oligomere für PCR

Oligo Nummer	Sequenz 5'-3'	Verwendung
AB002	tgcacttgctgactggctgccaggg	Genomischer Screen Chromosom 18
AB003	tgtctgtaaaattagaatgctgagg	Genomischer Screen Chromosom 18
AB004	gtgattctgttggagatttcctgcc	Genomischer Screen Chromosom 18
AB015	tatgcattgattacacatggacagc	Klonierung 5' Arm Chromosom 18
AB018	gcactgtgccatcaagttgtggtcc	Klonierung 5' Arm Chromosom 18
AB019	gcactcctgcgccggccgatagctg	Klonierung 3' Arm Chromosom 18
AB022	taccatactctcactaagccctacg	Klonierung 3' Arm Chromosom 18
AB037	ggattctaaaacagcagcaagtc	Sonde für Southern miR-1-1/133a-2
AB038	ccaaccccaggtcatgagaattg	Sonde für Southern miR-1-1/133a-2
AB080	caagtccaacgatgccttttagtgt	Sonde für Southern miR-1-2/133a-1
AB081	ttaatcgtgaagacaaaagactgtt	Sonde für Southern miR-1-2/133a-1
AB138	cataaaacactggctgtccatgtgt	Genotypisierung miR-1-2/133a-1 KO
AB140	aacacgtgaattttctgtttaacaa	Genotypisierung miR-1-2/133a-1 KO
AB148	gacttttcagcacgccctgtctgct	Genotypisierung miR-1-1/133a-2 KO
AB151	tgggccacccctcagtctggcgaga	Genotypisierung miR-1-1/133a-2 KO
AB166	gtcatcccagtctccaggattctgaa	RT PCR mindbomb1
AB167	ggaccaaaagcctaacaatctgggt	RT PCR mindbomb1
TB264	gctctgaattctgtctccttaccc	Genomischer Screen Chromosom 2
TB266	ttggtgtcgcctgtgtctcagtctc	Genomischer Screen Chromosom 2
TB496	tgaggagagccatttgactctttcc	Genotypisierung der miR-1/133a KOs
HPRT for	cacaggactagaacacctgc	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase foreward
HPRT rev	gctggtgaaaaggacctct	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase reverse

6.2 Abkürzungsverzeichnis

А	Adenin
bp	Basenpaare
С	Cytosin
cAMP	
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribo-Nukleosid-Tri-Phosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
Ex.5 x,	5-ter Tag der Mausentwicklung nach Befruchtung (z.B. E9.5: neu-
	neinhalb Tage nach Befruchtung)
G	Guanin
Ι	Strom, Stromstärke
IRES	internal ribosomal entry site
kb	Kilobasen
KO	Knock Out
LNA	Locked Nucleic Acid
loxP	Locus of Cross Over des Bakteriophagen P1
LTCC	L-Typ Kalzium Kanal
μl	Mikroliter
MCS	Multiple Cloning Site
mES-Zelle	n murine Embryonale Stammzellen
MEF	murine embryonale Fibroblasten
miRNA	microRNA; micro interfering RNA
mRNA	messengerRNA
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
ms	Millisekunde
Neo	Neomycin
nt	Nukleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
pgk	Phospho Glycerat Kinase
p-Wert	Wahrscheinlichkeitswert, engl. probabilty, Signifikanzwert
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Zeit zwischen zwei Herzschlägen im EKG (mit Zeitangabe)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	Stable isotop labeling of amino acids in cell culture
Т	Thymidin
U	Enzymeinheit
U	Urazil
UTR	untranslatierter Bereich (mRNA)
WT	Wildtyp

6.3 Gene und Proteine

Mausgene wurden in der Arbeit mit großem Anfangsbuchstaben und in kursiver Schrift geschrieben (*Kcne1*), humane Gene kursiv in Großbuchstaben (*KCNE1*). Proteine werden durch Großbuchstaben verdeutlicht (KCNE1).

Akap9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9
Ank2	ankyrin 2, brain
β-ΜΗС	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta
Cacna1c	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
Cald1	caldesmon 1
Cav3	caveolin 3
Ccnb1	cyclin B1
Ccnd1	cyclin D1
Ccnd2,	cyclin D2
Cnn1	calponin 1
Gata4	GATA binding protein 4
hand2	heart and neural crest derivatives expressed transcript 2
Hdac4	histone deacetylase 4
IRX5	Iroquois related homeobox 5
Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2
Kcne1	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1
Kcne2	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 2
Kcnh2	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member
2	
Kcnj2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2
Kcnq1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
lacZ	Beta-galactosidase
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C
Myh7	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta
NCX	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1
Nkx2.5	NK2 transcription factor related, locus 5
Nppa	natriuretic peptide type A
Nppb	natriuretic peptide B
Pln	phospholamban
Scn4b	sodium channel, voltage-gated, type IV, beta
Scn5a	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum calcium transporting ATPase
Slc8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1
Snta1	syntrophin, alpha 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, acidic
	component)
Srf	Serum response factor
Tagln	transgelin

6.4 Affymetrix Analyse der miR-1/133a KOs

Veränderte Gene, die in beiden Cluster-KOs signifikant verändert exprimiert sind.

Affymetrix ID	Gen Sym- bol	Gen Name	WT/ miR-1-2/ 133a-1 KO	WT/ miR-1-1/ 133a-2 KO
1448595_a_at	Bex1	brain expressed gene 1	0,3	0,2
1427735_a_at	Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	0,2	0,2
1418155_at	Myot	myotilin	0,5	0,2
1423183_at	Gm3888, Lgi1	predicted gene 3888; leucine- rich repeat LGI family, member 1	0,4	0,3
1416454_s_at	Acta2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	1,9	3,0
1448553_at	Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	1,7	2,5
1458455_at	Abra	actin-binding Rho activating protein	0,6	0,4
1428680_at	Cds1	CDP-diacylglycerol synthase 1	0,4	0,4
1427167_at	Armcx4	armadillo repeat containing, X- linked 4	0,6	0,4
1418093_a_at	Egf	epidermal growth factor	0,5	0,4
1441102_at	Prlr	prolactin receptor	0,7	0,4
1449969_at	Tmod4	tropomodulin 4	0,6	0,4
1435053_s_at	Plekhh1	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1	2,2	2,3
1455399_at	Cnksr1	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1	0,5	0,4
1417481_at	Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	1,8	2,2
1455736_at	Mybpc2	myosin binding protein C, fast- type	0,6	0,5
1455531_at	Mfsd4	major facilitator superfamily domain containing 4	0,7	0,5
1426208_x_at	Plagl1	pleiomorphic adenoma gene- like 1	1,5	2,0
1435851_at	Lgi1	leucine-rich repeat LGI family, member 1	0,6	0,5
1440581_at	A530088H 08Rik	RIKEN cDNA A530088H08 gene	1,6	2,0
1444693_at	Cacnb2	calcium channel, voltage- dependent, beta 2 subunit	1,6	1,9
1441035_at	Kcne1	potassium voltage-gated chan- nel, Isk-related subfamily, member 1	1,5	1,9
1447807_s_at	Plekhh1	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1	1,9	1,9
1435264_at	Emilin2	elastin microfibril interfacer 2	1,5	1,9
1425303_at	Gck	glucokinase	0,5	0,5
1419146_a_at	Gck	glucokinase	0,6	0,5

1426362_at	Tmem144	transmembrane protein 144	0,7	0,6
1458218_s_at	Pde7a	phosphodiesterase 7A	0,6	0,6
1452042_a_at	Tmem144	transmembrane protein 144	0,7	0,6
1460214_at	Pcp4	Purkinje cell protein 4	1,6	1,7
1455528_at	Atp5s	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, sub- unit s	0,6	0,6
1439352_at	Trim7	tripartite motif-containing 7	0,6	0,6
1453898_at	ltgb1bp3	integrin beta 1 binding protein 3	0,5	0,6
1458595_at	Intu	inturned planar cell polarity effector homolog (Drosophila)	0,7	0,6
1431893_a_at	Pdss1	prenyl (solanesyl) diphosphate synthase, subunit 1	0,7	0,6
1423860_at	Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)	1,7	1,6
1454974_at	Ntn1	netrin 1	1,5	1,5
1419527_at	Comp	cartilage oligomeric matrix pro- tein	0,7	1,5
1454843_at	Prps2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	1,5	1,5
1437385_at	Ccbe1	collagen and calcium binding EGF domains 1	0,6	0,7
1448426_at	Sardh	sarcosine dehydrogenase	1,5	1,5
1429588_at	2810474O 19Rik	RIKEN cDNA 2810474O19 gene	0,4	0,7
1439484_at	Pde7a	phosphodiesterase 7A	0,6	0,7
1452270_s_at	Cubn	cubilin (intrinsic factor- cobalamin receptor)	1,5	1,5

7 LITERATUR

- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996). KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the IKS cardiac potassium current. Nature 384, 78-80.
- Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, Vol. 116, pp. 281-297.
- Berkefeld, H., Sailer, C.A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J.O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., et al. (2006). BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca2+-activated K+ signaling. Science 314, 615-620.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ (2003) Dicer is essential for mouse development. Nat Genet 35(3): 215-217
- Beuvink I, Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F, Dengler U, Hall J, Filipowicz W, Weiler J (2007) A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. Nucl Acids Res 35(7): e52-
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol 13(12): 1097-1101
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA 10, 1957-1966.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. Crit Rev Biochem Mol Biol 36, 107-260.
- Caudy AA, Hannon GJ (2004) Induction and biochemical purification of RNAinduced silencing complex from Drosophila S2 cells. Methods Mol Biol 265: 59-72

- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet 38(2): 228-233
- Chu CY, Rana TM (2006) Translation repression in human cells by microRNAinduced gene silencing requires RCK/p54. PLoS Biol 4(7): e210
- Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W, Lebel M, Cheng CW, Park CY, Pierce SA, Guerchicoff A, Pollevick GD, Chan TY, Kabir MG, Cheng SH, Husain M, Antzelevitch C, Srivastava D, Gross GJ, Hui CC, Backx PH, Bruneau BG (2005) The homeodomain transcription factor Irx5 establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. Cell 123(2): 347-358
- Czech, B., Zhou, R., Erlich, Y., Brennecke, J., Binari, R., Villalta, C., Gordon, A., Perrimon, N., and Hannon, G.J. (2009). Hierarchical rules for Argonaute loading in Drosophila. Mol Cell 36, 445-456.
- Darnell, D.K., Kaur, S., Stanislaw, S., Konieczka, J.H., Yatskievych, T.A., and Antin, P.B. (2006). MicroRNA expression during chick embryo development. Dev Dyn 235, 3156-3165.
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP (1994) Ca2+ channel regulation by a conserved [beta] subunit domain. Neuron 13(2): 495-503
- Drici MD, Arrighi I, Chouabe C, Mann JR, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J (1998) Involvement of IsK-associated K+ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. Circ Res 83(1): 95-102
- Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. Nat Rev Mol Cell Biol 5(10): 827-835
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF (2006) Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs. Science 312(5770): 75-79
- Gregg, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J.A., Coronado, R., et al. (1996). Absence of the

beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 13961-13966.

- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res 34(Database issue): D140-144
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science 293(5531): 834-838
- Ishihama Y, Rappsilber J, Mann M (2006) Modular Stop and Go Extraction Tips with Stacked Disks for Parallel and Multidimensional Peptide Fractionation in Proteomics. Journal of Proteome Research 5(4): 988-994
- Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. Genes Dev 15(20): 2654-2659
- Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A (2006) Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. J Cell Biol 174(5): 677-687
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z (2007) An mRNA m7G Cap Binding-like Motif within Human Ago2 Represses Translation. 129(6): 1141-1151
- Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, Kauppinen S, Plasterk RHA (2006) In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. Nat Meth 3(1): 27
- Koetsier, P.A., Schorr, J., and Doerfler, W. (1993). A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA. Biotechniques 15, 260-262.
- Krüger M, Moser M, Ussar S, Thievessen I, Luber CA, Forner F, Schmidt S, Zanivan S, Fässler R, Mann M (2008) SILAC Mouse for Quantitative Proteomics

Uncovers Kindlin-3 as an Essential Factor for Red Blood Cell Function. Cell 134(2): 353-364

- Kwon, C., Han, Z., Olson, E.N., and Srivastava, D. (2005). MicroRNA1 influences cardiac differentiation in Drosophila and regulates Notch signaling. PNAS, 0509535102.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 294(5543): 853-858
- Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE (1995) Mapping of Functional Domains in Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4G (eIF4G) with Picornaviral Proteases. J Biol Chem 270(37): 21975-21983
- Larson AC, White, RD, Laub, G, MacVeigh, ER, Li, D, Simonetti, OP (2004) Magnetic Resonance in Medicine 51:93-102
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science 294(5543): 858-862
- Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan A, Athey BD (2009) New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. Genome Res
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75(5): 843-854
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 425(6956): 415-419
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J 23(20): 4051-4060
- Lewis BP, Shih Ih, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. Cell 115(7): 787-798

- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some micro-RNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature 433(7027): 769-773
- Link, S., Meissner, M., Held, B., Beck, A., Weissgerber, P., Freichel, M., Flockerzi, V. (2009). Diversity and developmental expression of L-type calcium channel beta2 proteins and their influence on calcium current in murine heart. J Biol Chem 284, 30129-30137.
- Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2007) An intragenic MEF2dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(52): 20844-20849
- Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A.H., Qi, X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008). microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. Genes Dev 22, 3242-3254.
- Luo XJ, Lin H, Li B, Lu Y, Yang B, Wang Z (2007) Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of I_{Ks} encoding genes and potential implications in regional hete-rogeneity of their expressions. Journal of Cellular Physiology 212(2): 358-367
- Lutz, S., Mura, R.A., Hippe, H.J., Tiefenbacher, C., and Niroomand, F. (2003). Plasma membrane-associated nucleoside diphosphate kinase (nm23) in the heart is regulated by beta-adrenergic signaling. Br J Pharmacol 140, 1019-1026.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. Proc Natl Acad Sci U S A 104(23): 9667-9672
- Maekawa S, Nishida E, Ohta Y, Sakai H (1984) Isolation of low molecular weight actin-binding proteins from porcine brain. J Biochem 95(2): 377-385
- Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. Nat Struct Mol Biol 13(12): 1102-1107
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science 317(5845): 1764-1767
- McCarthy JJ (2008) MicroRNA-206: The skeletal muscle-specific myomiR. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 1779(11): 682-691
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ (2007) SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. Circulation 116(2): 134-142
- Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. Proc Natl Acad Sci U S A 92(15): 6991-6995
- Mishima, Y., Abreu-Goodger, C., Staton, A.A., Stahlhut, C., Shou, C., Cheng, C., Gerstein, M., Enright, A.J., and Giraldez, A.J. (2009). Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization. Genes Dev 23, 619-632.
- Morgan TE, Lockerbie RO, Minamide LS, Browning MD, Bamburg JR (1993) Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. J Cell Biol 122(3): 623-633
- Morton SU, Scherz PJ, Cordes KR, Ivey KN, Stainier DY, Srivastava D (2008) microRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development. Proc Natl Acad Sci U S A 105(46): 17830-17835
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis 26, 99-109.

- Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D (2001) Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? Circ Res 89(11): 944-956
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. Nat Struct Mol Biol 13(12): 1108-1114
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y.T., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. Nat Struct Mol Biol 15, 354-363.
- Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002) Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. Mol Cell Proteomics 1(5): 376-386
- Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF (2006) Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 103(23): 8721-8726
- Reddy, A.M., Zheng, Y., Jagadeeswaran, G., Macmil, S.L., Graham, W.B., Roe,B.A., Desilva, U., Zhang, W., and Sunkar, R. (2009). Cloning, characterization and expression analysis of porcine microRNAs. BMC Genomics *10*, 65.
- Rigoutsos, I. (2009). New tricks for animal microRNAS: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. Cancer Res 69, 3245-3248.
- Rueckschloss U, Isenberg G (2001) Cytochalasin D reduces Ca2+ currents via cofilin-activated depolymerization of F-actin in guinea-pig cardiomyocytes. J Physiol 537(Pt 2): 363-370
- Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H.E., Flockerzi,
 V., and Hofmann, F. (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHPsensitive calcium channel from skeletal muscle. Science 245, 1115-1118.

- Salzman DW, Shubert-Coleman J, Furneaux H (2007) P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. J Biol Chem 282(45): 32773-32779
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Specter PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of KVLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac IKS potassium channel. Nature 384(6604): 80
- Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. 115(2): 199-208
- Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, Penninger JM, Molkentin JD (2001) Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. Circ Res 89(1): 20-25
- Sokol, N.S., and Ambros, V. (2005). Mesodermally expressed Drosophila micro-RNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. Genes Dev 19, 2343-2354.
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separeted by gel electrophoresis. J Mol Biol 98(3): 503-517
- Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, Oustanina S, Braun T, Dalmay T, Munsterberg A (2008) Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. Dev Biol 321(2): 491-499
- Szeliga MA, Hedley PL, Green CP, Moller DV, Christiansen M (2010) Long QT syndrome a genetic cardiac channelopathy. Kardiol Pol 68(5): 575-583
- Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM (2004) A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. Nat Methods 1(1): 47-53
- Voss, A.K., Thomas, T., and Gruss, P. (1997). Germ line chimeras from female ES cells. Exp Cell Res 230, 45-49.
- Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. Mol Cell 2(1): 135-140

- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RHA (2005) MicroRNA Expression in Zebrafish Embryonic Development. Science 309(5732): 310-311
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 75(5): 855
- Wisniewski JR, Zougman A, Mann M (2009a) Combination of FASP and Stage-Tip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. J Proteome Res 8(12): 5674-5678
- Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009b) Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods 6(5): 359-362
- Xiao J, Luo X, Lin H, Zhang Y, Lu Y, Wang N, Zhang Y, Yang B, Wang Z (2007) MicroRNA miR-133 represses HERG K+ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. J Biol Chem 282(17): 12363-12367
- Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., et al. (2007). The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. Nat Med 13, 486-491.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev 17(24): 3011-3016
- Yonezawa N, Nishida E, Sakai H (1985) pH control of actin polymerization by cofilin. J Biol Chem 260(27): 14410-14412
- Zhao Y, Samal E, Srivastava D (2005) Serum response factor regulates a musclespecific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature 436(7048): 214-220
- Zhao, Y., Ransom, J.F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A.N., Tsuchihashi, T., McManus, M.T., Schwartz, R.J., and Srivastava, D. (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. Cell 129, 303-317.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wäre nicht möglich gewesen, ohne die Hilfe und Mitwirkung anderer. Ich möchte mich hiermit herzlich bedanken bei...

- Prof. Dr. Thomas Braun, der mir die Durchführung der Arbeit am Max-Plank-Institut für Herz-und Lungenforschung ermöglichte
- Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn, der die Betreuung von Seiten der Justus-Liebig-Universität übernommen hat
- Dr. Thomas Böttger, der mir das Thema zur Verfügung stellte, und der mir mit seiner fachlichen Betreuung, methodischen Tipps und Diskussionen immer sehr geholfen hat
- unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Bernd Fleischmann, Prof. Dr. Philipp Sasse und Dr. Daniela Malan für die elektrophysiologischen Messungen
- Diana Fuchs, Ulrike Neckmann und Ulrike Schlapp für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag, besonders möchte ich mich bei Ulli bedanken, zum einen für die Ausdauer bei den *in situ* Hybridisierungen, zum anderen für all den Spaß, den wir zusammen hatten
- meinen Laborkollegen Judith Schweisgut, Johannes Besser und Nicole Gröger für die super Zusammenarbeit und die Durchführung von laborexternen Projekten
- der Servicegruppe Proteomics: ein besonderer Dank gilt Anne Konzer, die sich immer Zeit genommen hat, mich in die Geheimnisse der Protokolle und Lösungen einzuweihen
- Astrid Wietelmann f
 ür die Messung der MRTs und die ausf
 ührliche Besprechung der Daten
- Viktoria Gutjahr und Katharina Engel, stellvertretend für die Mitarbeiter des Tierstalls
- Sandra Bücker und Stefanie Köhler-Bachmann für wertvolle Diskussionen über die Arbeit, das Leben, das Universum und den ganzen Rest
- allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes f
 ür Herz-und Lungenforschung f
 ür die gute Zusammenarbeit

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mich während des ganzen Studiums und der Promotionszeit unterstützt haben. Ein Dankeschön ebenfalls an Susi, Dörte, Sabine, Mona, Steffi, Steffi und Anja, (ihr wisst schon...). Insbesondere möchte ich mich bei Raphael bedanken, dass er mich in allen Hochs und Tiefs der letzten Jahre ertragen hat.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich diese Dissertation gemäß der Promotionsordnung selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Angela Bachmann

Bad Nauheim, 03.12.2010