



# **Roquin als zentraler Regulator microRNA-vermittelter kardioprotektiver Signalwege**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. rer. nat.  
am Fachbereich Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Nadja Itani  
(M.Sc. Biotechnologie)  
Gießen 2026

Aus dem Physiologischen Institut  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Rainer Schulz  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Mit Genehmigung des Fachbereiches 08 Biologie und Chemie der  
Justus-Liebig-Universität

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Gutachter 1: Prof. Dr. Ivan Manzini

Gutachter 2: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Tag der Disputation: 13.07.2026

Für Tristan

## I. Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. Inhaltsverzeichnis .....</b>                                                              | <b>1</b>  |
| <b>II. Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                          | <b>4</b>  |
| <b>1. Einleitung .....</b>                                                                      | <b>7</b>  |
| 1.1 Adaptive Umbauprozesse im postischämischen Myokard .....                                    | 7         |
| 1.2 Biogenese, Wirkmechanismen und Bedeutung von microRNA im postinfarzierten Herzen .....      | 10        |
| 1.3 Struktur, Funktion und regulatorische Bedeutung von Roquin im reperfundierten Myokard ..... | 14        |
| 1.4 Arbeitshypothesen .....                                                                     | 17        |
| 1.5 Zielsetzung .....                                                                           | 19        |
| <b>2. Material .....</b>                                                                        | <b>19</b> |
| 2.1 Chemikalien .....                                                                           | 19        |
| 2.2 Medien, Pufferlösungen & spezifische Nachweissysteme .....                                  | 22        |
| 2.3 Verbrauchsmaterialien .....                                                                 | 24        |
| 2.4 Geräte .....                                                                                | 25        |
| 2.5 Software und Datenbanken .....                                                              | 27        |
| 2.6 Antikörper .....                                                                            | 28        |
| 2.7 Primer .....                                                                                | 29        |
| 2.8 Versuchstiere .....                                                                         | 30        |
| 2.9 Zelllinie .....                                                                             | 31        |
| <b>3. Methoden .....</b>                                                                        | <b>31</b> |
| 3.1 <i>In vitro</i> -Studien an humanen AC16-Kardiomyozyten .....                               | 31        |
| 3.1.1 Ansetzen einer Zellkultur aus kryokonservierten AC16-Zellen .....                         | 31        |
| 3.1.2 Mediumwechsel .....                                                                       | 32        |
| 3.1.3 Passagieren .....                                                                         | 32        |
| 3.1.4 Pharmakologische Behandlung und Transfektion von AC16-Zellen .....                        | 32        |
| 3.1.5 Hypoxie-Reoxygenierung .....                                                              | 34        |

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.6 Fluoreszenzbasierte Detektion mitochondrialer Funktion.....                                     | 35        |
| 3.1.7 Apoptose- / Nekrose-Assay .....                                                                 | 35        |
| 3.1.8 Bestimmung der Zellzahl .....                                                                   | 36        |
| 3.2 <i>In vivo</i> - und <i>ex vivo</i> -Studien am Herzen adulter Ratten.....                        | 36        |
| 3.2.1 Isolation von Kardiomyozyten (MZ) und nicht-Kardiomyozyten (NMZ) .....                          | 36        |
| 3.2.2 Integrative microRNA-mRNA Analyse zur Identifikation kardioprotektiver miRNAs ..                | 38        |
| 3.3 RNA-basierte Expressionsanalysen .....                                                            | 41        |
| 3.3.1 Isolation von RNA aus Rattenherzgewebe .....                                                    | 42        |
| 3.3.2 Isolation von RNA aus Zell-Lysaten .....                                                        | 43        |
| 3.3.3 cDNA-Synthese.....                                                                              | 43        |
| 3.3.4 microRNA cDNA-Synthese .....                                                                    | 44        |
| 3.3.5 RT-qPCR .....                                                                                   | 45        |
| 3.3.6 microRNA RT-qPCR.....                                                                           | 46        |
| 3.4 Proteinbasierte Analysen .....                                                                    | 47        |
| 3.4.1 Vorbereitung der Zell-Lysate .....                                                              | 47        |
| 3.4.2 Vorbereitung der Gewebe-Lysate.....                                                             | 47        |
| 3.4.3 Proteinisolation aus Gewebe- und Zell-Lysaten .....                                             | 48        |
| 3.4.4 BCA Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration .....                                         | 48        |
| 3.4.5 SDS-PAGE .....                                                                                  | 49        |
| 3.4.6 Western Blot .....                                                                              | 49        |
| 3.4.7 Proteindetektion .....                                                                          | 50        |
| 3.5 Statistische Auswertung .....                                                                     | 51        |
| <b>4. Ergebnisse .....</b>                                                                            | <b>51</b> |
| 4.1 Expression der beiden Roquin-Isoformen auf mRNA- und Proteinebene in kardialen Zellmodellen ..... | 51        |
| 4.2 Der Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Expression der Roquin-Isoformen .....         | 55        |
| 4.3 Der Beitrag von Roquin zur Kontrolle miRNA-vermittelter kardioprotektiver Signalwege .....        | 57        |

|                                                                                                                                                                       |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.1 Die „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Achse“ .....                                                                                                                | 57         |
| 4.3.2 Die „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Achse“ .....                                                                                                             | 66         |
| <b>5. Diskussion .....</b>                                                                                                                                            | <b>82</b>  |
| 5.1 Roquin im kardiovaskulären Kontext .....                                                                                                                          | 85         |
| 5.2 Die Bedeutung der „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Regulationsachse“ für das<br>Remodeling des postischämischen Myokards .....                                     | 87         |
| 5.3 Die „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Regulationsachse“ als potenzieller Regulator<br>kardioprotektiver Anpassungsreaktionen unter hypoxischen Bedingungen ..... | 92         |
| <b>6. Zusammenfassung .....</b>                                                                                                                                       | <b>98</b>  |
| <b>7. Summary.....</b>                                                                                                                                                | <b>99</b>  |
| <b>III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                                                                                                               | <b>100</b> |
| <b>IV. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                                                                                                                 | <b>102</b> |
| <b>V. PUBLIKATIONEN .....</b>                                                                                                                                         | <b>111</b> |
| <b>VI. PATENTANMELDUNGEN .....</b>                                                                                                                                    | <b>112</b> |
| <b>VII. VORTRAG / POSTERPRÄSENTATION .....</b>                                                                                                                        | <b>113</b> |

## II. Abkürzungsverzeichnis

|                         |                                                                |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>3'UTR</b>            | 3'-untranslatierte Region                                      |
| <b>A135a</b>            | Antagomir Gegen miR-135a-5p                                    |
| <b>AAV9</b>             | Adeno-assoziiertes Virus Serotyp 9                             |
| <b>AC16</b>             | Humane Kardiomyozyten-Zelllinie                                |
| <b>ACS</b>              | akutes Koronarsyndrom                                          |
| <b>ADE</b>              | Alternative Decay Element                                      |
| <b>AF</b>               | aortaler Fluss                                                 |
| <b>AGO</b>              | Argonaute-Protein                                              |
| <b>AKT</b>              | Proteinkinase B                                                |
| <b>ASK1/JNK</b>         | Apoptosis signal-regulating kinase 1 / c-Jun N-terminal kinase |
| <b>ATP</b>              | Adenosintriphosphat                                            |
| <b>BCA Assay</b>        | Bicinchoninic Acid Assay                                       |
| <b>C. elegans</b>       | Caenorhabditis elegans                                         |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | Calciumchlorid                                                 |
| <b>CCR4-NOT</b>         | CCR4-NOT-Komplex                                               |
| <b>CDE</b>              | Constitutive Decay Element                                     |
| <b>cDNA</b>             | komplementäre DNA                                              |
| <b>CF</b>               | koronarer Fluss                                                |
| <b>CO</b>               | Herzzeitvolumen                                                |
| <b>DAPI</b>             | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                                   |
| <b>DCP1/DCP2</b>        | Decapping Enzyme 1/2                                           |
| <b>DGCR8</b>            | DiGeorge Critical Region 8 (RNA-bindendes Protein)             |
| <b>DM</b>               | Diabetes mellitus                                              |
| <b>DMEM/F12</b>         | Dulbecco's Modified Eagle Medium F12                           |
| <b>DMSO</b>             | Dimethylsulfoxid                                               |
| <b>DNA</b>              | Desoxyribonukleinsäure                                         |
| <b>dNTPs</b>            | Desoxynukleotid-Triphosphat                                    |
| <b>DTT</b>              | Dithiothreitol                                                 |
| <b>ECL</b>              | Enhanced Chemiluminescence                                     |
| <b>eNOS</b>             | endotheliale NO-Synthase                                       |
| <b>EZM</b>              | extrazelluläre Matrix                                          |
| <b>FBS</b>              | Fetal Bovine Serum                                             |
| <b>FOXO</b>             | Forkhead box O (Transkriptionsfaktor)                          |
| <b>FS-Puffer</b>        | First Strand Puffer                                            |
| <b>GAPDH</b>            | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                       |
| <b>GSK-3β</b>           | Glycogen Synthase Kinase 3 beta                                |
| <b>HEPES</b>            | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid              |
| <b>HPRT</b>             | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase                  |

|                  |                                                                    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>HR</b>        | Herzfrequenz                                                       |
| <b>HRP</b>       | Horseradish Peroxidase                                             |
| <b>HYP</b>       | Hypoxie-Gruppe                                                     |
| <b>I/R</b>       | Ischämie/Reperfusion                                               |
| <b>IPC</b>       | Ischämische Vorkonditionierung                                     |
| <b>IPoC</b>      | Ischämische Postkonditionierung                                    |
| <b>IPoC-NR</b>   | Nicht-protective ischämische Postkonditionierung                   |
| <b>iPSC-CMs</b>  | Induzierte pluripotente Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten       |
| <b>KHK</b>       | koronare Herzkrankheit                                             |
| <b>LAD</b>       | Left Anterior Descending (Arterie)                                 |
| <b>LVDP</b>      | Left Ventricular Developed Pressure                                |
| <b>LVEDP</b>     | Left Ventricular End-Diastolic Pressure                            |
| <b>MALT1</b>     | Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 |
| <b>MI</b>        | Myokardinfarkt                                                     |
| <b>miR-17~92</b> | microRNA-Cluster 17 bis 92                                         |
| <b>miRISC</b>    | miRNA-induzierter Silencing-Komplex                                |
| <b>miRNA</b>     | microRNA                                                           |
| <b>MMIA</b>      | Integrative microRNA-und-mRNA Analyse                              |
| <b>M-MLV-Rt</b>  | Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase                |
| <b>MOPS</b>      | 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid                               |
| <b>MRE</b>       | miRNA Response Element                                             |
| <b>mRNA</b>      | Messenger RNA                                                      |
| <b>mTOR</b>      | Mechanistic Target of Rapamycin                                    |
| <b>MZ</b>        | Kardiomyozyten                                                     |
| <b>ND-100</b>    | NanoDrop                                                           |
| <b>NMZ</b>       | nicht-Kardiomyozyten                                               |
| <b>NOX</b>       | normoxische Kontrollgruppe                                         |
| <b>Opti-MEM</b>  | Optimized Minimal Essential Medium                                 |
| <b>p110</b>      | katalytische PI3K-Untereinheit                                     |
| <b>p85</b>       | regulatorische PI3K-Untereinheit                                   |
| <b>pAKT</b>      | phosphoryliertes AKT                                               |
| <b>P-Bodies</b>  | processing bodies                                                  |
| <b>PBS</b>       | Phosphate Buffered Saline                                          |
| <b>PCI</b>       | perkutane Koronarintervention                                      |
| <b>pCMV6</b>     | Plasmid mit Cytomegalovirus-Promotor                               |
| <b>PI</b>        | Propidiumiodid                                                     |
| <b>PI3K</b>      | Phosphoinositid-3-Kinase                                           |
| <b>PIP2</b>      | Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphat                              |
| <b>PIP3</b>      | Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat                           |

|                       |                                                        |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>PI-R1</b>          | <i>RC3H1</i> -Plasmid                                  |
| <b>PP2A</b>           | Proteinphosphatase 2A                                  |
| <b>pre-miRNA</b>      | Vorläufer-microRNA                                     |
| <b>pri-miRNA</b>      | primäre microRNA                                       |
| <b>PTEN</b>           | Phosphatase and tensin homolog                         |
| <b>qRT-PCR</b>        | quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion        |
| <b>RBP</b>            | RNA-binding protein                                    |
| <b><i>RC3H1</i></b>   | Gen für Roquin-1                                       |
| <b><i>RC3H2</i></b>   | Gen für Roquin-2                                       |
| <b>RISK</b>           | Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway              |
| <b>RNA-Pol II/III</b> | RNA-Polymerase II/III                                  |
| <b>ROQ</b>            | Roquin-typische Domäne                                 |
| <b>ROS</b>            | reaktive Sauerstoffspezies                             |
| <b>rpm</b>            | Umdrehungen pro Minute                                 |
| <b>RT</b>             | Raumtemperatur                                         |
| <b>SAFE</b>           | Survivor Activating Factor Enhancement pathway         |
| <b>Scr</b>            | scrambled Kontrolle                                    |
| <b>SDS-PAGE</b>       | Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| <b>siRNA</b>          | small interfering RNA                                  |
| <b>TGF-β</b>          | Transforming Growth Factor-beta                        |
| <b>Tregs</b>          | regulatorische T-Zellen                                |
| <b>TRITC</b>          | Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat                      |
| <b>UTR</b>            | untranslated region (nicht-translatierte Region)       |
| <b>VEGF</b>           | Vascular Endothelial Growth Factor                     |
| <b>WB</b>             | Western Blot                                           |
| <b>WHO</b>            | Weltgesundheitsorganisation                            |
| <b>XRN1</b>           | Exoribonuklease 1                                      |
| <b>ZBTB20</b>         | Zink Finger and BTB Domain Containing 20               |

## 1. Einleitung

### 1.1 Adaptive Umbauprozesse im postischämischen Myokard

Das Herz-Kreislauf-System, eine funktionelle Einheit aus Herz und Blutgefäßen, stellt für den Organismus die zentrale Versorgungsachse dar, die den Transport von Blut, Sauerstoff, Kohlendioxid und zahlreichen Stoffwechselprodukten gewährleistet. Innerhalb dieses komplexen Systems können sowohl vaskuläre als auch myokardiale Störungen unmittelbar zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion führen.

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen weltweit die häufigste Todesursache dar.<sup>1</sup> Einen wesentlichen Anteil an diesen Erkrankungen nimmt die koronare Herzkrankheit (KHK) ein, die etwa 50 % aller kardiovaskulären Fälle ausmacht.<sup>2</sup> Die KHK ist typischerweise durch eine Verengung der Koronararterien gekennzeichnet, deren Ursache überwiegend auf eine atherosklerotisch bedingte Stenosierung zurückzuführen ist. Hierbei handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung, bei der es zur Ablagerung von Lipiden, Cholesterin und weiteren Substanzen innerhalb der Gefäßwände kommt. Als Folge führt das reduzierte Gefäßlumen und die resultierende Einschränkung der Perfusion zur Ischämie im Versorgungsgebiet der betroffenen Arterie. Der plötzliche Verschluss eines Koronargefäßes verursacht das akute Koronarsyndrom, das je nach Ausmaß der Minderperfusion zur instabilen Angina pectoris oder einem Herzinfarkt (Myokardinfarkt, MI) führt. Bereits nach wenigen Minuten gehen Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) infolge des akuten Sauerstoffmangels zugrunde und verursachen histopathologisch das Bild einer myokardialen Koagulationsnekrose.

Die Wiederherstellung des Blutflusses in das ischämische Myokard, die sog. Reperfusion, kann paradoxerweise zusätzliche Gewebeschädigungen hervorrufen. Als Reperfusionsschaden bezeichnet, trägt dieses Phänomen im Anschluss an die Ischämie-bedingte Schädigung schätzungsweise 50 % zur endgültigen Infarktgröße bei. Bereits nach einer 30 bis 60 minütigen Ischämie mit anschließender Reperfusion (I/R) lassen sich die ersten histologischen Veränderungen sicher diagnostizieren, die sich vorrangig in strukturellen Veränderungen der Kardiomyozyten, einem interstitiellen Ödem und dem Beginn einer Nekrose widerspiegeln.<sup>3</sup>

Ein Myokardinfarkt führt zu dauerhaften Strukturveränderungen des Herzgewebes. Das infarzierte Myokard durchläuft komplexe Umbauprozesse, die als postischämisches

Remodeling erstmals 1982 von Hockman und Buckey beschrieben wurden.<sup>4</sup> Ziel dieses Prozesses ist der Ersatz des nekrotischen Myokards durch Narbengewebe. Das Remodeling stellt somit einen dynamischen Anpassungsmechanismus dar, der sowohl adaptive als auch maladaptive Komponenten umfasst. Während adaptive Prozesse der kurz- und mittelfristigen Aufrechterhaltung einer stabilen Herzfunktion dienen, können maladaptive Veränderungen langfristig zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen.

In der ischämischen Umgebung kommt es auf zellulärer Ebene zu einer Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel, einer Destabilisierung der Zellmembran und letztlich zum Zelltod durch Apoptose, Autophagie oder Nekrose.<sup>5</sup> Der Verlauf des Remodelings ist komplex und hängt sowohl von der Infarktgröße und der Lokalisation der Nekrose als auch vom Zeitpunkt und der Effizienz einer interventionellen Reperfusion ab. Darüber hinaus haben das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion, die Höhe der Wandspannung in der Infarktgrenzzone sowie die neurohormonelle Aktivierung und eine potenzielle Dysregulation auf Ebene der Transkription entscheidenden Einfluss auf die Umbauprozesse. Diese Faktoren stehen in wechselseitiger Beziehung zueinander und können – sich gegenseitig verstärkend – das Risiko zur Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz mitunter signifikant erhöhen. Weiterhin können Co-Morbiditäten die Progression einer Ischämie-bedingten kardialen Dysfunktion zusätzlich beschleunigen. Hierzu zählen unter anderem die Adipositas, ein Diabetes mellitus (DM) sowie die arterielle Hypertonie.<sup>6</sup> Das komplexe Zusammenspiel dieser Einflussfaktoren auf molekularer, zellulärer sowie interstitieller Ebene, an der inflammatorische Prozesse, das hypertrophe Wachstum überlebender Herzmuskelzellen sowie die interstitielle Fibrose beteiligt sind, ist bislang nicht vollständig geklärt.

In den 1990er Jahren wurde der sogenannte RISK-Signalweg (Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway) als Sammelbegriff für eine Gruppe überlebensfördernder Proteinkinasen etabliert. Diese entfalten insbesondere bei gezielter Aktivierung während der Reperfusion eine ausgeprägte kardioprotektive Wirkung, indem sie anti-apoptotische Signalmechanismen gegenüber den destruktiven Effekten der Reperfusion mobilisieren.<sup>7</sup> Einige experimentelle Studien identifizierten die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (AKT) als zentrale Komponenten eines Signalwegs, der sowohl das Überleben von Zellen fördert als auch den apoptotischen Zelltod reduziert. Der PI3K/AKT-Signalweg nimmt somit eine Schlüsselrolle ein, da er zahlreiche essenzielle Prozesse wie Wachstum bzw. Proliferation und

darüber hinaus den Stoffwechsel und das zelluläre Überleben steuert.<sup>7-9</sup> AKT inaktiviert pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, indem das Protein BAX phosphoryliert wird, wodurch dessen Translokation an die mitochondriale Membran und die damit verbundene Freisetzung von Cytochrom c unterbunden wird. Letzteres ist ein essenzieller Trigger der intrinsischen Apoptosekaskade. Des Weiteren aktiviert der PI3K/AKT-Signalweg transkriptionelle Effektoren wie mTOR, was die Translation pro-angiogener Faktoren stimuliert und somit die Ausbildung neuer Blutgefäße im infarktgeschädigten Myokard unterstützt. Der Transkriptionsfaktor FOXO wird zudem durch AKT phosphoryliert, was zu dessen Abbau führt, und somit seine wachstumshemmenden Effekte unterdrückt werden.<sup>10</sup>

Trotz dieser ausgeprägten kardioprotektiven Effekte kann eine chronische oder übermäßige Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs maladaptive Konsequenzen haben. Studien belegen, dass eine dauerhafte Aktivierung des Signalwegs mit einer exzessiven Fibrosierung im Infarktareal, der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie sowie dem plötzlichen Herztod assoziiert ist.<sup>6,8</sup> Ungeachtet seines therapeutischen Potentials müssen somit im Vorfeld einer klinisch anwendbaren Beeinflussung des PI3K/AKT-Signalwegs vor allem im Hinblick auf die Art und Weise sowie das Ausmaß seiner Aktivierung weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Da der Verlust von Kardiomyozyten direkt mit der kardialen Funktionseinschränkung korreliert, lässt sich über die Hemmung der Apoptose der Reperfusionsschaden und somit ein funktionelles Defizit effizient reduzieren.<sup>11</sup> Neben der AKT nimmt auch der Transkriptionsfaktor ZBTB20 Einfluss auf den apoptotischen Signalweg des postinfarzierten Myokards. *In vivo*, am Infarktmodell der Maus, wurde im Anschluss an eine LAD-Okklusion ZBTB20 mithilfe eines adeno-assoziierten Virus (AAV9) im Myokard überexprimiert. Vier Wochen nach dem Infarkt zeigten die Kontrolltiere eine signifikante Verschlechterung der Herzfunktion sowie eine Zunahme des kardiomyozytären Zelltods. Im Gegensatz dazu wiesen ZBTB20-überexprimierende Mausherzen eine signifikant reduzierte Infarktgröße und verbesserte kardiale Funktion auf. Außerdem kam es zu einer reduzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und einer Inaktivierung des ASK1/JNK-Signalwegs und somit zu einer verminderten Apoptose. Trotz dieser ersten Erkenntnisse sind weitere Arbeiten erforderlich, um die kardioprotektiven Effekte von ZBTB20 mechanistisch nachvollziehen zu können.<sup>12</sup>

In den letzten Jahren wurden zur gezielten Modulation kardioprotektiver Signalwege microRNAs (miRNAs) identifiziert, die als post-transkriptionale Regulatoren mittels Hemmung oder Abbau der jeweiligen mRNA Einfluss auf die Genexpression nehmen.<sup>13</sup> Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung miRNA-vermittelter Einflüsse auf die beiden kardioprotektiven Signalwege von ZBTB20 und PI3K/AKT, die das Remodeling des postischämischen Myokards steuern und dessen molekulare Mechanismen bislang nur unvollständig aufgeklärt sind.

### **1.2 Biogenese, Wirkmechanismen und Bedeutung von microRNA im postinfarzierten Herzen**

Im Jahr 2004 wurde der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an Victor Ambros und Gary Ruvkun für ihre Entdeckung der microRNA (miRNA) und deren Rolle in der post-transkriptionellen Genregulation verliehen. Die erste miRNA identifizierten die beiden Forscher bereits 1993 in dem Fadenwurm *C. elegans*.<sup>14</sup> Bei miRNAs handelt es sich um eine Klasse kleiner, nicht-kodierender RNA-Moleküle mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden, die eine zentrale Funktion in der post-transkriptionellen Kontrolle der Genexpression übernehmen. Einige dieser Moleküle sind evolutionär hoch konserviert und finden sich in verschiedenen Spezies wieder. Sie entstehen durch Transkription aus der DNA, werden in mehreren Schritten zu reifen miRNAs prozessiert und können an die 3'-UTR (nicht-translatierte Region) von Ziel-mRNAs binden und deren Translation hemmen.<sup>15</sup>

Nach einem Myokardinfarkt beginnt ein struktureller Umbauprozess, bei dem unter anderem fibrotisches Ersatzgewebe entsteht. Dieser Umbau kann langfristig die Struktur und Funktion der Ventrikel beeinträchtigen und ist häufig mit dem Verlust von Kardiomyozyten sowie der Entwicklung einer kompensatorischen Hypertrophie verbunden. Eine zunehmende Anzahl wissenschaftlicher Studien belegt, dass miRNAs eine zentrale Rolle in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression einnehmen und entscheidend an der Steuerung kardialer Umbauprozesse nach einem MI beteiligt sind.<sup>16–18</sup>

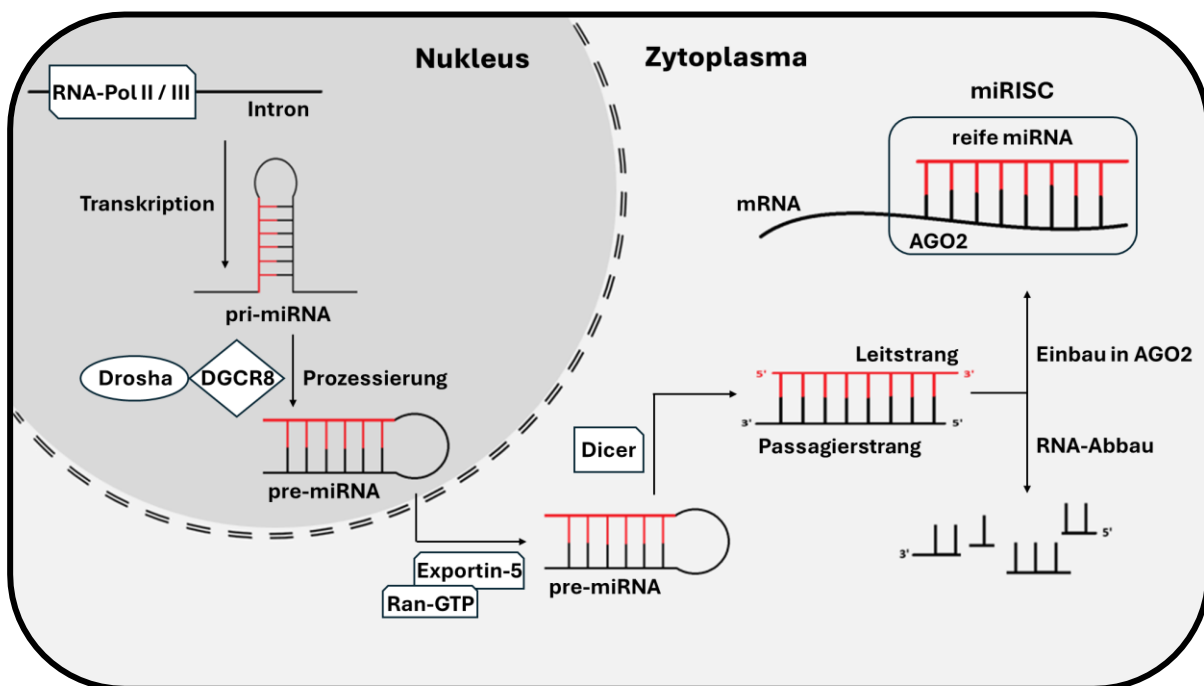
Die Myokardfibrose stellt ein wesentliches Merkmal des infarktbedingten kardialen Remodelings dar und zeichnet sich durch eine unkontrollierte Akkumulation extrazellulärer Matrix (EZM)-Komponenten aus, die primär von kardialen Fibroblasten und deren differenzierte Form, den Myofibroblasten, synthetisiert werden. Dadurch werden

Kardiomyozyten durch fibröses Gewebe ersetzt, was zur Ausbildung einer irreversiblen Narbe führt. Dies beeinträchtigt die systolische und diastolische Funktion des ventrikulären Myokards und kann somit zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen.<sup>19</sup> Die Ausbildung einer kardialen Fibrose läuft unter Beteiligung verschiedener Signalwege ab, innerhalb derer die bereits im ersten Kapitel beschriebene AKT eine wichtige Rolle übernimmt. Aktiviert durch den Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) vermittelt AKT sowohl die Proliferation von Fibroblasten als auch deren Differenzierung zu Myofibroblasten. Darüber wird die Expression von Genen gesteuert, die zur Bildung extrazellulärer Matrixbestandteile wie Elastin und Kollagen befähigt sind.<sup>20</sup>

Im Rahmen dieser postischämisch stattfindenden Umbauvorgänge konnten bereits mehrere miRNAs identifiziert werden, die sowohl an der Stabilisierung der Infarktzone als auch der maladaptiven Fibrosierung des Restmyokards beteiligt sind. Dabei zeigt sich, dass einzelne miRNAs in der Lage sind, Signalwege in verschiedene Zelltypen gleichzeitig zu modulieren. Dies deutet darauf hin, dass miRNAs verschiedene Zielgene regulieren und somit verschiedene Funktionen innerhalb des kardialen Remodelings übernehmen können. Eine ausgewogene Regulation zellulärer Signalwege durch miRNAs, die sowohl aktivierend als auch hemmend wirken können, ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion nach einem Infarkt.<sup>17,21</sup> Im Folgenden wird die molekulare Entstehung der miRNAs sowie ihre Rolle bei der Regulation der Genexpression beschrieben.

Die Biogenese der miRNAs wird in einen kanonischen als auch in verschiedene nicht-kanonische Prozesse unterteilt. Zu Beginn werden aus Introns Transkripte durch die RNA-Polymerase II oder III generiert. In einigen Fällen werden miRNAs als lange Transkripte exprimiert, die mehrere miRNA-Sequenzen enthalten und sogenannte miRNA-Cluster bilden. Im klassischen bzw. kanonischen Biogeneseweg werden primäre miRNAs (pri-miRNAs) transkribiert, welche durch den Mikroprozessor-Komplex weiter zu Vorläufer-miRNAs, den sog. pre-miRNAs, prozessiert werden. Zunächst erkennt das RNA-bindende Protein DGCR8 spezifische Sequenzbereiche, wie beispielsweise N6-methyladenylierte GGAC-Motive, innerhalb der pri-miRNA. Dies ermöglicht der Ribonuklease II Drosha das pri-miRNA-Duplex an der Basis der Haarnadelstruktur zu schneiden, so dass die pre-miRNA entsteht. Diese pre-miRNA wird über einen Exportin-5/RanGTP-Komplex aus dem Zellkern in das Zytoplasma befördert, wo sie durch die RNase III-Endonuklease Dicer weiterverarbeitet wird. In diesem

Schritt wird die Haarnadelschleife entfernt, wodurch ein reifes, doppelsträngiges miRNA-Duplex entsteht. Das reife miRNA-Duplex wird anschließend ATP-abhängig in ein Protein der Argonaute-(AGO)-Familie eingebaut. Dabei wird in der Regel der Strang mit der geringeren thermodynamischen Stabilität am 5'-Ende als Leitsequenz in das AGO-Protein geladen, während der gegenüberliegende Passagierstrang ebenfalls durch AGO gespalten und anschließend durch zelluläre Mechanismen abgebaut wird. Im nicht-kanonischen Biogeneseweg existieren verschiedene alternative Mechanismen, die sich in ihrem Verlauf und der Beteiligung der genannten Enzyme unterscheiden. In einem dieser Wege entstehen miRNAs ebenfalls aus pre-miRNAs, welche jedoch unabhängig von Drosha gebildet werden. Diese pre-miRNAs werden direkt über Exportin in das Zytoplasma exportiert, ohne zuvor durch Drosha prozessiert worden zu sein. Charakteristisch für diesen Weg ist, dass die pre-miRNAs eine 7-Methylguanosin-Kappe tragen, die die Beladung des 5p-Strangs in das AGO-Protein verhindert, sodass bevorzugt der 3p-Strang als Leitsequenz fungiert.<sup>15</sup>

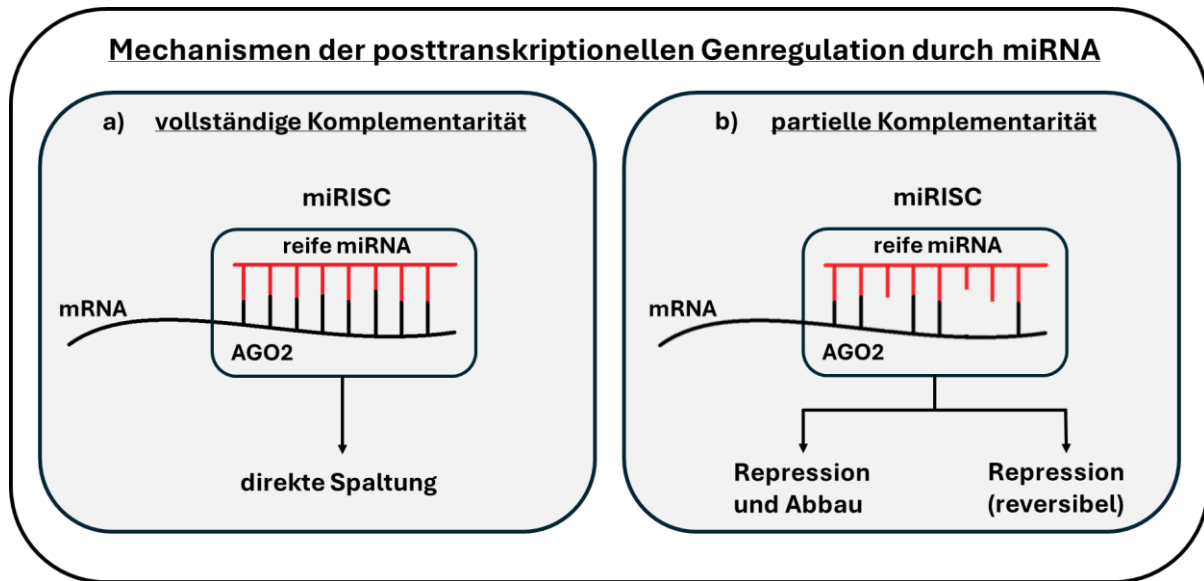


**Abbildung 1: Die Biogenese von microRNAs (miRNAs) in eukaryotischen Zellen.**

Im Zellkern wird die primäre miRNA (pri-miRNA) durch RNA-Polymerase II oder III (RNA-Pol II / III) transkribiert und anschließend durch den Microprocessor-Komplex aus Drosha und DGCR8 zu einer haarnadelförmigen Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Diese wird durch Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert, wo Dicer den miRNA-Duplex erzeugt. Nach Abbau des Passagierstrangs wird

der Leitstrang in den miRNA-induzierten Silencing-Komplex (miRISC) eingebaut, der Ziel-mRNAs über Basenpaarung reguliert.

Die miRNA-vermittelte Hemmung der Translation von mRNAs kann über verschiedene Mechanismen erfolgen und ist abhängig von der Lokalisation und der Art der Bindung zwischen der miRNA und ihrer Ziel-mRNA. Bei der Bindung an die 3'-UTR der mRNA wird in der Regel die Translation unterdrückt, was durch die Rekrutierung von Deadenylierungs- und Decapping-Komplexen ermöglicht wird. In der weiteren Folge kann die mRNA in einem 5'-3'-gerichteten Abbauprozess durch die Exoribonuklease XRN1 degradiert werden. Im Gegensatz dazu führt die Bindung von miRNAs an die 5'-UTR der Ziel-mRNA in der Regel nicht zum Abbau, sondern lediglich zu einer Repression der Translation, wobei die Stabilität der mRNA zunächst erhalten bleibt.<sup>15</sup> Für die inhibitorische Wirkung der miRNAs ist der sogenannte miRNA-induced silencing complex (miRISC) verantwortlich. Dieser Komplex besteht im Wesentlichen aus dem Leitstrang und einem Argonaute-Protein, meist AGO2. Die miRNA Response Elements (MREs) auf der Ziel-mRNA vermitteln die spezifische Bindung der miRNA und bestimmen durch ihren Komplementaritätsgrad den Mechanismus der Genregulation. Eine vollständige Komplementarität zwischen der miRNA und ihrem Ziel führt zur Aktivierung der endonukleolytischen Aktivität von AGO2 und damit zur direkten Spaltung der mRNA. In den meisten Fällen liegt jedoch lediglich eine partielle Komplementarität vor, so dass eine einzelne miRNA hunderte von Ziel-mRNAs regulieren kann.<sup>22</sup> Hierbei führt die partielle Interferenz zur Translationshemmung, die mit der Zeit in einen langsamen Abbau der mRNA führen kann. In diesem Fall rekrutiert der miRISC-Komplex Proteine der GW182-Familie, welche als Gerüst für die Anlagerung weiterer Effektoren dienen, darunter die Deadenylase-Komplexe. Der Poly(A)-Schwanz wird abgespalten und somit wird die mRNA destabilisiert, woraufhin das Decapping durch DCP2 erfolgt und der 5'-3'-gerichtete Abbau durch XRN1 ermöglicht wird.<sup>15</sup> Neben ihrer Funktion als zytoplasmatische Repressoren, wirken miRNAs auch im Zellkern, indem sie durch Bindung an Promotorregionen die Transkription aktivieren können.<sup>23</sup>



**Abbildung 2: Post-transkriptionelle Genregulation durch miRNAs.**

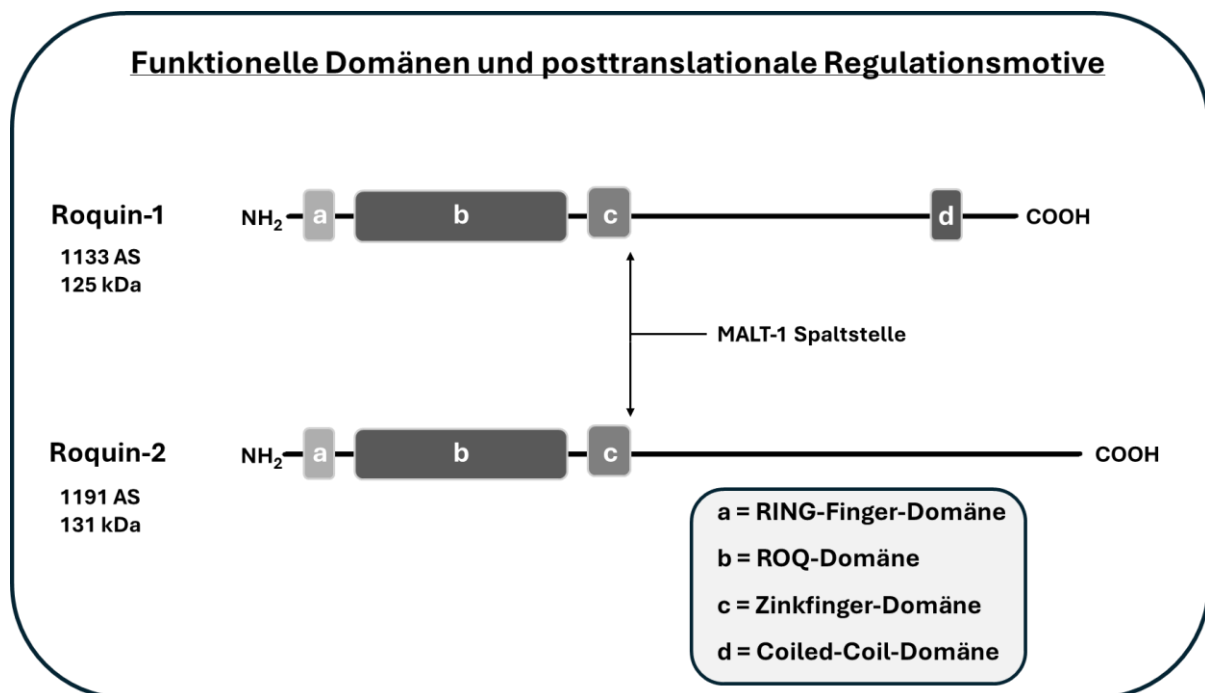
Bei vollständiger Basenpaarung führt der miRISC-Komplex über die Slicer-Aktivität von AGO2 zu einer endonukleolytischen Spaltung der mRNA. Bei partieller Komplementarität kann die Translation gehemmt werden, gefolgt von einem mRNA-Abbau durch Deadenylierung und Decapping. In manchen Fällen bleibt die mRNA stabil, während ihre Translation reversibel unterdrückt wird.

### 1.3 Struktur, Funktion und regulatorische Bedeutung von Roquin im reperfundierten Myokard

Wie in den ersten beiden Kapiteln dargestellt, ist das infarktbedingte Remodeling ein komplexer, molekular gesteuerter Prozess, der wesentlich zur Erhaltung der Struktur und Funktion des geschädigten Myokards beiträgt. miRNAs modulieren gezielt Signalwege, die entscheidend an der Reorganisation des Gewebes, der Angiogenese und der Bildung von Ersatzstrukturen beteiligt sind. Zur Vermeidung einer überschießenden Aktivierung oder Hemmung dieser Signalwege ist eine fein abgestimmte Regulation der Aktivität von miRNAs erforderlich. Im Immunsystem wurde das RNA-bindende Protein Roquin identifiziert, das die Aktivität zellulärer Signalwege beeinflusst, indem es in die miRNA-vermittelte Genregulation eingreift.<sup>24</sup> Perspektivisch könnte Roquin somit eine Schlüsselrolle in der übergeordneten Regulation des miRNA-gesteuerten Remodelings des reperfundierten Myokards einnehmen.

In seiner Funktion als RNA-bindendes Protein (RBP) spielt Roquin eine zentrale Rolle in der post-transkriptionellen Genregulation. Es existieren zwei hochkonservierte Isoformen,

Roquin-1 und Roquin-2, die von den Genen *RC3H1* bzw. *RC3H2* codiert werden und eine Sequenzhomologie von etwa 80 % aufweisen.<sup>25</sup> Beide Isoformen lokalisieren sich in zytoplasmatischen P-Körpern und Stressgranula. Strukturell bestehen Roquin-Proteine aus mehreren funktionellen Domänen. Der N-terminale Bereich enthält eine RING-Finger-Domäne, die als E3-Ubiquitin-Ligase fungiert und Proteine unabhängig von der RNA-Regulation ubiquitinieren kann. Es folgen zwei RNA-bindende Domänen: die ROQ-Domäne, die spezifisch für Roquin-Proteine ist und eine C3H1-Zinkfingerdomäne.<sup>26</sup> Während die ROQ-Domäne Stammschleifenmotive (Stem-Loops) erkennt, bindet der Zinkfinger vor allem AU-reiche Sequenzmotive und stabilisiert damit die Interaktion mit der Ziel-mRNA.<sup>27</sup> Die Coiled-Coil-Domäne von Roquin-1 befindet sich im C-terminalen Bereich und dient zur Dimerisierung, um die Interaktion mit anderen Proteinen zu fördern. Dieser Bereich unterscheidet sich vom C-terminalen Abschnitt von Roquin-2, der anstelle einer Coiled-Coil-Domäne lediglich eine hydrophobe Sequenz enthält.<sup>28,29</sup>



**Abbildung 3: Domänenstruktur und proteolytische Regulation von Roquin-1 und Roquin-2.**

Roquin-1 (1133 Aminosäuren, ca. 125 kDa) und Roquin-2 (1191 Aminosäuren, ca. 131 kDa) besitzen einen vergleichbaren modularen Aufbau mit konservierten funktionellen Domänen. Beide Proteine enthalten N-terminal eine (a) RING-Domäne, gefolgt von einer (b) ROQ-Domäne und einer (c) Zinkfingerdomäne. Direkt C-terminal der Zinkfingerdomäne befindet sich bei beiden die MALT1-

Spaltstelle, über die beide Isoformen proteolytisch reguliert werden. Nur Roquin-1 trägt zusätzlich eine (d) Coiled-Coil-Domäne im C-terminalen Abschnitt.

Bei der Regulation der mRNA-Stabilität bindet Roquin an cis-wirkende Strukturelemente in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der Ziel-mRNAs, insbesondere an Constitutive Decay Elements (CDEs) oder Alternative Decay Elements (ADEs). Nach erfolgreicher RNA-Erkennung rekrutiert Roquin über seine C-terminale prolinreiche Domäne den CCR4-NOT-Komplex, der den Poly(A)-Schwanz der mRNA entfernt (Deadenylierung). Daraufhin erfolgt das Decapping durch die Enzyme DCP1/DCP2, wodurch die mRNA am 5'-Ende für die Exonuklease XRN1 zugänglich wird und schrittweise vom 5'-Ende her abgebaut werden kann.<sup>30</sup> Neben Roquin gehören auch weitere RBPs wie die endonukleolytisch aktive RNase Regnase-1 zu zentralen post-transkriptionellen Regulatoren der Genexpression. In der Immunologie wurde gezeigt, dass Roquin und Regnase-1 kooperativ wirken können, um die mRNA-Homöostase gemeinsam zu regulieren. Roquin hemmt die Translation spezifischer Ziel-mRNAs durch Bindung an strukturierte Elemente in der 3'-UTR, während Regnase-1 diese Ziel-mRNAs direkt durch einen endonukleolytischen Schnitt abbaut. Untersuchungen in anderen Zelltypen legen jedoch nahe, dass beide RBPs auch unabhängig voneinander funktionell aktiv sein können.<sup>31</sup>

Neben der Regulation von mRNAs wurde im Jahr 2015 erstmals nachgewiesen, dass Roquin auch direkt mit miRNAs interagiert. Es konnte gezeigt werden, dass Roquin an die reife Form von miR-146a sowie an AGO2 bindet. Diese Interaktionen führen nicht nur zur funktionellen Hemmung der miRNA, sondern auch zur Blockade der Dicer-vermittelten Prozessierung der entsprechenden pre-miRNA. Roquin ist somit in der Lage die post-transkriptionelle Homöostase sowohl von mRNAs als auch von miRNAs zu beeinflussen.<sup>32</sup> Im Bereich der Immunologie findet sich ein weiteres Beispiel dafür, wie Roquin auf post-transkriptioneller Ebene auch indirekt an der Regulation von miRNAs beteiligt ist. In der Studie von Essig et al. (2017) konnte gezeigt werden, dass Roquin den PI3K-mTOR Signalweg hemmt, der eine entscheidende Rolle bei der Proteinbiosynthese sowie der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen spielt. Ein wichtiger Antagonist des PI3K-Signalwegs ist die Phosphatase PTEN, welche Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) zu PIP<sub>2</sub> dephosphoryliert und somit die Aktivierung des pro-proliferativen AKT-Signalwegs unterdrückt. PTEN selbst unterliegt einer post-transkriptionalen Regulation durch das miR-17~92-Cluster, dass seine Expression durch

mRNA-Interferenz hemmt. Roquin bindet in diesem Zusammenhang an ein überlappendes cis-regulatorisches Element in der 3'-UTR der PTEN-mRNA und verhindert dadurch die Interaktion des miR-17~92-Clusters mit der Ziel-mRNA. Auf diese Weise schützt Roquin die PTEN-mRNA vor translationaler Repression und ermöglicht eine ausreichende Proteinexpression zur Hemmung des AKT-Signalwegs. Die gezielte, tamoxifen-induzierte Deletion von Roquin in regulatorischen T-Zellen (Tregs) in der Maus führte zu einem erhöhten Spiegel des miR-17~92-Clusters. Dadurch wurde die PTEN-mRNA verstärkt durch die miRNAs reprimiert, was eine verringerte PTEN-Proteinexpression zur Folge hatte. Somit konnte sich PIP<sub>3</sub> anreichern und den AKT-Signalweg durch Phosphorylierung aktivieren.<sup>24</sup> Zusammenfassend weisen aktuelle Befunde darauf hin, dass Roquin sowohl direkt als auch indirekt in die Regulation von miRNAs involviert ist. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser Interaktionen sind bislang jedoch nur unvollständig verstanden.

Die Aktivität von Roquin selbst wird durch die proteolytisch aktive Paracaspase MALT1 negativ reguliert. MALT1 vermittelt die Spaltung von Roquin C-terminal des Zinkfingers und führt so zu dessen funktioneller Inaktivierung. Darüber hinaus spaltet MALT1 auch Regnase-1, was auf eine koordinierte Regulation und eine funktionelle Verbindung beider RNA-regulatorischer Proteine hinweist. Zusätzlich zu dieser posttranslationalen Kontrolle durch MALT1 legen strukturelle Daten nahe, dass Roquin auch autoregulatorisch wirken kann. Die Kristallstruktur der ROQ-Domäne von Roquin-2 im Komplex mit Ziel-RNA zeigt eine potenzielle Bindung an cis-regulatorische Elemente in der eigenen mRNA, was auf eine selbstregulierende Kontrolle der Roquin-Expression hindeutet.<sup>33</sup> Darüber hinaus weisen aktuelle Forschungsergebnisse darauf hin, dass ischämische Ereignisse die Expression von Roquin direkt beeinflussen können. *In vivo*, am I/R-Maus-Modell der Leber, konnte in Abhängigkeit der Ischämiedauer sowohl eine reduzierte als auch eine gesteigerte Expression nachgewiesen werden.<sup>34</sup>

### 1.4 Arbeitshypothesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des RNA-bindenden Proteins Roquin auf das Remodeling des reperfundierten Myokards untersucht. Roquin ist primär aus der Immunologie als molekularer Schalter der miRNA-Homöostase und post-transkriptionellen Genexpression bekannt. Dabei greift Roquin in die miRNA-vermittelte Kontrolle zellulärer

Signalwege ein, die für Anpassungsprozesse unter Stressbedingungen relevant sind. Diese Signalwege spielen ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Aktivierung kardioprotektiver Mechanismen, insbesondere im Kontext myokardialer Schädigungen. Die funktionelle Verknüpfung von Roquin mit kardiovaskulären Krankheitsprozessen könnte vor diesem Hintergrund neue Perspektiven für die Erforschung molekularer Schutzmechanismen eröffnen. Auf Grundlage der dargestellten Zusammenhänge lassen sich die folgenden Hypothesen formulieren.

- 1) Die beiden Roquin-Isoformen (Roquin-1/*RC3H1* und Roquin-2/*RC3H2*) werden sowohl in myozytären und nicht-myozytären Zellen des Rattenmyokards als auch in humanen Kardiomyozyten ventrikulären Ursprungs (AC16-Zelllinie) exprimiert.

Diese Hypothese dient der grundlegenden Lokalisation von Roquin in kardialem Gewebe und der Evaluierung seiner potenziell zelltypspezifischen Funktionen.

- 2) In seiner Expression durch hypoxische Ereignisse beeinflusst, spielt Roquin eine aktive Rolle im miRNA-gesteuerten Remodeling des reperfundierten Myokards.

Dabei wird angenommen, dass postischämisch aktivierte inflammatorische, pro-fibrotische oder metabolische Signalwege von einer veränderten Roquin Expression beeinflusst werden.

- 3) Roquin reguliert über seinen Einfluss auf die miRNA-Homöostase Schlüsselmoleküle kardioprotektiver Signalwege.

Potenzielle miRNAs, die von Roquin destabilisiert werden, lassen sich über eine integrative microRNA-und-mRNA Analyse (MMIA) identifizieren. Normoxe und postischämische Proben werden auf diese miRNAs hin untersucht und über die TargetScan8.0 mit entsprechenden kardioprotektiven Kinasen abgeglichen. Kinasen, die bei TargetScan einen hohen Score aufweisen, werden im Anschluss mittels Real-Time RT-PCR und Western Blot auf ihre Expression und Phosphorylierung hin untersucht. Die Validierung erfolgt über einen siRNA-basierten Knockdown von Roquin-1 bzw. Roquin-2, gefolgt von einer quantitativen Analyse der Expression zuvor identifizierter miRNAs und Kinasen.

### 1.5 Zielsetzung

In der geplanten Studie werden erstmalig die kardialen Effekte des RNA-bindenden Proteins Roquin auf molekulare und zellphysiologische Parameter am intakten Nagetierorgan *in vivo*, an isoliert perfundierten Herzen *ex vivo* sowie an kardialen Zellen der Ratte und des Menschen (AC16-Kardiomyozyten) untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, Roquin als molekularen Schalter miRNA-abhängiger Anpassungsprozesse des reperfundierten Myokards zu charakterisieren, um daraus mögliche therapeutische Strategien für die Behandlung der postinfarktbedingten Herzinsuffizienz abzuleiten.

## 2. Material

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Reagenzien, die für die Durchführung der experimentellen Untersuchungen erforderlich waren.

### 2.1 Chemikalien

| Name                                  | Bezugsquelle                              |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|
| Antibiotic Antimycotic Solution, 100X | Corning, Arizona (US)                     |
| <i>Aqua bidest.</i>                   | B. Braun, Melsungen                       |
| Bovines Serumalbumin (BSA)            | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe        |
| Carbogen                              | Praxair Deutschland GmbH, Düsseldorf      |
| Cell Lysis Buffer 10x                 | Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M. |
| Chloroform                            | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe        |
| dATP solution                         | Invitrogen, Darmstadt                     |
| dCTP solution                         | Invitrogen, Darmstadt                     |
| dGTP solution                         | Invitrogen, Darmstadt                     |
| DMEM/F12 mit 16 mM HEPES              | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                |

| <b>Name</b>                                                                              | <b>Bezugsquelle</b>                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| DMSO, ACS-Reagenz                                                                        | Thermo Fisher Scientific, Schwerte                    |
| DPBS                                                                                     | Bio&Sell GmbH, Feucht/Nürnberg                        |
| DTT (Dithiothreitol)                                                                     | Invitrogen, Darmstadt                                 |
| dTTP solution                                                                            | Invitrogen, Darmstadt                                 |
| Ethanol                                                                                  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |
| Ethanol absolut                                                                          | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                            |
| FBS                                                                                      | Corning, Arizona (US)                                 |
| FS-Puffer 5x                                                                             | Invitrogen, Darmstadt                                 |
| Gasgemisch für die Hypoxiekammer<br>(94,9% N, 5% CO <sub>2</sub> , 0,1% O <sub>2</sub> ) | NIPPON GASES, Hürth                                   |
| Glucose-Monohydrat D+                                                                    | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |
| HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure)                            | Roche, Mannheim                                       |
| Hoechst 33342                                                                            | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                            |
| iQ SYBR® Green Supermix                                                                  | Bio-Rad, München                                      |
| Isofluran                                                                                | Abbvie, Wiesbaden                                     |
| Isopropanol                                                                              | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |
| Kaliumchlorid (KCl)                                                                      | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                              | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |
| Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )                                                      | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |
| Kollagenase Typ 2                                                                        | Worthington Biochemical Cooperation,<br>Lakewood (US) |
| Laemmli 2x Concentrate Sample Buffer                                                     | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                            |
| L-Glutamine 200 mM                                                                       | PAN Biotech GmbH, Aidenbach                           |
| Lipofectamine RNAiMAX Transfection<br>Reagent                                            | Thermo Fisher Scientific, Schwerte                    |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x<br>7 H <sub>2</sub> O)                  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |
| Methanol                                                                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |

| <b>Name</b>                                      | <b>Bezugsquelle</b>                        |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| microScript microRNA cDNA Synthesis Kit          | NORGEN Biotek, Canada                      |
| mirVana miRNA Inhibitor, hsa-135a-5p             | Thermo Fisher Scientific, Schwerte         |
| mirVana miRNA Inhibitor, let-7c positive control | Thermo Fisher Scientific, Schwerte         |
| MitoTracker Dyes for Mitochondria Labeling       | Invitrogen, Darmstadt                      |
| M-MLV-Rt                                         | Invitrogen, Darmstadt                      |
| Natriumchlorid (0,9%)                            | B. Braun, Melsungen                        |
| Natriumchlorid (NaCl)                            | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe         |
| NuPAGE Antioxidant                               | Invitrogen, Darmstadt                      |
| NuPAGE Transferpuffer 20x                        | Invitrogen, Darmstadt                      |
| Oligo dt                                         | Roche, Mannheim                            |
| OPTI-MEM Reduced Serum Medium                    | gibco by life technologies, United Kingdom |
| pCMV6-Entry Mammalian Expression Vector          | OriGene Technologies, Maryland (US)        |
| PI3K-Inhibitor, Ly294002                         | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                 |
| Pierce BCA Protein Assay Kit                     | Thermo Fisher Scientific, Schwerte         |
| Pierce Rinderserumalbumin Standards              | Thermo Fisher Scientific, Schwerte         |
| PMSF(Phenylmethylsulfonylfluorid)                | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe          |
| Propidiumiodid                                   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe         |
| RNAasin Plus (RNase Inhibitor)                   | Promega, Mannheim                          |
| siRNA All stars negative control                 | QIAGEN, Niederlande                        |
| siRNA-RC3H1 (HS_KIAA2025)                        | QIAGEN, Niederlande                        |
| siRNA-RC3H2 (HS_MNAB)                            | QIAGEN, Niederlande                        |
| Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder    | Thermo Fisher Scientific, Schwerte         |
| Stickstoff flüssig                               | Linde GmbH, München                        |

| Name                                                      | Bezugsquelle                                 |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Super Signal West Pico PLUS<br>Chemiluminiscent Substrate | Thermo Fisher Scientific, Schwerte           |
| TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) 20x                  | AppliChem, Darmstadt                         |
| TRItidy G                                                 | AppliChem GmbH                               |
| TrypLE Express / Trypsin                                  | Gibco, Thermo Fisher Scientific,<br>Schwerte |
| TurboFectin 8.0 Transfection Reagent                      | OriGene Technologies, Maryland (US)          |
| Tween20                                                   | AppliChem, Darmstadt                         |

## 2.2 Medien, Pufferlösungen & spezifische Nachweissysteme

### • Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)

|                         |        |            |
|-------------------------|--------|------------|
| - <i>Aqua bidest.</i>   | 120 µl | B. Braun   |
| - dATP solution (100mM) | 20 µl  | Invitrogen |
| - dCTP solution (100mM) | 20 µl  | Invitrogen |
| - dGTP solution (100mM) | 20 µl  | Invitrogen |
| - dTTP solution (100mM) | 20 µl  | Invitrogen |

### • Laufpuffer (1 l)

|                                  |        |            |
|----------------------------------|--------|------------|
| - <i>Aqua bidest.</i>            | 950 µl | B. Braun   |
| - MOPS SDS Running Buffer<br>20x | 50 ml  | Invitrogen |

### • Lysispuffer für Zell-Lysate (1 ml)

|                         |        |                |
|-------------------------|--------|----------------|
| - <i>Aqua bidest.</i>   | 900 µl | B. Braun       |
| - Cell Lysis Buffer 10x | 100 µl | Cell Signaling |
| - PMSF (0,1 M)          | 10 µl  | Carl Roth GmbH |

### • PCR Mastermix je Probe

|                       |        |          |
|-----------------------|--------|----------|
| - <i>Aqua bidest.</i> | 6,4 µl | B. Braun |
|-----------------------|--------|----------|

|                          |        |            |
|--------------------------|--------|------------|
| - iQ SYBR green supermix | 10 µl  | BioRad     |
| - Primer (10 µMol)       | 0,6 µl | Invitrogen |

• **Powell-Medium (10 l)**

|                                                   |        |             |
|---------------------------------------------------|--------|-------------|
| -Glucose-Monohydrat D+<br>(10 mM)                 | 19,8 g | Roth, Merck |
| - HEPES (25 mM)                                   | 59,6 g | Roche       |
| - KCl (2,5 mM)                                    | 1,9 g  | Roth, Merck |
| - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,2 mM)        | 1,6 g  | Roth, Merck |
| - MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (1,2 mM) | 3 g    | Roth, Merck |
| - NaCl (110 mM)                                   | 64,3 g | Roth, Merck |

• **Reaktionsgemisch cDNA-Synthese je Probe**

|                        |        |            |
|------------------------|--------|------------|
| - 5x FS-Puffer         | 2 µl   | Invitrogen |
| - dNTP's (10 mMol/l)   | 1 µl   | Invitrogen |
| - DTT (0,1 mol/l)      | 0,5 µl | Invitrogen |
| - M-MLV-Rt (200 U/µl)  | 0,3 µl | Invitrogen |
| - Oligo dt (0,1 mg/ml) | 1 µl   | Roche      |
| - RNAsin (25 U/µl)     | 0,2 µl | Promega    |

• **Reaktionsgemisch microRNA cDNA-Synthese je Probe**

|                                      |       |               |
|--------------------------------------|-------|---------------|
| - microScript microRNA<br>Enzyme Mix | 1 µl  | NORGEN BioTek |
| - Reaction Mix 2x                    | 10 µl | NORGEN BioTek |
| - RNA-Material (1 µg/µl)             | 9 µl  | NORGEN BioTek |

• **Transferpuffer (0,5 l)**

|                             |        |                         |
|-----------------------------|--------|-------------------------|
| - Aqua bidest.              | 375 ml | B. Braun                |
| - Methanol                  | 100 ml | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| - NuPAGE Anioxidant         | 500 µl | Invitrogen              |
| - NuPAGE Transferpuffer 20x | 25 ml  | Invitrogen              |

• **Zellkulturmedium (250 ml)**

|                            |           |                     |
|----------------------------|-----------|---------------------|
| - Antibiotika/Antimykotika | 2,5 ml    | Corning             |
| - DMEM/F12 + HEPES         | 213,75 ml | Sigma-Aldrich       |
| - FBS                      | 31,25 ml  | PAA by GEHealthcare |
| - L-Glutamin               | 2,5 ml    | PAN Biotech GmbH    |

**2.3 Verbrauchsmaterialien**

| <b>Name</b>                                         | <b>Bezugsquelle</b>                 |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Blotting Papier 703                                 | VWR, Darmstadt                      |
| Cellstar Pipetten (5ml, 10 ml)                      | Greiner bio-one, Kremsmünster       |
| Cellview Zellkulturschale mit Glasboden<br>35 mm    | Greiner Bio-One, Frickenhausen      |
| Edelstahlklingen                                    | Wilkinson Sword GmbH, Solingen      |
| Einmalschälchen, blau                               | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe  |
| Falcon Zentrifugenröhrchen mit rundem<br>Boden      | Thermo Scientific, Schwerte         |
| Injektionsspritze (10 ml)                           | B. Braun, Melsungen                 |
| Keramikkügelchen                                    | peqlab, Erlangen                    |
| Leinen-Operationszwirn Et.Nr. 40,<br>unsteril       | Gruschwitz, Neu-Ulm                 |
| Microplatte, 96 Well, PS, U-Boden,<br>transparent   | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Mikro-Schraubröhre, 2ml                             | Sarstedt, Nümbrecht                 |
| Nitrocellulose-Membran 0,2 µm                       | Cytiva, Massachusets (USA)          |
| NuPAGE 10 %, Bis-Tris-Gel (10 well, 15<br>well)     | Invitrogen, Darmstadt               |
| NuPAGE 4-12 %, Bis-Tris-Gel (10 well, 15<br>well)   | Invitrogen, Darmstadt               |
| Nylongaze Polyamid monofil<br>(Maschenweite 200 µM) | Neolab, Berlin                      |

| <b>Name</b>                                      | <b>Bezugsquelle</b>                      |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Parafilm                                         | Pechiney Plastic Packaging, Chicago (US) |
| Pasteurpipetten Plastibrand                      | Brand, Wertheim                          |
| Pasteurpipetten, Glas                            | Avantor ScienceCentral VWR, Darmstadt    |
| PCR-8er-Ketten- und Verschlüsse<br>(transparent) | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht          |
| Pipettenspitzen                                  | Eppendorf, Hamburg                       |
| Precellys-Röhrchen                               | Sarstedt, Nümbrecht                      |
| Reagiergefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)            | Sarstedt, Nümbrecht                      |
| Silikonschläuche MZ Anlage                       | Avantor ScienceCentral VWR, Darmstadt    |
| Skalpell Nr. 21                                  | Feather, Köln                            |
| Sterile Pipettenspitzen mit Filter               | Eppendorf, Hamburg                       |
| Zellkulturschalen Falcon 35 mm, 100 mm           | BD Biosciences, Heidelberg               |
| Zellschaber (Medium: 1,7 cm)                     | Sarstedt, Nümbrecht                      |

## 2.4 Geräte

| <b>Name</b>                            | <b>Bezugsquelle</b>                   |
|----------------------------------------|---------------------------------------|
| Absorptionsmessgerät                   | Infinite M200, Tecan Deutschland GmbH |
| Allegra 21 Centrifuge                  | Beckmann Coulter, Krefeld             |
| Allegra 25R centrifuge                 | Beckmann Coulter, Krefeld             |
| Aqualine AL 18 Wasserbad               | Lauda, Lauda-Königshofen              |
| Bauchdeckenschere gebogen,             | Aeskulap, Tuttlingen                  |
| Bauchdeckenschere gebogen, 160 mm      | Aeskulap, Tuttlingen                  |
| Bechergläser                           | Ilmabor TGI, Ilmenau                  |
| Brutschrank BBD 6220                   | Thermo Scientific, Schwerte           |
| Büchnertrichter                        | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe     |
| CFX detection system                   | Bio-Rad, München                      |
| ChemiDoc 5000                          | peglab, Erlangen                      |
| Economic nofrost -20 °C Gefrierschrank | Bosch, Gerlingen                      |

| <b>Name</b>                                            | <b>Bezugsquelle</b>                                            |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Electrophoresis Power Supply PS 608                    | Life Technologies, Carlsbad (US)                               |
| GibcoBRL                                               |                                                                |
| Entwicklerschalen                                      | Labor Products, Gaithersburg (US)                              |
| Exsikkator                                             | Duran Group, Wertheim                                          |
| Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ-X800                   | Keyence, Neu-Isenburg                                          |
| Gefrierschrank -80 °C                                  | Sanyo, München                                                 |
| Guillotine                                             | Eigenkonstruktion des Physiologischen<br>Instituts, JLU Gießen |
| Hamilton-Pipette 100 µl<br>(Mikroliterspritze Typ 710) | Hamilton Germany GmbH, Gräfelfing                              |
| Heizplatte Dri Block DB-2B                             | Techne, Wertheim-Bestenheid                                    |
| Herasafe Sicherheitswerkbank                           | Thermo Scientific, Schwerte                                    |
| Hypoxie-Kammer                                         | Biospherix Ltd., Lacona (US)                                   |
| Inverses Mikroskop Olympus CKX41SF                     | Olympus Corporation, Tokio (JP)                                |
| Kapselpinzette                                         | Eickenmeyer, Tuttlingen                                        |
| Krokodilklemme                                         | Eickemeyer, Tuttlingen                                         |
| Kühlschrank 4 °C                                       | Bosch, Gerlingen                                               |
| Lauda Proline P8 Umwälzheizbad                         | Lauda, Lauda-Königshofen                                       |
| Mc Ilwain tissue chopper                               | Cavey Laboratory Engeneering Company<br>Limited, Goomshall     |
| Messzylinder                                           | Duran Group, Wertheim                                          |
| MF 26 Flake-Eismaschine                                | Scotman, Zizers (CH)                                           |
| Microfuge 18 Centrifuge                                | Beckmann Coulter, Krefeld                                      |
| Mikroliterzentrifuge Hettich MIKRO 200                 | Andreas Hettich GmbH & Co. KG,<br>Schramberg                   |
| NanoDrop-Spektrophotometrie ND-1000                    | peqlab, Erlangen                                               |
| Perfusionsanlage                                       | Eigenkonstruktion des Physiologischen<br>Instituts, JLU Gießen |
| Peristaltikpumpe                                       | Ismatec, Grevenbroich                                          |
| Pipett boy                                             | Integra Biosciences, Fernwald                                  |

| <b>Name</b>                                     | <b>Bezugsquelle</b>                       |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Pipetten                                        | Eppendorf, Hamburg                        |
| Plattformschüttler                              | Biometra, Göttingen                       |
| Präzisionswaage                                 | Kern & Sohn GmbH, Balingen                |
| Precellys 24 lysis and homogenization           | peglab, Erlangen                          |
| Sauerstoffsensor                                | Biospherix Ltd., Lacona (US)              |
| Sicherheitsabsaugungssystem Vacusafe Comfort    | Integra Biosciences AG, Zizers (CH)       |
| Thermalcycler                                   | Techne, Wertheim-Bestenheid               |
| Thermolyne Locator 8 Plus Cryo Storage Tank     | Thermo Scientific, Schwerte               |
| Uhrglasschälchen                                | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe         |
| UP100H Ultraschallprozessor                     | Hielscher Ultraschall-Technologie, Teltow |
| Vortex Genius 3                                 | IKA, Staufen                              |
| Western Blot Glasplatte                         | Biometra, Göttingen                       |
| Western Blot Roller                             | Novex by life technologies, Carlsbad (US) |
| Western Blot Pads                               | Novex by life technologies, Carlsbad (US) |
| XCell II blot module                            | Novex by life technologies, Carlsbad (US) |
| XCell SureLock mini-cell electrophoresis system | Novex by life technologies, Carlsbad (US) |

### 2.5 Software und Datenbanken

| <b>Name</b>                          | <b>Bezugsquelle</b>                                  |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|
| ChemiCapt 5000                       | Vilber Lourmant Deutschland GmbH, Eberhard-zell      |
| ImageJ                               | National Institute of Health (NIH), Maryland (US)    |
| Microsoft Office 2010 und Office 365 | Microsoft Deutschland GmbH, München                  |
| miRBase                              | <a href="http://www.mirbase.org">www.mirbase.org</a> |

| <b>Name</b>                                         | <b>Bezugsquelle</b>                               |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| National Library of Medicine (NIH),<br>Primerdesign | www.nlm.nih.gov                                   |
| BZ-X800 Analyzer                                    | Keyence, Neu-Isenburg                             |
| BZ-II Analyzer                                      | Keyence, Neu-Isenburg                             |
| RStudio                                             | Statistikprogramm                                 |
| SPSS 23                                             | Statistikprogramm                                 |
| Tecan Magellan Version 6                            | Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim                |
| Microscope VIS2.0 Pro                               | Kern & Sohn GmbH, Balingen                        |
| TargetScan8.0                                       | www.targetscan.org                                |
| ND-100 Version 3.5.1                                | Coleman Technologies, Inc., Newton<br>Square (US) |
| Quantity One Version 4.6.6                          | Bio-Rad, München                                  |
| Bio-Rad CFX Maestro Version 1.1                     | Bio-Rad, München                                  |

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Primärantikörper

| <b>Primärantikörper</b>                    | <b>Verdünnung</b> | <b>Bezugsquelle</b>            |
|--------------------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| AKT (Human, Rat), Rabbit IgG, pAb          | 1:1000            | Cell Signaling, Frankfurt a.M. |
| GAPDH (Human, Rat), Mouse IgG,<br>pAb      | 1:4000            | Calbiochem Merck,<br>Darmstadt |
| pAKT (Human, Rat), Rabbit IgG,<br>mAb      | 1:2000            | Cell Signaling, Frankfurt a.M. |
| Pan-Actin (Human, Rat), Rabbit<br>IgG, pAb | 1:1000            | Cell Signaling, Frankfurt a.M. |
| PI3K-p110 (Human, Rat), Rabbit<br>IgG, pAb | 1:1000            | Cell Signaling, Frankfurt a.M. |
| PI3K-p85 (Human, Rat), Rabbit IgG,<br>pAb  | 1:1000            | Cell Signaling, Frankfurt a.M. |

| Primärantikörper                                                     | Verdünnung | Bezugsquelle                    |
|----------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------|
| PP2A Antibody Sampler Kit (-A, -B, -C) (Human, Rat), Rabbit IgG, mAb | 1:1000     | Cell Signaling, Frankfurt a.M.  |
| pPTEN (Human, Rat), Rabbit IgG, pAb                                  | 1:1000     | Cell Signaling, Frankfurt a.M.  |
| PTEN (Human, Rat), Rabbit IgG, mAb                                   | 1:1000     | Cell Signaling, Frankfurt a.M.  |
| Roquin ½ (Human), Rat IgG, mAb                                       | 1:1000     | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt |

### 2.6.2 Sekundärantikörper

| Sekundärantikörper                   | Verdünnung | Bezugsquelle                                          |
|--------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------|
| Goat-anti-Mouse HRP conjugated, pAb  | 1:2000     | Dako Agilent, Hamburg                                 |
| Goat-Anti-Rabbit HRP conjugated, pAb | 1:2000     | Dako Agilent, Hamburg                                 |
| Goat-Anti-Rat HRP conjugated, pAb    | 1:6000     | Jackon ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire (UK) |

## 2.7 Primer

### 2.7.1 mRNA-Primer

| mRNA-Primer  | Spezies | Annealing-Temperatur | Sequenz (5'-3')                                               |
|--------------|---------|----------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>B2M</i>   | Human   | 59 °C                | TGTCTTTCAGCAAGGACTGGT (for.)<br>ACATGTCTCGATCCCACTTAAC (rev.) |
| <i>B2M</i>   | Ratte   | 65 °C                | GCCGTCGTGCTTGCCATTC (for.)<br>CTGAGGTGGGTGGAAGTGAAGAC (rev.)  |
| <i>HMGA2</i> | Human   | 60 °C                | GCCCTCTCCTAAGAGACCCA (for.)                                   |

| mRNA-Primer   | Spezies | Annealing-Temperatur | Sequenz (5'-3')                                                                            |
|---------------|---------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>HPRT</i>   | Human   | 60 °C                | TTCGGCAGACTCTTGTGAGG (rev.)<br>CCTGGCGTCGTGATTAGTGA (for.)<br>CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT (rev.) |
| <i>HPRT</i>   | Ratte   | 63 °C                | CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT (for.)<br>CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC (rev.)                     |
| <i>RC3H1</i>  | Human   | 59 °C                | GCTTACGAATTGCACCGGAC (for.)<br>TCCCAAGTAGGAGGAGGAGC (rev.)                                 |
| <i>RC3H1</i>  | Ratte   | 59 °C                | GATCCCTGAGCAACAACCCA (for.)<br>TTGGGCGACTCAGAACACTC (rev.)                                 |
| <i>RC3H2</i>  | Human   | 58 °C                | TGAACTTCAGCAGGCCAAGA (for.)<br>AGCATGAAGCCGAAAGGTTC (rev.)                                 |
| <i>RC3H2</i>  | Ratte   | 60 °C                | CTGTCCAGCAGCACCAAAAG (for.)<br>TAATAGACACTGGGCGTGGC (rev.)                                 |
| <i>ZBTB20</i> | Human   | 60 °C                | GACACACACAGGAGTGAGGG (for.)<br>GTAGGACTTCTCTCCCCGGT (rev.)                                 |
| <i>ZBTB20</i> | Ratte   | 60 °C                | CTCCTCTATCGGCACCGAAC (for.)<br>GGAGAGGAGGCACCTGTTTC (rev.)                                 |

### 2.7.2 microRNA-Primer

| microRNA-Primer    | Annealing-Temperatur | Sequenz (5'-3')                                    |
|--------------------|----------------------|----------------------------------------------------|
| <i>miR-135a-5p</i> | 64 °C                | UAUGGCUUUUUUAUCCUAUGUGA                            |
| <i>miR-23b-5p</i>  | 64 °C                | GGGUUCCUGGCAUGCUGAUUU                              |
| <i>SNORD48</i>     | 64 °C                | MystiCq Controlprimer Sigma (keine Sequenz-Angabe) |

## 2.8 Versuchstiere

Für die Isolation von Kardiomyozyten (MZ) und nicht-Kardiomyozyten (NMZ) wurden Herzen adulter, männlicher Wistar-Hannover-Ratten (200-250g) verwendet, die von Janvier Labs (Le

Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen wurden. Die extern durchgeführten *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen erfolgten an weiblichen Wistar-Hannover-Ratten im Alter von drei Monaten (200-250g).

## 2.9 Zelllinie

Die humanen AC16-Kardiomyozyten wurden kommerziell von Merck Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland) erworben und für sämtliche *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt.

## 3. Methoden

### 3.1 *In vitro*-Studien an humanen AC16-Kardiomyozyten

#### 3.1.1 Ansetzen einer Zellkultur aus kryokonservierten AC16-Zellen

Zur Einleitung der Zellkultivierung wurde ein Gesamtvolumen von 250 ml Kulturmedium angesetzt. Hierzu wurden 213,75 ml DMEM/F12 (inkl. HEPES) mit 2,5 ml L-Glutamin, 2,5 ml Antibiotika-Antimykotika-Zusatz sowie 31,25 ml FBS supplementiert. Das Kulturmedium wurde im Wasserbad auf 37 °C temperiert und anschließend unter die Sterilbank gestellt. In drei 100 mm Kulturschalen wurde jeweils 15 ml Kulturmedium pipettiert und in den Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) gestellt. Die eingefrorenen AC16-Zellen wurden auf Sicht im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension entsprach 1 ml und wurde unter Vermeidung von Schaumbildung durch langsames Pipettieren in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Es folgte ein Waschschrift, um das DMSO zu entfernen. Hierfür wurde bei 156 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 600 µl Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl Zellsuspension in die drei vorbereiteten 100 mm Kulturschalen überführt. Durch sternförmiges Schwenken der Kulturschale wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen erreicht. 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel.

#### **3.1.2 Mediumwechsel**

Im Routinebetrieb erfolgte alle 48 h ein Medienwechsel, um eine kontinuierliche Nährstoffversorgung zu gewährleisten und akkumulierte Zelltrümmer sowie apoptotische Zellen zu entfernen.<sup>29</sup> Zunächst wurde das Kulturmedium auf 37 °C temperiert. Unter der Sterilbank wurden die Kulturschalen kreisförmig geschwenkt, damit sich die abgelösten Zellen mittig in der Kulturschale sammelten. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, während gleichzeitig die Kulturschale schräg gehalten wurde. Im Falle einer 100 mm Kulturschale wurden 15 ml frisches Kulturmedium hinzu pipettiert.

#### **3.1.3 Passagieren**

Sobald der Zellrasen eine Konfluenz von 95 % erreicht hat, müssen die adhärenenten Zellen zur Weitervermehrung zunächst vom Boden der Kulturschale abgelöst werden.<sup>35</sup> Dazu wurden sowohl Kulturmedium als auch PBS auf 37 °C vorgewärmt, während das Trypsin auf Raumtemperatur temperiert wurde. Nachdem die Kulturschale geschwenkt worden war, wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. In einem Waschschrift wurden 8 ml PBS hinzugefügt und anschließend wieder abgesaugt. Danach wurden 4 ml Trypsin hinzu pipettiert und für 2 min im Brutschrank inkubiert. Sobald unter dem Mikroskop überprüft wurde, ob sich die Zellen vollständig abgelöst und eine kugelige Morphologie angenommen haben, wurde die Trypsinierung gestoppt, indem die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon mit 15 ml vorgewärmtem Kulturmedium überführt wurde.<sup>36</sup> Die Zellsuspension wurde bei 156 × g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Kulturmedium resuspendiert.

#### **3.1.4 Pharmakologische Behandlung und Transfektion von AC16-Zellen**

Die AC16-Zellen wurden für die Experimente 24 h Stunden zuvor in 35 mm Kulturschalen ausplattiert, sodass die jeweilige Transfektion bei einer Konfluenz von 60-70 % erfolgte.<sup>37</sup> Vor jeder Transfektion wurde 1 h zuvor das Kulturmedium abgesaugt und durch 1 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

#### 3.1.4.1 siRNA-Transfektion

Für die Untersuchung des Einflusses von Roquin auf das Transkriptom und auf die entsprechende Signaltransduktion ist die Herstellung eines Roquin-Knockdowns unerlässlich. Small interfering RNA (siRNA) sind kleine, etwa 22 Nukleotide lange RNA-Moleküle, die mittels komplementärer Nukleotidsequenzen an spezifische mRNA-Abschnitte binden und zu deren Abbau führen.<sup>38</sup>

Hierfür wurden die humanen AC16-Zellen mit siRNA (QIAGEN) und dem Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMAX nach Angaben des Herstellerprotokolls (ThermoFisher) transfiziert.<sup>37</sup> Mit einer siRNA-Endkonzentration von 20 nM pro Kulturschale wurde die Transfektion durchgeführt. Die Effizienz der Transfektion hängt sowohl von der eingesetzten siRNA-Konzentration als auch von der Wahl der Erkennungsstelle der Zielsequenz sowie vom mRNA-Lebenszyklus ab.

Zunächst wurden zwei Komponenten vorpipettiert. Komponente 1 bestand aus 4,5 µl Lipofectamine und 150 µl Opti-MEM, Komponente 2 aus 1,5 µl siRNA für Roquin-1 (HS\_KIAA2025, Quiagen), für Roquin-2 (HS\_MNAB, Quiagen) oder für die Scrambled-Kontrolle (SI03650318, Quiagen). Beide Komponenten wurden vereinigt, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde tröpfchenweise auf die Kulturschale aufgebracht und anschließend bei 37 °C für 24-48 h inkubiert.

#### 3.1.4.2 Plasmid-Transfektion

Eine induzierte Roquin-Überexpression erweitert die Möglichkeiten zur Untersuchung des Einflusses von Roquin auf AC16-Zellen und zum anderen können die Ergebnisse der siRNA-Transfektion überprüft werden.

Eingesetzt wurde der pCMV6-Vektor (ORIGENE) aus dem gramnegativen Bakterium *E.coli*, bei dem es sich um ein ringförmiges, doppelsträngiges DNA-Molekül handelt. In diesem Plasmid bzw. Expressionsvektor befinden sich verschiedene Sequenzabschnitte, die jeweils für den Promotor, den Replikationsursprung, die Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker sowie den Polylinker kodieren, in den die proteinkodierende Sequenz der Isoform *RC3H1* (Roquin-1)

eingefügt ist.<sup>39</sup> Dies ermöglicht eine autonome Replikation der Erbinformation für das Gen *RC3H1*, wodurch sich der mRNA-Spiegel für dieses Gen innerhalb der Zelle erhöht.

Die Experimente wurden mit dem Transfektionssystem der Firma ORIGENE durchgeführt. Um eine optimale Transfektionseffizienz zu gewährleisten, wurde zum Zeitpunkt der Durchführung ebenfalls eine Zellkonfluenz von 60-70 % angestrebt.<sup>40</sup> Die Zusammensetzung des Transfektionsmediums wurde für 35 mm Kulturschalen berechnet.

Zu Beginn wurde 1 µg Plasmid in 250 µl Opti-MEM (ThermoFisher) überführt und kurz gevortext. Danach wurden 4 µl des Transfektionsreagenz Turbofectin 8.0 hinzugefügt und mit der Pipette durchmischt und für 15 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde mittels Pipettierung tropfenweise auf die Zellkultur aufgebracht. Für eine gleichmäßige Verteilung wurde die behandelte Kulturschale in verschiedene Richtungen geschwenkt und anschließend für 24-48 h bei 37 °C inkubiert.

#### **3.1.4.3 Antagomir-Transfektion**

Um den Einfluss von miRNAs auf bestimmte Signalwege zu untersuchen und eine mögliche Korrelation zum Protein Roquin zu identifizieren, wurden die untersuchten miRNAs durch den Einsatz von Antagomirs stummgeschaltet. Hierbei handelt es sich um eine Klasse chemisch hergestellter Oligonukleotide, die komplementär an miRNAs binden, um deren post-transkriptionelle, regulatorische Funktion zu hemmen.<sup>41</sup>

Im Sinne der Vergleichbarkeit wurde für die Antagomir-Transfektion (*mir* Vana miRNA inhibitor, ThermoFisher) sowohl dieselbe Endkonzentration (20 nM) als auch das identische Transfektionsprotokoll verwendet wie für die siRNA-Transfektion.

#### **3.1.5 Hypoxie-Reoxygenierung**

Um die molekularen Prozesse des Ischämie-Reperfusionsschadens *in vitro* zu untersuchen, wurden die Experimente um das Hypoxie-Reoxygenierungsmodell erweitert, da dieses eine etablierte Methode darstellt, um zelluläre Reaktionen auf akuten Sauerstoffmangel und die anschließende Reoxygenierung unter kontrollierten Bedingungen nachzubilden.<sup>42</sup> Die AC16-Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer Hypoxie-Kammer (94,9 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 0,1 %

O<sub>2</sub>) für unterschiedliche Zeiten inkubiert und im Anschluss für eine Stunde im Brutschrank unter normoxischen Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Atmosphäre) reoxygeniert. Gleichzeitig wurden die Kontrollgruppen für denselben Zeitraum im Brutschrank außerhalb der Hypoxie-Kammer inkubiert.

#### **3.1.6 Fluoreszenzbasierte Detektion mitochondrialer Funktion**

Um den Einfluss eines Roquin-Knockdowns auf mitochondrialer Funktionsebene zu untersuchen, wurden AC16 Zellen mit einem MitoTracker™ (Mito Tracker Orange CMTMRos, ThermoFisher) angefärbt. Das mitochondriale Membranpotential (MMP) ist ein Hauptmerkmal für die Vitalität der Mitochondrien. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und Speicherung von Ca<sup>2+</sup> und bei der Synthese von ATP durch oxidative Phosphorylierung.<sup>43</sup> Eine Depolarisation des Membranpotentials ist daher ein geeigneter Indikator für eine mitochondriale Dysfunktion. Der verwendete Farbstoff reichert sich in lebenden Zellen in den Mitochondrien proportional zum mitochondrialen Membranpotenzial an.<sup>44</sup>

Für die Färbung wurden humane AC16-Zellen (35-mm-Schalen) mit 100 nM MitoTracker™ behandelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Färbelösung entfernt. Zur Fixierung wurden die Zellen anschließend mit jeweils 1 ml Paraformaldehyd (4 % in PBS) für 15 min bei Raumtemperatur überschichtet. Im Anschluss wurden die Fixierlösung abgesaugt, die Zellen gewaschen und in frischem PBS belassen. Die visuelle Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, wobei das Signal mit Hilfe eines TRITC-Filters erfasst wurde.

#### **3.1.7 Apoptose- / Nekrose-Assay**

Für die Beurteilung des regulatorischen Einflusses von Roquin auf die Viabilität der AC16-Zellen wurde eine kombinierte Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit Hoechst 33342 (bisBenzimid H 33342, Sigma-Aldrich) und Propidiumiodid (PI, Carl Roth) gefärbt. Hoechst 33342 ist ein DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt an AT-reiche Regionen in der DNA bindet. Dieser Farbstoff kann sowohl in lebende wie auch in abgestorbene Zellen eindringen und ermöglicht eine allgemeine Zellkernfärbung, unabhängig

vom Vitalitätsstatus der Zellen.<sup>46</sup> Ganz im Gegenteil dazu ist Propidiumiodid ein membranundurchlässiger Farbstoff, der nur an DNA interkalierend bindet, wenn sich die Zellen in spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zustand befinden.<sup>47</sup> Der Einsatz beider Farbstoffe ermöglicht somit die Unterscheidung zwischen vitalen und nicht-vitalen Zellen auf Grundlage der Chromatinmorphologie und der Membranintegrität.

Für die Färbung wurde eine Lösung in 5 ml DMEM (ohne Zusätze), bestehend aus jeweils 25 µl PI (2 mg/ml) und 25 µl Hoechst 33342 (1,2 mg/ml), frisch angesetzt. Zuerst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit je 1 ml vorgewärmtem (37 °C) PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurde pro 35 mm Zellkulturschale 1 ml der Färbelösung hinzugefügt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Für die Hoechst-Fluoreszenz wurde bei 360 nm angeregt und bei 460 nm detektiert (DAPI), während bei der PI-Fluoreszenz das Signal unter Verwendung des TRITC-Filters erfasst wurde.

#### **3.1.8 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zelldichte wurde mittels digitaler Bildgebung am inversen Mikroskop (Olympus CKX41SF) durchgeführt. Die anschließende Quantifizierung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung der Software BZ-II Analyzer (Keyence). Anschließend erfolgte eine Normalisierung der Zellzahl der jeweiligen Behandlungsgruppe auf die Zellzahl der unbehandelten Kontrollgruppe.

### **3.2 *In vivo*- und *ex vivo*-Studien am Herzen adulter Ratten**

#### **3.2.1 Isolation von Kardiomyozyten (MZ) und nicht-Kardiomyozyten (NMZ)**

Basierend auf dem Langendorff-Prinzip wurde für die Isolation und Separierung von MZ und NMZ aus adulten Rattenherzen eine eigens entwickelte Perfusionsanlage verwendet.<sup>48</sup> Die Apparatur bestand aus einem doppelwandigen, 1 m langen Glasrohr, welches über Silikonschläuche an einer Rollenpumpe angeschlossen war, die das Perfusionsmedium (Powell-Medium) durch das Innere des Glasrohrs gefördert hat. Gleichzeitig zirkulierte im äußeren Glasmantel Wasser, welches durch das angeschlossene Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt wurde, um das Perfusionsmedium zu temperieren. Insgesamt wurden 80 ml des

Perfusionsmediums luftblasenfrei in das System überführt. Am distalen Ende des Glasrohrs befand sich eine Kanüle, die zur retrograden Perfusion des Herzens über die Aorta diente. Das aus dem Herz austretende Perfusat wurde in einem beweglich gelagerten Auffanggefäß gesammelt und über eine Peristaltikpumpe dem oberen Trichter der Apparatur erneut zugeführt, wodurch sich ein geschlossener Kreislauf ergab. Zur kontinuierlichen Sauerstoffbegasung wurde das Medium im Glastrichter mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Vorbereitend wurden 25 mg Kollagenase Typ 2 (265 U/mg) in 5 ml des Perfusionsmediums unter Zusatz von 12,5 µl einer 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst und im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Der myozytäre und nicht-myozytäre Anteil des Herzens wurde aus adulten, männlichen Wistar-Ratten isoliert. Dafür wurden die Tiere zunächst in einem Exsikkator mit 5 % Isofluran anästhesiert und anschließend durch Dekapitation mittels Guillotine euthanasiert. Die Bauchhöhle wurde zügig eröffnet und das Zwerchfell aufgeschnitten. Anschließend wurden Lunge, Herz und Thymus mithilfe einer Kapselpinzette sowie einer chirurgischen Schere entnommen und in 4 °C kalter 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Lungenflügel, der Thymus sowie das restliche Bindegewebe wurden entfernt, sodass die Aorta vor dem ersten Abgang im Aortenbogen freigelegt werden konnte. Die Aorta wurde mithilfe der Kapselpinzetten über die Kanüle der Perfusionsanlage gestülpt und mittels einer Krokodilklemme sowie chirurgischem Zwirn fixiert. Um verbliebene Blutreste zu entfernen, wurde ein separater Auffangbehälter unter dem Herzen positioniert. Die Koronargefäße wurden zunächst mit 40 ml Perfusionsmedium blutfrei gespült. Hierzu wurde der Zufluss geöffnet, wodurch verbliebene Blutreste vollständig aus dem Gefäßsystem entfernt wurden. Im Anschluss wurde der separate Auffangbehälter entfernt und das bewegliche Auffanggefäß der Apparatur unterhalb des Herzens positioniert, um einen geschlossenen Perfusionskreislauf herzustellen. Der Zufluss wurde anschließend so reguliert, dass eine Flussrate von etwa einem Tropfen pro Sekunde erreicht wurde. Die vorbereitete Kollagenase-Lösung wurde nun dem Medium zugeführt, um den enzymatischen Verdau über 25 min zu starten.

Nach dem enzymatischen Verdau wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Kanüle abgetrennt und auf ein Uhrglas überführt. Die Ventrikel wurden so aufgeschnitten, dass das Gewebe flach auf einer Kunststoffplatte eines Gewebeschneiders (McIlwain Tissue Chopper,

Cavey Laboratory Engineering Company Ltd.) positioniert werden konnte. Die automatische Zerkleinerung erfolgte sowohl horizontal als auch vertikal bei einer Schnittbreite von 0,7 mm. Eine zusätzliche manuelle Zerkleinerung erfolgte anschließend mit zwei Skalpellen. Das fragmentierte Gewebe wurde in ein 50-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt, in dem zuvor 12 ml des kollagenasehaltigen Perfusionsmediums über die Kanüle der Anlage aufgefangen worden waren. Die anschließende Nachverdauung erfolgte für weitere 5 min bei 37 °C im Wasserbad.

Zur Entfernung der groben Gewebereste wurde die Suspension durch eine Nylongaze mit einer Porengröße von 200 µm filtriert. Anschließend erfolgte ein erster Zentrifugationsschritt bei 400 rpm zur Trennung der myozytären und nicht-myozytären Zellen. Der Überstand, der den nicht-myozytären Anteil enthielt, wurde in ein separates Gefäß überführt und für weitere 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Das daraus resultierende Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff konserviert. Das Zellpellet aus dem ersten Zentrifugationsschritt wurde schrittweise rekalkifiziert, um die Zellen an physiologische Kalziumkonzentrationen zu adaptieren. Zu diesem Zweck wurde das Pellet zunächst in 6 ml vorgewärmten Powell-Medium mit 250 µM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und bei 300 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 6 ml Powell-Medium mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt, und die abschließende Zentrifugation erfolgte für 1 min bei 200 rpm. Das resultierende Pellet enthielt nun kalziumresistente MZ, die bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff konserviert wurden.

#### **3.2.2 Integrative microRNA-mRNA Analyse zur Identifikation kardioprotektiver miRNAs**

Als RNA bindendes Molekül kann Roquin u. a. miRNAs binden und destabilisieren. Um potenzielle miRNAs zu identifizieren, die in ihrer Konzentration von Roquin reguliert werden, wurde eine integrative microRNA-und-mRNA Analyse (MMIA) durchgeführt.<sup>49</sup> Die Expressionsdaten wurden mittels RNA-Sequenzierung aus Rattenherzproben generiert, die sieben Tage nach Ischämie/Reperfusion (I/R) bzw. aus einer normoxen Kontrollgruppe entnommen wurden. Darüber hinaus wurde das Expressionsmuster in prä- (IPC) und post-konditionierten (IPoC) Herzen untersucht.<sup>50</sup>

Sowohl das *in vivo*-Modell der kardialen Ischämie-Reperfusion als auch die anschließende Funktionsdiagnostik im Working-Heart-Modell sowie die RNA-Sequenzierung einschließlich der bioinformatischen Auswertung wurden im Rahmen eines kooperativen Forschungsprojekts zum myokardialen Reperfusionsschaden von der Semmelweis Universität Budapest und dem Institut für Pharmakologie der Universität Budapest durchgeführt.

#### **3.2.2.1 *In vivo*-Modell der myokardialen Ischämie/Reperfusion**

Für die chirurgischen Eingriffe wurden weibliche Wistar-Hannover-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 250 g verwendet. Die Narkotisierung erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg Natrium-Pentobarbital (Euthasol, Produlab Pharma b.v., Raamsdonksveer). Nach erfolgreicher Sedierung wurden die Tiere endotracheal intubiert und mit einem mechanischen Beatmungsgerät (Modell 683, Harvard Apparatus, Holliston) unter Verwendung von Raumluft beatmet (Beatmungsvolumen; 6,2 ml/kg; Frequenz: 55 Atemzüge/min). Während der gesamten Operationsdauer wurden die Tiere in Rückenlage auf einer beheizten Unterlage positioniert, um eine konstante Körperkerntemperatur von 37 °C sicherzustellen. Das Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG, Haemosys, Experimetria Inc.) wurde kontinuierlich überwacht. Zur Induktion einer Myokardischämie wurde eine linksthorakale Thorakotomie durchgeführt und die linke anteriore absteigende Koronararterie (LAD) mittels einer 5-0 Prolene-Naht (Ethicon, Johnson & Johnson Kft.) für 45 min okkludiert. Der erfolgreiche Gefäßverschluss wurde durch eine ST-Streckenhebung im EKG sowie durch das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien bestätigt. Nach Ablauf der Ischämie wurde die Okklusion gelöst und die Naht vom Herzen entfernt. Im Anschluss wurde der Thorax schichtweise mit einer 4-0 Monocryl-Naht (Ethicon, Johnson & Johnson Kft.) verschlossen. Zur Schmerzbehandlung erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von 0,3 mg/kg Nalbuphin (Nalbuphin, Orpha, Torrex Chiesi Pharma GmbH). Der Beobachtungszeitraum (Follow-up) nach dem Koronarverschluss betrug sieben Tage.

Die Versuchstiere wurden randomisiert in vier verschiedene Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe bestand aus scheinoperierten Tieren, die dem operativen Verfahren unterzogen wurden, jedoch ohne Verschluss der LAD. Diese Tiere dienten als normoxe Kontrollgruppe (Sham). Die nächste Gruppe diente als ischämische Kontrolle, bei der ein 30-minütiger LAD-

Verschluss durchgeführt wurde (I/R). In der dritten Gruppe wurde eine ischämische Vorkonditionierung (IPC) durchgeführt, bei der die LAD vor dem 30-minütigen Koronarverschluss in einer Abfolge von drei Zyklen jeweils für 3 min verschlossen und anschließend für 5 min reperfundiert wurde. Bei der letzten Gruppe handelte es sich um die ischämische Postkonditionierung (IPoC), bei der am Ende des 30-minütigen LAD-Verschlusses drei Zyklen aus jeweils 10 s Reperfusion und 10 s erneuter Okklusion durchgeführt wurden.<sup>50</sup>

#### **3.2.2.2 Working-Heart-Modell**

Nach den Operationen wurden die Herzen aus den Ratten entnommen und gemäß dem Perfusionsprotokoll des Working-Heart-Modells nach Neely et al. (Neely JR et al., Am. J. Physiol. 1967) für die *ex vivo*-Perfusion vorbereitet.<sup>51,52</sup> Für die Perfusion wurde vortemperierter (37 °C), frisch angesetzter Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer verwendet, welcher kontinuierlich begast wurde (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>). Für den Versuch wurde eine Vorlast von 1,7 kPa und eine Nachlast von 9,8 kPa eingestellt. Um den koronaren Fluss (CF) zu bestimmen, wurde das Perfusat aus dem rechten Vorhof in einem Messzylinder aufgefangen, wohingegen der aortale Fluss (AF) mit einem Rotameter (KDG Flowmeters, Sussex) gemessen wurde. Die Summe aus CF und AF ergab das Herzzeitvolumen (CO). Der linksventrikuläre Druck wurde mit einem Drucktransducer (B. Braun, Melsungen) gemessen, welcher mit einem Polyethylenkatheter verbunden war und durch die linke Vorhofkanüle in den linken Ventrikel eingeführt wurde. Der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) wurde als Differenz zwischen dem systolischen Spitzendruck und dem enddiastolischen Druck (LVEDP) berechnet. Aus der Druckkurve des linken Ventrikels wurde die Herzfrequenz (HR) abgeleitet. Nach einer 20-minütigen Äquilibrationsphase wurden die funktionellen Basalwerte erfasst. Abschließend wurden die myokardialen Gewebeproben mittels Flüssigstickstoff für weitere Analysen konserviert.<sup>50</sup>

#### **3.2.2.3 RNA-Sequenzierung**

Die RNA-Sequenzierung ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung des gesamten Transkriptoms einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt. Hierfür wird die Gesamt-RNA aus

den Gewebeproben isoliert und in cDNA umgeschrieben, um eine Sequenzierbibliothek zu erstellen. Die anschließende Hochdurchsatzsequenzierung erlaubt Rückschlüsse auf die Genexpression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.<sup>53</sup>

Zunächst wurden die linksventrikulären Gewebeproben in 1,5 ml Eppendorf LoBind-Röhrchen überführt, die sowohl Glasperlen (Durchmesser 1,7-2,1 mm, Carl Roth) als auch 500 µl VRX-Puffer (Viogene Biotek) enthielten. Die Proben wurden anschließend mit einem SILAMAT S5-Vibrator (Ivoclar Vivadent) homogenisiert. Die Gesamt-RNA wurde mithilfe des Viogene miTotal RNA Extraction Miniprep System (Viogene Biotek) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem RNA HS Assay Kit unter Verwendung des Qubit 3.0 Fluorometers (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Zur Erstellung der Small RNA-Bibliothek kam das NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set für Illumina (New England Biolabs) zum Einsatz, ebenfalls gemäß dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurden spezifische 3'- und 5'-Adapter an die kleinen RNA-Moleküle ligiert, gefolgt von der reversen Transkription zur cDNA-Synthese und einer PCR-Amplifikation mit indexierten Primern, um mehrere Proben gleichzeitig sequenzieren zu können (Multiplexing). Die finalen Bibliotheken wurden äquimolar gepoolt und auf eine Endkonzentration von 1,8 pM verdünnt. Die Sequenzierung erfolgte mithilfe des 75-cycle High Output v2 Kits (Illumina) im 2 x 43 bp Paired-End-Modus auf dem Illumina NextSeq 500 Sequencing System. Die Rohdaten wurden mit dem Illumina FastQ Toolkit (Version 2.2.0) erfasst und zunächst bereinigt, indem Adaptersequenzen entfernt und nur qualitativ hochwertige Reads mit einer Mindestlänge von 10 Nukleotiden berücksichtigt wurden. Anschließend wurden die bereinigten Sequenzen mit dem Referenzgenom der Ratte (Rnor\_6.0) abgeglichen, um bekannte Gene bzw. miRNAs mithilfe der mirBase-Datenbank zu identifizieren. Abschließend wurde untersucht, ob bestimmte miRNAs in den verschiedenen Versuchsgruppen unterschiedlich exprimiert waren.<sup>54</sup>

### **3.3 RNA-basierte Expressionsanalysen**

Für die Untersuchung der Expression spezifischer Zielgene in Gewebeproben und Zelllysaten wurde die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) durchgeführt. Hierbei wurde die Gesamt-RNA aus den Proben isoliert und durch reverse Transkription in doppelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt, die als Matrize für die PCR-

Amplifikation diene. Dabei erfolgt die Quantifizierung in Echtzeit durch fluoreszenzbasierte Detektion. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge der amplifizierten DNA und ermöglicht so eine direkte und sensitive Bestimmung der Genexpression in den zu untersuchenden Proben.<sup>55</sup>

#### **3.3.1 Isolation von RNA aus Rattenherzgewebe**

Zur Isolierung der RNA wurde die Chomczynski- oder Trizol-Methode herangezogen, bei der ein Reagenz bestehend aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol eingesetzt wurde, um die Zellen zu lysieren, die Proteine zu denaturieren und um RNasen zu inaktivieren.<sup>56</sup> Hierfür wurden eingefrorene Gewebeproben aus Rattenherzen verwendet, die zuvor bei -80 °C gelagert wurden. Unter sterilen Bedingungen erfolgte die Entnahme eines Gewebefragments mittels Skalpell und der unmittelbare Transfer in vorbereitete Precellys-Röhrchen, während das restliche Gewebe zur Vermeidung von Auftauzyklen umgehend zurückgelagert wurde. In jedes Precellys-Röhrchen wurde 1 ml TRIzol/TRItyd G (AppliChem GmbH) hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend mithilfe eines Homogenisators bei 5000 × *g* für 20 Sekunden homogenisiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurden je Probe 200 µl Chloroform zugegeben, für 10 Sekunden mittels Vortexer gemischt und anschließend für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation zur Phasentrennung erfolgte bei 4 °C mit 12500 rpm für 15 Minuten. Aus der oberen, wässrigen Phase wurden vorsichtig 500 µl abpipettiert und mit 500 µl Isopropanol in ein ebenfalls vorbeschriftetes RNA-Röhrchen überführt. Nach kurzem Mischen wurden die Proben bei -20 °C für 1 Stunde auf Eis inkubiert, um die RNA auszufällen. Zur RNA-Pelletierung wurde eine weitere Zentrifugation (15 min, 4 °C, 12500 rpm) durchgeführt. Der Überstand wurde unter dem Abzug in einen geeigneten Phenol-Abfallbehälter entsorgt. Zur Reinigung der Pellets wurden 1 ml 70 %iger Ethanol hinzugefügt, die Proben kurz durchmischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die RNA-Pellets wurden anschließend unter dem Abzug für 1 h luftgetrocknet. Zur Resuspendierung wurden 50 µl *Aqua bidest.* zugegeben, die Proben kurz gemischt und für eine weitere Stunde bei 4 °C auf Eis inkubiert. Die RNA-Proben konnten anschließend entweder bei -80 °C eingelagert oder direkt zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mittels NanoDrop-Spektrophotometrie verwendet werden.

#### 3.3.2 Isolation von RNA aus Zell-Lysaten

Für die RNA-Isolation aus AC16-Zellen wurde zunächst die Pufferlösung PBS bei 37 °C aufgewärmt. Nacheinander wurde jeweils eine 35 mm Zellkulturschale, aus dem Brutschrank entnommen und unter der Sterilbank zweimal mit 2 ml vortemperiertem PBS gewaschen. Unter dem Abzug wurde pro Zellkulturschale 1 ml TRIzol/TRItidy G hinzugefügt. Mit einem sterilen Zellschaber wurde der Zellrasen vom Boden der Zellkulturschale in und gegen Richtung des Uhrzeigersinns abgelöst und in vorbeschriftete Precellys-Röhrchen überführt. Das Zelllysate im Precellys-Röhrchen wurde mit dem Vortexer gut durchmischt und anschließend mit der RNA-Isolation begonnen.

Die RNA-Isolation aus Zelllysaten erfolgte analog zu der RNA-Isolation aus Gewebeproben. Zur Resuspendierung des luftgetrockneten RNA-Pellets wurden pro Probe allerdings nur 12 µl *Aqua bidest.* zugegeben, da die RNA-Ausbeute aus Zelllysaten im Vergleich zu Gewebeproben erfahrungsgemäß deutlich geringer ausfällt. Nach der Resuspendierung wurden die Proben kurz durchmischt und für 1 h bei 4 °C auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben bei -80 °C eingelagert oder direkt für die cDNA-Synthese weitergenutzt.

#### 3.3.3 cDNA-Synthese

Bei der RT-qPCR wurde die Polymerase für die Amplifikation verwendet, welche auf doppelsträngige DNA als Matrize angewiesen ist. Aus diesem Grund musste die einzelsträngige mRNA vor der Amplifikation durch das Enzym Reverse Transkriptase in doppelsträngige cDNA umgeschrieben werden.<sup>57</sup> Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mittels NanoDrop-Spektrophotometer (ND-100, Peqlab) bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Für die anschließende Reverse Transkription wurden die Proben erforderlichenfalls mit *Aqua bidest.* auf eine einheitliche Einsatzmenge von 1 µg RNA (entsprechend einer Konzentration von 1 µg/µl) eingestellt.

Zur Denaturierung wurde die isolierte RNA zunächst für 15 min bei 60 °C im Thermalcycler (Cyclogene thermal cycler, Techne) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des entsprechenden Volumens an Reaktionsgemisch (Zusammensetzung siehe Tab. 1), um die Reverse Transkription zu initiieren.

**Tab. 1: Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese****Zusammensetzung für je eine Probe**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| 5 x FS-Puffer                   | 2 µl   |
| Oligo dt (0,1 mg/ml)            | 1 µl   |
| dNTP's (10 mMol/l je Nukleotid) | 1 µl   |
| DTT (0,1 mol/l)                 | 0,5 µl |
| RNAsin (25 U/µl)                | 0,2 µl |
| M-MLV-Rt (200 U/µl)             | 0,3 µl |

Die Reverse Transkription der mRNA in cDNA erfolgte bei 37 °C für eine Stunde. Danach wurden die Proben 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Im Anschluss wurde die gewonnene cDNA im Verhältnis 1:10 mit *Aqua bidest.* verdünnt und bei -20 °C gelagert.

**3.3.4 microRNA cDNA-Synthese**

Reife miRNAs sind einzelsträngige, kurze RNA-Moleküle (~ 22 Nukleotide), die im Gegensatz zu der mRNA keinen Poly(A)-Schwanz besitzen. Bei der konventionellen cDNA-Synthese kann die Reverse Transkriptase mit einem oligo(dT)-Primer am 3'Ende der mRNA bzw. am Poly(A)-Schwanz binden und die mRNA in cDNA umschreiben. Aus diesem Grund wird bei der Umschreibung im ersten Schritt mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase künstlich ein Poly(A)-Schwanz an die miRNA enzymatisch angehängen, da er als Bindestelle für den oligo(dT)-Primer dient. Im nächsten Schritt bindet der oligo(dT)-Primer, der zusätzlich eine vom Hersteller definierte universelle Adaptersequenz trägt, an den frisch angehängenen Poly(A)-Schwanz. Anschließend beginnt die Reverse Transkription. Das resultierende cDNA-Produkt enthält am 5'-Ende die ursprüngliche miRNA-Sequenz und am 3'-Ende die angehängte Adaptersequenz.<sup>58</sup>

Nach der RNA-Isolation wurde mittels NanoDrop-Spektrophotometrie die RNA-Konzentration bestimmt. Die Proben wurden mit *Aqua bidest.* verdünnt, um in einem Gesamtvolumen von 9 µl eine Endkonzentration von 1 µg/µl zu erhalten. Für die cDNA-Synthese wurde ein „ready-to-use“ microScript microRNA cDNA Synthesis Kit (NORGEN) verwendet. Für jede Probe

wurden auf die vorbereiteten 9 µl RNA-Material (1 µg/µl) 10 µl 2 x Reaction Mix und 1 µl microScript microRNA Enzyme Mix hinzugegeben. Die Proben wurden kurz durchmischt und in den Thermalcycler überführt, um die cDNA mit nachfolgendem Protokoll herzustellen:

**Tab. 2: Reaktionsprotokoll für die microRNA-cDNA-Synthese**

| Temperatur (°C) | Zeit (min) |
|-----------------|------------|
| 37              | 30         |
| 50              | 30         |
| 70              | 15         |

Nach der microRNA-cDNA-Synthese wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit *Aqua bidest.* Verdünnt, gut durchmischt und bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.<sup>59</sup>

### 3.3.5 RT-qPCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ermöglicht die Amplifikation und Quantifizierung eines DNA-Abschnitts. Für das zu untersuchende Zielgen wurden spezifische Primer eingesetzt, die zuvor mit Hilfe des Tools Primer-BLAST der NIH National Library of Medicine entworfen wurden.<sup>60</sup> Die Primer binden an einen spezifischen DNA-Abschnitt und dienen der Taq-Polymerase als Startpunkt für die Amplifikation der Zielsequenz.

SYBR Green ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der während der Amplifikation an die doppelsträngige DNA bindet. Dabei fluoresziert der Farbstoff nur in gebundener Form, sodass die Fluoreszenzintensität proportional zur Produktmenge ansteigt.<sup>61</sup> Übersteigt die Fluoreszenz der PCR-Produkte erstmals die Hintergrundfluoreszenz, wird der sog. zielgenspezifische Ct-Wert registriert. Für die Auswertung der PCR-Daten wurde für jede Probe ein stabil exprimiertes Housekeeping-Gen (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, HPRT) mitgeführt, um den Ct-Wert des Zielgens von dem Ct-Wert des Housekeeping-Gens zu subtrahieren. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach der Methode von Livak und Schmittgen (2001).<sup>62</sup>

Die Proben wurden für jeden Primer in einer Doppelbestimmung von je 3 µl in ein PCR-Reaktionsgefäß (Multiply-µStripPro, Sarstedt) pipettiert. Auf jede Probe wurden 17 µl des

PCR-Master-Mix (Tab. 3) hinzugefügt. Für jeden PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle (PCR-Master-Mix ohne cDNA) mitgeführt. Die vorbereiteten Reaktionsgefäße wurden in den Thermocycler (CFX detection system, Bio-Rad) überführt. Mit dem dazugehörigen Programm (CFX-Maestro) wurde das zuvor vorbereitete Belegungsprotokoll sowie das auf den Primer abgestimmte PCR-Protokoll ausgewählt und die Messung gestartet.

**Tab. 3: Zusammensetzung des PCR-Master-Mix**

**Reaktionsgemisch für eine Probe**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Primer (10 µMol)       | 0,6 µl |
| iQ SYBR green supermix | 10 µl  |
| <i>Aqua bidest.</i>    | 6,4 µl |

**3.3.6 microRNA RT-qPCR**

Die microRNA RT-qPCR läuft nahezu identisch zu der klassischen RT-qPCR, die im Abschnitt zuvor beschrieben wurde. Bei dem Primerdesign wurde nur der microRNA-spezifische Forward-Primer generiert und eingesetzt. Als „Reverse-Primer“ wurde der Universalprimer des Herstellerkits verwendet. Auch hier wurden 3 µl pro Probe in einer Doppelbestimmung in ein PCR-Reaktionsgefäß vorpipettiert. Auf jede Probe wurden 17 µl des PCR-Master-Mix (Tab. 4) hinzugefügt. Auch hier wurde das zuvor vorbereitete Belegungsprotokoll als auch das auf den Primer abgestimmte PCR-Protokoll ausgewählt und die Messung gestartet.

**Tab. 4: Zusammensetzung des microRNA PCR-Master-Mix**

**Reaktionsgemisch für eine Probe**

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Universal PCR Reverse Primer     | 1 µl  |
| microRNA-specific Forward Primer | 1 µl  |
| iQ SYBR green supermix           | 10 µl |
| <i>Aqua bidest.</i>              | 5 µl  |

### 3.4 Proteinbasierte Analysen

Zur Untersuchung potenzieller Roquin-Effekte und zur Validierung der RT-qPCR Daten auf Proteinebene wurde das molekularbiologische Western Blot Verfahren unter Verwendung des NuPAGE-Systems (Thermo Fisher Scientific) angewandt.<sup>63</sup> Dem Grundprinzip nach wurden die Proteine aus dem zu untersuchenden Gewebe- oder Zelllysate isoliert, danach in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-PAGE) und im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, sodass die Proteinbanden mit Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Im Folgenden wird der genaue Ablauf beschrieben.<sup>64</sup>

#### 3.4.1 Vorbereitung der Zell-Lysate

Nach dem jeweiligen experimentellen Ansatz (z.B. Transfektion, Inkubation in der Hypoxiekammer etc.) erfolgte die Zellernte humaner AC16-Kardiomyozyten für den Proteinnachweis. Hierfür wurden zunächst 120 µl Lysispuffer pro 35 mm Kulturschale angesetzt. 1 ml Lysispuffer setzten sich aus 100 µl 10 x Cell Lysis Buffer, 900 µl *Aqua bidest.* sowie 10 µl 0,1 M PMSF zusammen. Die benötigte Menge Lysispuffer wurde zuvor berechnet und 30 min vor der Zellernte frisch angesetzt. Die Zellen wurden mit je 1 ml PBS zweimal gewaschen, um Zell- sowie Mediumreste zu entfernen. Nach dem finalen Waschschrift wurden die Zellen mit jeweils 120 µl Lysispuffer versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber (Medium: 1,7 cm, SARSTEDT) im Uhrzeigersinn sowie in Gegenrichtung abgelöst und in ein vorbeschriftetes 1 ml Precellys-Röhrchen mit Keramikkügelchen überführt. Die Proben wurden kurz gevortext und bis zur Proteinisolation bei -80 °C gelagert.

#### 3.4.2 Vorbereitung der Gewebe-Lysate

Für die Proteinisolation aus tiefgefrorenen Gewebeproben (ventrikuläres Myokard aus der adulten Ratte) wurden 100 µg Gewebe benötigt. Die abgewogene Probe wurde direkt in ein vorbeschriftetes Precellys-Röhrchen mit Keramikkügelchen überführt. Das restliche Gewebe wurde für weitere Untersuchungen bei -80 °C gelagert.

Für die Gewebeproben wurde derselbe Lysispuffer verwendet wie für AC16-Zellen, wobei in jedes Precellys-Röhrchen 500 µl Lysispuffer hinzugegeben worden sind. Bis zur Proteinisolation wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

#### **3.4.3 Proteinisolation aus Gewebe- und Zell-Lysaten**

Ab diesem Versuchsschritt ist der experimentelle Ablauf sowohl für die Gewebe- als auch für die Zell-Lysate identisch. Zunächst wurden die Proben sowohl mechanisch im Homogenisator (Precellys24-Systems, peglab) als auch mittels Sonikation (30 kHz, Cycle 0.7, Amplitude 60 % für 30 s; UP100H, Hielscher Ultraschall-Technologie) aufgeschlossen. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min bei 14000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde sodann in neue, vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **3.4.4 BCA Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration**

Nun erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe des BCA Assays. Hierfür wurde zunächst für jede Probe eine 1:10 Verdünnung mit *Aqua bidest.* angesetzt. In einem 15 ml Falcon wurde das Working-Reagent vorbereitet, indem 10,29 ml Reagent A mit 210 µl Reagent B gemischt und auf Eis gestellt wurde. In einer 96er Well-Platte erfolgte der Probenauftrag von jeweils 25 µl in Doppelbestimmung beginnend mit der Standardreihe (Pierce Rinderserumalbumin Standards, Thermo Scientific). Anschließend wurde auf jede Probe 200 µl Working-Reagent hinzugefügt. Die 96er Well-Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Die photometrische Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Inkubation bei 562 nm an einem Infinite M200 Multiplatten-Reader (Tecan Deutschland GmbH). Zur Datenerfassung und Auswertung wurde die dazugehörige Software Tecan Magellan eingesetzt. Basierend auf den ermittelten Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit *Aqua bidest.* auf eine einheitliche Konzentration eingestellt. Da die anschließende elektrophoretische Trennung ausschließlich aufgrund der Molekulargewichte der Proteine und unabhängig von ihrer spezifischen Nettoladung erfolgte, wurden die Proben mit

2 x Laemmli-Puffer (Sigma-Aldrich) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert.<sup>65</sup> Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.5 SDS-PAGE

Nach der Proteinisolation erfolgte die Auftrennung der Proteine aus den Lysaten nach ihrem Molekulargewicht. Hierfür wurde die Standardmethode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat - Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) unter Verwendung des NuPAGE Systems herangezogen.<sup>66</sup> Zu Beginn wurde 1 L Laufpuffer (1 x MOPS) angesetzt, indem 50 ml 20 x MOPS SDS Running Buffer mit 950 ml *Aqua bidest.* verdünnt wurden. Von dem Laufpuffer wurden 200 ml für den Innenbereich der Kammer entnommen und mit 500 µl Antioxidant (NuPAGE, Invitrogen) versetzt. In eine Gelkammer konnten je nach Bedarf ein oder zwei 10 %ige BIS-Tris-Gele bzw. 4-12 %ige Bis-Tris-Gradientengele (NuPAGE, Invitrogen) eingesetzt werden. Der Innenbereich zwischen den beiden Gelen wurde mit ca. 200 ml Laufpuffer inkl. Antioxidant befüllt, der Außenbereich mit ca. 600 ml reinem Laufpuffer. Mit Hilfe einer Spritze (Braun) wurde etwas Laufpuffer aus dem Innenbereich aufgenommen und jede einzelne Geltasche gespült. Die mit Laemmli-Puffer versetzten Lysate wurden bei 37 °C für 5 min im Heizblock aufgewärmt und anschließend kurz abzentrifugiert. Danach wurden die Proben sowie der Proteinmarker (Spectra Multicolor Broad Range Protein ladder, Thermo Fisher Scientific) jeweils kurz durchgemischt. Mittels einer Hamilton-Pipette wurden 15 µl (10 well) bzw. 10 µl (15 well) Probenmaterial pro Tasche aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nun bei 200 V für 50 min.

#### 3.4.6 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine im nächsten Schritt auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.<sup>67</sup> Zunächst wurde hierfür ein Transferpuffer, bestehend aus 25 ml NuPAGE 20 x Konzentrat, 375 ml *Aqua bidest.*, 500 µl Antioxidant sowie 100 ml Methanol, angesetzt. Für den Proteintransfer auf die Membran wurde ein luftblasenfreies „Gelsandwich“ aus Gel und Nitrocellulose-Membran zwischen Filterpapieren und Pads in einem Blotmodul (XCell II blot module) fixiert. Bei zeitgleichem Transfer zweier Gele wurden

die entsprechenden Gelsandwiches durch einen zusätzlichen Pad voneinander getrennt. Der Proteintransfer erfolgte in einer gekühlten Blotkammer. Hierzu wurde das Innenmodul mit ca. 50 ml Transferpuffer befüllt, während das Außengefäß zur Thermostatisierung mit 600 ml Aqua bidest. versehen wurde. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte nun bei 30 V für 60 min.

#### 3.4.7 Proteindetektion

Nach erfolgtem Proteintransfer wurden die Membranen gründlich mit *Aqua bidest.* gewaschen und anschließend in einer frisch angesetzten Blockpufferlösung (5 % BSA/Magermilch in 5 ml TBS pro Membran) für 60 min auf dem Wippschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen von den jeweiligen Nachweisantikörpern zu verhindern.

Die Inkubation der Membranen mit dem Erstantikörper erfolgte nach Herstellerangaben entweder für 2 h bei RT oder für 24 h im Kühlraum (4 °C). Für jede Membran wurden sowohl für den Erst- als auch für den Zweitantikörper 5 ml Antikörperlösung (5 % BSA/Magermilch, 5 ml TBS, 0,1 % Tween20) hergestellt. Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen wurden gemäß den Herstellerangaben gewählt. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Membranen dreimal für 10 min mit TBS inkl. 0,1 % Tween20 gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die 60-minütige Inkubation der Blotmembranen lichtgeschützt bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, welcher mit Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) konjugiert war. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit je 5 ml TBS inkl. 0,1 % Tween20 gewaschen und zum Schluss noch einmal mit je 5 ml reinem TBS.

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Membranen für 120 s mit ECL-Lösung (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Die dabei induzierte Chemilumineszenz basiert auf der Reaktion zwischen der membrangebundenen HRP und dem Luminol-basierten Substrat. Die Chemilumineszenz wurde mit dem ChemiDoc 5000 (paula) digital erfasst. Die anschließende densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software Quantity One, wobei der relative Gehalt des Zielproteins stets auf die Expression der Referenzproteine GAPDH bzw. Aktin normiert wurde.

### 3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach initialer Prüfung der Daten auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde bei normalverteilten Daten ein zweiseitiger t-Test angewendet, während bei Vergleichen mehrerer Gruppen eine zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt wurde. Lag keine Normalverteilung vor, kamen für den Vergleich zweier Gruppen der zweiseitige Wilcoxon-Test sowie für den Vergleich mehrerer Gruppen der zweiseitige Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. p-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Korrelationsanalysen wurden mittels Pearson-Korrelation durchgeführt, bei denen die Ergebnisse als Korrelationskoeffizienten  $\beta$  sowie exakte p-Werte angegeben sind. Die statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung von SPSS 23 sowie RStudio.<sup>68–73</sup>

## 4. Ergebnisse

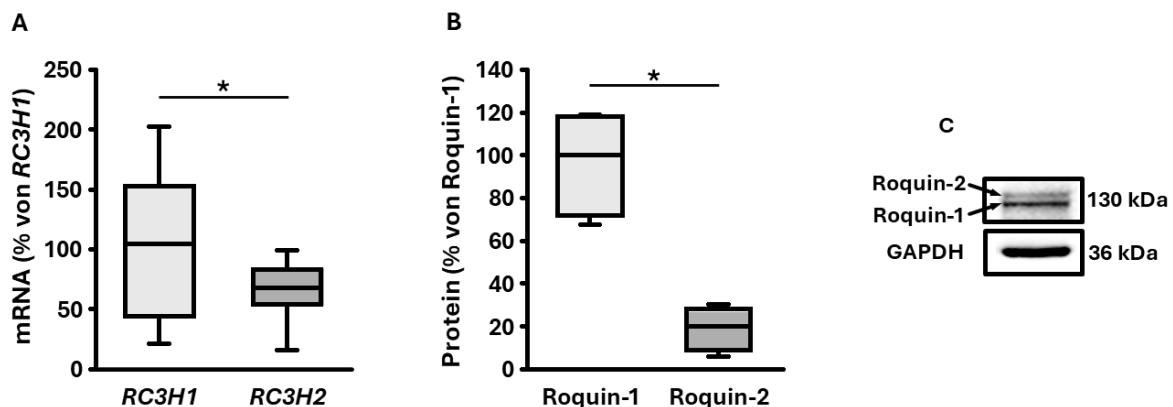
Im Folgenden werden die experimentellen Befunde zur Expression sowie zur funktionellen Bedeutung der beiden Roquin-Isoformen in myokardialen Modellsystemen dargestellt, wobei insbesondere die differenziellen regulatorischen Effekte von Roquin-1 und Roquin-2 auf miRNA-vermittelte Signalwege und zelluläre Anpassungsprozesse berücksichtigt werden.

### 4.1 Expression der beiden Roquin-Isoformen auf mRNA- und Proteinebene in kardialen Zellmodellen

Da bislang keine systematischen Daten zur Expression von Roquin im kardiovaskulären System vorliegen, wurde zunächst die mRNA-Expression der Gene *RC3H1* und *RC3H2* sowie die Proteinexpression der Isoformen Roquin-1 und Roquin-2 in humanen AC16-Kardiomyozyten untersucht. Ergänzend wurde die Expression beider Isoformen in primären Zellpopulationen des Rattenherzens analysiert. Hierzu wurden isolierte Kardiomyozyten und nicht-myozytäre Zellen getrennt untersucht, um mögliche zelltypspezifische Unterschiede zu erfassen.

Die AC16-Zelllinie wurde durch Fusion von Primärzellen aus adulten humanen Kardiomyozyten mit SV40-transformierten humanen Fibroblasten etabliert.<sup>74</sup> Zelllinien stellen ein kontrolliertes *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Transkriptionsregulation dar und werden daher häufig als erste Validierungsstufe in der Grundlagenforschung eingesetzt. Zu ihren wesentlichen Vorteilen zählen die ausgeprägte Homogenität der Zellpopulation und die daraus resultierende Reproduzierbarkeit der Daten sowie die einfache genetische Manipulierbarkeit.<sup>75</sup>

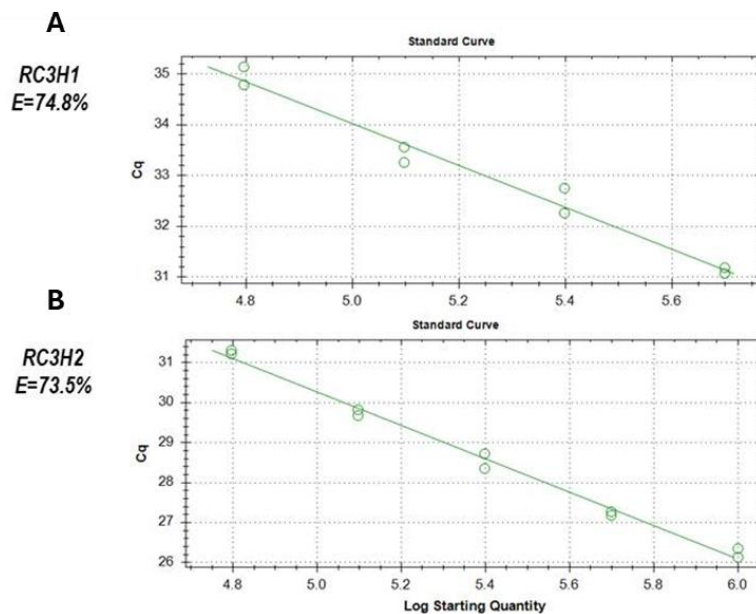
Wie in Abbildung 4 dargestellt, sind beide Isoformen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in AC16-Zellen exprimiert. Auf mRNA-Ebene zeigt *RC3H2* im Vergleich zu *RC3H1* eine geringere relative Expression (Abb. 4 A). Ein entsprechender Unterschied zeigt sich auch auf Proteinebene: Die Expression von Roquin-2 beträgt  $19,0 \pm 8,7$  % derjenigen von Roquin-1 (Abb. 4 B, C).



**Abbildung 4: Analyse der mRNA- und Proteinexpression beider Roquin-Isoformen in humanen AC16-Kardiomyozyten.**

**A)** Die relative mRNA-Expression ( $\Delta\text{Ct}$ ) wurde mittels RT-qPCR bestimmt und auf das Housekeeping-Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) normalisiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *RC3H2* im Vergleich zu *RC3H1* ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ). **B)** Die relative Proteinexpression von Roquin-2 im Vergleich zu Roquin-1, bestimmt mittels Western-Blot-Analyse. **C)** Repräsentativer Western-Blot. Die Daten basieren auf  $n = 6$  unabhängige Zellpassagen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test nach Prüfung der Varianzhomogenität (Levene-Test) und der Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test). \*  $p \leq 0,05$ .

Zur weiteren Charakterisierung wurde die mRNA- und Proteinexpression beider Roquin-Isoformen im Herzgewebe adulter weiblicher Wistar-Ratten untersucht. Zur Erfassung zelltypspezifischer Unterschiede wurde das Herzgewebe in myozytäre (MZ) und nicht-myozytäre (NMZ) Fraktionen separiert. Im Vorfeld der quantitativen Analyse wurden die Primereffizienzen bestimmt, um eine valide Vergleichbarkeit der mRNA-Expression zu gewährleisten.<sup>76</sup> Wie in Abbildung 5 gezeigt, amplifizieren die Primer für *RC3H1* und *RC3H2* die jeweiligen Targets mit nahezu identischer Effizienz (*RC3H1*: E = 74,8 %; *RC3H2*: E = 73,5 %).



**Abbildung 5: Primereffizienz von *RC3H1* und *RC3H2*.**

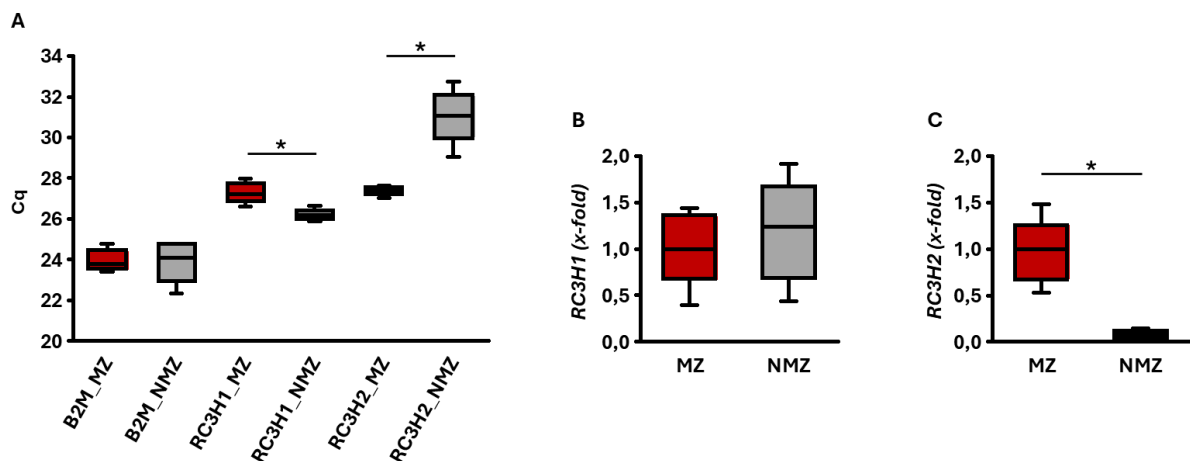
Standardkurven für *RC3H1* (**A**) und *RC3H2* (**B**). Dargestellt ist die logarithmische Auftragung der Ct-Werte zur Bestimmung der jeweiligen Primereffizienz.

Nachfolgend wurde die mRNA-Expression der beiden Roquin-Isoformen in den isolierten Zellfraktionen der Kardiomyozyten (MZ) und nicht-myozytären Zellen (NMZ) analysiert (Abb. 6 A). Als interne Referenz wurde Beta-2-Mikroglobulin (*B2M*) verwendet, da dieses ubiquitär in kernhaltigen Zellen exprimiert wird.<sup>77</sup> In beiden untersuchten Zellfraktionen wies *B2M* ein vergleichbares Expressionsniveau auf (MZ: Ct-Wert:  $23,78 \pm 0,47$ , NMZ: Ct-Wert:  $24,09 \pm 0,91$ ).

Die Darstellung der nicht normalisierten Ct-Werte zeigt, dass *RC3H1* in der Fraktion der NMZ einen geringfügig niedrigeren Ct-Wert aufweist als in den MZ, was auf eine höhere

Transkriptmenge in den NMZ hindeutet. Für *RC3H2* ergibt sich ein entgegengesetztes Expressionsmuster mit niedrigeren Ct-Werten in den MZ und damit einer stärkeren Expression in dieser Zellfraktion.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ct-Werte beider Gene auf *B2M* normalisiert ( $\Delta\text{Ct}$ ). Die relative Expression wurde mit den myozytären Zellen (MZ) als Referenz ( $x\text{-fold} = 1$ ) berechnet. Diese Darstellung verdeutlicht die Unterschiede in der Expression der beiden Isoformen zwischen den Zellfraktionen. *RC3H1* zeigt in den nicht-myozytären Zellfraktionen (NMZ:  $1,19 \pm 0,49$ ) eine tendenziell höhere Expression als in den myozytären Zellen (MZ), während *RC3H2* in den NMZ ( $0,08 \pm 0,04$ ) im Vergleich zu den MZ nur schwach exprimiert wird (Abb. 6 B, C).



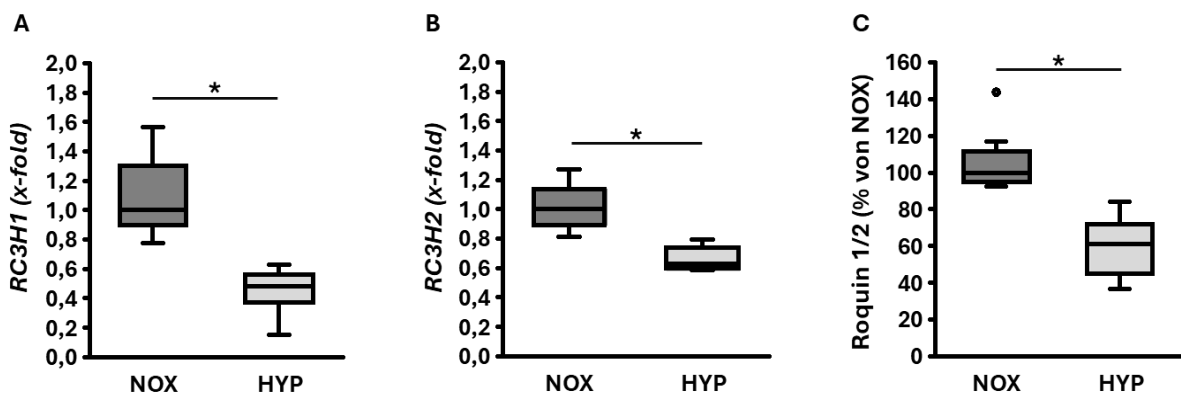
**Abbildung 6: Zelltypspezifische Expression der Roquin-Isoformen in kardialen Myozyten (MZ) und nicht-myozytären Zellen (NMZ).**

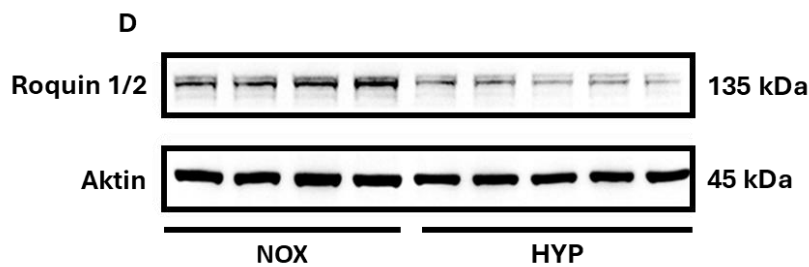
**A)** Nicht normalisierte Ct-Werte von *B2M*, *RC3H1* und *RC3H2* in beiden Zellfraktionen. **B, C)** Nach Normalisierung auf *B2M* und Bezug auf die MZ zeigt *RC3H1* eine tendenziell höhere Expression in den NMZ, während die *RC3H2* Expression deutlich in den MZ überwiegt (Abb. 6 B, C). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; \*  $p \leq 0,05$ . Die Daten stammen aus  $n = 5$  Herzen adulter weiblicher Wistar-Ratten, aus denen jeweils beide Zellfraktionen isoliert wurden.

## 4.2 Der Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Expression der Roquin-Isoformen

Im Anschluss an die Expressionsanalysen der beiden Roquin-Isoformen in kardialen Gewebe wurde im nächsten Schritt untersucht, ob hypoxische Bedingungen die Expression von Roquin beeinflussen.

Eine Veränderung der Roquin-Expression könnte potenziell kardioprotektive Signalwege modulieren und damit das miRNA-gesteuerte Remodeling des reperfundierten Myokards unmittelbar beeinflussen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden AC16-Zellen für 48 h unter hypoxischen Bedingungen (94,9 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 0,1 % O<sub>2</sub>) kultiviert und anschließend 1 h reoxygeniert (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Umgebungsluft). Die RT-qPCR-Analyse zeigte eine deutliche Herabregulation der relativen mRNA-Expression von *RC3H1* unter Hypoxie (HYP;  $0,48 \pm 0,15$ ) im Vergleich zu den normoxischen Kontrollbedingungen (NOX; x-fold = 1) (Abb. 7 A). Für *RC3H2* zeigte sich unter Hypoxie eine vergleichbare Abnahme der mRNA-Expression (HYP;  $0,63 \pm 0,07$ ) (Abb. 7 B). Um die hypoxieinduzierte Herabregulation der Roquin-Isoformen auf Proteinebene zu überprüfen, wurden aus denselben Proben Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die densitometrische Auswertung bestätigte eine reduzierte Proteinexpression von Roquin unter hypoxischen Bedingungen (HYP;  $61,12 \pm 14,73$ ) (Abb. 7 C, D).

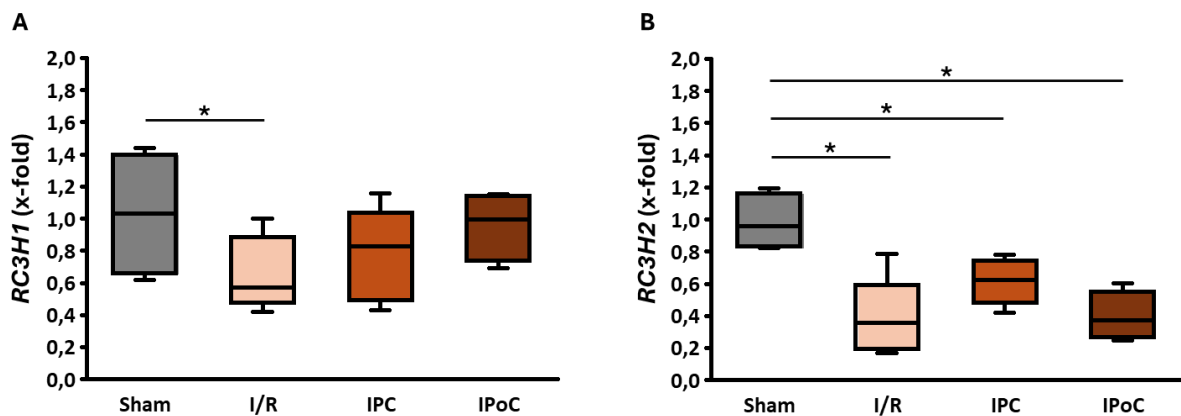




**Abbildung 7: Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Expression von Roquin in AC16-Kardiomyozyten.**

**A, B)** Relative mRNA-Expression von *RC3H1* (A) und *RC3H2* (B) nach 48 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung, normalisiert auf *B2M* und bezogen auf normoxische Kontrollbedingungen (NOX; x-fold = 1). **C)** Die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen zeigt eine verminderte Proteinexpression von Roquin nach Hypoxie und Reoxygenierung. **D)** Repräsentativer Western-Blot mit Aktin als Beladungskontrolle. Die Daten basieren auf n = 6 unabhängige Zellpassagen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Nachdem im Zellkulturmodell durch Hypoxie und Reoxygenierung eine Herabregulation von Roquin sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt ein *in vivo*-Modell der Ischämie-Reperfusion herangezogen, um diese Befunde im Kontext der physiologischen und pathophysiologischen Prozesse des Gesamtorganismus zu untersuchen. Zu diesem Zweck stellte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ferdinandy im Rahmen eines Kooperationsprojekts Myokardproben von adulten, weiblichen Wistar-Ratten zur Verfügung, die einer 45-minütigen Ischämie durch Okklusion der linken Vorderwandarterie (LAD) mit anschließender siebentätiger Reperfusionsphase unterzogen worden waren. Neben einer normoxen Kontrollgruppe (Sham) wurden die Versuchsgruppen Ischämie/Reperfusion (I/R), ischämische Präkonditionierung (IPC), sowie ischämische Postkonditionierung (IPoC) analysiert. Im Vergleich zur Sham-Kontrollgruppe (x-fold = 1) ist die Expression von *RC3H1* in der I/R-Gruppe signifikant herabreguliert ( $0,57 \pm 0,20$ ). Unabhängig von der jeweiligen kardioprotektiven Intervention (IPC, IPoC) zeigten alle ischämischen Gruppen im Vergleich zur normoxen Kontrollgruppe eine signifikante Herabregulation der *RC3H2*-mRNA-Expression (Abb. 8 A, B).



**Abbildung 8: Regulation der Roquin-mRNA *in vivo* nach kardialer Ischämie und Reperfusion.**

**A)** Relative mRNA-Expression von *RC3H1* in der normoxenen Kontrollgruppe (Sham) sowie in den experimentellen Gruppen Ischämie/Reperfusion (I/R), ischämische Präkonditionierung (IPC) und ischämische Postkonditionierung (IPoC). **B)** Relative mRNA-Expression von *RC3H2* unter denselben experimentellen Bedingungen. Die Daten basieren auf  $n = 4$  weibliche Wistar-Ratten für Sham und  $n = 5$  für die übrigen Gruppen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-hoc-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Zusammenfassend zeigen die im Hypoxie-Reoxygenierungsmodell an AC16-Zellen erhobenen Daten eine verminderte mRNA- und Proteinexpression beider Roquin-Isoformen. Im *in vivo*-Modell der Ischämie und Reperfusion in Wistar-Ratten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden: Während *RC3H2* unabhängig von den Konditionierungsstrategien IPC und IPoC reduziert blieb, wurde die Expression von *RC3H1* durch die Interventionen wieder normalisiert. Die konsistenten Befunde aus beiden Modellsystemen stützen die Annahme, dass Roquin, dessen Expression unmittelbar durch hypoxische Ereignisse moduliert wird, eine Schlüsselrolle in der Regulation miRNA-gesteuerter Umbauprozesse im reperfundierten Myokard einnehmen könnte.

### 4.3 Der Beitrag von Roquin zur Kontrolle miRNA-vermittelter kardioprotektiver Signalwege

#### 4.3.1 Die „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Achse“

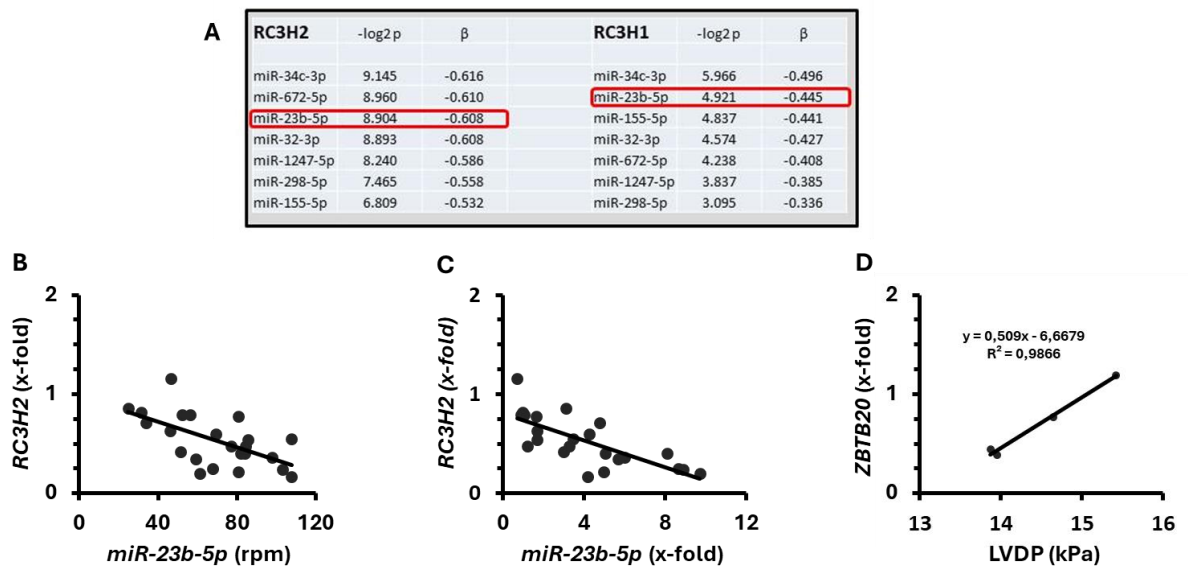
Wie in immunologischen Studien bereits gezeigt wurde, reguliert das RNA-bindende Protein Roquin die Homöostase von miRNAs, welche wiederum an der Regulation von Signalwegen

der T-Zelldifferenzierung beteiligt sind.<sup>24</sup> Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob Roquin auch miRNAs reguliert, die kardioprotektive Signalwege beeinflussen.

Zur Identifikation potenzieller miRNAs, die sowohl kardioprotektive Effekte vermitteln als auch durch Roquin reguliert werden können, wurde eine integrative microRNA-mRNA Analyse (MMIA) durchgeführt. Die zugrunde liegenden Daten stammen aus RNA-Sequenzierungen derselben ventrikulären Herzproben, in denen im Abschnitt zuvor die I/R-vermittelte Herabregulation von Roquin mittels RT-qPCR bestätigt wurde. Zur Identifizierung möglicher miRNAs, die von den Roquin-Isoformen reguliert werden, wurden Korrelationsanalysen (Pearson-Korrelation) zwischen den Expressionsdaten bekannter kardioprotektiver miRNAs und den mRNA-Expressionsdaten von *RC3H1* und *RC3H2* durchgeführt (Abb. 9 A).

Dabei zeigte miR-34c-3p die stärkste inverse Korrelation mit beiden Roquin-Isoformen. Zur Validierung dieses Befundes wurde eine zusätzliche Korrelationsanalyse auf Basis der RT-qPCR-Daten durchgeführt, in der die Expression von miR-34c-3p mit der Expression der Roquin-Isoformen verglichen wurde. In dieser Analyse konnte, die zuvor beobachtete, inverse Korrelation jedoch nicht bestätigt werden. Für *RC3H2* hingegen konnte miR-23b-5p identifiziert werden, welche sowohl in den RNA-Sequenzierungsdaten als auch in den RT-qPCR-Daten eine ausgeprägte inverse Korrelation (RNA-Sequenzierung:  $\beta = -0,608$ , RT-qPCR:  $\beta = -0,735$ ) mit der Expression von *RC3H2* zeigte (Abb. 9 B, C). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde miR-23b-5p als potenzielles Ziel von Roquin-2 identifiziert.

In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls das Zinkfinger- und BTB-Domänen-haltige Protein 20 (ZBTB20) als Zielmolekül der miR-23b-5p mithilfe der Datenbank *TargetScan8.0* identifiziert werden. Die mRNA-Expression von *ZBTB20* zeigte in dem verwendeten *in vivo*-Modell eine positive Korrelation mit dem linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP), was auf eine verbesserte Herzfunktion bei erhöhter ZBTB20-Expression hinweist (Abb. 9 D).



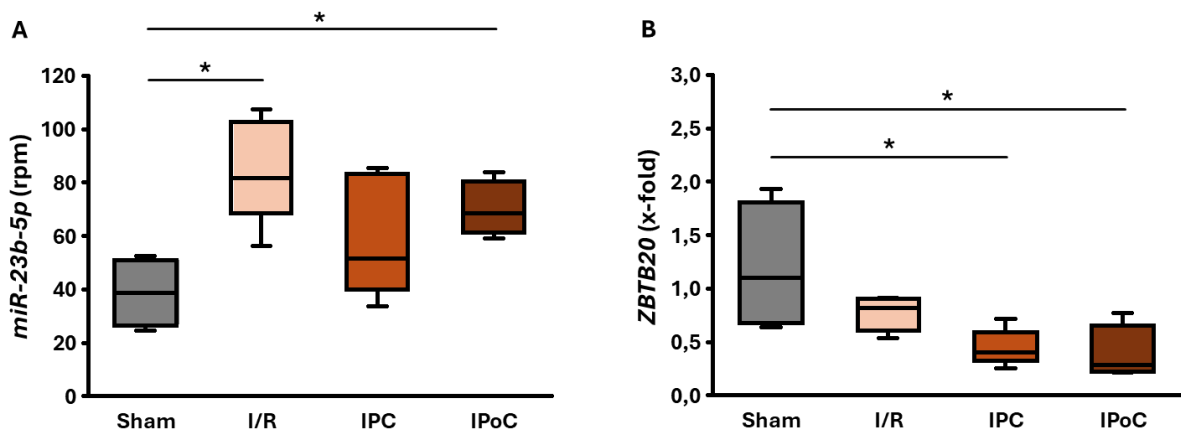
**Abbildung 9:** Die „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Achse“ als möglicher kardioprotektiver Signalweg identifiziert mittels integrativer microRNA-mRNA Analyse.

**A)** Inverse Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *RC3H2* und den RNA-Sequenzierungsdaten potenzieller miRNA-Kandidaten. **B)** Inverse Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *RC3H2* und den RNA-Sequenzierungsdaten (rpm) von miR-23b-5p. **C)** Validierung der inversen Korrelation zwischen der Expression von *RC3H2* und miR-23b-5p anhand von RT-qPCR-Daten (x-fold). **D)** Positive Korrelation zwischen der *ZBTB20*-mRNA-Expression und dem linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP), bestimmt im working heart-Modell. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Pearson-Korrelation. Exakte p-Werte (<0,01) sowie die entsprechenden  $\beta$ -Koeffizienten sind angegeben.

Im nächsten Schritt wurde anhand derselben ventrikulären Herzproben des I/R-Modells die Expression von miR-23b-5p und *ZBTB20* analysiert, um den Einfluss ischämischer Bedingungen auf deren Expression zu untersuchen und die Ergebnisse mit den zuvor durchgeführten Korrelationsanalysen in Beziehung zu setzen. Dabei zeigte sich in allen ischämischen Gruppen (I/R, IPC und IPoC) eine erhöhte relative Expression von miR-23b-5p im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe (Sham) (Abb. 10 A). Diese Hochregulation war in der I/R-Gruppe ( $81,76 \pm 17,39$ ) sowie in der IPoC-Gruppe ( $68,52 \pm 8,99$ ) signifikant gegenüber der Sham-Gruppe ( $38,83 \pm 11,13$ ). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der zuvor beobachteten inversen Korrelation zwischen *RC3H2* und miR-23b-5p, da die *RC3H2*-mRNA-Expression in denselben Gewebeproben unter ischämischen Bedingungen herabreguliert war.

Parallel dazu wurde die mRNA-Expression von *ZBTB20* analysiert (Abb. 10 B). Hier zeigte sich in allen ischämischen Gruppen eine reduzierte Expression im Vergleich zur Sham-Gruppe, insbesondere in der IPC- ( $0,40 \pm 0,15$ ) sowie der IPoC-Gruppe ( $0,28 \pm 0,22$ ). Die verminderte *ZBTB20*-Expression in ischämischem Gewebe unterstützt die Annahme eines regulatorischen Zusammenhangs, bei dem eine Ischämie-bedingte Herabregulation von *RC3H2* zu einer erhöhten Expression von miR-23b-5p führt, welche wiederum die *ZBTB20*-mRNA negativ reguliert.

Vor dem Hintergrund der zuvor beschriebenen positiven Korrelation zwischen der *ZBTB20*-Expression und der linksventrikulären Funktion deutet die beobachtete Herabregulation von *ZBTB20* nach ischämischen Ereignissen auf eine funktionell relevante Beeinträchtigung des reperfundierten Myokards hin.

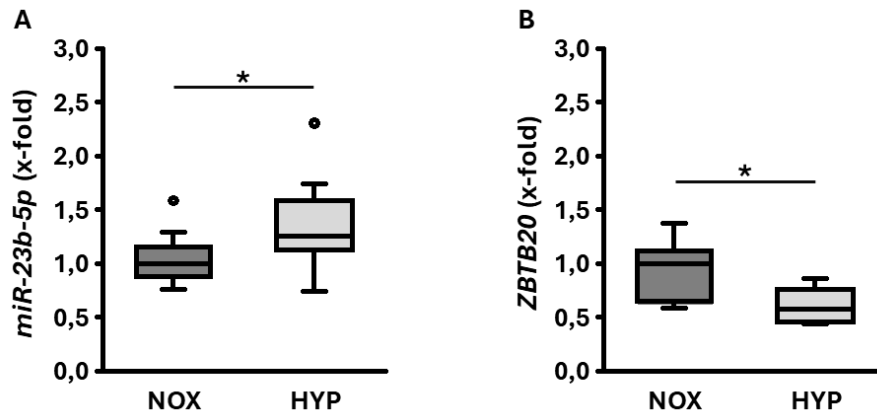


**Abbildung 10: Die linksventrikuläre Expression von miR-23b-5p und *ZBTB20* im I/R-Modell.**

**A)** Relative Expression von miR-23b-5p in den Gruppen Sham, I/R, IPC und IPoC, bestimmt anhand von RNA-Sequenzierungsdaten (rpm). **B)** Relative mRNA-Expression von *ZBTB20* (x-fold) in denselben Myokardproben, ermittelt durch RT-qPCR. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger ANOVA mit Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Zur Validierung der Befunde am *in vivo*-Modell wurden AC16-Zellen entsprechend dem zuvor beschriebenen Protokoll (Kapitel 4.2) hypoxischen Bedingungen gefolgt von Reoxygenierung ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen ließ sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der miR-23b-5p-Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe (x-fold = 1) nachweisen

(Abb. 11 A). Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante Abnahme der *ZBTB20*-mRNA-Expression ( $0,58 \pm 0,16$ ), so dass die zuvor am Myokard der Ratte beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden konnten (Abb. 11 B).



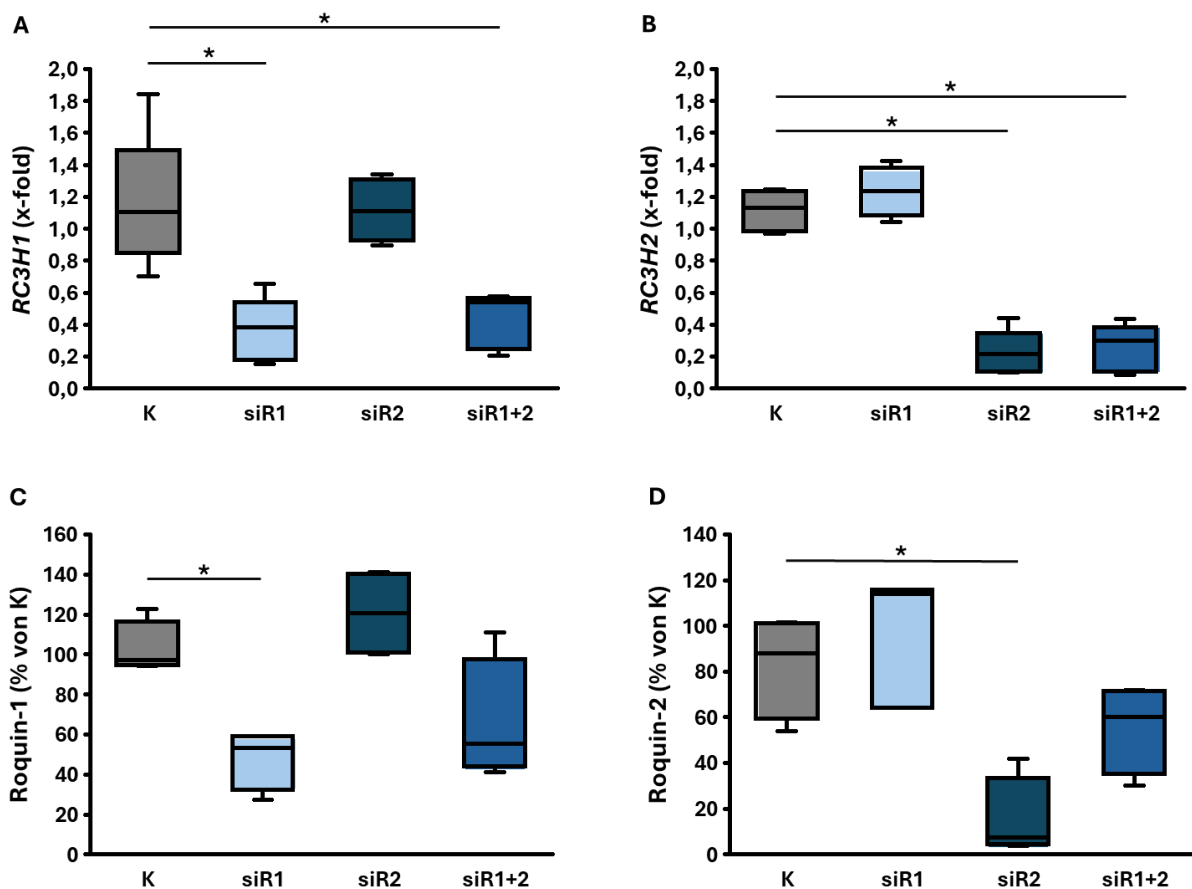
**Abbildung 11: Expression von miR-23b-5p und *ZBTB20* in AC16-Kardiomyozyten.**

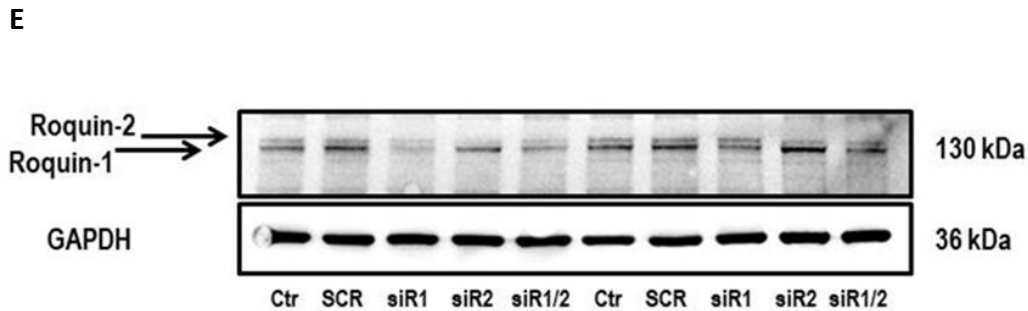
**A)** Relative Expression von miR-23b-5p in AC16-Zellen nach Hypoxie und Reoxygenierung (HYP) im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe (NOX). **B)** Relative mRNA-Expression von *ZBTB20* unter denselben Bedingungen. Die Daten basieren auf n = 6 unabhängige Zellpassagen für (A) und (B). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Die bisherigen Ergebnisse sprechen für das Vorliegen einer „Roquin-2 – miR-23b-5p – *ZBTB20*-Regulationsachse“. Ausgangspunkt dieser Achse ist eine durch hypoxische bzw. ischämische Bedingungen ausgelöste Herabregulation von Roquin, die sowohl im I/R-Modell der Ratte als auch im Hypoxie-/Reoxygenierungs-Modell in AC16-Zellen beobachtet wurde. Infolge einer verminderten Roquin-Expression ließ sich ein Anstieg der miR-23b-5p-Expression nachweisen, die wiederum mit einer reduzierten mRNA-Konzentration von *ZBTB20* einherging. Um diese Zusammenhänge weiter zu validieren und auszuschließen, dass die beobachteten Effekte lediglich indirekte Folgen hypoxischer Stressreaktionen sind, wurde eine siRNA-vermittelte Herabregulation von Roquin durchgeführt. Ziel dieses Ansatzes war es, eine gezielte sowie isolierte Reduktion von Roquin zu erreichen und damit einen kausalen Zusammenhang zwischen *RC3H2*, miR-23b-5p und *ZBTB20* zu bestätigen. Hierzu wurden AC16-Zellen für 48 h mit siRNA gegen *RC3H1* (siR1), siRNA gegen *RC3H2* (siR2) sowie mit einer Kombination beider

siRNAs (siR1+2) transfiziert. Eine unbehandelte Kontrollgruppe (K) sowie Scrambled-siRNA (Scr) dienten als Referenz.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und die Expression der beiden Roquin-Isoformen sowohl auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR als auch auf Proteinebene mittels Western-Blot analysiert. Die RT-qPCR-Ergebnisse (Abb. 12 A, B) sowie die densitometrische Auswertung der Western Blots (Abb. 12 C, D) zeigten eine hochspezifische und signifikante Herabregulation der jeweils adressierten Isoform. Auf mRNA-Ebene war die Expression von *RC3H1* im Vergleich zur Kontrolle sowohl in der siRNA-*RC3H1*-Gruppe ( $0,38 \pm 0,18$ ) als auch in der kombinierten siRNA-Gruppe ( $0,54 \pm 0,15$ ) deutlich reduziert. Entsprechend zeigte sich auf Proteinebene im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion der *RC3H1*-Expression auf  $53,4 \pm 12,9$  % in der siRNA-*RC3H1*-Gruppe. Auch die Transfektion mit siRNA gegen *RC3H2* führte zu einer ausgeprägten und spezifischen Herabregulation von *RC3H2* auf mRNA- ( $0,22 \pm 0,12$ ) sowie von Roquin-2 auf Proteinebene ( $7,4 \pm 15,5$  %).

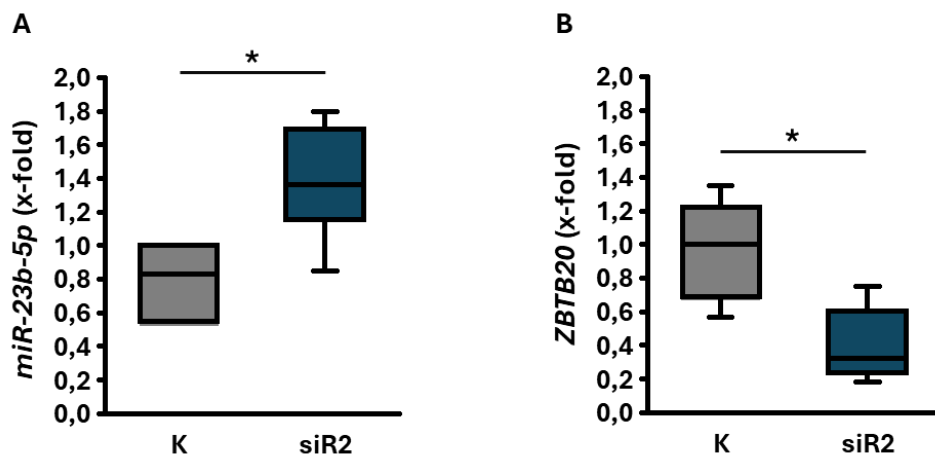




**Abbildung 12: siRNA-induzierte Herabregulation von Roquin in AC16-Kardiomyozyten.**

**A)** AC16-Zellen wurden für 48 h mit siRNA gegen *RC3H1* transfiziert und anschließend mittels RT-qPCR analysiert. Die relative mRNA-Expression zeigt eine signifikante Herabregulierung von *RC3H1*. **B)** Die Transfektion mit siRNA gegen *RC3H2* resultierte entsprechend in einer signifikanten Reduktion der *RC3H2*-mRNA-Expression. **C)** Die Western-Blot-Analysen zeigen eine spezifische Herabregulation der Proteinexpression von Roquin-1 in der siR1-Gruppe sowie **D)** eine entsprechende Reduktion der Roquin-2-Proteinexpression in der siR2-Gruppe; die Daten wurden auf GAPDH als interne Beladungskontrolle normiert. **E)** Repräsentative Western-Blot-Aufnahme von  $n = 2$  Transfektionen. Die Daten basieren auf  $n = 5$  unabhängige Zellpassagen für (A, B) und  $n = 4$  für (C, D). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitiger ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-hoc-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Nach erfolgreicher Validierung der isoformspezifischen Roquin-Suppression mittels siRNA wurde unter selektivem *RC3H2*-Knockdown die Expression von miR-23b-5p sowie von *ZBTB20* analysiert (Abb. 13). Die RT-qPCR-Analysen zeigen, dass die Expression von miR-23b-5p in der siRNA-*RC3H2*-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht war ( $1,37 \pm 0,31$ ; Abb. 13 A). Parallel dazu war die *ZBTB20*-mRNA-Expression unter denselben Bedingungen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert ( $0,33 \pm 0,19$ ; Abb. 13 B). Diese Ergebnisse belegen, dass der beobachtete regulatorische Zusammenhang zwischen *RC3H2*, miR-23b-5p und *ZBTB20* direkt auf der gezielten Hemmung von *RC3H2* beruht und nicht auf sekundären Effekten hypoxischer oder ischämischer Stressbedingungen.



**Abbildung 13: Einfluss eines *RC3H2*-Knockdowns auf die Expression von miR-23b-5p und *ZBTB20* in AC16-Kardiomyozyten.**

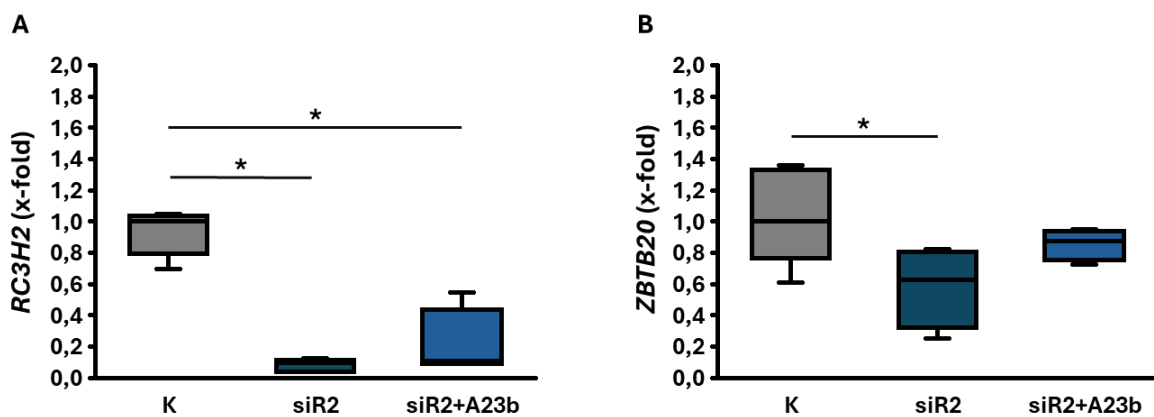
**A)** Die RT-qPCR-Analysen zeigen, dass die relative Expression von miR-23b-5p in der mit siRNA gegen *RC3H2* (siR2) behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) signifikant erhöht ist. **B)** Zeitgleich wurde die *ZBTB20*-mRNA-Expression in der siR2-Gruppe signifikant reduziert. Die Daten basieren auf  $n = 6$  unabhängige Zellpassagen für (A) und  $n = 9$  für (B). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die veränderte Expression von miR-23b-5p und *ZBTB20* auf die Reduktion von *RC3H2* und nicht auf sekundäre Einflüsse zurückzuführen ist, wurde im nächsten Schritt die Kausalität innerhalb miR-23b-5p – *ZBTB20*-Interaktion geprüft. Hierzu wurden AC16-Zellen gleichzeitig mit siRNA gegen *RC3H2* und dem Antagomir-23b-5p transfiziert (Abb. 14). Das Antagomir blockiert die Funktion der reifen miR-23b-5p, indem es deren Interaktion mit der *ZBTB20*-mRNA verhindert.

Da Antagomire die miRNA nicht zwangsläufig degradieren und die RT-qPCR nicht zwischen funktionell aktiver und inaktiver miRNA unterscheiden kann, zudem eine kompensatorische Hochregulation der Transkripte auftreten kann, wurde die Wirksamkeit der Antagomir-Transfektion in Vorexperimenten anhand eines positiven Kontroll-Antagomirs überprüft. Hierfür wurde ein Antagomir gegen let-7c eingesetzt. Da let-7c die *HMGA2*-mRNA negativ reguliert, führt die Hemmung dieser miRNA zu einer erhöhten *HMGA2*-Expression, die in der RT-qPCR als Indikator für eine erfolgreiche Antagomir-Transfektion dient.<sup>78</sup> In AC16-Kardiomyozyten führte die Transfektion mit Antagomir-let-7c reproduzierbar zu einer

signifikanten Induktion der *HMGA2*-Expression, sodass die nachfolgenden Experimente mit demselben Transfektionsprotokoll durchgeführt wurden.

Die Applikation der siRNA gegen *RC3H2* (siR2) resultierte, wie bereits zuvor gezeigt, in einer signifikanten Reduktion der *RC3H2*-Expression ( $0,10 \pm 0,03$ ; Abb. 14 A). Die parallel analysierte Expression von *ZBTB20* war in dieser Gruppe ebenfalls signifikant herabreguliert ( $0,63 \pm 0,22$ ). Eine gleichzeitige Transfektion mit Antagomir-23b-5p (siR2 + A23b) normalisierte hingegen die Expression von *ZBTB20* nahezu auf Kontrollniveau ( $0,88 \pm 0,08$ ) und bestätigte somit eine direkte Regulation von *ZBTB20* durch miR-23b-5p (Abb. 14 B).



**Abbildung 14: Validierung der „Roquin-2 – miR23b-5p – ZBTB20-Regulationsachse“ mittels Antagomir-23b-5p in AC16-Kardiomyozyten.**

**A)** Relative mRNA-Expression von *RC3H2* in der Kontrollgruppe (K), der siRNA-*RC3H2*-Gruppe (siR2) sowie der kombinatorisch behandelten siRNA-*RC3H2*- und Antagomir-23b-5p-Gruppe (siR2+A23b).

**B)** Relative *ZBTB20*-mRNA-Expression unter denselben Bedingungen. Die Daten basieren auf  $n = 5$  unabhängige Zellpassagen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Zusammenfassend stützen die Expressionsanalysen die Existenz einer „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Regulationsachse“ in kardiomyozytären Systemen. Die konsistenten Befunde in AC16-Zellen und primären Rattenkardiomyozyten weisen darauf hin, dass *RC3H2* über die Kontrolle der miR-23b-5p-Expression zur Regulation von ZBTB20 beiträgt und damit potenziell an der Steuerung kardiomyozytärer Anpassungsprozesse beteiligt ist, insbesondere im Kontext einer myokardialen Ischämie und Reperfusion.

#### 4.3.2 Die „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Achse“

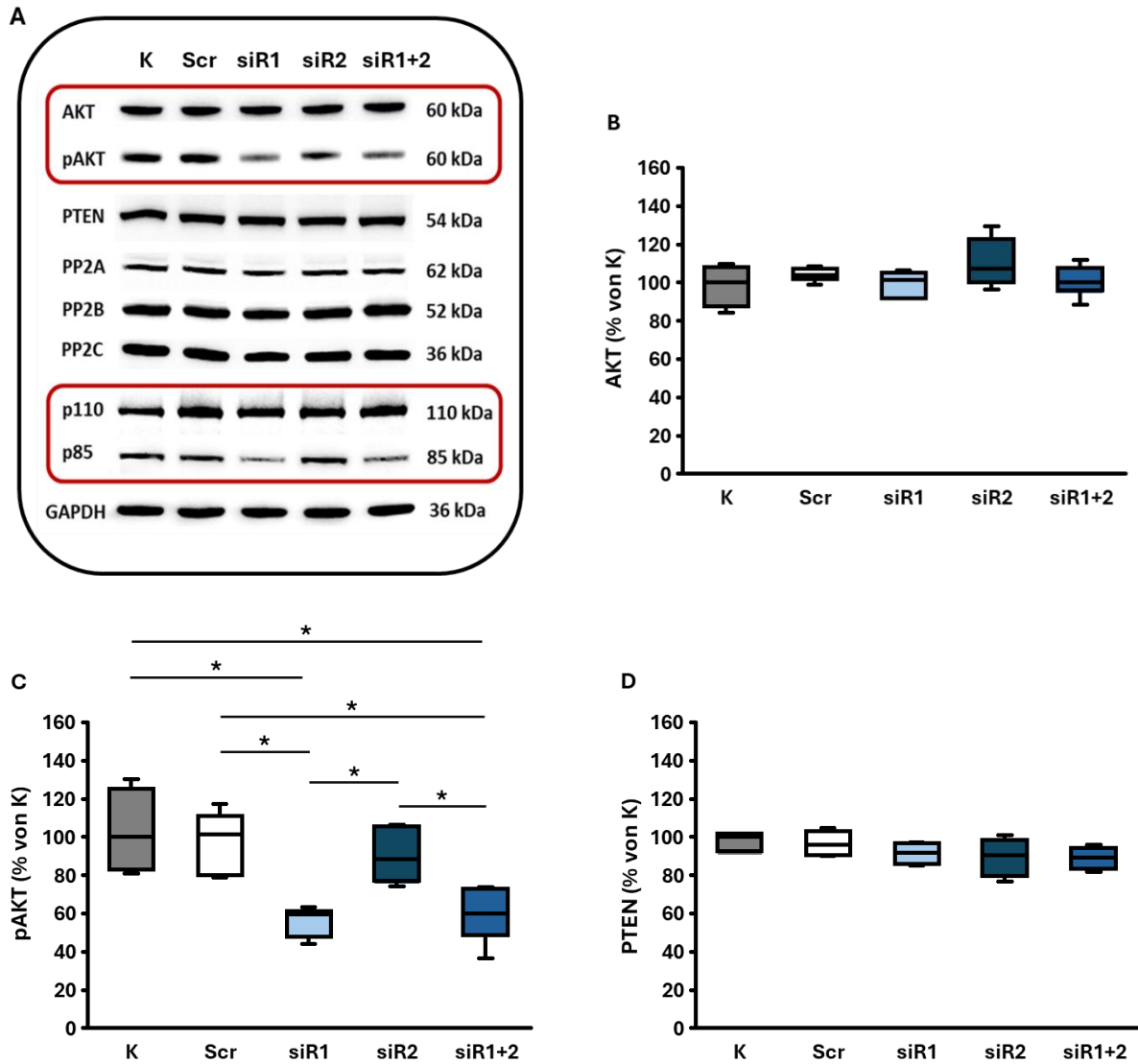
Wie in der Einleitung dargestellt, wurde die Rolle von Roquin erstmals im Immunsystem beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass Roquin in der Lage ist, die Homöostase von miRNAs zu beeinflussen, welche ihrerseits den AKT-Signalweg regulieren. Insbesondere reguliert Roquin ein miRNA-Cluster, das über die Repression der PTEN-mRNA die inhibitorische Wirkung von PTEN abschwächt und dadurch den AKT-Signalweg aktiviert.<sup>24</sup>

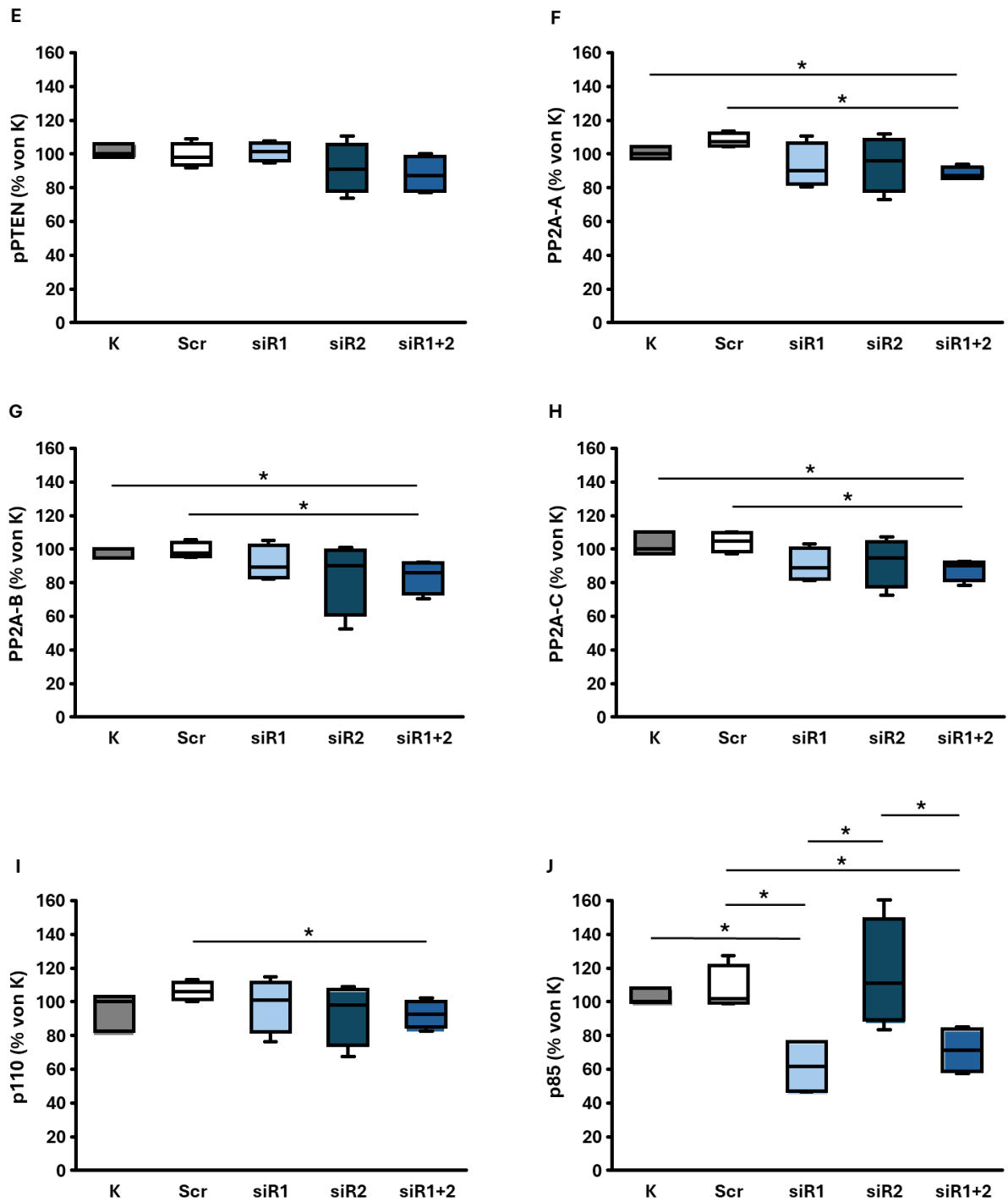
Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Roquin auf den kardioprotektiven AKT-Signalweg über die Regulation von miRNAs wurden AC16-Zellen entsprechend dem in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Versuchsansatz mit siRNAs gegen die Roquin-Isoformen transfiziert (Abb. 12). Hierbei dienten eine unbehandelte Kontrollgruppe (K) sowie Zellen, die mit Scrambled-siRNA (Scr), siRNA gegen *RC3H1* (siR1), siRNA gegen *RC3H2* (siR2) oder einer Kombination beider siRNAs (siR1+2) transfiziert wurden, als Vergleichsgruppen. Nach 48 h wurden die Zellen für Western-Blot-Analysen geerntet. Im Rahmen dieser Analyse wurde die Proteinexpression zentraler Komponenten des PI3K/AKT-Signalwegs untersucht, um mögliche Effekte einer reduzierten Roquin-Expression zu identifizieren. Abbildung 15 A zeigt repräsentative Western-Blots der analysierten Proteine.

Signifikante Veränderungen in der Proteinexpression traten ausschließlich nach Transfektion mit siRNA-*RC3H1* auf und betrafen sowohl das phosphorylierte AKT (pAKT) als auch die regulatorische PI3K-Untereinheit p85 (Abb. 15 C, J). Die Proteinexpression wurde jeweils auf die unbehandelte Kontrollgruppe normiert (% zu K; K = 100 %). Während die Gesamt-AKT-Proteinexpression in allen Gruppen unverändert blieb (B), war das pAKT in der siR1-Gruppe signifikant auf  $59,56 \pm 6,99$  % reduziert. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich in der kombinierten siR1+2-Gruppe mit einer pAKT-Expression von  $60,02 \pm 12,54$  %. Somit führte die Herabregulation von Roquin-1 im Gegensatz zu den im Immunsystem beschriebenen Effekten zu einer Reduktion des phosphorylierten und damit aktivierten Anteils von AKT, was mit einer verminderten Aktivität des AKT-Signalwegs einhergeht.

Bei der Analyse weiterer am Signalweg beteiligter Proteine konnte weder für PTEN und dessen phosphorylierte Form pPTEN noch für die drei Untereinheiten der Proteinphosphatase-2A (PP2A) Veränderungen in der Proteinexpression nach spezifischer Herabregulation einzelner Roquin-Isoformen festgestellt werden (Abb. 15 D-H). Während die regulatorische PI3K-

Untereinheit p85 ein ähnliches Expressionsmuster wie pAKT aufwies, blieb die katalytische Untereinheit p110 unbeeinflusst (Abb. I-J). In der siR1-Gruppe betrug die p85-Expression  $61,60 \pm 14,33$  % der Kontrollgruppe.





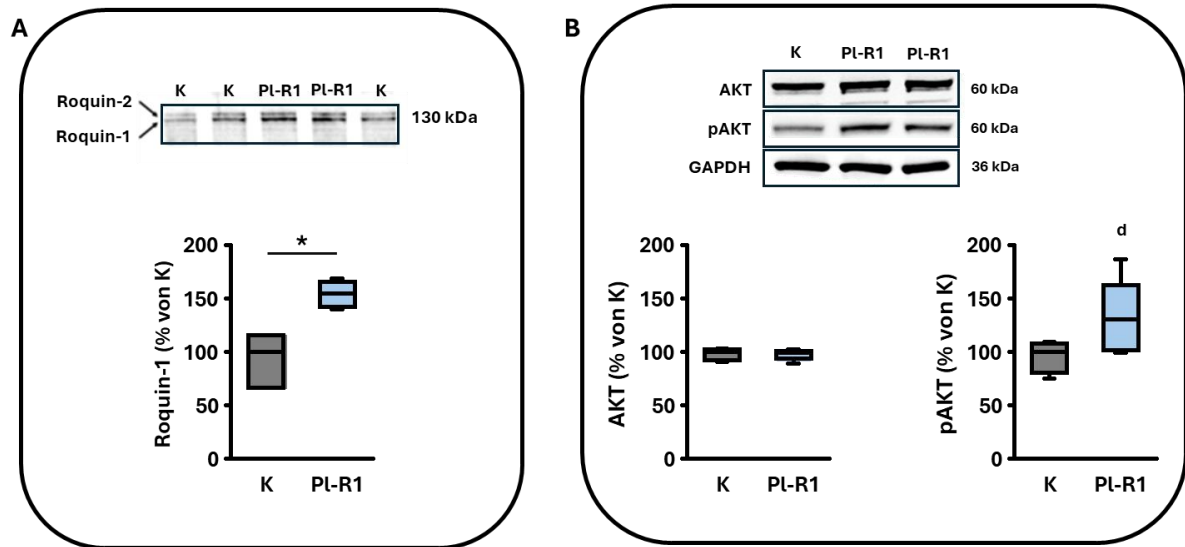
**Abbildung 15:** Einfluss eines isoformspezifischen Roquin-Knockdowns auf den PI3K/AKT-Signalweg in AC16-Kardiomyozyten.

**A)** Repräsentative Western-Blots der am PI3K/AKT-Signalweg beteiligten Proteine. **B - J)** Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen. Die Daten basieren auf n = 6 unabhängige Zellpassagen für (B-C) und n = 4 unabhängige Zellpassagen für (D-J). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \* p ≤ 0,05.

Die Analyse der Proteinexpression zeigte, dass eine Herabregulation von Roquin-1 in AC16-Zellen mit einer signifikanten Abnahme der pAKT einhergeht. Zur Validierung dieser Beobachtung wurde eine Überexpression von Roquin-1 mittels Plasmid-Transfektion durchgeführt.

Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse wurde hierbei eine Zunahme der pAKT-Proteinexpression erwartet. Zu diesem Zweck wurden AC16-Zellen für 48 h mit einem *RC3H1*-Plasmid transfiziert und anschließend die Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse bestimmt (Abb. 16). Zunächst wurde die Überexpression bestätigt, indem die relative Proteinexpression der Roquin-1-Isoform zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe (K) und der mit dem *RC3H1*-Plasmid transfizierten Gruppe (PI-R1) verglichen wurde (Abb. 16 A). Im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %) betrug die Roquin-1 Proteinexpression in der PI-R1-Gruppe  $155,02 \pm 10,47$  %.

Nach Bestätigung der Roquin-1 Überexpression wurde die Proteinexpression von AKT und pAKT analysiert (Abb. 16 B). Während die Gesamtproteinexpression von AKT in beiden Gruppen vergleichbar war, zeigte sich für pAKT in der PI-R1-Gruppe ein Anstieg auf  $130,85 \pm 31,21$  %. Somit resultierte die Überexpression von Roquin-1 in einer erhöhten pAKT-Proteinmenge, was die Ergebnisse der siRNA-vermittelten Herabregulation von Roquin-1 konsistent ergänzt.

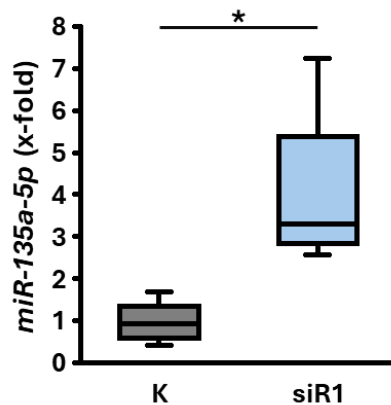


**Abbildung 16: Einfluss der *RC3H1*-Plasmidtransfektion auf die AKT in AC16-Kardiomyozyten.**

**A)** Repräsentativer Western-Blot sowie die zugehörige densitometrische Quantifizierung der Roquin-1-Proteinexpression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen: Kontrollgruppe (K) und mit dem *RC3H1*-Plasmid transfizierte Gruppe (PI-R1). **B)** Repräsentative Western-Blots und densitometrische Auswertungen der Proteinexpression von AKT und pAKT. Die Daten basieren auf  $n = 4$  unabhängige Zellpassagen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Tests; \*  $p \leq 0,05$ . Die Effektstärke nach Cohen ( $d = +1,17$ ) weist auf einen stark ausgeprägten Anstieg der pAKT-Proteinexpression in der PI-R1-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hin.<sup>79</sup>

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die signifikante Abnahme der pAKT als Folge einer Roquin-1-Herabregulation ursächlich auf die reduzierte Expression der regulatorischen PI3K Untereinheit p85 zurückzuführen ist (Abb. 15).

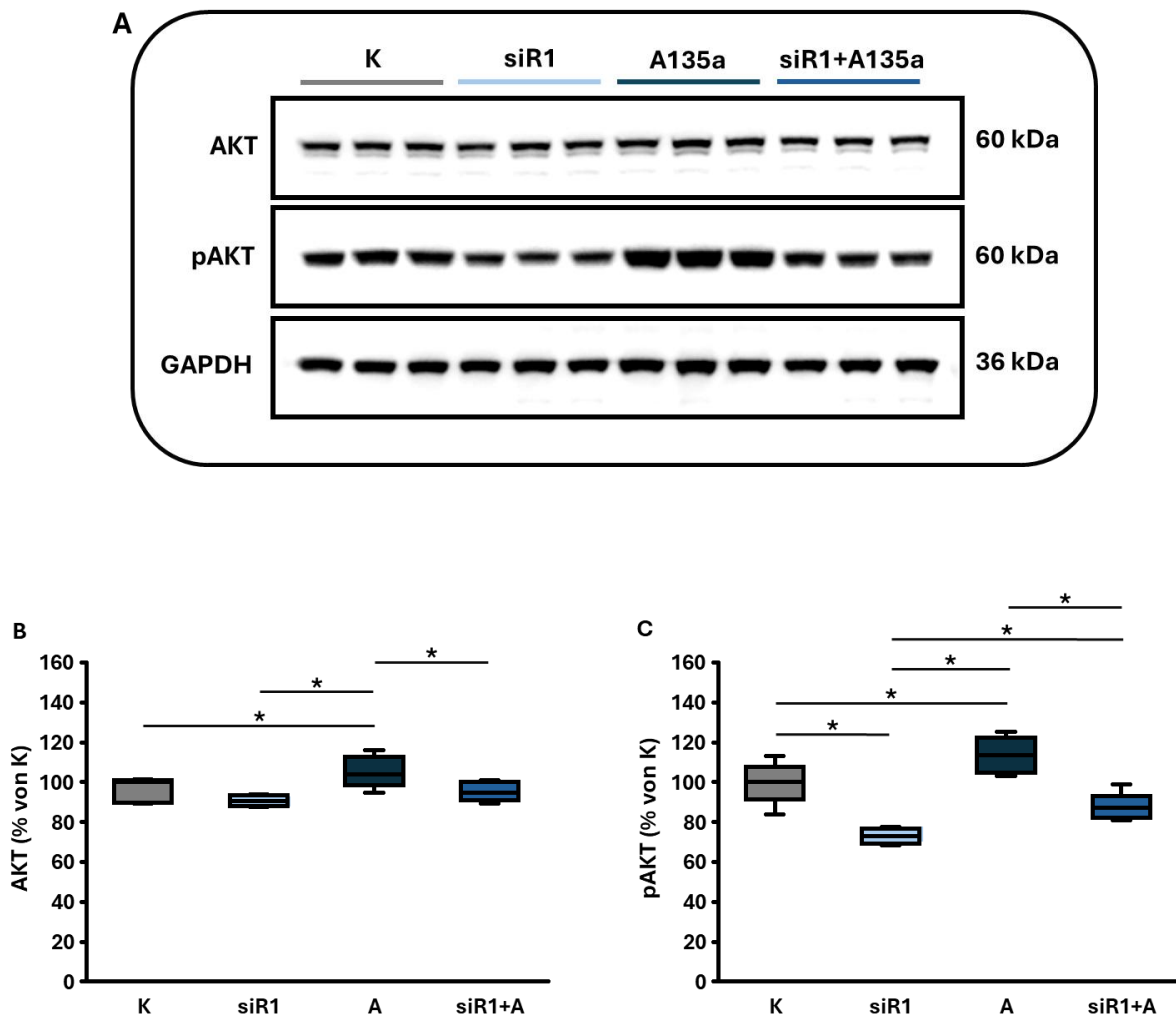
Da Roquin die Homöostase von miRNAs beeinflusst, die ihrerseits eine zentrale Rolle in der Regulation post-transkriptioneller Prozesse spielen, wurden mithilfe der Datenbank *TargetScan8.0* mehrere miRNAs identifiziert, die potenziell auf die p85-Untereinheit abzielen. Mittels microRNA-RT-qPCR konnte schließlich miR-135a-5p identifiziert werden (Abb. 17), deren Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $x\text{-fold} = 1$ ) bei *RC3H1*-Herabregulation durch siRNA-Transfektion (siR1) signifikant erhöht war ( $3,29 \pm 1,67$ ).



**Abbildung 17: Relative Expression von miR-135a-5p in siRNA-*RC3H1* transfizierten AC16-Kardiomyzyten.**

Dargestellt ist die relative miR-135a-5p-Expression der unbehandelten Kontrollgruppe (K) im Vergleich zu einer siRNA-*RC3H1* transfizierten Gruppe (siR1). Die Daten basieren auf  $n = 5$  unabhängige Zellpassagen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Tests; \*  $p \leq 0,05$ .

Zur Überprüfung der Kausalität zwischen den drei Komponenten der „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Achse“ wurden AC16-Zellen sowohl mit einer siRNA gegen *RC3H1* (siR1) als auch mit einem Antagomir gegen miR-135a-5p (A135a) transfiziert. Abbildung 18 A zeigt repräsentative Western-Blots der behandelten AC16-Zellen für AKT, phosphoryliertes AKT (pAKT) sowie die Beladungskontrolle GAPDH. Die Expression der Gesamt-AKT war in allen Behandlungsgruppen vergleichbar (Abb. 18 B), während für pAKT signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen festgestellt wurden (Abb. 18 C). Nach Herabregulation von Roquin-1 war die pAKT-Expression im Vergleich zur Kontrolle ( $K = 100\%$ ) signifikant reduziert und betrug  $72,91 \pm 3,45\%$ . Im Gegensatz dazu führte die alleinige Transfektion mit dem Antagomir gegen miR-135a-5p zu einem tendenziellen Anstieg der pAKT-Expression auf  $113,68 \pm 8,19\%$ , was darauf hindeutet, dass der Verlust von miR-135a-5p die inhibitorische Wirkung auf den PI3K/AKT-Signalweg aufhebt. In der kombinierten Behandlungsgruppe, in der sowohl Roquin-1 herabreguliert als auch miR-135a-5p gehemmt wurde, zeigte sich eine annähernd eine Normalisierung der pAKT ( $87,00 \pm 6,26\%$ ). Insgesamt stützen diese Ergebnisse die Existenz einer funktionellen „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Signalkaskade“.

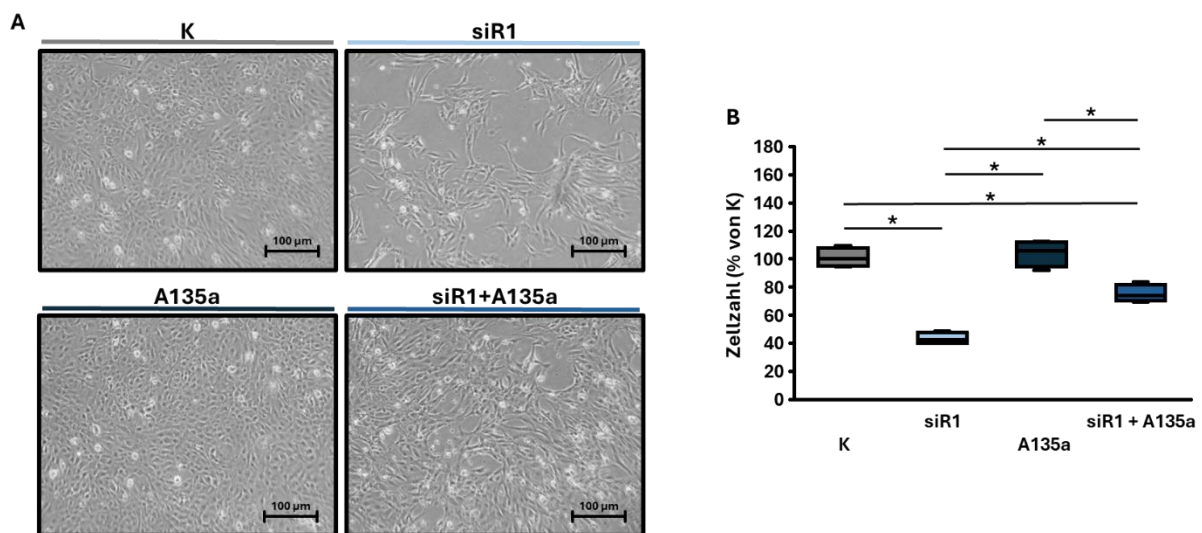


**Abbildung 18: Einfluss des Roquin-1-Knockdowns und der miR-135a-5p-Hemmung auf die AKT in AC16-Kardiomyozyten.**

**A)** Repräsentative Western-Blots nach Transfektion von AC16-Zellen mit einer siRNA gegen Roquin-1 (siR1) und/oder einem Antagomir gegen miR-135a-5p (A135a) für AKT, phosphoryliertes AKT (pAKT) und GAPDH als Beladungskontrolle. **B, C)** Quantifizierung der AKT und pAKT relativ zur Kontrolle (K = 100 %). Die Daten basieren auf n = 5 unabhängige Zellpassagen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Achse“ wurde unter identischen experimentellen Bedingungen eine lichtmikroskopische Beurteilung der Zellen durchgeführt, wobei gleichzeitig die Zellzahl erfasst wurde (Abb. 19). Die siRNA-vermittelte Herabregulation von Roquin-1 (siR1) führte im Vergleich zur Kontrollgruppe (K = 100%) zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl auf  $42,40 \pm 3,68$  %. Die alleinige

Hemmung der miR-135a-5p mittels Antagomir (A135a) zeigte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Zellzahl, was mit den beobachteten Veränderungen der pAKT-Expression vereinbar ist. In der kombinierten Behandlungsgruppe, in der sowohl Roquin-1 herabreguliert als auch miR-135a-5p gehemmt wurde, zeigte sich im Vergleich zur ausschließlich mit siRNA gegen *RC3H1* behandelten Gruppe ein signifikanter Anstieg der Zellzahl auf  $74,00 \pm 5,35\%$ . Diese Ergebnisse stimmen mit den Western-Blot-Daten überein und deuten darauf hin, dass der Verlust von Roquin-1 über eine miR-135a-5p-vermittelte Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs die Proliferation kardialer Zellen reduziert, was die zentrale Bedeutung dieses Signalwegs für das Zellüberleben und die Zellfunktion unterstreicht. Die Hemmung von miR-135a-5p wirkte diesem Effekt protektiv entgegen.



**Abbildung 19: Einfluss des Roquin-1-Knockdowns und der miR-135a-5p-Hemmung auf die Zellzahl humaner AC16-Kardiomyozyten.**

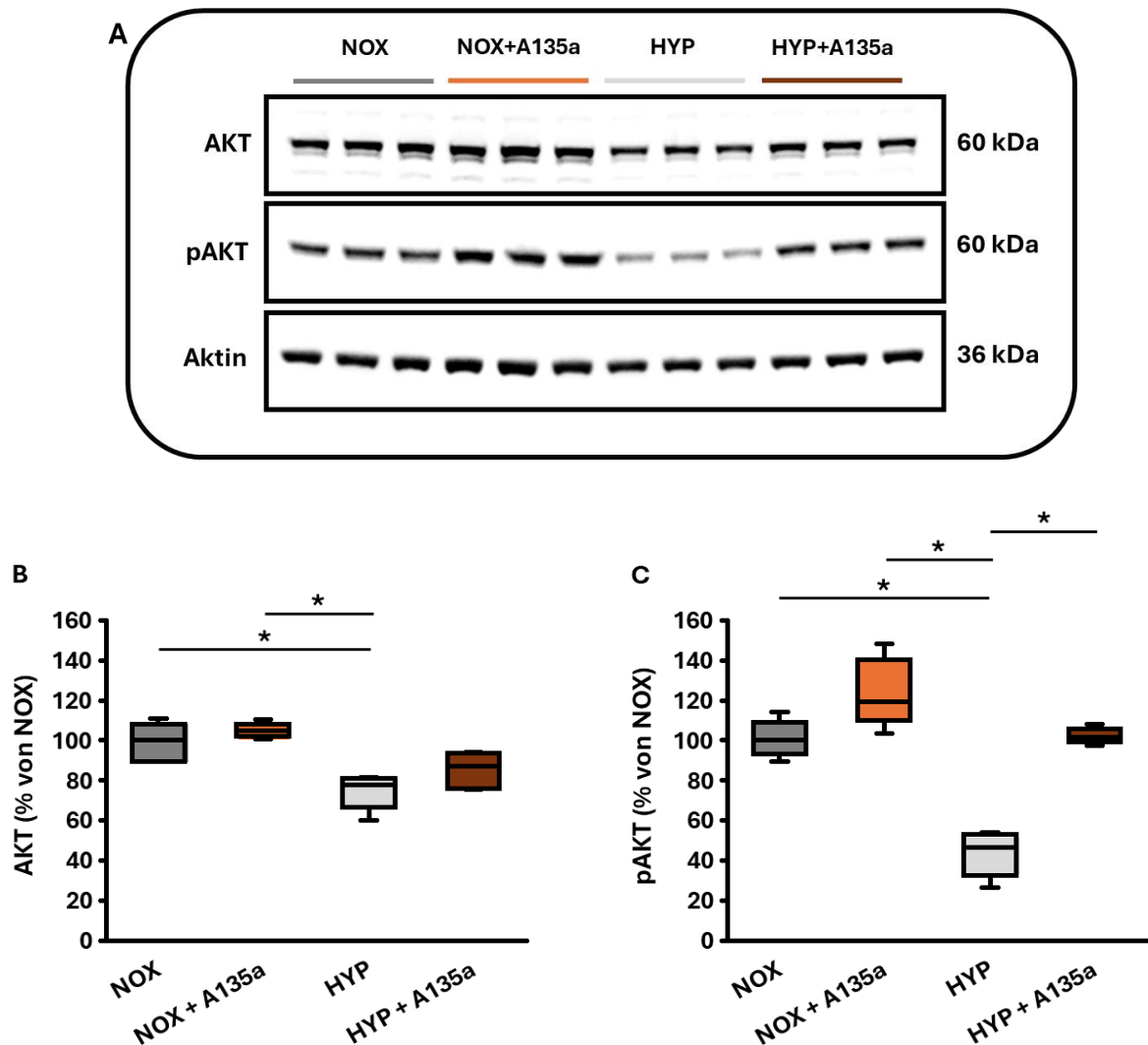
**A)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von AC16-Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe (K), der mit siRNA gegen *RC3H1* transfizierten Gruppe (siR1), der mit Antagomir gegen miR-135a-5p behandelten Gruppe (A135a) sowie der kombinierten Behandlungsgruppe (siR1+A135a).

**B)** Relative Zellzahl der unterschiedlichen Behandlungsgruppen, normiert auf die Kontrollgruppe (K = 100 %). Die Daten basieren auf n = 4 unabhängige Zellpassagen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \* p ≤ 0,05.

Im nächsten Schritt wurde das vorangegangene Experiment erneut durchgeführt, wobei die Herabregulation von Roquin-1 nicht durch siRNA-Transfektion, sondern durch die Exposition der AC16-Zellen gegenüber 48 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung nach dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Protokoll induziert wurde (Abb. 20).

Hierzu wurde eine unbehandelte normoxische Kontrollgruppe (NOX) sowie eine normoxische Versuchsgruppe mit Antagomir-vermittelter Hemmung der miR-135a-5p (A135a) gebildet. Parallel dazu wurden Zellen für 48 h unter hypoxischen Bedingungen (HYP) inkubiert, wobei auch hier eine Teilgruppe vorab mit A135a transfiziert wurde. Anschließend wurde die Proteinexpression der AKT und pAKT mittels Western-Blot analysiert. Bei der vergleichenden Betrachtung der normoxischen und hypoxischen Bedingungen zeigte sich unabhängig von der jeweiligen Transfektion und vom untersuchten Protein eine generelle Reduktion der Gesamtproteinmenge unter Hypoxie (Abb. 20 A). Die Expression der Gesamt-AKT unterschied sich unter normoxischen Bedingungen nicht signifikant zwischen der Kontrollgruppe und der A135a-behandelten Gruppe. Unter hypoxischen Bedingungen war die AKT-Proteinexpression hingegen reduziert ( $78,02 \pm 7,80 \%$ ), wobei die zusätzliche Hemmung von miR-135a-5p zu einem moderaten Anstieg auf  $86,98 \pm 7,94 \%$  führte. Deutlicher ausgeprägt waren die Effekte bei der Analyse der pAKT, da unter normoxischen Bedingungen die A135a-Transfektion einen Anstieg der pAKT-Expression auf  $119,20 \pm 15,35 \%$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte (Abb. 20 B). Hypoxie und Reoxygenierung führten zu einer ausgeprägten Reduktion der pAKT auf  $46,57 \pm 9,97 \%$ , wohingegen die Hemmung von miR-135a-5p diesen Effekt nahezu vollständig kompensierte und das pAKT-Signal auf ein Niveau vergleichbar mit normoxischen Bedingungen stabilisierte ( $101,71 \pm 3,53 \%$ ).

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die hypoxiebedingte Reduktion der Roquin-1-Expression mit einer verstärkten miR-135a-5p-vermittelten Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs einhergeht. Die gezielte Hemmung von miR-135a-5p wirkt diesem Mechanismus entgegen und trägt zur Aufrechterhaltung der AKT-Aktivierung unter hypoxischem Stress bei.

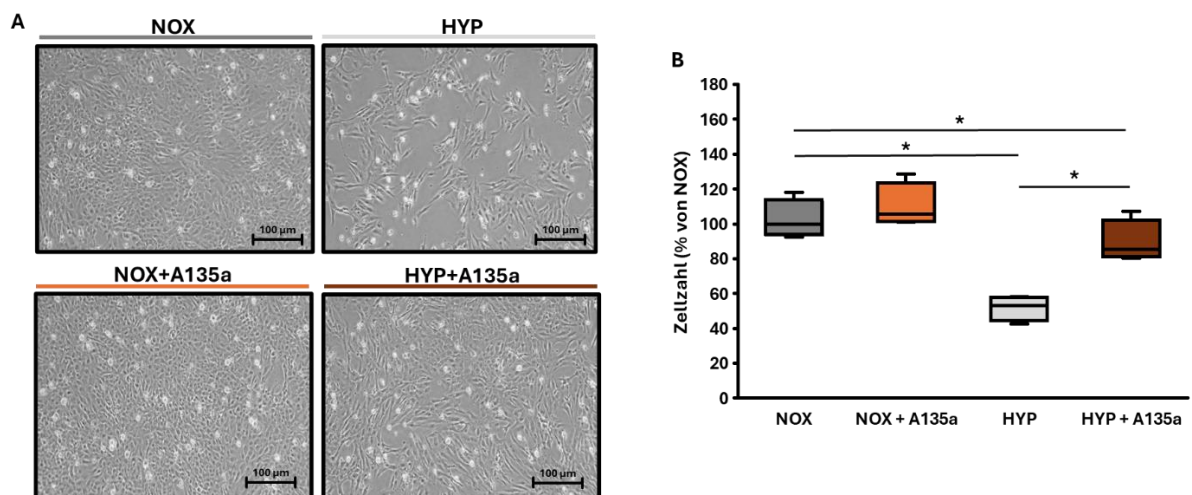


**Abbildung 20: Einfluss hypoxischer Bedingungen und der miR-135a-5p-Hemmung auf die AKT in AC16-Kardiomyozyten.**

**A)** Repräsentative Western-Blots nach Normoxie sowie Hypoxie (48 h) und Reoxygenierung (1 h). Bestimmt wurde die Proteinexpression für AKT, pAKT und die Beladungskontrolle Aktin unter den Konditionen: Normoxie (NOX), Normoxie + Antagomir135a (NOX+A135a), Hypoxie (HYP), Hypoxie + Antagomir135a (HYP+A135a). **B, C)** Densitometrische Auswertung der AKT und pAKT. Die Daten basieren auf n = 5 unabhängige Zellpassagen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Im Anschluss wurden auch unter diesen experimentellen Konditionen die funktionellen Auswirkungen der jeweiligen Behandlung auf zellulärer Ebene untersucht. Hierzu wurden für alle Versuchsbedingungen (NOX, HYP, NOX+A135a, HYP+A135a) lichtmikroskopische

Aufnahmen angefertigt, um die Zellzahl zu bestimmen (Abb. 21). Die normoxische Kontrollgruppe zeigte eine nahezu vollständig konfluente Zellschicht, während unter hypoxischen Bedingungen ausgeprägte zellfreie Areale detektiert wurden ( $53,28 \pm 6,14 \%$ ). Die Transfektion mit A135a führte unter normoxischen Bedingungen zu keiner signifikanten Veränderung der Zellzahl ( $105,74 \pm 10,97$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Demgegenüber wiesen AC16-Zellen, die vor der Hypoxie mit A135a transfiziert wurden, eine signifikant erhöhte Zellzahl ( $85,25 \pm 10,55$ ) im Vergleich zur reinen Hypoxie-Gruppe auf. Diese Ergebnisse bestätigen erneut, dass eine hypoxieinduzierte Herabregulation von Roquin-1 mit einer erhöhten Expression von miR-135a-5p einhergeht, wodurch der kardioprotektive PI3K/AKT-Signalweg gehemmt wird und in der Folge hypoxiebedingte zelluläre Schäden verstärkt auftreten.



**Abbildung 21: Einfluss hypoxischer Bedingungen und der Hemmung von miR-135a-5p auf die Zellzahl humaner AC16-Kardiomyozyten.**

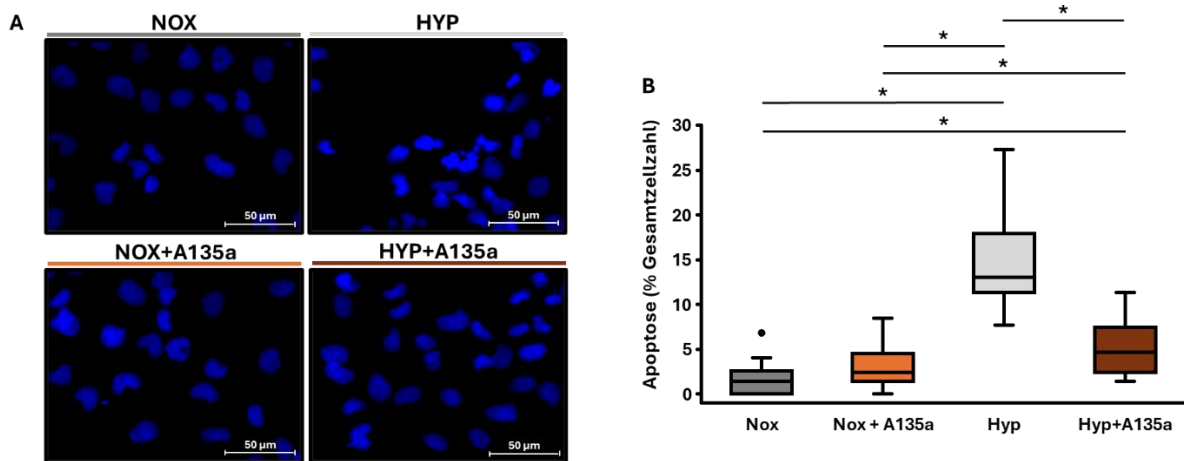
**A)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von AC16-Zellen unter normoxischen Bedingungen (NOX) sowie nach Hypoxie und Reoxygenierung (HYP). Hierbei wurden Kulturschalen mit und ohne Antagomir-vermittelter Hemmung der miR-135a-5p (A135a) verglichen. **B)** Quantitative densitometrische Auswertung der Zelldichte basierend auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen. Die Daten basieren auf  $n = 4$  unabhängige Zellpassagen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Die Beurteilung der Zellviabilität humaner AC16-Zellen erfolgte mittels kombinierter Hoechst-33342 und Propidiumjodid Färbung. Dieses Färbeverfahren ermöglicht die Differenzierung vitaler Zellen von apoptotischen und nekrotischen Zellen.<sup>80</sup>

Da sich nekrotische Zellen überwiegend von der Zellkulturschale abgelöst haben und sich im Zellkulturmedium befanden, wurde im vorliegenden Versuchsansatz ausschließlich die Beurteilung der Apoptose anhand der Hoechst-Färbung vorgenommen. Wie in Abbildung 22 dargestellt, wurde unter denselben Versuchsbedingungen wie zuvor der Anteil apoptotischer Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl bestimmt und als prozentualer Wert angegeben. Hierbei wurden sämtliche Zellkerne angefärbt, wobei apoptotische Zellen durch ein überstrahltes blaues Fluoreszenzsignal infolge der Kernkondensation identifiziert wurden.<sup>81</sup>

Unter normoxischen Bedingungen betrug der Anteil apoptotischer Zellen  $1,89 \pm 2,03$  %. Eine Transfektion mit A135a führte unter normoxischen Bedingungen zu einem vergleichbaren Apoptose-Anteil von  $2,70 \pm 1,99$  % und unterschied sich somit nicht von der normoxischen Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen auf  $14,56 \pm 4,34$  % im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Durch die Transfektion mit A135a unter hypoxischen Bedingungen konnte der Anteil apoptotischer Zellen signifikant auf  $5,21 \pm 2,96$  % reduziert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition der miR-135a-5p dem hypoxieinduzierten Funktionsverlust von Roquin-1 sowie der nachfolgenden Inaktivierung des AKT-Signalwegs, der zellschützende und anti-apoptotische Effekte vermittelt, effizient entgegenwirkt.



**Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Apoptoserate von AC16-Zellen nach Hoechst-33342-Färbung.**

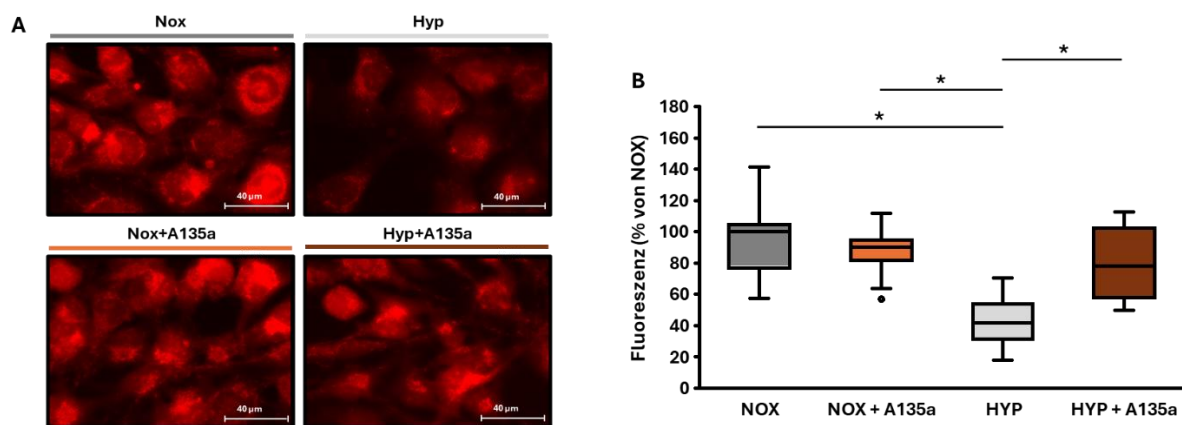
**A)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner AC16-Kardiomyozyten unter den Versuchsbedingungen: Normoxie (NOX), Normoxie + Antagomir135a (NOX+A135a), Hypoxie (HYP), Hypoxie + Antagomir135a (HYP+A135a). Die Zellkerne wurden mit Hoechst-33342 angefärbt. **B)** Quantitative Darstellung der Apoptoserate, angegeben als prozentualer Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl, für die jeweilige Versuchsbedingung. Die Daten basieren auf n = 5 unabhängigen Zellpassagen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

Der PI3K/AKT-Signalweg spielt eine zentrale Rolle für die mitochondriale Funktion und Vitalität von Kardiomyozyten. Unter hypoxischen Bedingungen transloziert das phosphorylierte pAKT zu den Mitochondrien, wo es zur Stabilisierung der mitochondrialen Atmungskette beiträgt, unter anderem durch den Erhalt der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität. Infolgedessen wird das mitochondriale Membranpotential aufrechterhalten, wodurch die Freisetzung von Cytochrom-c sowie die Aktivierung apoptotischer Signalwege reduziert werden.<sup>82</sup>

Da in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Inhibition von miR-135a-5p unter hypoxischen Bedingungen den PI3K/AKT-Signalweg effizient stabilisiert, könnte diese Intervention sowohl zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Vitalität als auch zur funktionellen Integrität der Mitochondrien beitragen. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden unter denselben Versuchsbedingungen wie zuvor die Mitochondrien in AC16-Zellen mittels MitoTracker™ angefärbt. Der Farbstoff akkumuliert in Abhängigkeit vom

mitochondrialen Membranpotential in den Mitochondrien und dient somit als Indikator für deren funktionelle Vitalität.

Wie in Abbildung 23 gezeigt, wurden die stärksten Fluoreszenzsignale in der normoxischen Kontrollgruppe sowie in den normoxischen A135a-transfizierten Zellen detektiert. Unter hypoxischen Bedingungen war die mitochondriale Fluoreszenz signifikant auf  $41,45 \pm 13,01$  % reduziert. Die Transfektion der AC16-Zellen mit A135a führte hingegen trotz anschließender Hypoxie und Reoxygenierung zu einer signifikanten Stabilisierung des mitochondrialen Fluoreszenzsignals auf  $78,23 \pm 22,06$  %.



**Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des mitochondrialen Membranpotentials von AC16-Zellen mittels MitoTracker™-Färbung.**

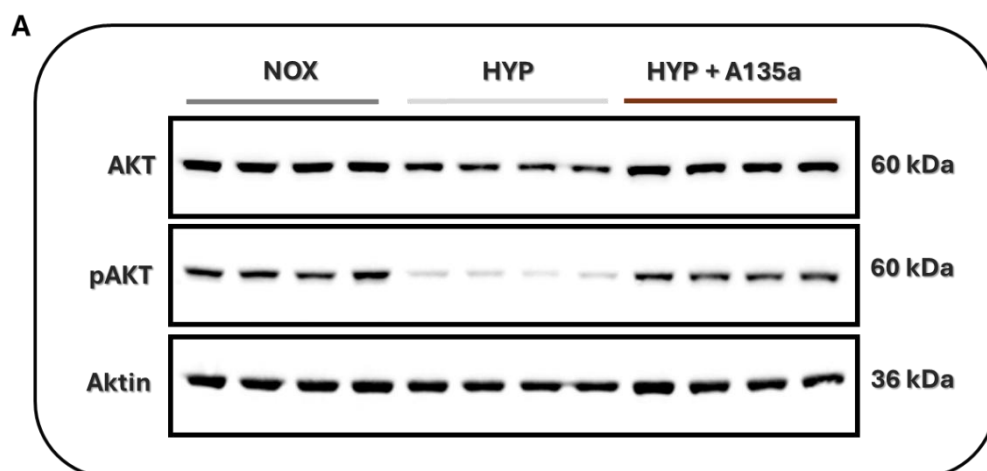
**A)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AC16-Zellen unter den Versuchsbedingungen: Normoxie (NOX), Normoxie + Antagomir135a (NOX+A135a), Hypoxie (HYP), Hypoxie + Antagomir135a (HYP+A135a). Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker™ angefärbt; die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Höhe des mitochondrialen Membranpotentials. **B)** Quantitative Darstellung der MitoTracker™-Fluoreszenzintensität als prozentualer Wert relativ zur normoxischen Kontrollgruppe. Die Daten basieren auf  $n = 6$  unabhängigen Zellpassagen mit jeweils  $n = 5$  Zellkulturschalen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \*  $p \leq 0,05$ .

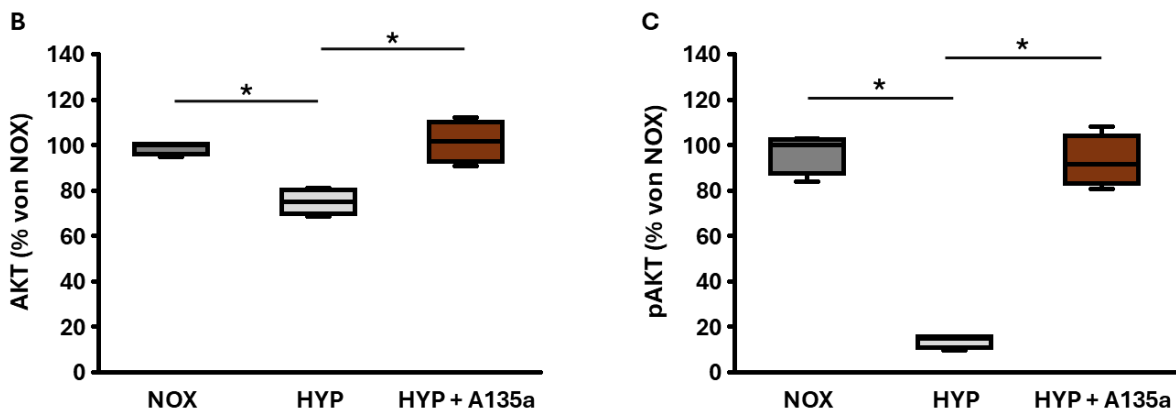
Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass Roquin-1 den PI3K/AKT-Signalweg im Herzen beeinflusst, indem es die zelluläre Homöostase von miR-135a-5p reguliert. miR-135a-5p wiederum hemmt die mRNA der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85, wodurch die

Signalübertragung auf AKT ebenfalls beeinträchtigt wird. Die Inhibition von miR-135a-5p vor hypoxischen Ereignissen führte nachweislich zu einer signifikanten Stabilisierung der Zellproliferation, der Integrität des Zellkerns sowie der mitochondrialen Funktion. Nach einem Myokardinfarkt könnte eine gezielte Inhibition von miR-135a-5p dazu beitragen, die Aktivität des AKT-Signalwegs aufrechtzuerhalten und kardioprotektive Effekte zu vermitteln.

Da in der klinischen Anwendung die Induktion kardioprotektiver Effekte nach Eintreten eines Infarkts (postischämisch) therapeutisch relevant ist, wurden AC16-Zellen für 48 h hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, um ein ischämisches Ereignis *in vitro* zu simulieren. Anschließend erfolgte die Transfektion mit A135a, gefolgt von einer 24-stündigen Reoxygenierung zur Simulation der Reperfusion. Nachfolgend wurden die AC16-Zellen für die Western-Blot-Analyse geerntet. Ziel dieses Versuchsansatzes war es den Einfluss einer posthypoxischen Inhibition von miR-135a-5p zu untersuchen. In Abbildung 24 A bis C sind die repräsentativen Western-Blots sowie die densitometrische Auswertung von AKT und pAKT dargestellt.

Unter hypoxischen Bedingungen war die Gesamt-AKT-Expression auf  $75,07 \pm 4,64$  % reduziert, während die pAKT-Expression auf  $15,04 \pm 2,56$  % sank. Die postischämische Transfektion mit A135a führte zu einer stabilen Gesamt-AKT-Proteinexpression ( $101,55 \pm 7,78$  %) und zu einer weitgehenden Wiederherstellung der pAKT-Expression ( $91,44 \pm 9,91$  %) auf das Niveau normoxischer Zellen.

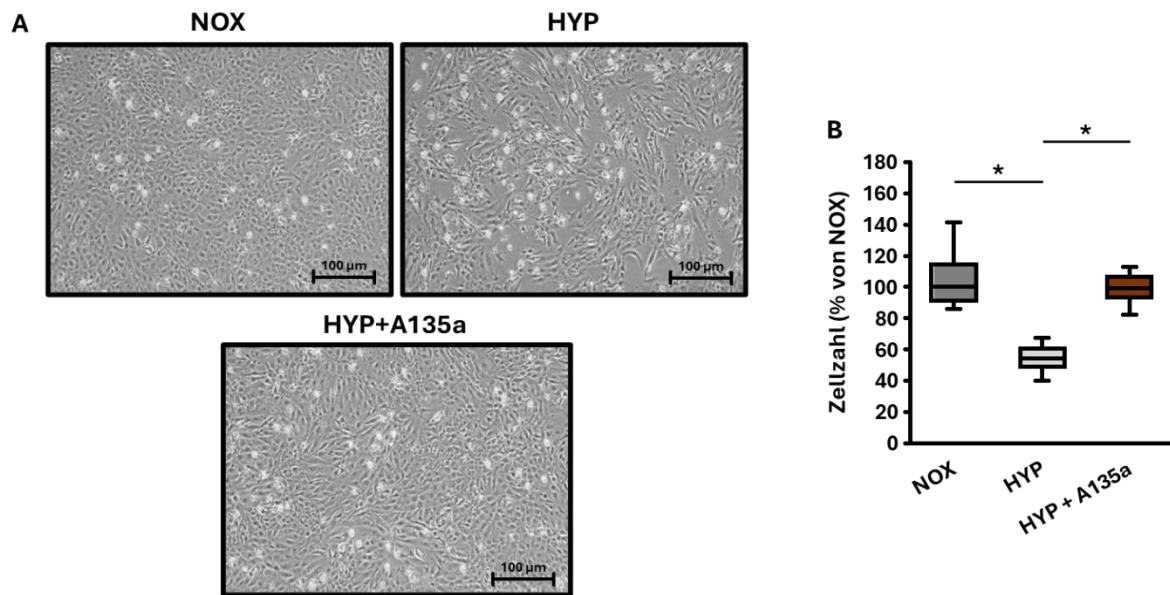




**Abbildung 24: Posthypoxische Western-Blot-Analyse der AKT- und pAKT-Proteinexpression in AC16-Zellen nach A135a-Transfektion.**

**A)** Repräsentative Western-Blots von AC16-Zellen unter normoxischen Kontrollbedingungen (NOX), nach 48 h Hypoxie und 24-stündiger Reoxygenierung (HYP) sowie nach posthypoxischer A135a-Transfektion (HYP+A135a). **B)** Densitometrische Auswertung der Gesamt-AKT-Proteinexpression, sowie der **C)** pAKT-E, angegeben als prozentualer Anteil relativ zur normoxischen Kontrollgruppe. Die Daten basieren auf  $n = 4$  unabhängigen Zellpassagen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \*:  $p \leq 0,05$ .

Um zu prüfen, ob die Stabilisierung der AKT-Aktivierung durch die posthypoxische A135a-Transfektion einen Einfluss auf die Zellzahl und damit das Zellüberleben hat, wurden die Experimente unter denselben Versuchsbedingungen wiederholt. Abbildung 25 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der drei zuvor beschriebenen Versuchsbedingungen. Während die Zellzahl nach Hypoxie und Reoxygenierung signifikant auf  $54,21 \pm 7,66$  % der normoxen Kontrolle reduziert war, führte die A135a-Transfektion mit anschließender Reoxygenierung zu einer Wiederherstellung der Zellzahl auf Kontrollniveau ( $99,07 \pm 7,60$  %).



**Abbildung 25: Analyse der Zellzahl humaner AC16-Zellen nach posthypoxischer A135a-Transfektion.**

**A)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der AC16-Zellen unter normoxischen Kontrollbedingungen (NOX), nach 48 h Hypoxie und 24-stündiger Reoxygenierung (HYP) sowie nach posthypoxischer A135a-Transfektion (HYP+A135a). **B)** Quantitative Darstellung der Zellzahl als prozentualer Anteil relativ zur normoxischen Kontrollgruppe. Die Daten basieren auf  $n = 4$  unabhängigen Zellpassagen mit je  $n = 4$  Zellkulturschalen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test; \*:  $p \leq 0,05$ .

Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Ergebnisse für die Existenz einer funktionellen „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Regulationsachse“ in humanen Kardiomyozyten, die unter hypoxischen und postischämischen Bedingungen zentrale Prozesse des Zellüberlebens sowie der mitochondrialen Funktion moduliert.

## 5. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen und manifestieren sich im Rahmen des akuten Koronarsyndroms häufig als Myokardinfarkt.<sup>1,83</sup> Die rasche Wiederherstellung des koronaren Blutflusses durch interventionelle oder chirurgische

Revaskularisation begrenzt zwar den Ischämie-bedingten Gewebeschaden, kann jedoch gleichzeitig einen Reperfusionsschaden auslösen, der die initiale Zellschädigung verstärkt und langfristig zum postischämischen Remodeling des Myokards beiträgt. Die gezielte Modulation molekularer Signalwege, die diese Prozesse begrenzen und kardioprotektive Mechanismen stabilisieren, ist daher von zentraler therapeutischer Bedeutung.<sup>84</sup>

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine molekulare Regulationsebene zu identifizieren, die intrazelluläre kardioprotektive Signalwege im Kontext des Reperfusionsschadens stabilisiert und damit zur langfristigen Erhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität des Herzmuskels beiträgt. Während das RNA-bindende Protein Roquin im Immunsystem bereits als post-transkriptioneller Regulator etabliert ist, der durch Destabilisierung spezifischer miRNAs zentrale Signalwege kontrolliert, wurde seine Rolle im Herzen bislang nicht untersucht.<sup>24</sup> In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Roquin im Myokard exprimiert wird, seine Expression unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen signifikant reguliert ist und es die Homöostase spezifischer miRNAs steuert, die essenzielle kardioprotektive Signalwege kontrollieren.<sup>85</sup>

Die Isoformen Roquin-1 und Roquin-2 wurden sowohl im Myokard adulter Ratten als auch in humanen Kardiomyozyten der AC16-Zelllinie eindeutig nachgewiesen. Dabei zeigten sich klare zelltypspezifische Expressionsmuster. Roquin-1 war sowohl in der myozytären als auch in der nicht-myozytären Fraktion vergleichbar stark exprimiert, wohingegen Roquin-2 nahezu ausschließlich in der myozytären Fraktion repräsentiert war (Abb. 6). Diese Befunde sprechen dafür, dass die beiden Isoformen zelltypspezifisch reguliert sind und funktionell differenzierte Rollen im Myokard übernehmen.

Unter hypoxischem Stress waren sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression beider Isoformen signifikant herabreguliert. Die Befunde legen nahe, dass Roquin an der molekularen Stressantwort des Myokards im Kontext von Ischämie und Reperfusion beteiligt ist.

Im weiteren Verlauf konnten zwei klar definierte regulatorische Achsen identifiziert werden, über die Roquin direkt in die miRNA-gesteuerte Regulation kardioprotektiver Signalwege eingreift.

Für die erste Achse wurde ZBTB20 als zentrales Zielmolekül charakterisiert. ZBTB20 ist ein zentraler Regulator der kardialen Kontraktilität und der Blutdruckregulation, der die Calcium-

Dynamik in Kardiomyozyten moduliert und über die Kontrolle von Phospholamban sowohl Inotropie als auch Lusitropie beeinflusst.<sup>86</sup> In der vorliegenden Arbeit zeigte die mRNA-Expression von ZBTB20 eine positive Korrelation mit dem linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP), was den funktionellen Zusammenhang zwischen ZBTB20-Expression und verbesserter mechanischer Herzleistung unterstreicht.<sup>87</sup> Als regulatorische miRNA wurde miR-23b-5p identifiziert, die spezifisch an die *ZBTB20*-mRNA bindet. Die persistierende Hochregulation von miR-23b-5p sieben Tage nach Reperfusion deutet darauf hin, dass diese miRNA nicht nur an der akuten Stressantwort beteiligt ist, sondern möglicherweise auch das mittel- und langfristige Remodeling beeinflusst. Die miRNA wird direkt durch Roquin-2 reguliert, dessen Expression unter ischämischen Bedingungen signifikant herabreguliert ist. Zusammenfassend bestätigen die kombinierten Expressions- und Korrelationsanalysen eine funktionell relevante „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Achse“, die die kardiale Funktion im Reperfusionskontext maßgeblich beeinflusst.

Darüber hinaus konnte eine zweite, unabhängige regulatorische Achse für Roquin-1 identifiziert werden. Hierbei konnte eine direkte Interaktion zwischen Roquin-1 und miR-135a-5p nachgewiesen werden, die mit einer Modulation der Expression der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85 einherging. Nach hypoxischen Ereignissen zeigte auch Roquin-1 auf mRNA- und Proteinebene eine signifikante Reduktion, was zu einer Hochregulation von miR-135a-5p führte. In der Folge kam es zu einer verminderten Expression der PI3K-Untereinheit p85 sowie zu einer reduzierten Phosphorylierung von AKT. Der PI3K/AKT-Signalweg ist als zentraler kardioprotektiver Signalweg im RISK-Pathway des Reperfusionsschadens verankert und vermittelt sowohl anti-apoptotische als auch metabolisch protektive Effekte.<sup>88,89</sup> Die Daten stützen das Vorliegen einer funktionellen „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Regulationsachse“, die auf zellulärer, subzellulärer und molekularer Ebene protektive Effekte vermittelt.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Roquin im Herzen differentiell exprimiert wird und maßgeblich an der molekularen Steuerung kardioprotektiver Prozesse des Reperfusionsschadens beteiligt ist. Beide Isoformen übernehmen klar definierte und voneinander abgrenzbare Funktionen innerhalb spezifischer miRNA-gesteuerter Signalachsen. Roquin spielt damit eine nachweislich zentrale Rolle im miRNA-vermittelten Remodeling des reperfundierten Myokards.

### 5.1 Roquin im kardiovaskulären Kontext

Eine präzise Regulation der Proteinexpression ist essenziell für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und Funktion. Transkription, Translation sowie ein kontrollierter Proteinabbau wirken hierbei koordiniert zusammen und sichern die intrazelluläre Proteinhomöostase. Eine zentrale Rolle in der post-transkriptionellen Genregulation spielen RNA-bindende Proteine (RBPs), die durch Interaktion mit mRNA oder miRNA die Stabilität und Translation von Transkripten modulieren.<sup>90,91</sup> Als Mitglied der RBP-Familie reguliert Roquin Zieltranskripte durch Bindung an spezifische Strukturelemente, insbesondere der Stammschleifenmotive innerhalb der 3'UTR von mRNAs und beeinflusst dadurch deren Stabilität und Translationseffizienz. Darüber hinaus ist Roquin auch an der Regulation nicht-kodierender RNAs beteiligt. Es kann die Stabilität bestimmter miRNAs beeinflussen und zu deren Destabilisierung beitragen.<sup>32</sup> Auf diese Weise wirkt Roquin nicht nur direkt auf Ziel-mRNAs, sondern moduliert zusätzlich indirekt die Genexpression über miRNA-abhängige Mechanismen. In einigen Fällen agiert Roquin funktionell in Kooperation mit Regnase-1. Während Regnase-1 Endonuklease-Aktivität besitzt, vermittelt Roquin vor allem die Rekrutierung von Abbaukomplexen an strukturell definierten RNA-Elementen.<sup>31,92</sup> Die Aktivität von Roquin selbst unterliegt einer proteolytischen Regulation durch MALT1. Im Rahmen der inflammatorischen Signaltransduktion vermittelt MALT1 eine proteolytische Spaltung von Roquin und schwächt dadurch dessen regulatorische Funktion ab.<sup>93</sup>

Funktionell wurde Roquin bislang überwiegend im Immunsystem charakterisiert, wo es maßgeblich an der Regulation von T-Zell-Aktivierung und inflammatorischen Prozessen beteiligt ist.<sup>24,94</sup> Transkriptomanalysen deuten jedoch darauf hin, dass Roquin nicht ausschließlich in Immunzellen exprimiert wird. Datenbanken wie der Human Protein Atlas zeigen, dass die Gene *RC3H1* und *RC3H2* in einer Vielzahl menschlicher Gewebe exprimiert werden, darunter Haut, Gehirn, Niere und Lunge.<sup>95</sup> Die geringe Gewebespezifität spricht für eine eher ubiquitäre Expression und legt nahe, dass Roquin potenziell eine breite physiologische Funktion besitzt, was durch die Beobachtung unterstrichen wird, dass Mäuse mit vollständiger Inaktivierung von Roquin bereits kurz nach der Geburt nicht überlebensfähig sind. Die perinatale Letalität verdeutlicht, dass Roquin für die frühe Entwicklung und das Überleben unerlässlich ist, wobei seine Funktion weit über immunologische Aufgaben hinausreicht.<sup>96</sup>

Vor dem Hintergrund der gezielten Modulation molekularer Signalwege zur Begrenzung des Reperfusionsschadens und zur Stabilisierung kardioprotektiver Mechanismen wurde Roquin in der vorliegenden Arbeit erstmals im kardialen System untersucht. Dabei konnte sowohl die relative mRNA- als auch die Proteinexpression von Roquin-1 und Roquin-2 in terminal differenzierten Rattenkardiomyozyten sowie in der humanen Kardiomyozyten-Zelllinie AC16 bestätigt werden (Abb. 4, 6). Die Verwendung beider Modellsysteme bietet methodische Vorteile, ist jedoch mit spezifischen Limitationen verbunden. Humane AC16-Zellen ermöglichen eine direkte Übertragbarkeit auf den Menschen. Zudem lassen sich experimentelle Bedingungen präzise steuern, etwa durch definierte Hypoxie-Reoxygenierungsprotokolle zur Simulation des Ischämie-Reperfusionsschadens sowie durch Plasmid- oder siRNA-Transfektionen zur gezielten Modulation von Roquin. *In vitro*-Experimente mit AC16-Zellen ermöglichen eine präzise Kontrolle experimenteller Bedingungen sowie eine effiziente Untersuchung molekularer Signalwege bei geringer biologischer Variabilität.<sup>97</sup> Eine Limitation besteht jedoch darin, dass immortalisierte Zelllinien die charakteristischen Merkmale adulter, zur Kontraktion befähigter Kardiomyozyten nur eingeschränkt abbilden.<sup>98</sup>

Im Vergleich dazu erlauben Untersuchungen am Rattenherz nach experimenteller Ischämie und Reperfusion die Effekte von Roquin am intakten Gewebe unter physiologischen Bedingungen zu beurteilen. Hierbei können sowohl strukturelle Gewebeschäden als auch entzündliche und Remodeling-assoziierte Prozesse im Kontext des gesamten Organs analysiert werden, was eine hohe pathophysiologische Relevanz besitzt.<sup>99</sup> Allerdings ist die Übertragbarkeit auf den Menschen durch Speziesunterschiede limitiert.<sup>100</sup> Zusätzlich schränkt das Fehlen eines spezifischen Antikörpers gegen Roquin aus der Ratte die Analyse auf Proteinebene erheblich ein, da Expression und Lokalisation nur eingeschränkt untersucht werden können. Darüber hinaus sind tierexperimentelle Modelle mit höherer biologischer Variabilität und eingeschränkter molekularer Manipulierbarkeit verbunden. Die Kombination beider Systeme ermöglicht somit eine methodisch fundierte Verknüpfung der molekularen Charakterisierung Roquin-abhängiger Signal- und Regulationsprozesse im humanen Zellmodell mit der funktionellen Validierung dieser Befunde im physiologisch relevanten Gesamtorganismus.

Bei differenzierter Analyse der mRNA-Expression beider Isoformen in Myozyten (MZ) und Nicht-Myozyten (NMZ) zeigten sich zelltypspezifische Unterschiede. Während die Expression von *RC3H1* in beiden Zellfraktionen vergleichbar exprimiert wird, lässt sich *RC3H2* in den NMZ kaum nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass Roquin-2 eine stärkere myozytenspezifische und möglicherweise funktionell dominantere Rolle in Kardiomyozyten einnimmt (Abb. 6). Um die Rolle von Roquin im Kontext des kardialen Remodelings nach einem Infarkt zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob hypoxische Ereignisse die Expression der beiden Roquin-Isoformen beeinflussen. Sowohl *in vitro* am Modell der Hypoxie- und Reoxygenierung humaner AC16-Zellen als auch *in vivo* am Ischämie-Reperusionsmodell adulter Rattenherzen zeigte sich eine signifikante Herabregulation der mRNA-Expression von *RC3H1* und *RC3H2* (Abb. 7, 8). Bemerkenswert ist, dass die mRNA-Expression von Roquin-1 durch Prä- und Postkonditionierung wieder auf Normwerte zurückgeführt wurde, während die Roquin-2-Expression unbeeinflusst blieb, obwohl beide Interventionen etablierte protektive Signalprogramme aktivieren.<sup>101</sup> Diese isoformspezifische Reaktion spricht gegen eine klassische konditionierungsinduzierte Transkriptionsregulation für Roquin-2. Vielmehr deutet sie darauf hin, dass Roquin-2 unabhängig von akuten transkriptionellen Stimuli als konstitutiver regulatorischer Faktor in kardialen Signalprozessen wirkt, während Roquin-1 offenbar direkt auf konditionierungsinduzierte Mechanismen anspricht.

Im Gegensatz dazu zeigten weder Regnase-1 noch MALT1 eine Regulation durch Hypoxie-Reoxygenierung oder Ischämie-Reperfusion, weshalb diese Kandidaten im Ergebnisteil dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden.

Zusammenfassend konnte erstmalig die Expression von Roquin im kardiovaskulären System nachgewiesen werden, wobei die hypoxieabhängige Regulation auf eine aktive Beteiligung an den unmittelbar folgenden kardialen Anpassungsreaktionen hindeutet.

## **5.2 Die Bedeutung der „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Regulationsachse“ für das Remodeling des postischämischen Myokards**

Bekanntermaßen wird Roquin eine zentrale Rolle bei der Regulation der miRNA-Homöostase zugeschrieben.<sup>32</sup> Vor diesem Hintergrund wurde in der integrativen microRNA-mRNA-Analyse miR-23b-5p als Kandidat mit inverser Korrelation zur *RC3H2*-Expression identifiziert, während

ZBTB20 als funktionell relevantes Zielmolekül hervorging (Abb. 9). Die experimentelle Validierung in hypoxischen AC16-Zellen, im I/R-Modell des adulten Rattenherzens sowie nach gezieltem Roquin-2-Knockdown stützen das Vorliegen einer „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Regulationsachse“ (Abb. 10, 11, 13). Die partielle Normalisierung der *ZBTB20*-mRNA-Expressions nach Inhibition von miR-23b-5p unter Roquin-2-Suppression spricht dabei für einen kausalen Zusammenhang und weist auf eine funktionelle Hierarchie innerhalb dieser Achse hin (Abb. 14). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welche funktionellen Konsequenzen eine Suppression von ZBTB20 im postischämischen Myokard haben könnte und inwiefern eine therapeutische Stabilisierung der Achse potenziell protektive Effekte entfalten kann.

Um die funktionelle Bedeutung im kardiovaskulären Kontext einzuordnen, ist die biologische Rolle von ZBTB20 zu betrachten. ZBTB20 bindet über seine Zinkfinger-Domäne an spezifische DNA-Sequenzen und reguliert als Transkriptionsfaktor die Genexpression, während die BTB-Domäne an der Rekrutierung von Korepressoren oder -aktivatoren beteiligt ist. Im Herz-Kreislaufsystem ist ZBTB20 essenziell für die physiologische Entwicklung der Herzkammern sowie für die Aufrechterhaltung von Myokardkontraktilität und Blutdruckhomöostase. *ZBTB20*-Knockout-Mäuse entwickelten bereits im Alter von 16 Tagen eine ausgeprägte arterielle Hypertonie, begleitet von einer signifikanten Reduktion der Herzgröße, der linksventrikulären Wanddicke sowie der Kardiomyozytengröße. Echokardiographische Untersuchungen zeigten zudem eine deutlich eingeschränkte Kontraktilität und einen verminderten ATP-Gehalt des Myokards. Diese Befunde unterstreichen die zentrale Bedeutung von ZBTB20 für Herzentwicklung, Energiestoffwechsel und kontraktile Funktion.<sup>102</sup> Vor dem Hintergrund seiner beschriebenen Funktion wurde im Ischämie-Reperfusion-Modell untersucht, inwieweit ZBTB20 protektiv wirkt. Dabei zeigte sich, dass eine kardiale Überexpression von ZBTB20 das maladaptive postischämische Remodeling signifikant reduzierte.<sup>12</sup> Ergänzend konnte in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen der *ZBTB20*-mRNA-Expression und dem linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP) nachgewiesen werden (Abb. 9 D), was auf eine funktionelle Relevanz von ZBTB20 für die kardiale Leistungsfähigkeit hinweist.

Im Kontext etablierter Strategien der Myokardprotektion, ist neben einer raschen Reperfusion insbesondere die Begrenzung des Reperfusionsschadens und die Beeinflussung des frühen

Remodelings von entscheidender Bedeutung für die langfristige Prognose nach akutem Myokardinfarkt.<sup>84</sup> Zu den experimentell am besten charakterisierten Strategien zählen das ischämische *Preconditioning* (IPC) und das ischämische *Postconditioning* (IPoC), die auf kurzen repetitiven Ischämie-/Reperfusionszyklen beruhen und kardioprotektive RISK- und SAFE-Signalwege aktivieren.<sup>103</sup> Während IPC in präklinischen Modellen hoch effizient ist, ist seine klinische Anwendbarkeit limitiert, da die Ischämie bei einem akuten Myokardinfarkt in der Regel nicht antizipiert werden kann. Demgegenüber besitzt IPoC eine unmittelbare klinische Relevanz, da es zum Zeitpunkt der Reperfusion, beispielsweise im Rahmen einer primären perkutanen Koronarintervention (PCI) durchgeführt werden kann.<sup>104</sup>

Obwohl beide Strategien in experimentellen Kurzzeitmodellen konsistent eine Reduktion der Infarktgröße zeigen, bleibt ihr langfristiger funktioneller Nutzen kontrovers. Mehrere klinische Studien konnten keinen nachhaltigen Vorteil von IPoC hinsichtlich Mortalität oder Hospitalisierungsrate nachweisen. Diese Diskrepanz zwischen experimenteller Infarktgrößenreduktion und fehlender klinischer Translation deutet darauf hin, dass zentrale molekulare Prozesse des postischämischen Remodelings möglicherweise nicht ausreichend adressiert werden.<sup>50</sup>

In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass sowohl im Langzeit-I/R-Modell (45 min Ischämie, 7 Tage Reperfusion) als auch im akuten Hypoxie-Reoxygenierungsmodell der AC16-Zellen (48 h Hypoxie, 1 h Reoxygenierung) eine signifikante Reduktion von *RC3H2* und *ZBTB20* nachweisbar war (Abb. 10, 11). Dies spricht gegen einen transienten Effekt unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis und legt vielmehr nahe, dass die Suppression von *ZBTB20* zu einer persistierenden funktionellen Beeinträchtigung beitragen könnte. Da *ZBTB20* funktionell mit kontraktile Leistungsfähigkeit und metabolischer Stabilität des Myokards verknüpft ist, wie die vorliegenden Daten nahelegen, könnte das Ausbleiben einer Reaktivierung dieser transkriptionellen Achse eine Erklärung dafür liefern, weshalb Konditionierungsstrategien zwar die akute Zellschädigung begrenzen, jedoch nicht zwangsläufig eine nachhaltige funktionelle Erholung gewährleisten.

Die „Roquin-2 – miR-23b-5p – *ZBTB20*-Regulationsachse“ beschreibt damit einen bislang nicht berücksichtigten Regulationsmechanismus, der über klassische RISK-/SAFE-Signalwege hinausgeht und längerfristige transkriptionelle Programme beeinflusst. Die persistierende

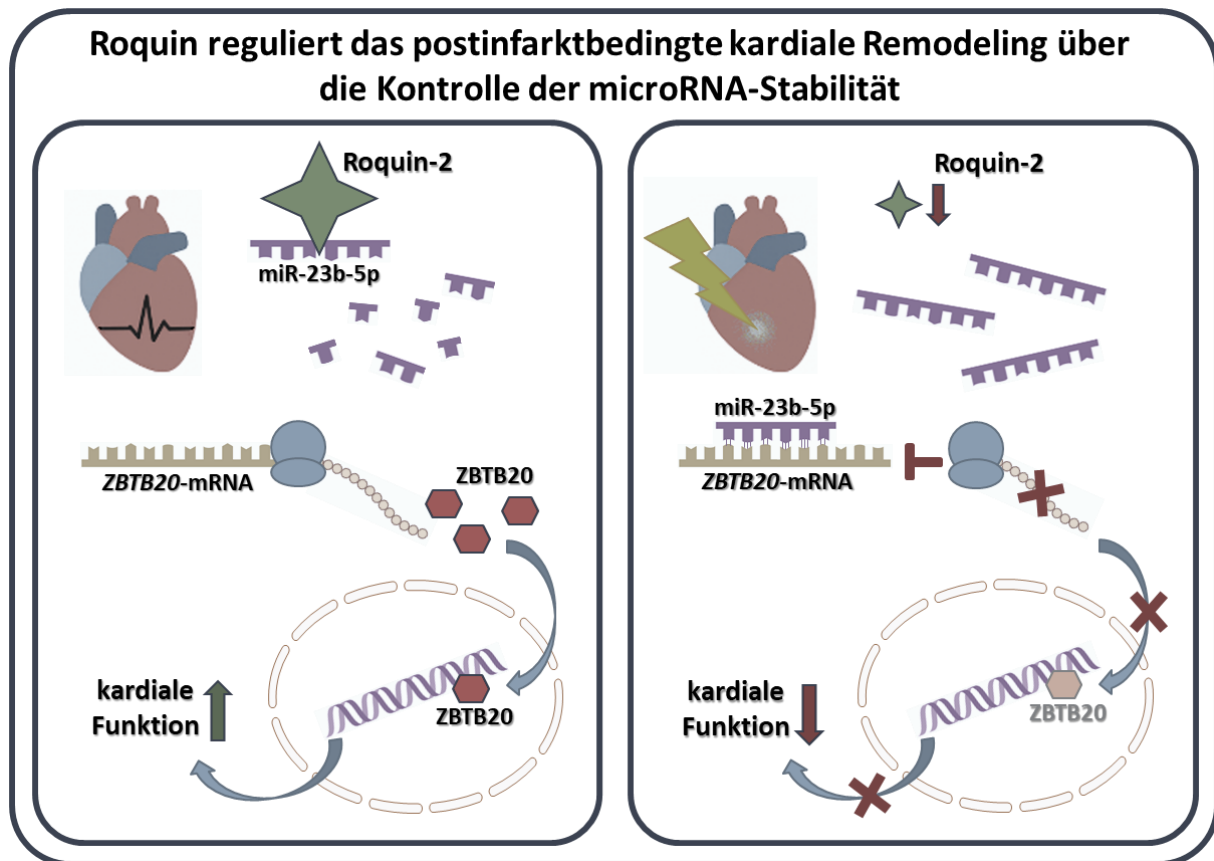
Suppression von ZBTB20 nach I/R könnte zu einem maladaptem Remodeling beitragen und somit zumindest teilweise erklären, weshalb etablierte Konditionierungsstrategien bislang keinen durchgreifenden klinischen Nutzen zeigen.

Eine wesentliche Limitation der vorliegenden Studie liegt in ihrem primär mRNA-basierten Ansatz. Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers zur Detektion von Roquin-2 im Rattengewebe konnte die Proteinexpression im *in vivo*-Modell nicht umfassend untersucht werden. Analysen auf Proteinebene waren daher auf die humane AC16-Zelllinie beschränkt und erlauben keine vollständige Übertragbarkeit auf das adulte Rattenherz. Gleichwohl zeigte sich über unterschiedliche Modelle und Zeitpunkte hinweg eine konsistente Reduktion der ZBTB20-mRNA-Expression, sowohl im akuten Hypoxie-Reoxygenierungs- als auch im Langzeit-I/R-Modell. Insbesondere die persistierende mRNA-Reduktion nach sieben Tagen Reperfusion spricht gegen einen rein transienten Effekt und legt nahe, dass auch eine reduzierte ZBTB20-Proteinexpression vorliegen könnte. Eine direkte Validierung dieser Annahme steht jedoch aus und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Hierbei wären insbesondere Analysen der Proteinexpression, der subzellulären Lokalisation sowie funktioneller Downstream-Targets von ZBTB20 erforderlich, um die Regulationsachse weiter zu präzisieren.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Studie besteht darin, dass die *in vivo*-I/R-Versuche ausschließlich an weiblichen Ratten durchgeführt wurden und die *in vitro*-Untersuchungen an der AC16-Zelllinie erfolgten, deren geschlechtsspezifischer Ursprung unklar ist. Präklinische Studien zum MI wurden überwiegend an männlichen Tieren durchgeführt, sodass Daten zu weiblichen Tieren bislang nur in begrenztem Umfang vorliegen.<sup>105</sup> Geschlechtsspezifische Unterschiede in der kardialen Stressantwort sind gut dokumentiert, unter anderem vermittelt durch hormonelle Effekte wie den Östrogenhaushalt auf mitochondriale Funktion, oxidativen Stress und die Aktivierung kardioprotektiver Signalwege. Interessanterweise stehen diese experimentellen Befunde teilweise im Gegensatz zu klinischen Beobachtungen, bei denen Frauen nach Myokardinfarkt häufig eine ungünstigere Prognose aufweisen.<sup>106</sup> Obwohl die Verwendung weiblicher Tiere in dieser Arbeit wertvolle Daten zu einem bislang wenig untersuchten Bereich liefert, wäre eine direkte vergleichende Analyse an männlichen Tieren erforderlich, um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede in den hier identifizierten Roquin-abhängigen Signalachsen vollständig zu erfassen.

Die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe betrug  $n = 5$ . Diese Stichprobengröße wurde unter Berücksichtigung des 3R-Prinzips (Replacement, Reduction, Refinement) gewählt, wie es von Russel & Burch (1959) definiert wurde, um einen verantwortungsvollen und ressourcenschonenden Einsatz von Versuchstieren als auch ethische Standards in der Forschung sicherzustellen.<sup>107</sup> Trotz der geringen Tierzahl konnten konsistente Effekte über mehrere unabhängige Experimente hinweg beobachtet werden. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass größere Stichprobengrößen die statistische Aussagekraft weiter erhöhen würden.

Zusammenfassend identifiziert die vorliegende Arbeit erstmals eine Roquin-abhängige miRNA-Regulationsachse in Kardiomyozyten, die unter hypoxischen Bedingungen zu einer miR-23b-5p-vermittelten Suppression von *ZBTB20* führt und mit einer reduzierten kardialen Funktion assoziiert ist. Diese Achse stellt einen neuartigen molekularen Erklärungsansatz für persistierende postischämische Funktionsstörungen dar und unterstützt die Hypothese, dass etablierte kardioprotektive Strategien wie Prä- und Postkonditionierung hypoxieinduzierte transkriptionelle Anpassungsmechanismen nicht vollständig reaktivieren. Eine weiterführende proteomische Charakterisierung im Langzeit-I/R-Modell könnte dazu beitragen, zusätzlich therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, die über bislang adressierte akute Überlebenssignalwege hinausgehen und langfristige Remodeling-Prozesse gezielt modulieren.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Regulationsachse“.**

**Links:** Unter physiologischen Bedingungen reguliert Roquin-2 die Stabilität von miR-23b-5p, sodass die *ZBTB20*-mRNA translatiert werden kann und ZBTB20 seine Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern zur Aufrechterhaltung der kardialen Funktion ausübt. **Rechts:** Nach MI ist die Roquin-2-Expression reduziert, was zu einer Stabilisierung von miR-23b-5p führt. Dadurch wird die Translation der *ZBTB20*-mRNA gehemmt und die kardiale Funktion beeinträchtigt.

### 5.3 Die „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Regulationsachse“ als potenzieller Regulator kardioprotektiver Anpassungsreaktionen unter hypoxischen Bedingungen

Die immunologische Studie der Arbeitsgruppe um Professor Heißmeyer zeigt, dass das Protein Roquin den PI3K/AKT-Signalweg regulatorisch hemmt und dadurch Autoimmunität verhindert. Dieser Effekt beruht darauf, dass Roquin die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen sowie die Spezialisierung regulatorischer Treg-Zellen begrenzt. Die Hemmung erfolgt über eine Hochregulation von PTEN, bei der Roquin die Bindung des miRNA-Clusters miR-17~92 an die 3'-UTR der PTEN-mRNA stört. Dies führt zu einer erhöhten PTEN-Proteinexpression, wodurch PTEN vermehrt seinen funktionellen Gegenspieler PIP3

dephosphoryliert und somit die Aktivierung der AKT verhindert wird.<sup>24</sup> Da der PI3K/AKT-Signalweg ein zentraler Bestandteil des kardioprotektiven RISK-Signalwegs ist, ergab sich die Hypothese, dass Roquin auch im kardiovaskulären Kontext als potenzieller molekularer Schalter dieses Signalwegs fungieren könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte, die im Immunsystem beschriebene Regulationsachse im Herzen jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den dort beschriebenen molekularen Mechanismen führte in unserem Modell eine durch hypoxische Ereignisse induzierte Herabregulation von Roquin-1 zu einer korrespondierenden Abnahme der pAKT-Proteinexpression. Basierend auf den Befunden in humanen AC16-Kardiomyozyten konnte somit eine weitere Regulationsachse identifiziert werden: Nach einem Myokardinfarkt führt die durch hypoxische Ereignisse bedingte Herabregulation von Roquin zu einer erhöhten Expression von miR-135a-5p. Diese miRNA hemmt die mRNA der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85, was in einer verminderten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs und folglich einer reduzierten pAKT-vermittelten Signaltransduktion resultiert (Abb. 4, 6).

Eine verminderte AKT-Aktivität kann weitreichende Auswirkungen auf nachgeschaltete Signalwege im ischämischen Myokard haben, da AKT zentrale kardioprotektive Prozesse über mehrere Downstream-Effektoren reguliert.<sup>108</sup> Dazu zählen angiogene Signalwege, die über Effektoren wie eNOS und VEGF vermittelt werden, sowie metabolische Adaptionsprozesse und Zellwachstum, die über das mechanistic target of rapamycin (mTOR) reguliert werden. Gleichzeitig induziert AKT anti-apoptotische Effekte, unter anderem durch die Inhibition von GSK-3 $\beta$  und Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie, welche an der Regulation von Apoptose, oxidativem Stress und Zellzyklusprozessen beteiligt sind.<sup>109</sup> Eine Abnahme der AKT-Aktivität durch hypoxische Ereignisse (Abb. 15, 20), kann daher zu einer verstärkten Aktivierung dieser Faktoren führen und Prozesse wie Apoptose, gestörte Angiogenese und maladaptives kardiales Remodeling nach einem Myokardinfarkt begünstigen.<sup>110</sup>

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Regulationsachse“ könnte einen zusätzlichen molekularen Mechanismus darstellen, der die verminderte Aktivierung dieses Signalwegs unter hypoxischen Ereignissen erklärt. Die funktionellen Experimente zeigen, dass eine Herabregulation von Roquin-1 mit einer deutlichen Beeinträchtigung zellulärer Überlebensmechanismen einhergeht. So führte die reduzierte Expression von Roquin-1 nach Hypoxie-Reoxygenierung zu einer signifikanten

Abnahme der Zellzahl (Abb. 19, 20). Darüber hinaus konnte unter diesen Bedingungen eine erhöhte Apoptoserate beobachtet werden (Abb. 22). Ergänzend zeigte sich eine deutliche Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials, welches als sensibler Marker für mitochondriale Dysfunktion und frühe apoptotische Prozesse gilt (Abb. 23).<sup>111</sup> Diese Befunde stehen im Einklang mit der verminderten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, da AKT unter physiologischen Bedingungen zentrale anti-apoptotische und mitochondriale Schutzmechanismen vermittelt.<sup>112</sup>

MiRNAs rücken zunehmend in den Fokus der biomedizinischen Forschung, nicht nur in der Onkologie, sondern auch als potenzielle therapeutische Interventionen bei Myokardinfarkten.<sup>113,114</sup> Aus den Befunden der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass die Inhibition von miR-135a-5p mittels eines Antagomirs in AC16-Zellen unter hypoxischen Bedingungen die Zellzahl stabilisierte, die Apoptoserate reduzierte und zudem das mitochondriale Membranpotential nahezu auf Kontrollniveau hielt (Abb. 21-23). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur die Stabilisierung der Roquin-Expression nach einem Infarkt, sondern auch die gezielte Hemmung der Überexpression von miR-135a-5p eine vielversprechende Möglichkeit darstellt, die kardioprotektiven Mechanismen des PI3K/AKT-Signalwegs aufrechtzuerhalten.

Klinisch erscheint insbesondere ein postischämischer Ansatz therapeutisch relevant. Erste posthypoxische Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Behandlung der AC16-Zellen mit einem Antagomir gegen miR-135a-5p nach Hypoxie-Reoxygenierung ebenfalls protektive Effekte ausüben kann. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine Stabilisierung der pAKT-Proteinexpression, die mit einer gleichzeitigen Stabilisierung der Zellzahl einherging (Abb. 24, 25). Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine gezielte Hemmung von miR-135a-5p auch nach hypoxischen Ereignissen zur Stabilisierung des PI3K/AKT-Signalwegs beitragen könnte und somit ein potenzieller therapeutischer Ansatz zur Begrenzung reperusionsbedingter Zellschädigung sein könnte.

Zusätzlich können kardiovaskuläre Komorbiditäten die Funktion dieses Signalwegs bereits vor einem Infarkt beeinträchtigen. So führt beispielsweise die Insulinresistenz bei Diabetes mellitus zu einer chronischen Dysregulation der PI3K/AKT-Signaltransduktion, was im Falle eines akuten Gefäßverschlusses mit einem größeren Ausmaß an Myokardschädigung

assoziiert sein kann.<sup>115</sup> Diese Zusammenhänge verdeutlichen die potenzielle Bedeutung frühzeitiger therapeutischer Interventionen zur Stabilisierung kardioprotektiver Signalwege bei Patienten mit entsprechenden Risikofaktoren.

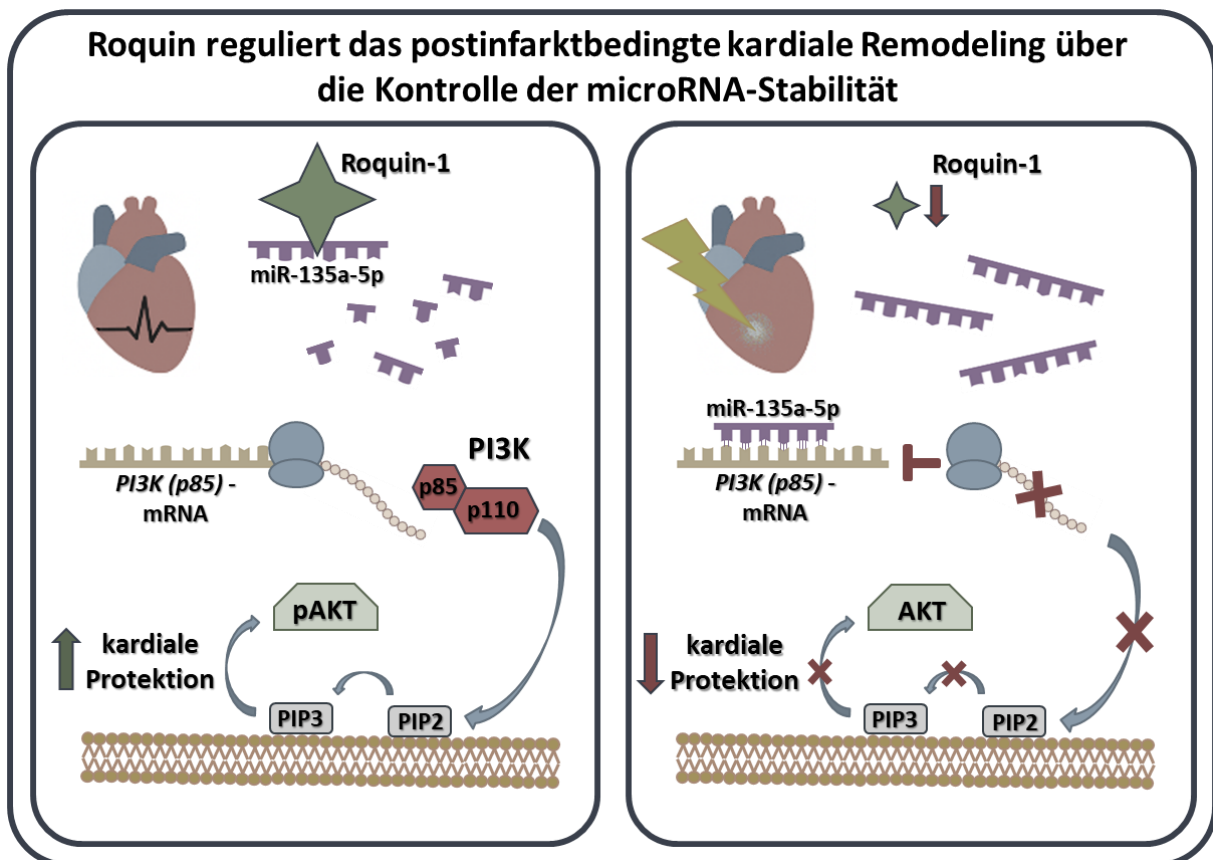
Sollte die Hemmung von miR-135a-5p als therapeutischer Ansatz zur Stabilisierung des PI3K/AKT-Signalwegs nach einem Myokardinfarkt in Betracht gezogen werden, ist eine sorgfältige Charakterisierung potenzieller Off-Target-Effekte erforderlich. Da einzelne miRNAs zahlreiche mRNA-Targets regulieren können, lassen sich unerwünschte Nebeneffekte möglicherweise nicht vollständig vermeiden und müssen bei der Entwicklung miRNA-basierter Therapiestrategien berücksichtigt werden.<sup>116</sup> Eine zentrale Rolle spielt hierbei die präzise Dosierung der therapeutischen Moleküle, da deren Wirkung innerhalb eines begrenzten Konzentrationsbereichs erfolgen muss, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, ohne toxische Nebenwirkungen zu induzieren. Erste quantitative Analysen deuten darauf hin, dass Veränderungen der zellulären miRNA-Expression typischerweise in einer Größenordnung von etwa  $10^3$  Kopien pro Zelle auftreten.<sup>117</sup>

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs präzise reguliert werden muss. Nicht nur eine verminderte Aktivität, wie sie bereits beschrieben wurde, kann nachteilig sein, sondern auch eine übermäßige Aktivierung des Signalwegs, die pathologische Hypertrophie und maladaptives kardiales Remodeling begünstigen kann.<sup>6,118</sup>

Bioinformatische Analysen mithilfe von Datenbanken wie TargetScan und miRBase zeigen zudem, dass die Sequenz von miR-135a-5p in verschiedenen Spezies, darunter Maus, Ratte und Mensch, konserviert ist.<sup>119,120</sup> Diese evolutionäre Konservierung spricht für eine funktionelle Bedeutung dieser miRNA und ermöglicht gleichzeitig die Untersuchung der identifizierten Regulationsachse in etablierten experimentellen Tiermodellen. Zur weiteren funktionellen Charakterisierung könnte beispielsweise im Langendorff-Modell an isoliert-perfundierten Ratten- oder Mausherzen die Rolle dieser Regulationsachse unter kontrollierten Bedingungen am intakten Organ analysiert werden. Während der Reperfusionsphase könnten dabei Antagomire gegen miR-135a-5p appliziert werden, um deren Einfluss auf Infarktgröße, Zellüberleben sowie auf die Protein- und mRNA-Expression relevanter Komponenten kardioprotektiver Signalwege zu untersuchen. Ergänzend könnten humanbasierte Modelle wie induzierte pluripotente Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten

(hiPSC-CMs) eingesetzt werden. Dieses Modell bietet gegenüber dem intakten Nagetierorgan *in vivo* den Vorteil, dass sowohl funktionelle als auch strukturelle Veränderungen über Zeiträume von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen hinweg direkt visualisiert sowie zugrundeliegende Pathomechanismen auf Ebene der humanen Herzmuskelzelle untersucht werden können.<sup>121</sup>

Zusammenfassend identifiziert die vorliegende Arbeit eine weitere Roquin-abhängige miRNA-Regulationsachse in Kardiomyozyten. Die hypoxieinduzierte Herabregulation von Roquin-1 führt über eine Hochregulation von miR-135a-5p zu einer Hemmung der PI3K/AKT-Signaltransduktion und ist mit einer erhöhten Apoptoserate sowie mitochondrialer Dysfunktion assoziiert. Die gezielte Modulation dieser Achse könnte daher einen potenziellen Ansatz zur Stabilisierung kardioprotektiver Signalwege nach ischämischen Ereignissen darstellen.



**Abbildung 27:** Schematische Darstellung der „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Regulationsachse“.

**Links:** Unter physiologischen Bedingungen reguliert Roquin-1 die Stabilität von miR-135a-5p, wodurch die Expression der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85 erhalten bleibt und der PI3K/AKT-Signalweg

aktiviert werden kann. **Rechts:** Nach MI ist die Roquin-1-Expression reduziert. Dies führt zu einer Hochregulation von miR-135a-5p, welche die Translation der p85-mRNA hemmt und dadurch die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs beeinträchtigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern das aktuelle Verständnis der post-transkriptionellen Regulation kardioprotektiver Signalwege im Kontext des ischämischen Myokardschadens. Erstmals konnte gezeigt werden, dass das RNA-bindende Protein Roquin im kardialen Gewebe exprimiert wird und unter hypoxischen Bedingungen funktionell reguliert ist. Darüber hinaus wurden zwei unabhängige, jedoch funktionell komplementäre miRNA-abhängige Regulationsachsen identifiziert. Während die „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Achse“ mit der Regulation der kontraktilen Funktion und des postischämischen Remodelings assoziiert ist, beeinflusst die „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Achse“ zentrale Überlebens- und Stressadaptationsmechanismen von Kardiomyozyten.

Bemerkenswert ist, dass die beiden Roquin-Isoformen unterschiedliche miRNA-abhängige Regulationsachsen adressieren. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in strukturellen und funktionellen Unterschieden der beiden Isoformen liegen. Obwohl Roquin-1 und Roquin-2 homologe RNA-Bindedomänen besitzen, wurden Unterschiede in ihrer subzellulären Lokalisation, Bindungsspezifität und Interaktion mit RNA-Abbaukomplexen beschrieben.<sup>122</sup> Diese Unterschiede könnten zu isoformspezifischen Zieltranskripten führen. Darüber hinaus könnten zelltypspezifische Expressionsmuster die funktionelle Spezialisierung der beiden Isoformen weiter beeinflussen (Abb. 6).

Zusammengenommen legen diese Befunde nahe, dass Roquin als wichtiger post-transkriptioneller Regulator innerhalb des miRNA-abhängigen Signalnetzwerks des Herzens fungiert und somit eine bislang wenig charakterisierte molekulare Regulationsebene des Reperfusionsschadens darstellt. Die gezielte Modulation Roquin-abhängiger miRNA-Signalachsen könnten daher einen neuen Ansatz darstellen, nicht nur akute Zellschädigung, während der Reperfusion zu begrenzen, sondern auch längerfristige Remodelingprozesse therapeutisch zu beeinflussen.

## 6. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar und manifestieren sich im Rahmen des akuten Koronarsyndroms häufig als Myokardinfarkt. Trotz erfolgreicher Wiedereröffnung des Koronargefäßes führt die Reperfusion nicht selten zur Ausweitung der myokardialen Zellschädigung, dem sogenannten Reperfusionsschaden.

Die Identifikation neuer therapeutischer Ansatzpunkte, die kardioprotektive Signalwege stabilisieren und den Reperfusionsschaden begrenzen, stellt daher ein zentrales Ziel der kardiovaskulären Forschung dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des RNA-bindenden Proteins Roquin im kardiovaskulären System zu untersuchen und miRNA-abhängige Regulationsmechanismen zu identifizieren, die zur Stabilisierung kardioprotektiver Signalwege beitragen.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass die Isoformen Roquin-1 (*RC3H1*) und Roquin-2 (*RC3H2*) im Myokard exprimiert und durch hypoxische bzw. ischämische Stimuli signifikant herabreguliert werden. Die Befunde weisen darauf hin, dass Roquin ein zentraler Bestandteil der molekularen Stressantwort des Myokards im Kontext von Ischämie und Reperfusion ist.

Darüber hinaus konnten zwei miRNA-abhängige Regulationsachsen identifiziert werden. Die „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Achse“ zeigt, dass eine verminderte Roquin-2-Expression mit einer Hochregulation von miR-23b-5p und einer nachfolgenden Hemmung des Transkriptionsfaktors ZBTB20 einhergeht, was mit einer eingeschränkten kardialen Funktion und maladapтивem postischämischem Remodeling assoziiert ist. Als zweite Achse wurde die „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Kaskade“ identifiziert. Die hypoxieinduzierte Reduktion von Roquin-1 führt zu einer gesteigerten miR-135a-5p-Expression und zur Hemmung des zentralen kardioprotektiven PI3K/AKT-Signalwegs. Die Inhibition von miR-135a-5p stabilisiert unter hypoxischen Bedingungen die Zellviabilität, reduziert die Apoptose und erhält die mitochondriale Funktion.

Die vorliegenden Befunde erweitern das Verständnis der post-transkriptionellen Regulation kardioprotektiver Signalwege im Myokard und identifizieren Roquin erstmals als wichtigen Regulator miRNA-abhängiger Signalachsen im Herzen. Damit liefert die Arbeit eine wichtige Grundlage für zukünftige translationale Ansätze zur Verbesserung der Myokardprotektion nach ischämischen Ereignissen.

## 7. Summary

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide, often manifesting as myocardial infarction in the context of acute coronary syndrome. Despite successful reopening of the coronary artery, reperfusion frequently leads to an increase in myocardial cell damage, known as reperfusion injury.

Therefore, the identification of new therapeutic targets that stabilize cardioprotective signaling pathways and limit reperfusion injury represents a major objective in cardiovascular research. The aim of the present study was to investigate the role of the RNA-binding protein Roquin in the cardiovascular system and to identify miRNA-dependent regulatory mechanisms that contribute to the stabilization of cardioprotective signaling pathways.

For the first time, it has been demonstrated that the isoforms Roquin-1 (*RC3H1*) and Roquin-2 (*RC3H2*) are expressed in the myocardium and are significantly downregulated by hypoxic and ischemic stimuli, respectively. The findings suggest that Roquin is a key component of the myocardial stress response in the context of ischemia and reperfusion.

In addition, two miRNA-dependent regulatory axes were identified. The “Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20 pathway” shows that reduced Roquin-2 expression is accompanied by upregulation of miR-23b-5p and subsequent inhibition of the transcription factor ZBTB20, which is associated with impaired cardiac function and maladaptive post-ischemic remodeling. The “Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT cascade” was identified as a second axis. The hypoxia-induced reduction in Roquin-1 leads to increased miR-135a-5p expression and inhibition of the PI3K/AKT pathway, a key cardioprotective mechanism. Under hypoxic conditions, inhibition of miR-135a-5p stabilizes cell viability, reduces apoptosis and preserves mitochondrial function.

Overall, these findings expand the current understanding of post-transcriptional regulation of cardioprotective signaling pathways in the myocardium and identify Roquin for the first time as an important regulator of miRNA-dependent signaling networks in the heart. This work thus provides an important foundation for future translational approaches aimed at improving myocardial protection following ischemic events.

### III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Die Biogenese von microRNAs (miRNAs) in eukaryotischen Zellen. ....                                                                                 | 12 |
| Abbildung 2: Post-transkriptionelle Genregulation durch miRNAs. ....                                                                                             | 14 |
| Abbildung 3: Domänenstruktur und proteolytische Regulation von Roquin-1 und Roquin-2. ....                                                                       | 15 |
| Abbildung 4: Analyse der mRNA- und Proteinexpression beider Roquin-Isoformen in humanen AC16-Kardiomyozyten. ....                                                | 52 |
| Abbildung 5: Primereffizienz von RC3H1 und RC3H2. ....                                                                                                           | 53 |
| Abbildung 6: Zelltypspezifische Expression der Roquin-Isoformen in kardialen Myozyten (MZ) und nicht-myozytäre Zellen (NMZ). ....                                | 54 |
| Abbildung 7: Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Expression von Roquin in AC16-Kardiomyozyten. ....                                                  | 56 |
| Abbildung 8: Regulation der Roquin-mRNA in vivo nach kardialer Ischämie und Reperfusion. ....                                                                    | 57 |
| Abbildung 9: Die „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Achse“ als möglicher kardioprotektiver Signalweg identifiziert mittels integrativer microRNA-mRNA Analyse. .... | 59 |
| Abbildung 10: Die linksventrikuläre Expression von miR-23b-5p und ZBTB20 im I/R-Modell. ....                                                                     | 60 |
| Abbildung 11: Expression von miR-23b-5p und ZBTB20 in AC16-Kardiomyozyten. ....                                                                                  | 61 |
| Abbildung 12: siRNA-induzierte Herabregulation von Roquin in AC16-Kardiomyozyten. ....                                                                           | 63 |
| Abbildung 13: Einfluss eines RC3H2-Knockdowns auf die Expression von miR-23b-5p und ZBTB20 in AC16-Kardiomyozyten. ....                                          | 64 |
| Abbildung 14: Validierung der „Roquin-2 – miR23b-5p – ZBTB20-Regulationsachse“ mittels Antagomir-23b-5p in AC16-Kardiomyozyten. ....                             | 65 |
| Abbildung 15: Einfluss eines isoformspezifischen Roquin-Knockdowns auf den PI3K/AKT-Signalweg in AC16-Kardiomyozyten. ....                                       | 68 |
| Abbildung 16: Einfluss der RC3H1-Plasmidtransfektion auf die AKT in AC16-Kardiomyozyten. ....                                                                    | 70 |

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 17: Relative Expression von miR-135a-5p in siRNA-RC3H1 transfizierten AC16-Kardiomyozyten.....                                | 71 |
| Abbildung 18: Einfluss des Roquin-1-Knockdowns und der miR-135a-5p-Hemmung auf die AKT in AC16-Kardiomyozyten. ....                     | 72 |
| Abbildung 19: Einfluss des Roquin-1-Knockdowns und der miR-135a-5p-Hemmung auf die Zellzahl humaner AC16-Kardiomyozyten. ....           | 73 |
| Abbildung 20: Einfluss hypoxischer Bedingungen und der miR-135a-5p-Hemmung auf die AKT in AC16-Kardiomyozyten. ....                     | 75 |
| Abbildung 21: Einfluss hypoxischer Bedingungen und der Hemmung von miR-135a-5p auf die Zellzahl humaner AC16-Kardiomyozyten. ....       | 76 |
| Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Apoptoserate von AC16-Zellen nach Hoechst-33342-Färbung. ....                       | 78 |
| Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des mitochondrialen Membranpotentials von AC16-Zellen mittels MitoTracker™-Färbung..... | 79 |
| Abbildung 24: Posthypoxische Western-Blot-Analyse der AKT- und pAKT-Proteinexpression in AC16-Zellen nach A135a-Transfektion. ....      | 81 |
| Abbildung 25: Analyse der Zellzahl humaner AC16-Zellen nach posthypoxischer A135a-Transfektion. ....                                    | 82 |
| Abbildung 26: Schematische Darstellung der „Roquin-2 – miR-23b-5p – ZBTB20-Regulationsachse“.                                           | 92 |
| Abbildung 27: Schematische Darstellung der „Roquin-1 – miR-135a-5p – PI3K/AKT-Regulationsachse“. ....                                   | 96 |

**IV. LITERATURVERZEICHNIS**

1. World Health Organization: WHO. *Cardiovascular Diseases (CVDs)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (2025).
2. Lopez, E. O., Ballard, B. D. & Jan, A. *Cardiovascular Disease*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/> (2026).
3. Frank, A. *et al.* Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: From Basic Science to Clinical Bedside. *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **16**, 123–132 (2012).
4. Hochman, J. S. & Bulkley, B. H. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* **65**, 1446–1450 (1982).
5. Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. R. & Zornoff, L. A. M. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq. Bras. Cardiol.* <https://doi.org/10.5935/abc.20160005> (2016) doi:10.5935/abc.20160005.
6. Walkowski, B., Kleibert, M., Majka, M. & Wojciechowska, M. Insight into the Role of the PI3K/Akt Pathway in Ischemic Injury and Post-Infarct Left Ventricular Remodeling in Normal and Diabetic Heart. *Cells* **11**, 1553 (2022).
7. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail. Rev.* **12**, 217–234 (2007).
8. Matsui, T. *et al.* Phenotypic Spectrum Caused by Transgenic Overexpression of Activated Akt in the Heart. *J. Biol. Chem.* **277**, 22896–22901 (2002).
9. Miao, W., Luo, Z., Kitsis, R. N. & Walsh, K. Intracoronary, Adenovirus-mediated Akt Gene Transfer in Heart Limits Infarct Size Following Ischemia-reperfusion Injury in Vivo. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 2397–2402 (2000).
10. He, Y. *et al.* Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 425 (2021).
11. Luo, Y. *et al.* Therapeutic potentials of cell death inhibitors in rats with cardiac ischaemia/reperfusion injury. *J. Cell. Mol. Med.* **26**, 2462–2476 (2022).
12. Li, F. *et al.* Zinc Finger Protein ZBTB20 protects against cardiac remodelling post-myocardial infarction via ROS-TNF $\alpha$ /ASK1/JNK pathway regulation. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 13383–13396 (2020).

13. Barwari, T., Joshi, A. & Mayr, M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **68**, 2577–2584 (2016).
14. NobelPrize.org. *Press Release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2024*. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2024/press-release/> (2024).
15. O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **9**, 402 (2018).
16. Varzideh, F. *et al.* Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction: Functional Contribution of microRNAs to Inflammation and Fibrosis. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 863238 (2022).
17. Maries, L. *et al.* MicroRNAs—The Heart of Post-Myocardial Infarction Remodeling. *Diagnostics* **11**, 1675 (2021).
18. Parikh, M. & Pierce, G. N. A Brief Review on the Biology and Effects of Cellular and Circulating microRNAs on Cardiac Remodeling after Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4995 (2021).
19. Talman, V. & Ruskoaho, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* **365**, 563–581 (2016).
20. Abdalla, M., Goc, A., Segar, L. & Somanath, P. R. Akt1 Mediates  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression and Myofibroblast Differentiation via Myocardin and Serum Response Factor. *J. Biol. Chem.* **288**, 33483–33493 (2013).
21. Chen, C. *et al.* MicroRNA as a Therapeutic Target in Cardiac Remodeling. *BioMed Res. Int.* **2017**, 1–25 (2017).
22. Thomas, M., Lieberman, J. & Lal, A. Desperately seeking microRNA targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1169–1174 (2010).
23. Dharap, A., Pokrzywa, C., Murali, S., Pandi, G. & Vemuganti, R. MicroRNA miR-324-3p Induces Promoter-Mediated Expression of RelA Gene. *PLoS ONE* **8**, e79467 (2013).
24. Essig, K. *et al.* Roquin Suppresses the PI3K-mTOR Signaling Pathway to Inhibit T Helper Cell Differentiation and Conversion of Treg to Tfr Cells. *Immunity* **47**, 1067–1082.e12 (2017).
25. Braun, J. *et al.* Identification of new high affinity targets for Roquin based on structural conservation. *Nucleic Acids Res.* **46**, 12109–12125 (2018).
26. Akira, S. & Maeda, K. Control of RNA Stability in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **39**, 481–509 (2021).

27. Tants, J.-N., Oberstrass, L., Weigand, J. E. & Schlundt, A. Structure and RNA-binding of the helically extended Roquin CCCH-type zinc finger. *Nucleic Acids Res.* **52**, 9838–9853 (2024).
28. Yoshinaga, M. & Takeuchi, O. Regulation of inflammatory diseases via the control of mRNA decay. *Inflamm. Regen.* **44**, 14 (2024).
29. Uehata, T. & Takeuchi, O. Regnase-1 Is an Endoribonuclease Essential for the Maintenance of Immune Homeostasis. *J. Interferon Cytokine Res.* **37**, 220–229 (2017).
30. Leppek, K. *et al.* Roquin Promotes Constitutive mRNA Decay via a Conserved Class of Stem-Loop Recognition Motifs. *Cell* **153**, 869–881 (2013).
31. Mino, T. *et al.* Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell* **161**, 1058–1073 (2015).
32. Srivastava, M. *et al.* Roquin binds microRNA-146a and Argonaute2 to regulate microRNA homeostasis. *Nat. Commun.* **6**, 6253 (2015).
33. Schlundt, A., Niessing, D., Heissmeyer, V. & Sattler, M. RNA recognition by Roquin in posttranscriptional gene regulation. *WIREs RNA* **7**, 455–469 (2016).
34. Zheng, L., Ling, W., Zhu, D., Li, Z. & Kong, L. Roquin-1 Regulates Macrophage Immune Response and Participates in Hepatic Ischemia–Reperfusion Injury. *J. Immunol.* **204**, 1322–1333 (2020).
35. Labster Theory pages. *Zellpassage*. [https://theory.labster.com/de/cell-passaging-ccl/?utm\\_source](https://theory.labster.com/de/cell-passaging-ccl/?utm_source).
36. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur*. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2020). doi:10.1007/978-3-662-58951-9.
37. Life Technologies. *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol 2013*. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Lipofectamine\\_RNAiMAX\\_Reag\\_protocol.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Lipofectamine_RNAiMAX_Reag_protocol.pdf) (2013).
38. Hannon, G. J. & Rossi, J. J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* **431**, 371–378 (2004).
39. Spektrum.de. *Plasmid Kompaktlexikon Der Biologie*. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/plasmid/9129>.
40. OriGene. *TurboFectin 8.0 Transfection Reagent User Manual*. <https://cdn.origene.com/assets/documents/transfection/transfectionreagent.pdf>.

41. Krützfeldt, J. *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **438**, 685–689 (2005).
42. Chen, T. & Vunjak-Novakovic, G. In Vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regen. Eng. Transl. Med.* **4**, 142–153 (2018).
43. Ahmed Selim, N. & Wojtovich, A. P. Mitochondrial membrane potential and compartmentalized signaling: Calcium, ROS, and beyond. *Redox Biol.* **86**, 103859 (2025).
44. Thermo Scientific. *HCS Mitochondrial Health Kit*.  
<https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10295.pdf> (2008).
45. Thermo Scientific. *MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes*.  
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07510.pdf> (2008).
46. Lumiprobe. *Hoechst 33342, Blau Fluoreszierender Nukleinsäurefarbstoff*.  
<https://de.lumiprobe.com/p/hoechst-33342>.
47. Carl Roth. *Propidiumiodid, 25 Mg, CAS Nr. 25535-16-4 | Vitalfarbstoffe | Färbung | Histologie/Mikroskopie | Life Science | Carl ROTH - Deutschland*.  
<https://www.carlroth.com/de/de/vitalfarbstoffe/propidiumiodid/p/cn74.1>.
48. Piper, H. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **14**, 397–412 (1982).
49. Nam, S. *et al.* MicroRNA and mRNA integrated analysis (MMIA): a web tool for examining biological functions of microRNA expression. *Nucleic Acids Res.* **37**, W356–W362 (2009).
50. Schreckenber, R. *et al.* Adverse Effects on  $\beta$ -Adrenergic Receptor Coupling: Ischemic Postconditioning Failed to Preserve Long-Term Cardiac Function. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, e006809 (2017).
51. Taegtmeyer, H., Hems, R. & Krebs, H. A. Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem. J.* **186**, 701–711 (1980).
52. Neely, Liebermeister, H., Battersby, E. & Morgan, H. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* **212**, 804–814 (1967).
53. Hrdlickova, R., Toloue, M. & Tian, B. RNA -Seq methods for transcriptome analysis. *WIREs RNA* **8**, e1364 (2017).

54. Schreckenber, R. *et al.* Ischaemic post-conditioning in rats: Responder and non-responder differ in transcriptome of mitochondrial proteins. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 5528–5541 (2020).
55. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nat. Biotechnol.* **11**, 1026–1030 (1993).
56. Chomzynski, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
57. Thermo Scientific. *Basic Principles of RT-qPCR*.  
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>.
58. Shi, R. & Chiang, V. L. Facile Means for Quantifying MicroRNA Expression by Real-Time PCR. *BioTechniques* **39**, 519–525 (2005).
59. Norgen. *MicroScript MicroRNA CDNA Synthesis Kit Product Insert*.  
<https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/PI54410-3%20TruScript%20microRNA%20cDNA%20Synthesis%20Kit%20Product%20Insert.pdf> (2021).
60. National Center for Biotechnology Information. *National Library of Medicine - Nucleotide*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=>.
61. Bustin, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 23–39 (2002).
62. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
63. InvitrogenTM. *NuPAGE Technical Guide*. [https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/nupage\\_tech\\_man.pdf](https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/nupage_tech_man.pdf) (2010).
64. Harper, D. R., Kit, M.-L. & Kangro, H. O. Protein blotting: ten years on. *J. Virol. Methods* **30**, 25–39 (1990).
65. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
66. Matsumoto, H., Haniu, H. & Komori, N. Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. in *Electrophoretic Separation of Proteins* (eds Kurien, B. T. & Scofield, R. H.) vol. 1855 101–105 (Springer New York, New York, NY, 2019).

67. Taylor, S. C. & Posch, A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–8 (2014).
68. Royston, J. P. An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *Appl. Stat.* **31**, 115 (1982).
69. jmp STATISTICAL DISCOVERY. *Der T-Test*. <https://www.jmp.com/de/statistics-knowledge-portal/t-test>.
70. jmp STATISTICAL DISCOVERY. *Einfaktorielle ANOVA*. <https://www.jmp.com/de/statistics-knowledge-portal/one-way-anova>.
71. Universität Zürich. *Wilcoxon-Test*. [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/unterschiede/zentral/wilkoxon.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/wilkoxon.html).
72. Universität Zürich. *Kruskal-Wallis-Test*. [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/unterschiede/zentral/kruskal.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/kruskal.html).
73. Universität Zürich. *Korrelation Nach Bravais-Pearson*. [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/zusammenhaenge/korrelation.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/zusammenhaenge/korrelation.html).
74. Sigma Aldrich. *AC16-Human-Cardiomyocyte-Cell-Line*. [https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/search/ac16-human-cardiomyocyte-cell-line?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=ac16%20human%20cardiomyocyte%20cell%20line&type=product\\_name](https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/search/ac16-human-cardiomyocyte-cell-line?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=ac16%20human%20cardiomyocyte%20cell%20line&type=product_name).
75. Segeritz, C.-P. & Vallier, L. Cell Culture. in *Basic Science Methods for Clinical Researchers* 151–172 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.
76. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 45e–445 (2001).
77. Wang, H., Liu, B. & Wei, J. Beta2-microglobulin(B2M) in cancer immunotherapies: Biological function, resistance and remedy. *Cancer Lett.* **517**, 96–104 (2021).
78. Invitrogen™. *Anti-miR<sup>TM</sup> Hsa-Let-7c miRNA Inhibitor Positive Control 5 Nmol | Buy Online | Invitrogen<sup>TM</sup>*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4392431>.
79. Spektrum.de. *Effektstärke*. <https://www.spektrum.de/lexikon/psychologie/effektstaerke/3796>.

80. Belloc, F. *et al.* A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* **17**, 59–65 (1994).
81. Lumiprobe Life science solutions. *Färbung von Zellen Mit Hoechst-Farbstoffen*. <https://de.lumiprobe.com/protocols/staining-cells-with-hoechst-dyes>.
82. Song, H.-P., Chu, Z.-G., Zhang, D.-X., Dang, Y.-M. & Zhang, Q. PI3K–AKT Pathway Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia-Induced Apoptosis by MitoKATP-Mediated Mitochondrial Translocation of pAKT. *Cell. Physiol. Biochem.* **49**, 717–727 (2018).
83. Statistisches Bundesamt. *Häufigste Todesfälle Durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen 2024*. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
84. Ibanez, B. *et al.* 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* **39**, 119–177 (2018).
85. Itani, N. *et al.* Roquin Modulates Cardiac Post-Infarct Remodeling via microRNA Stability Control. *Cells* **14**, 1748 (2025).
86. Ren, A.-J. *et al.* ZBTB20 Regulates SERCA2a Activity and Myocardial Contractility Through Phospholamban. *Circ. Res.* **134**, 252–265 (2024).
87. Xiang, X., Mao, J., Tang, D., Huang, H. & Tang, H. The ZBTB family in cardiac development and diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **771**, 152026 (2025).
88. Rossello, X., Riquelme, J. A., Davidson, S. M. & Yellon, D. M. Role of PI3K in myocardial ischaemic preconditioning: mapping pro-survival cascades at the trigger phase and at reperfusion. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 926–935 (2018).
89. Ghafouri-Fard, S. *et al.* Interplay between PI3K/AKT pathway and heart disorders. *Mol. Biol. Rep.* **49**, 9767–9781 (2022).
90. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. & Dreyfuss, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* **582**, 1977–1986 (2008).
91. Nussbacher, J. K. & Yeo, G. W. Systematic Discovery of RNA Binding Proteins that Regulate MicroRNA Levels. *Mol. Cell* **69**, 1005-1016.e7 (2018).
92. Behrens, G. & Heissmeyer, V. Cooperation of RNA-Binding Proteins – a Focus on Roquin Function in T Cells. *Front. Immunol.* **13**, 839762 (2022).

93. Jeltsch, K. M. *et al.* Cleavage of roquin and regnase-1 by the paracaspase MALT1 releases their cooperatively repressed targets to promote TH17 differentiation. *Nat. Immunol.* **15**, 1079–1089 (2014).
94. Schaefer, J. S. & Klein, J. R. Roquin—a multifunctional regulator of immune homeostasis. *Genes Immun.* **17**, 79–84 (2016).
95. Proteinatlas. *RC3H - The Human Protein Atlas*.  
<https://www.proteinatlas.org/search/RC3H>.
96. Bertossi, A. *et al.* Loss of Roquin induces early death and immune deregulation but not autoimmunity. *J. Exp. Med.* **208**, 1749–1756 (2011).
97. Schreckenberger, R. *et al.* mRNA-based SARS-CoV-2 vaccines: intracellular processing and aggregation of the encoded spike protein as a mechanistic contributor to cardiac cellular stress. *Front. Immunol.* **17**, 1635478 (2026).
98. Kaur, G. & Dufour, J. M. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* **2**, 1–5 (2012).
99. Jiren, Z. *et al.* A Rat Model of Middle Cerebral Artery Occlusion/Reperfusion without Damaging the Anatomical Structure of Cerebral Vessels. *J. Vis. Exp.* 66635 (2024) doi:10.3791/66635.
100. Rahman, A. *et al.* Large animal models of cardiac ischemia-reperfusion injury: Where are we now? *Zool. Res.* **44**, 591–603 (2023).
101. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion. *Pharmacol. Ther.* **116**, 173–191 (2007).
102. Ren, A. *et al.* Zbtb20 deficiency causes cardiac contractile dysfunction in mice. *FASEB J.* **34**, 13862–13876 (2020).
103. Hausenloy, D. & Yellon, D. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Res.* **70**, 240–253 (2006).
104. Staat, P. *et al.* Postconditioning the Human Heart. *Circulation* **112**, 2143–2148 (2005).
105. McClain, A. K., Monteleone, P. P. & Zoldan, J. Sex in cardiovascular disease: Why this biological variable should be considered in in vitro models. *Sci. Adv.* **10**, eadn3510 (2024).
106. Medzikovic, L. *et al.* Sex Differences in Therapies against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: From Basic Science to Clinical Perspectives. *Cells* **12**, 2077 (2023).
107. The Principles of Humane Experimental Technique. *Med. J. Aust.* **1**, 500–500 (1960).

108. Hausenloy, D. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc. Res.* **61**, 448–460 (2004).
109. Zhang, Q. *et al.* Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 78 (2022).
110. Miyamoto, S., Murphy, A. N. & Brown, J. H. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* **15**, 521–529 (2008).
111. Yin, C. *et al.* A Novel Method for Mitochondrial Membrane Potential Detection in Heart Tissue Following Ischemia-reperfusion in Mice. *Curr. Med. Sci.* **44**, 1091–1096 (2024).
112. Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N. & Walsh, K. Akt Promotes Survival of Cardiomyocytes In Vitro and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse Heart. *Circulation* **101**, 660–667 (2000).
113. Li, Q. *et al.* Overexpression of micro RNA -99a attenuates heart remodelling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 919–928 (2014).
114. Sun, L. *et al.* Down-Regulated Exosomal MicroRNA-221 – 3p Derived From Senescent Mesenchymal Stem Cells Impairs Heart Repair. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 263 (2020).
115. Omolekan, T. O., Chamcheu, J. C., Buerger, C. & Huang, S. PI3K/AKT/mTOR Signaling Network in Human Health and Diseases. *Cells* **13**, 1500 (2024).
116. Seyhan, A. A. Trials and Tribulations of MicroRNA Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 1469 (2024).
117. Diener, C., Keller, A. & Meese, E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends Genet.* **38**, 613–626 (2022).
118. Abeyrathna, P. & Su, Y. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul. Pharmacol.* **74**, 38–48 (2015).
119. *TargetScanHuman 8.0*. [https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/).
120. *MiRBase*. <https://www.mirbase.org/>.
121. Häkli, M. *et al.* Human induced pluripotent stem cell-based platform for modeling cardiac ischemia. *Sci. Rep.* **11**, 4153 (2021).
122. Zhang, Q. *et al.* New Insights into the RNA-Binding and E3 Ubiquitin Ligase Activities of Roquins. *Sci. Rep.* **5**, 15660 (2015).

## V. PUBLIKATIONEN

1. Schreckenberger R, Woitasky N, **Itani N**, Czech L, Windhorst AC, Juchem M, Bär C, Thum T, Ferdinandy P, Schulz R. mRNA-based SARS-CoV-2 vaccines: Intracellular processing and aggregation of the encoded spike protein as a mechanistic contributor to cardiac cellular stress. **Front Immunol.** 2026. doi:10.3389/fimmu.2026.1635478.
2. **Itani N**, Schreckenberger R, Schulz R, Bencsik P, Ferdinandy P, Schlüter KD. Roquin Modulates Cardiac Post-Infarct Remodeling via microRNA Stability Control. **Cells.** 2025 14:1748.
3. Schreckenberger R, Schulz R, **Itani N**, Bencsik P, Ferdinandy P, Szabados T, Rohrbach S, Niemann B, Schlüter KD. Inhibition of MMP2 activity mitigates N-omega-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME)-induced right heart failure. **Redox Biol.** 2024 76:103308.
4. Schreckenberger R, Woitasky N, **Itani N**, Czech L, Ferdinandy P, Schulz R. Cardiac side effects of RNA-based SARS-CoV-2 vaccines: Hidden cardiotoxic effects of mRNA-1273 and BNT162b2 on ventricular myocyte function and structure. **Br J Pharmacol.** 2024 181:345-361.
5. Knittel J, **Itani N**, Schreckenberger R, Heger J, Rohrbach S, Schulz R, Schlüter KD. Monoamine Oxidase A Contributes to Serotonin-But Not Norepinephrine-Dependent Damage of Rat Ventricular Myocytes. **Biomolecules.** 2023 13:1013.

## VI. PATENTANMELDUNGEN

**„Verfahren zur Kardioprotektion durch gezielte Hemmung einer microRNA“**

Patentanmeldung (federführende Erfinderin und Ansprechpartnerin),

Aktenzeichen TM 1275, Februar 2026

## VII. VORTRAG / POSTERPRÄSENTATION

1. 14.-15.09.2022, ***“15<sup>th</sup> GGL Annual Conference”*** – Gießen
2. 12.-15.04.2023, ***“89. Jahrestagung 2023 der DGK”*** – Mannheim
3. 11.-12.09.2024, ***“17<sup>th</sup> GGL Annual Conference”*** – Gießen
4. 27.-28.03.2025, ***“14<sup>th</sup> Symposium of the Young Physiologists”*** – Münster
5. 11.-14.09.2025, ***“40<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences a joint meeting with Europhysiology”*** – Frankfurt

## DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter, nicht nur für die Bereitstellung dieses Themas, sondern auch für die kontinuierliche Unterstützung und den konstruktiven fachlichen Austausch.

Ich danke auch Herrn PD. Dr. Rolf Schreckenberg, auf dessen fachliche und methodische Expertise ich jederzeit zählen konnte. Besonders schätze ich unser gemeinsames Interesse, Lösungsstrategien für wissenschaftliche Fragestellungen mit klinischer Relevanz zu entwickeln, sowie seine Fähigkeit, neue Perspektiven aufzuzeigen und Vertrauen sowohl in den Ablauf der Laborarbeiten als auch in die eigene Arbeit zu stärken.

Für die hervorragende Einarbeitung in die Labore sowie das stets angenehme und kollegiale Arbeitsklima danke ich den technischen Mitarbeiterinnen Nadine Woitasky, Karin Westermann und Daniela Schreiber ganz herzlich.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Anita Windhorst aus dem Institut für Medizinische Informatik für ihre kompetente Beratung bei der statistischen Auswertung.

Frau Prof. Dr. Julia Weigand aus dem pharmazeutischen Institut der Philipps-Universität Marburg danke ich für die freundliche Bereitstellung des Roquin-Antikörpers.

Darüber hinaus möchte ich mich bei einer besonderen Person bedanken, die mich in herausfordernden Phasen auf außergewöhnliche Weise begleitet und maßgeblich dazu beigetragen hat, dass ich diesen Weg erfolgreich fortsetzen konnte. Für die professionelle, unterstützende und zugleich herzliche Art der Begleitung bin ich sehr dankbar.

Zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank Regine Pommerenke, ohne deren finanzielle Unterstützung es mir nicht möglich gewesen wäre, das Studium zu beginnen und diesen Weg einzuschlagen. In der Zeit, in der ich auf mich allein gestellt war, hat sie mich begleitet, mir wertvolle Ratschläge gegeben und mich durch ihr außergewöhnlich positives Grundvertrauen in meinem Vorhaben nachhaltig bestärkt.