

**Die synergistische Wirkung von miR-1/133a ist für die  
Aufrechterhaltung des postmitotischen Zustandes adulter  
Kardiomyozyten essenziell**

*The synergistic effect of miR-1/133a is essential for maintaining the postmitotic state of  
adult cardiomyocytes*

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
- DOCTOR RERUM NATURALIUM -  
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich für Biologie und Chemie (FB08)  
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**M. Sc. Melissa Valussi**

Bad Nauheim 2021

**Erstgutachter:**

Prof. Dr. Thomas Böttger  
Abteilung Entwicklung und Umbau des Herzens  
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, W.G. Kerckhoff-Institut  
Ludwigstrasse 43  
61231 Bad Nauheim

**Zweitgutachter:**

Prof. Dr. Dr. Thomas Braun  
Abteilung Entwicklung und Umbau des Herzens  
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, W.G. Kerckhoff-Institut  
Ludwigstrasse 43  
61231 Bad Nauheim

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG:

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Bad Nauheim, den 10.09.2021

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim angefertigt.

*Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation eingereicht (in press at science advances):*

Melissa Valussi, Johannes Besser, Katharina Wystub-Lis, Sven Zukunft, Manfred Richter, Thomas Kubin, Thomas Boettger, Thomas Braun (2021). „*Repression of Osmr and Fgfr1 by miR-1/133a prevents cardiomyocyte dedifferentiation and cell cycle entry in the adult heart*“.

## Zusammenfassung

Die Funktion des Herz-Kreislauf-Systems ist von grundlegender Bedeutung für die Versorgung des Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Pumpleistung des Herzens wird durch hochspezialisierte kontraktile Kardiomyozyten gewährleistet, welche als Teil Ihrer Differenzierung postmitotisch sind und einen hohen Energiebedarf aufweisen. Eine Unterbrechung der Energieversorgung der Kardiomyozyten, wie beispielsweise durch einen Myokardinfarkt, führt unweigerlich zum Absterben der Kardiomyozyten, welche aufgrund des fehlenden Regenerationspotentials durch Narbengewebe ersetzt werden. Dabei spielt während der Remodellierung des Myokards die Dedifferenzierung von Kardiomyozyten eine große Rolle. Bedeutend hierbei ist die posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs, da durch eine Expression von spezifischen Genen verschiedenste Zelltypen und Zellfunktionen definiert und somit biologische Prozesse gesteuert werden. Einige miRNAs werden gewebsspezifisch exprimiert. Ein Beispiel hierfür sind die im Herz und Skelettmuskel spezifischen miRNAs miR-1 und miR-133a.

Die vorliegende Arbeit untersucht die physiologische Rolle von miR-1 und miR-133a im Herzen, welche als Cluster im Genom vorliegen und gemeinsam exprimiert werden. Hierbei konnte eine von miR-1/133a vermittelte Repression der synergistisch wirkenden Rezeptoren *Osmr* und *Fgfr1* nachgewiesen werden, welche eine Rolle bei der Dedifferenzierung und Proliferation von Kardiomyozyten spielen. Ein Verlust von miR-1/133a führte zu einer Dedifferenzierung der Kardiomyozyten, welche einherging mit einer Veränderung der Genexpression der extrazellulären Matrix, dem Wiedereintritt in den Zellzyklus und metabolischen Veränderungen vom Fettsäure- zum glykolytischen Metabolismus. Weiterhin schützte ein Verlust von miR-1/133a adulte Kardiomyozyten vor Ischämie was bei einem Myokardinfarkt zu einem stark verringerten Infarktbereich führte. Ein langfristiger Verlust von miR-1/133a jedoch ist schädlich und hat eine dilatative Kardiomyopathie zur Folge. Dabei scheint der MEK/ERK Signalweg für die Veränderungen nach einem Verlust von miR-1/133a verantwortlich zu sein, da eine Behandlung der miR-1/133a Knockout Tiere mit dem MEK/ERK Inhibitor UO126 eine Normalisierung der Gene zur Folge hatte, die durch den Verlust von miR-1/133a erhöht exprimiert wurden. Weiterhin konnte auch ein zusätzlicher Knockout von *Osmr* oder *Fgfr1* in Kombination mit miR-1/133a die meisten Auswirkungen des miR-1/133a Verlustes verhindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung der von miR-1/133a vermittelte Repression von *Osmr* und *Fgfr1* in Bezug auf die Transkriptionsregulation und Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes von Kardiomyozyten.

## Abstract

The function of the cardiovascular system is fundamental to the supply of the organism with oxygen and nutrients. The pumping capacity of the heart is ensured by highly specialized contractile cardiomyocytes, which become postmitotic and require high energy during differentiation. An interruption of the energy supply to the cardiomyocytes, for example through myocardial infarction, inevitably leads to cardiomyocyte death. Following death cardiomyocytes are replaced by scar tissue due to their lack of regeneration potential. Post-transcriptional regulation by miRNAs controls several biological processes through the expression of specific genes which then lead to the development of specific cell types and defined functions. During myocardium remodeling, miRNAs play a pivotal role in myocardium dedifferentiation. miRNAs can also be expressed in a tissue-specific manner. For instance, miRNAs miR-1 and miR-133a are specific to the heart and skeletal muscle.

The present work examines the physiological role of miR-1 and miR-133a in the heart, which are clustered in the genome and expressed together. miR-1/133a mediated repression of the synergistic receptors *Osmr* and *Fgfr1*, which play a role in the dedifferentiation and proliferation of cardiomyocytes, could be demonstrated. Loss of miR-1/133a led to cardiomyocyte dedifferentiation, changes in gene expression of the extracellular matrix as well as re-entry into the cell cycle and to metabolic switch from fatty acid to glycolytic. Furthermore, loss of miR-1/133 protected adult cardiomyocytes from ischemia, leading to a significantly reduced infarct area following myocardial infarction. Nonetheless, long-term loss of miR-1/133a was detrimental since it resulted in dilated cardiomyopathy. The MEK/ERK signaling pathway is responsible for the changes following loss of miR-1/133a. Indeed, treatment of miR-1/133a knockout animals with the MEK/ ERK inhibitor UO126 normalized the increased expression of genes due to the loss of miR-1/133a. Furthermore, additional knockout of *Osmr* or *Fgfr1* in combination with miR-1/133a prevented most of the effects of miR-1/133a loss. This work highlights the importance of miR-1/133a-mediated repression of *Osmr* and *Fgfr1* in the regulation of transcription as well as in the maintenance of cardiomyocyte differentiated state.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Formales</b>	<b>i</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Die Entwicklung und Funktion des Herzens . . . . .	5
1.2 Arten, Ursachen und Folgen von Herzinsuffizienzen . . . . .	8
1.3 Der Oncostatin M Rezeptor (OSMR) und seine Funktion und Relevanz im Herzen	12
1.4 Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1) und seine Funktion und Relevanz im Herzen . . . . .	15
1.5. MicroRNAs und ihre Funktion und Relevanz im Herzen . . . . .	18
1.5.1 Biogenese und Funktion . . . . .	18
1.5.2 Der Einfluss von miRNAs auf das Herz . . . . .	21
1.5.3 Die Herz- und Muskelspezifischen microRNAs miR-1 und miR-133a . . . .	24
1.6 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	27
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1 Materialien . . . . .	28
2.1.1 Verwendete Mauslinien . . . . .	28
2.1.2 Humane Proben . . . . .	28
2.1.3 Verwendete Software . . . . .	29
2.2 Tierexperimentelle Methoden . . . . .	30
2.2.1 Haltung von Versuchstieren . . . . .	30
2.2.2 Generierung der verwendeten Mauslinien . . . . .	30
2.2.3 Injektion in adulte Versuchstiere . . . . .	31
2.2.5 Tötung von Versuchstieren und Gewebeentnahme . . . . .	32
2.3 Histologische Untersuchung von Mausegeweben . . . . .	32

---

2.3.1 Einfrieren von adulten Herzen für Kryoschnitte . . . . .	32
2.3.2 Anfertigung von Kryoschnitten für immunhistochemische Untersuchungen	33
2.3.3 Anfertigung von Paraffinschnitten . . . . .	33
2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	33
2.3.5 Masson-Trichrom-Färbung . . . . .	34
2.3.6 Immunhistochemische Färbung von adulten Herz Gewebeschnitten von Mäusen . . . . .	35
2.3.7 Immunhistochemische Färbung von humanen Herz Gewebeschnitten . . .	37
2.3.8 Färbung von isolierten Maus Kardiomyozyten mit EdU . . . . .	38
2.3.9 Immunhistochemische Färbung von neonatalen Maus Kardiomyozyten nach Hikari . . . . .	39
2.3.10 Lebend-Tod-Färbung . . . . .	40
2.4 Molekularbiologische und biochemische Methoden . . . . .	40
2.4.1 Extraktion von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien . . . . .	40
2.4.2 Genotypisierung der verwendeten Mauslinien . . . . .	41
2.4.3 RNA Extraktion aus adulten Herzen und isolierten Kardiomyozyten . . .	46
2.4.4 Reverse Transkriptase Reaktion . . . . .	46
2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) . . . . .	49
2.4.6 Microarray . . . . .	52
2.4.7 Proteinanalyse mittels Western Blot Methode . . . . .	52
2.4.8 Apoptose und Nekrose Assay . . . . .	57
2.4.9 Fettsäure-Oxidations-Assay und Glukose-Oxidations-Assay . . . . .	58
2.4.10 Metabolomische Untersuchungen . . . . .	59
2.5 Isolierung, Stimulation und Inhibierung von neonatalen und adulten Kardiomyo- zyten . . . . .	59
2.5.1 Isolation von neonatalen Maus Kardiomyozyten . . . . .	59
2.5.2 Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten . . . . .	61
2.5.3 Isolation von Nicht-Kardiomyozyten aus adulten Maus Herzen . . . . .	66
2.5.4 Isolation von Ratten Kardiomyozyten . . . . .	66

---

2.6 Operative Methoden . . . . .	67
2.6.1 Myokardinfarkt-Modell der Maus . . . . .	67
2.7 Statistische Auswertungen und Analysen . . . . .	67
2.7.1 Transkriptomanalysen mittels GSEA ( <i>Gene set enrichment analysis</i> ) . . .	68
2.7.2 Untersuchung der lebenden und toten Maus Kardiomyozyten mittels Fiji	69
2.7.3 Bestimmung der Infarktgröße mittels Fiji . . . . .	69
2.7.4 Statistische Auswertung der Experimente . . . . .	70
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>71</b>
3.1 In Kardiomyozyten wird die Expression von Osmr und Fgfr1 durch miR-1/133a reguliert . . . . .	71
3.2 Die erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 nach dem Verlust von miR-1/133a führt zu einer Aktivierung des MEK/ERK Signalweges . . . . .	77
3.3 Der Verlust von miR-1/133a führt zu einer Aktivierung des Zellzyklus in adulten Kardiomyozyten . . . . .	82
3.4 Die Aktivierung des Zellzyklus in adulten miR-1/133a dKO Kardiomyozyten ist mit einer Dedifferenzierung der Zellen verbunden . . . . .	88
3.5 Eine erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 in miR-1/133a dKO Herzen verän- dern die Expression extrazellulärer Matrixgene . . . . .	92
3.6 Der Verlust von miR-1/133a im Herzen führt zu einer metabolischen Veränderung vom Fettsäurestoffwechsel zur Glykolyse . . . . .	99
3.7 miR-1/133a dKO Kardiomyozyten haben eine erhöhte Resistenz gegenüber hypo- xischen Bedingungen . . . . .	104
3.8 Eine Runterregulation von miR-1/133a führt nach einem Myokardinfarkt zu einem deutlich verringerten Infarktbereich . . . . .	108
3.9 Die Expression von Osmr und Fgfr1 ist im Infarktbereich und im ischämischen Bereich von ICM Patienten erhöht . . . . .	110
<b>4. Diskussion</b>	<b>114</b>

---

4.1 Die Expression von Osmr und Fgfr1 in Kardiomyozyten wird von miR-1/133a reguliert . . . . .	114
4.2 Die erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 nach Verlust von miR-1/133a aktiviert den MEK-ERK Signalweg . . . . .	117
4.3 Nach Verlust von miR-1/133a kommt es zu einer erhöhten Zellzyklusaktivität der adulten Kardiomyozyten . . . . .	118
4.4 Der Verlust von miR-1/133a führt zu einer Dedifferenzierung von Kardiomyozyten und einer veränderten Expression von extrazellulären Matrixgenen . . . . .	121
4.5 Die erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 nach Verlust von miR-1/133a führt zu einer Änderung des Metabolismus . . . . .	124
4.6 Der Verlust von miR-1/133a führt zu einer erhöhten Hypoxieresistenz und zu einer kleineren Narbe nach einem Myokardinfarkt . . . . .	125
4.7 Wissenschaftliche Erkenntnisse und Ausblick . . . . .	128
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>132</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>151</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>153</b>
<b>Anhang</b>	<b>155</b>
<b>Danksagung</b>	<b>163</b>

## 1. Einleitung

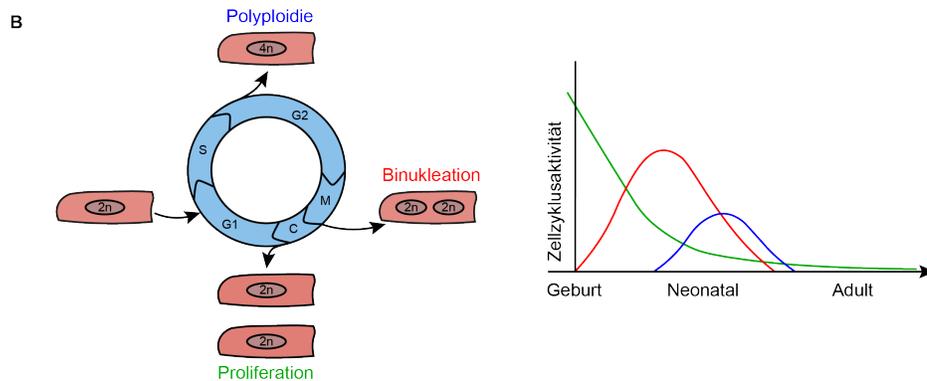
### 1.1 Die Entwicklung und Funktion des Herzens

Das Herz ist das erste funktionale Organ und entwickelt sich sehr früh während der Embryonalentwicklung, wobei der größte Teil des Herzgewebes aus dem Mesoderm entsteht (Kelly, Buckingham et al. 2014). Konzeptionell kann die Entwicklung des Herzens in drei Phasen unterteilt werden: Spezifikation, Morphogenese und Reifung der Kardiomyozyten (Guo and Pu 2020). Während der Spezifikation und Morphogenese wächst das Herz zum einen durch die Differenzierung proliferierender multipotenter Herzvorläuferzellen in Kardiomyozyten, zum anderen durch Proliferation bereits differenzierter Kardiomyozyten (Kelly, Buckingham et al. 2014). Hierbei spielt die intrazelluläre Expression von Transkriptionsfaktoren als auch die Regulation von extrazellulären Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle (Gunthel, Barnett et al. 2018). Später entwickelt sich bei Säugetieren daraus das Vierkammerherz, dessen Aufgabe es ist den gesamten Körper mit Blut zu versorgen. Das Blut wird dabei über die Blutgefäße gepumpt und bildet so das Kreislaufsystem, welches den Körper auf der einen Seite mit Sauerstoff und wichtigen Nährstoffen versorgt, auf der anderen Seite bei der Beseitigung von Stoffwechselabfällen beteiligt ist (Buckingham, Meilhac et al. 2005). Säugetiere zeichnen sich mit zwei eigenständigen Kreisläufen, dem Körperkreislauf und dem Lungenkreislauf, aus, die als sogenannter „doppelter Kreislauf“ bezeichnet werden. Hierbei wird durch die Kontraktion des linken Ventrikels das mit Sauerstoff angereicherte Blut über die Aorta in den Körperkreislauf gepumpt. Die ersten Arterien die von der Aorta abzweigen sind die zwei großen Herzkranzgefäße (rechte und linke Koronararterie). Sie umgeben den Herzmuskel und versorgen diesen dadurch mit Sauerstoff und wichtigen Nährstoffen. Für ein gesundes Herz ist diese Durchblutung des Herzmuskels essenziell. Nach den Koronararterien folgt eine Abzweigung der Arterien in den Kopf, vordere Extremitäten, abdominale Organe und hintere Extremitäten bevor das nun sauerstoffarme Blut in der oberen und unteren Hohlvene ankommt. Von dort strömt das Blut zunächst in das rechte Atrium und anschließend in den rechten Ventrikel. Mit der Kontraktion des rechten Ventrikels wird das Blut dann in den Lungenkreislauf gepumpt. Es strömt durch die Lungenarterie in die Lunge, gibt dabei Kohlenstoffdioxid ab und wird wieder mit Sauerstoff

angereichert. Aus der Lungenvene strömt das nun sauerstoffreiche Blut über das linke Atrium in den linken Ventrikel und kann von dort aus mit der nächsten Kontraktion wieder in den Körperkreislauf gepumpt werden (Campbell, 2009). Um eine lebenslange effiziente Kontraktilität und Pumpleistung des Herzens zu gewährleisten, ist eine Reifung der Kardiomyozyten während der Entwicklung essenziell. Unter der Reifung von Kardiomyozyten versteht man grundsätzlich eine Änderung der Funktion, der Zellstruktur, des Metabolismus und der Genexpression, wodurch aus sogenannten undifferenzierten „fetalen“ Kardiomyozyten, differenzierte „adulte“ Kardiomyozyten gebildet werden (Guo and Pu 2020). In den Myofibrillen findet während der Reifung der Kardiomyozyten ein Wechsel der Isoformen und eine Anordnung und Erweiterung der Sarkomere statt, um so die Sarkomerkontraktion gewährleisten zu können. Zudem kommt es zu einer Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften, um die für eine Kontraktion benötigte Reizbildung und Reizweiterleitung zu koordinieren. Darüber hinaus kommt es zu einem Wechsel des Metabolismus von Glykolyse zum Fettsäurestoffwechsel und einem Verlust des Proliferationspotentials, was zu einer Bildung von binukleären und polyploiden Kardiomyozyten führt (Abbildung 1). Diese differenzierten Kardiomyozyten sind grundlegend für die Kontraktion des Herzens. Sie sind durch Glanzstreifen (engl. *intercalated disc*) miteinander verbunden und bilden die Herzmuskelfasern und das Myokard. Prinzipiell werden zwei Arten von Herzmuskelfasern unterschieden: Das Arbeitsmyokard (ca. 98 %), welches als Arbeitsmuskulatur der Vorhöfe und Ventrikel die eigentliche mechanische Pumparbeit des Herzens verrichtet, und Zellen des Erregungsbildungs- und Leitungssystems (ca. 2 %), welche aus spezialisierten Kardiomyozyten bestehen, die für die elektrische Reizbildung und Weiterleitung verantwortlich sind (Aumüller, 2010). Auch wenn die Kontraktion des Herzens autonom erfolgt, wird die Frequenz und der zeitliche Ablauf, mit denen sämtliche Kardiomyozyten synchron kontrahieren, vom Sinusknoten festgelegt. Dieser besteht aus einer Gruppe autorhythmischer Zellen und generiert elektrische Impulse die sich mit Hilfe von *Gap Junctions*, welche die Kardiomyozyten elektrisch miteinander koppeln, rasch über den atrioventrikulären Knoten (AV-Knoten) und den Purkinje-Fasern im Herzgewebe ausbreiten. Die rhythmische Kontraktion kann dabei von physiologischen Einflüssen, wie dem vegetativen Nervensystem, die auf den Sinusknoten einwirken, beeinflusst werden (Campbell, 2009).

**A**

	Genexpression	Morphologie	Funktion
<b>Myofibrille</b>	reife Sarkomerkomponente  Wechsel der Isoformen: MYH6 → MYH7 (hs) MYH7 → MYH6 (mm) TNN1 → TNN3 MYL7 → MYL2 TTN-N2BA → TTN-N2B	Anordnung und Erweiterung von Sarkomeren  Ausrichtung der Sarkomere  Zunahme der Sarkomerlänge (~ 2,2µm)  Bildung der M-Linie	Sarkomerkontraktion
<b>Elektrophysiologie und Ca2+ Handling</b>	Ventrikuläre Ionenkanäle (z.B. KCNJ2) ↑ Spannungsgesteuerte Ionenkanäle (z.B. HCN4) ↓ Ca2+ beeinflussende Moleküle (z.B. Cav 1.2, RYR2, SERCA2) ↑	Bildung und Organisation von T-Tubuli  Erweiterung und Organisation des sarkoplasmatischen Retikulums	Aktionspotential  Ca2+ Transienten: Peak Amplitude Abklingzeit Diastolisches Ca2+
<b>Metabolismus</b>	Glykolyse ↓ mitochondriale Biogenese ↑ Fettsäureoxidation und oxidative Phosphorylierung ↑	Anzahl und Größe der Mitochondrien ↑  Cristae Bildung und Organisation  Intermyofibrilläre Lokalisation	Wechsel des Metabolismus von Glykolyse zu Fettsäurestoffwechsel
<b>Weitere</b>	Zellzyklusaktivität ↓ Veränderungen der Zelladhäsionsgene	Polyploidie Binukleation Formation der Glanzstreifen	



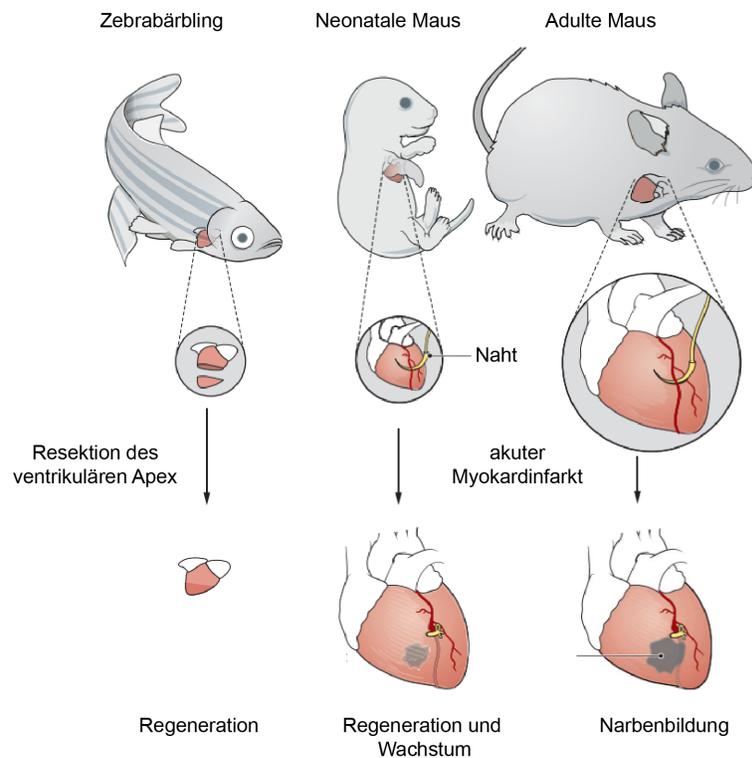
**Abbildung 1 – Veränderung der Kardiomyozyten während der Entwicklung des Herzens.**  
 (A) Darstellung wesentlicher Parameter während der Reifung der Kardiomyozyten (adaptiert von (Guo and Pu 2020)). (B) Schematische Darstellung über die Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten während der Herzentwicklung und des postnatalen Wachstums bei Mäusen. Das Herz wächst während der Entwicklung durch die Proliferation von Kardiomyozyten (grüne Linie). Die Proliferation nimmt dabei bereits vor der Geburt ab. Dabei kann die DNA-Replikation und Karyokinese noch stattfinden aber keine Cytokinese, was zur Bildung von zweikernigen (DNA-Replikation mit Karyokinese; rote Linie) oder polyploiden Kardiomyozyten (DNA-Replikation ohne Karyokinese; blaue Linie) führt (M = Mitose; C = Cytokinese; adaptiert von(Gunthel, Barnett et al. 2018)).

## 1.2 Arten, Ursachen und Folgen von Herzinsuffizienzen

Alle Erkrankungen, die die Struktur oder Funktion des Herzens und des Gefäßsystems beeinträchtigen, werden als Herz-Kreislauf-Erkrankungen bezeichnet und sind weltweit die häufigste Todesursache (GBD causes of death; 2018). Einige Erkrankungen des Herzens sind zum Beispiel Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), Herzklappenerkrankungen, Kardiomyopathien, koronare Herzerkrankungen, Herzinfarkte und die Herzinsuffizienz. Während Herzrhythmusstörungen in den meisten Fällen ungefährlich sind, können sie jedoch wie andere Herzerkrankungen schwere Folgen mit sich ziehen. Bei einem Vorhofflimmern beispielsweise können sich Blutgerinnsel bilden, die wiederum Schlaganfälle verursachen können. Bei einem Kammerflimmern kommt es sogar zum Herzstillstand da kein Blut mehr gepumpt werden kann. Herzklappenerkrankungen verändern den Blutfluss und können bei fehlerhaften Öffnen und Schließen zu einer Verdickung des Herzmuskels oder einer Herzinsuffizienz führen. Kardiomyopathien umfassen Erkrankungen die das Myokard betreffen und in Folge dessen das Herz nicht mehr richtig kontrahieren kann. Darunter fallen beispielsweise die dilatative Kardiomyopathie (DCM) und die ischämische Kardiomyopathie (ICM). Bei der dilatativen Kardiomyopathie kommt es vor allem zur Dilatation des linken Ventrikels, wobei bei einem Fortschreiten der Krankheit auch der rechte Ventrikel und die Atrien betroffen sein können. Zudem kann die komplette Herzwand aufgrund der Dilatation dünner werden, wodurch das Herz nicht mehr sinngemäß kontrahieren kann, um das Blut in den Körper- und Lungenkreislauf zu pumpen. Die ischämische Kardiomyopathie umfasst dilatierte und schlecht kontrahierende Herzen und tritt bei schweren koronaren Herzerkrankungen auf, welche mit oder ohne Infarktbereiche auftreten können. Eine koronare Herzerkrankung entwickelt sich durch Ablagerungen in den Arterien. Damit einhergehend kommt es zur Behinderung der Blutzirkulation des Herzmuskels, der dann nicht mehr ausreichend mit Blut versorgt werden kann. Es kommt zu Durchblutungsstörungen die zu anfallsartigen Brustschmerzen (Angina pectoris) führen oder, sollte die Koronararterie durch Ablagerungen komplett verschlossen werden, zu einem Herzinfarkt (Khan, 2005). Die Ursachen von solchen Erkrankungen sind dabei sehr vielseitig und reichen von Bluthochdruck, über den Lebensstil (z. B. Alkohol, Drogen, Fettleibigkeit, Stress), bis hin zu Lungenproblemen

(z. B. Asthma, Bronchitis, schlechte Lungendurchblutung) (Ponikowski, Anker et al. 2014). All diese geschilderten Erkrankungen können das Herz schwächen und Herzinsuffizienzen nach sich ziehen. Beispielsweise kann eine chronische Herzinsuffizienz als Folge nach einem Herzinfarkt auftreten und dabei eine Reihe von Symptomen mit sich führen, die zu einer enormen Belastung werden können (Mosterd and Hoes 2007, Jenca, Melenovsky et al. 2021). Die Größe des Infarktgebietes kann als prognostischer Marker für eine anschließende Herzinsuffizienz genutzt werden, da mit der Größe des Infarktgebietes auch die Wahrscheinlichkeit einer Herzinsuffizienz zunimmt (Takemura, Nakagawa et al. 2009). Obwohl die Lebenserwartungen heute aufgrund von fortwährenden Verbesserungen von pharmakologischen Therapien und entlastenden operativen Eingriffen erhöht werden kann (O’Leary, Murphy et al. 2009), weisen Herz-Kreislauf-Erkrankungen weiterhin eine hohe Mortalitätsrate auf (Riley and Beattie 2017). Hauptursache hierfür ist, dass Schäden durch Herzinfarkte oder Herzinsuffizienzen mit einem Absterben von Kardiomyozyten verbunden ist (Konstantinidis, Whelan et al. 2012). Anders als bei Amphibien und Fischen, die das Herz nach Schädigung komplett regenerieren können, sind erwachsene Säugetiere nur zu einer Wundheilung fähig. Hier führt eine Schädigung des Herzens durch beispielsweise einem Herzinfarkt aufgrund des fehlenden Regenerationspotentials zur Bildung einer permanenten fibrotischen Narbe (Tanaka and Reddien 2011, Tzahor and Poss 2017, Hortells, Johansen et al. 2019). Der Grund hierfür liegt darin, dass bei Säugetieren kurz nach der Geburt das Proliferationspotential von Kardiomyozyten verloren geht (siehe Abbildung 1 B) (Bergmann, Bhardwaj et al. 2009). Während zum Beispiel in neonatalen Mäusen das fetale Herz kurz nach der Geburt durch die fetalen und dadurch noch stark proliferativen Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt komplett regenerieren kann, bildet sich in adulten Mäusen durch das begrenzte Proliferationspotential von adulten Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt eine permanente fibrotische Narbe (Abbildung 2) (Drenckhahn, Schwarz et al. 2008, Bergmann, Bhardwaj et al. 2009, Porrello, Mahmoud et al. 2011, Porrello, Mahmoud et al. 2013, Konfino, Landa et al. 2015, Haubner, Schneider et al. 2016, Tzahor and Poss 2017). In Mäusen stoppt die Proliferation der Kardiomyozyten fünf Tage nach der Geburt. Ab diesem Zeitpunkt findet in den Kardiomyozyten bis zu einem gewissen Grad zwar noch eine DNA-Replikation und Karyokinese statt, jedoch keine Cytokinese mehr, was zur

Bildung von zweikernigen oder polyploiden Kardiomyozyten führt (Li, Wang et al. 1996, Liu, Yue et al. 2010, Zebrowski, Jensen et al. 2017). Um also die Herzfunktion zu verbessern und so eine Herzinsuffizienz in adulten Herzen zu unterbinden ist das Verständnis über die Induktion der Proliferation in adulten Kardiomyozyten essenziell (Foglia and Poss 2016, Mohamed, Ang et al. 2018, Hashmi and Ahmad 2019, Judd, Lovas et al. 2019, Li, Feng et al. 2020). Verschiedene Studien, die sich mit der Proliferation in adulten Kardiomyozyten befassen, zeigen, dass die Proliferation durch unterschiedlichste Bedingungen induziert werden kann. Dazu gehören zum Beispiel die Überexpression von Zellzyklusregulatoren (Mohamed, Ang et al. 2018), Veränderungen von extrazellulären Matrix Komponenten (Bassat, Mutlak et al. 2017) und hypoxische Bedingungen (Nakada, Canseco et al. 2017). Darüber hinaus können vor allem in frühen neonatalen Stadien auch Wachstumsfaktoren wie Interleukin-6 oder Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF) die Proliferation von fetalen Kardiomyozyten stimulieren (Kardami, Banerji et al. 2003, Engel, Hsieh et al. 2006, Zhou, Honor et al. 2011, Przybyt, Krenning et al. 2013). Ein weiterer unterstützender Faktor für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion nach einem Herzinfarkt scheint die Dedifferenzierung von adulten Kardiomyozyten zu sein, die nach einem Herzinfarkt auftritt und sich in der Expression von Genen widerspiegelt, die charakteristisch in embryonalen, fetalen und frühen postnatalen Kardiomyozyten exprimiert sind (Ausma, Wijffels et al. 1997, Driesen, Verheyen et al. 2009, Taegtmeyer, Sen et al. 2010, Kubin, Poling et al. 2011, Hou, Adrian-Segarra et al. 2015). Zusammenfassend gibt es viele Arten und Ursachen einer Herzerkrankung, welche jedoch alle aufgrund des fehlenden Regenerationspotentials in adulten Herzen letztendlich zu einer Herzinsuffizienz führen. Um die Herzfunktion nach einer Schädigung zu verbessern und eine Herzinsuffizienz zu vermeiden, müssten adulte Kardiomyozyten das Regenerationspotential durch Dedifferenzierung und Proliferation erhöhen.



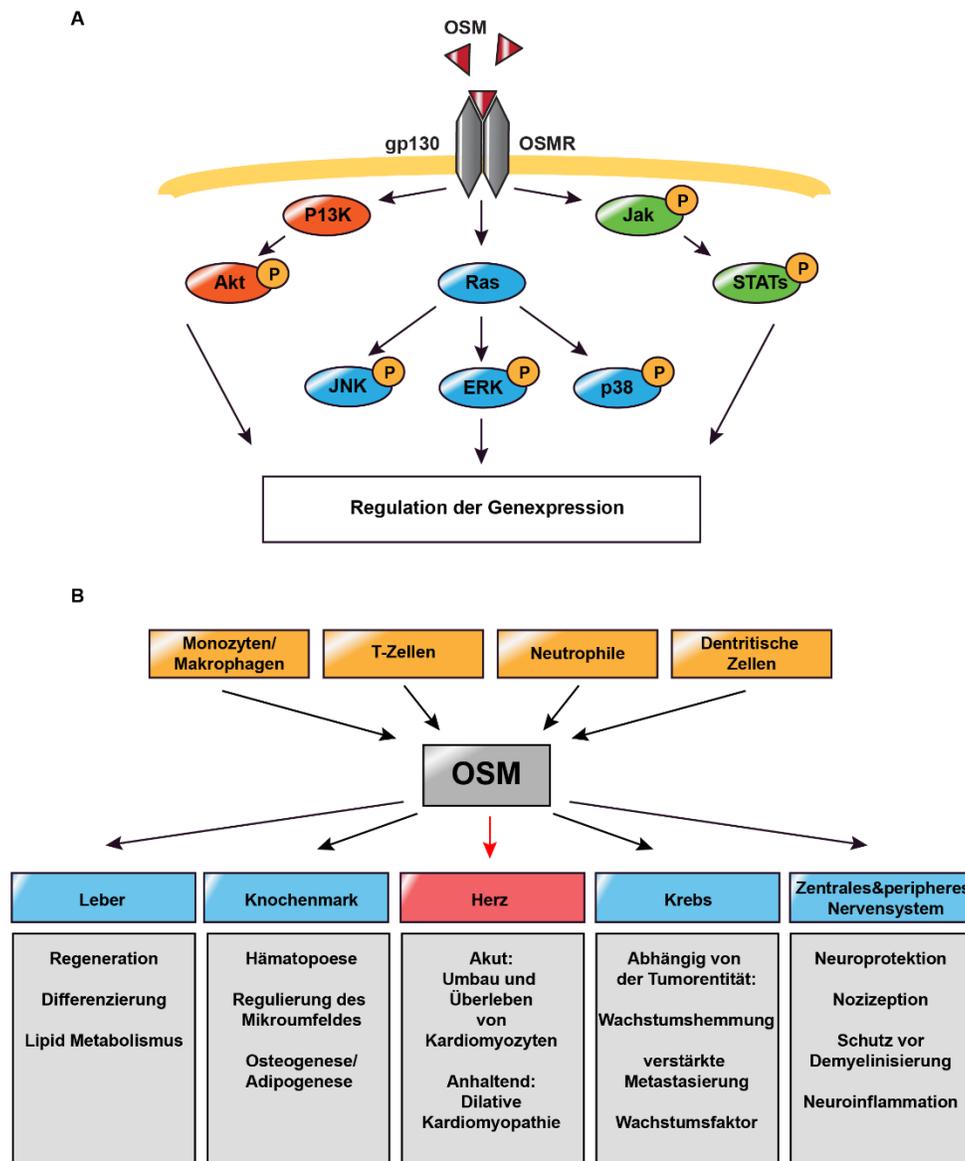
**Abbildung 2 – Regenerationspotential von Zebrafährlingen, neonatalen und adulten Mäusen.**

Adulte Zebrafische können den Herzmuskel nach einer Verletzung durch beispielsweise eine Resektion des ventrikulären Apex mittels Kardiomyozytenproliferation vollständig regenerieren (Links). Neonatale Mäuse weisen ein Regenerationspotential nach einem Myokardinfarkt auf inklusiver kompensatorischer Proliferation während des Wachstums des Herzens, welches die Folgen einer Verletzung in dieser Phase minimiert (Mitte). Adulte Mäusen besitzen kein Regenerationspotential mehr und weisen nach einem Myokardinfarkt stattdessen eine Wundheilung auf, welche zu einer Bildung einer permanenten fibrotischen Narbe führt (Rechts; adaptiert von (Tzahor und Poss 2017)).

### 1.3 Der Oncostatin M Rezeptor (OSMR) und seine Funktion und Relevanz im Herzen

Der Oncostatin M Rezeptor (OSMR) interagiert ebenso wie gp130 oder der LIF Rezeptor (LIFR) mit Oncostatin M (OSM), einem Glykoprotein der Interleukin-6 Familie (IL-6) (Gearing, Comeau et al. 1992, Mosley, De Imus et al. 1996). OSM wird durch aktivierte Monozyten, dendritische Zellen und T-Lymphozyten synthetisiert (Rose and Bruce 1991) und ist das einzige Zytokin aus der IL-6 Familie, dass in der Lage ist, mit einer hohen Affinität, zwei Signalkomplexe zu aktivieren. Hierfür bindet OSM entweder an den Typ I Rezeptorkomplex bestehend aus gp130 und dem LIFR (gp130/LIFR) (Gearing, Comeau et al. 1992) oder an den Typ II Rezeptorkomplex bestehend aus gp130 und OSMR (gp130/OSMR) (Mosley, De Imus et al. 1996). Da der OSMR sowohl im Gefäßsystem als auch im Herzen, in der Lunge, im Fettgewebe und vielem mehr exprimiert wird, kann OSM dadurch eine Vielzahl von biologischen Prozessen und auch pathologische Situationen, wie etwa verschiedene chronische entzündliche Erkrankungen, oder akute Myokardverletzungen beeinflussen (Abbildung 3) (Hermanns 2015). Dabei kann OSM neben dem JAK/STAT-Signalweg (Lutticken, Wegenka et al. 1994, Radtke, Hermanns et al. 2002) auch die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/ERK2 (Schiemann, Bartoe et al. 1997, Hermanns, Radtke et al. 2000), den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg (Negoro, Oh et al. 2001) und die durch die Spannung aktivierten Proteinkinasen p38 und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktivieren (Abbildung 3) (Wang, Robledo et al. 2000, Hermanns 2015). Studien, welche die Aktivierung des gp130/OSMR Rezeptorkomplexes in *in vivo* Modellen gründlich untersuchten, konnten in verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise Rückenmarksverletzungen, durch Fettleibigkeit hervorgerufen Leberinsulinresistenz und bei einem ischämischen Schlaganfall einen schützenden Effekt nachweisen (Slaets, Nelissen et al. 2014, Guo, Li et al. 2015, Luo, Wang et al. 2016). Im Herz spielt OSM eine essenzielle Rolle bei der Dedifferenzierung von Kardiomyozyten (Kubin, Poling et al. 2011) und der Regulation der extrazellulären Matrix (Stawski and Trojanowska 2019). Dabei wurden Gene die durch OSM reguliert werden auch bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und ischämischen Herzerkrankungen identifiziert (Kubin, Poling et al. 2011,

Szibor, Poling et al. 2014, Hou, Adrian-Segarra et al. 2015, Richter, Lautze et al. 2015). Es scheint jedoch, dass sich die Rolle von OSM von einer akuten Verletzung zu einer chronischen Erkrankung des Herzens unterscheidet. Während die OSM induzierte Dedifferenzierung von Kardiomyozyten das Herz nach einer akuten Verletzung wie etwa einem Herzinfarkt schützt, kommt es bei einer chronischen Aktivierung von OSM wie beispielsweise bei einer dilatativen Kardiomyopathie, zu einer Verschlechterung der Funktion des Herzens bis hin zur Letalität (Kubin, Poling et al. 2011). Diese unterschiedlichen Wirkmechanismen wurden auch in anderen Modellen beobachtet. In Diabetes-Mäusen konnte bei einer akuten Verletzung des Herzens durch Ischämie/Reperfusion eine schützende Wirkung von OSM nachgewiesen werden (Sun, Li et al. 2015), während in einer weiteren Studie die schädliche Wirkung von OSM bei einer dilatativen Kardiomyopathie bestätigt wurde, indem eine Anwendung eines Antikörpers gegen die extrazelluläre Domäne von OSMR $\beta$  die Herzleistung in einem Mausmodell mit dilatativer Kardiomyopathie signifikant verbesserte (Poling, Gajawada et al. 2014). Verantwortlich für die schützende Funktion von OSM soll dabei Reg3 $\beta$  sein, das Makrophagen an die Stelle der Verletzung im Herzen rekrutieren soll und somit den Heilungsprozess unterstützt. Bestätigt wird diese Annahme durch eine Korrelation zwischen dem Verlust der Reg3 $\beta$  Expression und einer verringerten Anzahl von Makrophagen im ischämischen Herzen, welches von einer erhöhten ventrikulären Dilatation begleitet wird (Lorchner, Poling et al. 2015).



**Abbildung 3 – Übersicht der durch OSM aktivierten Signalwege und Funktionen von OSM.**

(A) Nachdem OSM an den OSMR gebunden hat, ist es in der Lage durch Phosphorylierungen verschiedenste Signalwege zu initiieren (B) Zusammenfassende schematische Darstellung einiger physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von OSM, in verschiedenen Geweben, welches durch aktivierte Monozyten, dendritische Zellen, Neutrophile und T-Lymphozyten synthetisiert wird. (adaptiert von (Hermanns 2015)).

#### 1.4 Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1) und seine Funktion und Relevanz im Herzen

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1) interagiert mit sogenannten Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF; engl. *fibroblast growth factor*), welche als FGF-Familie bezeichnet werden und aus 23 sekretierten Proteinen besteht (FGF1-FGF23), die mit vier Tyrosinkinase-FGF-Rezeptoren (FGFR1-4) interagieren (Ornitz and Itoh 2015). Obwohl diese vier Rezeptoren von unterschiedlichen Genen kodiert werden, weisen sie bei einer identischen Sequenz zwischen 56 % bis 71 % eine hohe Homologie auf (Itoh and Ornitz 2004, Dai, Zhou et al. 2019). Die FGFR's werden ähnlich wie andere Rezeptortyrosinkinasen auf der Zellmembran exprimiert und können so durch extrazelluläre Signale aktiviert werden. Durch die Bindung eines FGF's an einen Rezeptor kommt es zur Dimerisierung der FGFR's und zur Transautophosphorylierung der intrazellulären Kinasedomäne mit anschließender Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege (Lemmon and Schlessinger 2010). Diese Signalwege umfassen die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen Ras/Raf-Mek-MAPKs, den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg und STAT. Zudem können FGFR's auch PLC $\gamma$  rekrutieren und phosphorylieren (Ornitz and Itoh 2015). Dies ermöglicht den FGFR's die Beteiligung an verschiedenen lebenswichtigen Prozessen wie etwa die Proliferation, Differenzierung und Zellmigration in verschiedensten Geweben und Zelltypen (Abbildung 4) (Beenken and Mohammadi 2009, Dorey and Amaya 2010, Ornitz and Itoh 2015, Xie, Su et al. 2020). Im Herzen spielt die Signalübertragung via FGF eine wichtige Rolle bei der kardialen Remodellierung (Itoh and Ohta 2013) und trägt unter anderem, sowohl bei neonatalen, als auch bei adulten Kardiomyozyten, zur Proliferation der Zellen bei (Engel, Hsieh et al. 2006, Novoyatleva, Sajjad et al. 2014, Itoh, Ohta et al. 2016). Dabei scheint im adulten Herzen vorwiegend der FGFR1 in Kardiomyozyten exprimiert zu werden, während FGFR2, FGFR3 und FGFR4 im Herzen nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden (Fon Tacer, Bookout et al. 2010). Kommt es zu einer akuten Verletzung des Herzens wie etwa einem Myokardinfarkt, steigt die Expression von FGFR1 im Bereich der Verletzung an und ist an der Regulation der Angiogenese und Regeneration des Herzens beteiligt (Zhao, Zhao et al. 2011). Diese

---

unterstützende Funktion des FGFR1 bei der Regeneration des Herzens konnte auch in weitere Studien gezeigt werden, in denen man den FGF2/FGFR1 Signalweg mittels FGF2-Mutante, die nicht mehr an den FGFR1 binden konnte, inhibierte, und keine Verbesserung mehr bei der Regeneration des Herzens nach Ischämie/Reperfusion nachweisen konnte (Jiang, Padua et al. 2002). Auch eine Inhibition des Signalweges mit einem Pan-FGFR-Inhibitor bei Ratten führte zu keiner schützenden Wirkung, sondern einer kardialen Dysfunktion (Yanochko, Vitsky et al. 2013).

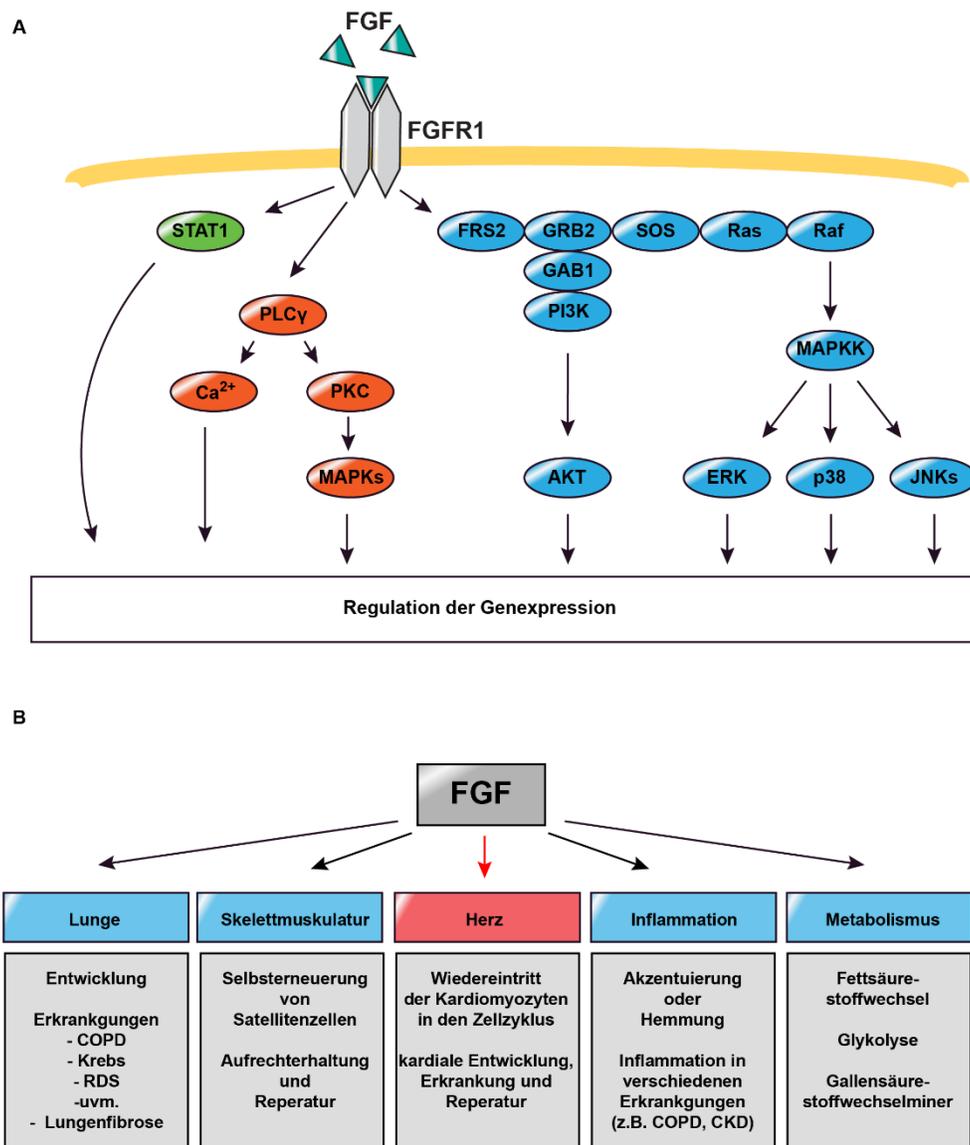


Abbildung 4 – Übersicht der durch FGF aktivierten Signalwege und Funktionen von FGF.

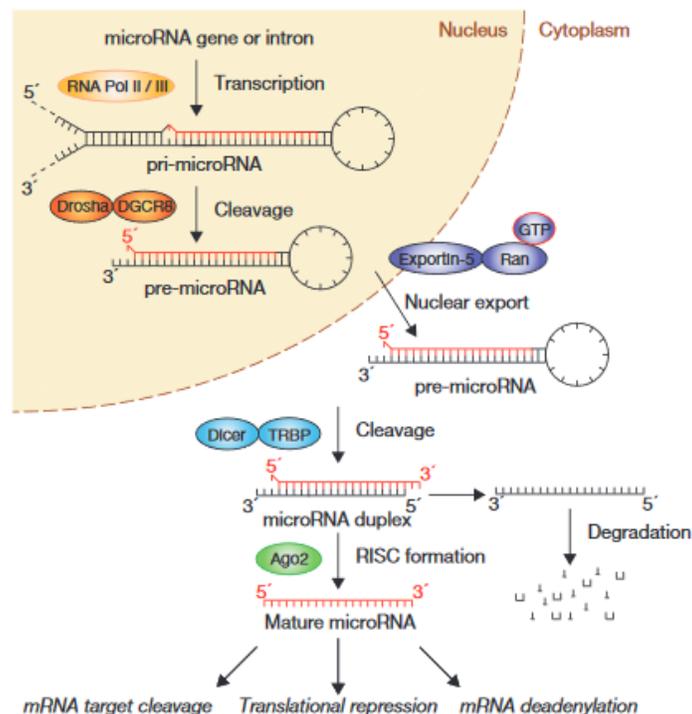
(A) Nachdem FGF an einen FGFR (dargestellt hier FGFR1) gebunden hat ist es in der Lage verschiedenste Signalwege zu initiieren (B) Zusammenfassende schematische Darstellung einiger physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von FGF in verschiedenen Geweben (adaptiert von (Xie, Su et al. 2020))

## 1.5. MicroRNAs und ihre Funktion und Relevanz im Herzen

### 1.5.1 Biogenese und Funktion

MicroRNAs (miRNAs) sind etwa 20 bis 25 Nukleotide lang, gehören zu den kleinen nicht-kodierenden RNAs und können sowohl in kodierenden, als auch nicht-kodierenden genomischen Elementen lokalisiert werden (Bartel 2004, Boettger and Braun 2012). Dabei weisen miRNAs die zwischen den genomischen Elementen lokalisiert sind eine eigene Promotorregion auf, während miRNAs die in einem genomischen Bereich lokalisiert sind für gewöhnlich mit dem Wirtsgen exprimiert werden (Baskerville and Bartel 2005). In Säugern kommen miRNAs überwiegend in Clustern vor, wobei alle miRs innerhalb eines Clusters polycistronisch exprimiert werden (Cai, Hagedorn et al. 2004, Baskerville and Bartel 2005, Xu and Wong 2008). Die Biogenese der miRNAs besteht aus mehreren Schritten (Abbildung 5) und beginnt mit der Transkription einer langen primären miRNA (pri-miRNA). Dabei werden pri-miRNAs in der Regel durch die RNA Polymerase II transkribiert mitunter auch durch die RNA Polymerase III (Lee, Jeon et al. 2002, Borchert, Lanier et al. 2006). Anschließend wird die pri-miRNA durch den Mikroprozessorkomplex, welcher aus *Drosha*, RNase III und dem RNA bindenden Protein DGCR8 besteht, endonukleolytisch prozessiert. Dadurch entsteht eine in etwa 85 Nukleotid lange pre-miRNA, die als typische Sekundärstruktur eine Haarnadelstruktur bildet. Das 3´Ende der pre-miRNA wird von Exportin-5 gebunden und mit Hilfe von Ran-GTP aus dem Nukleus in das Zytoplasma transportiert (Yi, Qin et al. 2003, Denli, Tops et al. 2004, Gregory, Yan et al. 2004, Lund, Guttinger et al. 2004, Winter, Jung et al. 2009). Im Zytoplasma erkennt und schneidet das RNase III Enzym *Dicer* die Haarnadelstruktur der pre-miRNA, sodass ein in etwa 20 bis 25 Nukleotid langer miRNA Doppelstrang (miRNA/miRNA-Duplex) entsteht, welcher anschließend entwunden wird, wodurch zwei RNA Stränge entstehen. Der Hauptstrang wird als so genannte reife miRNA bezeichnet und wird in den miRISC (engl. *microRNA-induced silencing complex*), bestehend aus *Dicer*, Argonaut (*Ago2*) und den RNA-Bindeproteinen PACT (engl. *Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase*) und TRBT (engl. *HIV-1 TAR RNA binding protein*), eingebaut (Kok, Ng et al. 2007, Winter, Jung et al. 2009), während der komplementäre Strang in der Regel im miRISC abgebaut wird (Rand,

Petersen et al. 2005). Abschließend bindet der Hauptstrang der reifen miRNA des miRISC mit Hilfe der Watson-Crick Basenpaarung an ihre Ziel-RNA um diese durch beispielsweise Spaltung, translationale Repression oder Deadenylierung abzubauen oder zu inhibieren, um damit die Proteinexpression zu verringern. Dabei ist die Effizienz dieser Bindung von ihrer Komplementarität und anschließenden Wirkungsweise abhängig (Ambros 2004, Cordes and Srivastava 2009, Winter, Jung et al. 2009, Peng and Croce 2016).



**Abbildung 5 – Schematische Darstellung der Prozessierung und Funktionsweisen von miRNAs.**

Die pri-microRNA wird mittels RNA Polymerase II oder III (RNA Pol II / III) im Nucleus transkribiert und von dem Drosha/DGCR8 Komplex geschnitten. Dadurch entsteht eine in etwa 85 Nukleotid lange pre-microRNA. Diese pre-microRNA wird mit Hilfe des Exportin-5/Ran/GTP Komplex in das Zytoplasma exportiert und dort vom Dicer/TRBP Komplex erkannt und geschnitten. Der in etwa 20 bis 25 Nukleotid lange miRNA Doppelstrang wird entwunden und der Hauptstrang (rot dargestellt) der miRNA (reife microRNA) anschließend zusammen mit Ago2 Proteinen in den RISC Komplex eingebaut, während der komplementäre Strang (schwarz dargestellt) abgebaut wird. Die reife microRNA wird dann vom RISC Komplex zur Ziel-RNA gebracht um diese beispielsweise durch Spaltung, translationale Repression oder Deadenylierung zu inhibieren (aus (Winter, Jung et al. 2009)).

Die Wirkungsweise von reifen miRNAs ist stark abhängig von einer sechs bis acht Nukleotid langen Sequenz (*seed region*) am 5'Ende der reifen miRNA und besteht hauptsächlich darin die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene zu regulieren. Liegt eine hohe Übereinstimmung vor, erfolgt eine Degradierung der Ziel-RNA durch Deadenylierung, während eine geringe Übereinstimmung die Inhibierung der Translationsmaschinerie zur Folge hat (Lewis, Burge et al. 2005, Cordes and Srivastava 2009, Peng and Croce 2016). Neben der *seed region* ist die Bindung der reifen miRNA an die Ziel-RNA auch davon abhängig wie zugänglich die Ziel-RNA ist. Beispielsweise kann der Zugang der Ziel-RNA durch RNA-bindende Proteine oder veränderte Sekundärstrukturen der RNA unterbunden werden (Zhao and Srivastava 2007). Seit der Entdeckung des ersten miRNA-Gens im Jahre 1993 (Lee, Feinbaum et al. 1993) wurden dank der Entdeckung des RNA-Interferenz Mechanismus in einer miR Datenbank (<http://mirbase.org>) die Lokalisation im Genom, die Sequenz, Nomenklatur und Funktion, sofern diese bekannt ist, von rund 1115 reife miRNAs allein im Menschen (Alles, Fehlmann et al. 2019) (miRBase V22) und insgesamt über 17000 reife miRNA Sequenzen aus über 140 Spezies annotiert, deren Funktionen bis heute teilweise noch vollkommen unbekannt sind. Putative Ziel-RNAs werden heutzutage mittels bioinformatischen Programmen (Liu, Li et al. 2014, Chen, Heikkinen et al. 2019), wie miRanda (John, Enright et al. 2004, Betel, Koppal et al. 2010), TargetScan (Lewis, Shih et al. 2003, Agarwal, Bell et al. 2015), RNAhybrid (Rehmsmeier, Steffen et al. 2004, Kruger and Rehmsmeier 2006) und PicTar (Krek, Grun et al. 2005, Lall, Grun et al. 2006), oder experimentellen Ansätzen identifiziert. Zweiteres basiert auf Immunopräzipitation von Bestandteilen des miRISC, um die daran gebundene mRNA zu isolieren und anschließend zu sequenzieren (Karginov, Conaco et al. 2007, Orom and Lund 2007, Hsu, Yang et al. 2009). Die Identifizierung putativer Ziel-RNAs alleine gibt jedoch keinen Aufschluss über die eigentlichen Gegebenheiten *in vivo*. Hierfür werden Experimente mit Gen-spezifischen Knockouts oder Überexpressionen in Modelorganismen verwendet (Boettger and Braun 2012). Wissenschaftliche Studien wiesen eine wichtige Rolle von miRNAs in unterschiedlichsten physiologischen Prozessen nach, darunter Proliferation, Entwicklung, Differenzierung und Metabolismus verschiedenster Gewebe (Bartel 2004, Wang and Sen 2011). Dabei konnte bei verschiedensten Erkrankungen eine deregulierte Expression

von miRNAs nachgewiesen werden (Shukla, Singh et al. 2011, Wang, Chen et al. 2015) und die Erforschung von miRNAs gewann im Laufe der Jahre immer mehr an zunehmender Bedeutung für mögliche therapeutische Anwendungspunkte, wie beispielsweise in der Herz-Kreislauf Medizin (Care, Catalucci et al. 2007, van Rooij, Sutherland et al. 2007, Thum, Gross et al. 2008, da Costa Martins, Salic et al. 2010, Boon, Seeger et al. 2011, Thum, Chau et al. 2011).

### 1.5.2 Der Einfluss von miRNAs auf das Herz

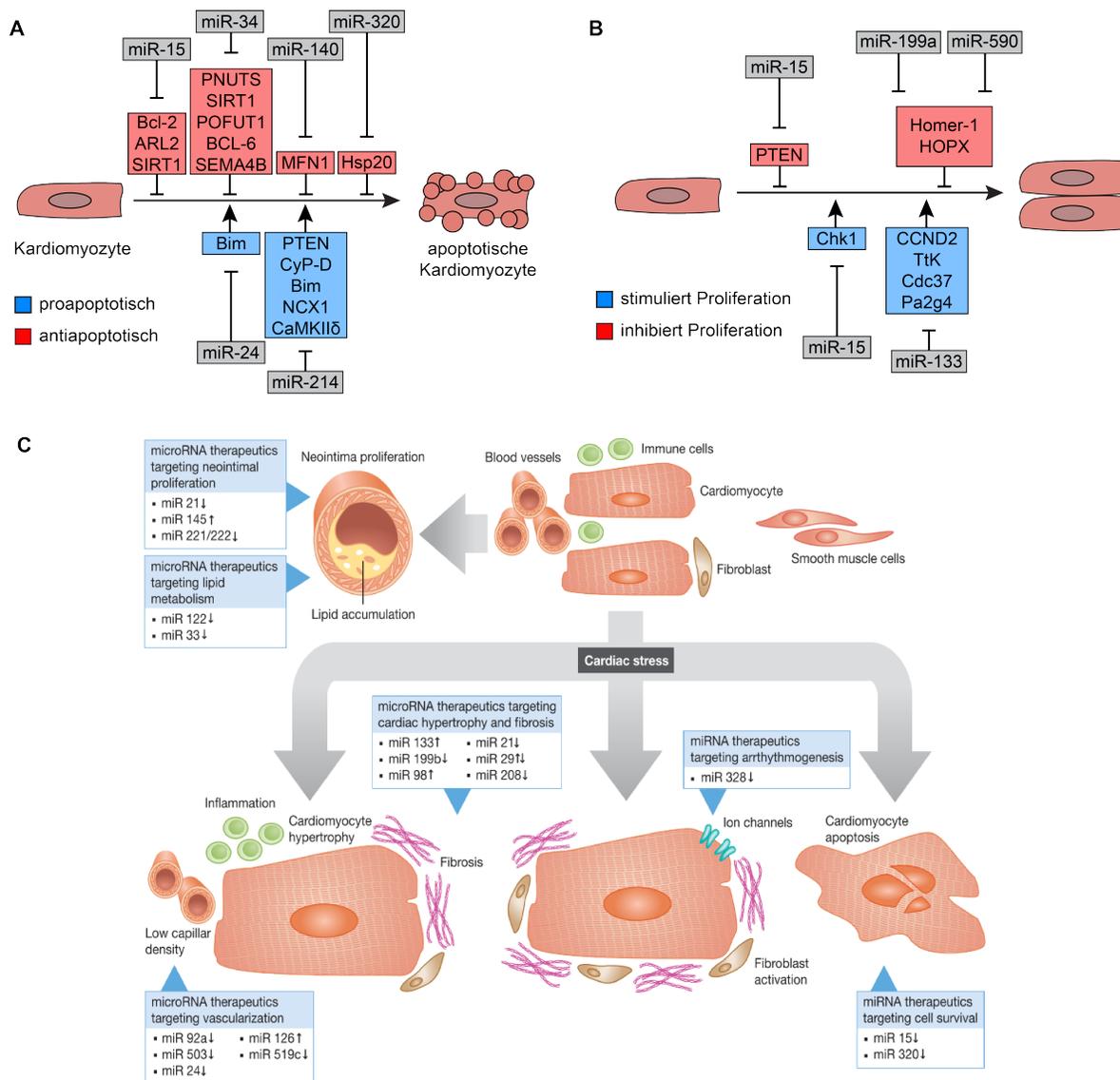
Wie wichtig die posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines gesunden Herzens ist, wurde durch verschiedenste Studien nachgewiesen. Beispielsweise führt im Herzen der frühe Verlust von Enzymen, wie Dicer, Drosha, Ago2 und DGCR8, die eine wichtige Rolle während der Biogenese von miRNAs spielen, zu schweren Entwicklungsstörungen, die eine embryonale Letalität zur Folge hat (Kuehbach, Urbich et al. 2007, Park, Choi et al. 2010, Bauersachs and Thum 2011). Angesichts der Rolle von miRNAs im Herzen wurden daher im Laufe der Jahre miRNAs im Zusammenhang mit Erkrankungen des Herzens untersucht, um dadurch ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu erlangen, und somit die Entwicklung innovativer und wirksamer Therapien für Herzerkrankungen zu ermöglichen (Abbildung 6). Beispielsweise führt eine *in vivo* Inhibition von miR-199 unter anderem zu einer Normalisierung von Herzfunktionsstörungen (da Costa Martins, Salic et al. 2010) oder eine Runterregulation von miR-29 zu vermehrter Fibrose und der Verhinderung einer Aortendilatation (van Rooij, Sutherland et al. 2007, Boon, Seeger et al. 2011).

Dabei beinhaltet das Herz verschiedenste Zelltypen und exprimiert miRNAs die nicht grundsätzlich Herz- oder Kardiomyozyten spezifisch sind, da diese auch in anderen Geweben weitgehend exprimiert werden (Ludwig, Leidinger et al. 2016). Wie etwa miR-195 (Porrello, Johnson et al. 2011) oder miR-99/100 (Aguirre, Montserrat et al. 2014), welche nach einer Inhibierung zwar die Expression von Zellzyklusgenen in Kardiomyozyten oder die Dedifferenzierung und Proliferation von Kardiomyozyten fördern, aber nicht spezifisch in Kardiomyozyten exprimiert sind. Weitere miRNAs die die Proliferation von Kardiomyozyten induzieren sind die miRNAs miR-199a und miR-590 (Eulalio, Mano et al. 2012). Im Gegensatz dazu hemmen miRNAs

aus der miR-15 Familie (Porrello, Johnson et al. 2011, Porrello, Mahmoud et al. 2013) und miR-133 (Liu, Bezprozvannaya et al. 2008) die Proliferation von Kardiomyozyten. Neben der Proliferation spielen auch weitere Faktoren wie Apoptose, Angiogenese und die interzelluläre Kommunikation bei der Regeneration des Herzens eine wichtige Rolle. Aufgrund des geringen Proliferationspotentials von adulten Kardiomyozyten würde die Hemmung der Apoptose nach einer Schädigung des Herzens die Funktion und Regeneration des Herzens fördern. Diverse proapoptotische miRNAs umfassen unter anderem die miR-15 Familie (Zhu, Yang et al. 2011); miR-34 (Bernardo, Gao et al. 2012, Boon, Iekushi et al. 2013); miR-320 (Ren, Wu et al. 2009) und miR-140 (Li, Li et al. 2014). Antiapoptotische miRNAs umfassen miR-24 (Qian, Van Laake et al. 2011) und miR-214 (Aurora, Mahmoud et al. 2012).

Die Angiogenese ist entscheidend für die Versorgung des regenerierten Herzmuskels mit Sauerstoff und Nährstoffen. MicroRNAs, die die Angiogenese im Herzen induzieren sind unter anderem miR-15 (Yin, Olsen et al. 2012); miR-24 (Meloni, Marchetti et al. 2013) und miR-26 (Icli, Wara et al. 2013). Gehemmt wird diese durch miRNAs aus dem miR-17/92 cluster (Bonauer, Carmona et al. 2009).

Im Falle der interzellulären Kommunikation wird die Herzregeneration durch eine Behandlung mit Stamm- oder Vorläuferzellen induziert, welche dazu beitragen Gewebe neu zu bilden oder die endogene Regeneration des Herzens über parakrine Wirkungen stimulieren. MicroRNAs welche die Funktion von solchen Stamm- oder Vorläuferzellen fördern sind beispielsweise miR-1 (Heinrich and Dimmeler 2012) und eine Kombination von miR-21, miR-24 und miR-221 (Hu, Huang et al. 2011). Umgekehrt hemmen miRNAs aus der miR-15 Familie (Spinetti, Fortunato et al. 2013) und miR-34 (Xu, Seeger et al. 2012) die Funktion von Stamm- und Vorläuferzellen. Zusammenfassend können Veränderungen in Bezug auf die Regulation von miRNAs, die im Herzen auftritt sobald das Herz verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt ist, als Biomarker für Erkrankungen des Herzens genutzt werden und untermauern die Wichtigkeit von miRNAs als potentielle therapeutische Ziele bei verschiedensten Herzerkrankungen (Abbildung 6) (van Rooij, Sutherland et al. 2006, D'Alessandra, Devanna et al. 2010).



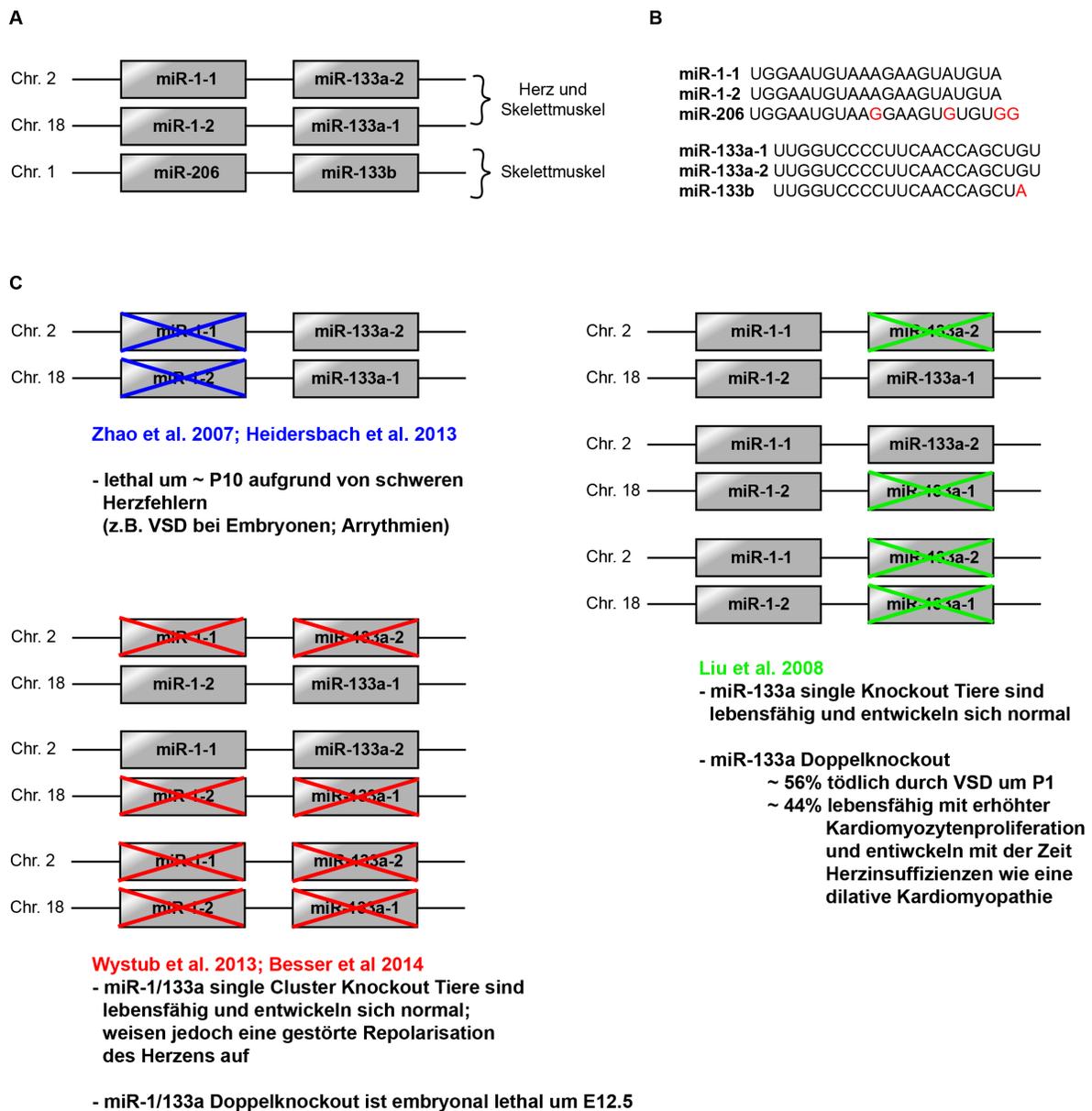
**Abbildung 6 – Schematische Darstellung unterschiedlicher Einflüsse von miRNAs auf das Herz.**

(A) Mehrere miRNAs regulieren die Apoptose in Kardiomyozyten. Zu den proapoptotischen miRNAs gehören miRNAs aus der miR-15 Familie, miR-34, miR-320 und miR-140. Zu den Antiapoptotischen miRNAs gehören miR-24 und miR-214 (adaptiert von (Boon and Dimmeler 2015)). (B) MicroRNAs die die Proliferation von Kardiomyozyten fördern sind beispielsweise miR-19, miR-199a und miR-590. Die miRNAs miR-15 und miR-133 hingegen hemmen die Proliferation von Kardiomyozyten (verändert nach (Boon and Dimmeler 2015)). (D) Repräsentative Zusammenstellung von miRNAs die laut verschiedensten Studien bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen von therapeutischen Interesse sind (aus (Thum 2012)).

### 1.5.3 Die Herz- und Muskelspezifischen microRNAs miR-1 und miR-133a

Einige miRNAs sind hoch muskelspezifisch exprimiert (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2002, Malizia and Wang 2011). Diese spezifisch im Muskel exprimierten miRNAs werden als sogenannte MyomiRs (myo = Muskel, miR = miRNA) bezeichnet, da diese zum Teil in Myosin Genen lokalisiert sind und mit diesen auch koexprimiert werden (Rao, Kumar et al. 2006, Sweetman, Goljanek et al. 2008, van Rooij, Quiat et al. 2009). Dazu gehören die miRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208b und miR-499 (Horak, Novak et al. 2016). Dabei wird die Expression der einzelnen MyomiRs durch Transkriptionsfaktoren reguliert die als sogenannte MRFs (engl. *myogenic regulatory factors*) zusammengefasst werden. Dazu gehören unter anderem MyoD, Myogenin, SRF, Mef2 und Myf5 (Zhao, Samal et al. 2005, Chen, Mandel et al. 2006, Rao, Kumar et al. 2006, Liu, Williams et al. 2007, Sweetman, Goljanek et al. 2008, Koutsoulidou, Mastroiannopoulos et al. 2011). Die miRNAs miR-1 und miR-206, deren Sequenzen sich nur in vier Basen unterscheidet, werden aufgrund ihrer hohen Übereinstimmung zur miR-1 Subfamilie gezählt, während miR-133a und miR-133b, deren Sequenzen sich lediglich in zwei Basen unterscheiden, zur miR-133 Subfamilie gezählt werden (Abbildung 7 A + B). Im Genom existieren zwei geclusterte Kopien von miR-1 und miR-133, die bicistronisch exprimiert werden. Obwohl die Sequenzen der reifen miRNAs von miR-1-1 und miR-1-2 und die Sequenzen von miR-133a und miR-133b identisch sind, werden diese auf Grund ihrer unterschiedlichen Lokalisation im Genom voneinander differenziert. Das miR-1-1/133a-2 Cluster ist auf Chromosom 2 lokalisiert, besitzt einen eigenen Promotor und wird als gemeinsames primäres Transkript exprimiert. Das miR-1-2/133a-1 Cluster ist auf Chromosom 18 lokalisiert, verfügt ebenfalls über einen eigenen Promotor und liegt im Gegenstrang der Ubiquitin Ligase Mib1 (engl. *mindbomb*) (Liu, Williams et al. 2007, Malizia and Wang 2011). Ein drittes Cluster, dessen Sequenz den zwei miR1/133 Clustern ähnelt und aus miR-206/133b besteht, befindet sich auf Chromosom 1 innerhalb der kodierenden Region von einer langen nicht kodierenden RNA namens linc-MD1 (Cesana, Cacchiarelli et al. 2011). Während beide miR-1/133 Cluster sowohl im Herzmuskel als auch im Skelettmuskel exprimiert werden, wird das miR-206/133b Cluster ausschließlich im Skelettmuskel exprimiert (McCarthy 2008, Horak, Novak et al. 2016),

wo es unter anderem die Regeneration der Skelettmuskulatur nach einer Verletzung fördert und negative Regulatoren der Myogenese unterdrückt und dadurch die Differenzierung von Satellitenzellen begünstigt (Liu, Williams et al. 2012). Die Funktion der miR-1/133 Cluster im Herzen wurde mit Hilfe von Geneditierungen, welche die Deletion einzelner miRNAs aber auch ganze miRNA Cluster *in vivo* ermöglicht, in verschiedenen Mausmodellen untersucht. Dabei führte eine gezielte Deletion von miR-1-2 bei der Hälfte der untersuchten Tiere zu einer embryonalen Letalität zwischen E15.5 bis kurz nach der Geburt. Bei der anderen Hälfte der untersuchten Tiere kam es nach einer Deletion von miR-1-2 zu einer Vielzahl an Phänotypen, wie etwa ventrikuläre Septumdefekte (VSD), kardiale elektrophysiologische Anomalien wie Arrhythmien und eines plötzlichen Todes aufgrund einer Herzinsuffizienz (Abbildung 7 C) (Zhao, Ransom et al. 2007). Eine gezielte Deletion von miR-1-1 resultiert in einem Phänotyp, der dem Mausmodell mit einer gezielten miR-1-2 Deletion ähnelt, während ein kompletter Verlust von miR-1 zu einer perinatalen Herzinsuffizienz mit myokardialen Sarkomerdefekten führt (Heidersbach, Saxby et al. 2013). Außerdem führte im Gegensatz zu einer miR-1 Deletion, eine gezielte Deletion von miR-133a-1 oder miR-133a-2 zu keinem deutlichen Phänotyp (Liu, Bezprozvannaya et al. 2008). Der komplette Verlust von miR-133 jedoch führte aufgrund von ventrikulären Septumdefekten wiederum zu einer Letalität von ungefähr 56 % kurz nach der Geburt. Die anderen rund 44 % überlebten bis hin zum Erwachsenenalter, entwickelten jedoch mit der Zeit Herzinsuffizienzen wie etwa eine dilatative Kardiomyopathie (siehe 1.2). Darüber hinaus wiesen Mäuse mit einem miR-133 Verlust eine ungewöhnlich hohe Anzahl an proliferierenden Kardiomyozyten auf und zudem auf Transkriptomebene eine Hochregulation von Genen der glatten Muskulatur wie etwa  $\alpha$ -Actin und Calponin (Liu, Bezprozvannaya et al. 2008). Ein konstitutiver Knockout des miR-1-1/133a-2 oder miR-1-2/133a-1 Clusters resultiert in einer veränderten Repolarisation des Herzens, weist aber darüber hinaus keine deutlichen morphologischen Veränderungen in der embryonalen oder postnatalen Entwicklung auf. Werden hingegen beide miR-1/133a Cluster konstitutiv deletiert, kommt es zu einer frühen embryonalen Letalität (E12.5) der Tiere aufgrund von Defekten während der Herzentwicklung (Wystub, Besser et al. 2013, Besser, Malan et al. 2014).



**Abbildung 7 – Übersicht der Herz- und Muskelspezifischen microRNAs miR-1 und miR-133a.**

(A) Im Genom existieren zwei Kopien von miR-1 und miR-133 die als Cluster bicistronisch exprimiert werden. Obwohl die Sequenzen der reifen miRNAs von miR-1-1 und miR-1-2 und die Sequenzen von miR-133a und miR-133b fast identisch sind werden diese auf Grund ihrer unterschiedlichen Lokalisation im Genom differenziert. (B) Darstellung der einzelnen miRNA Sequenzen. Die Sequenz von miR-1 und miR-206 unterscheiden sich nur in vier Basen und werden aufgrund ihrer hohen Übereinstimmung zur miR-1 Subfamilie gezählt, während miR-133a und miR-133b, deren Sequenzen sich in lediglich in zwei Basen unterscheiden, zur miR-133 Subfamilie gezählt werden. (C) Zusammenstellung einiger miR-1 und miR-133a Knockoutmodelle im Herzen und deren Konsequenzen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs spielt bei der Entwicklung des Herzens, der Proliferation und Differenzierung von Kardiomyozyten, bei der Regeneration des Herzens nach einer akuten Verletzung, wie etwa einem Myokardinfarkt, oder in verschiedenen Krankheitsmodellen, wie beispielsweise Kardiomyopathien, eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Arbeit soll nun zum einen die Auswirkungen eines miR-1/133a Doppelknockouts in adulten Herzen, basierend auf vorherigen Untersuchungen von Dr. Katharina Wystub und Dr. Johannes Besser, weiter untersucht und validiert werden.

Da ein konstitutiver miR-1/133a Doppelknockout eine frühe embryonale Letalität aufgrund einer defekten Herzentwicklung zur Folge hat, wurden von Dr. Katharina Wystub und Dr. Johannes Besser für die Untersuchung des Kompletverlustes von miR-1/133a in adulten Tieren ein konditioneller miR-1/133a Doppelknockout generiert. Während erster Untersuchungen wurde eine potentielle Bindestelle für miR-1 innerhalb der 3'UTR von *Osmr* und zwei potentielle Bindestellen für miR-133a innerhalb der 3'UTR von *Fgfr1* identifiziert und validiert. Daher soll in diesem Zusammenhang in dieser Arbeit zusätzlich auch die Rolle von *Osmr* und *Fgfr1* mit miR-1/133a genauer untersucht werden. Um diese Fragen zu adressieren wurden neben den miR-1/133a Doppelknockout Mäusen auch Mauslinien verwendet in denen neben miR-1/133a auch *Osmr* oder *Fgfr1* deletiert sind. Neben phänotypischen Analysen sollen außerdem Transkriptomdaten zusätzlichen Aufschluss über die Funktionen auf transkriptioneller Ebene liefern, welche durch Analysen auf Proteinbasis erweitert werden sollen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen neue Erkenntnisse über die funktionelle Rolle der untersuchten miRNAs und Rezeptoren im Herzen liefern, einen Einblick in die Regulierung zellulärer Prozesse im Herzen gewähren und zu einem generellen Verständnis der Wirkungsweise von miR-1/133a, *Osmr* und *Fgfr1* für die Biologie des Herzens und der Transkriptionsregulation von Kardiomyozyten beitragen. Auch wenn bereits einige Funktionen von *Osmr*, *Fgfr1* und des miR-1/133a Clusters beschrieben wurden, ist es wichtig das Wissen bezüglich des zugrundeliegenden Mechanismus zu vertiefen, um somit die Bedeutung dieser Komponenten im speziellen für die Transkriptionsregulation der Kardiomyozyten zu erörtern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Allgemein verwendete Mäuslinien und Software Programme sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. Restliche verwendete Materialien sind im entsprechenden Textabschnitt aufgeführt.

#### 2.1.1 Verwendete Mäuslinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuslinien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 1: Verwendete Mäuslinien**

Laborbezeichnung	Erläuterung
<b>203</b>	miR-1-1/133a-2 (Chr. 2) KO
<b>239</b>	mir-1-2/ mir-133a-1 (Chr. 18) KO
<b>535flp-203</b>	miR-1-2/133a-1 (Chr. 18) konditionell/ miR-1-1/133a-2 KO
<b>KondDopMer</b>	miR-1-2/133a-1 (Chr. 18) konditionell/ miR-1-1/133a-2 KO (Chr. 2)/ $\alpha$ MHC-MerCreMer
<b>KondMerOR</b>	miR-1-2/133a-1 (Chr. 18) konditionell/ miR-1-1/133a-2 KO/OSMR konditionell/ $\alpha$ MHC-MerCreMer
<b>KondMerFg</b>	miR-1-2/133a-1 (Chr. 18) konditionell/ miR-1-1/133a-2 KO/FGFR konditionell/ $\alpha$ MHC-MerCreMer

#### 2.1.2 Humane Proben

Die humanen Myokardproben wurden zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Manfred Richter (Kerckhoff Klinik; Abt. Herzchirurgie). Das Herzgewebe wurde während einer Herztransplantation von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie oder dilatativer Kardiomyopathie entnommen, welche eine Ejektionsfraktion von unter 25% aufwiesen. Als Kontrollproben diente

Herzgewebe, dass aus subvalvulären Myokardresektionen von Patienten mit Aortenstenose entnommen wurde. Die Ejektionsfraktion lag in diesen Fällen bei über 60%. Die Patienten wurden nach den Kriterien der *New York Heart Association* (NYHA) klassifiziert und nach den Richtlinien der *European Society of Cardiology* medizinisch behandelt.

### 2.1.3 Verwendete Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Software Programme sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 2: Verwendete Software**

Software	Hersteller
Access 2016	Microsoft Office
Adobe	Adobe System Incorporated
CAT	Computer Administriertes Tierhaus (MPG)
Endnote X8	Endote
Excel 2016	Microsoft Office
L <sup>A</sup> T <sub>E</sub> X	XeTeX 3.141592653
Gene Set Enrichment Analysis	Broad Institute
GraphPad Prism 8	GraphPad Software
Fiji	Image Processing and analysis Java, MacBiophotonics
Image Lab 6.0.1	Biorad
PowerPoint 2016	Microsoft Office
StepOne Software v2.3	Applied Biosystems
Word 2016	Microsoft Office
Zen 2.3	Zeiss

## 2.2 Tierexperimentelle Methoden

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte gemäß den geltenden Richtlinien der Tierschutzbestimmungen und ist der jeweils gehaltenen Spezies angepasst. Alle genannten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt und wurden entsprechend der jeweiligen Tierversuchsanträge durchgeführt. Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit Männchen und Weibchen durchgeführt die zu Beginn der Experimente 8-12 Wochen alt waren.

### 2.2.1 Haltung von Versuchstieren

Als Versuchstiere dienten verschiedene Mauslinien (*Mus musculus*) und Sprague-Dawley-Ratten (*Rattus norvegicus*). Mäuse wurden in ventilierten (Aero Cage-Mouse IVC Green Line, Techniplast Italien) und Ratten in konventionellen Käfigen auf Streu gehalten, mit freiem Zugang zu Futter und Wasser. Die Tiere wurden in Gruppen gehalten und mit Nist- und Beschäftigungsmaterial versorgt. Um eine zirkadiane Rhythmik zu ermöglichen, betrug der Tag- und Nachtrhythmus 12 Std. mit jeweils einer Stunde Dämmerung. Für adulte Versuchstiere wurde ein Alleinfuttermittel genutzt, das empfohlen wird für Nager ab einem Alter von acht Wochen (altromin #1320). Zur Fütterung ad libitum, empfohlen für adulte Nager in der Zucht und junge Nager bis zu einem Alter von acht Wochen, wurde ein spezielles Alleinfuttermittel verwendet (altromin #1310). Die Raumtemperatur betrug zwischen 20-24°C und die Luftfeuchtigkeit lag bei 45-65 %. Um eine Identifikation der Mäuse zu ermöglichen wurden diese im Alter von ein bis zwei Wochen mit einer Ohrmarkierung durch Kerben versehen und eine Schwanzbiopsie zur Genotypisierung durchgeführt. Bei Ratten war dies nicht erforderlich.

### 2.2.2 Generierung der verwendeten Mauslinien

Alle Mauslinien wurden von Dr. Katharina Wystub und Dr. Johannes Besser generiert. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde ein konditioneller miR-1/133a Doppelknockout (miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>/miR-1-2/133a-1<sup>fl/fl</sup>/Myh6-MerCreMer<sup>pos</sup>; KondDopMer; kurz: dKO) verwendet (Abbildung 33 im Anhang). Um die Rolle von Osmr und Fgfr1 für miR-

1/133a abhängige Effekte im adulten Myokard zu untersuchen wurden konditionelle *Osmr* (Tanaka and Reddien 2011) und *Fgfr1* (Trokovic, Trokovic et al. 2003) Knockout Tiere mit miR-1/133a Doppelknockout Tieren gekreuzt. Im Folgenden werden miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>/miR-1-2/133a-1<sup>fl/fl</sup>/Myh6-MerCreMer<sup>pos</sup>/OSMR<sup>-/-</sup> (KondMerOR) als „tKO (OR)“ und miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>/miR-1-2/133a-1<sup>fl/fl</sup>/Myh6-MerCreMer<sup>pos</sup>/ *Fgfr1*<sup>fl/fl</sup> (KondMerFg) als „tKO (FR1)“ bezeichnet. Als Kontrollen (WT) werden miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup> und mir-1-2/ mir-133a-1<sup>+/+</sup> Tiere verwendet.

### 2.2.3 Injektion in adulte Versuchstiere

**2.2.3.1 Tamoxifeninjektion in adulte Versuchstiere** Konditionelle Knockouts wurden mittels Tamoxifeninjektion induziert. Hierfür injizierte man den Versuchstieren je nach Versuch an drei bzw. fünf aufeinanderfolgenden Tagen 20 mg/kg Tamoxifen intraperitoneal (i.p.).

**2.2.3.2 UO126 Injektion in adulte Versuchstiere** Für Untersuchungen des MEK/ERK Signalweges wurde der Inhibitor UO126 verwendet. Dafür wurde den Versuchstieren 21 Tage nach der ersten Tamoxifeninjektion an drei aufeinanderfolgenden Tagen 0,2 mg/kg UO126 i.p. injiziert.

**2.2.3.3 EdU Injektion in adulte Versuchstiere** Um die Proliferationsrate von Kardiomyozyten in adulten Herzen zu untersuchen, wurde den Versuchstieren 14 Tage nach der ersten Tamoxifeninjektion an sieben Tagen in Folge 50 mg/kg EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Thermo Scientific A10044) i.p. injiziert. Die Versuchstiere wurden 24 Std. nach der letzten EdU Injektion getötet und die adulten Herzen wie in 2.2.5 beschrieben entnommen. Vor Gebrauch wurden zunächst 500 mg EdU bei 50°C in 30 ml 0,9 % NaCl auf einem Schüttler gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einem Verhältnis von 1:3,33 mit 0,9 % NaCl verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für die Injektionen wurde die EdU Lösung vor Gebrauch auf einem Schüttler bei 37°C aufgetaut bis sich alle Schwebeteilchen gelöst hatten.

**2.2.3.4 Intravenöse Injektion in adulte Versuchstiere** Für die Untersuchung der Infarktgröße nach einem induzierten Myokardinfarkt (siehe 2.4.1) wurden den Versuchstieren sieben Tage vor dem Myokardinfarkt LNA (*locked nucleic acid*)-AntimiRs intravenös (i.v.) injiziert. Hierbei verabreichte man den Kontrolltieren 7 mg/kg Kontroll-LNA-AntimiR und miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup> (single Knockout; sKO) Tieren jeweils 3,5 mg/kg i-mmu-miR-1a-3p und i-mmu-miR-133a-3 (Exiqon #199900).

### 2.2.5 Tötung von Versuchstieren und Gewebeentnahme

Sofern nicht anders angegeben wurden die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Für die anschließende Gewebeentnahme wurde der Thorax geöffnet und das Tier mit 10-15 ml 1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) durch das Herz perfundiert bis sich die Leber des Tieres entfärbte. Anschließend wurde das Gewebe entnommen und für molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für histologische Untersuchungen wurde das Gewebe nach der Entnahme wie in 2.3 beschrieben behandelt.

## 2.3 Histologische Untersuchung von Mausgeweben

### 2.3.1 Einfrieren von adulten Herzen für Kryoschnitte

Für das Einfrieren von adulten Herzen für Kryoschnitte wurden die Tiere wie in 2.2.5 beschrieben getötet und mit 1x PBS perfundiert. Anschließend wurde das Tier noch mit 5 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) (Sigma Aldrich, 6148-1Kg) perfundiert. Danach wurden die Herzen präpariert und für 1 Std. mit 4 % PFA auf Eis fixiert. Zur Minimierung von Kryoartefakten wurden die Herzen nach der Fixierung mit 4 % PFA über Nacht bei 4°C in 15 % Saccharose/PBS gelagert. Am Folgetag wurden die Herzen in 30 % Saccharose/PBS überführt und wiederholt über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Herzen für mindestens 24 Std. in Tissue Tek (Leica, Surgipath, FSC 22 Clear #3801480) überführt und bei 4°C gelagert. Zuletzt wurden die Herzen auf Trockeneis in frisches Tissue Tek eingebettet.

### 2.3.2 Anfertigung von Kryoschnitten für immunhistochemische Untersuchungen

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Herzen wie in 2.3.1 beschrieben eingebettet. Aus den eingebetteten Herzen wurden mit Hilfe eines Kryotoms (Leica CM1950) 10  $\mu\text{M}$  dicke Gewebeschnitte gefertigt und auf Objektträger (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, SuperFrost Ultra Plus<sup>TM</sup> Adhäsionsobjektträger) aufgezogen. Dabei wurde die Temperatur der Kammer auf  $-24^{\circ}\text{C}$  und die Temperatur des Schnitthalters auf  $-27^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Die Schnitte konnten dann entweder direkt für die Färbung genutzt oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.3.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die entnommenen Herzen mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (70 %, 80 %, 90 %, 100%, Isopropanol). Dafür lagerte man die Herzen in der jeweiligen Konzentration bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Anschließend wurden die Herzen zunächst in eine 1:1 Isopropanol/Paraffin Mischung gelegt und für 3 Std. bei  $56^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, bevor sie in Paraffin überführt und über Nacht bei  $56^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Abschließend wurden die Herzen in Paraffin eingebettet. Von den eingebetteten Herzen wurde mit Hilfe eines Mikrotoms 8  $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte angefertigt und in ein Wasserbad (ca.  $40^{\circ}\text{C}$ ) zum Strecken gelegt. Nach dem Strecken der Schnitte wurden diese auf Objektträger überführt und für mehrere Stunden oder über Nacht auf einer ca.  $56^{\circ}\text{C}$  warmen Heizplatte getrocknet. Die Schnitte konnten dann entweder direkt für die Färbung genutzt oder bei Raumtemperatur gelagert werden.

### 2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient zur Visualisierung der zellulären Morphologie. Dafür werden Kerne mittels Hämatoxylin-Lösung (Gills Nr. 3, Sigma #GHS332) blau angefärbt und Muskelfasern und das Zytoplasma mit Hilfe einer Eosin-Färbung (Merck #921 K11613835) rot. Hierfür wurden die angefertigten Paraffinschnitte zunächst zweimal für 5 Min. bei Raumtemperatur in Xylol inkubiert. Dies diente zur Entparaffinierung der Schnitte. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für jeweils 2 Min. mit Hilfe

einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100 %, 90 %, 80 %, 70 %) und für weitere 2 Min. in ddH<sub>2</sub>O überführt. Danach wurden die Schnitte zum Färben der Kerne für 10 Min. in eine Hämatoxylin-Lösung getaucht und danach für 10 Min. unter fließendes Leitungswasser gelegt. Im Falle einer Überfärbung wurden die Schnitte nach diesem Schritt für ca. 10 Sek. in ein Ethanol/HCL Gemisch gedippt (1 % HCL in 70 % Ethanol) und anschließend wieder für 10 Min. gründlich unter fließendem Leitungswasser gespült. Es folgte die Färbung der Muskelfasern und des Zytoplasmas mit Hilfe der Eosin-Arbeitslösung (0,01 % Eosin G, 0,05 % Essigsäure) für 7 Min. Anschließend wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Hierfür wurden die Schnitte kurz in 70 %, 80 % und 90 % Ethanol getaucht und für 10 Min. in 100 % Ethanol gelegt. Zuletzt wurden die Schnitte für 10 Min. in 100 % Xylol geklärt, mit Entellan® (Merck Millipore #107960) eingebettet und über Nacht zum Aushärten unter einem Abzug liegen gelassen.

### **2.3.5 Masson-Trichrom-Färbung**

Die Masson-Trichrom-Färbung dient zur Visualisierung der zellulären Morphologie. Dafür werden Muskelfasern in rot angefärbt, Kerne in braun-schwarz und Kollagen in blau. Hierfür wurden sowohl Paraffinschnitte, als auch Kryoschnitte verwendet. Paraffinschnitte wurden zunächst zweimal für 5 Min. bei Raumtemperatur in Xylol inkubiert. Dies diente zur Entparaffinierung der Schnitte. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für jeweils 2 Min. mit Hilfe einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100 %, 90 %, 80 %, 70 %) und für weitere 2 Min. in ddH<sub>2</sub>O überführt. Danach wurden die Paraffinschnitte über Nacht bei Raumtemperatur in einer Bouin-Lösung (Sigma-Aldrich; #HT10-1) inkubiert. Kryoschnitte wurden für 30 Min. bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend direkt über Nacht bei Raumtemperatur in einer Bouin-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Masson-Trichrom-Färbung nach Angaben des Standard Herstellerprotokolls (Sigma-Aldrich; Weigerts Eisenhämatoxylin Kit #HT1079; Trichrom-Färbungskit (Masson) #HT15). Nach der Färbung wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder dehydriert. Hierfür wurden die Schnitte zweimal kurz in 70 %, 80 % und 90 % Ethanol getaucht bevor sie für 10 Min. in 100 % Ethanol gelegt wurden. Zuletzt wurden die Schnitte für zweimal 5 Min. in 100 % Xylol

geklärt, mit Entellan® (Merck Millipore #107960) eingebettet und über Nacht zum Aushärten unter einem Abzug liegen gelassen.

### **2.3.6 Immunhistochemische Färbung von adulten Herz Gewebeschnitten von Mäusen**

Für immunhistochemische Färbungen wurden Kryoschnitte für 30 Min. bei Raumtemperatur getrocknet und danach mit einem Fettstift (Pap-Pen; Kisker Biotech #MKP-1) umrandet. Zu Beginn wurden die Kryoschnitte für 10 Min. mit 4 % PFA bei Raumtemperatur oder für 10 Min. mit einem Aceton/Methanol Gemisch (1:1) bei -20°C fixiert und danach dreimal für jeweils 5 Min. mit 1x PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Permeabilisierung der Membran für 10 Min. mit 0,1 % Triton-X100/PBS. Danach wurden die Kryoschnitte zunächst dreimal für jeweils 5 Min. mit 1x PBS gewaschen und dann für 1 Std. in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur in 200 µl Blocklösung (3 % Normales Ziegen Serum (NGS) (Sigma Aldrich #G9023-5 ml); 0,5 % Bovines Serumalbumin (BSA); 2 % NP-40 in 1x PBS) inkubiert. Abschließend folgte die Inkubation der Schnitte in einer Feuchtekammer mit dem primären Antikörper in 200 µl einer Antikörperlösung (0,5 % BSA; 2 % NP-40 in 1x PBS) bei 4°C über Nacht. Um ungebundene Erstantikörper auf den Schnitten zu entfernen wurden die Schnitte am nächsten Tag zunächst dreimal für 5 Min. mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 1 Std. in einer Feuchtekammer und bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in 200 µl Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 5 Min. mit 1x PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 10 Min. mit DAPI inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte erneut dreimal für 5 Min. in 1x PBS gewaschen und mit Fluoromount W (Serva; #21634.01) eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

**Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper für immunhistologische Färbungen**

<b>Primärer</b>				
<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Fixierung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>ACTN2</b>	Maus	1:100	Aceton/Methanol	Sigma-Aldrich; EA53; A7811
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Maus	1:1000	4% PFA	Sigma-Aldrich; C6198
<b>cTnT</b> (FITC gekoppelt)	Maus	1:250	4% PFA	Abcam; ab105439
<b>F-Aktin</b>	Kaninchen	1:100	4% PFA	Phalloidin; Sigma-Aldrich
<b>FGFR</b>	Kaninchen	1:100	Aceton/Methanol	Cell Signaling; #3472
<b>OSMR</b>	Kaninchen	1:100	Aceton/Methanol	Proteintech Group; 10982-1-AP
<b>phospho-Histon 3</b> (Ser-10)	Kaninchen	1:200	4% PFA	Upstate Cell Signaling Solutions; #06-570
<b>Wheat Germ</b> <b>Agglutinin</b> (WGA; Alexa 488 gekoppelt)		1:250	4 % PFA	Sigma-Aldrich; # L4895

**Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper für immunhistologische Färbungen**

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor®488</b>	1:1000	Invitrogen; A11070
<b>Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor®546</b>	1:1000	Invitrogen; A11035
<b>Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor®594</b>	1:1000	Invitrogen; A11012
<b>Ziege anti-Maus Alexa Fluor®594</b>	1:1000	Invitrogen; A11005

### **2.3.7 Immunhistochemische Färbung von humanen Herz Gewebeschnitten**

Für immunhistochemische Färbungen von humanen Gewebeschnitten wurde das Gewebe unmittelbar nach der Entnahme in Stickstoff schockgefroren und entweder direkt verwendet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aus dem schockgefrorenen Gewebe wurden Kryoschnitte wie in 2.3.2 beschrieben angefertigt. Die Schnitte wurden zunächst für 10 Min. mit einem Aceton/Methanol Gemisch (1:1) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert und danach an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Min. mit 4 % PFA inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte für jeweils 5 Min. bei Raumtemperatur mit 1x PBS bevor die Schnitte mit dem Primärantikörper über Nacht in einer Feuchtekammer bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert wurden. Um ungebundene Erstantikörper auf den Schnitten zu entfernen wurden die Schnitte am nächsten Tag dreimal für jeweils 5 Min. bei Raumtemperatur mit 1x PBS gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit Biotin (anti-Kaninchen; Esel-anti-Kaninchen IgG (h+L) Biotin; Dianova GmbH Hamburg; 705-065-152). Danach wurden die Schnitte für 2 Std. bei Raumtemperatur mit Streptavidin (Streptavidin FITC Rockland; S000-02) inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte für weitere 2 Std. bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (siehe Tabelle 4) inkubiert. DAPI wurde in einer 1:1000

Verdünnung 10 min vor Ablauf des sekundären Antikörpers zu den Schnitten hinzugegeben. Die Schnitte wurden nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper und DAPI dreimal für 5 Min. mit 1x PBS gewaschen und abschließend mit Mowiol eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

**Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper für immunhistologische Färbungen von humanem Gewebe**

<b>Primärer</b>				
<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Fixierung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>FGFR1</b>	Maus	1:100	4% PFA	Proteintech; 60325
<b>hOSMR beta</b>	Maus	1:100	4% PFA	R&D; MAB4389
<b>F-Aktin</b>	Maus	1:100	4% PFA	Sigma-Aldrich; FAK100

### 2.3.8 Färbung von isolierten Maus Kardiomyozyten mit EdU

Die Färbung mit EdU diente zur Detektion von DNA-Synthese in adulten isolierten Maus Kardiomyozyten. Dabei wird das modifizierte Thymidin-Analogon 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) in neu synthetisierte DNA eingebaut. Der Nachweis des EdU Einbaus und damit der DNA-Synthese erfolgte durch Fluoreszenzfarbstoffe. Für die Färbung wurden adulte Maus Kardiomyozyten genutzt, die wie in 2.5.2 beschrieben, isoliert wurden. Nach der Isolierung wurden die Kardiomyozyten auf Kammerobjektträger (Nunc™ Lab-Tek™; 177380) ausgesät und für 2 Std. anheften lassen. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 5 Min. bei Raumtemperatur mit 4 % PFA fixiert. Abschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur einmal für 5 Min. mit 1x PBS gewaschen und entweder direkt für die Färbung genutzt oder das PBS abgenommen und die Zellen bei -20°C gelagert. Die EdU Färbung erfolgte, bis auf die Inkubationszeit mit dem EdU Mix, nach Herstellerangaben (Click-iT Plus EdU Imaging Kits Protocol; Thermo Fisher Scientific; C10639). Die Inkubation mit dem EdU Mix erfolgte für 40 Min. lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen

zweimal mit 3 % BSA in 1x PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit FITC gekoppelten kardialen Troponin T (cTnT; 1:250; Abcam; ab105439) in 1x PBS inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurden die Zellen am nächsten Tag dreimal für 5 Min. mit 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit DAPI für 5 Min. bei Raumtemperatur (1:1000 in 1x PBS). Zuletzt wurden die Zellen bei Raumtemperatur dreimal für 5 Min. gewaschen und mit Fluoromount W eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

### **2.3.9 Immunhistochemische Färbung von neonatalen Maus Kardiomyozyten nach Hikari**

Für immunhistochemische Färbungen von neonatalen Maus Kardiomyozyten wurde das *Hikari Kit* verwendet. Die Zellen wurden zunächst für 10 Min. mit 4 % PFA fixiert und anschließend zweimal mit 3 % BSA/PBS gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Membran für dreimal 10 Min. mit 0,3 % Triton-X100/PBS. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 3 % BSA/PBS gewaschen. Danach wurde für eine Detektion der DNA-Synthese eine EdU Färbung wie in 2.3.8 beschrieben durchgeführt. Nach der EdU Färbung erfolgte ein Waschschriff von 5 Min. mit 1x PBS bevor die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocklösung (1,8 ml 0,01 % Triton-X100; 200 µl Blocking One (Nacalai; #03953-95)) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 Min. mit 1x PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit FITC gekoppelten kardialen Troponin T (cTnT; 1:250; Abcam; ab105439) in Lösung A (Nacalai; #02272-74) inkubiert. Um ungebundene Erstantikörper auf den Zellen zu entfernen wurden die Schnitte am nächsten Tag dreimal für jeweils 10 Min. bei Raumtemperatur mit 0,01 % Triton-X100/PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit DAPI für 5 Min. bei Raumtemperatur (1:1000 in 1x PBS). Zuletzt wurden die Zellen bei Raumtemperatur dreimal für 5 Min. mit 0,01 % Triton-X100/PBS gewaschen und mit Fluoromount W eingedeckelt im Dunkeln bei 4°C gelagert. Falls die Zellen auf 96-well Platten ausgesäht wurden, wurde bis zur mikroskopischen Untersuchung der Zellen 1x PBS auf die Zellen gegeben, die Platte mit Parafilm umrandet und mit Alufolie umwickelt bei 4°C gelagert.

### **2.3.10 Lebend-Tod-Färbung**

Mit Hilfe einer Lebend-Tod-Färbung kann die Zellviabilität untersucht werden, indem der Anteil von lebenden bzw. toten Zellen dargestellt und mikroskopisch erfasst wird. Hierfür wurden 8-10 Wochen alte Versuchstiere verwendet. Diese wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen wie in 2.2.4.1 beschrieben mit Tamoxifen behandelt und für einen weiteren Tag sitzen gelassen. Vier Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion wurden dann Kardiomyozyten wie in 2.5.2 beschrieben isoliert und auf eine 24-well Platte (Corning; #3542) ausplattiert. Nach zwei Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Am nächsten Tag wurden die Zellen in eine Hypoxiekammer (Whitley H45 HEPA) gestellt und für 18 Std. mit einer Sauerstoffkonzentration von 1 % O<sub>2</sub> inkubiert. Nach 18 Std. wurden die Zellen aus der Hypoxiekammer genommen und die Zellviabilität mittels Lebend-Tod-Färbung (Thermo Fisher Scientific; LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells; L3224) untersucht. Hierfür wurden die Stocklösungen (4 mM Calcein-AM (Komponente A); 2 mM Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1; Komponente B)) zunächst aufgetaut und auf Raumtemperatur erwärmt. Danach wurde für die Färbung die für die Arbeitslösung empfohlene Abfolge und Konzentration aus dem Herstellerprotokoll verwendet (2 μM Calcein-AM; 4 μM EthD-1) und 100 μl der Lösung pro 22 mm<sup>2</sup> Fläche direkt in das Medium gegeben. Um eine gleichmäßige Verteilung der Lösung zu gewährleisten, wurde die Platte anschließend vorsichtig geschwenkt und die Zellen dann mit der Lösung für 1 Std. im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt im Anschluss wurde mit Hilfe eines Mikroskops die Zellviabilität erfasst und mit Hilfe von ImageJ ausgewertet (siehe 2.7.2).

## **2.4 Molekularbiologische und biochemische Methoden**

### **2.4.1 Extraktion von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien**

Die Extraktion von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien diente zur Genotypisierung der Versuchstiere. Dafür wurden die Schwänze zunächst bei 55°C über Nacht in 500 μl Lysepuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % SDS) mit 10 μl Proteinase K (20 mg/ml) verdaut. Anschließend konnten die lysierten Schwänze bei -20°C weg gefroren oder die DNA direkt extrahiert werden. Für die Extraktion der DNA wurden die verdauten

Schwänze zunächst mehrfach invertiert und für 15 Min. bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (Eppendorf). Für die Fällung der DNA wurde zu den Proben 400 µl Isopropanol hinzugegeben. Die Proben wurden nach der Zugabe von Isopropanol invertiert und zunächst für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 Min. bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und verworfen. Das DNA Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol für 5 Min. bei 14000 rpm gewaschen und entsalzt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und verworfen. Das DNA Pellet wurde abschließend für ca. 20 min bei Raumtemperatur getrocknet und danach in 100 µl T<sub>1/10</sub>E Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0) über Nacht bei 55°C gelöst.

#### **2.4.2 Genotypisierung der verwendeten Mauslinien**

Die Genotypisierung der Mauslinien erfolgte mittels semiquantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese. Dabei wurde die wie in 2.4.1 beschriebene extrahierte DNA verwendet. Verwendete Primer, Programme, Reaktionsansätze und erwartete Produktgrößen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt und diesen zu entnehmen.

**Tabelle 6: Verwendete Primer für die Genotypisierung verwendeter Mauslinien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
<b>203</b>	AB148	gacttttcagcagccctgtctgct
	AB151	tgggccaccctcagctctggcgaga
	TB496	TGAGGAGAGCCATTTGACTCTTTCC
<b>239</b>	AB138	cataaaacactggctgtccatgtgt
	AB140	aacacgtgaatcttctgtttaaca
	TB496	TGAGGAGAGCCATTTGACTCTTTCC
<b>535flp</b>	JD40	CATTAATTCACTCACACAATGAAATGATCC
	JD42	CAGAGTCTTAAGTGTATTCAGAAATGTTAGC
<b>OSMR</b>	JB139	GTAATCAGACCAATGGCTTTCTC
	JB140	GATCCAACAGAGCAATCATGAAGC
	JB141	GCACATCTGAACTTCAGC
<b>FGFR1</b>	KW235	AATAGGTCCCTCGACGGTATC
	KW236	CTGGGTCAGTGTGGACAGTGT
	KW239	aggttcctcctcttggatga
<b>Cre</b>	TB512	taaactggtcgagcgatggattcc
	TB513	catatctcgcgggctccgacacgg

**Tabelle 7: Verwendete Reaktionsansätze für die Genotypisierung verwendeter Mauslinien**

Reagenz	Volumen (µl) (2 Primer)	Volumen (µl) (3 Primer)
10x Puffer	5	5
50mM MgCl <sub>2</sub>	2	2
10mM dNTPs	1	1
100 pmol Vorwärtsprimer	1	1
100 pmol Rückwärtsprimer	1	1
100 pmol Rückwärtsprimer (Mutante)		1
Taq-Polymerase	0,5	0,5
DNA	1	1
H <sub>2</sub> O	38,5	37,5
Gesamtvolumen	50	50

**Tabelle 8: PCR Programm für die Genotypisierung verwendeter Mauslinien**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
<b>Initiale</b>	94°C	5 Min.	1
<b>Denaturierung</b>			
<b>Denaturierung</b>	94°C	30 Sek.	35
<b>Annealing</b>	X°C	30 Sek.	35
<b>Elongation</b>	72°C	45 Sek.	35
<b>Finale Elongation</b>	72°C	5 Min.	1
<b>Ende</b>	10°C	∞	

**Tabelle 9: Erwartete Produktlängen der verwendeten Primerkombinationen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Primer</b>	<b>Wildtyp-Allel (bp)</b>	<b>Mutanten- Allel (bp)</b>	<b>Annealing Temperatur (°C)</b>
<b>203</b>	AB148	257	400	58-63
	AB151			
	TB496			
<b>239</b>	AB138	230	278	58-60
	AB140			
	TB496			
<b>535flp</b>	JD40	230	> 360	58; 62
	JD24			
<b>OSMR</b>	JB139	364	750	60; 62
	JB140			
	JB141			
<b>FGFR</b>	KW235	594	341	60
	KW236			
	KW239			
<b>Cre</b>	TB512	-	244	58; 62; 66
	TB513			

### 2.4.3 RNA Extraktion aus adulten Herzen und isolierten Kardiomyozyten

Um RNA aus adulten Herzen oder isolierten Kardiomyozyten zu extrahieren, wurden die Mäuse wie in 2.2.5 (für adulte Herzen) oder 2.5 (für isolierte Kardiomyozyten) beschrieben getötet. Das benötigte Gewebe wurde entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Extraktion der RNA wurde das Gewebe dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizol (Thermo Scientific #15596026) überführt und eine autoklavierte Stahlkugel (5 mm) dazu gegeben. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit Hilfe einer Schwingmühle (Retsch; MM301) für 5 Min. bei maximaler Intensität.

Die Kardiomyozyten aus adulten Herzen wurden wie in 2.5.2 beschrieben isoliert und ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Kardiomyozyten einmal mit 1x PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml Trizol auf die Platte gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellen wurden mittels mechanischem Aufschlussverfahren (Potter-Elvehjem Verfahren) homogenisiert und entweder direkt für die RNA Extraktion weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

Nach der Homogenisierung des Gewebes oder der Kardiomyozyten wurde die RNA nach Herstellerprotokoll extrahiert. Die Konzentration der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des Nanodrop 2000 (Thermo Scientific #ND-2000).

### 2.4.4 Reverse Transkriptase Reaktion

Um RNA mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR; 2.4.5) analysieren zu können, muss diese zunächst mit der reverse Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkriptase Reaktion erfolgte entweder nach dem PrimeScript™ RT Reagent Kit (3RR037A) von Takara, oder dem microRNA Kit zur reversen Transkription (Applied Biosystems™; 4366596) von TaqMan™ die in den folgenden Tabellen aufgeführt und zu entnehmen sind.

**Tabelle 10: cDNA Synthese mittels TaqMan MicroRNA Assay**

Reagenz	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Nuklease freies Wasser	3,68
10x RT-Puffer	1
100 mM dNTPs (mit dTTP)	0,2
RNase Inhibitor	0,13
MultiScribe RT	0,5
20x TaqMan microRNA RT Primer	0,5
5x TaqMan microRNA RT Primer U6 snRNA	2
Gesamtvolumen	8

Der Mastermix wurde auf Eis vorgelegt und dann 2  $\mu\text{l}$  RNA (10 ng/2  $\mu\text{l}$ ) hinzugegeben. Der RT-Mix wurde für 5 min. auf Eis stehen gelassen und dann in eine PCR Maschine gestellt.

**Tabelle 11: PCR Programm für die cDNA Synthese mittels TaqMan MicroRNA Assay**

Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Dauer (Min.)
16	30
42	30
85	5
4	$\infty$

Abschließend wurden zum RT-Produkt 27,6  $\mu\text{l}$  destilliertes Wasser gegeben (Verdünnung 1:3,76).

**Tabelle 12: cDNA Synthese mittels PrimeScript™ RT Takara Kit**

Reagenz	Volumen (µl)
RNA (1 µg/10 µl)	10
5x PrimeScript Puffer 2	4
PrimeScript Enzym Mix I	1
RT Primer Mix 1:1 (Oligo-dT-Primer; Random Primer)	4
RNase freies Wasser	3
Gesamtvolumen	22

Der RT-Mix wurde anschließend direkt in eine PCR Maschine gestellt.

**Tabelle 13: PCR Programm für die cDNA Synthese mittels PrimeScript™ RT Takara Kit**

Temperatur (°C)	Dauer
37	15 Min.
85	5 Sek.
4	∞

Abschließend wurden zu 2 µl RT-Produkt 198 µl destilliertes Wasser gegeben (Verdünnung 1:100). War die Expression der untersuchten Gene zu gering, wurde das RT-Produkt 1:10 verdünnt.

### 2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die qPCR dient zur quantitativen Analyse von cDNA. Dabei wird, im Verlauf der cDNA Vervielfältigung, die quantitative Menge der cDNA, durch einen Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes in die cDNA, gemessen. Abhängig davon, ob die cDNA nach dem PrimeScript™ RT Reagent Kit von Takara oder dem microRNA Kit zur reversen Transkription von TaqMan™ umgeschrieben wurde, wurden unterschiedliche Protokolle für die qPCR verwendet die, sowie die verwendeten TaqMan Assays, in den folgenden Tabellen aufgeführt und zu entnehmen sind. Alle Proben wurden als technische Replikate aufgetragen und die PCR-Reaktionen mit Hilfe des Step One Plus System (#4376600) von Thermo Scientific durchgeführt.

**Tabelle 14: PCR Reaktion der qPCR für miRNAs**

Reagenz	Volumen (µl)
Nuklease freies Wasser	1,5
2x TaqMan Universal PCR MasterMix (no UNG)	5
20x TaqMan Assay miRNA (FAM)	0,5
20x TaqMan Assay U6 snRNA (VIC)	0,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>7,5</b>

Abschließend wurden 2,5 µl des verdünnten RT-Produktes (2.4.4) auf Eis vorgelegt und 7,5 µl des MasterMix dazugegeben.

**Tabelle 15: Verwendetes PCR-Programm für eine miRNA qPCR**

Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
95	10 Min.	
95	15 Sek.	40
60	1 Min.	40

**Tabelle 16: PCR Reaktion der qPCR für die Expression von Genen**

Reagenz	Volumen (µl)
2x TaqMan Gene Expression MasterMix	5
20x TaqMan Assay (FAM)	0,5
20x TaqMan Assay GAPDH (VIC)	0,5
Gesamtvolumen	6

Abschließend wurden 4 µl des verdünnten RT-Produktes (2.4.4) auf Eis vorgelegt und 6 µl des MasterMix dazugegeben.

**Tabelle 17: Verwendetes PCR-Programm für die Expression von Genen**

Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
50	2 Min.	
95	10 Min.	
95	15 Sek.	40
60	1 Min.	40

**Tabelle 18: Verwendete TaqMan Assays**

---

<b>Assay</b>	<b>Assay ID</b>
<b>Agrin</b>	Mm01264855_m1
<b>Col1a1</b>	Mm00801666_g1
<b>Col4a1</b>	Mm01210125_m1
<b>Ctgf</b>	Mm01192933_g1
<b>Fgfr1 (Maus)</b>	Mm00438930_m1
<b>Fgfr1 (Mensch)</b>	Hs00384276_m1
<b>Gapdh</b>	4352339E
<b>hsa-miR-1</b>	002222
<b>hsa-miR-133a</b>	002246
<b>Lox</b>	Mm00495386_m1
<b>Mmp2</b>	Mm00439498_m1
<b>OSMR (Maus)</b>	Mm01307326_m1
<b>OSMR (Mensch)</b>	Hs00384276_m1
<b>Periostin</b>	Mm01284919_m1
<b>Timp1</b>	Mm01341361_m1
<b>U6 snRNA</b>	001973

---

### 2.4.6 Microarray

Für Transkriptionsanalysen in Mäusen wurde zunächst die Qualität von isolierter RNA aus adulten Herzen mit Hilfe eines Bioanalyzer und dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent) überprüft (*RNA Integrity Number* (RIN) > 7 - 8). Für die Analyse wurden dann 200 ng qualitativ geeignete RNA eingesetzt und nach Herstellerangaben (Affymetrix) mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Für die anschließende Hybridisierung wurde ein Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array verwendet. Abschließend wurde der Chip gescannt und die Fluoreszenzsignale analysiert (DNASTar Arraystar 5). Die Durchführung und Messung erfolgte durch Sylvia Thomas und die anschließende Analyse der Rohdaten durch Prof. Dr. Thomas Böttger.

### 2.4.7 Proteinanalyse mittels Western Blot Methode

Die Proteinanalyse mittels Western Blotting erfolgte mit Hilfe einer Größenauftrennung der Proteine mittels Acrylamidgel und anschließender Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran, auf welcher die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert werden konnten.

**2.4.7.1 Proteinextraktion aus adulten Mausherzen** Für die Proteinextraktion aus adulten Mausherzen wurden die Tiere wie in 2.2.5 beschrieben getötet und mit 1x PBS perfundiert. Das Herz wurde entnommen, die Atrien entfernt und der Rest in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auf das gefrorene Herz wurde für die Proteinextraktion 500 µl Extraktionspuffer gegeben, der sich wie in Tabelle 19 angegeben zusammensetzte. Dabei ist zu beachten, dass die Proben im weiteren Verlauf mit Hilfe eines Bradford-Tests bestimmt wurden und dem Extraktionspuffer daher kein Dithiothreitol (DTT) zugegeben wurde. Sollten die Proben im weiteren Verlauf nicht mittels Bradford-Test bestimmt werden, kann in den Extraktionspuffer noch 0,04 M DTT (0,4 ml bei einem 1 M DTT Stock; Roth; #6908.2) zugegeben werden.

**Tabelle 19: Zusammensetzung des Protein-Extraktionspuffers**

Reagenz	10 ml Ansatz	Stock
<b>0,1 M Tris/HCl pH 8,0</b>	1 ml	1 M Tris/HCl pH 8,0 (Roth; #9090.4)
<b>0,01 M EDTA</b>	0,2 ml	0,5 M EDTA pH 8,0 (Roth; 8040.3)
<b>10 % SDS</b>	5 ml	20 % SDS (8040.3)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	3,4 ml	
<b>1 x Proteinase Inhibitor Cocktail</b>	1 Tablette	Complete mini (Roche; #04693132001)

Das Gewebe mit dem Extraktionspuffer wurde dann mit Hilfe eines Sonifizierstabes (Sonolab) aufgeschlossen (Power: 40 %; Zyklen: 5x; Dauer: 20 Sek.). Im Anschluss wurden die Proben bei Raumtemperatur für 5 Min. und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Überstand wurden dann für die Proteinbestimmung mittels Bradford-Test (siehe 2.4.7.2) 10 µl entnommen und in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum restlichen Proteinlysate wurde dann 4 µl 1 M DTT pro 100 µl Protein-Extraktionspuffer hinzugegeben. Die Proteinlysate wurden abschließend für 1 Min. bei 96°C aufgeköcht und bei -80°C gelagert.

**2.4.7.2 Bradford-Test zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen** Der kolorimetrische Bradford-Test diente zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Hierfür wurde das DC Protein Assay Kit (Bio-Rad; 5000111) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Für die Berechnung der Standardkurve wurde der Proteinstandard von Sigma-Aldrich (#P0843) genutzt und für die Auswertung ein Multiskan<sup>TM</sup> FC Mikrotiterplatten-Photometer (Thermo Fisher Scientific; #51119000) verwendet.

**2.4.7.3 Western Blot** Die isolierten Proteine (siehe 2.4.7.1) wurden mit Hilfe einer SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Hierfür wurde die Proteinkonzentration wie in 2.4.7.2 beschrieben gemessen und 10 µg pro Probe für das weitere Verfahren eingesetzt. Dafür wurden die Proben zunächst entsprechend mit Extraktionspuffer verdünnt und 1:4 mit 4x Laemmli Puffer (Tabelle 20) versetzt. Danach wurden die Proben für 10 min bei 70°C aufgeköcht und kurz abzentrifugiert.

**Tabelle 20: Zusammensetzung des 4x Laemmli Puffer**

Reagenz	Volumen (ml)	Hersteller
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	5	Roth; #9090.4
Glycerol	4	Sigma Aldrich; #G5516
10% SDS	8	Sigma Aldrich; #862010
0,1%	2	Sigma Aldrich; #B0126
<b>Bromphenolblaulösung</b>		
$\beta$ -Mercaptoethanol	1	Sigma Aldrich; #M6250
ddH <sub>2</sub> O	Ad 20 ml	-

Als Gele wurden fertige Gradientengele verwendet (NuPAGE™ 4 bis 12 %; BisTris-Gele; Invitrogen™). Die Gele wurden in eine Gelkammer (Invitrogen™; XCell *SureLock*™ Mini-Cell; EI0001) eingesetzt. Zwischen den Gelen wurde frischer MES-Laufpuffer (50 mM MES, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, 1 mM EDTA) gefüllt und in die äußere Kammer gebrauchter MES-Laufpuffer. Dabei war zu beachten, dass die Geltaschen vom frischen Laufpuffer zwischen den Gelen vollständig bedeckt waren. Die Geltaschen wurden mit dem Laufpuffer mehrfach durchgespült und anschließend mit 10 µg Protein geladen. Als Marker diente ein vorgefärbter Proteinmarker (5 µl; 10-245 kDa; AppliChem; #A8889). Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst für 15 min bei 75 V. Anschließend wurde die Gelkammer auf Eis gestellt und die Spannung auf 180 V erhöht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte so lange, bis

die unterste Bande des vorgefärbten Proteinmarkers das untere Ende des Geles erreichte. Nach der Auftrennung folgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose Membran (Amersham™ Protran® Western-Blotting-Membranen, Nitrozellulose; GE10600002) mit Hilfe einer Blotkammer (Invitrogen™; XCell II™ Blot Module; EI9051). Hierfür wurden zunächst Blottschwämme (Novex®, *life technologies* #EI9052) in Transferpuffer (20 % Methanol; 0,5 M Bicine; 0,5 M BisTris; 20,5 mM EDTA) getränkt und in die Blotkammer gelegt. Danach wurde ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier (Whatman #3030704) darauf gelegt. Anschließend wurden die beiden Platten des Gradientengels mit Hilfe eines Gelmessers aufgebrochen und das Gel auf das nasse Filterpapier gelegt. Auf das Gel wurde eine mit Transferpuffer durchnässte Nitrozellulosemembran gelegt und darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden. Darauf folgten wieder ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier und Blottschwämme. Zwischen den einzelnen Lagen vorkommende Luftblasen wurden herausgerollt. Abschließend wurden das Blotmodul zusammengedrückt und in die Blotkammer eingesetzt. Das Blotmodul wurde mit Transferpuffer und die Blotkammer bis zum oberen Teil mit ddH<sub>2</sub>O befüllt. Die Übertragung der Proteine erfolgte dann für 2 Std. bei 30 V. Anschließend wurde die Blotkammer auseinandergebaut, die Nitrozellulosemembran mit RedAlert™ (Merck #71078) gefärbt und eingescannt um die Übertragung der Proteine zu detektieren und zu dokumentieren. Die Nitrozellulosemembran konnte danach direkt weiterverwendet oder luftgetrocknet und lichtgeschützt bis zur Weiterverwendung gelagert werden. Nach der Dokumentation der Nitrozellulosemembran erfolgte die Markierung der Proteine mit Antikörpern. Um mehrere Proteine zeitgleich untersuchen zu können wurde die Nitrozellulosemembran zunächst entsprechend der Molekülmassen der Proteine zerschnitten. Anschließend wurden die Membranen erst 20 Min. mit ddH<sub>2</sub>O auf einem Schüttler gewaschen und dann für 1 Std. mit 5 % Magermilchpulver (Hersteller) in 1x TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS-T; Sigma-Aldrich; #T6664-10PAK) mit 1 % Tween20 (Sigma-Aldrich; #P1379) geblockt. Anschließend wurden die Membranen sechsmal für 5 min. in 1x TBS-T mit 1% Tween20 auf einem Schüttler gewaschen und mit den Primärantikörpern (Tabelle 21) in entsprechender Verdünnung in 3 % BSA (Sigma Aldrich #A7284-500ml) oder 3 % Magermilchpulver über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Um ungebundene Erstantikörper auf der Membran zu entfernen wurden die Membranen am

nächsten Tag zunächst sechsmal für jeweils 5 min. in 1x TBS-T mit 1 % Tween20 auf einem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase* (HRP)) gekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 22) auf die Membranen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Verdünnung der Sekundärantikörper erfolgte nach Herstellerempfehlungen in 3 % BSA oder 3 % Magermilchpulver. Abschließend wurden die Membranen zunächst sechsmal für 5 min. in 1x TBS-T mit 1 % Tween20 und dann für weitere 60 Min. bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gewaschen. Die Detektion der Antikörpersignale erfolgte mit Hilfe eines Pico- (#35065) oder Femto-Kit (#34095) nach Herstellerprotokoll und einem ChemiDoc-Imaging System (BioRad #1708280).

**Tabelle 21: Verwendete primäre Antikörper für die Proteinanalyse mittels Western Blot**

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<b>Fgfr1</b>	Kaninchen	1:500	Cell Signaling; #9740
<b>Osmr<math>\beta</math></b>	Ziege	1:500	R&D; AF662
<b>GAPDH</b>	Kaninchen	1:5000	Cell Signaling; #2118
<b>pERK</b>	Kaninchen	1:500	Cell Signaling; #9101
<b>panERK</b>	Maus	1:500	BD; 612641
<b>ACTN1</b>	Kaninchen	1:1000	Abcam; ab68194
<b>ACTN4</b>	Kaninchen	1:1000	Abcam; ab108198
<b>Alpha smooth muscle actin</b>	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich; A5228
<b>Hexokinase</b>	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling; #2024
<b>MAD2</b>	Maus	1:1000	BD; 610679
<b>Myh</b>	Maus	1:1000	LSBio; LS-B6307
<b>PCNA</b>	Maus	1:1000	Bionity; 555566

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Phospho-Histon H3 (Ser10)</b>	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling; #9701
<b>Ral A</b>	Maus	1:5000	BD; 610222
<b>Runx</b>	Kaninchen	1:1000	Abcam; ab92336
<b>SDHA</b>	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling; #5839
<b>Timp1</b>	Maus	1:1000	R&D; MAB9801
<b>Hsp60</b>	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling; # 4870
<b>ATP5F1</b>	Maus	1:1000	Abcam; ab117991

**Tabelle 22: Verwendete sekundäre Antikörper für die Proteinanalyse mittels Western Blot**

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ziege anti-Maus (HRP)</b>	1:5000	Pierce; 1858413
<b>Ziege anti-Kaninchen (HRP)</b>	1:5000	Pierce; 31460
<b>Esel anti-Ziege (HRP)</b>	1:5000	R&D; HAF109

#### **2.4.8 Apoptose und Nekrose Assay**

Der Apoptose und Nekrose Assay (Promega; #JA1011) diente zur Untersuchung des Zelltodes von Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen. Hierfür wurden 8-10 Wochen alte Versuchstiere verwendet, welche an drei aufeinanderfolgenden Tagen wie in 2.2.4.1 beschrieben mit Tamoxifen behandelt wurden. Anschließend wurden die Versuchstiere für einen weiteren Tag sitzen gelassen. Vier Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion wurden die Kardiomyozyten

dann wie in 2.5.2 beschrieben isoliert und nach Vorgaben des Herstellerprotokolls auf 96-well Platten (1 Platte pro Zeitpunkt) ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 2, 12, 18, oder 24 Std. in eine Hypoxiekammer (Whitley H45 HEPA) gestellt und mit einer Sauerstoffkonzentration von 1% O<sub>2</sub> inkubiert. Entsprechend den untersuchten Zeitpunkten wurden die 96-well Platten aus der Hypoxiekammer genommen und nach Angaben des Herstellerprotokolls mit den Komponenten des Kits behandelt. Anschließend konnte dann mit Hilfe eines Multimode-Mikroplatten-Lesers (Berthold Technologies; Mithras LB 940) die Lumineszenz und Fluoreszenz (485nm<sub>Ex</sub>/525–530nm<sub>Em</sub>) gemessen werden und daraus die Apoptose und Nekrose der Zellen ermittelt werden.

#### 2.4.9 Fettsäure-Oxidations-Assay und Glukose-Oxidations-Assay

Der Fettsäure-Oxidations-Assay (FAO) und der Glukose-Oxidations-Assay dienten zur Untersuchung des Metabolismus von adulten Kardiomyozyten und basierten auf den zuvor beschriebenen Methoden (Moon & Rhead, 1987; Schweisgut, Schutt et al. 2017). Hierfür wurden 10-12 Wochen alte Versuchstiere verwendet. Diese wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen wie in 2.2.4.1 beschrieben mit Tamoxifen behandelt und für einen weiteren Tag sitzen gelassen. Vier Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion wurden die Kardiomyozyten wie in 2.5.2 beschrieben isoliert, gezählt und in eine vorab beschichtete 24-Well Platte (Hersteller) ausgesät (30000 Zellen pro Well). Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Das Kulturmedium in denen die Zellen über Nacht inkubiert wurden, wurde durch ein Kulturmedium ausgetauscht, das mit Tritium-markierte Fettsäure (5 µCi Palmitic acid (9,10-<sup>3</sup>H(N) + 50 mM/well L-Carnitin) oder Glukose (2,2 µCi Glucose D-(5-<sup>3</sup>H(N))) versetzt wurde. Die Kardiomyozyten wurden dann für 6 Std. bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> mit dem Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand in ein Glasfläschchen überführt. Die Glasfläschchen wurden mit Hilfe von Gummistopfen verschlossen, durch die ein *hanging center well* gestochen wurde, in dem sich ein angefeuchtetes Filterpapier befand. Diese Konstruktion ermöglichte die Äquilibrierung der <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O Konzentration zwischen dem Medium und dem angefeuchteten Filterpapier im *hanging center well*. Die Glasfläschchen wurden dann für 48 Std. bei 37°C inkubiert. Nach 48 Std. wurde die <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O Konzentration im Filterpapier gemessen. Hierfür

wurde das Filterpapier in Szintillationsfläschchen (6,5 ml; Roth; #AYX4.1) überführt, in denen sich 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth; #00163) befand. Die Menge an  $^3\text{H}_2\text{O}$  wurde dann mit Hilfe eines Szintillationszählers (Tri-Carb 2810TR Low Activity Liquid Scintillation Analyzer; Perkin Elmer) gemessen. Die Normalisierung erfolgte auf die Anzahl der ausgesäten Zellen.

#### **2.4.10 Metabolomische Untersuchungen**

Die metabolomischen Untersuchungen dienten zur Untersuchung von verschiedenen Metaboliten in adulten Herzen. Hierfür wurden die 10-12 Wochen alten Versuchstiere eine Woche nach der ersten Tamoxifen Injektion wie in 2.2.5 beschrieben getötet und mit 1x PBS perfundiert bis sich die Leber entfärbte. Die Herzen wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Herzen wurden dann mit einem Mörser auf Trockeneis zermahlen und jeweils ca. 50 mg der gemörserten Probe in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert bis die weitere Probenaufbereitung, sowie die metabolomischen Untersuchungen (Quantifizierung von Metaboliten des TCA Zyklus, freien Aminosäuren im Gewebe und Acyl-Coenzym A im Gewebe) von Dr. Sven Zukunft (*Vascular Research Centre*; Frankfurt am Main) durchgeführt wurden.

### **2.5 Isolierung, Stimulation und Inhibierung von neonatalen und adulten Kardiomyozyten**

#### **2.5.1 Isolation von neonatalen Maus Kardiomyozyten**

Die Isolation von neonatalen Maus Kardiomyozyten erfolgte mittels dem Dissoziations (Miltenyi Biotec; #130-098-373) und Isolations Kit (Miltenyi Biotec; #130-100-825) für neonatale Maus Herzen von Miltenyi Biotec. Hierfür wurden neonatale Mäuse bis zu drei Tage nach der Geburt (P0-P3) getötet und das Herz entnommen. Zunächst erfolgte die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus den Herzen mit einer Kombination von mechanischer Dissoziation (gentleMACS Dissoziator von Miltenyi Biotec; #130-096-427) und enzymatischer Degradation der extrazellulären Matrix nach Angaben des Herstellerprotokolls. Anschließend folgte die Lyse der roten Blutkörperchen mittels *Red Blood Cell Lysis Solution* (Miltenyi Biotec; #130-

094-183). Hierfür wurde das Zellpellet in 1 ml PEB Puffer (1:20, auto MACS® BSA Stock Lösung (Miltenyi Biotec; #130-091-376) und auto MACS® Spüllösung (Miltenyi Biotec; #130-091-222)) resuspendiert und 10 ml *Red Blood Cell Lysis Solution* (1:10 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt) für eine Minute bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde dann bei 600g für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 10 ml PBS mit 15 µl Enzym A resuspendiert und anschließend wieder bei 600g für 5 min. zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand entnommen und das Pellet in entsprechender Menge PEB Puffer, die für die weitere Isolation der neonatalen Kardiomyozyten vom Hersteller empfohlen wird, resuspendiert (90 µl Puffer/5x10<sup>6</sup> Zellen) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Einzelzellsuspension wurden dann 10 µl pro 5x10<sup>6</sup> Zellen des neonatalen Isolations Kits hinzugegeben, die Suspension durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gut vermischt und für 15 Min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dieser Schritt diente zur Markierung der nicht-Kardiomyozyten mit magnetischen Beads und ermöglicht somit die anschließende magnetische Auftrennung der Zellsuspension zwischen Kardiomyozyten und nicht-Kardiomyozyten mit Hilfe von *MS Columns* (Miltenyi Biotec; #130-042-201) nach Angaben des Herstellerprotokolls. Abschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert auf zuvor mit Fibronectin beschichteten (PromoCell; C-43050) Platten (20 µg/ml) ausgesät. Dabei sollte das Fibronectin mind. 2 Std. vor den Kardiomyozyten auf die Platten pipettiert werden und erst kurz vor dem aussäen der Kardiomyozyten abgenommen werden.

**Tabelle 23: Kulturmedium für neonatale Maus Kardiomyozyten**

Reagenz	Konzentration	Menge für 500 ml
DMEM ( <i>high glucose</i> )	-	445 ml
FCS	10%	50 ml
Pen-Strep	5%	5 ml

**2.5.1.1 Stimulation von neonatalen Maus Kardiomyozyten mit Agrin** Die Stimulation von neonatalen Maus Kardiomyozyten mit Agrin diente zur Untersuchung der Proliferation. Hierfür wurden neonatale Kardiomyozyten wie in 2.5.1 beschrieben isoliert und ausplattiert. Vier Stunden nach der Isolation wurde frisches Kulturmedium auf die Kardiomyozyten gegeben und die Kardiomyozyten anschließend für 48 Std. bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 48 Std. wurde das Kulturmedium durch mit Agrin versetztes Medium (DMEM (high glucose); Pen-Strep 5 %; Agrin 100 ng/ml) ersetzt und die Kardiomyozyten für weitere 72 Std. bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Kardiomyozyten wie in 2.3.9 beschrieben gefärbt.

### **2.5.2 Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten**

Die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten basierte auf die zuvor beschriebene Langendorff Methode (O'Connell, Rodrigo et al. 2007). Hierfür wurde den Versuchstieren zunächst 100 µl Heparin und 100 µl/10 g Körpergewicht Ketamin/Xylarium (4 ml NaCl 0,9 %; 500 µl Ketamin; 250µl Xylarium) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Narkosetiefe wurde anhand verschiedener Reflexe überprüft und der Brustkorb geöffnet. Das Herz und die Lunge wurden entnommen und in eine mit Silikon beschichtete Petrischale gelegt und mit Hilfe von Stecknadeln, die durch die Lungenflügel gesteckt wurden, fixiert. Der Thymus wurde entfernt und die Aorta freipräpariert. Eine abgeschliffene Kanüle wurde in die Aorta eingeführt bis sich die Spitze der Kanüle direkt über der Aortenklappe befand. Die Kanüle wurde anschließend unterhalb des ersten Abganges des Aortenbogens mit Hilfe eines Knotens befestigt und das Herz komplett von überschüssigen Gewebe freipräpariert und mit 1 ml Perfusionspuffer (Tabelle 25) langsam perfundiert. Anschließend wurde das Herz luftblasenfrei an eine mit Perfusionspuffer gefüllte Langendorff-Apparatur gehängt. Es folgte eine Perfusion des Herzens mit ca. 15 ml Perfusionspuffer. Das dabei entstehende Perfusat wurde verworfen. Danach wurden für den Verdau des Herzens 15 ml Enzympuffer (Tabelle 26) in die Anlage gefüllt. Das dabei entstehende Perfusat wurde für den Verdau gesammelt und wiederverwendet. Während dem Verdau sollte das Herz anschwellen und verblassen. Diese Anzeichen weisen auf eine gute Verdauung des Herzens hin. Konnte man dazu noch mit Hilfe eines Mikroskopes erste Kardiomyozyten im Perfusat nachweisen und das Herz mit Hilfe einer Pinzette leicht von der

Langendorf-Apparatur lösen, war der Verdau abgeschlossen. Nach dem Verdau wurde das Herz von der Langendorff-Apparatur genommen und in eine Schale mit 3 ml des verwendeten Enzympuffers aus der Anlage überführt. Restliche Gefäße und die Atrien wurden entfernt und das Herz anschließend mit Hilfe von zwei Pinzetten mechanisch zerkleinert. Das Gemisch wurde mit einer 10 ml Plastikpipette in ein 50 ml Falcon überführt und die Schale nochmal mit 2 ml Stopppuffer gespült um möglichst alle Zellen zu bekommen. Das Falcon wurde dann für ca. 3 min. stehen gelassen damit sich die Zellen absetzen konnten. Dann wurde der Großteil des Überstandes in ein neues 15 ml Falcon überführt und zu dem Rest im 50 ml Falcon 7,5 ml Stopppuffer pipettiert. Das 15 ml Falcon wurde dann bei 500 rpm für 1 Min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand des 15 ml Falcons wurde verworfen oder als Nicht-Kardiomyozyten Fraktion verwendet (siehe 2.5.2). Das Pellet aus dem 15 ml Falcon wurde mit Hilfe von 2 ml des Stopppuffers aus dem 50 ml Falcon resuspendiert und beide Pellets in dem 50 ml Falcon vereint. Für die Kultivierung der Kardiomyozyten wurden dem Pellet nach und nach mit  $\text{CaCl}_2$  zugegeben. Die Zugabe erfolgte in fünf Schritten (50  $\mu\text{l}$  10 mM; 50  $\mu\text{l}$  10 mM; 100  $\mu\text{l}$  10 mM; 30  $\mu\text{l}$  100 mM; 50  $\mu\text{l}$  100 mM) mit jeweils 4 min. Inkubationszeit wobei die Zellen nach jeder Zugabe vorsichtig geschwenkt wurden. Nach der  $\text{CaCl}_2$  Zugabe wurden die Zellen noch einmal vorsichtig geschwenkt und für weitere 4 Min. stehen lassen. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein 100  $\mu\text{m}$  Filter in ein neues 50 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden dann bei 500 rpm für 1 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand weitestgehend abgenommen. Dabei sollte behutsam vorgegangen werden, da das Pellet sich leicht löst. Das Pellet wurde dann mit Kulturmedium vorsichtig resuspendiert, wobei überschüssiges resuspendieren dabei vermieden werden sollte, da Kardiomyozyten sehr empfindlich sind. Abschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und auf zuvor mit Laminin beschichteten Platten (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ausgesät. Dabei sollte das Laminin mind. 2 Std. vor den Kardiomyozyten auf die Platten pipettiert werden und erst kurz vor dem aussäen der Kardiomyozyten abgenommen werden. Der erste Mediumwechsel erfolgte 2 Std. nach der Isolation. Wollte man die Kardiomyozyten länger in Kultur halten, musste das Medium nach dem ersten Mediumwechsel alle zwei Tage gewechselt werden.

**Tabelle 24: Kalzium freier Puffer für die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten**

Reagenz	Konzentration	Menge (g/l)
NaCl	113 mM	6,60
KCl	4,7 mM	0,35
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 mM	0,085
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 mM	0,082
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM	0,3
NaHCO <sub>3</sub>	12 mM	1,0
KHCO <sub>3</sub>	10 mM	1,0
Taurin	30 mM	3,75
Hepes	10 mM	10 ml/l
Gekauftes Aqua dest. (Braun)	-	Auffüllen auf 1 Liter

Das Kalzium freie Medium muss steril filtriert werden und kann danach bei 4°C gelagert werden.

**Tabelle 25: Perfusionspuffer für die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten**

Reagenz	Konzentration	Menge
Kalzium freier Puffer	-	100 ml
BDM	10 mM	2 ml 0,5 M/100 ml
Glucose	5,5 mM	100 mg/100 ml

Der Perfusionspuffer muss steril filtriert und immer frisch angesetzt werden. Für drei Tiere benötigt man 200 ml Perfusionspuffer.

**Tabelle 26: Enzympuffer für die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten**

Reagenz	Konzentration	Menge pro Tier
Perfusionspuffer	-	14 ml
Liberase DH	0,25 mg/ml	0,7 ml
Trypsin	0,27 mg/ml	3,75 mg
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	23,2 µM	3,25 µl

Der Enzympuffer muss steril filtriert und immer frisch angesetzt werden.

**Tabelle 27: Stopppuffer für die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten**

Reagenz	Konzentration	Menge pro Tier
Perfusionspuffer		9,5 ml
FCS	5 %	0,5 ml
CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	12,5 µM	12,5 µl

Der Stopppuffer muss steril filtriert und immer frisch angesetzt werden.

**Tabelle 28: Kulturmedium für adulten Maus Kardiomyozyten**

Reagenz	Konzentration	Menge für 500 ml
<b>M199</b>	-	0,430 l
<b>Creatine x H<sub>2</sub>O</b>	5 mM	0,330 g/l
<b>L-Carnitin x H<sub>2</sub>O</b>	2 mM	0,220 g/l
<b>Taurin</b>	5 mM	0,315 g/l
<b>HEPES</b>	25 mM	12,6 ml
<b>Pen-Strep</b>	1%	5 ml
<b>ITS</b>	1%	5 ml
<b>AraC</b>	10 $\mu$ M	100 $\mu$ l

Den pH-Wert des Kulturmediums mit Hilfe von NaOH auf pH 7,3 einstellen und steril filtrieren. Das Kulturmedium kann bei 4°C gelagert werden.

**2.5.2.1 Behandlung adulter Kardiomyozyten mit Etomoxir** Für die Behandlung mit Etomoxir wurden adulte Kardiomyozyten, wie in 2.5.2 beschrieben, isoliert und auf 24-well Platten (Corning; #3542) ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und eine Zugabe von 100  $\mu$ M Etomoxir/well. Nach 12 Std. Inkubation mit 100 $\mu$ M Etomoxir wurden die Zellen in eine Hypoxiekammer (Whitley H45 HEPA) gestellt und für 18 Std. mit einer Sauerstoffkonzentration von 1 % O<sub>2</sub> inkubiert. Nach 18 Std. wurden die Zellen aus der Hypoxiekammer genommen und die Zellviabilität mittels Lebend-Tod-Färbung wie in 2.3.10 beschrieben untersucht.

### 2.5.3 Isolation von Nicht-Kardiomyozyten aus adulten Maus Herzen

Die Isolation von Nicht-Kardiomyozyten erfolgte zunächst wie in 2.5.2 beschrieben. Nach dem Verdau des Herzens und der Zentrifugation des 15 ml Falcons wurde der Überstand des 15 ml Falcons als Nicht-Kardiomyozyten Fraktion verwendet. Hierfür wurde der Überstand in ein neues 15 ml Falcon überführt und bei 2000 rpm für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Trizol resuspendiert und mittels mechanischem Aufschlussverfahren (Potter-Elvehjem Verfahren) homogenisiert und entweder direkt für die RNA Extraktion (2.4.3) weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

### 2.5.4 Isolation von Ratten Kardiomyozyten

Die Isolation von Ratten Kardiomyozyten erfolgte, nach zuvor beschriebenen Methoden (Kubin, Ando et al. 1999), durch Dr. Thomas Kubin. Als Versuchstiere dienten Sprague Dawley Ratten (200-250 g). Die isolierten Kardiomyozyten wurden gezählt, in der entsprechenden Menge Kulturmedium resuspendiert und auf zuvor mit Laminin beschichtete Platten ausgesät ( $1,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>). Die ausplattierten Kardiomyozyten wurden während der Experimente kontinuierlich in Kulturmedium gehalten.

#### 2.5.4.1 Stimulation und Inhibierung von isolierten Ratten Kardiomyozyten

Die Stimulation von isolierten Ratten Kardiomyozyten erfolgte durch Zugabe von 20 ng/ml Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2; PeproTech), 20 ng/ml Onkostatine M (OSM; Sigma) oder einer Kombination aus OSM+FGF2 (1:1) im Kulturmedium. Als Kontrolle dienten Kardiomyozyten denen 20 ng/ml Albumin in das Kulturmedium zugegeben wurden. Die Stimulation erfolgte über mehrere Tage (die genaue Dauer ist den einzelnen Abbildungen zu entnehmen). Dabei wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Für die Inhibierung von isolierten Ratten Kardiomyozyten wurden die Kardiomyozyten einen Tag vor der Stimulation mit 0,05 µM LNA-anti-miRs (*locked nucleic acid*; i-mmu-miR-1a-3p und i-mmu-miR-133a-3p; Exiqon; #199900) oder einer Kontrolle (*scrambled negative control*; Exiqon; #199900) transfiziert (DharmaFECT-Transfektionsreagenz; Dharmacon).

## 2.6 Operative Methoden

### 2.6.1 Myokardinfarkt-Modell der Maus

Die Induktion der akuten Myokardinfarkte erfolgte durch Ischämie und Reperfusion (I/R) und wurde von Marion Wiesnet durchgeführt. Hierfür wurden den Tieren zunächst 20 min vor dem Eingriff subkutan 5 IU Heparin und 0,1 mg/kg Buprenorphin injiziert. Für den Eingriff wurden die Tiere dann mit 5 mg/l Isofluran betäubt. Danach erfolgte eine oropharyngeale Intubation der Tiere um eine Aufrechterhaltung der Anästhesie im Verlaufe des Eingriffes zu gewährleisten (1,5 mg/l Isofluran). Um die Augenoberfläche der Tiere vor Schäden durch Austrocknung zu schützen wurde auf den Augen eine Salbe aufgetragen. Weiterhin wurden die Tiere während dem gesamten Eingriff auf eine Heizplatte gelegt um somit ein Unterkühlen der Tiere zu vermeiden. Das Fell wurde auf der linken Thoraxseite entfernt und der linke Thoraxbereich mit einem Schnitt zwischen der 3. und 4. Rippe geöffnet. Die „oberflächliche Oberbaucharterie“ (*Arteria epigastrica superficialis*) wurde mit Hilfe eines Elektrokauters verodet und es folgte ein Einschnitt der Interkostalmuskulatur um die LAD (*left anterior descending artery* oder *ramus interventricularis anterior* (RIVA)) freizulegen. Die Ischämie erfolgte mittels distaler Ligatur der LAD mit Hilfe eines nicht resorbierbaren Seidenfadens. Um eine Reperfusion und ein Öffnen des Knotens zu ermöglichen, wurde zwischen dem Knoten eine kleine Kanüle als „Platzhalter“ platziert. Die Dauer der Ischämie betrug 30 Minuten. Dabei diente ein Verblässen des Myokards und Veränderungen im EKG als Kontrolle für eine erfolgreiche Ischämie. Nach der Ischämie folgte die Reperfusion durch Lösen des Knotens. Der Thorax wurde mit Hilfe einer chirurgischen Naht verschlossen und das Tier extubiert. Postoperative Schmerzkontrolle erfolgte durch orale Schmerztherapie mit Hilfe von 200 mg/kg Metamizol im Trinkwasser für eine Dauer über drei Tage.

### 2.7 Statistische Auswertungen und Analysen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden generierte Ergebnisse statistisch ausgewertet und analysiert. Die hierfür verwendeten Programme und Signifikanztests sind im Folgenden aufgeführt.

### 2.7.1 Transkriptomanalysen mittels GSEA (*Gene set enrichment analysis*)

Die Transkriptomanalysen mit Hilfe von GSEA (Subramanian, Tamayo et al. 2005) wurden für eine genauere Analyse der Microarray Daten (2.4.6) verwendet. Dies diente der Untersuchung von potentiell veränderten Gensets. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 29 aufgeführt und zu entnehmen. Für die Untersuchungen wurden implementierte Datenbanken der Software verwendet (Hallmark (Keysar, Le et al. 2017); C2 und C5 (Ashburner, Ball et al. 2000)). Dabei wurden immer zwei unterschiedliche Genotypen miteinander verglichen. Wiesen Gene eines untersuchten Genotyps eine Veränderung der Expression auf, die um mehr als 5% von der Expressionsstärke der gleichen Gene in der Kontrollgruppe abwichen galten diese Gene als verändert (Eden, Lipson et al. 2007, Eden, Navon et al. 2009).

**Tabelle 29 – Parameter für die Transkriptomanalyse mittels GSEA**

---

```
1 param collapse true
2 param cls
3 param plot_top_x 100
4 param norm meandiv
5 param save_rnd_lists false
6 param median false
7 param num 200
8 param scoring_scheme weighted
9 param make_sets true
10 param mode Max_probe
11 param gmx gseaftp.broadinstitute.org://pub/gsea/gene_sets_final/c5.all.v6.2.symbols.gmt
12 param gui false
13 param chip gseaftp.broadinstitute.org://pub/gsea/annotations/MoGene_1_0_st.chip
14 param metric Signal2Noise
15 param rpt_label dKO
16 param help false
17 param order descending
18 param out P:\Affy
19 param create_svgs false
20 param permute gene_set
21 param rnd_type no_balance
22 param set_min 15
23 param include_only_symbols true
24 param sort real
25 param create_gcts false
26 param rnd_seed timestamp
27 param nperm 1000
28 param zip_report false
29 param set_max 1000
```

---

### 2.7.2 Untersuchung der lebenden und toten Maus Kardiomyozyten mittels Fiji

Für die Untersuchung von lebenden und toten Kardiomyozyten wurden Fluoreszenzbilder von isolierten Kardiomyozyten (2.5.2) verwendet die, wie in 2.3.8 beschrieben, behandelt wurden. Die Bilder wurden mikroskopisch dokumentiert und aus der Zen Software als JPG-Datei exportiert und anschließend mit Fiji geöffnet. Mit Hilfe des „*Multi-Point*“ Tools wurden dann alle lebenden Kardiomyozyten angeklickt. Anschließend konnte mit „Strg + M“ die Anzahl angezeigt werden. Das gleiche Verfahren wurde dann für die Untersuchung von toten Kardiomyozyten verwendet.

### 2.7.3 Bestimmung der Infarktgröße mittels Fiji

Für die Bestimmung der Infarktgröße wurden Fluoreszenzbilder von adulten Herzen verwendet die, wie in 2.6.1 behandelt und wie in 2.3 beschrieben geschnitten und mit WGA gefärbt wurden (2.3.1; 2.3.2; 2.3.6). Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe einer Mosaikaufnahme des Mikroskops aufgenommen und als JPG-Datei exportiert und anschließend mit Fiji geöffnet. Zunächst wurde ein Bild mit einem Maßstabsbalken geöffnet und dieser mit dem „*Straight*“ Tool von Fiji nachgezogen. Anschließend wurde unter „*Analyze*“ die Option „*set scale*“ ausgewählt. Hier wird die Pixellänge des vorher nachgezogenen Maßstabsbalken als „*Distance in Pixels*“ angegeben. Im Feld „*known Distance*“ wurde dann die bekannte Distanz des nachgezogenen Maßstabsbalkens eingefügt und bei „*Unit of length*“ die entsprechende Einheit eingefügt ( $\mu\text{M}$ ). Abschließend wurde der Punkt „*Global*“ angeklickt um den Maßstab auf alle weiteren Bilder übertragen zu können. Das Menü wurde geschlossen und mit Hilfe des „*Polygon*“ Tools der Infarktbereich umrandet. Nach der Umrandung des Infarktbereiches konnte dann mit Hilfe von „Strg + M“ die Größe der Fläche angezeigt werden.

### 2.7.4 Statistische Auswertung der Experimente

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 8). Für die statistische Auswertung wurde zunächst auf eine Normalverteilung getestet. Lag eine Gaußverteilung der untersuchten Gruppen vor, wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe eines „*Students T-Tests*“ berechnet. Lag keine Gaußverteilung der untersuchten Gruppen vor, wurde, wenn nicht anders angegeben, der „*Mann-Whitney-Test*“ angewendet. Statistisch signifikante Ausreißer wurden mittels ROUT-Ausreißertest (Q=1%) ermittelt. Statistische Signifikanzen werden als p-Wert angegeben und sind Tabelle 30 zu entnehmen.

**Tabelle 30: Darstellung der statistischen Signifikanzen**

---

Symbol	Signifikanz
ns	$P > 0,05$ ; nicht signifikant
*	$P < 0,05$ ; signifikant
**	$P < 0,01$ ; signifikant
***	$P < 0,001$ ; signifikant
****	$P < 0,0001$ ; signifikant

---

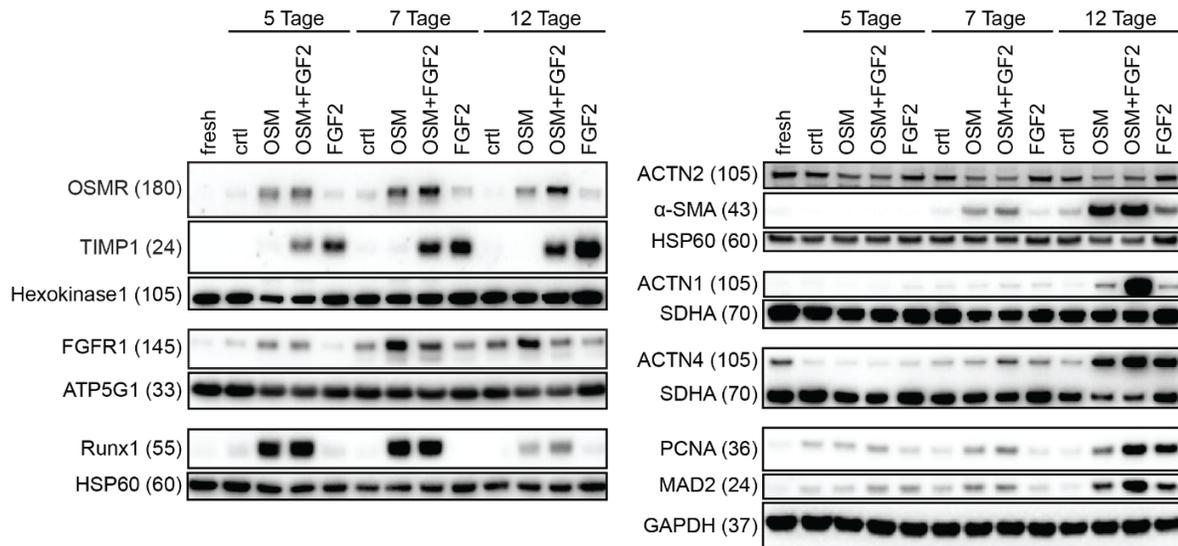
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 In Kardiomyozyten wird die Expression von *Osmr* und *Fgfr1* durch miR-1/133a reguliert

Zur Identifikation von posttranskriptionellen Regulationsprozessen im Herzen erfolgte eine Analyse von putativen Bindestellen der gewebspezifischen microRNAs (miRNAs) miR-1 und miR-133a. Mittels TargetScan und MiRanda (miRNA „target prediction tools“) wurde eine potentielle miR-1 Bindestelle innerhalb der 3'UTR von *Osmr* und zwei potentielle miR-133a Bindestellen innerhalb der 3'UTR von *Fgfr1* in *Mus musculus* identifiziert (Abbildung 32 A + C im Anhang). Diese konnten mittels Luziferase-Reporter-Assay funktionell validiert werden (Abbildung 32 B + D im Anhang). Um eine mögliche Auswirkung von miR-1 und miR-133a auf die Expression von OSMR und FGFR1 zu untersuchen wurden neonatale Kardiomyozyten (P0-P3) isoliert und mit siRNAs transfiziert. Die qRT-PCR Analysen ergaben nach einer Transfektion mit miR-1 eine signifikant verringerte Expression (über 50 %) von *Osmr* (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05) und nach einer Transfektion mit miR-133a eine signifikant verringerte Expression (über 80%) von *Fgfr1* (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: \*\*\*\* < 0,0001; Abbildung 32 E). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl miR-1, als auch miR-133a die Expression der Rezeptoren, die eine wichtige Rolle in der Proliferation und Dedifferenzierung von Kardiomyozyten spielen, unterdrücken können.

Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wurde zunächst die alleinige Auswirkung von OSM und FGF2 in adulten Kardiomyozyten untersucht. Hierfür wurden adulte Kardiomyozyten aus Ratten isoliert und mit OSM und FGF2 behandelt. Die adulten Kardiomyozyten wurden über einen Zeitraum von zwölf Tagen mit OSM, FGF2 oder OSM + FGF2 behandelt. Dabei wurden die Zellen nach fünf, sieben oder zwölf Tagen geerntet, lysiert und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 8). Als Kontrolle dienten Zellen die nicht mit OSM und FGF2 behandelt wurden. Die Western Blot Analysen ergaben, dass OSM nicht nur die Expression von OSMR (180 kDa) und FGFR1 (145 kDa) induziert, sondern auch die Expression von Runx1 (55 kDa),  $\alpha$ -SMA (43 kDa), ACTN1 (105 kDa), ACTN4 (105 kDa), PCNA (36 kDa) und MAD2 (24 kDa). Eine Behandlung mit FGF2 induzierte die Expression von TIMP1 (24 kDa), ACTN2

(105 kDa) und ebenfalls die Expression von OSMR,  $\alpha$ -SMA, ACTN1, ACTN4, PCNA und MAD2. Dabei wies eine Behandlung mit FGF2 aber im Vergleich zu einer Behandlung mit OSM nur eine geringfügigere Auswirkung auf die Expression von OSMR und ACTN1 auf, jedoch nach zwölf Tagen eine vergleichsweise verstärkte Auswirkung auf die Expression der Zellzyklusmarker PCNA und MAD2. Eine Co-Stimulation mit OSM und FGF2 führte, im Vergleich zu einer Behandlung mit OSM oder FGF2 allein, zu einer Steigerung der Expression von OSMR,  $\alpha$ -SMA, ACTN1, ACTN4, PCNA und MAD2. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf einen synergistischen Effekt von OSMR und FGFR1 hin.



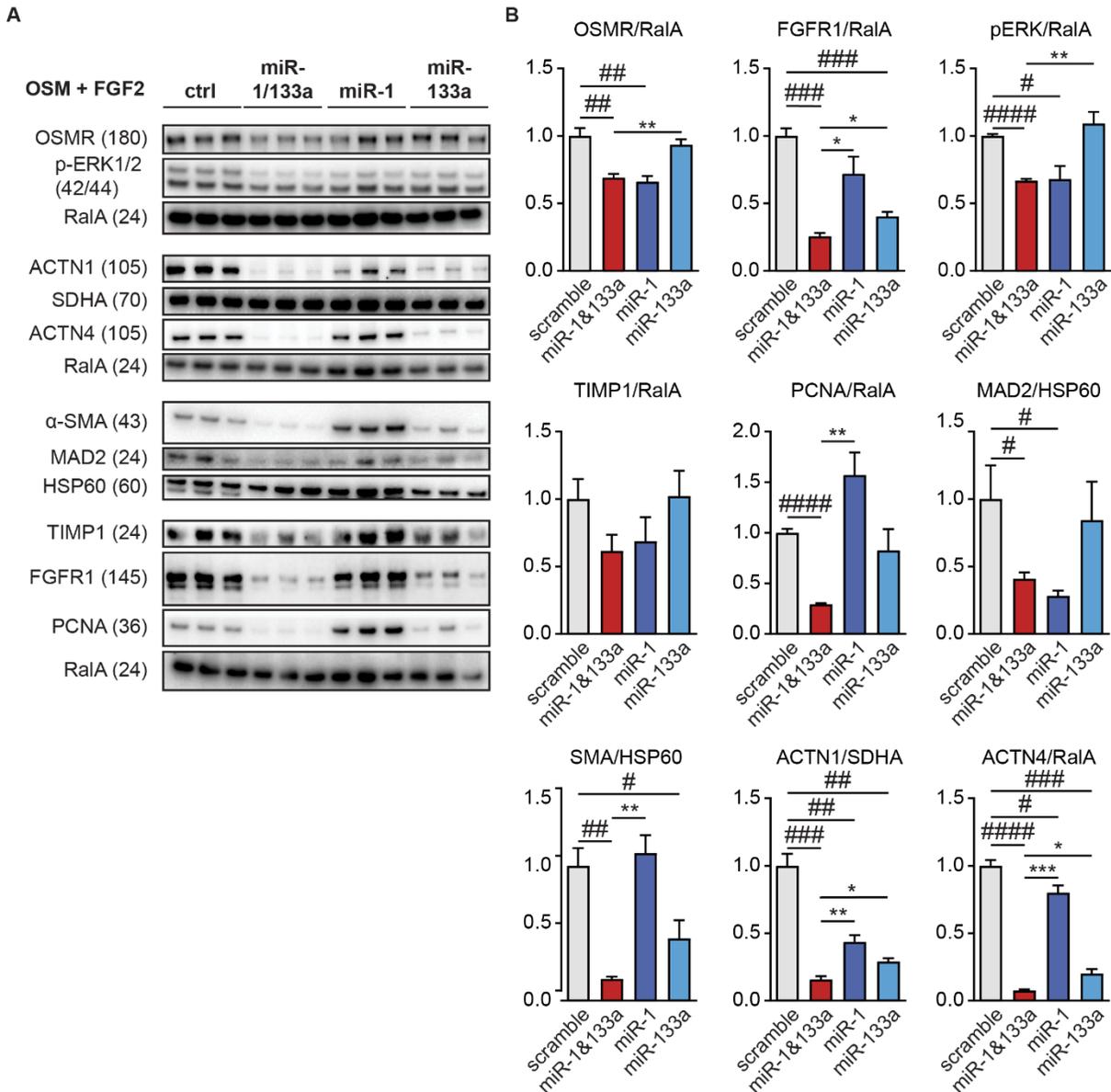
**Abbildung 8 – Eine Stimulation mit OSM und FGF2 enthüllt einen synergistischen Effekt von *Osmr* und *Fgfr1*.**

Untersuchung der Expression von OSMR, FGFR1 und Marker für Zellzyklus, Fibrose und Kontraktilität in isolierten Ratten Kardiomyozyten nach Behandlung mit OSM, FGF2 oder OSM+FGF2 für 5 Tage, 7 Tage oder 12 Tage auf Proteinebene. Die Western Blot Analysen zeigen, dass eine Stimulation mit OSM oder FGF2 die Expression von verschiedenen Markern erhöht (OSM Stimulation: OSMR, FGFR1, Runx1,  $\alpha$ -SMA, ACTN1 und ACTN4; FGF2 Stimulation: Timp1,  $\alpha$ -SMA und ACTN4). Eine Co-Stimulation mit OSM und FGF2 (OSM+FGF2) erhöht die Expression von OSMR,  $\alpha$ -SMA, ACTN1, ACTN4 und Timp1 synergistisch. Dazu verstärkt eine Co-Stimulation (OSM + FGF2) die Expression der Zellzyklusmarker PCNA und MAD2. Der Western Blot wurde durchgeführt von Dr. Thomas Kubin.

Um herauszufinden wie sich eine Überexpression von miR-1/133a auf die Auswirkungen einer Stimulation mit OSM+FGF2 in adulten Kardiomyozyten auswirkt, wurden adulte Ratten Kardiomyozyten isoliert und zunächst für sieben Tage mit OSM+FGF2 behandelt. Dies diente zur Erhöhung der Expression der untersuchten Marker, um so eine mögliche Auswirkung der anschließend erfolgten Zugabe von miR-1, miR-133a oder miR-1/133a besser untersuchen zu können. Als Kontrolle dienten hierbei adulte Ratten Kardiomyozyten die für sieben Tage mit OSM+FGF2 behandelt wurden, ohne zusätzliche Zugabe der untersuchten miRNAs. Die Western Blot Analysen ergaben, dass eine Überexpression von miR-1 im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Verringerung der Expression von OSMR (180 kDa; p-Wert: ## < 0,01), pERK (42/44 kDa; p-Wert: # < 0,05), MAD2 (24 kDa; p-Wert: # < 0,05), ACTN1 (105 kDa; p-Wert: ## < 0,01) und ACTN4 (105 kDa; p-Wert: # < 0,05) führt. Des Weiteren hat eine Überexpression von miR-1 eine deutliche Verringerung der Expression von TIMP1 zur Folge. Eine Überexpression von miR-133a führte, im Vergleich zur Kontrolle, zu einer signifikanten Verringerung der Expression von FGFR1 (145 kDa; p-Wert: ### < 0,001),  $\alpha$ -SMA (43 kDa; p-Wert: ## < 0,05), ACTN1 (p-Wert: ## < 0,01) und ACTN4 (p-Wert: ### < 0,001). Eine Überexpression beider miRNAs (miR-1/133a) führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Verringerung der Expression von OSMR (p-Wert: ## < 0,01), FGFR1 (p-Wert: ### < 0,001), pERK (p-Wert: #### < 0,0001),  $\alpha$ -SMA (p-Wert: ## < 0,01), ACTN1 (p-Wert: ### < 0,001), ACTN4 (p-Wert: #### < 0,0001), PCNA (36 kDa; p-Wert: #### < 0,0001) und MAD2 (p-Wert: # < 0,05). Weiterhin führte eine Überexpression von miR-1/133a auch zu einer deutlichen Verringerung der Expression von TIMP1 (24 kDa; p-Wert: > 0,05; nicht signifikant; ungepaarter einseitiger t-Test; Abbildung 9). Eine Überexpression der Kombination beider miRNAs (miR-1/133a) wirkte sich, im Vergleich zu der Überexpression von miR-1 oder miR-133a allein, verstärkt auf einzelne Expressionen der untersuchten Gene aus (p-Wert (OSMR, miR-133a vs. miR-1/133a): \*\* < 0,01, p-Werte (FGFR1, miR-1 vs. miR-1/133a; miR-133a vs. miR-1/133a): \* < 0,05, p-Wert (pERK, miR-133a vs. miR-1/133a): \*\* < 0,01, p-Wert (PCNA, miR-1 vs. miR-1/133a): \*\* < 0,01, p-Wert ( $\alpha$ -SMA, miR-1 vs. miR-1/133a): \*\* < 0,01, p-Wert (ACTN1, miR-1 vs. miR-1/133a): \*\* < 0,01, p-Wert (ACTN1, miR-133a vs. miR-1/133a): \* < 0,05, p-Wert (ACTN4, miR-1 vs. miR-1/133a): \*\*\* < 0,001,

p-Wert (ACTN4, miR-133a vs. miR-1/133a): \* < 0,05).

Zusammenfassend konnte mit den *in vitro* Analysen gezeigt werden, dass die miRNAs miR-1 und miR-133a eine wichtige Rolle bei der Regulation der Dedifferenzierung von Kardiomyozyten zu spielen scheinen, indem diese die synergistische Aktivität der Signalübertragung von OSMR und FGFR1 inhibieren.

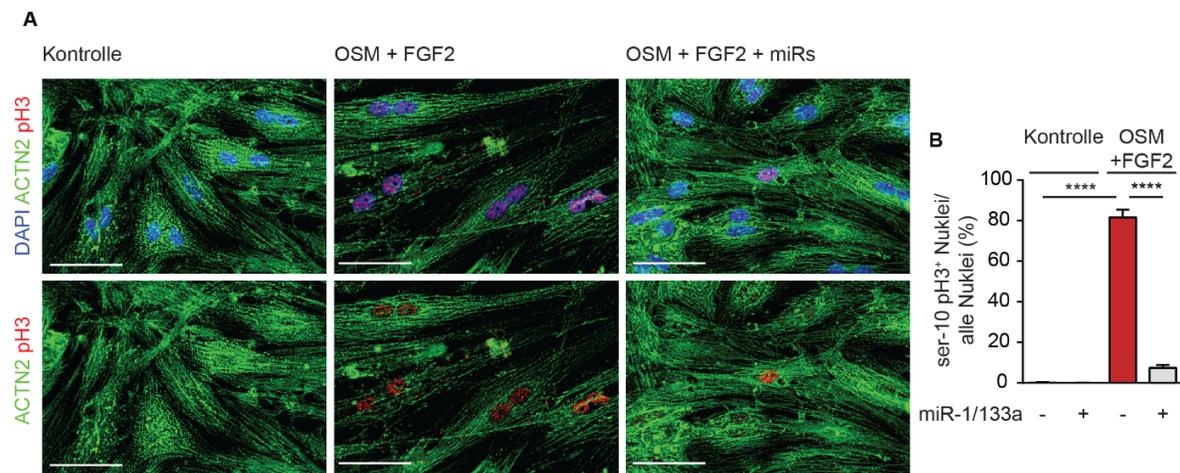


**Abbildung 9 – Eine Überexpression von miR-1, miR-133a oder miR-1/133a hebt die Wirkung von OSM+FGF2 in adulten Ratten Kardiomyozyten nahezu auf.**

(A) Western Blot Analyse von OSMR, FGFR1, pERK und Marker für Zellzyklus, Fibrose und Kontraktilität nach 7 Tagen OSM+FGF2 Stimulation von isolierten adulten Ratten Kardiomyozyten mit und ohne miR-1/133a Behandlung. Der Western Blot wurde von Dr. Thomas Kubin durchgeführt. (B) Quantifizierung der in (A) gezeigten Ergebnisse (n = 3 pro Gruppe; Mittelwert ± SEM; ungepaarter einseitiger t-Test). Die Zugabe von miR-1, miR-133a oder miR-1/133a führt zu einer signifikanten Verringerung der Expression der untersuchten Gene (# = Vergleichen zur Kontrolle; \* = Vergleichen zu miR-1/133a). Als Kontrolle (*scramble*) dienten Kardiomyozyten die für sieben Tage mit OSM+FGF2 behandelt wurden, ohne zusätzliche Zugabe der untersuchten miRNAs.

Die Inhibition der Expression der Zellzyklusmarker PCNA und MAD2 durch eine Überexpression von miR-1/133a deutet darauf hin, dass sich miR-1/133a auf die Proliferation von adulten Kardiomyozyten auswirkt. Um diese Annahme zu untersuchen wurde die Akkumulation von Phospho-Histon-H3 positiven (pH3<sup>+</sup>) Kernen in Kardiomyozyten untersucht. Für diesen Zweck wurden adulte Kardiomyozyten aus Ratten isoliert und über sieben Tage mit OSM+FGF2 stimuliert. Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen konnten in unbehandelten Zellen keinerlei pH3<sup>+</sup> Kerne nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu konnte in knapp 80% der Zellen, die mit OSM+FGF2 stimuliert wurden (Abbildung 10; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (OSM+FGF2 vs. Kontrolle): \*\*\*\*  $< 0,0001$ ), pH3<sup>+</sup> Kerne nachgewiesen werden. Der Anstieg der pH3<sup>+</sup> Kerne in OSM+FGF2 stimulierten Zellen konnte nach einer Zugabe von miR-1/133a (miRs) nahezu aufgehoben werden (ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (OSM+FGF2 vs. OSM+FGF2+miRs): \*\*\*\*  $< 0,0001$ ).

Diese Ergebnisse unterstützen die vorangegangene Annahme, dass eine Überexpression von miR-1/133a die Auswirkungen einer Stimulation mit OSM+FGF2 in adulten Kardiomyozyten in Bezug auf die Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten unterdrückt.



**Abbildung 10 – Eine Co-Stimulation mit OSM und FGF2 führt zu einer erhöhten Menge an pH3<sup>+</sup> Kerne in Kardiomyozyten.**

(A+B) Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI (blau), ACTN2 (grün) und pH3 (rot) von isolierten adulten Ratten Kardiomyozyten zeigt eine erhöhte Menge an pH3<sup>+</sup> Kernen in OSM+FGF2 stimulierten Kardiomyozyten im Vergleich zu nicht stimulierten Kardiomyozyten (Kontrolle) auf. Eine Zugabe von miR-1/133a (OSM+FGF2+miRs) inhibiert die erhöhte Menge von pH3<sup>+</sup> Kernen (n = 5 pro Gruppe; Mittelwert ± SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (OSM+FGF2 vs. Kontrolle): \*\*\*\* < 0,0001; p-Wert (OSM+FGF2 vs. OSM+FGF2+miRs): \*\*\*\* < 0,0001). Maßstabsbalken = 50µm.

### 3.2 Die erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* nach dem Verlust von miR-1/133a führt zu einer Aktivierung des MEK/ERK Signalweges

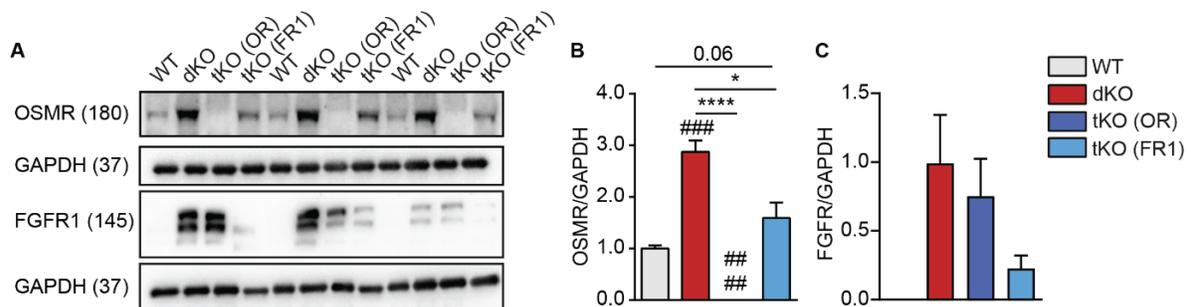
Um die zuvor erlangten *in vitro* Ergebnisse zu Überprüfen, wurde die Funktion von miR-1/133a in Kardiomyozyten *in vivo* untersucht. Für diesen Zweck wurde für die vorliegende Arbeit ein herzspezifischer Verlust beider miR-1/133a Gencluster im Mausmodell induziert (Besser, Malan et al. 2014). Hierfür wurde eine Tamoxifen induzierbare  $\alpha$ MHC-MerCreMer (Sohal, Nghiem et al. 2001) mit zuvor beschriebenen miR-1/133a Allelen (Wust, Droese et al. 2018) kombiniert. Das endgültige Resultat der Verpaarungsstrategie waren Myh6-MerCreMer<sup>pos</sup>/miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>/miR-1-2/133a-1<sup>fl/fl</sup> Tiere, die im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit als Doppelknockout (dKO) Tiere bezeichnet werden (Abbildung 33 im Anhang). Zur Klärung

der Rolle von *Osmr* und *Fgfr1* im adulten Myokard nach Verlust von *miR1/133a*, wurde zusätzlich zu den *miR-1/133a* Gencluster auch *Osmr* oder *Fgfr1* konditionell inaktiviert. Hierfür wurden dKO Tiere mit zuvor beschriebenen *Osmr* (Tanaka, Hirabayashi et al. 2003) oder *Fgfr1* (Trokovic, Trokovic et al. 2003) konditionellen Verlustmodellen gekreuzt. Das Resultat dieser Verpaarungsstrategie waren *Myh6-MerCreMer<sup>pos</sup>/miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>/miR-1-2/133a-1<sup>fl/fl</sup>/OSMR<sup>-/-</sup>* (tKO (OR)) und *Myh6-MerCreMer<sup>pos</sup>/miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>/miR-1-2/133a-1<sup>fl/fl</sup>/Fgfr1<sup>fl/fl</sup>* (tKO (FR1)) Tiere. Als Kontrollen wurden *Myh6-MerCreMer<sup>neg</sup>/miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>* Tiere verwendet, die im weiteren Verlauf der Arbeit als Wildtypen (WT) bezeichnet werden.

Drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion wurde mittels qRT-PCR die Expression von *miR-1*, *mir-133a*, *Osmr* und *Fgfr1* in Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten untersucht. Die Untersuchungen ergaben eine signifikante Verringerung der Expression von *miR-1* und *miR-133a* in Kardiomyozyten von dKO Tieren im Vergleich zu WT Tieren (Abbildung 34 A im Anhang; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte (*miR-1* dKO vs. WT Kardiomyozyten; *miR-133a* dKO vs. WT Kardiomyozyten): \* < 0,05), während sowohl in WT Tieren als auch dKO Tieren keinerlei *miR-1* und *mir-133a* Expression in Nicht-Kardiomyozyten detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte ein Anstieg der *Osmr* und *Fgfr1* Expression in isolierten dKO Kardiomyozyten (ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte (*Osmr*, dKO vs. WT Kardiomyozyten; *Fgfr1*, dKO vs. WT Kardiomyozyten): \* < 0,05), jedoch nicht in Nicht-Kardiomyozyten, verzeichnet werden (Abbildung 34 B + C im Anhang). Mittels Western Blot Analyse von adulten Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion konnte die starke Hochregulation von *Osmr* (180 kDa) und *Fgfr1* (145 kDa) in dKO Mäusen bestätigt werden (Abbildung 11; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (*Osmr*, dKO vs. Wildtyp): ### < 0,001; p-Wert (*Fgfr1*, dKO vs. Wildtyp): > 0,05; nicht signifikant). Weiterhin wurde mittels Western Blot die Effizienz der Inaktivierung der jeweiligen Gene in tKO Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion untersucht. Die Analysen ergaben im Falle von *Osmr* eine effiziente und signifikante Inaktivierung von *Osmr* in tKO (OR) Tieren im Vergleich zu WT und dKO Tieren (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (dKO vs. tKO (OR)): \*\*\*\* < 0,0001;

p-Wert (tKO (OR) vs. Wildtyp): #### < 0,0001) und eine signifikant verringerte Menge an Osmr in tKO (FR1) Tieren verglichen mit dKO Tieren (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (Osmr, tKO (FR1) vs. dKO): dKO vs. tKO (FR1)): \* < 0,05). Jedoch war die Menge an Osmr in tKO (FR1) Tieren im Vergleich zu WT Tieren erhöht (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (Osmr, tKO (FR1) vs. WT): 0,06). Im Falle von Fgfr1 ergaben die Analysen eine beträchtliche Reduktion von FGFR1 in tKO (FR1) Tieren im Vergleich zu dKO Tieren und eine leichte Reduktion der Expression von FGFR1 in tKO (OR) Tieren verglichen mit dKO Tieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine effiziente Inaktivierung von miR-1/133a zu einer erhöhten Expression von Osmr und Fgfr1 auf RNA und Proteinebene führt, welche durch einen zusätzlichen Knockout von Osmr (tKO (OR)) oder Fgfr1 (tKO (FR1)) inhibiert wird.



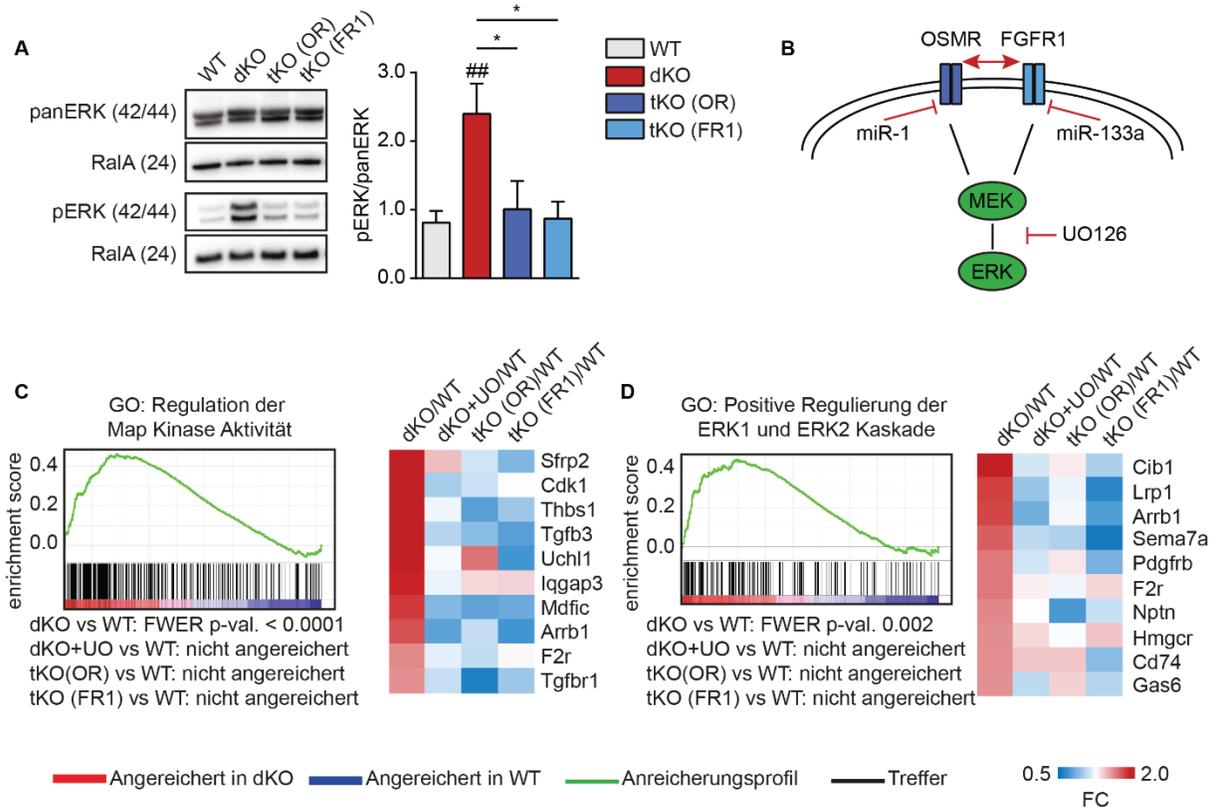
**Abbildung 11 – Der Doppelknockout von miR-1/133a führt zu einer Hochregulation von Osmr und Fgfr1 in adulten Mausherzen.**

(A) Western Blot Analyse der OSMR und FGFR1 Expression in Wildtyp, Doppelknockout (dKO) und Trippelknockout (tKO; tKO (OR): miR-1/133a+OSMR KO; tKO (FR1): miR-1/133a+FGFR1 KO) Herzen 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion. Als Ladekontrolle und für die Normalisierung wurde GAPDH verwendet. (B+C) Quantifizierung der in (A) gezeigten Ergebnisse (n = 3 pro Gruppe; Mittelwert ± SEM; ungepaarter einseitiger t-Test). Die Western Blot Analyse der adulten Herzen zeigt eine starke Hochregulation von OSMR (p-Wert (dKO vs. Wildtyp): ### < 0,001; p-Wert (tKO (OR) vs. Wildtyp): #### < 0,0001; p-Wert (tKO (FR1) vs. Wildtyp): 0,06, nicht signifikant; p-Wert (dKO vs. tKO (OR)): \*\*\*\* < 0,0001; p-Wert (dKO vs. tKO (FR1)): \* < 0,05) und FGFR1 (p-Werte alle > 0,05; nicht signifikant) in Doppelknockout Herzen und eine effiziente Inaktivierung der jeweiligen Gene in den Trippelknockout Herzen.

Neben der erhöhten Expression von *Osmr* und *Fgfr1* in dKO Tieren konnte nach einem Verlust der miR-1/133a Gencluster auch ein signifikanter Anstieg der ERK Phosphorylierung in adulten Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion nachgewiesen werden (Abbildung 12 A). Die Western Blot Analysen ergaben eine signifikant erhöhte Menge an pERK (Phospho-ERK; 42/44 kDa) in dKO Tieren im Vergleich zu Wildtyp Tieren (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert:  $## < 0,01$ ), die allerdings durch eine zusätzliche Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* wieder normalisiert wurde (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (dKO vs. tKO (OR)):  $* < 0,05$ ; p-Wert (dKO vs. tKO (FR1)):  $* < 0,05$ ). Die Menge an panERK (42/44 kDa) war dabei in allen Gruppen unverändert.

Die Normalisierung der Menge an pERK nach einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* deutete darauf hin, dass der Anstieg an pERK in dKO Tieren auf den Verlust von miR-1/133a und die damit verbundene erhöhte Expression von OSMR und FGFR1 zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde der MEK/ERK Signalweg in dKO Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion mit Hilfe eines selektiven Inhibitors der Enzyme MEK 1 und MEK 2 (UO126) inhibiert (Abbildung 12 B) und mittels GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) untersucht. Die GSEA Analysen wiesen eine signifikante Hochregulation von Genen (p-Wert:  $< 0,0001$ ) in dKO Herzen auf, die mit der MAP Kinase Aktivität und der ERK 1 und ERK 2 Kaskade zusammenhängen (Abbildung 12 C + D). Eine Behandlung mit UO126 (dKO + UO/WT) oder eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR)/WT) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)/WT) normalisierte die Expression der hochregulierten Gene. Die Ergebnisse bestätigen die vorangegangene Hypothese, dass die erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* nach dem Verlust von miR-1/133a eine erhöhte Aktivität des MEK/ERK Signalweges zur Folge hat.

Die GSEA Analysen weiterer putativer Signalwege ergab keine deutliche Anreicherung von veränderten Genexpressionen im Falle des Notch-, Hippo-, JAK/STAT- und Wnt-Signalweges (Abbildung 35 im Anhang).



**Abbildung 12 – Der Doppelknockout von miR-1/133a führt zu einem starken Anstieg der ERK-Phosphorylierung die durch eine Behandlung mit UO126 oder einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* wieder aufgehoben wird.**

(A) Western Blot Analyse der ERK-Phosphorylierung in adulten dKO Herzen (n = 5) im Vergleich zu Wildtyp Herzen (n = 5) zeigt eine erhöhte ERK-Phosphorylierung in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen (Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: ## < 0,01). Die erhöhte ERK-Phosphorylierung wird durch eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR); n = 3) oder *Fgfr1* (tKO (FR1); n = 3) normalisiert (Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (dKO vs. tKO (OR)): \* < 0,05; p-Wert (dKO vs. tKO (FR1)): \* < 0,05). (B) Modell der Repression von OSMR und FGFR1 durch miR-1 und miR-133a. Beide Rezeptoren aktivieren synergistisch die MEK-ERK Signalübertragung die durch UO126 inhibiert wird. (C + D) In einer GSEA (broadinstitute.org) signifikant veränderte Gensets von Microarray Daten aus adulten Mausherzen 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen eine Anreicherung von Genen, die mit dem MEK-ERK Signalweg in Zusammenhang stehen (rot = Angereichert in dKO Herzen; blau = Angereichert in Wildtyp Herzen). Eine Behandlung mit UO126 (dKO + UO) oder eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisiert die Expression von hochregulierten Genen (n = 3 pro Gruppe). Die 10 am stärksten hochregulierten Gene sind neben der dazugehörigen GSEA dargestellt und zeigen die Hochregulation (rot; Fold Change (FC) > 1) der Gene in dKO Herzen die durch eine zusätzliche UO126 Zugabe oder Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* normalisiert wird (blau; Fold Change (FC) < 1).

Da miRNAs im Allgemeinen eine große Anzahl von Zielgenen regulieren können, wurden weitere potentielle Zielgene für miR-1/133a mit Hilfe von miRanda und Luziferase Assays identifiziert und validiert. Dabei wurde, neben *Osmr*, unter anderem auch *Runx1* (Abbildung 36 A + B im Anhang) als potentielles direktes Zielgen von miR-1 identifiziert. Zur Klärung, der Rolle von *Runx1* im adulten Myokard nach Verlust von miR1/133a, wurde zusätzlich zu den miR-1/133a Gencluster auch *Runx1* konditionell inaktiviert. Das Resultat der Verpaarungsstrategie waren *Myh6-MerCreMer<sup>POS</sup>/miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>/miR-1-2/133a-1<sup>fl/fl</sup>/Runx1<sup>fl/fl</sup>* (tKO (Rx)) Tiere. Der zusätzliche *Runx1* Knockout hatte jedoch im Vergleich zu einem zusätzlichen *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) Knockout keinerlei Auswirkungen der im weiteren Verlauf der Arbeit untersuchten und dargestellten Experimente nach dem Verlust von miR-1/133a (Abbildung 36 C - H im Anhang). Daher wird im Folgenden Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht mehr darauf eingegangen.

### 3.3 Der Verlust von miR-1/133a führt zu einer Aktivierung des Zellzyklus in adulten Kardiomyozyten

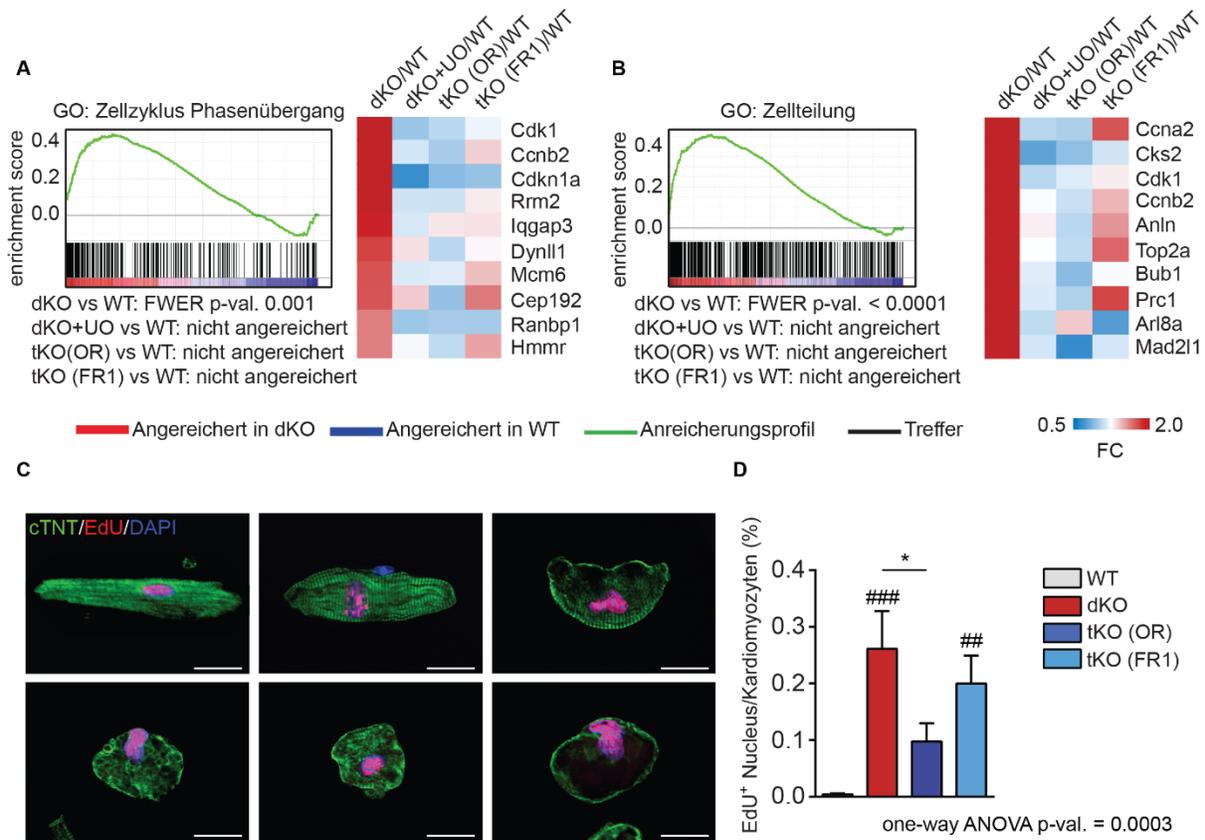
Bisher konnte mit den vorangegangenen Ergebnissen eine Inhibierung von *Osmr* und *Fgfr1* durch miR-1/133a nachgewiesen werden, die mit einer Inhibierung des Zellzyklus von Kardiomyozyten in Zusammenhang zu stehen scheint. Um zu überprüfen ob eine Aktivität von *Osmr* und *Fgfr1* in miR-1/133a dKO Herzen ausreichend ist, um den Eintritt von adulten Kardiomyozyten in den Zellzyklus zu initiieren und um die *in vitro* Western Blot Daten der OSM, FGF2 und miR-1/133a behandelten Ratten Kardiomyozyten (siehe 3.1) *in vivo* zu untersuchen, wurden die in 3.2 beschriebenen Mauslinien verwendet. Zunächst wurden mittels qRT-PCR Analysen die Expression von Genen untersucht die bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen. Für diesen Zweck wurden Herzen von WT und dKO Tieren verwendet denen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion auf drei aufeinanderfolgenden Tagen der MEK/ERK Signalweg Inhibitor UO126 injiziert wurde. Die qRT-PCR Analysen wiesen in dKO Tieren im Vergleich zu WT Tieren eine erhöhte Expression von *Cdk1*, *Ccna2*, *Ccnb1*, *E2f3*, *Pdk3* und *Runx1* auf (Abbildung 37 im Anhang). Eine zusätzliche Behandlung der dKO Tiere mit UO126 führte zu einer Normalisierung der zuvor erhöhten Expression (ungepaarter

einseitiger t-Test; dKO + UO126 vs. dKO ohne UO126) von Cdk1 (p-Wert: 0,07), Ccna2 (p-Wert: \*\* < 0,01), Ccnb1 (p-Wert: \* < 0,05), E2f3 (p-Wert: \*\* < 0,01), Pdk3 (p-Wert: \*\* < 0,01) und Runx1 (p-Wert: \* < 0,05). Die qRT-PCR Analysen der WT Tiere zeigte hingegen keine deutlichen Unterschiede zwischen UO126 behandelten und unbehandelten Tieren. Unvoreingenommene GSEA Analysen ergaben zudem in dKO Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion eine Aktivierung von Prozessen im Zusammenhang mit Zellzyklus und Zellteilung. Diese Hochregulation von Genen konnte durch eine zusätzliche Behandlung mit UO126 oder einer zusätzlichen Deletion von Osmr (tKO (OR)) normalisiert werden. Eine zusätzliche Deletion von Fgfr1 hingegen konnte die Hochregulation der Gene nur partiell normalisieren (Abbildung 13 A + B). Um die Transkriptomanalysen zu validieren und zu überprüfen ob die Zellzyklus assoziierten Gene ausschließlich in Kardiomyozyten hochreguliert sind, wurden zunächst adulte Maus Kardiomyozyten isoliert und mittels qRT-PCR mit Nicht-Kardiomyozyten aus dem Herzen vergleichen. Die qRT-PCR Analysen zeigten eine deutliche Erhöhung der Expression von Ccnd2 (p-Wert: \*\* < 0,01), E2f1 (p-Wert: \* < 0,05), E2f3 (p-Wert: \* < 0,05), Ccna2 (p-Wert: \*\* < 0,01), Ccnb1 (p-Wert: \* < 0,05), Cdk1 (p-Wert: \* < 0,05) und Anln (p-Wert: 0,059) in dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten (ungepaarter einseitiger t-Test; Abbildung 38 im Anhang). In Nicht-Kardiomyozyten war die Expression von Ccnd2 und E2f3 in dKO Nicht-Kardiomyozyten und WT Nicht-Kardiomyozyten vergleichbar. Jedoch war die Expression von E2f1 (p-Wert: \* < 0,05), Ccna2 (p-Wert: \* < 0,05), Ccnb1 (p-Wert: \*\* < 0,01), Cdk1 (p-Wert: \*\* < 0,01) und Anln (p-Wert: \* < 0,05) in Nicht-Kardiomyozyten aus dKO Herzen im Vergleich zu WT Nicht-Kardiomyozyten signifikant verringert.

Diese Ergebnisse unterstützten die Transkriptomanalysen und deuteten darauf hin, dass die erhöhte Zellzyklusaktivität spezifisch auf Kardiomyozyten zurück zu führen ist.

Durch immunhistochemische Färbungen sollten die vorangegangenen Erkenntnisse veranschaulicht und unterstützt werden. Zu diesem Zweck wurde 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) ein Analog von Thymidin (Chehrehasa, Meedeniya et al. 2009) verwendet. Hierfür wurde den Versuchstieren zwei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion an sieben aufeinanderfol-

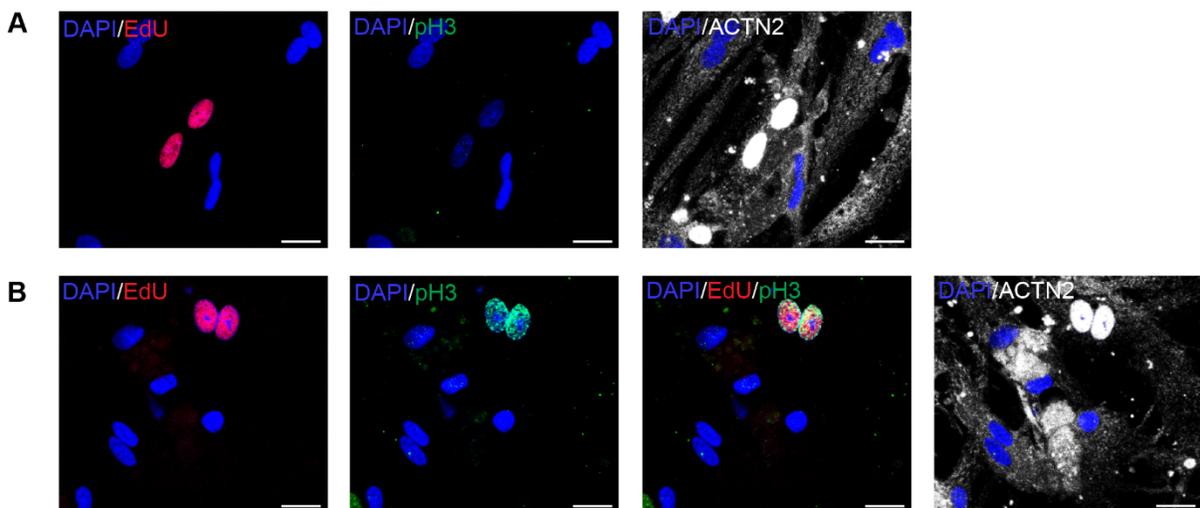
genden Tagen EdU injiziert. Die EdU Injektion führte im Falle einer DNA-Synthese zu EdU positiven (EdU<sup>+</sup>) Kardiomyozyten. Die immunhistochemischen Untersuchungen der isolierten Kardiomyozyten konnten in dKO Tieren, jedoch nicht in WT Tieren, EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten nachweisen (*one-way* ANOVA; p-Wert (dKO vs. Wildtyp): ### < 0,001; Abbildung 13 C + D). EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten konnten auch in tKO (OR) und tKO (FR1) Tieren nachgewiesen werden. Jedoch war in tKO (OR) Tieren die Menge an EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten im Vergleich zu dKO Kardiomyozyten signifikant verringert (*one-way* ANOVA; p-Wert (dKO vs. tKO (OR)): \* < 0,05), während die Menge an EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten in tKO (FR1) Tieren verglichen mit dKO Tieren nur leicht verringert war. Diese Ergebnisse stimmen mit den Transkriptomanalysen überein und unterstützen die Annahme, dass eine zusätzliche Deletion von *Osmr* eine Normalisierung der Zellzyklus assoziierten Gene zur Folge hat, während eine zusätzliche Deletion von *Fgfr1* nur eine partielle Auswirkung auf Zellzyklus assoziierte Gene hat.



**Abbildung 13 – Eine erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* führt zu einem Zellzykluseintritt adulter Kardiomyozyten.**

(A + B) In einer GSEA (broadinstitute.org) signifikant veränderte Gensets von Microarray Daten aus adulten Mausherzen 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigen eine Anreicherung von Genen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen die mit dem Phasenübergang des Zellzyklus (A) und der Zellteilung (B) zusammenhängen (n = 3 pro Gruppe; rot = Angereichert in dKO Herzen; blau = Angereichert in Wildtyp Herzen). Eine Behandlung mit UO126 (dKO + UO) oder eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisiert die Expression von hochregulierten Genen (n = 3 pro Gruppe). Die 10 am stärksten hochregulierten Gene sind neben der dazugehörigen GSEA dargestellt und zeigen die Hochregulation (rot; Fold Change (FC) > 1) der Gene in dKO Herzen die durch eine zusätzliche UO126 Zugabe oder Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* normalisiert wird (blau; Fold Change (FC) < 1). (C) Repräsentative Bilder einer Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und aufgenommen von Dr. Johannes Besser mit DAPI (blau), cTNT (grün) und EdU (rot) von isolierten adulten Doppelknockout Maus Kardiomyozyten 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion und 7 tägiger EdU Injektion eine Woche vor der Isolation. Die isolierten Maus Kardiomyozyten weisen EdU<sup>+</sup> Kerne und unterschiedliche Grade von Dedifferenzierung auf. Maßstabsbalken = 20 µm. (D) Quantifizierung der in (C) repräsentativ dargestellten Färbung (Wildtyp: n = 13; dKO: n = 10; tKO (OR): n = 14; tKO (FR1): n = 11; Mittelwert ± SEM; one-way ANOVA; p-Wert (dKO vs. Wildtyp): ### < 0,001; p-Wert (tKO (FR1) vs. Wildtyp): ## < 0,01; p-Wert (dKO vs. tKO (OR)): \* < 0,05; p-Werte (tKO (OR) vs. Wildtyp; dKO vs. tKO (FR1)): > 0,05, nicht signifikant). Der Einbau von EdU konnte sowohl in dKO Kardiomyozyten nachgewiesen werden, als auch in tKO (OR) oder tKO (FR1) Kardiomyozyten. Wildtyp Kardiomyozyten wiesen keinen EdU Einbau auf.

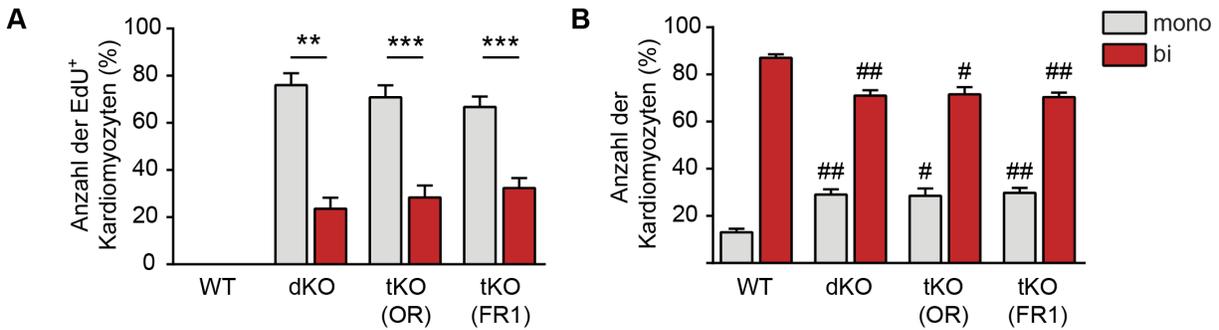
Um herauszufinden ob die Zellzyklusaktivität von adulten Kardiomyozyten mit der Aktivierung der OSMR und FGFR Signalwege zusammenhängt, wurde zusätzlich zu den *in vivo* Experimenten in Bezug auf die Zellzyklusaktivität von adulten Maus Kardiomyozyten auch *in vitro* Untersuchungen in isolierten adulten Ratten Kardiomyozyten durchgeführt. Hierfür wurden adulte isolierte Ratten Kardiomyozyten für sieben Tage mit OSM +FGF2 behandelt und mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert. Die Analysen ergaben, dass eine Stimulation mit OSM+FGF2 ebenfalls zu EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten führt (Abbildung 14). Zudem konnte in einigen EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten auch Co-Färbungen von EdU und pH3 nachgewiesen werden, was eine Zellzyklusaktivität von adulten Kardiomyozyten, mit einer OSM+FGF2 Überexpression, untermauerte.



**Abbildung 14 – *In vitro* Stimulation von adulten Ratten Kardiomyozyten mit OSM+FGF2 führt zu EdU<sup>+</sup> und pH3<sup>+</sup> Kernen.**

(A + B) Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI (blau), ACTN2 (weiß); EdU (rot) und pH3 (grün) von isolierten adulten Ratten Kardiomyozyten 7 Tage nach OSM+FGF2 Stimulation zeigen sowohl EdU<sup>+</sup> Kerne (A) als auch Kerne mit einer Co-Färbung von EdU und pH3 (B). Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m.

Im Zuge der Untersuchung von EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten wiesen mononukleären Kardiomyozyten sowohl im dKO (p-Wert: \*\* < 0,01), als auch im tKO (OR) (p-Wert: \*\*\* < 0,001) und tKO (FR1) (p-Wert: \*\*\* < 0,001) die Mehrheit der EdU<sup>+</sup> Kerne auf (zweiseitiger ungepaarter t-Test; Abbildung 15 A). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte auch ein signifikanter Anstieg von ca. 10 % an mononukleären Kardiomyozyten in dKO (p-Wert (dKO vs. WT): ## < 0,01), tKO (OR) (p-Wert (tKO (OR) vs. WT): # < 0,05) und tKO (FR1) (p-Wert (tKO (FR1) vs. WT): ## < 0,01) Herzen festgestellt werden (ungepaarter zweiseitiger t-Test; Abbildung 15 B). Zusammenfassend zeigen die Experimente einen Anstieg an Zellzyklusaktivität von adulten Kardiomyozyten nach Verlust von miR-1/133a. Diese war verbunden mit einer erhöhten Expression des Cytokinese Markers Anilin (Straight, Field et al. 2005) in adulten Kardiomyozyten und dem signifikanten Anstieg von mononukleären Kardiomyozyten was darauf hindeuten könnte, dass die erhöhte Zellzyklusaktivität auch mit einer anschließenden Cytokinese verbunden ist. Jedoch konnte *in vitro* keine Proliferation von isolierten adulten Kardiomyozyten beobachtet werden.



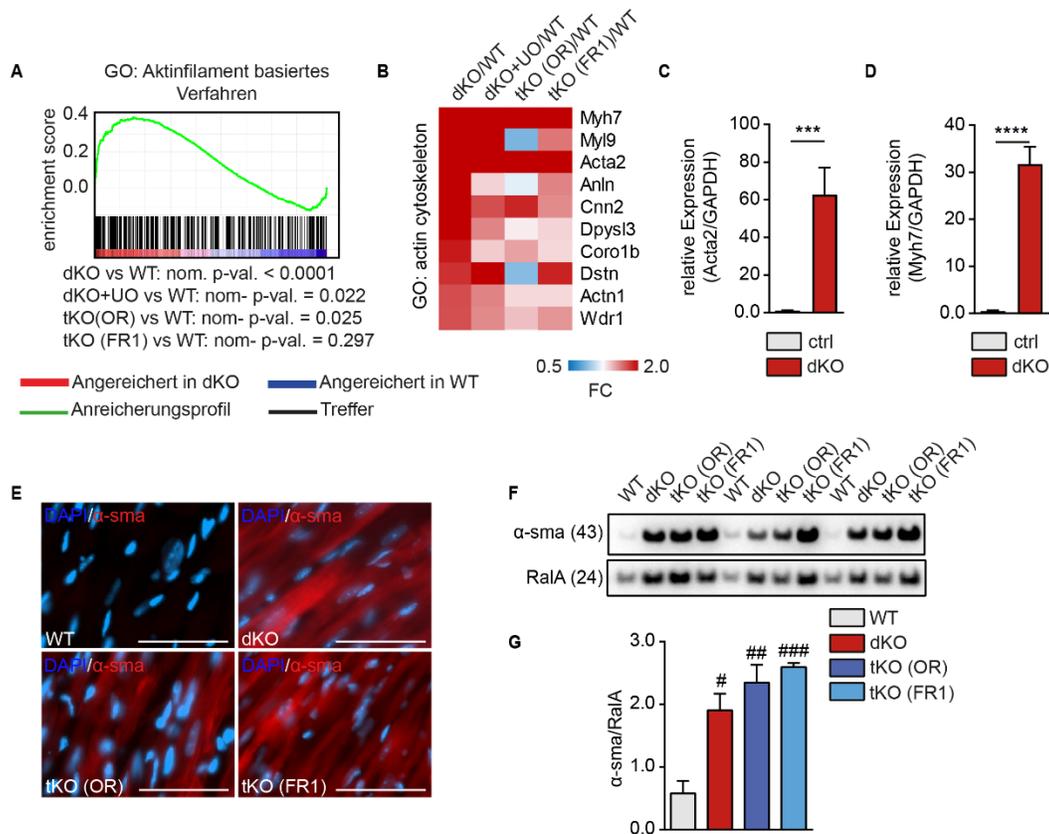
**Abbildung 15 – Der Doppelknockout von miR-1/133a führt zu einem Anstieg von mononukleären Kardiomyozyten.**

(A) Analyse des EdU-Einbaus in mono- und binukleären isolierten Maus Kardiomyozyten *in vivo* 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion und 7 tägiger EdU Injektion. Der Einbau von EdU ist in mononukleären verglichen mit binukleären Kardiomyozyten erhöht (Wildtyp: n = 3; dKO: n = 3; tKO (OR): n = 5; tKO (FR1): n = 4; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (dKO): \*\*\* < 0,001; p-Werte (tKO (OR); tKO (FR1)): \*\*\* < 0,0001). (B) Eine Quantifizierung von mono- und binukleären Maus Kardiomyozyten *in vivo* 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion weist im Vergleich zu WT Kardiomyozyten eine Zunahme von mononukleären Kardiomyozyten in dKO, tKO (OR) und tKO (FR1) auf (WT: n = 3; dKO: n = 3; tKO (OR): n = 5; tKO (FR1): n = 4; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte (dKO vs. WT, tKO (FR1) vs. WT): ## < 0,01; p-Wert (tKO (OR) vs Wildtyp): # < 0,05).

### 3.4 Die Aktivierung des Zellzyklus in adulten miR-1/133a dKO Kardiomyozyten ist mit einer Dedifferenzierung der Zellen verbunden

Da in adulten Kardiomyozyten die Proliferation durch eine Dedifferenzierung der Zellen unterstützt wird (Zhang, Li et al. 2010), wurde aufbauend auf vorangegangene Ergebnisse untersucht, wie sich die erhöhte Aktivität von *Osmr* und *Fgfr1* auf die Dedifferenzierung von adulten Kardiomyozyten auswirkt. Im Zuge der EdU Untersuchungen konnten in EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten aller Mauslinien oftmals Anzeichen einer Dedifferenzierung nachgewiesen werden. Dies zeichnete sich durch einen Verlust der Querstreifung und einer verminderten cTnT Färbung aus (Abbildung 13 C). Darüber hinaus konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen eine Desorganisation der Sarkomere und unscharfe Zwischenscheiben (Z-Scheiben) in dKO Herzen im Vergleich zu WT Herzen nachgewiesen werden (Abbildung 39 im Anhang). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine erhöhte Zellzyklusaktivität von dKO Kardiomyozyten mit einer ausgeprägten Dedifferenzierung von Kardiomyozyten verbunden

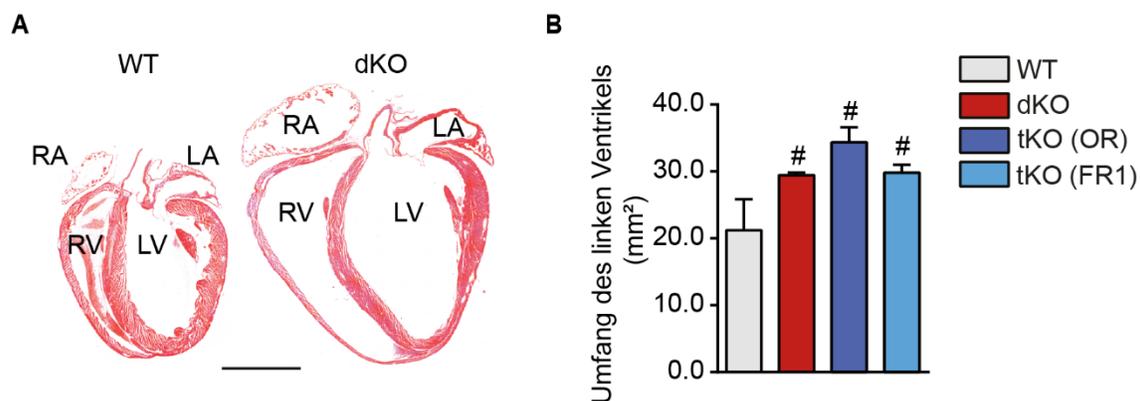
ist. Um diese Annahme genauer zu untersuchen, wurden zunächst Transkriptomanalysen durchgeführt. Unvoreingenommene GSEA Analysen ergaben in dKO Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion eine Aktivierung von Aktinfilament basierenden Prozessen, die durch eine zusätzliche Behandlung mit UO126 oder einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) nicht normalisiert wurde (Abbildung 16 A). Zudem konnte drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion in dKO Herzen im Vergleich zu WT Herzen durch Microarray-Analysen eine Hochregulation von Genen nachgewiesen werden, die mit dem Zytoskelett von Kardiomyozyten zusammenhängen und ebenfalls durch eine zusätzliche Behandlung mit UO126 oder einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) nicht normalisiert wurden (Abbildung 16 B). Eines dieser hochregulierten Gene war *ACTA2*, welches durch die MEK-ERK-Kaskade in adulten Kardiomyozyten initiiert und für gewöhnlich nur in embryonalen Kardiomyozyten exprimiert wird (Kubin, Poling et al. 2011). Neben *ACTA2* war auch die Expression von *Myh7* stark erhöht, welches vorwiegend nur während der pränatalen Entwicklung von Mäusen exprimiert wird (Guo und Pu, 2020). Zur Unterstützung der Transkriptomanalysen wurde mittels qRT-PCR Analysen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion die Expression von *ACTA2* und *Myh7* in dKO Kardiomyozyten untersucht. . Dabei konnte in dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten eine erhöhte Expression sowohl von *ACTA2* (p-Wert: \*\*\* < 0,001), als auch von *Myh7* (p-Wert: \*\*\*\* < 0,0001) nachgewiesen werden (einseitiger ungepaarter t-Test; Abbildung 16 C + D). Die erhöhte Expression von *ACTA2* in dKO Tieren im Vergleich zu WT Tieren konnte weiterhin mit Immunfluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten des Herzens 50 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion (Abbildung 16 E) und mittels Western Blot Analysen in Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion nachgewiesen werden (Abbildung 16 F + G). Eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO(OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) hatte dabei sowohl in den immunhistochemischen Färbungen, als auch in den Western Blot Analysen keine Auswirkung auf die erhöhte Expression von *ACTA2* ( $\alpha$ -sma (43 kDA); ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (dKO vs. WT): # < 0,05; p-Wert: (tKO (OR) vs. WT): ## < 0,01; p-Wert (tKO (FR1) vs. WT): ### < 0,001).



**Abbildung 16 – Die erhöhte Zellzyklusaktivität der adulten Doppelknockout Kardiomyozyten ist mit Dedifferenzierung verbunden.**

(A) In einer GSEA (broadinstitute.org) signifikant verändertes Genset von Microarray Daten aus adulten Mauserherzen 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt eine Anreicherung von Genen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen die in Zusammenhang mit Aktinfilament basierenden Prozessen stehen ( $n = 3$  pro Gruppe; rot = Angereichert in dKO Herzen; blau = Angereichert in Wildtyp Herzen). Eine Anreicherung dieser Gene kann auch in UO126 behandelten dKO Herzen (dKO + UO126), in tKO (OR) und tKO (FR1) Herzen beobachtet werden. (B) Die 10 am stärksten hochregulierten Gene der in (A) dargestellten GSEA zeigt weder in UO126 behandelten dKO Herzen, noch in tKO (OR) und tKO (FR1) Herzen eine Normalisierung der in den dKO Herzen erhöhten Genexpression ( $n = 3$  pro Gruppe). (C + D) RT-PCR Analyse der Expression von Acta2 und Myh7 in isolierten adulten Wildtyp Kardiomyozyten und dKO Kardiomyozyten 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt eine erhöhte Expression von Acta2 und Myh7 in dKO Kardiomyozyten verglichen mit Wildtyp Kardiomyozyten (Wildtyp:  $n = 10$ ; dKO:  $n = 8$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM; einseitiger ungepaarter t-Test; p-Wert (Acta2): \*\*\* < 0,001; p-Wert (Myh7): \*\*\*\* < 0,0001). (E) Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI (blau) und  $\alpha$ -SMA (rot) in Gewebeschnitten aus adulten Wildtyp Herzen, dKO Herzen, tKO (OR) Herzen und tKO (FR1) Herzen 50 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt verglichen mit Wildtyp Herzen eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -SMA in dKO, tKO (OR) und tKO (FR1) Herzen (Wildtyp:  $n = 2$ ; dKO:  $n = 2$ ; tKO (OR):  $n = 5$ ; tKO (FR1):  $n = 5$ ). Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m. (F + G) Die erhöhte Expression von  $\alpha$ -SMA in dKO, tKO (OR) und tKO (FR1) Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen kann mit einer Western Blot Analyse nachgewiesen werden ( $n = 3$  pro Gruppe; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (dKO vs. Wildtyp): # < 0,05; p-Wert (tKO (OR) vs. Wildtyp): ## < 0,01; p-Wert (tKO (FR1) vs. Wildtyp): ### < 0,001).

Eine dauerhaft erhöhte Expression von Genen wie beispielsweise ACTA2, das vorwiegend in glatter Muskulatur oder in embryonalen Kardiomyozyten exprimiert wird, oder Myh7, welches vorwiegend während der pränatalen Entwicklung von Mäusen exprimiert ist, kann sich nachteilig auf die Kontraktilität des Herzens auswirken. Daher wurden die physiologischen Folgen einer Langzeit-Inaktivierung von miR-1/133a im Herzen untersucht. Für diesen Zweck wurden Herzen 50 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion mittels HE-Färbung untersucht und mit Hilfe von Fiji analysiert. Obwohl eine Tamoxifen induzierte Deletion von miR-1/133a kurz nach den Injektionen keinen offensichtlichen klinischen Phänotyp aufwies, konnte jedoch 50 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion eine deutliche Veränderung der dKO Herzen festgestellt werden (Abbildung 17).



**Abbildung 17 – Eine langanhaltende Dedifferenzierung von Kardiomyozyten hat eine dilatative Kardiomyopathie zur Folge.**

(A + B) Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung von dKO Herzen und Wildtyp Herzen 50 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion. Ein dauerhafter Knockout von miR-1/133a führt zu einer dilatativen Kardiomyopathie. Maßstabsbalken = 2 mm. (A), welche durch einen zusätzlichen Knockout von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) nicht verhindert werden kann (B; n = 3 pro Gruppe; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte (dKO vs. Wildtyp; tKO (OR) vs. Wildtyp; tKO (FR1) vs. Wildtyp): # < 0,05).

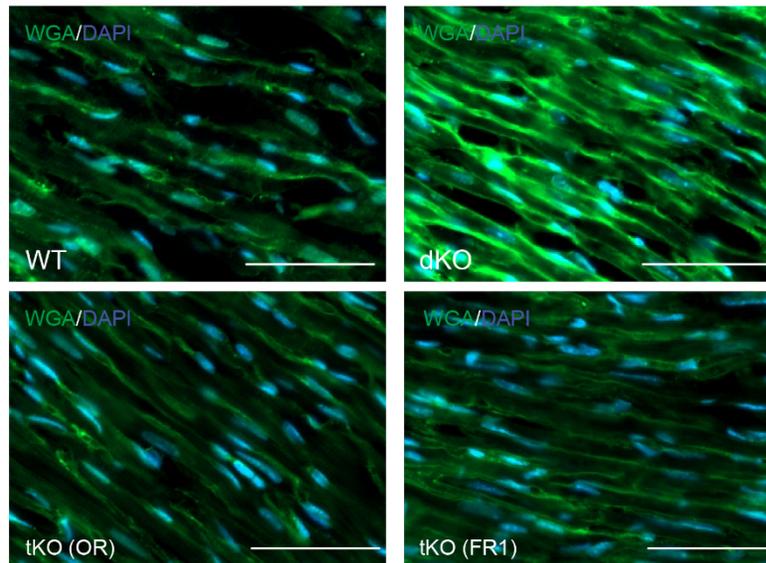
Eine Langzeit-Inaktivierung von miR-1/133a führte in dKO Herzen im Vergleich zu WT Herzen zu einer massiven Vergrößerung der Ventrikel und Atrien sowie eine Ausdünnung der Ventrikelwände (ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert:  $\# < 0,05$ ). Eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (p-Wert (tKO (OR) vs. WT):  $\# < 0,05$ ) oder *Fgfr1* (p-Wert (tKO (FR1) vs. WT):  $\# < 0,05$ ) hatte dabei keinerlei Auswirkungen auf die dilatativen Veränderungen (ungepaarter zweiseitiger t-Test).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine Repression von *Osmr* und *Fgfr1* durch miR-1/133a mit einer Inhibierung der Dedifferenzierung von adulten Kardiomyozyten verbunden ist. Dabei führt der Verlust von miR-1/133a zu einer erhöhten Expression von Genen die vorwiegend in glatter Muskulatur oder in embryonalen Kardiomyozyten exprimiert sind. Diese erhöhten Expressionen können weder durch eine zusätzliche Behandlung mit UO126, noch durch eine zusätzliche Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* normalisiert werden. Weiterhin war die Dedifferenzierung von dKO Kardiomyozyten über längere Zeit hinweg mit einer dilatativen Kardiomyopathie verbunden, was zu der Annahme führt, dass miR-1/133a eine essenzielle Rolle für die Aufrechterhaltung eines differenzierten Zustands von Kardiomyozyten spielt, der wiederum für die Verhinderung einer Herzinsuffizienz entscheidend ist.

### **3.5 Eine erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* in miR-1/133a dKO Herzen verändern die Expression extrazellulärer Matrixgene**

Während der postnatalen Entwicklung des Herzens von Säugetieren verlieren Kardiomyozyten zunehmend ihre embryonalen Eigenschaften. Diese Veränderungen gehen einher mit einer Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Hortells, Johansen et al. 2019). Auf Grund der vorangegangenen Ergebnisse wurde daher zunächst mit einer WGA Färbung untersucht, ob ein Verlust von miR-1/133a mit einer Veränderung der Extrazellulären Matrix verbunden ist. Die WGA Färbungen ergaben eine erhöhte Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten in dKO Herzen im Vergleich zu WT Herzen, welche jedoch nach einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 18). Um diese Veränderungen in der extrazellulären Matrix näher zu charakterisieren wurden

Transkriptomanalysen durchgeführt. Die GO-GSEA Analysen ergaben, dass die Veränderungen der extrazellulären Matrix mit einer deutlichen Anreicherung von Genen zusammenhängt die mit der extrazellulären Matrix zusammenhängen (Abbildung 19 A). Weiterhin ergaben unvoreingenommene GSEA Analysen in dKO Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion eine Hochregulation von Genen die in Zusammenhang mit der extrazellulären Matrix stehen. Diese Hochregulation der Gene konnte durch eine zusätzliche Behandlung mit UO126 oder einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisiert werden (Abbildung 19 B).

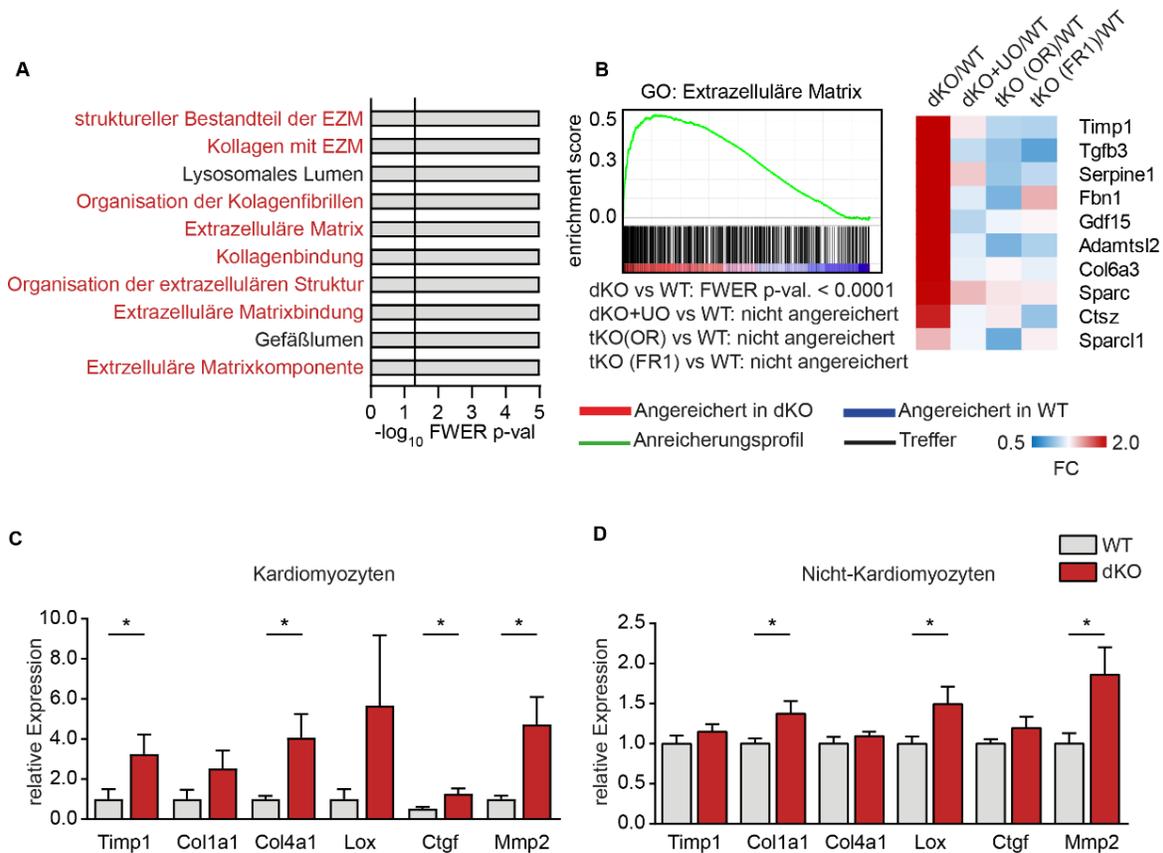


**Abbildung 18 – Die erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* in miR-1/133a Doppelknockout Herzen ist verbunden mit einer erhöhten Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten.**

Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI (blau) und WGA (grün) in Gewebeschnitten aus adulten WT Herzen, dKO Herzen, tKO (OR) Herzen und tKO (FR1) Herzen 50 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigen in dKO Herzen, im Vergleich zu WT Herzen, eine erhöhte Ablagerung der Extrazellulären Matrix. Ein zusätzlicher Knockout von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisiert diese erhöhte Ablagerung der Extrazellulären Matrix (WT: n = 2; dKO: n = 2; tKO (OR): n = 5; tKO (FR1): n = 5). Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m.

Um die Transkriptomanalysen zu validieren und zu untersuchen, ob die extrazelluläre Matrix assoziierten Gene spezifisch in Kardiomyozyten hochreguliert sind, wurden zunächst adulte Maus Kardiomyozyten isoliert und mittels qRT-PCR mit Nicht-Kardiomyozyten aus dem Herzen verglichen. Die Analysen wiesen im Vergleich zu WT Kardiomyozyten einen starken Anstieg von *Timp1* (p-Wert: \* < 0,05), *Coll1a1* (p-Wert: \* < 0,05), *Col4a1* (p-Wert: \* < 0,05), *Ctgf* (p-Wert: \* < 0,05) und *Mmp2* (p-Wert: \* < 0,05) in adulten dKO Kardiomyozyten nach (ungepaarter zweiseitiger t-Test; Abbildung 19 C). In Nicht-Kardiomyozyten aus dKO Herzen konnte hingegen nur ein vergleichbar mäßiger Anstieg der Expression von *Coll1a1* (p-Wert: \* < 0,05), *Lox* (p-Wert: \* < 0,05), und *Mmp2* (p-Wert: \* < 0,05) im Vergleich zu Nicht-Kardiomyozyten aus WT Herzen nachgewiesen werden. In Bezug auf *Timp1*, *Col4a1* und *Ctgf* konnte in Nicht-Kardiomyozyten kein Unterschied zwischen dKO und WT Herzen nachgewiesen werden (ungepaarter zweiseitiger t-Test; Abbildung 19 D).

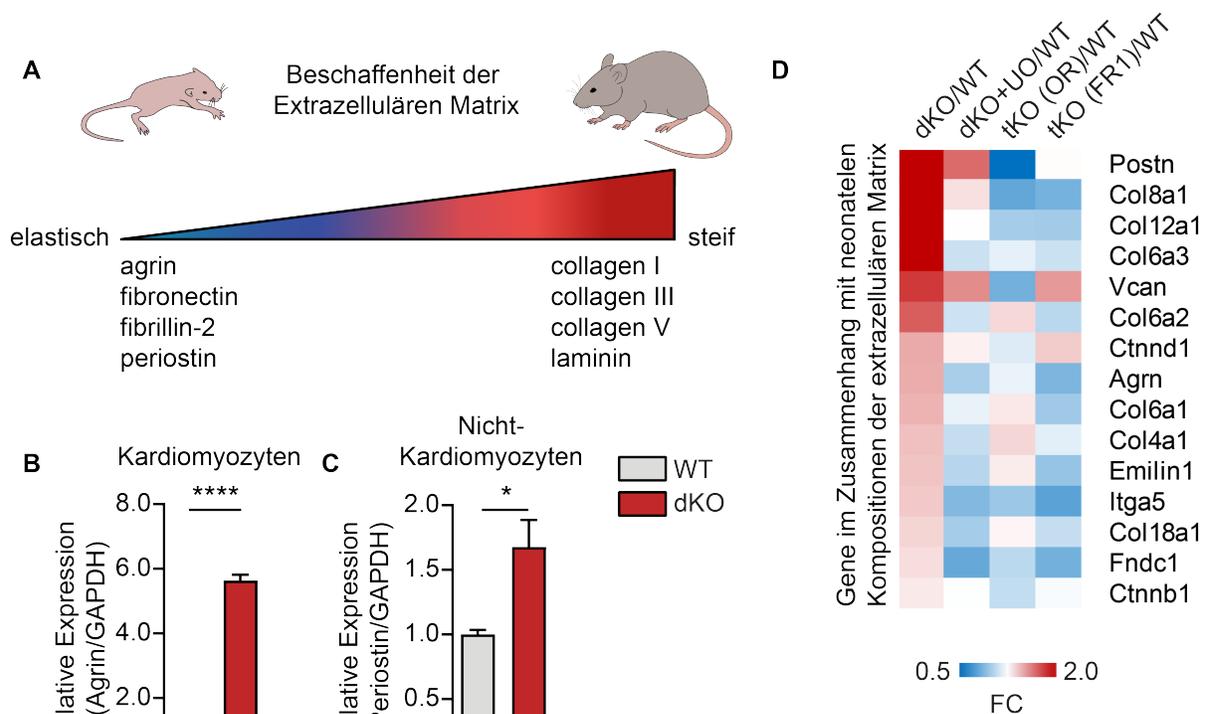
Zusammenfassend führt der Verlust von miR-1/133a und die damit verbundene erhöhte Aktivität von *Osmr* und *Fgfr1* zu einer Veränderung der Expression von extrazellulären Matrixgenen in adulten Kardiomyozyten.



**Abbildung 19 – Die erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* in miR-1/133a Doppel-knockout Herzen verändern die Expression von extrazellulären Matrixgenen.**

(A) Eine GO-GSEA Analyse (broadinstitute.org) von Microarray Daten aus adulten Mausherzen 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt die zehn am stärksten veränderten Gensets in dKO Herzen verglichen mit Wildtyp Herzen ( $n = 3$  pro Gruppe). Acht von zehn Gensets sind mit der extrazellulären Matrix assoziiert (rot). (B) Microarray basierte GSEA (broadinstitute.org) Analyse von adulten Mausherzen 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt eine Anreicherung von Genen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen die im Zusammenhang mit der extrazellulären Matrix stehen ( $n = 3$  pro Gruppe; rot = Angereichert in dKO Herzen; blau = Angereichert in Wildtyp Herzen). Eine Behandlung mit UO126 (dKO + UO) oder eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisiert die Expression von hochregulierten Genen ( $n = 3$  pro Gruppe). Die 10 am stärksten hochregulierten Gene der dargestellten GSEA zeigen die Hochregulation (rot; Fold Change (FC) > 1) der Gene in dKO Herzen die durch eine zusätzliche UO126 Zugabe oder Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* normalisiert wird (blau; Fold Change (FC) < 1). (C + D) qRT-PCR Analysen in adulten Wildtyp ( $n = 5$ ) und dKO ( $n = 4$ ) Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten (Wildtyp:  $n = 4$ ; dKO:  $n = 2-3$ ) zeigen eine erhöhte Expression von *Timp1*, *Col1a1*, *Col4a1*, *Lox* und *Mmp2* in dKO Kardiomyozyten verglichen mit Wildtyp Kardiomyozyten (Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte: \* < 0,05). Eine geringe Hochregulierung von *Col1a1*, *Lox* und *Mmp2* kann auch in dKO Nicht-Kardiomyozyten im Vergleich zu Wildtyp Nicht-Kardiomyozyten gezeigt werden (Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte: \* < 0,05). Die Zellen wurden 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion isoliert.

Neugeborene Mäuse weisen im Vergleich zu adulten Tieren eine „elastischere“ extrazelluläre Matrix auf, welche die Herzregeneration und die Proliferation von Kardiomyozyten bei Verletzungen des neonatalen Herzens unterstützt (Williams, Quinn et al. 2014). Adulte Herzen weisen hingegen eine eher „steife“ extrazelluläre Matrix auf, die auf die Differenzierung der Kardiomyozyten zurückzuführen ist (Abbildung 20 A) (Hortells, Johansen et al. 2019). Ausgehend von der Annahme, dass die extrazelluläre Matrix von dKO Herzen auf Grund der zuvor nachgewiesenen Dedifferenzierung (siehe 3.4) der Kardiomyozyten und der erhöhten Zellzyklusaktivität (siehe 3.3) ebenso eine eher neonatale Komposition aufweist, wurde zunächst die Expression von Agrin und Periostin, welche repräsentativ für eine neonatale extrazelluläre Matrix Komposition sind (Bassat, Mutlak et al. 2017, Chen, Xie et al. 2017), mittels qRT-PCR analysiert. Hierfür wurden adulte Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion isoliert. Die qRT-PCR Analysen ergaben sowohl eine erhöhte Expression von Agrin in dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten (ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert: \*\*\*\*  $< 0,0001$ ; Abbildung 20 B), als auch eine erhöhte Expression von Periostin in Nicht-Kardiomyozyten aus dKO Herzen im Vergleich zu Nicht-Kardiomyozyten aus WT Herzen (ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert: \*  $< 0,05$ ; Abbildung 20 C). Zusätzliche Transkriptomanalysen von adulten Mäuserherzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion ergaben eine Anreicherung von Genen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen die im Zusammenhang mit einer eher neonatal ähnlichen extrazellulären Matrix Komposition stehen. Eine zusätzliche Behandlung mit UO126 oder eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisierte die Expression der hochregulierten Gene in dKO Herzen (Abbildung 20 D).

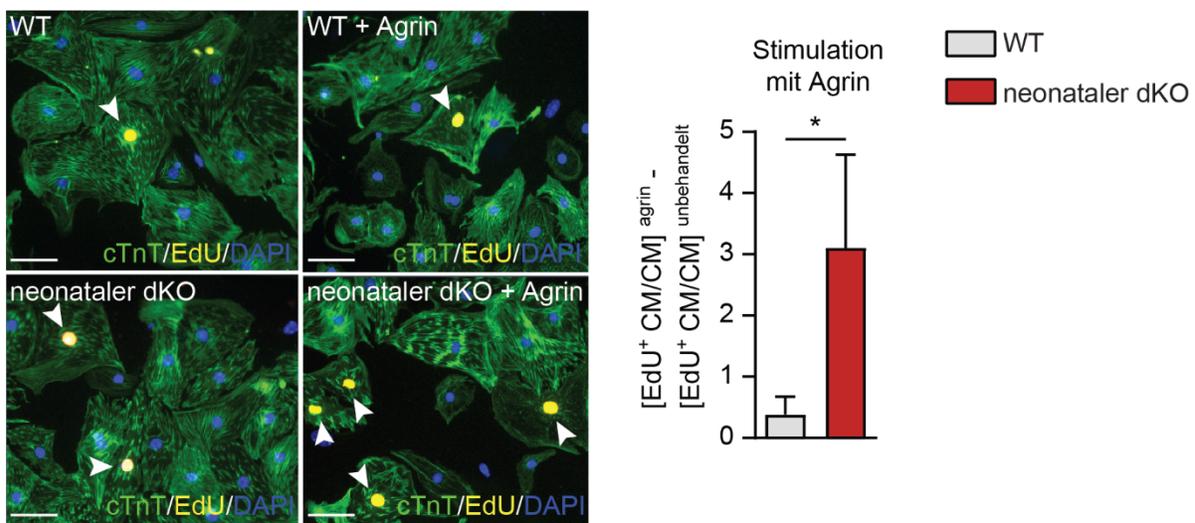


**Abbildung 20 – Der Doppelknockout von mir-1/133a in adulten Herzen führt zu einer neonatal ähnlichen Zusammensetzung der adulten extrazellulären Matrix.**

(A) Schematische Darstellung von Veränderungen der Genexpression im Herzen von neugeborenen und adulten Mäusen die die Steifigkeit der Extrazellulären Matrix beeinflussen. (B + C) qRT-PCR Analyse der erhöhten Expression von Agrin (B; Wildtyp: n = 4; dKO: n = 3; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert: \*\*\*\* < 0,0001) und Periostin (C; WT: n = 4; dKO: n = 4; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05) in isolierten Doppelknockout Kardiomyozyten und in der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion der Doppelknockout Tiere im Vergleich zum WT. Die Zellen wurden 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion isoliert. (D) Transkriptomanalysen von adulten Mauserherzen (n = 3 pro Gruppe; rot = Angereichert in dKO Herzen; blau = Angereichert in Wildtyp Herzen) 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt eine Anreicherung von Genen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen die im Zusammenhang mit einer „weichen“ Extrazellulären Matrix stehen. Eine Behandlung mit UO126 (dKO + UO126) oder eine zusätzlichen Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisiert die Expression der hochregulierten Gene im dKO.

Um zu überprüfen, ob sich der Verlust von miR-1/133a und die damit verbundene Dedifferenzierung, Veränderung der extrazellulären Matrix und der Wiedereintritt der Kardiomyozyten in den Zellzyklus positiv auf eine proliferative Behandlung auswirkt, wurden sowohl neonatale WT, als auch dKO Kardiomyozyten isoliert und mit EdU behandelt. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit Agrin behandelt um die proliferative Behandlung zu untersuchen. Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen konnten zunächst in den unbehandelten Zellen sowohl in den WT, als auch in den dKO Kardiomyozyten EdU nachgewiesen werden. Nach einer Agrin Behandlung stieg die Menge an EdU<sup>+</sup> Kardiomyozyten sowohl in den WT als auch in den dKO Kardiomyozyten an. Dabei konnte zwischen den WT und dKO Kardiomyozyten ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05; Abbildung 21).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass der Verlust von miR-1/133a sich positiv auf eine proliferative Behandlung auswirkt, wodurch dKO Kardiomyozyten empfänglicher für proliferative Signale sind.

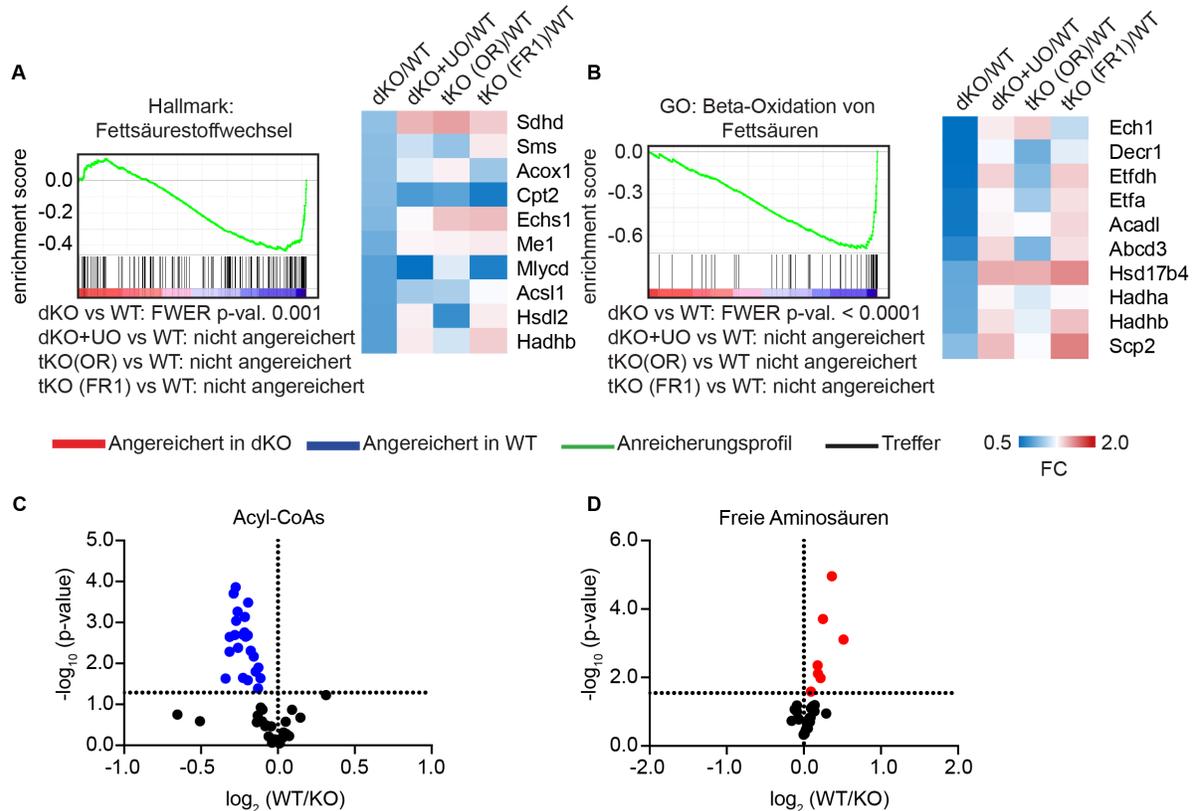


**Abbildung 21 – Der durch den Verlust von miR-1/133a ausgelöste proliferative Zustand von Kardiomyozyten macht diese empfänglicher für proliferative Signale.** Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI (blau), cTnT (grün) und EdU (gelb) von isolierten neonatalen Kardiomyozyten aus WT und dKO zeigt eine vermehrte EdU-Inkorporation in dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten. Dabei stimuliert eine Behandlung mit Agrin (100 ng/ml) die EdU-Inkorporation stärker in dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten (WT: n = 6; dKO: n = 3; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Maßstabsbalken = 30  $\mu\text{M}$ ).

### 3.6 Der Verlust von miR-1/133a im Herzen führt zu einer metabolischen Veränderung vom Fettsäurestoffwechsel zur Glykolyse

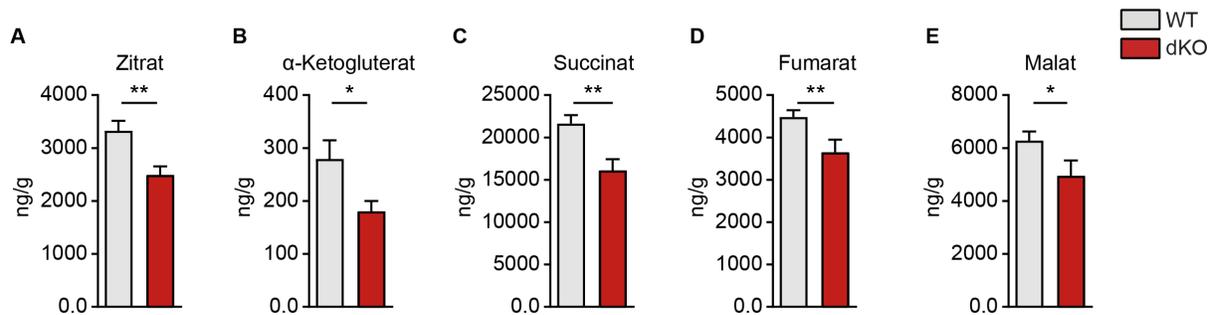
Während der Entwicklung des Herzens wechseln Kardiomyozyten vom glykolytischen Metabolismus zur oxidativen Phosphorylierung, welche mit einer verstärkten Biogenese der Mitochondrien in frühen postnatalen Stadien einhergeht (Doenst, Nguyen et al. 2013). Da die vorherigen Ergebnisse nach dem Verlust von miR-1/133a darauf hindeuten, dass adulte Kardiomyozyten ihren differenzierten Zustand nicht aufrechterhalten können und eher neonatale Eigenschaften annehmen, wurde daher aufbauend auf die vorherigen Ergebnisse untersucht, wie sich die Dedifferenzierung von adulten dKO Kardiomyozyten auf deren Metabolismus auswirkt. Zu diesem Zweck wurden zunächst unvoreingenommene GSEA Analysen und Microarray Untersuchungen durchgeführt. Die unvoreingenommene GSEA Analysen ergaben in dKO Herzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion eine Runterregulation des Fettsäurestoffwechsels und der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren. Diese Runterregulationen konnten zudem drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion in dKO Herzen im Vergleich zu WT Herzen durch Microarray-Analysen validiert werden, da diese Analysen eine Runterregulation von Genen ergaben, die mit dem Fettsäurestoffwechsel oder der  $\beta$ -Oxidation zusammenhängen. Eine zusätzliche Behandlung mit UO126, oder eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)), normalisierte die Runterregulation der Gene (Abbildung 22 A + B). Weitere Metabolomanalysen von dKO und WT Herzen eine Woche nach der ersten Tamoxifen Injektion, welche von Dr. Sven Zukunft in Frankfurt durchgeführt wurden, stützten unter anderem die Ergebnisse der Transkriptomanalyse und ergab eine Herunterregulierung des Fettsäurestoffwechsels mit einer massiv reduzierten Menge an Acyl-CoA-Konzentrationen in dKO Herzen im Vergleich zu WT Herzen (Abbildung 22 C). Neben der massiv reduzierten Menge an Acyl-CoA-Konzentrationen konnte im Zuge der Metabolomanalysen im Gegensatz dazu ein signifikanter Anstieg einiger freier Aminosäuren (Asparagine (Asn), p-Wert: \*\* < 0,01; Proline-hydroxyproline (PHP), p-Wert: \*\*\* < 0,001; Theanine (THE), p-Wert: \* < 0,05; 1-Methyl-histidine (1MHIS), p-Wert: \*\*\* < 0,001; Glycine-proline (GPR), p-Wert: \*\*\*\* < 0,0001; Proline (Pro), \*\* < 0,01; Tyrosine (Tyr), p-Wert: \*\* < 0,01; ungepaarter einseitiger

t-Test) in dKO Herzen im Vergleich zu WT Herzen nachgewiesen werden, welcher vermutlich auf die verringerte  $\beta$ -Oxidation in dKO Herzen zurückzuführen ist (Abbildung 22 D).



**Abbildung 22 – Die miR-1/133a Doppelknockout Herzen weisen einen runterregulierten Fettsäurestoffwechsel und einen Anstieg der Konzentration von freien Aminosäuren auf.** (A + B) In einer GSEA (broadinstitute.org) signifikant verändertes Genset von Microarray Daten aus adulten Mauser Herzen ( $n = 3$  pro Gruppe; rot = Angereichert in dKO Herzen; blau = Angereichert in Wildtyp Herzen) 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt eine Runterregulierung von Genen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen die mit dem Fettsäurestoffwechsel zusammenhängen. Eine Behandlung mit UO126 (dKO + UO) oder eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisiert die Expression der runtergeregelten Gene ( $n = 3$  pro Gruppe). Die 10 am stärksten runtergeregelten Gene sind neben der dazugehörigen GSEA dargestellt und zeigen die Runterregulierung (blau; Fold Change (FC) < 1) der Gene in dKO Herzen die durch eine zusätzliche UO126 Zugabe oder Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) partiell normalisiert wird (rot; Fold Change (FC) > 1). (C + D) Volcano Plot der metabolomischen Analysen von dKO Herzen ( $n = 9$ ) im Vergleich zu Wildtyp Herzen ( $n = 12$ ) 1 Woche nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigen einen signifikanten Rückgang von Acyl-CoA (C) und einen Anstieg der Konzentration an freien Aminosäuren (D). Dargestellt ist das Verhältnis ( $\log_2$ ) der Metabolitkonzentrationen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen und der entsprechende p-Wert ( $-\log_{10}$ ).

Da sowohl Acyl-CoAs, als auch freie Aminosäuren eine wichtige Rolle im Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) spielen, wurde auch die Auswirkung des Verlustes von miR-1/133a auf den TCA-Zyklus mittels Metabolomanalysen untersucht. Die Analysen ergaben eine signifikante Abnahme aller messbaren Metabolite des TCA-Zyklus. Darin inbegriffen waren Citrat (p-Wert:  $** < 0,01$ ),  $\alpha$ -Ketoglutarat (p-Wert:  $* < 0,05$ ), Succinat (p-Wert:  $** < 0,01$ ), Fumarat (p-Wert:  $** < 0,01$ ) und Malat (p-Wert:  $* < 0,05$ ; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Abbildung 23).

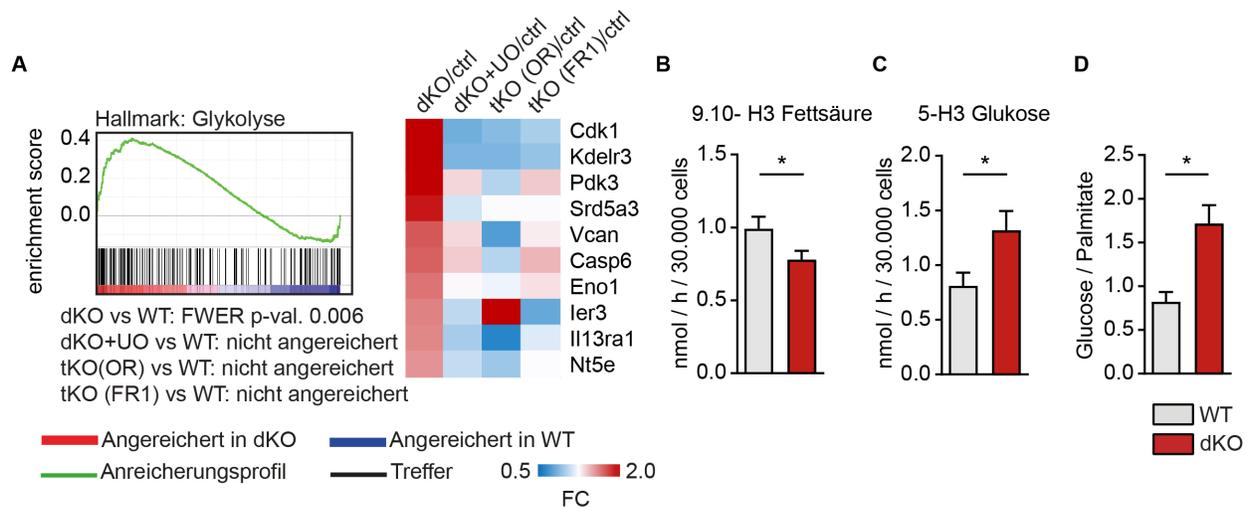


**Abbildung 23 – Der miR-1/133a Doppelknockout im Herzen führt zu einer Abnahme von Metaboliten des Tricarbonsäurezyklus.**

(A - E) Metabolomische Analysen von dKO Herzen ( $n = 9$ ) im Vergleich zu Wildtyp Herzen ( $n = 12$ ) 1 Woche nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigen in dKO Herzen eine signifikant verminderte Konzentration von Metaboliten die am Zitratzyklus beteiligt sind (WT:  $n = 12$ ; dKO:  $n = 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte (Zitrat; Succinat; Fumarat):  $** < 0,01$ ; P-Werte ( $\alpha$ -Ketoglutarat; Malat):  $* < 0,05$ ).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Verlust von miR-1/133a in dKO Herzen zu einer allgemeinen Verringerung der Stoffwechselprozesse führt.

Um herauszufinden, ob und wie sich ein Verlust von miR-1/133a in adulten dKO Herzen, neben dem Fettsäurestoffwechsel und dem TCA-Zyklus, auch auf die Glykolyse auswirkt wurden GSEA Analysen durchgeführt. Die Analysen ergaben eine Anreicherung von Genen in dKO Herzen im Vergleich zu WT Herzen die mit der Glykolyse zusammenhängen. Zusätzliche Transkriptomanalysen von adulten Mausherzen drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion ergaben eine Hochregulation von Genen in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen, die bei der Glykolyse eine Rolle spielen. Eine zusätzliche Behandlung mit UO126 oder eine zusätzlichen Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisierte die Expression der hochregulierten Gene in dKO Herzen (Abbildung 24 A). Diese Ergebnisse deuteten auf eine Verschiebung des Metabolismus der adulten Kardiomyozyten von der Fettsäureoxidation hin zur Glykolyse. Um diese Annahme zu validieren wurde der Kardiomyozytenstoffwechsel durch direkte Messung des Verbrauches von Fettsäuren und Glukose von isolierten Kardiomyozyten mit Hilfe von Fettsäure-Oxidations-Assays und Glukose-Oxidations-Assays untersucht. Hierfür wurden WT und dKO Tiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen injiziert. Vier Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion wurden die adulten Kardiomyozyten isoliert. Die isolierten Kardiomyozyten wurden dann in einem Medium inkubiert, das entweder Tritium markiertes Palmitat (9.10-H3 Fettsäure), oder Tritium markierte Glukose (5-H3 Glukose) enthielt. Dies ermöglichte Rückschlüsse auf die oxidative und glykolytische Aktivität der isolierten Kardiomyozyten. Die Untersuchungen ergaben eine Abnahme der Oxidation von Fettsäuren in dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05), welche die vorangegangenen Transkriptom- und Metabolomanalysen bestätigte (Abbildung 24 B). Zudem konnte verglichen mit isolierten WT Kardiomyozyten eine Zunahme der glykolytischen Aktivität in isolierten dKO Kardiomyozyten (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05) nachgewiesen werden (Abbildung 24 C), welches durch ein erhöhtes Glukose-Fettsäureoxidations Verhältnis untermauert wird (Abbildung 24 D).



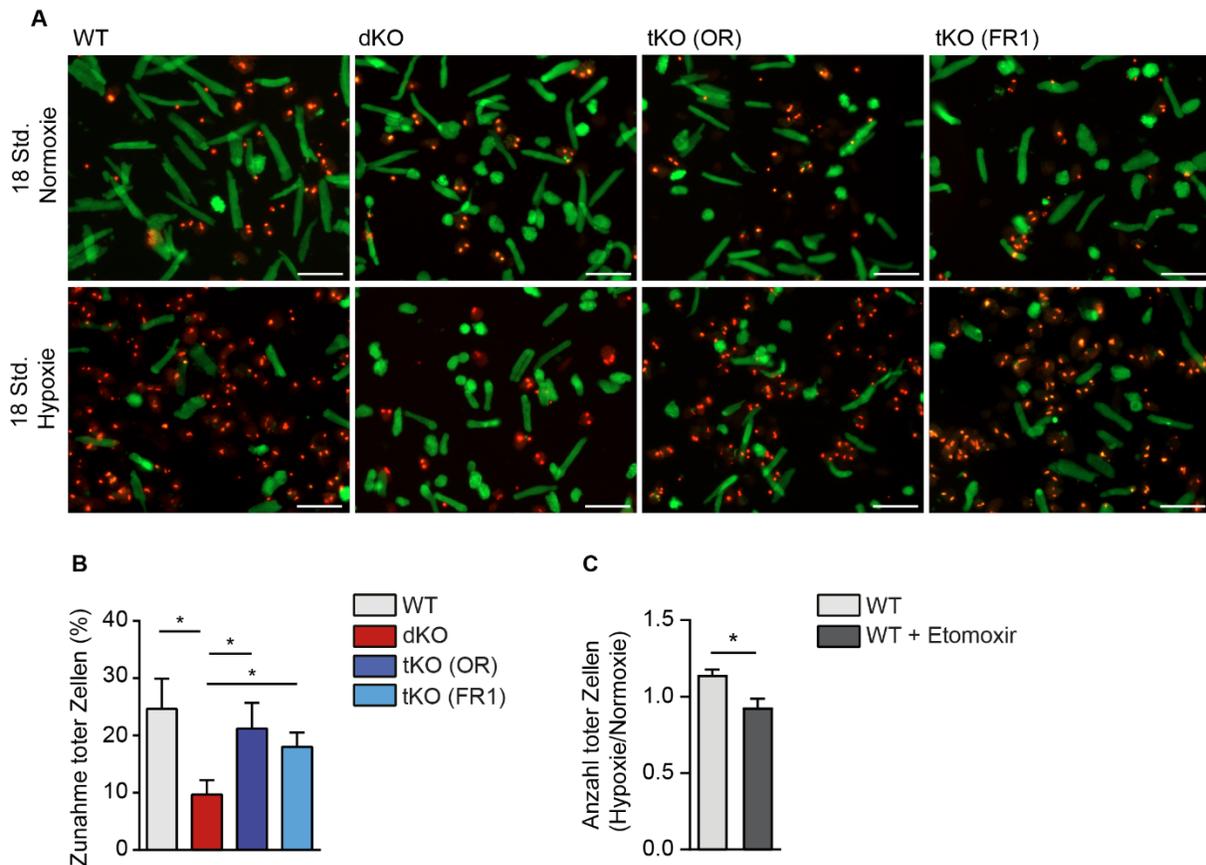
**Abbildung 24 – Die Abnahme der Fettsäureoxidation in miR-1/133a Doppelknockout Herzen ist mit einer erhöhten Glykolyse verbunden.**

(A) Microarray basierte GSEA (broadinstitute.org) Analyse von adulten Mausherzen ( $n = 3$  pro Gruppe; rot = Angereichert in dKO Herzen; blau = Angereichert in Wildtyp Herzen) 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt in dKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen eine Anreicherung von Genen die mit der Glykolyse zusammenhängen. Die 10 am stärksten hochregulierten Gene der dargestellten GSEA zeigen die Hochregulation (rot; Fold Change (FC)  $> 1$ ) der Gene in dKO Herzen die durch eine zusätzliche UO126 Zugabe (dKO + UO126), oder Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) normalisiert wird (blau; Fold Change (FC)  $< 1$ ). (B - D) Oxidations-Assays mit Kardiomyozyten die 4 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion isoliert wurden (Fettsäure-Oxidations-Assay (B); Glukose-Oxidations-Assay (C)) weisen eine verringerte Fettsäureoxidation (B; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert:  $* < 0,05$ ) aber eine erhöhte Glykolyse (C; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert:  $* < 0,05$ ) in dKO Kardiomyozyten ( $n = 10$ ) im Vergleich zu Wildtyp Kardiomyozyten ( $n = 8$ ) auf, was durch ein erhöhtes Glukose/Fettsäureoxidation Verhältnis bestätigt wird (D; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert:  $* < 0,05$ ).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine allgemeine Verringerung der Stoffwechselprozesse in adulten Kardiomyozyten nach Verlust von miR-1/133a hin. Dazu konnte eine Verschiebung des Metabolismus der adulten Kardiomyozyten von der Fettsäureoxidation hin zur Glykolyse verzeichnet werden, was zu der Annahme führt, dass ein Verlust von miR-1/133a in adulten Kardiomyozyten einen eher neonatalen Metabolismus zur Folge hat.

### 3.7 miR-1/133a dKO Kardiomyozyten haben eine erhöhte Resistenz gegenüber hypoxischen Bedingungen

Metabolische Veränderungen von adulten Kardiomyozyten, vom Fettsäurestoffwechsel hin zur Glykolyse führt zu der Annahme, dass adulte dKO Kardiomyozyten auf Grund der verminderten sauerstoffverbrauchenden oxidativen Phosphorylierung eine vermeintlich höhere Hypoxieresistenz aufweisen. Diese Annahme wird zum einen durch eine verringerte Expression kontraktiler Gene und zum anderen durch die vorangegangenen Ergebnissen bezüglich der Kompositionsveränderungen von dKO Kardiomyozyten von adult zu eher neonatal unterstützt. Um diese Annahme zu untersuchen wurde den Tieren an drei aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen injiziert und vier Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion wurden die adulten Kardiomyozyten isoliert. Die isolierten Kardiomyozyten wurden dann für 18 Std. normoxischen oder hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (1 % O<sub>2</sub>) und die Überlebensrate anschließend mit Hilfe einer Lebend-Tod-Färbung analysiert. Die Analysen ergaben unter normoxischen Bedingungen keinerlei auffällige Unterschiede zwischen den einzelnen Mauslinien. Jedoch konnte unter hypoxischen Bedingungen signifikante Unterschiede in der Anzahl von toten Kardiomyozyten verzeichnet werden (Abbildung 25 A + B). Nach 18 Std. Hypoxie konnten in dKO's im Vergleich zu normoxischen Bedingungen rund 10 % mehr tote Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Im WT hingegen konnten nach 18 Std. Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Bedingungen rund 24 % tote Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Somit wiesen dKO Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen rund 50 % weniger tote Kardiomyozyten auf und damit eine signifikant erhöhte Zellviabilität im Vergleich zu WT Kardiomyozyten (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05). Eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) revertierten die vorteilhafte Auswirkung des Verlustes von miR-1/133a in dKO Kardiomyozyten und wiesen im Vergleich zu dKO Kardiomyozyten eine signifikant erhöhte Anzahl toter Kardiomyozyten auf (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: (tKO (OR) vs. dKO): \* < 0,05; p-Wert (tKO (FR1) vs. dKO): \* < 0,05), und somit eine geringere Zellviabilität unter hypoxischen Bedingungen.



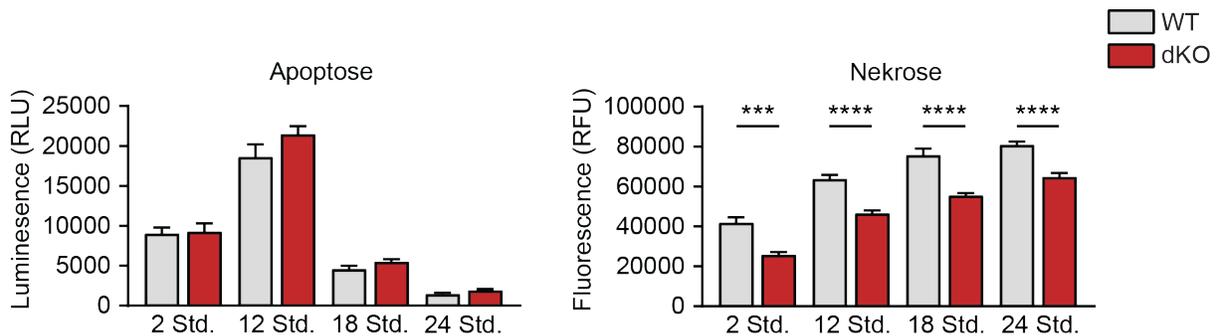
**Abbildung 25 – Der Verlust von miR-1/133a in adulten Kardiomyozyten führt zu einer erhöhten Resistenz der Doppelknockout Kardiomyozyten gegenüber hypoxischen Bedingungen.**

(A) Assay zur Untersuchung der Zellviabilität von adulten dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu Wildtyp Kardiomyozyten unter Normoxie und Hypoxie (18 Std.; 1 % O<sub>2</sub>). Die Kardiomyozyten wurden 4 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion isoliert. Nach 18 Std. Hypoxie weisen dKO Kardiomyozyten eine erhöhte Viabilität (grün) auf. Im Vergleich dazu weisen Wildtyp Kardiomyozyten eine erhöhte Menge von toten Zellen auf (rot). (B) Die Quantifizierung der Untersuchung der Zellviabilität nach 18 Std. Hypoxie zeigt eine geringere Menge an toten dKO Kardiomyozyten (n = 7) im Vergleich zu Wildtyp Kardiomyozyten (n = 9; Mittelwert ± SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (dKO vs. Wildtyp): \* < 0,05). Eine zusätzliche Deletion von *Osmr* (tKO (OR); n = 5) oder *Fgfr1* (tKO (FR1); n = 6) führt zu einer Verringerung der durch einen dKO hervorgerufenen erhöhten Zellviabilität (Mittelwert ± SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Werte (tKO (OR) vs. dKO; tKO (FR1) vs. dKO): \* < 0,05). (C) Assay zur Untersuchung der Zellviabilität von adulten WT Kardiomyozyten mit und ohne Etomoxir Behandlung (100µM, 12 Std.) unter Normoxie und Hypoxie (18 Std.; 1 % O<sub>2</sub>). Die mit Etomoxir behandelten Zellen weisen im Vergleich zu unbehandelten Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Viabilität auf (Mittelwert ± SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (WT + Etomoxir vs. WT): \* < 0,05).

Um zu überprüfen ob die erhöhte Zellviabilität allein auf den veränderten Metabolismus zurückzuführen ist, wurden adulte WT Kardiomyozyten isoliert und für 12 Std. mit Etomoxir behandelt (100  $\mu$ M). Anschließend wurden sowohl die mit Etomoxir behandelten, als auch die unbehandelten Zellen für 18 Std. normoxischen und hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (1 % O<sub>2</sub>) und die Zellviabilität mittels Lebend-Tod-Färbung analysiert. Um eine mögliche Auswirkung der Etomoxir Behandlung auf die Zellviabilität auszuschließen, wurden die hypoxischen Bedingungen mit den normoxischen Bedingungen verrechnet. Die Analysen ergaben unter hypoxischen Bedingungen eine signifikant höhere Anzahl toter Kardiomyozyten in unbehandelten WT Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten die zuvor mit Etomoxir behandelt wurden (ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05; Abbildung 25 C).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine erhöhte Zellviabilität von Kardiomyozyten nach einem Verlust von miR-1/133a die jedoch durch eine zusätzliche Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* revertiert wird. Weiterhin deuten die Ergebnisse des Etomoxir Experimentes darauf hin, dass eine Inhibierung des Fettsäurestoffwechsels ausreichend ist um die Zellviabilität unter hypoxischen Bedingungen zu erhöhen.

Um herauszufinden ob die Ursache der erhöhte Zellviabilität auf Veränderungen in der Apoptose oder Nekrose von Kardiomyozyten zurückzuführen ist, wurden adulte WT und dKO Kardiomyozyten isoliert und hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (1 % O<sub>2</sub>). An verschiedenen Zeitpunkten wurden die Kardiomyozyten dann mittels einem Apoptose und Nekrose Assays untersucht. Die Analysen ergaben in Bezug auf Apoptose zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied zwischen WT und dKO Kardiomyozyten. Jedoch konnte in den dKO Kardiomyozyten in allen Zeitpunkten eine deutliche Reduktion der Nekrose festgestellt werden (p-Wert (2 Std.): \*\*\* < 0,001, p-Werte (12 Std., 18 Std., 24 Std.): \*\*\*\* < 0,0001; Abbildung 26).

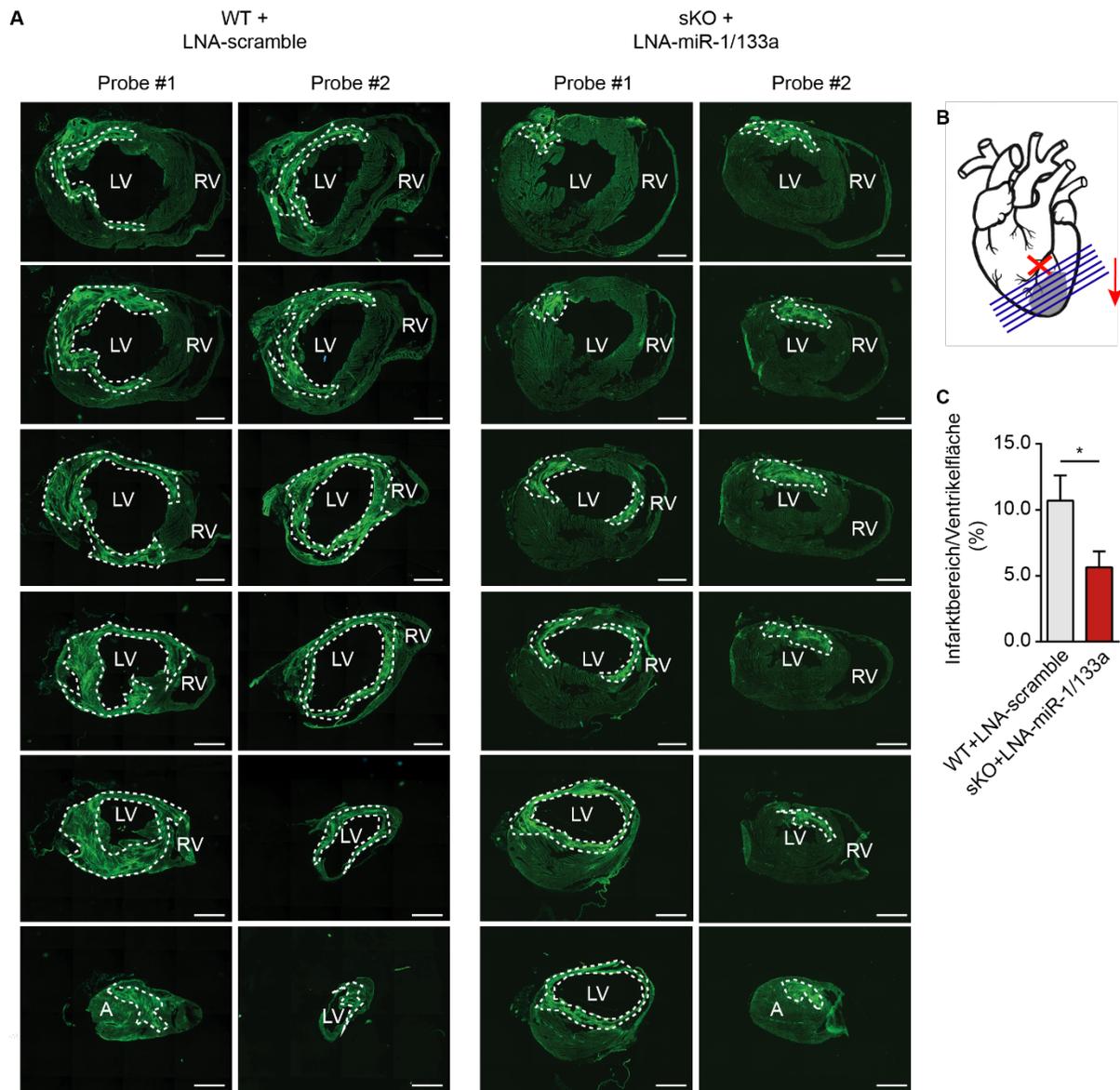


**Abbildung 26 – Der Verlust von miR-1/133a in adulten Kardiomyozyten führt unter hypoxischen Bedingungen zu einer reduzierten Nekrose.**

Assay für Apoptose und Nekrose mit isolierten adulten WT und dKO Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen. An verschiedenen Zeitpunkten weisen dKO Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen keine Unterschiede bei der Apoptose auf. Im Falle der Nekrose weisen dKO Kardiomyozyten durchgehend eine reduzierte Nekrose auf (n = 2, je 4 technische Replikate; Mittelwert ± SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (2 Std.): \*\*\* < 0,001; p-Werte (12 Std., 18 Std., 24 Std.): \*\*\*\* < 0,0001).

### 3.8 Eine Runterregulation von miR-1/133a führt nach einem Myokardinfarkt zu einem deutlich verringerten Infarktbereich

Vorangegangene *in vitro* Untersuchungen bestätigten die Annahme einer erhöhten Hypoxieresistenz adulter Kardiomyozyten nach Verlust von miR-1/133a (siehe 3.7.). Zusammen mit der Dedifferenzierung und der erhöhten Zellzyklusaktivität der dKO Kardiomyozyten könnte es das Herz bei einem akuten Myokardinfarkt und der darauffolgenden Regeneration unterstützen. Da sich eine Langzeit-Inaktivierung von miR-1/133a jedoch negativ auf die Herzfunktion auswirkt (siehe 3.6), wurden miR-1/133a für die Untersuchung, wie sich der Verlust von miR-1/133a bei einem akuten Myokardinfarkt auswirkt, nur vorübergehend unterdrückt. Für diesen Zweck wurden miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>/miR-1-2/133a-1<sup>+/+</sup> Tiere (single knockout Tiere; sKO), welche keine offensichtlichen Veränderungen in der Kardiomyozytenphysiologie aufweisen (Besser, Malan et al. 2014), eine Woche vor dem akuten Myokardinfarkt miR-1/133a gerichtete LNAs intravenös injiziert. Für die Quantifizierung 14 Tage nach dem Myokardinfarkt wurden die Herzen mit Hilfe von WGA-Färbungen untersucht (Abbildung 27 A; Validierung des Infarktbereiches mittels Trichrom Färbung siehe Abbildung 40 im Anhang). Um eine möglichst exakte Quantifizierung zu ermöglichen, wurden ab der Stelle der Ligation bis hin zum Apex alle 50 µm Schnitte aufgenommen und als Serienschnitt gefärbt und ausgewertet (Abbildung 27 B). Die Quantifizierung ergab in sKO Tieren mit miR-1/133a-LNA Injektion einen rund 50 % verringerten Infarktbereich im Vergleich zu WT Tieren mit einer Kontroll-LNA Injektion (ungepaarter zweiseitiger t-Test; pWert: \* < 0,05; Abbildung 27 C).



**Abbildung 27 – Eine Runterregulation von miR-1/133a in adulten Herzen vor einem Myokardinfarkt führt zu einem deutlich verringerten Infarktbereich.**

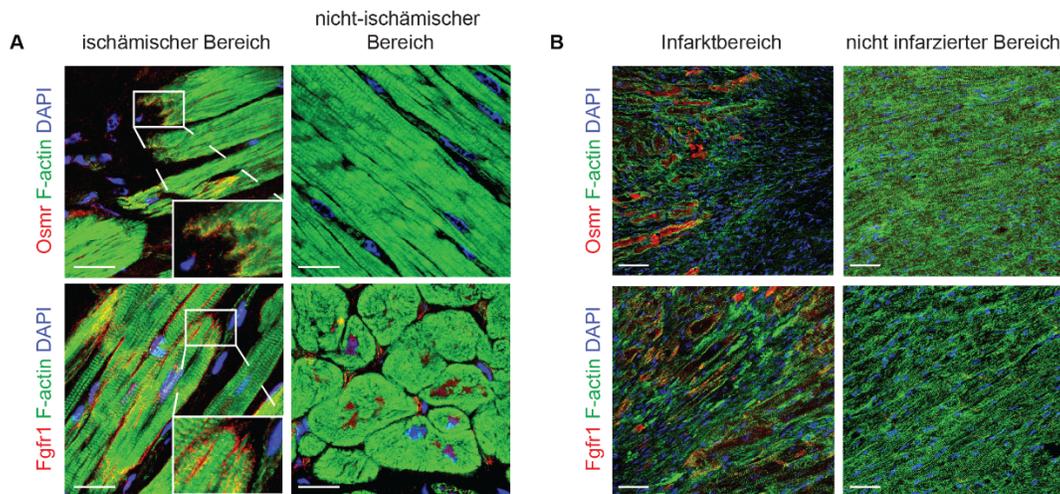
(A) Analyse des Infarktbereiches mittels WGA-Färbung 14 Tage nach einem Myokardinfarkt. Die Injektion der Kontroll-LNA (LNA-scramble) in Wildtyp Tiere und der Kombination von miR-1-LNA und miR-133a-LNA (LNA-miR-1/133a) in sKO Tiere (*single Knockout*) erfolgte intravenös 7 Tage vor dem Myokardinfarkt. Die gestrichelte weiße Linie umrandet die Infarktbereiche, die anschließend mittels Fiji quantifiziert wurden (LV = linker Ventrikel; RV = rechter Ventrikel). Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m (B) Schematische Darstellung des Myokardinfarktes (rotes Kreuz) und der Schnittebenen (blaue Striche). Schnitte wurden alle 50  $\mu$ m entlang der basal-apikalen Achse aufgenommen. (C) Quantifizierung des Infarktbereiches relativ zur Ventrikelfläche des linken Ventrikels. Eine Injektion von LNA-miR-1/133a in sKO Tiere 7 Tage vor einem Myokardinfarkt führt zu einem fast 50 % kleineren Infarktbereich im Vergleich zu Wildtyp Tieren denen 7 Tagen vor einem Myokardinfarkt eine Kontroll-LNA injiziert wurde (WT + LNA-scramble: n = 14; sKO + LNA-miR-1/133a: n = 12; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05).

### 3.9 Die Expression von *Osmr* und *Fgfr1* ist im Infarktbereich und im ischämischen Bereich von ICM Patienten erhöht

Vorangegangene *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen in *Mus musculus* ergaben unter anderem nach einem Verlust von miR-1/133a eine erhöhte Resistenz von Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen (siehe Abbildung 25). Zudem konnte eine Wechselwirkung zwischen miR-1/133a und den Rezeptoren OSMR und FGFR1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9; Abbildung 32 E im Anhang und Abbildung 34 B im Anhang).

Um herauszufinden ob diese Wechselwirkung auch nach einem Myokardinfarkt bei Mäusen und bei verschiedenen Erkrankungen des humanen Herzens vorzufinden ist, wurde zunächst die Expression von OSMR und FGFR1 in humanen Proben von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und im akuten Myokardinfarkt bei Mäusen untersucht. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben zunächst eine Hochregulierung von OSMR und FGFR1 im ischämischen Bereich von ICM Patienten (Abbildung 28 A) und im Infarktbereich bei Mäusen sieben Tage nach einem akuten Myokardinfarkt (Abbildung 28 B) aber nicht im nicht-ischämischen Bereich von ICM Patienten oder im nicht infarzierten Bereich bei Mäusen (Abbildung 28 A + B).

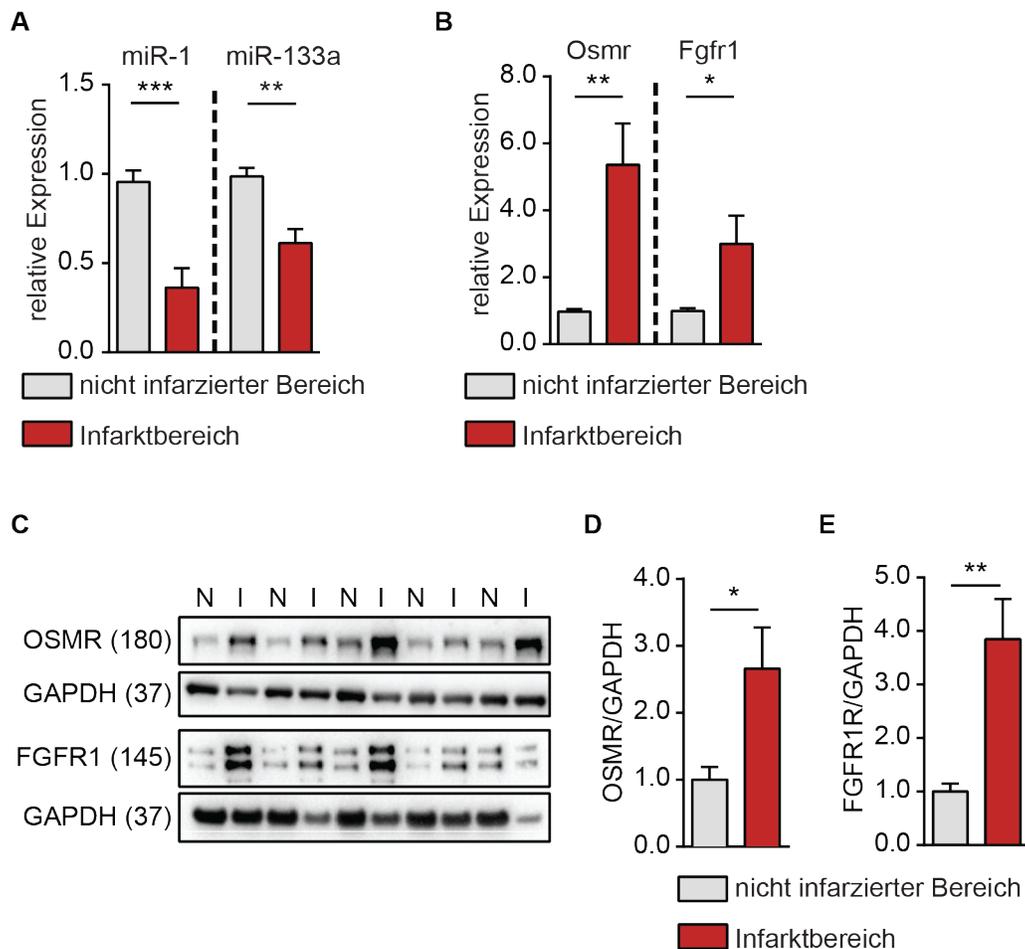
Ausgehend von der Annahme, dass miR-1/133a mit den Rezeptoren *Osmr* und *Fgfr1* in einer Wechselwirkung zueinander stehen, wurde zum einen die relative Expression der miRNAs miR-1 und miR-133a und zum anderen die relative Expression der Rezeptoren OSMR und FGFR1 im Infarktbereich bei Mäusen sieben Tage nach einem akuten Myokardinfarkt untersucht. Die qRT-PCR Analysen ergaben eine signifikant verringerte Expression von miR-1 (über 50 %, p-Wert (miR-1, Infarktbereich vs. Nicht infarzierten Bereich): \*\*\* < 0,001) und miR-133a (um die 40 %, p-Wert (miR-133a, Infarktbereich vs. Nicht infarzierten Bereich): \*\* < 0,01) im Infarktbereich im Vergleich zum nicht infarzierten Bereich (Abbildung 29 A). Zudem konnte auch eine Hochregulierung von OSMR und FGFR1 im Infarktbereich von Mäusen sieben Tage nach einem akuten Myokardinfarkt mittels RT-PCR und Western Blot Analysen verifiziert werden (Abbildung 29 B - E).



**Abbildung 28 – Die Osmr und Fgfr1 Expression ist im Infarktbereich und im ischämischen Bereich von ICM Patienten erhöht.**

(A+B) Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI (blau), F-actin (grün) und Osmr (rot) oder Fgfr1 (rot) bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) (A; Maßstabsbalken = 30  $\mu$ m) und Mauserherzen 7 Tage nach LAD-Ligation (B; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m). Sowohl Osmr, als auch Fgfr1 sind im Infarktbereich und im ischämischen Bereich der ICM Patienten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (ischämischer Bereich vs. nicht ischämischer Bereich; Infarktbereich vs. Nicht infarzierter Bereich) hochreguliert.

Dabei war die relative Expression von OSMR im Infarktbereich fünfmal höher als die relative Expression von OSMR im nicht infarzierten Bereich (p-Wert: \*\* < 0,01). Im Falle von FGFR1 war die relative Expression im Infarktbereich mehr als doppelt so hoch wie im nicht infarzierten Bereich (p-Wert: \* < 0,05; Abbildung 29 B). Im Western Blot wurden die Mengen von OSMR (180 kDa) und FGFR1 (145 kDa) auf GAPDH (37 kDa) normalisiert. Die Analysen ergaben dabei, dass die Menge an OSMR und FGFR1 im Infarktbereich im Vergleich zum nicht infarzierten Bereich ebenfalls signifikant erhöht sind (p-Wert (OSMR): < 0,05; p-Wert (FGFR1): \*\* < 0,01). Die Menge an OSMR im Infarktbereich war dabei fast dreimal so hoch wie im nicht infarzierten Bereich. Die Menge an FGFR1 im Infarktbereich war fast viermal so hoch wie im nicht infarzierten Bereich (Abbildung 29 C - E).

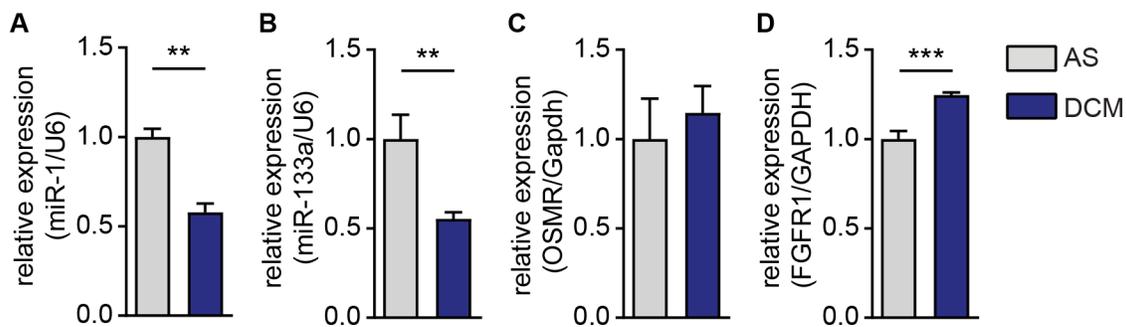


**Abbildung 29 – Die erhöhte *Osmr* und *Fgfr1* Expression im Infarktbereich kann mit anderen Nachweismethoden bestätigt werden.**

(A) qPCR Analyse der *mir-1* und *mir-133a* Expression in Mauserherzen 7 Tage nach LAD-Ligation zeigt eine deutliche Verringerung von *mir-1* und *mir-133a* im Infarktbereich im Vergleich zum nicht infarzierten Bereich ( $n = 7$  pro Gruppe; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (*mir-1*): \*\*\*  $< 0,001$ ; p-Wert (*mir-133a*): \*\*  $< 0,01$ ). Die relative Expression wurde auf U6 normalisiert. (B) RT-PCR Analysen von Mauserherzen 7 Tage nach LAD-Ligation zeigen eine erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* im Infarktbereich im Vergleich zum nicht infarzierten Bereich ( $n = 7$  pro Gruppe; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (*SOMR*): \*\*  $< 0,01$ ; p-Wert (*Fgfr1*): \*  $< 0,05$ ). (C - E) Western Blot Analysen der Expression von OSMR (C + D) und FGFR1 (C + E) im Infarktbereich und nicht infarzierten Bereich von Mauserherzen 7 Tage nach LAD-Ligation ( $n = 5$  pro Gruppe; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (*SOMR*): \*  $< 0,05$ ; p-Wert (*Fgfr1*): \*\*  $< 0,01$ ) zeigen eine erhöhte Expression der Rezeptoren im Infarktbereich (I) im Vergleich zum nicht infarzierten Bereich (N).

Da qRT-PCR Analysen mit Proben von ICM Patienten problematisch sind, weil man den ischämischen und nicht ischämischen Bereich nicht gut trennen kann, wurden für die Untersuchung der Wechselwirkung von miR-1/133a und den Rezeptoren OSMR und FGFR1 Proben von Patienten mit dilativer Kardiomyopathie (DCM) untersucht. Als Kontrollgruppe wurden Proben von Patienten mit Aortenstenose (AS) ohne Auffälligkeiten verwendet.

Die qRT-PCR Untersuchungen wiesen eine signifikant verringerte Expression von miR-1 und miR-133a in DCM Patienten auf im Vergleich zur Kontrollgruppe (p-Werte: \*\* < 0,01; Abbildung 30 A + B). Im Gegensatz dazu war die Expression von Osmr tendenziell (p-Wert: > 0,05, nicht signifikant) und die Expression von Fgfr1 signifikant erhöht (p-Wert: \*\*\* < 0,001; Abbildung 30 C + D). Diese Ergebnisse bestätigen eine Wechselwirkung zwischen miR-1/133a mit den Rezeptoren Osmr und Fgfr1 und untermauern eine wichtige Rolle dieser Wechselwirkung sowohl bei einer Herzinsuffizienz, als auch nach einem akuten Myokardinfarkt.



**Abbildung 30 – Auch in DCM Patienten stehen die Rezeptoren und die miRNAs in einer entgegengesetzten Beziehung zueinander.**

(A+B) qPCR Analyse der miR-1 (A) und miR-133a (B) Expression bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM; n = 5) oder Aortenstenose (AS; n = 3) zeigen eine deutlich verringerte Expression von miR-1 und miR-133a in DCM Patienten im Vergleich zu Patienten mit AS (Kontrollgruppe; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert: \*\* < 0,01). (C+D) qPCR Analyse der Osmr (C) und Fgfr1 (D) Expression in DCM Patienten (n = 5) und Patienten mit Aortenstenose (n = 3) zeigen eine erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 in DCM (n = 5) Patienten im Vergleich zu Patienten mit Aortenstenose (n = 3; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Wert (OSMR): > 0,05, nicht signifikant; p-Wert (FGFR1): \*\*\* < 0,001).

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Expression von *Osmr* und *Fgfr1* in Kardiomyozyten wird von miR-1/133a reguliert

Die Aufgabe des Herzens ist die Aufrechterhaltung des Herz-Kreislauf-Systems, um den Körper somit einerseits mit Sauerstoff und wichtigen Nährstoffen zu versorgen, und andererseits Stoffwechselabfälle zu beseitigen (Buckingham, Meilhac et al. 2005). Um dies zu ermöglichen muss es regelmäßig kontrahieren wofür differenzierte Kardiomyozyten grundlegend sind. Um diesen funktionsfähigen und kontraktile Zustand aufrecht zu erhalten, spielen zum einen die Genregulation eine wichtige Rolle, da durch die Expression spezifischer Gene verschiedene Zelltypen und Zellfunktionen definiert und somit biologische Prozesse gesteuert werden können, und zum anderen die posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs im Herzen (siehe 1.5.2). Allerdings fehlt es differenzierten Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt an ausreichendem Regenerationspotential weswegen es zu einer Narbenbildung kommt die, je nach Grad des Myokardinfarktes zu einer chronischen Herzinsuffizienz führen kann (siehe 1.2). Daher wäre in solchen Fällen ein dedifferenzierter Zustand der Kardiomyozyten, wie beispielsweise in neonatalen Kardiomyozyten, von Vorteil, um die Umstände eines Myokardinfarktes besser zu überstehen und anschließend eine Regeneration einleiten zu können. Hierbei spielen *Osmr* und *Fgfr1*, welche unter anderem die Dedifferenzierung und Proliferation von Kardiomyozyten regulieren, eine wichtige Rolle. Dadurch ist es wichtig das Wissen bezüglich des zugrundeliegenden Mechanismus von *Osmr*, *Fgfr1* und des miR-1/133a Clusters zu vertiefen, um somit die Bedeutung dieser Komponenten im speziellen für die Transkriptionsregulation der Kardiomyozyten zu erörtern.

OSMR wird durch OSM aktiviert und reguliert die Dedifferenzierung der adulten Kardiomyozyten über die Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges. Zusätzlich kommt es zu einer Erhöhung der Zellzyklusaktivität und einer erhöhten Resistenz gegenüber hypoxischen Bedingungen, welches allesamt Faktoren sind, die das Myokard bei einem akuten Myokardinfarkt vorübergehend schützen (Kubin, Poling et al. 2011, Hu, Zhang et al. 2017, Stawski and Trojanowska

2019). FGFR1 hingegen wird durch FGF's aktiviert und unterstützt den Wiedereintritt von Kardiomyozyten in den Zellzyklus (Dell'Era, Ronca et al. 2003, Engel, Hsieh et al. 2006, Feng, Niu et al. 2013, Novoyatleva, Sajjad et al. 2014, Itoh, Ohta et al. 2016, Krejci, Pesevski et al. 2016). Im Zebraabärbling unterstützt der FGFR1 sogar die Regeneration des Myokards (Poss 2007).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden potentielle Bindestellen für miRNAs analysiert um somit posttranskriptionelle Regulationsprozesse für *Osmr* und *Fgfr1* identifizieren zu können. Dabei konnte eine Bindestelle für miR-1 innerhalb der 3'UTR von *Osmr* und zwei Bindestellen für miR-133a innerhalb der 3'UTR von *Fgfr1* identifiziert und mittels Luziferase Assay validiert werden. Die miRNAs miR-1 und miR-133a sind die im Herzen am häufigsten vorkommenden miRNAs und spielen bei der pränatalen Herzentwicklung, durch die Inhibierung verschiedener Zielgene, eine essenzielle Rolle (Zhao, Ransom et al. 2007, Liu, Bezprozvannaya et al. 2008, Heidersbach, Saxby et al. 2013, Wei, Peng et al. 2014). Mittels *in vitro* Untersuchungen konnte in neonatalen Kardiomyozyten nach einer Transfektion mit miR-1 und miR-133a eine signifikant verringerte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die miRNAs miR-1 und miR-133a die Expression der Rezeptoren OSMR und FGFR1 posttranskriptionell unterdrücken können und dadurch die Dedifferenzierung und Proliferation von Kardiomyozyten regulieren.

Im Falle einer akuten Verletzung oder Erkrankung des Herzens könnte der Verlust des differenzierten Zustandes eine Möglichkeit sein mit den pathologischen Veränderungen umzugehen. Bei der genaueren Untersuchung der Wechselwirkung zwischen miR-1/133a und den Rezeptoren OSMR und FGFR1 *in vitro* konnten wir zunächst, nach einer OSM oder FGF2 Stimulation von adulten Rattenkardiomyozyten, eine erhöhte Expression von Markern nachweisen die in Zusammenhang stehen mit dem Zellzyklus, der Fibrose und der Kontraktilität von Kardiomyozyten. Eine Co-Stimulation mit OSM+FGF2 führte zudem, im Vergleich zu einer Behandlung mit OSM oder FGF2 allein, zu einer Steigerung der Expression von  $\alpha$ -SMA, ACTN1, ACTN4, PCNA, MAD2 und sogar OSMR selbst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass OSM und FGF2 für die Induktion der Dedifferenzierung von adulten Kardiomyozyten synergistisch

wirken. Um die Annahme der Wechselwirkung zwischen miR-1/133a und den Rezeptoren OSMR und FGFR1 im Weiteren zu validieren, wurde neben einer Co-Stimulation von adulten Ratten Kardiomyozyten mit OSM+FGF2 zusätzlich auch miR-1/133a überexprimiert. Diese Überexpression von miR-1/133a hob die Wirkung der Co-Stimulation von OSM+FGF2 in adulten Ratten Kardiomyozyten nahezu auf, was die Annahme der Wechselwirkung bestätigte.

Da miRNAs im Allgemeinen aber eine große Anzahl von Zielgenen regulieren können, üben auch miR-1/133a ihre Funktionen nicht ausschließlich über den OSMR und FGFR1 aus. Daher wurde nach weiteren putativen Zielgenen gesucht und neben der Hochregulation von *Osmr* und *Fgfr1* auch eine Hochregulation von schon bekannten miR-1/133a Zielgenen wie *Myocardin* und *Kcnmb1* (Wystub, Besser et al. 2013) nachgewiesen. Auch eine Hochregulation von noch unbekanntem Zielgenen wie *Myotrophin*, welches unter anderem neben der Bindung von Aktin (Bhattacharya, Ghosh et al. 2006), auch die Stimulierung des Myozytenwachstums durch nukleare Translokation von p65 induziert (Das, Gupta et al. 2008) und den Proteinen *Cnn1* und *Cnn2*, welche in embryonalen Kardiomyozyten exprimiert werden (Samaha, Ip et al. 1996), und spezifisch in der glatten Muskulatur Aktin, Tropomyosin und Calmodulin binden (Strasser, Gimona et al. 1993, Jin, Wu et al. 2003) konnte nachgewiesen werden. Da diese Zielgene im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurden, kann man nicht ausschließen, dass diese auch eine mögliche Rolle bei der Dedifferenzierung von adulten Kardiomyozyten spielen.

Neben den bereits erwähnten putativen Bindestellen konnte für miR-1 innerhalb der 3'UTR von *Runx1* eine weitere potentielle Bindestelle nachgewiesen werden. Da *Runx1* nicht nur als Dedifferenzierungsmarker von Kardiomyozyten bekannt ist (Zhang, Ma et al. 2016, Riddell, McBride et al. 2020), sondern in Kardiomyozyten auch durch OSM induziert wird (Kubin, Poling et al. 2011), wurde im Rahmen dieser Arbeit partiell auch die Funktion von *Runx1* untersucht, indem Mausmodelle generiert wurden, bei denen neben den miR-1/133a Gencluster auch *Runx1* (tKO (Rx)) konditionell inaktiviert wurde. Allerdings normalisierte die zusätzliche Inaktivierung von *Runx1* im Gegensatz zu einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1*, kaum Gene, welche durch den Verlust von miR-1/133a in den dKO Tieren hochreguliert wurden. Weiterhin konnten die Transkriptomanalysen durch immunhistochemische Färbungen

unterstützt werden, da auch diese keinerlei Unterschiede zwischen dKO und tKO (Rx) Herzen aufzeigten. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerung, dass miR-1/133a den differenzierten Zustand von adulten Kardiomyozyten auf Grund der Inhibierung von *Osmr* und *Fgfr1* aufrechterhalten.

#### **4.2 Die erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* nach Verlust von miR-1/133a aktiviert den MEK-ERK Signalweg**

Um die zuvor erlangten *in vitro* Ergebnisse zu Überprüfen, musste die Funktion von miR-1/133a in Kardiomyozyten *in vivo* untersucht werden. Da aber ein Kompletterverlust beider miR-1/133a Cluster eine embryonale Letalität zur Folge hat (Wystub, Besser et al. 2013) wurden miR-1 und miR-133a, welche eine funktionelle Einheit bilden (Wystub, Besser et al. 2013), bisher nur separat untersucht (Zhao, Ransom et al. 2007, Liu, Bezprozvannaya et al. 2008, Heidersbach, Saxby et al. 2013, Wei, Peng et al. 2014). Daher wurde für die *in vivo* Experimente der vorliegenden Arbeit ein herzspezifischer Verlust beider miR-1/133a Gencluster im Mausmodell generiert (dKO). Diese dKO Tiere wiesen im Vergleich zu WT Tieren drei Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion mittels qRT-PCR Analysen eine erhöhte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* in Kardiomyozyten auf aber nicht in Nicht-Kardiomyozyten. Um zusätzlich die Rolle von *Osmr* und *Fgfr1* im adulten Myokard nach Verlust von miR1/133a zu klären, wurden Mausmodelle generiert, bei denen neben den miR-1/133a Gencluster auch *Osmr* (tKO (OR)) oder *Fgfr1* (tKO (FR1)) konditionell inaktiviert wurden. Mittels Western Blot Analysen konnte die starke Hochregulation von *Osmr* und *Fgfr1* in dKO Herzen bestätigt werden. Zudem wurde mittels Western Blot auch die Effizienz der Inaktivierung der jeweiligen Gene in tKO Herzen untersucht. Die Analysen ergaben im Falle von *Osmr* eine effiziente und signifikante Inaktivierung von *Osmr* in tKO (OR) Herzen im Vergleich zu WT und dKO Tieren. Im Falle von *Fgfr1* ergaben die Analysen eine wesentliche Reduktion von FGFR1 in tKO (FR1) Herzen im Vergleich zu dKO Herzen. Im Vergleich zu WT Herzen, war die Menge an *Fgfr1* in tKO (FR1) Tieren jedoch erhöht. Dies kann damit begründet werden, dass im adulten Herzen zwar vorwiegend der FGFR1 in Kardiomyozyten exprimiert wird, dieser aber mit den anderen drei Tyrosinkinase-FGF-Rezeptoren (FGFR2, FGFR3, FGFR4) eine hohe Homologie aufweist (Itoh

and Ornitz 2004, Dai, Zhou et al. 2019), welche ebenfalls in sehr geringen Mengen im adulten Herzen exprimiert werden (Fon Tacer, Bookout et al. 2010). Daher kann eine Kreuzreaktivität des für den Western Blot verwendeten FGFR1 Antikörpers mit den anderen FGFRs oder die FGFR1 Expression in Nicht-Kardiomyozyten nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Aktivierung der *Osmr* und *Fgfr1* Expression nach einem Verlust von *miR-1/133a* führte, neben der Hochregulation von *OSMR* und *FGFR1*, auch zu einer erhöhten ERK-Aktivität, welche für eine OSM-vermittelte Dedifferenzierung von Kardiomyozyten eine wichtige Rolle spielt (Kubin, Poling et al. 2011). Die erhöhte ERK-Aktivität in dKO Herzen wurde nach einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* normalisiert was darauf hindeutet, dass der Anstieg an pERK in dKO Tieren auf den Verlust von *miR-1/133a* und die damit verbundene erhöhte Expression von *OSMR* und *FGFR1* zurückzuführen ist. Eine Inhibition des ERK-Signalweges mit UO126 normalisierte ebenfalls die Expression der meisten hochregulierten Gene der dKO Herzen und zeigte im Wesentlichen die gleichen Auswirkungen wie die der zusätzlichen Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* in tKO Herzen. Obwohl es nach einer Bindung von OSM oder FGF zu einer Aktivierung mehrerer unterschiedlicher Signalwege kommt (Lutticken, Wegenka et al. 1994, Schiemann, Bartoe et al. 1997, Hermanns, Radtke et al. 2000, Wang, Robledo et al. 2000, Negoro, Oh et al. 2001, Radtke, Hermanns et al. 2002, Ornitz and Itoh 2015), scheint bei der *miR-1/133a* vermittelten Inhibition von *OSMR* und *FGFR1* jedoch der ERK-Signalweg eine zentrale Rolle zu spielen. Dies konnte nicht nur durch die gleichen Auswirkungen der UO126 Inhibition in dKO Herzen und der Auswirkungen in tKO Herzen gezeigt werden, sondern auch durch Transkriptomanalysen (GSEA) die in dKO Herzen nur eine minimal erhöhte Aktivität des Hippo-, Notch-, Wnt- und des JAK/STAT-Signalweges aufzeigten, die jedoch im Vergleich zu WT Herzen nicht signifikant verändert waren.

### **4.3 Nach Verlust von *miR-1/133a* kommt es zu einer erhöhten Zellzyklusaktivität der adulten Kardiomyozyten**

Kurz nach der Geburt geht das Proliferationspotential von Kardiomyozyten bei Säugetieren verloren (Bergmann, Bhardwaj et al. 2009). In Mäusen stoppt die Proliferation der Kardiomyo-

zyten fünf Tage nach der Geburt. Ab diesem Zeitpunkt kommt es zur Bildung von zweikernigen und polyploiden Kardiomyozyten, da in den Kardiomyozyten bis zu einem gewissen Grad eine DNA-Replikation und Karyokinese stattfindet aber keine Cytokinese mehr (Li, Wang et al. 1996, Liu, Yue et al. 2010, Zhang, Li et al. 2010). Dieser Prozess dauert ungefähr bis zur dritten postnatalen Woche an. Ab da sind etwa 80 - 90% der Kardiomyozyten binukleär (Ahuja, Sdek et al. 2007). Grund hierfür ist die Reifung der Kardiomyozyten bei der es unter anderem zu einer Veränderung der Zellstruktur, des Metabolismus, der Genexpression und vor allem Funktion kommt (Guo and Pu 2020). Nur so kann gewährleistet werden, dass differenzierte adulte Kardiomyozyten, welche grundlegend für die Kontraktion des Herzens sind, ihrer Funktion gewachsen sind.

Da in den vorhergehenden *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, dass eine Überexpression von miR-1/133a die erhöhte Expression einiger Dedifferenzierungs- und Zellzyklusmarker, welche durch eine Co-Stimulation mit OSM+FGF2 hervorgerufen wurden, nahezu aufhob, stellte sich die Frage, ob ein Verlust von miR-1/133a eine gegensätzlichen Wirkung zur Folge hat.

Nach einem Verlust von miR-1/133a *in vivo* konnte in dKO Herzen mittels Transkriptomanalyse eine Anreicherung von Genen nachgewiesen werden, welche eine wichtige Rolle während des Zellzyklus und der Zellteilung spielen. Dabei spielt die translationale Regulation der Gene die für die Zellzyklusprogression verantwortklich ist eine wichtige Rolle (Stumpf, Moreno et al. 2013). Da die Transkriptomanalysen jedoch mit ganzen Herzen durchgeführt wurden, liefern diese keine genaue Aussage darüber, ob die transkriptionellen Veränderungen tatsächlich auch von adulten Kardiomyozyten ausgehen oder nicht. Um diese Frage zu klären, wurde die Expression verschiedenster Zellzyklusmarker mittels qRT-PCR in isolierten Kardiomyozyten untersucht und mit Nicht-Kardiomyozyten, welche eine Gruppe von anderen Zelltypen des Herzens, wie beispielsweise Fibroblasten oder Endothelzellen, zusammenfassen, verglichen. Dabei konnte im Vergleich zu WT Kardiomyozyten ausschließlich in dKO Kardiomyozyten eine erhöhte Expression von Genen festgestellt werden, welche in unterschiedlichsten Phasen (G1/0, S, G2) des Zellzyklus eine Rolle spielen. Dahingegen konnte in dKO Nicht-Kardiomyozyten im

Vergleich zu WT Nicht-Kardiomyozyten keinerlei erhöhte Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die transkriptionellen Veränderungen der erhöhten Genexpression von Genen, welche eine Rolle während des Zellzyklus und der Zellteilung spielen tatsächlich von dKO Kardiomyozyten ausgeht und diese somit einen proproliferativen Phänotyp aufweisen. Um zu untersuchen, ob diese proproliferativen Kardiomyozyten jedoch auch wirklich in den Zellzyklus eintreten, wurde adulten dKO Tieren EdU injiziert, welches als Thymidin Analog während der DNA-Synthese eingebaut wird (Chehrehasa, Meedeniya et al. 2009), und mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden kann. Nach der Isolation der Kardiomyozyten konnte nur in dKO Kardiomyozyten ein Einbau von EdU nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass diese proproliferativen dKO Kardiomyozyten tatsächlich in den Zellzyklus eintreten. Da auf einen Wiedereintritt in den Zellzyklus bei Kardiomyozyten nicht automatisch auch eine Zellteilung folgt (Li, Wang et al. 1996, Liu, Yue et al. 2010), stellte sich die Frage, ob die proproliferative Eigenschaften der dKO Kardiomyozyten ausreichend für eine Zellteilung ist.

Hinweise hierfür lieferte zum einen die erhöhte Expression von Anilin, ein Protein, das an der Cytokinese beteiligt ist (Field and Alberts 1995, Oegema, Savoian et al. 2000, Piekny and Glotzer 2008), und zum anderen eine allgemein erhöhte Anzahl von mononukleärer Kardiomyozyten in dKO Herzen. Weiterhin war der Großteil der EdU<sup>+</sup> dKO Kardiomyozyten mononukleär.

Um nun die Zellteilung in dKO Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden Aurora B Färbungen durchgeführt. Jedoch konnte trotz erhöhter DNA-Synthese keinerlei Aurora B Färbung nachgewiesen werden. Dies kann entweder daran liegen, dass im Allgemeinen eine zu geringe Menge an dKO Kardiomyozyten DNA-Synthese betreiben (ca. 0,25 %), was den Nachweis einer eventuell folgende Zellteilung erschwert oder es den dKO Kardiomyozyten an noch unbekanntem bestimmten Signalen fehlt eine Zellteilung wirklich durchzuführen.

#### 4.4 Der Verlust von miR-1/133a führt zu einer Dedifferenzierung von Kardiomyozyten und einer veränderten Expression von extrazellulären Matrixgenen

In adulten Kardiomyozyten wird eine Proliferation durch eine Dedifferenzierung der Zelle unterstützt (Zhang, Li et al. 2010). Da durch vorangegangene Ergebnisse ein proliferativer Zustand der dKO Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte, wurde aufbauend auf diese Ergebnisse untersucht, wie sich die erhöhte Aktivität von *Osmr* und *Fgfr1* nach Verlust von miR-1/133a auf die Dedifferenzierung von adulten Kardiomyozyten auswirkt. Bereits während der Untersuchungen der EdU Inkorporation wiesen dKO Kardiomyozyten Anzeichen einer Dedifferenzierung auf, welche sich durch eine verminderte cTnT-Färbung und einem Verlust der Querstreifung auszeichnete. Mittels Transkriptomanalysen konnte weiterhin eine Anreicherung von Markergenen der glatten Muskulatur in dKO Kardiomyozyten nachgewiesen werden, welche durch immunhistochemische Färbungen, Western Blot Analysen und qRT-PCR Analysen validiert wurden. In dKO Kardiomyozyten konnte somit zum einen eine erhöhte Expression von ACTA2 nachgewiesen werden, welches im Grunde nur in glatten Muskelzellen und embryonalen Kardiomyozyten exprimiert wird (Kubin, Poling et al. 2011, Guo, Li et al. 2015), und zum anderen eine erhöhte Expression von MYH7, welches hauptsächlich während der pränatalen Entwicklung von Mäusen exprimiert wird (Guo, Li et al. 2015). Da eine dauerhafte Expression von MYH7 oder Genen der glatten Muskulatur sich nachteilig auf die Kontraktilität des Herzens auswirkt, wurden die physiologischen Folgen eines dauerhaften miR-1/133a Verlustes untersucht. Obwohl bei den Untersuchungen kurz nach der Tamoxifeninjektion kein klinischer Phänotyp festgestellt werden konnte, kam es 50 Tage nach der Behandlung mit Tamoxifen zu einer dilatativen Kardiomyopathie, welche sich durch dünnere Herzwände und eine massive Vergrößerung der Atrien und Ventrikel auszeichnete. Im Gegensatz zu den Veränderungen der Genexpression in Bezug auf den Zellzyklus oder des MEK/ERK Signalweges konnte jedoch weder die Anreicherung von ACTA2 oder MYH7, noch die dilatative Kardiomyopathie durch eine Inhibierung des MEK/ERK Signalweges mit UO126 oder durch eine zusätzliche Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* normalisiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die miRNAs miR-1 und miR-133a die Expression der Gene, welche für die Kontraktilität des Herzens zuständig

sind, über andere Wege als *Osmr* und *Fgfr1* regulieren müssen. Eine Möglichkeit hierfür wäre beispielsweise die Regulierung von *Myocardin*, *SRF* und *Kcnmb1* durch *miR-1/133a*. Frühere Studien konnten zeigen, dass es nach einem Verlust von *miR-1/133a* zu einer erhöhten Expression von *Myocardin*, *SRF* und *Kcnmb1* kommt, welche eine bedeutende Rolle bei der Genexpression der glatten Muskulatur spielen (Wang, Wang et al. 2003, Heidersbach, Saxby et al. 2013, Wystub, Besser et al. 2013). Dabei führt ein embryonaler Verlust von *miR-1/133a* zu einer erhöhten Expression von *Myocardin*, das durch *miR-1* reguliert wird, und *Kcnmb1*, welches zum einen durch *miR-133a* reguliert wird und zum anderen auf transkriptioneller Ebene auch durch *Myocardin*. Die Folgen sind eine fehlerhafte Herzentwicklung, die eine embryonale Lethalität zur Folge hat (Wystub, Besser et al. 2013). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in adulten Mäusen in weiteren Studien nur der Verlust von *miR-1* oder *miR-133a* untersucht. Auch nach einem Verlust von *miR-1* allein konnte ein Zusammenhang von *miR-1* und *Myocardin* nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch *SRF* von *miR-1/133a* reguliert wird und das Zusammenspiel von *miR-1/133a*, *SRF* und *Myocardin* zum einen die Genregulation der glatten Muskulatur in Säugetierherzen unterdrückt, und zum anderen die Bildung der Sarkomere reguliert (Heidersbach, Saxby et al. 2013). Da die in den Studien beschriebenen Phänotypen, wie beispielsweise die erhöhte Expression von *ACTA2* oder der Verlust der Sarkomerstruktur, dem Phänotyp unserer adulten *miR-1/133a* dKO Tieren entspricht und in unseren Transkriptomdaten die Expression von *Myocardin* in den dKO Tieren signifikant erhöht ist, welche auch nach einer Behandlung mit *UO126* oder einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* und *Fgfr1* signifikant erhöht ist, kann man daraus schließen, dass die Regulation der Gene, welche für die Kontraktilität des Herzens zuständig sind, vermutlich durch *Myocardin* reguliert werden.

Ein weiteres wichtiges Anzeichen für eine Dedifferenzierung von Kardiomyozyten ist eine Veränderung der Komposition der extrazellulären Matrix. Vergleicht man die Komposition der extrazellulären Matrix von neugeborenen Mäusen mit der Komposition der extrzellulären Matrix von adulten Tieren, weisen neugeborene Tiere eine vergleichsweise „elastischere“ extrazelluläre Matrixkomposition im Herzen auf, welche die Regeneration des Herzens und die

Proliferation von Kardiomyozyten bei Verletzungen des neonatalen Herzens unterstützt (Williams, Quinn et al. 2014). Die extrazelluläre Matrixkomposition von adulten Herzen allerdings ist vergleichsweise „steifer“ was auf die Differenzierung der Kardiomyozyten zurückzuführen ist (Hortells, Johansen et al. 2019). Im Laufe der Untersuchungen konnte neben dem veränderten Transkriptionsmuster von zellzyklusbezogenen Genen in dKO Herzen auch eine erhöhte Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten festgestellt werden, die mit einer Veränderung von Gensets einherging, welche im Zusammenhang mit der extrazellulären Matrix standen. Um zu überprüfen ob die Veränderung der extrazellulären Matrix Gene auch auf Kardiomyozyten zurückzuführen ist, wurde die Genexpression von *Timp1*, *Colla1*, *Col4a1*, *Lox*, *Ctgf* und *Mmp2* in Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten untersucht. Alle Gene waren in dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten stark erhöht. In Nicht-Kardiomyozyten konnte zwar auch eine leichte Erhöhung der Expression von *Colla1*, *Lox* und *Mmp2* in dKO Nicht-Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Nicht-Kardiomyozyten festgestellt werden, jedoch waren die Gene in dKO Nicht-Kardiomyozyten bei weitem nicht so stark exprimiert wie in dKO Kardiomyozyten und ist vermutlich auf die parakrine Aktivität von Kardiomyozyten zurückzuführen.

Da die vorangegangenen Ergebnisse darauf hindeuten, dass ein Verlust von miR-1/133a und die damit einhergehende verstärkte Expression von *Osmr* und *Fgfr1* im adulten Herzen zu einem eher neonatalen Phänotyp der Kardiomyozyten führt, wurde mittels Transkriptomanalysen die Expression von Genen untersucht, welche repräsentativ für eine eher neonatale Zusammensetzung der extrazellulären Matrix sind. Die Transkriptomanalysen ergaben in dKO Herzen eine Hochregulation der untersuchten Gene, welche durch eine Behandlung mit UO26 oder einer zusätzlichen Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* normalisiert wurden. Auffallend war insbesondere die Hochregulation von *Agrin* und *Periostin*, zwei Proteine welche nicht nur repräsentativ für eine neonatale Komposition der extrazellulären Matrix sind, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Regeneration des Herzens spielen (Bassat, Mutlak et al. 2017, Chen, Xie et al. 2017). Aufgrund mehrerer Studien, welche sich mit der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im Zusammenhang mit der Herzregeneration auseinandersetzten (Hortells, Johansen et

al. 2019, Silva, Pereira et al. 2020), könnte die veränderte Komposition der extrazellulären Matrix nach einem Verlust von miR-1/133a die Regeneration des adulten Herzens nach einer Verletzung wie beispielsweise einem Myokardinfarkt unterstützen.

#### **4.5 Die erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 nach Verlust von miR-1/133a führt zu einer Änderung des Metabolismus**

Während der Entwicklung des Herzens kommt es nicht nur zu einem Verlust der Proliferationsfähigkeit und finalen Differenzierung von Kardiomyozyten, sondern auch zu Veränderungen des Energie-Metabolismus. In der frühen Entwicklung des Herzens betreiben Kardiomyozyten vermehrt einen glykolytischen Stoffwechsel, während bei differenzierten Kardiomyozyten der Stoffwechsel von Glykolyse auf die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren umgestellt wird. Begründet wird dies unter anderem durch die Veränderung der Aufgabe und Nährstoffverfügbarkeit des adulten Herzens (Guo and Pu 2020).

Da ein Verlust von miR-1/133a zu einer Veränderung der extrazellulären Matrixkomposition führt, welche einhergeht mit der Dedifferenzierung von Kardiomyozyten und deren Wiedereintritt in den Zellzyklus, wurde die Annahme untersucht, dass es auf Grund des eher neonatalen Phänotyps der dKO Kardiomyozyten auch zu metabolischen Veränderungen kommt. Mittels Transkriptomanalysen konnte in dKO Kardiomyozyten eine verringerte Expression von Genen festgestellt werden, welche eine Rolle beim Fettstoffwechsel und der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren spielen, während die Expression von Genen die im Zusammenhang mit der Glykolyse stehen hochreguliert war. Die Transkriptomanalysen wurden durch weitere metabolomische Analysen unterstützt indem diese neben der Herunterregulation des Fettsäurestoffwechsels auch eine stark reduzierte Konzentration von Acyl-CoA aufzeigten. Zudem konnte auch ein Anstieg von freien Aminosäuren festgestellt werden, welche vermutlich auf die reduzierte oxidative Phosphorylierung in dKO Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Da eine Herunterregulation des Fettstoffwechsels nicht automatisch mit einem Anstieg der Glykolyse verbunden ist, wurde in einem Experiment die oxidative und glykolytische Aktivität von isolierten dKO Kardiomyozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es, neben einer Abnahme der Fettsäureoxidation,

auch zu einem Anstieg der Glykolyse kommt. Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme, dass es in adulten dKO Kardiomyozyten zu einer Veränderung des Metabolismus kommt, welcher dem Metabolismus von unreifen Kardiomyozyten ähnelt.

Einige Studien, die sich mit dem Metabolismus von Kardiomyozyten im Zusammenhang mit der Regeneration des Herzens befassen, zeigen, dass sich eine Hemmung des Fettstoffwechsels (Lim 2020) oder eine Stimulation der Glykolyse sich nicht nur positiv auf die Proliferation von Kardiomyozyten auswirkt, sondern auch auf die Regeneration des Herzens (Fukuda, Marin-Juez et al. 2020, Martik 2020, Bae, Paltzer et al. 2021). Dabei reduziert der Wechsel von der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren hin zur Glykolyse den Sauerstoffverbrauch, was eine Veränderung der Sarkomerstruktur zur Folge hat (Bayeva and Ardehali 2010). Diese Studien stimmen mit unseren Daten überein und führen zu der Annahme, dass die metabolischen Veränderungen der dKO Kardiomyozyten, neben der Dedifferenzierung und Veränderung der extrazellulären Matrixkomposition, zum proproliferativen Zustand der dKO Kardiomyozyten beitragen.

Dabei scheinen die metabolischen Veränderungen unseren Studien nach abhängig von der Hochregulation von *Osmr* und *Fgfr1* zu sein, da eine zusätzliche Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* die metabolischen Veränderungen wieder normalisierte.

#### **4.6 Der Verlust von miR-1/133a führt zu einer erhöhten Hypoxieresistenz und zu einer kleineren Narbe nach einem Myokardinfarkt**

Die Dedifferenzierung von dKO Kardiomyozyten, welche einhergeht mit einer reduzierten Expression kontraktile Proteine, und der metabolischen Veränderung von der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren hin zur Glykolyse lässt darauf schließen, dass die dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten eine erhöhte Hypoxieresistenz aufweisen könnten. Diese Annahme wurde mittels isolierten Kardiomyozyten untersucht die für 18 Std. hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden. Mittels Zellviabilitätsassays konnte nach Hypoxie in dKO Kardiomyozyten im Vergleich zu WT Kardiomyozyten eine signifikant geringere Menge an toten Zellen nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* führte nach Hypoxie zu einer erhöhten Anzahl von toten Zellen im Vergleich zu dKO Kardiomyozyten.

Diese Ergebnisse unterstützten die vorausgegangene Annahme, dass dKO Kardiomyozyten eine erhöhte Hypoxieresistenz aufweisen. Auch im Falle der zusätzlichen Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* stimmen die Ergebnisse mit vorherigen Daten überein. Da in den vorangegangenen Untersuchungen eine zusätzliche Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* sowohl die erhöhte Expression der Gene, welche für die Dedifferenzierung von Kardiomyozyten eine Rolle spielen, als auch die metabolischen Veränderungen von der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren hin zur Glyskolyse normalisierte, war keine erhöhte Hypoxieresistenz zu erwarten.

Eine Behandlung von adulten WT Kardiomyozyten mit Etomoxir 12 Std. bevor diese hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden, verbesserte die Hypoxieresistenz und führte zu einer geringeren Anzahl toter Zellen in Etomoxir behandelten WT Kardiomyozyten im Vergleich zu unbehandelten Kardiomyozyten. Dabei war die Anzahl toter Zellen in Etomoxir behandelten WT Kardiomyozyten jedoch vergleichsweise höher als die Anzahl toter Zellen in dKO Kardiomyozyten. Dies lässt vermuten, dass die Etomoxir behandelten WT Kardiomyozyten aufgrund der reduzierten Fettsäureoxidation zwar dem Phänotyp der dKO Kardiomyozyten ähneln, jedoch eine Reduktion der Fettsäureoxidation allein nicht ausreicht, um eine ähnlich gute Hypoxieresistenz wie die der dKO Kardiomyozyten aufzuweisen.

Bei einer genaueren Untersuchung des Zelltodes konnte keinerlei Unterschied in Bezug auf Apoptose nachgewiesen werden, jedoch konnte eine signifikante Verringerung der Nekrose festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die erhöhte Anzahl lebender Zellen in dKO Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen nicht von einem programmierten Zelltod abhängig ist. Obwohl Studien zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen und bei Herzinsuffizienzen sowohl Apoptose, als auch Nekrose eine Rolle spielen können (Chiong, Wang et al. 2011), sprechen neben den Ergebnissen des Apoptose und Nekrose Assays weitere Punkte dafür, dass der Unterschied in der Anzahl toter Zellen in unserem Falle nicht auf eine Veränderung in Bezug der Apoptose zurückzuführen ist, da auch mit Western Blot Analysen sowohl Caspase 3 als auch Parp untersucht wurde und keinerlei Unterschiede zwischen dKO Kardiomyozyten und WT Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte.

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, führt ein Verlust von miR-1/133a zu einer Dedifferenzierung von Kardiomyozyten die einhergeht mit einem Wiedereintritt in den Zellzyklus und einem veränderten Metabolismus. All diese Veränderungen tragen zu einer erhöhten Hypoxieresistenz bei und ähneln dem Phänotyp von unreifen Kardiomyozyten. Daher könnte sich ein Verlust von miR-1/133a nach einem Myokardinfarkt positiv auf die Regeneration und Funktion des Herzens auswirken. Jedoch führt ein miR-1/133a Verlust auf Dauer zu einer dilatativen Kardiomyopathie, die durch eine zusätzliche Deletion von *Osmr* oder *Fgfr1* nicht verhindert werden konnte. Um aber die putativen positiven Auswirkungen des dKO Phänotypes auf die Regeneration des Herzens zu untersuchen, wurden miR-1/133a mittels LNA-Injektion in sKO Tieren nicht dauerhaft, sondern vorübergehend inhibiert. Die immunhistochemischen Analysen ergaben im Vergleich zu WT Tieren einen ca. 50 % kleineren Infarktbereich in sKO Tieren denen eine Woche vor dem Myokardinfarkt zusätzlich noch LNA injiziert wurden. Im Vergleich dazu konnte in sKO Tieren, denen zuvor keine LNAs injiziert wurden im Vergleich zu WT Tieren keine Unterschiede in der Infarktgröße festgestellt werden. Dies liegt vermutlich daran, dass sKO Tiere keine offensichtlichen Veränderungen in der Kardiomyozytenphysiologie aufweisen (Besser, Malan et al. 2014) und das neben dem Knockout eines Clusters eine zusätzliche Inhibierung der durch das zweite miR-1/133a Clusters exprimierten miRNAs durch LNAs notwendig ist, um eine positive Auswirkung auf die Regeneration und Funktion des Herzens zu erzielen.

Auch wenn sich ein vorübergehender Verlust von miR-1/133a positiv auf die Regeneration des Herzens auswirkt, ist nicht sicher, ob das auch auf die Wechselwirkung zwischen den miRNAs und den Rezeptoren zurückzuführen ist. Daher wurden die Expressionen von miR-1/133a und den Rezeptoren *OSMR* und *FGFR1* nach einem Myokardinfarkt bei Mäusen und bei verschiedenen Erkrankungen des humanen Herzens in humanen Proben von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) untersucht.

Mittels Immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine Hochregulation von *OSMR* und *FGFR1* sowohl im ischämischen Bereich von ICM Patienten, als auch im Infarktbereich bei

Mäusen sieben Tage nach einem akuten Myokardinfarkt nachgewiesen werden, welche weiterhin durch RT-PCR und Western Blot Analysen verifiziert werden konnten. Im nicht-ischämischen Bereich von ICM Patienten und im nicht infarzierten Bereich bei Mäusen konnte zudem keinerlei Hochregulation von OSMR oder FGFR1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle von *Osmr* und *Fgfr1* sowohl bei einer Herzinsuffizienz als auch nach einem akuten Myokardinfarkt hin. Da *Osmr* als auch *Fgfr1* nach einem Myokardinfarkt gerade in der Grenzzone stark exprimiert sind deutet dies darauf hin, dass die Kardiomyozyten versuchen bei bestimmten pathologischen Bedingungen eine Dedifferenzierung einzuleiten, um so eine verbesserte Resistenz gegenüber widrigen Bedingungen zu erlangen. Dabei ist die Hochregulation von OSMR und FGFR1 größtenteils auf positive Rückkopplungsschleifen zurückzuführen, bei denen die Konzentration der Rezeptoren simultan mit der Konzentration des entsprechenden Liganden ansteigt (Kubin, Poling et al. 2011).

Weiterhin konnten wir in der Grenzzone des Infarktgebietes und in DCM Patienten neben der Hochregulation von OSMR und FGFR1 eine Runterregulation von miR-1 und miR-133a feststellen (Bostjancic, Zidar et al. 2009, Danowski, Manthey et al. 2013, Ferreira, Frade et al. 2014), welche die vorangegangene Annahme einer Wechselwirkung zwischen den miRNAs und den Rezeptoren unterstützt.

#### **4.7 Wissenschaftliche Erkenntnisse und Ausblick**

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die miRNAs miR-1 und miR-133a durch die Inhibierung von *Osmr* und *Fgfr1* den differenzierten Zustand von Kardiomyozyten aufrechterhalten. Zusammenfassend verändern sich die im Herzen ablaufenden Prozesse nach einem Verlust von miR-1/133a in Richtung eines fetalen Genprogramms. Dabei kommt es nicht nur zu einer Dedifferenzierung der adulten Kardiomyozyten, sondern auch zu einer erhöhten Zellzyklusaktivität, einer veränderten Komposition der extrazellulären Matrix und einer erhöhten Hypoxieresistenz. Ein langfristiger Verlust von miR-1/133a hat allerdings eine dilatative Kardiomyopathie zur Folge, während sich ein kurzfristiger Verlust positiv auf die Regeneration des Herzens nach einem Myokardinfarkt auswirkt (Abbildung 31). Hierbei

scheinen die durch den Verlust von miR-1/133a induzierten zellulären Veränderungen während der Zeit der Verletzung wirksam zu werden, was wahrscheinlicher für eine Schutzfunktion des umprogrammierten Metabolismus und der extrazellulären Matrix spricht, als für vorteilhafte Effekte des Wiedereintritts in den Zellzyklus dedifferenzierter Kardiomyozyten. Weiterhin konnte sieben Tage nach einem Myokardinfarkt bei Mäusen eine verringerte Expression von miR-1/133a im Infarktbereich, im Vergleich zum nicht infarzierten Bereich, nachgewiesen werden, während die Expression von *Osmr* und *Fgfr1* im Infarktbereich erhöht war. Dies lässt auf eine Wechselwirkung von miR-1/133a und den Rezeptoren *Osmr* und *Fgfr1* schließen. Zudem konnte diese Wechselwirkung auch in Patienten mit einer ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass diese Wechselwirkung bei Herzerkrankungen eine essenzielle Rolle spielt. Zieht man dabei die positiven Auswirkungen eines kurzfristigen miR-1/133a Verlustes in Betracht, scheint es offensichtlich ein Zeitfenster zu geben, bei dem der Verlust von miR-1/133a therapeutisch genutzt werden könnte. Dabei müsste die Inhibierung von miR-1/133a jedoch vor einem Myokardinfarkt erfolgen, um den differenzierten Kardiomyozyten somit ausreichend Zeit zu geben sich in Richtung eines fetalen Genprogramms umzustellen. Erfolgt die Inhibierung verspätet käme es vermutlich zu keiner Verbesserung der Regeneration des Herzens nach einem Myokardinfarkt.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Behandlung mit dem MEK/ERK Inhibitor UO126 oder eine zusätzliche Deletion von *Osmr* und *Fgfr1* die charakteristische Signatur des neonatalen Phänotyps der dKO Kardiomyozyten aufhob, was darauf hindeutet, dass die neonatal ähnliche Komposition der extrazellulären Matrix, die Dedifferenzierung und die erhöhte Zellzyklusaktivität eng miteinander verbunden sind.

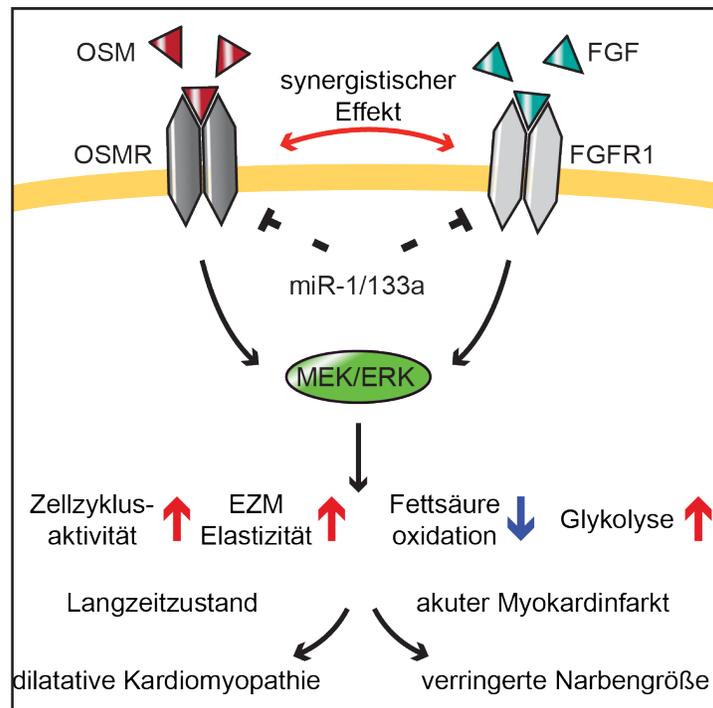
Jedoch konnte in dieser Arbeit die Funktion von miR-1/133a im Herzen nur partiell gelöst werden, was zu weiteren Fragen führt, die nicht vollständig geklärt wurden. Im Falle der erhöhten Zellzyklusaktivität konnte zwar neben der erhöhten DNA-Synthese auch eine erhöhte Expression von Zellzyklusgenen und Anilin, welches bei der Cytokinese beteiligt ist, nachgewiesen werden, jedoch keinerlei Aurora B Färbung. Somit hängt die erhöhte Zellzyklusaktivität

der dKO Kardiomyozyten nicht automatisch mit einer Zellteilung zusammen. Allerdings konnte die Effizienz der Zellzyklusaktivität in dKO Kardiomyozyten mittels Agrin Behandlung gesteigert werden. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust von miR-1/133a zu einer erhöhten Zellzyklusaktivität führt deren Effizienz durch proproliferative Behandlung verstärkt werden kann aber letztlich essenzielle Signale fehlen, welche zu einer anschließenden Zellteilung führen würden. Dahingehend könnten sich zukünftige Untersuchungen damit auseinandersetzen den dedifferenzierten Zustand der dKO Kardiomyozyten zu nutzen um mittels der notwendigen proproliferativen Stimulation eine Zellteilung zu induzieren.

Ein weiterer Punkt, der genauer untersucht werden müsste, wäre die Resistenz der dKO Kardiomyozyten gegenüber hypoxischen Bedingungen. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die erhöhte Hypoxieresistenz der Kardiomyozyten nach einem Verlust von miR-1/133a nicht auf eine Veränderung in Bezug der Apoptose zurückzuführen ist, sondern auf eine Verringerung der Nekrose. Diese Ergebnisse liefern zwar erste Hinweise in Bezug auf die „Schutzwirkung“ des Verlustes von miR-1/133a, allerdings wäre eine genauere Untersuchung wie beispielsweise in Bezug auf Autophagozytose, Mitochondrien oder potentielle Regulatoren (z.B Gene, Proteine, Moleküle etc.) erstrebenswert.

Da die miRNAs miR-1 und miR-133a im Herzen abundant sind, wäre auch die Untersuchung anderer putativer Zielgene interessant. Neben *Osmr* und *Fgfr1* konnten weitere noch unbekannt putative Zielgene nachgewiesen werden. Da diese Zielgene im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurden, ist nicht geklärt welche Rolle das Zusammenspiel dieser Gene mit miR-1/133a in Kardiomyozyten spielt.

Zusammenfassend könnte eine umfassendere Analyse putativer synergistischer Effekte von einem miR-1/133a Verlust in Kardiomyozyten Antworten in Bezug auf die Transkriptionsregulation und Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes von Kardiomyozyten liefern, welche wiederum bei Herzerkrankungen in Zukunft therapeutisch genutzt werden könnten.



**Abbildung 31 – Die Repression von *Osmr* und *Fgfr1* durch *miR-1* und *miR-133a* verhindert die Dedifferenzierung von Kardiomyozyten und den Zellzykluseintritt im adulten Herzen.**

Die Aktivierung von OSMR und FGFR1 führt zu einer erhöhten MEK/ERK Signalübertragung, die für die Induktion der Dedifferenzierung von Kardiomyozyten erforderlich ist. Damit verbunden ist ein Zellzykluseintritt der Kardiomyozyten, eine erhöhte Elastizität der extrazellulären Matrix, verringerte Fettsäureoxidation und eine erhöhte Glykolyse. Die miRNAs *miR-1* und *miR-133a* unterdrücken die Expression der OSMR und FGFR Rezeptoren und halten Kardiomyozyten dadurch in einem differenzierten Zustand.

Ein kurzfristiger Verlust von *miR-1/133a* wirkt sich positiv auf die Regeneration des Herzens nach einem akuten Myokardinfarkt aus. Eine Langzeit-Inaktivierung jedoch hat eine dilatative Kardiomyopathie zur Folge.

## Literatur

- [1] AGARWAL, V., BELL, G. W., NAM, J. W., AND BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4 (2015).
- [2] AGUIRRE, A., MONTERRAT, N., ZACCHIGNA, S., NIVET, E., HISHIDA, T., KRAUSE, M. N., KURIAN, L., OCAMPO, A., VAZQUEZ-FERRER, E., RODRIGUEZ-ESTEBAN, C., KUMAR, S., MORESCO, J. J., YATES, J. R., R., CAMPISTOL, J. M., SANCHO-MARTINEZ, I., GIACCA, M., AND IZPISUA BELMONTE, J. C. In vivo activation of a conserved microRNA program induces mammalian heart regeneration. *Cell Stem Cell* 15, 5 (2014), 589–604.
- [3] AHUJA, P., SDEK, P., AND MACLELLAN, W. R. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 87, 2 (2007), 521–44.
- [4] ALLES, J., FEHLMANN, T., FISCHER, U., BACKES, C., GALATA, V., MINET, M., HART, M., ABU-HALIMA, M., GRASSER, F. A., LENHOF, H. P., KELLER, A., AND MEESE, E. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res* 47, 7 (2019), 3353–3364.
- [5] AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 7006 (2004), 350–5.
- [6] ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M., AND SHERLOCK, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. the gene ontology consortium. *Nat Genet* 25, 1 (2000), 25–9.
- [7] AUMÜLLER, G. *Anatomie*. Georg Thieme, Stuttgart, 2010.
- [8] AURORA, A. B., MAHMOUD, A. I., LUO, X., JOHNSON, B. A., VAN ROOIJ, E., MATSUZAKI, S., HUMPHRIES, K. M., HILL, J. A., BASSEL-DUBY, R., SADEK, H. A., AND OLSON, E. N. MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca<sup>2+</sup> overload and cell death. *Journal of Clinical Investigation* 122, 4 (2012), 1222–1232.
- [9] AUSMA, J., WLIFFELS, M., VAN EYS, G., KOIDE, M., RAMAEKERS, F., ALLESSIE, M., AND BORGERS, M. Dedifferentiation of atrial cardiomyocytes as a result of chronic atrial fibrillation. *American Journal of Pathology* 151, 4 (1997), 985–997.
- [10] BAE, J., PALTZER, W. G., AND MAHMOUD, A. I. The role of metabolism in heart failure and regeneration. *Front Cardiovasc Med* 8 (2021), 702920.
- [11] BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 2 (2004), 281–97.
- [12] BASKERVILLE, S., AND BARTEL, D. P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 11, 3 (2005), 241–7.
- [13] BASSAT, E., MUTLAK, Y. E., GENZELINAKH, A., SHADRIN, I. Y., BARUCH UMANSKY, K., YIFA, O., KAIN, D., RAJCHMAN, D., LEACH, J., RIABOV BASSAT, D., UDI, Y., SARIG, R., SAGI, I., MARTIN, J. F., BURSAC, N., COHEN, S., AND TZAHOR, E. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature* 547, 7662 (2017), 179–184.
- [14] BAUERSACHS, J., AND THUM, T. Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs. *Circ Res* 109, 3 (2011), 334–47.
- [15] BAYEVA, M., AND ARDEHALI, H. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage to sarcomeric proteins. *Curr Hypertens Rep* 12, 6 (2010), 426–32.
- [16] BEENKEN, A., AND MOHAMMADI, M. The fgf family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8, 3 (2009), 235–53.
- [17] BERGMANN, O., BHARDWAJ, R. D., BERNARD, S., ZDUNEK, S., BARNABE-HEIDER, F., WALSH, S., ZUPICICH, J., ALKASS, K., BUCHHOLZ, B. A., DRUID, H., JOVINGE, S., AND FRISEN, J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 5923 (2009), 98–102.
- [18] BERNARDO, B. C., GAO, X. M., WINBANKS, C. E., BOEY, E. J., THAM, Y. K., KIRIAZIS, H., GREGOREVIC, P., OBAD, S., KAUPPINEN, S., DU, X. J., LIN, R. C., AND MCMULLEN, J. R. Therapeutic inhibition of the mir-34

- family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 43 (2012), 17615–20.
- [19] BERTERO, E., AND C., M. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol* (2018).
- [20] BESSER, J., MALAN, D., WYSTUB, K., BACHMANN, A., WIETELMANN, A., SASSE, P., FLEISCHMANN, B. K., BRAUN, T., AND BOETTGER, T. Mirna-1/133a clusters regulate adrenergic control of cardiac repolarization. *PLoS One* 9, 11 (2014), e113449.
- [21] BETEL, D., KOPPAL, A., AGIUS, P., SANDER, C., AND LESLIE, C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 11, 8 (2010), R90.
- [22] BHATTACHARYA, N., GHOSH, S., SEPT, D., AND COOPER, J. A. Binding of myotrophin/v-1 to actin-capping protein - implications for how capping protein binds to the filament barbed end. *Journal of Biological Chemistry* 281, 41 (2006), 31021–31030.
- [23] BOETTGER, T., AND BRAUN, T. A new level of complexity: the role of microRNAs in cardiovascular development. *Circ Res* 110, 7 (2012), 1000–13.
- [24] BONAUE, A., CARMONA, G., IWASAKI, M., MIONE, M., KOYANAGI, M., FISCHER, A., BURCHFIELD, J., FOX, H., DOEBELE, C., OHTANI, K., CHAVAKIS, E., POTENTE, M., TJWA, M., URBICH, C., ZEIHNER, A. M., AND DIMMELER, S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 324, 5935 (2009), 1710–3.
- [25] BOON, R. A., AND DIMMELER, S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* 12, 3 (2015), 135–42.
- [26] BOON, R. A., IEKUSHI, K., LECHNER, S., SEEGER, T., FISCHER, A., HEYDT, S., KALUZA, D., TREGUER, K., CARMONA, G., BONAUE, A., HORREVOETS, A. J., DIDIER, N., GIRMATSION, Z., BILICZKI, P., EHRLICH, J. R., KATUS, H. A., MULLER, O. J., POTENTE, M., ZEIHNER, A. M., HERMEKING, H., AND DIMMELER, S. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 495, 7439 (2013), 107–10.
- [27] BOON, R. A., SEEGER, T., HEYDT, S., FISCHER, A., HERGENREIDER, E., HORREVOETS, A. J., VINCIGUERRA, M., ROSENTHAL, N., SCIACCA, S., PILATO, M., VAN HEIJNINGEN, P., ESSERS, J., BRANDES, R. P., ZEIHNER, A. M., AND DIMMELER, S. MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circ Res* 109, 10 (2011), 1115–9.
- [28] BORCHERT, G. M., LANIER, W., AND DAVIDSON, B. L. Rna polymerase iii transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 12 (2006), 1097–101.
- [29] BOSTJANCIC, E., ZIDAR, N., AND GLAVAC, D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. *Dis Markers* 27, 6 (2009), 255–68.
- [30] BUCKINGHAM, M., MEILHAC, S., AND ZAFFRAN, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6, 11 (2005), 826–35.
- [31] CAI, X. Z., HAGEDORN, C. H., AND CULLEN, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* 10, 12 (2004), 1957–1966.
- [32] CAMPBELL, N. A., AND REECE, J. B. *Biologie*. Pearson Studium, 2009.
- [33] CARE, A., CATALUCCI, D., FELICETTI, F., BONCI, D., ADDARIO, A., GALLO, P., BANG, M. L., SEGALINI, P., GU, Y., DALTON, N. D., ELIA, L., LATRONICO, M. V., HOYDAL, M., AUTORE, C., RUSSO, M. A., DORN, G. W., N., ELLINGSEN, O., RUIZ-LOZANO, P., PETERSON, K. L., CROCE, C. M., PESCHLE, C., AND CONDORELLI, G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13, 5 (2007), 613–8.
- [34] CESANA, M., CACCHIARELLI, D., LEGNINI, I., SANTINI, T., STHANDIER, O., CHINAPPI, M., TRAMONTANO, A., AND BOZZONI, I. A long noncoding rna controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous rna. *Cell* (2011).
- [35] CHEHREHASA, F., MEEDENIYA, A. C., DWYER, P., ABRAHAMSEN, G., AND MACKAY-SIM, A. Edu, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods* 177, 1 (2009), 122–30.

- [36] CHEN, J. F., MANDEL, E. M., THOMSON, J. M., WU, Q., CALLIS, T. E., HAMMOND, S. M., CONLON, F. L., AND WANG, D. Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38, 2 (2006), 228–33.
- [37] CHEN, L., HEIKKINEN, L., WANG, C., YANG, Y., SUN, H., AND WONG, G. Trends in the development of mirna bioinformatics tools. *Brief Bioinform* 20, 5 (2019), 1836–1852.
- [38] CHEN, Z., XIE, J., HAO, H., LIN, H., WANG, L., ZHANG, Y., CHEN, L., CAO, S., HUANG, X., LIAO, W., BIN, J., AND LIAO, Y. Ablation of periostin inhibits post-infarction myocardial regeneration in neonatal mice mediated by the phosphatidylinositol 3 kinase/glycogen synthase kinase 3beta/cyclin d1 signalling pathway. *Cardiovasc Res* 113, 6 (2017), 620–632.
- [39] CHIONG, M., WANG, Z. V., PEDROZO, Z., CAO, D. J., TRONCOSO, R., IBACACHE, M., CRIOLLO, A., NEMCHENKO, A., HILL, J. A., AND LAVANDERO, S. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis* 2 (2011), e244.
- [40] COLLABORATORS, G. B. D. C. o. D. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet* 392, 10159 (2018), 1736–1788.
- [41] COLLABORATORS, G. B. D. C. o. D. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet* 392, 10159 (2018), 1736–1788.
- [42] CORDES, K. R., AND SRIVASTAVA, D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ Res* 104, 6 (2009), 724–32.
- [43] DA COSTA MARTINS, P. A., SALIC, K., GLADKA, M. M., ARMAND, A. S., LEPTIDIS, S., EL AZZOUZI, H., HANSEN, A., COENEN-DE ROO, C. J., BIERHUIZEN, M. F., VAN DER NAGEL, R., VAN KUIK, J., DE WEGER, R., DE BRUIN, A., CONDORELLI, G., ARBONES, M. L., ESCHENHAGEN, T., AND DE WINDT, L. J. MicroRNA-199b targets the nuclear kinase dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/nfat signalling. *Nat Cell Biol* 12, 12 (2010), 1220–7.
- [44] DAI, S., ZHOU, Z., CHEN, Z., XU, G., AND CHEN, Y. Fibroblast growth factor receptors (fgfrs): Structures and small molecule inhibitors. *Cells* 8, 6 (2019).
- [45] D’ALESSANDRA, Y., DEVANNA, P., LIMANA, F., STRAINO, S., DI CARLO, A., BRAMBILLA, P. G., RUBINO, M., CARENA, M. C., SPAZZAFUMO, L., DE SIMONE, M., MICHELI, B., BIGLIOLI, P., ACHILLI, F., MARTELLI, F., MAGGIOLINI, S., MARENZI, G., POMPILIO, G., AND CAPOGROSSI, M. C. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 31, 22 (2010), 2765–73.
- [46] DANOWSKI, N., MANTHEY, I., JAKOB, H. G., SIFFERT, W., PETERS, J., AND FREY, U. H. Decreased expression of mir-133a but not of mir-1 is associated with signs of heart failure in patients undergoing coronary bypass surgery. *Cardiology* 125, 2 (2013), 125–30.
- [47] DAS, B., GUPTA, S., VASANJI, A., XU, Z., MISRA, S., AND SEN, S. Nuclear co-translocation of myotrophin and p65 stimulates myocyte growth. regulation by myotrophin hairpin loops. *J Biol Chem* 283, 41 (2008), 27947–27956.
- [48] DELL’ERA, P., RONCA, R., COCO, L., NICOLI, S., METRA, M., AND PRESTA, M. Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circulation Research* 93, 5 (2003), 414–420.
- [49] DENLI, A. M., TOPS, B. B., PLASTERK, R. H., KETTING, R. F., AND HANNON, G. J. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 432, 7014 (2004), 231–5.
- [50] DOENST, T., NGUYEN, T. D., AND ABEL, E. D. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res* 113, 6 (2013), 709–24.
- [51] DOREY, K., AND AMAYA, E. Fgf signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 137, 22 (2010), 3731–42.
- [52] DRENCKHAHN, J. D., SCHWARZ, Q. P., GRAY, S., LASKOWSKI, A., KIRIAZIS, H., MING, Z., HARVEY, R. P., DU, X. J., THORBURN, D. R., AND COX, T. C. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev Cell* 15, 4 (2008), 521–33.

- [53] DRIESEN, R. B., VERHEYEN, F. K., DEBIE, W., BLAAUW, E., BABIKER, F. A., CORNELUSSEN, R. N. M., AUSMA, J., LENDERS, M. H., BORGERS, M., CHAPONNIER, C., AND RAMAEKERS, F. C. S. Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 5 (2009), 896–908.
- [54] EDEN, E., LIPSON, D., YOGEV, S., AND YAKHINI, Z. Discovering motifs in ranked lists of dna sequences. *PLoS Comput Biol* 3, 3 (2007), e39.
- [55] EDEN, E., NAVON, R., STEINFELD, I., LIPSON, D., AND YAKHINI, Z. Gorilla: a tool for discovery and visualization of enriched go terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10 (2009), 48.
- [56] ENGEL, F. B., HSIEH, P. C., LEE, R. T., AND KEATING, M. T. Fgf1/p38 map kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 42 (2006), 15546–51.
- [57] EULALIO, A., MANO, M., DAL FERRO, M., ZENTILIN, L., SINAGRA, G., ZACCHIGNA, S., AND GIACCA, M. Functional screening identifies mirnas inducing cardiac regeneration. *Nature* 492, 7429 (2012), 376–81.
- [58] FAN, D., TAKAWALE, A., LEE, J., AND KASSIRI, Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, 1 (2012), 15.
- [59] FENG, Y., NIU, L. L., WEI, W., ZHANG, W. Y., LI, X. Y., CAO, J. H., AND ZHAO, S. H. A feedback circuit between mir-133 and the erk1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation. *Cell Death & Disease* 4 (2013).
- [60] FERREIRA, L. R., FRADE, A. F., SANTOS, R. H., TEIXEIRA, P. C., BARON, M. A., NAVARRO, I. C., BENVENUTI, L. A., FIORELLI, A. I., BOCCHI, E. A., STOLF, N. A., CHEVILLARD, C., KALIL, J., AND CUNHA-NETO, E. Micrnas mir-1, mir-133a, mir-133b, mir-208a and mir-208b are dysregulated in chronic chagas disease cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 175, 3 (2014), 409–17.
- [61] FIELD, C. M., AND ALBERTS, B. M. Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex. *Journal of Cell Biology* 131, 1 (1995), 165–178.
- [62] FOGLIA, M. J., AND POSS, K. D. Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation. *Development* 143, 5 (2016), 729–40.
- [63] FON TACER, K., BOOKOUT, A. L., DING, X., KUROSU, H., JOHN, G. B., WANG, L., GOETZ, R., MOHAMMADI, M., KURO-O, M., MANGELSDORF, D. J., AND KLEWER, S. A. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* 24, 10 (2010), 2050–64.
- [64] FUKUDA, R., MARIN-JUEZ, R., EL-SAMMAK, H., BEISAW, A., RAMADASS, R., KUENNE, C., GUENTHER, S., KONZER, A., BHAGWAT, A. M., GRAUMANN, J., AND STAINIER, D. Y. Stimulation of glycolysis promotes cardiomyocyte proliferation after injury in adult zebrafish. *EMBO Rep* 21, 8 (2020), e49752.
- [65] GEARING, D. P., COMEAU, M. R., FRIEND, D. J., GIMPEL, S. D., THUT, C. J., MCGOURTY, J., BRASHER, K. K., KING, J. A., GILLIS, S., MOSLEY, B., AND ET AL. The il-6 signal transducer, gp130: an oncostatin m receptor and affinity converter for the lif receptor. *Science* 255, 5050 (1992), 1434–7.
- [66] GREGORY, R. I., YAN, K. P., AMUTHAN, G., CHENDRIMADA, T., DORATOTAJ, B., COOCH, N., AND SHIEKHATTAR, R. The microprocessor complex mediates the genesis of micrnas. *Nature* 432, 7014 (2004), 235–40.
- [67] GUNTHEL, M., BARNETT, P., AND CHRISTOFFELS, V. M. Development, proliferation, and growth of the mammalian heart. *Mol Ther* 26, 7 (2018), 1599–1609.
- [68] GUO, S., LI, Z. Z., GONG, J., XIANG, M., ZHANG, P., ZHAO, G. N., LI, M., ZHENG, A., ZHU, X., LEI, H., MINORU, T., AND LI, H. Oncostatin m confers neuroprotection against ischemic stroke. *J Neurosci* 35, 34 (2015), 12047–62.
- [69] GUO, Y., AND PU, W. T. Cardiomyocyte maturation: New phase in development. *Circ Res* 126, 8 (2020), 1086–1106.
- [70] HASHIMOTO, H., OLSON, E. N., AND BASSEL-DUBY, R. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. *Nat Rev Cardiol* 15, 10 (2018), 585–600.

- [71] HASHMI, S., AND AHMAD, H. R. Molecular switch model for cardiomyocyte proliferation. *Cell Regen* 8, 1 (2019), 12–20.
- [72] HAUBNER, B. J., SCHNEIDER, J., SCHWEIGMANN, U., SCHUETZ, T., DICHTL, W., VELIK-SALCHNER, C., STEIN, J. I., AND PENNINGER, J. M. Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction. *Circ Res* 118, 2 (2016), 216–21.
- [73] HEIDERSBACH, A., SAXBY, C., CARVER-MOORE, K., HUANG, Y., ANG, Y. S., DE JONG, P. J., IVEY, K. N., AND SRIVASTAVA, D. microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *Elife* 2 (2013), e01323.
- [74] HEINRICH, E. M., AND DIMMELER, S. Micrnas and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment. *Circ Res* 110, 7 (2012), 1014–22.
- [75] HERMANN, H. M. Oncostatin m and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 26, 5 (2015), 545–58.
- [76] HERMANN, H. M., RADTKE, S., SCHAPER, F., HEINRICH, P. C., AND BEHRMANN, I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. the adapter protein shc is specifically recruited to rhe oncostatin m receptor. *J Biol Chem* 275, 52 (2000), 40742–8.
- [77] HORAK, M., NOVAK, J., AND BIENERTOVA-VASKU, J. Muscle-specific micrnas in skeletal muscle development. *Dev Biol* 410, 1 (2016), 1–13.
- [78] HORTELLS, L., JOHANSEN, A. K. Z., AND YUTZEY, K. E. Cardiac fibroblasts and the extracellular matrix in regenerative and nonregenerative hearts. *J Cardiovasc Dev Dis* 6, 3 (2019).
- [79] HOU, Y., ADRIAN-SEGARRA, J. M., RICHTER, M., KUBIN, N., SHIN, J., WERNER, I., WALTHER, T., SCHONBURG, M., POLING, J., WARNECKE, H., BRAUN, T., KOSTIN, S., AND KUBIN, T. Animal models and omics technologies for identification of novel biomarkers and drug targets to prevent heart failure. *Biomed Res Int* 2015 (2015), 212910.
- [80] HSU, R. J., YANG, H. J., AND TSAI, H. J. Labeled microrna pull-down assay system: an experimental approach for high-throughput identification of microrna-target mrnas. *Nucleic Acids Res* 37, 10 (2009), e77.
- [81] HU, J. Q., ZHANG, L., ZHAO, Z. J., ZHANG, M. M., LIN, J., WANG, J. X., YU, W. J., MAN, W. R., LI, C. Y., ZHANG, R. Q., GAO, E. H., WANG, H. C., AND SUN, D. D. Osm mitigates post-infarction cardiac remodeling and dysfunction by up-regulating autophagy through mst1 suppression. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1863, 8 (2017), 1951–1961.
- [82] HU, S., HUANG, M., NGUYEN, P. K., GONG, Y., LI, Z., JIA, F., LAN, F., LIU, J., NAG, D., ROBBINS, R. C., AND WU, J. C. Novel microrna pro-survival cocktail for improving engraftment and function of cardiac progenitor cell transplantation. *Circulation* 124, 11 Suppl (2011), S27–34.
- [83] ICLI, B., WARA, A. K., MOSLEHI, J., SUN, X., PLOVIE, E., CAHILL, M., MARCHINI, J. F., SCHISLER, A., PADERA, R. F., SHI, J., CHENG, H. W., RAGHURAM, S., ARANY, Z., LIAO, R., CROCE, K., MACRAE, C., AND FEINBERG, M. W. Microrna-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting bmp/smad1 signaling. *Circ Res* 113, 11 (2013), 1231–41.
- [84] ITOH, N., AND OHTA, H. Pathophysiological roles of fgf signaling in the heart. *Front Physiol* 4 (2013), 247.
- [85] ITOH, N., OHTA, H., NAKAYAMA, Y., AND KONISHI, M. Roles of fgf signals in heart development, health, and disease. *Front Cell Dev Biol* 4 (2016), 110.
- [86] ITOH, N., AND ORNITZ, D. M. Evolution of the fgf and fgfr gene families. *Trends Genet* 20, 11 (2004), 563–9.
- [87] JENCA, D., MELENOVSKY, V., STEHLIK, J., STANEK, V., KETTNER, J., KAUTZNER, J., ADAMKOVA, V., AND WOHLFAHRT, P. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail* 8, 1 (2021), 222–237.
- [88] JIANG, Z. S., PADUA, R. R., JU, H., DOBLE, B. W., JIN, Y., HAO, J., CATTINI, P. A., DIXON, I. M., AND KARDAMI, E. Acute protection of ischemic heart by fgf-2: involvement of fgf-2 receptors and protein kinase c. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, 3 (2002), H1071–80.

- [89] JIN, J. P., WU, D., GAO, J., NIGAM, R., AND KWONG, S. Expression and purification of the h1 and h2 isoforms of calponin. *Protein Expr Purif* 31, 2 (2003), 231–9.
- [90] JOHN, B., ENRIGHT, A. J., ARAVIN, A., TUSCHL, T., SANDER, C., AND MARKS, D. S. Human microRNA targets. *PLoS Biology* (2004).
- [91] JUDD, J., LOVAS, J., AND HUANG, G. N. Defined factors to reactivate cell cycle activity in adult mouse cardiomyocytes. *Sci Rep* 9, 1 (2019), 18830.
- [92] KÖBERICH, S. Barriers and facilitators to palliative care of patients with chronic heartfailure in germany: a study protocol. *J Public Health Res* (2015).
- [93] KARDAMI, E., BANERJI, S., DOBLE, B. W., DANG, X., FANDRICH, R. R., JIN, Y., AND CATTINI, P. A. Pkc-dependent phosphorylation may regulate the ability of connexin43 to inhibit dna synthesis. *Cell Communication and Adhesion* 10, 4-6 (2003), 293–297.
- [94] KARGINOV, F. V., CONACO, C., XUAN, Z., SCHMIDT, B. H., PARKER, J. S., MANDEL, G., AND HANNON, G. J. A biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 49 (2007), 19291–6.
- [95] KELLY, R. G., BUCKINGHAM, M. E., AND MOORMAN, A. F. Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, 10 (2014).
- [96] KEYSAR, S. B., LE, P. N., MILLER, B., JACKSON, B. C., EAGLES, J. R., NIETO, C., KIM, J., TANG, B., GLOGOWSKA, M. J., MORTON, J. J., PADILLA-JUST, N., GOMEZ, K., WARNOCK, E., REISINGER, J., ARCAROLI, J. J., MESSERSMITH, W. A., WAKEFIELD, L. M., GAO, D., TAN, A. C., SERRACINO, H., VASILIOU, V., ROOP, D. R., WANG, X. J., AND JIMENO, A. Regulation of head and neck squamous cancer stem cells by pi3k and sox2. *J Natl Cancer Inst* 109, 1 (2017).
- [97] KHAN, M. G. *Encyclopedia of Heart Diseases*. Academic Press, 2005.
- [98] KOK, K. H., NG, M. H. J., CHING, Y. P., AND JIN, D. Y. Human trbp and pact directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering rna. *Journal of Biological Chemistry* 282, 24 (2007), 17649–17657.
- [99] KONFINO, T., LANDA, N., BEN-MORDECHAI, T., AND LEOR, J. The type of injury dictates the mode of repair in neonatal and adult heart. *J Am Heart Assoc* 4, 1 (2015), e001320.
- [100] KONSTANTINIDIS, K., WHELAN, R. S., AND KITSIS, R. N. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 7 (2012), 1552–62.
- [101] KOUTSOULIDOU, A., MASTROYIANNPOULOS, N. P., FURLING, D., UNEY, J. B., AND PHYLACTOU, L. A. Expression of mir-1, mir-133a, mir-133b and mir-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC Dev Biol* 11 (2011), 34.
- [102] KREJCI, E., PESEVSKI, Z., NANKA, O., AND SEDMERA, D. Physiological role of fgf signaling in growth and remodeling of developing cardiovascular system. *Physiol Res* 65, 3 (2016), 425–35.
- [103] KREK, A., GRUN, D., POY, M. N., WOLF, R., ROSENBERG, L., EPSTEIN, E. J., MACMENAMIN, P., DA PIEDADE, I., GUNSAUS, K. C., STOFFEL, M., AND RAJEWSKY, N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 5 (2005), 495–500.
- [104] KRUGER, J., AND REHMSMEIER, M. Rnahybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* 34, Web Server issue (2006), W451–4.
- [105] KUBIN, T., ANDO, H., SCHOLZ, D., BRAMLAGE, P., KOSTIN, S., VAN VEEN, A., HELING, A., HEIN, S., FISCHER, S., BREIER, A., SCHAPER, J., AND SCHAPER, W. Microvascular endothelial cells remodel cultured adult cardiomyocytes and increase their survival. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 276, 6 (1999), H2179–H2187.
- [106] KUBIN, T., POLING, J., KOSTIN, S., GAJAWADA, P., HEIN, S., REES, W., WIETELMANN, A., TANAKA, M., LORCHNER, H., SCHIMANSKI, S., SZIBOR, M., WARNECKE, H., AND BRAUN, T. Oncostatin m is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell Stem Cell* 9, 5 (2011), 420–432.

- [107] KUEHBACHER, A., URBICH, C., ZEIHNER, A. M., AND DIMMELER, S. Role of dicer and drosha for endothelial microrna expression and angiogenesis. *Circ Res* 101, 1 (2007), 59–68.
- [108] LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., YALCIN, A., MEYER, J., LENDECKEL, W., AND TUSCHL, T. Identification of tissue-specific micrnas from mouse. *Curr Biol* 12, 9 (2002), 735–9.
- [109] LALL, S., GRUN, D., KREK, A., CHEN, K., WANG, Y. L., DEWEY, C. N., SOOD, P., COLOMBO, T., BRAY, N., MACMENAMIN, P., KAO, H. L., GUNSALUS, K. C., PACTHER, L., PIANO, F., AND RAJEWSKY, N. A genome-wide map of conserved microrna targets in *c. elegans*. *Curr Biol* 16, 5 (2006), 460–71.
- [110] LEE, R. C., FEINBAUM, R. L., AND AMBROS, V. The *c. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 5 (1993), 843–54.
- [111] LEE, Y., JEON, K., LEE, J. T., KIM, S., AND KIM, V. N. Microrna maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21, 17 (2002), 4663–70.
- [112] LEMMON, M. A., AND SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 7 (2010), 1117–34.
- [113] LEWIS, B. P., BURGE, C. B., AND BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microrna targets. *Cell* 120, 1 (2005), 15–20.
- [114] LEWIS, B. P., SHIH, I. H., JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P., AND BURGE, C. B. Prediction of mammalian microrna targets. *Cell* 115, 7 (2003), 787–98.
- [115] LI, F., WANG, X., CAPASSO, J. M., AND GERDES, A. M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* 28, 8 (1996), 1737–46.
- [116] LI, J. C., LI, Y. Z., JIAO, J. Q., WANG, J. X., LI, Y. R., QIN, D. N., AND LI, P. F. Mitofusin 1 is negatively regulated by microrna 140 in cardiomyocyte apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 34, 10 (2014), 1788–1799.
- [117] LI, Y. D., FENG, J., SONG, S., LI, H. T., YANG, H. J., ZHOU, B., LI, Y., YUE, Z., LIAN, H., LIU, L. H., HU, S. S., AND NIE, Y. gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Circulation* 142, 10 (2020), 967–982.
- [118] LIM, G. B. Inhibiting fatty acid oxidation promotes cardiomyocyte proliferation. *Nat Rev Cardiol* 17, 5 (2020), 266–267.
- [119] LIU, B., LI, J., AND CAIRNS, M. J. Identifying mirnas, targets and functions. *Brief Bioinform* 15, 1 (2014), 1–19.
- [120] LIU, N., BEZPROZVANNAYA, S., WILLIAMS, A. H., QI, X., RICHARDSON, J. A., BASSEL-DUBY, R., AND OLSON, E. N. microrna-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 22, 23 (2008), 3242–54.
- [121] LIU, N., WILLIAMS, A. H., KIM, Y., MCANALLY, J., BEZPROZVANNAYA, S., SUTHERLAND, L. B., RICHARDSON, J. A., BASSEL-DUBY, R., AND OLSON, E. N. An intragenic *mef2*-dependent enhancer directs muscle-specific expression of micrnas 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 52 (2007), 20844–9.
- [122] LIU, N., WILLIAMS, A. H., MAXEINER, J. M., BEZPROZVANNAYA, S., SHELTON, J. M., RICHARDSON, J. A., BASSEL-DUBY, R., AND OLSON, E. N. microrna-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of duchenne muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest* 122, 6 (2012), 2054–65.
- [123] LIU, Z., YUE, S., CHEN, X., KUBIN, T., AND BRAUN, T. Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by *cyclin1*. *Circ Res* 106, 9 (2010), 1498–506.
- [124] LORCHNER, H., POLING, J., GAJAWADA, P., HOU, Y., POLYAKOVA, V., KOSTIN, S., ADRIAN-SEGARRA, J. M., BOETTGER, T., WIETELMANN, A., WARNECKE, H., RICHTER, M., KUBIN, T., AND BRAUN, T. Myocardial healing requires *reg3beta*-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat Med* 21, 4 (2015), 353–62.
- [125] LUDWIG, N., LEIDINGER, P., BECKER, K., BACKES, C., FEHLMANN, T., PALLASCH, C., RHEINHEIMER, S., MEDER, B., STAHLER, C., MEESE, E., AND KELLER, A. Distribution of mirna expression across human tissues. *Nucleic Acids Res* 44, 8 (2016), 3865–77.

- [126] LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, J. E., AND KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 5654 (2004), 95–98.
- [127] LUO, P., WANG, P. X., LI, Z. Z., ZHANG, X. J., JIANG, X., GONG, J., QIN, J. J., GUO, J., ZHU, X., YANG, S., AND LI, H. Hepatic oncostatin m receptor beta regulates obesity-induced steatosis and insulin resistance. *Am J Pathol* 186, 5 (2016), 1278–92.
- [128] LUTTICKEN, C., WEGENKA, U. M., YUAN, J., BUSCHMANN, J., SCHINDLER, C., ZIEMIECKI, A., HARPUR, A. G., WILKS, A. F., YASUKAWA, K., TAGA, T., AND ET AL. Association of transcription factor aprf and protein kinase jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263, 5143 (1994), 89–92.
- [129] MALIZIA, A. P., AND WANG, D. Z. MicRNAs in cardiomyocyte development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3, 2 (2011), 183–90.
- [130] MARTIK, M. L. Heart development and regeneration: Metabolism makes and mends the heart. *Elife* 9 (2020).
- [131] MCCARTHY, J. J. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomir. *Biochim Biophys Acta* 1779, 11 (2008), 682–91.
- [132] MELONI, M., MARCHETTI, M., GARNER, K., LITTLEJOHNS, B., SALA-NEWBY, G., XENOPHONTOS, N., FLORIS, I., SULEIMAN, M. S., MADEDDU, P., CAPORALI, A., AND EMANUELI, C. Local inhibition of microRNA-24 improves reparative angiogenesis and left ventricle remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Mol Ther* 21, 7 (2013), 1390–402.
- [133] MOHAMED, T. M. A., ANG, Y. S., RADZINSKY, E., ZHOU, P., HUANG, Y., ELFENBEIN, A., FOLEY, A., MAGNITSKY, S., AND SRIVASTAVA, D. Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. *Cell* 173, 1 (2018), 104–116 e12.
- [134] MOON, A., AND RHEAD, W. J. Complementation analysis of fatty acid oxidation disorders. *J Clin Invest* 79, 1 (1987), 59–64.
- [135] MOSLEY, B., DE IMUS, C., FRIEND, D., BOIANI, N., THOMA, B., PARK, L. S., AND COSMAN, D. Dual oncostatin m (osm) receptors. cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring osm-specific receptor activation. *J Biol Chem* 271, 51 (1996), 32635–43.
- [136] MOSTERD, A., AND HOES, A. W. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93, 9 (2007), 1137–46.
- [137] NAKADA, Y., CANSECO, D. C., THET, S., ABDISALAAM, S., ASAITHAMBY, A., SANTOS, C. X., SHAH, A. M., ZHANG, H., FABER, J. E., KINTER, M. T., SZWEDA, L. I., XING, C., HU, Z., DEBERARDINIS, R. J., SCHIATTARELLA, G., HILL, J. A., OZ, O., LU, Z., ZHANG, C. C., KIMURA, W., AND SADEK, H. A. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature* 541, 7636 (2017), 222–227.
- [138] NEGORO, S., OH, H., TONE, E., KUNISADA, K., FUJIO, Y., WALSH, K., KISHIMOTO, T., AND YAMAUCHI-TAKIHARA, K. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/akt phosphorylation and bcl-xl/caspase-3 interaction. *Circulation* 103, 4 (2001), 555–561.
- [139] NOVOYATLEVA, T., SAJJAD, A., POGORYELOV, D., PATRA, C., SCHERMULY, R. T., AND ENGEL, F. B. Fgf1-mediated cardiomyocyte cell cycle reentry depends on the interaction of fgfr-1 and fn14. *FASEB J* 28, 6 (2014), 2492–503.
- [140] O’CONNELL, T. D., RODRIGO, M. C., AND SIMPSON, P. C. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol* 357 (2007), 271–96.
- [141] OEGEMA, K., SAVOIAN, M. S., MITCHISON, T. J., AND FIELD, C. M. Functional analysis of a human homologue of the drosophila actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J Cell Biol* 150, 3 (2000), 539–52.
- [142] O’LEARY, N., MURPHY, N. F., O’LOUGHLIN, C., TIERNAN, E., AND McDONALD, K. A comparative study of the palliative care needs of heart failure and cancer patients. *Eur J Heart Fail* 11, 4 (2009), 406–12.
- [143] ORNITZ, D. M., AND ITOH, N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 3 (2015), 215–66.
- [144] OROM, U. A., AND LUND, A. H. Isolation of microRNA targets using biotinylated synthetic microRNAs. *Methods* 43, 2 (2007), 162–165.

- [145] PARK, C. Y., CHOI, Y. S., AND MCMANUS, M. T. Analysis of microRNA knockouts in mice. *Hum Mol Genet* 19, R2 (2010), R169–75.
- [146] PENG, Y., AND CROCE, C. M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* 1 (2016), 15004.
- [147] PIEKNY, A. J., AND GLOTZER, M. Anillin is a scaffold protein that links rhoa, actin, and myosin during cytokinesis. *Current Biology* 18, 1 (2008), 30–36.
- [148] POLING, J., GAJAWADA, P., RICHTER, M., LORCHNER, H., POLYAKOVA, V., KOSTIN, S., SHIN, J., BOETTGER, T., WALTHER, T., REES, W., WIETELMANN, A., WARNECKE, H., KUBIN, T., AND BRAUN, T. Therapeutic targeting of the oncostatin m receptor-beta prevents inflammatory heart failure. *Basic Res Cardiol* 109, 1 (2014), 396.
- [149] PONIKOWSKI, P., ANKER, S. D., ALHABIB, K. F., COWIE, M. R., FORCE, T. L., HU, S., JAARMSMA, T., KRUM, H., RASTOGI, V., ROHDE, L. E., SAMAL, U. C., SHIMOKAWA, H., BUDI SISWANTO, B., SLIWA, K., AND FILIPPATOS, G. Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail* 1, 1 (2014), 4–25.
- [150] PORRELLO, E. R., JOHNSON, B. A., AURORA, A. B., SIMPSON, E., NAM, Y. J., MATKOVICH, S. J., DORN, G. W., N., VAN ROOIJ, E., AND OLSON, E. N. Mir-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res* 109, 6 (2011), 670–9.
- [151] PORRELLO, E. R., MAHMOUD, A. I., SIMPSON, E., HILL, J. A., RICHARDSON, J. A., OLSON, E. N., AND SADEK, H. A. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 6020 (2011), 1078–80.
- [152] PORRELLO, E. R., MAHMOUD, A. I., SIMPSON, E., JOHNSON, B. A., GRINSFELDER, D., CANSECO, D., MAMMEN, P. P., ROTHERMEL, B. A., OLSON, E. N., AND SADEK, H. A. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the mir-15 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1 (2013), 187–92.
- [153] POSS, K. D. Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 18, 1 (2007), 36–45.
- [154] PRZYBYT, E., KRENNING, G., BRINKER, M. G. L., AND HARMSSEN, M. C. Adipose stromal cells primed with hypoxia and inflammation enhance cardiomyocyte proliferation rate in vitro through stat3 and erk1/2. *Journal of Translational Medicine* 11 (2013).
- [155] QIAN, L., VAN LAAKE, L. W., HUANG, Y., LIU, S., WENDLAND, M. F., AND SRIVASTAVA, D. mir-24 inhibits apoptosis and represses bim in mouse cardiomyocytes. *J Exp Med* 208, 3 (2011), 549–60.
- [156] RADTKE, S., HERMANN, H. M., HAAN, C., SCHMITZ-VAN DE LEUR, H., GASCAN, H., HEINRICH, P. C., AND BEHRMANN, I. Novel role of janus kinase 1 in the regulation of oncostatin m receptor surface expression. *J Biol Chem* 277, 13 (2002), 11297–305.
- [157] RAND, T. A., PETERSEN, S., DU, F., AND WANG, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 4 (2005), 621–9.
- [158] RAO, P. K., KUMAR, R. M., FARKHONDEH, M., BASKERVILLE, S., AND LODISH, H. F. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 23 (2006), 8721–8726.
- [159] REHMSMEIER, M., STEFFEN, P., HOCHSMANN, M., AND GIEGERICH, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 10, 10 (2004), 1507–17.
- [160] REN, X. P., WU, J. H., WANG, X. H., SARTOR, M. A., QIAN, J., JONES, K., NICOLAOU, P., PRITCHARD, T. J., AND FAN, G. C. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* 119, 17 (2009), 2357–U128.
- [161] RICHTER, M., LAUTZE, H. J., WALTHER, T., BRAUN, T., KOSTIN, S., AND KUBIN, T. The failing heart is a major source of circulating fgf23 via oncostatin m receptor activation. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 34, 9 (2015), 1211–1214.
- [162] RIDDELL, A., MCBRIDE, M., BRAUN, T., NICKLIN, S. A., CAMERON, E., LOUGHREY, C. M., AND MARTIN, T. P. Runx1: an emerging therapeutic target for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 116, 8 (2020), 1410–1423.

- [163] RILEY, J. P., AND BEATTIE, J. M. Palliative care in heart failure: facts and numbers. *ESC Heart Fail* 4, 2 (2017), 81–87.
- [164] ROSE, T. M., AND BRUCE, A. G. Oncostatin-m is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 19 (1991), 8641–8645.
- [165] SAMAHA, F. F., IP, H. S., MORRISEY, E. E., SELTZER, J., TANG, Z., SOLWAY, J., AND PARMACEK, M. S. Developmental pattern of expression and genomic organization of the calponin-h1 gene. a contractile smooth muscle cell marker. *J Biol Chem* 271, 1 (1996), 395–403.
- [166] SCHIEMANN, W. P., BARTOE, J. L., AND NATHANSON, N. M. Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase - evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at ras. *Journal of Biological Chemistry* 272, 26 (1997), 16631–16636.
- [167] SCHWEISGUT, J., SCHUTT, C., WUST, S., WIETELMANN, A., GHESQUIERE, B., CARMELIET, P., DROSE, S., KORACH, K. S., BRAUN, T., AND BOETTGER, T. Sex-specific, reciprocal regulation of eralpha and mir-22 controls muscle lipid metabolism in male mice. *EMBO J* 36, 9 (2017), 1199–1214.
- [168] SHUKLA, G. C., SINGH, J., AND BARIK, S. Micrnas: Processing, maturation, target recognition and regulatory functions. *Mol Cell Pharmacol* 3, 3 (2011), 83–92.
- [169] SILVA, A. C., PEREIRA, C., FONSECA, A., PINTO-DO, O. P., AND NASCIMENTO, D. S. Bearing my heart: The role of extracellular matrix on cardiac development, homeostasis, and injury response. *Front Cell Dev Biol* 8 (2020), 621644.
- [170] SLAETS, H., NELISSEN, S., JANSSENS, K., VIDAL, P. M., LEMMENS, E., STINISSEN, P., HENDRIX, S., AND HELINGS, N. Oncostatin m reduces lesion size and promotes functional recovery and neurite outgrowth after spinal cord injury. *Mol Neurobiol* 50, 3 (2014), 1142–51.
- [171] SOHAL, D. S., NGHIEM, M., CRACKOWER, M. A., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., TYMITZ, K. M., PENNINGER, J. M., AND MOLKENTIN, J. D. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible cre protein. *Circulation Research* 89, 1 (2001), 20–25.
- [172] SPINETTI, G., FORTUNATO, O., CAPORALI, A., SHANTIKUMAR, S., MARCHETTI, M., MELONI, M., DESCAMPS, B., FLORIS, I., SANGALLI, E., VONO, R., FAGLIA, E., SPECCHIA, C., PINTUS, G., MADEDDU, P., AND EMANUELI, C. Microrna-15a and microrna-16 impair human circulating proangiogenic cell functions and are increased in the proangiogenic cells and serum of patients with critical limb ischemia. *Circ Res* 112, 2 (2013), 335–46.
- [173] STAWSKI, L., AND TROJANOWSKA, M. Oncostatin m and its role in fibrosis. *Connect Tissue Res* 60, 1 (2019), 40–49.
- [174] STRAIGHT, A. F., FIELD, C. M., AND MITCHISON, T. J. Anillin binds nonmuscle myosin ii and regulates the contractile ring. *Mol Biol Cell* 16, 1 (2005), 193–201.
- [175] STRASSER, P., GIMONA, M., MOESSLER, H., HERZOG, M., AND SMALL, J. V. Mammalian calponin. identification and expression of genetic variants. *FEBS Lett* 330, 1 (1993), 13–8.
- [176] STUMPF, C. R., MORENO, M. V., OLSHEN, A. B., TAYLOR, B. S., AND RUGGERO, D. The translational landscape of the mammalian cell cycle. *Mol Cell* 52, 4 (2013), 574–82.
- [177] SUBRAMANIAN, A., TAMAYO, P., MOOTHA, V. K., MUKHERJEE, S., EBERT, B. L., GILLETTE, M. A., PAULOVICH, A., POMEROY, S. L., GOLUB, T. R., LANDER, E. S., AND MESIROV, J. P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 43 (2005), 15545–50.
- [178] SUN, D., LI, S., WU, H., ZHANG, M., ZHANG, X., WEI, L., QIN, X., AND GAO, E. Oncostatin m (osm) protects against cardiac ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice by regulating apoptosis, mitochondrial biogenesis and insulin sensitivity. *J Cell Mol Med* 19, 6 (2015), 1296–307.
- [179] SWEETMAN, D., GOLJANEK, K., RATHJEN, T., OUSTANINA, S., BRAUN, T., DALMAY, T., AND MUNSTERBERG, A. Specific requirements of mrfs for the expression of muscle specific micrnas, mir-1, mir-206 and mir-133. *Dev Biol* 321, 2 (2008), 491–9.

- [180] SZIBOR, M., POLING, J., WARNECKE, H., KUBIN, T., AND BRAUN, T. Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration. *Cell Mol Life Sci* 71, 10 (2014), 1907–16.
- [181] TAEGTMEYER, H., SEN, S., AND VELA, D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1188 (2010), 191–8.
- [182] TAKEMURA, G., NAKAGAWA, M., KANAMORI, H., MINATOYUCHI, S., AND FUJIWARA, H. Benefits of reperfusion beyond infarct size limitation. *Cardiovasc Res* 83, 2 (2009), 269–76.
- [183] TANAKA, E. M., AND REDDIEN, P. W. The cellular basis for animal regeneration. *Dev Cell* 21, 1 (2011), 172–85.
- [184] TANAKA, M., HIRABAYASHI, Y., SEKIGUCHI, T., INOUE, T., KATSUKI, M., AND MIYAJIMA, A. Targeted disruption of oncostatin m receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102, 9 (2003), 3154–62.
- [185] THUM, T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Mol Med* 4, 1 (2012), 3–14.
- [186] THUM, T., CHAU, N., BHAT, B., GUPTA, S. K., LINSLEY, P. S., BAUERSACHS, J., AND ENGELHARDT, S. Comparison of different mir-21 inhibitor chemistries in a cardiac disease model. *J Clin Invest* 121, 2 (2011), 461–2; author reply 462–3.
- [187] THUM, T., GROSS, C., FIEDLER, J., FISCHER, T., KISSLER, S., BUSSEN, M., GALUPPO, P., JUST, S., ROTTBAUER, W., FRANTZ, S., CASTOLDI, M., SOUTSCHEK, J., KOTELIANSKY, V., ROSENWALD, A., BASSON, M. A., LICHT, J. D., PENA, J. T., ROUHANIFARD, S. H., MUCKENTHALER, M. U., TUSCHL, T., MARTIN, G. R., BAUERSACHS, J., AND ENGELHARDT, S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating map kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456, 7224 (2008), 980–4.
- [188] TROKOVIC, R., TROKOVIC, N., HERNESNIEMI, S., PIRVOLA, U., WEISENHORN, D. M. V., ROSSANT, J., MCMAHON, A. P., WURST, W., AND PARTANEN, J. Fgfr1 is independently required in both developing mid- and hindbrain for sustained response to isthmic signals. *Embo Journal* 22, 8 (2003), 1811–1823.
- [189] TZAHOR, E., AND POSS, K. D. Cardiac regeneration strategies: Staying young at heart. *Science* 356, 6342 (2017), 1035–1039.
- [190] VAN ROOIJ, E., QUIAT, D., JOHNSON, B. A., SUTHERLAND, L. B., QI, X., RICHARDSON, J. A., KELM, R. J., J., AND OLSON, E. N. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 17, 5 (2009), 662–73.
- [191] VAN ROOIJ, E., SUTHERLAND, L. B., LIU, N., WILLIAMS, A. H., MCANALLY, J., GERARD, R. D., RICHARDSON, J. A., AND OLSON, E. N. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 48 (2006), 18255–18260.
- [192] VAN ROOIJ, E., SUTHERLAND, L. B., QI, X., RICHARDSON, J. A., HILL, J., AND OLSON, E. N. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 5824 (2007), 575–9.
- [193] WANG, J., CHEN, J., AND SEN, S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *J Cell Physiol* (2015).
- [194] WANG, J., AND SEN, S. MicroRNA functional network in pancreatic cancer: from biology to biomarkers of disease. *J Biosci* 36, 3 (2011), 481–91.
- [195] WANG, W. E., LI, L., XIA, X., FU, W., LIAO, Q., LAN, C., YANG, D., CHEN, H., YUE, R., ZENG, C., ZHOU, L., ZHOU, B., DUAN, D. D., CHEN, X., HOUSER, S. R., AND ZENG, C. Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury. *Circulation* 136, 9 (2017), 834–848.
- [196] WANG, Y., ROBLEDOS, O., KINZIE, E., BLANCHARD, F., RICHARDS, C., MIYAJIMA, A., AND BAUMANN, H. Receptor subunit-specific action of oncostatin m in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 275, 33 (2000), 25273–85.
- [197] WANG, Z. G., WANG, D. Z., PIPES, G. C. T., AND OLSON, E. N. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12 (2003), 7129–7134.

- [198] WEI, Y., PENG, S., WU, M., SACHIDANANDAM, R., TU, Z., ZHANG, S., FALCE, C., SOBIE, E. A., LEBECHE, D., AND ZHAO, Y. Multifaceted roles of mir-1s in repressing the fetal gene program in the heart. *Cell Res* 24, 3 (2014), 278–92.
- [199] WILLIAMS, C., QUINN, K. P., GEORGAKOUDI, I., AND BLACK, L. D., R. Young developmental age cardiac extracellular matrix promotes the expansion of neonatal cardiomyocytes in vitro. *Acta Biomater* 10, 1 (2014), 194–204.
- [200] WINTER, J., JUNG, S., KELLER, S., GREGORY, R. I., AND DIEDERICH, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 11, 3 (2009), 228–234.
- [201] WUST, S., DROSE, S., HEIDLER, J., WITTIG, I., KLOCKNER, I., FRANKO, A., BONKE, E., GUNTHER, S., GARTNER, U., BOETTGER, T., AND BRAUN, T. Metabolic maturation during muscle stem cell differentiation is achieved by mir-1/133a-mediated inhibition of the dlk1-dio3 mega gene cluster. *Cell Metabolism* 27, 5 (2018), 1026–+.
- [202] WYSTUB, K., BESSER, J., BACHMANN, A., BOETTGER, T., AND BRAUN, T. mir-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. *PLoS Genet* 9, 9 (2013), e1003793.
- [203] XIE, Y., SU, N., YANG, J., TAN, Q., HUANG, S., JIN, M., NI, Z., ZHANG, B., ZHANG, D., LUO, F., CHEN, H., SUN, X., FENG, J. Q., QI, H., AND CHEN, L. Fgf/fgfr signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 5, 1 (2020), 181.
- [204] XU, J., AND WONG, C. A computational screen for mouse signaling pathways targeted by microRNA clusters. *RNA* 14, 7 (2008), 1276–83.
- [205] XU, Q., SEEGER, F. H., CASTILLO, J., IEKUSHI, K., BOON, R. A., FARCAS, R., MANAVSKI, Y., LI, Y. G., ASSMUS, B., ZEIHNER, A. M., AND DIMMELER, S. Micro-rna-34a contributes to the impaired function of bone marrow-derived mononuclear cells from patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 59, 23 (2012), 2107–17.
- [206] YANOCHKO, G. M., VITSKY, A., HEYEN, J. R., HIRAKAWA, B., LAM, J. L., MAY, J., NICHOLS, T., SACE, F., TRAJKOVIC, D., AND BLASI, E. Pan-fgfr inhibition leads to blockade of fgf23 signaling, soft tissue mineralization, and cardiovascular dysfunction. *Toxicol Sci* 135, 2 (2013), 451–64.
- [207] YI, R., QIN, Y., MACARA, I. G., AND CULLEN, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-miRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 24 (2003), 3011–6.
- [208] YIN, K. J., OLSEN, K., HAMBLIN, M., ZHANG, J., SCHWENDEMAN, S. P., AND CHEN, Y. E. Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia. *J Biol Chem* 287, 32 (2012), 27055–64.
- [209] ZHANG, X. T., MA, S., ZHANG, R., LI, S., ZHU, D., HAN, D., LI, X. J., LI, C. Y., YAN, W., SUN, D. D., XU, B., WANG, Y. B., AND CAO, F. Oncostatin m-induced cardiomyocyte dedifferentiation regulates the progression of diabetic cardiomyopathy through b-raf/mek/erk signaling pathway. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 48, 3 (2016), 257–265.
- [210] ZHANG, Y., LI, T. S., LEE, S. T., WAWROWSKY, K. A., CHENG, K., GALANG, G., MALLIARAS, K., ABRAHAM, M. R., WANG, C., AND MARBAN, E. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PLoS One* 5, 9 (2010), e12559.
- [211] ZHAO, T., ZHAO, W., CHEN, Y., AHOKAS, R. A., AND SUN, Y. Acidic and basic fibroblast growth factors involved in cardiac angiogenesis following infarction. *Int J Cardiol* 152, 3 (2011), 307–13.
- [212] ZHAO, Y., RANSOM, J. F., LI, A., VEDANTHAM, V., VON DREHLE, M., MUTH, A. N., TSUCHIHASHI, T., MCMANUS, M. T., SCHWARTZ, R. J., AND SRIVASTAVA, D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking mirna-1-2. *Cell* 129, 2 (2007), 303–17.
- [213] ZHAO, Y., SAMAL, E., AND SRIVASTAVA, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets hand2 during cardiogenesis. *Nature* (2005).
- [214] ZHAO, Y., AND SRIVASTAVA, D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* 32, 4 (2007), 189–97.
- [215] ZHOU, B., HONOR, L. B., HE, H., MA, Q., OH, J. H., BUTTERFIELD, C., LIN, R. Z., MELERO-MARTIN, J. M., DOLMATOVA, E., DUFFY, H. S., GISE, A., ZHOU, P., HU, Y. W., WANG, G., ZHANG, B., WANG, L., HALL, J. L.,

- 
- MOSES, M. A., MCGOWAN, F. X., AND PU, W. T. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest* 121, 5 (2011), 1894–904.
- [216] ZHU, H., YANG, Y., WANG, Y., LI, J., SCHILLER, P. W., AND PENG, T. MicroRNA-195 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating sirt1. *Cardiovasc Res* 92, 1 (2011), 75–84.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Celsius
µCi	Mikrocurie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
<sup>3</sup> H <sub>2</sub> O	Tritiumoxid
α-SMA	engl. <i>alpha smooth muscle actin</i>
Abb.	Abbildung
Acta2	actin alpha 2
ACTN1	Actinin Alpha 1
ACTN2	Actinin Alpha 2
ACTN4	Actinin Alpha 4
ad	auffüllen bis
Ago2	Argonaut
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i>
AraC	engl. <i>Cytosine β-D-arabinofuranoside</i>
AS	Aortenstenose
ATP5G1	ATP Synthase, H <sup>+</sup> Transporting, Mitochondrial F0 Complex, Subunit C1 (Subunit 9)
AV-Knoten	Atrioventrikuläre Knoten
BDM	engl. <i>2,3-Butanedione 2-Monoxime</i>
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Cav 1.2	engl. <i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
Chr.	Chromosom
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
Col1a1	Kollagen Typ I, alpha 1

Abkürzung	Bedeutung
<b>Col4a1</b>	Kollagen Typ IV, alpha 1
<b>Ctgf</b>	engl. <i>connective tissue growth factor</i>
<b>cTnT</b>	engl. <i>Cardiac Troponin T</i>
<b>ctrl</b>	engl. <i>Control</i>
<b>DAPI</b>	engl. <i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
<b>DCM</b>	dilatative Kardiomyopathie
<b>ddH2O</b>	demineralisiertes Wasser
<b>dKO</b>	miR-1/133a Doppelknockout
<b>DMEM</b>	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (Acid)
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EdU</b>	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
<b>ERK</b>	engl. <i>extracellular-signal regulated kinases</i>
<b>et al.</b>	<i>et alterae</i>
<b>EthD-1</b>	Ethidium-Homodimer-1
<b>FAM</b>	Fluorescein
<b>FAO</b>	engl. <i>Fatty Acid Oxidation</i>
<b>FC</b>	engl. <i>Fold change</i>
<b>FCS</b>	engl. <i>Fetal Calf Serum</i>
<b>FGF</b>	Fibroblasten Wachstumsfaktor
<b>FGFR1</b>	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>Flp</b>	Flippase
<b>FRS2</b>	engl. <i>Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2</i>
<b>FWER</b>	engl. <i>family-wise error rate</i>
<b>g (SI-Einheit)</b>	Gramm
<b>g (Zentrifuge)</b>	Gravitation
<b>GAB1</b>	engl. <i>GRB2 Associated Binding Protein 1</i>
<b>Gapdh</b>	Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GO</b>	engl. <i>gene ontology</i>
<b>GRB2</b>	engl. <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>GSEA</b>	engl. <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
<b>HCL</b>	Salzsäure

Abkürzung	Bedeutung
<b>HCN4</b>	engl. <i>Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4</i>
<b>Hepes</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>hOSMR</b>	humaner Oncostatin M Rezeptor
<b>HRP</b>	engl. <i>Horseradish peroxidase</i>
<b>hsa</b>	homo sapiens
<b>Hsp60</b>	60-kDa-Hitzeschockproteine
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>I/R</b>	Ischämie/Reperfusion
<b>ICM</b>	ischämische Kardiomyopathie
<b>IL-6</b>	Interleukin-6 Familie
<b>ITS</b>	Insulin-Transferrin-Selenium
<b>IU</b>	engl. <i>International Unit</i>
<b>Jak</b>	Janus Kinase
<b>JNK</b>	c-Jun-N-terminale Kinasen
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KCNJ2</b>	engl. <i>Potassium Inwardly-Rectifying Channel, Subfamily J, Member 2</i>
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	Kaliumhydrogencarbonat
<b>KO</b>	Knockout
<b>l</b>	Liter
<b>LA</b>	linkes Atrium
<b>LAD</b>	engl. <i>left anterior descending artery</i>
<b>LIFR</b>	LIF Rezeptor
<b>LNA</b>	engl. <i>Locked-nucleid acid</i>
<b>Lox</b>	Lysyl oxidase
<b>LV</b>	linker Ventrikel
<b>M (SI-Einheit)</b>	Mol
<b>M199</b>	Medium 199
<b>MAD2</b>	engl. <i>mitotic arrest deficient 2</i>
<b>MAPKs</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
<b>Mef2</b>	engl. <i>myocyte enhancer factor-2</i>
<b>mg</b>	Milligramm

Abkürzung	Bedeutung
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</b>	Magnesium Sulfat Heptahydrat
<b>Mib1</b>	engl. <i>Mindbomb</i>
<b>min.</b>	Minuten
<b>miR</b>	microRNA
<b>miRISC</b>	engl. <i>microRNA-induced silencing complex</i>
<b>miRNAs</b>	MicroRNAs
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimol
<b>Mmp2</b>	engl. <i>matrix metalloproteinase-2</i>
<b>mmu</b>	Mus musculus
<b>MRFs</b>	engl. <i>Myogenic regulatory factors</i>
<b>Mut</b>	Mutante
<b>Mtpn</b>	Myotrophin
<b>Myf5</b>	engl. <i>Myogenic factor 5</i>
<b>Myh</b>	Myosin
<b>MYH6</b>	engl. <i>Myosin Heavy Chain 6</i>
<b>MYH7</b>	engl. <i>Myosin Heavy Chain 7</i>
<b>MYL2</b>	engl. <i>Myosin Light Chain 2</i>
<b>MYL7</b>	engl. <i>Myosin Light Chain 7</i>
<b>MyoD</b>	Myogener Faktor 3
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>nd</b>	nicht detektiert
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NGS</b>	engl. <i>Normal Goat Serum</i>
<b>nm<sub>Em</sub></b>	engl. <i>Nanometer emission range</i>
<b>nm<sub>Ex</sub></b>	engl. <i>Nanometer excitation range</i>
<b>nom</b>	engl. <i>Nominal</i>
<b>NP-40</b>	Nonyl Phenoxyethoxyethanol
<b>ns</b>	nicht signifikant
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>OSM</b>	Oncostatin M
<b>OSMR</b>	Oncostatin M Rezeptor

Abkürzung	Bedeutung
<b>P</b>	engl. <i>postnatal day</i>
<b>PACT</b>	engl. <i>Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase</i>
<b>panERK</b>	Purified Mouse Anti-ERK/ Gesamtmenge von ERK
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCNA</b>	engl. <i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PEB</b>	Puffer bestehend aus PBS und EDTA
<b>pERK</b>	phospho ERK (engl. extracellular-signal regulated kinases)
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH3</b>	engl. <i>Phosho-Histone 3</i>
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Phospholipase C $\gamma$
<b>pre-miRNA</b>	engl. <i>Precursor miRNA</i>
<b>pri-mRNA</b>	primäre miRNA
<b>p-val.</b>	engl. <i>p-value</i>
<b>qPCR</b>	quantitative Echtzeit-PCR
<b>RA</b>	rechtes Atrium
<b>Raf</b>	engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
<b>Ral A</b>	engl. <i>RAS Like Proto-Oncogene A</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (Acid)
<b>rpm</b>	engl. <i>Rounds per Minute</i>
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>Runx1</b>	engl. <i>Runt-related transcription factor 1</i>
<b>RV</b>	rechter Ventrikel
<b>RYR2</b>	Ryanodin-Rezeptor 2
<b>scr</b>	scramble
<b>SDHA</b>	engl. <i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>
<b>SDS</b>	Natriumlaurylsulfat
<b>SERCA2</b>	engl. <i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
<b>snRNA</b>	engl. <i>small nuclear RNA</i>
<b>SOS</b>	engl. <i>Son of Sevenless</i>
<b>SRF</b>	engl. <i>Serum Response Factor</i>
<b>STAT</b>	engl. <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<b>Std.</b>	Stunden
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>TBS</b>	engl. <i>Tris Buffered Saline</i>
<b>TBS-T</b>	engl. <i>Tris Buffered Saline - Tween20</i>
<b>TCA</b>	Tricarbonsäure
<b>TE</b>	Trypsin/EDTA
<b>Timp1</b>	engl. <i>tissue inhibitors of metalloproteinases 1</i>
<b>tKO (FR1)</b>	miR-1/133a Doppelknockout + FGFR1 Knockout
<b>tKO (OR)</b>	miR-1/133a Doppelknockout + OSMR Knockout
<b>TNNI1</b>	Troponin I1
<b>TNNI3</b>	Troponin I3
<b>TRBT</b>	engl. <i>HIV-1 TAR RNA binding protein</i>
<b>Tris</b>	Tris-aminomethan
<b>TTN-N2B</b>	Titin Isoform N2B
<b>TTN-N2BA</b>	Titin Isoform N2BA
<b>UO126</b>	Inhibitor des MEK/ERK-Signalweges
<b>V</b>	Volt
<b>VIC</b>	2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein
<b>VSD</b>	ventrikuläre Septumdefekte
<b>WGA</b>	engl. <i>Wheat Germ Agglutinin</i>
<b>WT</b>	wildtypisch
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

---

## Abbildungsverzeichnis

1	Veränderung der Kardiomyozyten während der Entwicklung des Herzens	7
2	Regenerationspotential von Zebrafärblingen, neonatalen und adulten Mäusen . . . . .	11
3	Übersicht der durch OSM aktivierten Signalwege und Funktionen von OSM	14
4	Übersicht der durch FGF aktivierten Signalwege und Funktionen von FGF	17
5	Schematische Darstellung der Prozessierung und Funktionsweisen von miRNA . . . . .	19
6	Schematische Darstellung unterschiedlicher Einflüsse von miRNAs auf das Herz . . . . .	23
7	Übersicht der Herz- und Muskelspezifischen microRNAs miR-1 und miR-133a . . . . .	26
8	Eine Stimulation mit OSM und FGF2 enthüllt einen synergistischen Effekt von <i>Osmr</i> und <i>Fgfr1</i> . . . . .	72
9	Eine Überexpression von miR-1, miR-133a oder miR-1/133a hebt die Wirkung von OSM+FGF2 in adulten Ratten Kardiomyozyten nahezu auf	75
10	Eine Co-Stimulation mit OSM und FGF2 führt zu einer erhöhten Menge an pH3 <sup>+</sup> Kerne in Kardiomyozyten . . . . .	77
11	Der Doppelknockout von miR-1/133a führt zu einer Hochregulation von <i>Osmr</i> und <i>Fgfr1</i> in adulten Mausherzen . . . . .	79
12	Der Doppelknockout von miR-1/133a führt zu einem starken Anstieg der ERK-Phosphorylierung die durch eine Behandlung mit UO126 oder einer zusätzlichen Deletion von <i>Osmr</i> oder <i>Fgfr1</i> wieder aufgehoben wird . .	81
13	Eine erhöhte Expression von <i>Osmr</i> und <i>Fgfr1</i> führt zu einem Zellzykluseintritt adulter Kardiomyozyten . . . . .	85
14	<i>In vitro</i> Stimulation von adulten Ratten Kardiomyozyten mit OSM+FGF2 führt zu EdU <sup>+</sup> und pH3 <sup>+</sup> Kernen . . . . .	86
15	Der Doppelknockout von miR-1/133a führt zu einem Anstieg von mononukleären Kardiomyozyten . . . . .	88
16	Die erhöhte Zellzyklusaktivität der adulten Doppelknockout Kardiomyozyten ist mit Dedifferenzierung verbunden . . . . .	90
17	Eine langanhaltende Dedifferenzierung von Kardiomyozyten hat eine dilatative Kardiomyopathie zur Folge . . . . .	91
18	Die erhöhte Expression von <i>Osmr</i> und <i>Fgfr1</i> in miR-1/133a Doppelknockout Herzen ist verbunden mit einer erhöhten Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten . . . . .	93
19	Die erhöhte Expression von <i>Osmr</i> und <i>Fgfr1</i> in miR-1/133a Doppelknockout Herzen verändern die Expression von extrazellulären Matrixgenen .	95
20	Der Doppelknockout von mir-1/133a in adulten Herzen führt zu einer neonatal ähnlichen Zusammensetzung der adulten extrazellulären Matrix	97
21	Der durch den Verlust von miR-1/133a ausgelöste proliferative Zustand von Kardiomyozyten macht diese empfänglicher für proliferative Signale	98

---

22	Die miR-1/133a Doppelknockout Herzen weisen einen runterregulierten Fettsäurestoffwechsel und einen Anstieg der Konzentration von freien Aminosäuren auf . . . . .	100
23	Der miR-1/133a Doppelknockout im Herzen führt zu einer Abnahme von Metaboliten des Tricarbonsäurezyklus . . . . .	101
24	Die Abnahme der Fettsäureoxidation in miR-1/133a Doppelknockout Herzen ist mit einer erhöhten Glykolyse verbunden . . . . .	103
25	Der Verlust von miR-1/133a in adulten Kardiomyozyten führt zu einer erhöhten Resistenz der Doppelknockout Kardiomyozyten gegenüber hypoxischen Bedingungen . . . . .	105
26	Der Verlust von miR-1/133a in adulten Kardiomyozyten führt unter hypoxischen Bedingungen zu einer reduzierten Nekrose . . . . .	107
27	Eine Runterregulation von miR-1/133a in adulten Herzen vor einem Myokardinfarkt führt zu einem deutlich verringerten Infarktbereich . .	109
28	Die Osmr und Fgfr1 Expression ist im Infarktbereich und im ischämischen Bereich von ICM Patienten erhöht . . . . .	111
29	Die erhöhte Osmr und Fgfr1 Expression im Infarktbereich kann mit anderen Nachweismethoden bestätigt werden . . . . .	112
30	Auch in DCM Patienten stehen die Rezeptoren und die miRNAs in einer entgegengesetzten Beziehung zueinander . . . . .	113
31	Die Repression von Osmr und Fgfr1 durch miR-1 und miR-133a verhindert die Dedifferenzierung von Kardiomyozyten und den Zellzykluseintritt im adulten Herzen . . . . .	131
32	Osmr und Fgfr1 weisen Bindestellen von miR-1 und miR-133a auf . . .	155
33	Inhibierung der miR-1/133a Gene im adulten Herzen . . . . .	156
34	Der Knockout von miR-1/133a hat eine erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 in Kardiomyozyten zur Folge . . . . .	157
35	Der Doppelknockout von miR-1/133a führt zu keiner Anreicherung von Genen im Zusammenhang mit dem WNT-, Notch-, JAK/STAT- und Hippo Signalweg . . . . .	158
36	Ein zusätzlicher Knockout von Runx1 hat keinen Einfluss auf die Veränderungen durch einen Verlust von miR-1/133a . . . . .	159
37	Inhibierung des ERK-Signalweges mit UO126 normalisiert die erhöhte Expression von Zellzyklusmarkern in miR-1/133a Doppelknockout Herzen	160
38	Deutliche Erhöhung von Zellzyklusmarkern in miR-1/133a Doppelknockout Kardiomyozyten . . . . .	161
39	Der miR-1/133a Doppelknockout ist mit einer Dedifferenzierung der Kardiomyozyten verbunden . . . . .	161
40	Darstellung des verringerten Infarktbereichs nach einer Runterregulation von miR-1/133a vor einem Myokardinfarkt . . . . .	162

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Verwendete Mauslinien *S. 28*

**Tabelle 2:** Verwendete Software *S. 29*

**Tabelle 3:** Verwendete primäre Antikörper für immunhistologische Färbungen *S. 36*

**Tabelle 4:** Verwendete sekundäre Antikörper für immunhistologische Färbungen *S. 37*

**Tabelle 5:** Verwendete primäre Antikörper für immunhistologische Färbungen von humanem Gewebe *S. 38*

**Tabelle 6:** Verwendete Primer für die Genotypisierung verwendeter Mauslinien *S. 42*

**Tabelle 7:** Verwendete Reaktionsansätze für die Genotypisierung verwendeter Mauslinien *S. 43*

**Tabelle 8:** PCR Programm für die Genotypisierung verwendeter Mauslinien *S. 44*

**Tabelle 9:** Erwartete Produktlängen der verwendeten Primerkombinationen *S. 45*

**Tabelle 10:** cDNA Synthese mittels TaqMan MicroRNA Assay *S. 47*

**Tabelle 11:** PCR Programm für die cDNA Synthese mittels TaqMan MicroRNA Assay *S. 47*

**Tabelle 12:** cDNA Synthese mittels PrimeScript™ RT Takara Kit *S. 48*

**Tabelle 13:** PCR Programm für die cDNA Synthese mittels PrimeScript™ RT Takara Kit *S. 48*

**Tabelle 14:** PCR Reaktion der qPCR für miRNAs *S. 49*

**Tabelle 15:** Verwendetes PCR-Programm für eine miRNA qPCR *S. 50*

**Tabelle 16:** PCR Reaktion der qPCR für Genexpressionen *S. 50*

**Tabelle 17:** Verwendetes PCR-Programm für Genexpression *S. 50*

**Tabelle 18:** Verwendete TaqMan Assays *S. 51*

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des Protein-Extraktionspuffers *S. 53*

**Tabelle 20:** Zusammensetzung des 4x Laemmli Puffer *S. 54*

**Tabelle 21:** Verwendete primäre Antikörper für die Proteinanalyse mittels Western Blot *S. 56*

**Tabelle 22:** Verwendete sekundäre Antikörper für die Proteinanalyse mittels Western Blot *S. 57*

**Tabelle 23:** Kulturmedium für neonatale Maus Kardiomyozyten *S. 60*

**Tabelle 24:** Kalzium freier Puffer für die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten *S. 63*

**Tabelle 25:** Perfusionspuffer für die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten *S. 63*

**Tabelle 26:** Enzympuffer für die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten *S. 64*

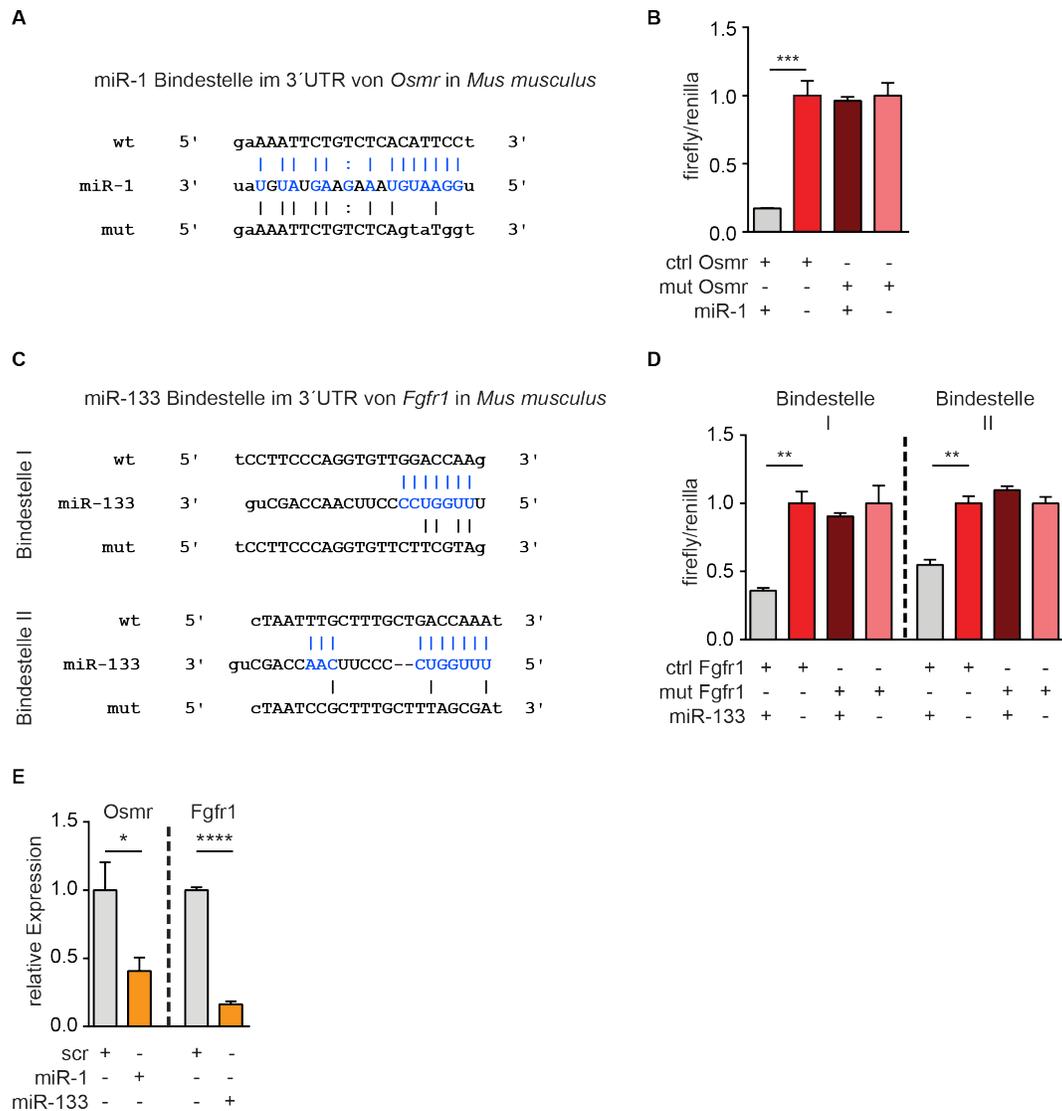
**Tabelle 27:** Stopppuffer für die Isolation von adulten Maus Kardiomyozyten *S. 64*

**Tabelle 28:** Kulturmedium für adulten Maus Kardiomyozyten *S. 65*

**Tabelle 29:** Parameter für die Transkriptomanalyse mittels GSEA *S. 68*

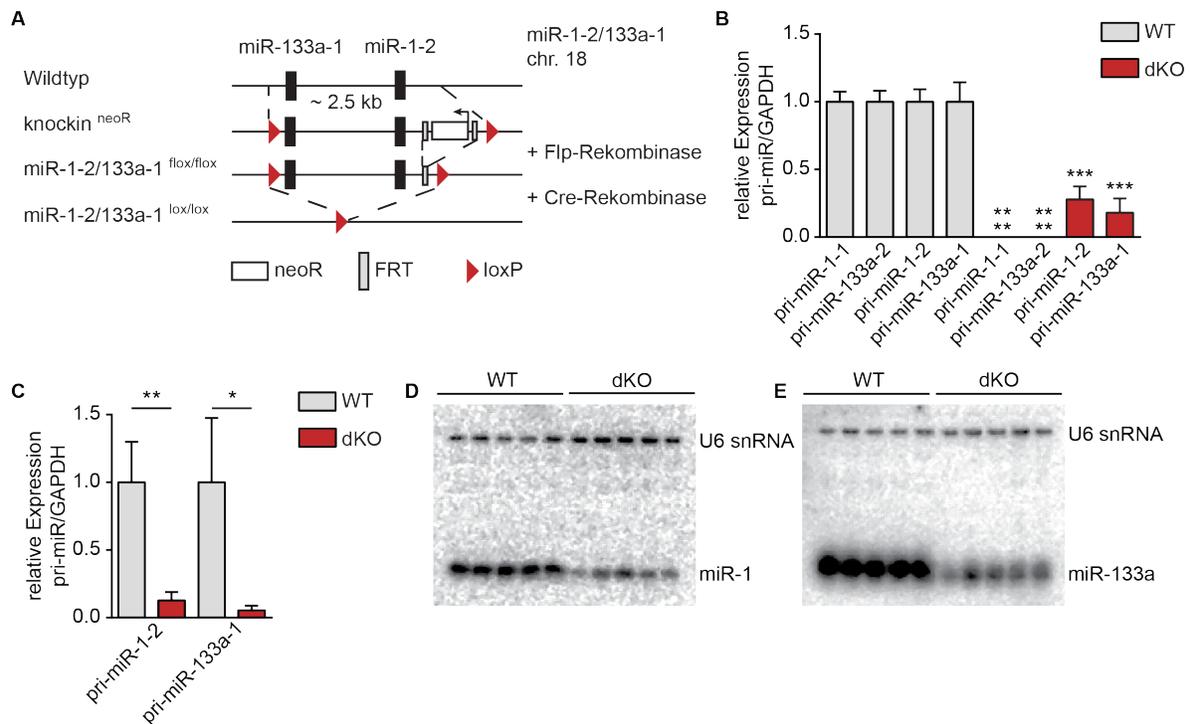
**Tabelle 30:** Darstellung der statistischen Signifikanzen *S. 70*

## Anhang



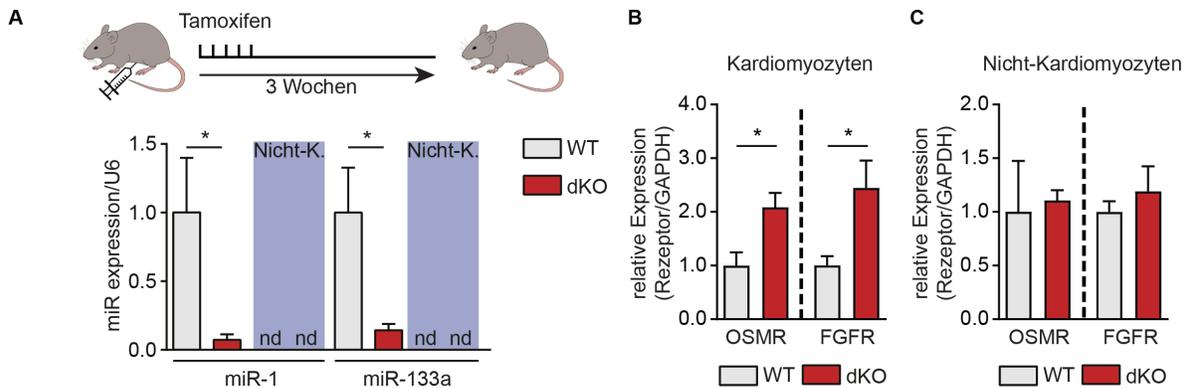
**Abbildung 32 – Osmr und Fgfr1 weisen Bindestellen von miR-1 und miR-133a auf.**

(A-D) Potentielle Bindestellen von miR-1 und miR-133a wurden mit Hilfe von microRNA „target prediction tools“ (TargetScan und MiRanda) identifiziert (A + C) und mittels Luciferase Assay funktional validiert (C+D). Als Kontrollen für die Luciferase Assays wurden mutierte Versionen der Bindestellen verwendet. Es wurde eine miR-1 Bindestelle innerhalb der 3'UTR von *Osmr* (A) identifiziert und zwei miR-133a Bindestellen innerhalb der 3'UTR von *Fgfr1* (C). (E) Transfektion von isolierten neonatalen Kardiomyozyten (P0-P3) mit siRNAs. Die qRT-PCR Analysen ergaben nach einer Transfektion mit miR-1 eine signifikant verringerte Expression von *Osmr* (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: \* < 0,05) und nach einer Transfektion mit miR-133a eine signifikant verringerte Expression von *Fgfr1* (ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert: \*\*\*\* < 0,0001). Die Untersuchungen wurden von Dr. Johannes Besser und Dr. Katharina Wysub-Lis durchgeführt.



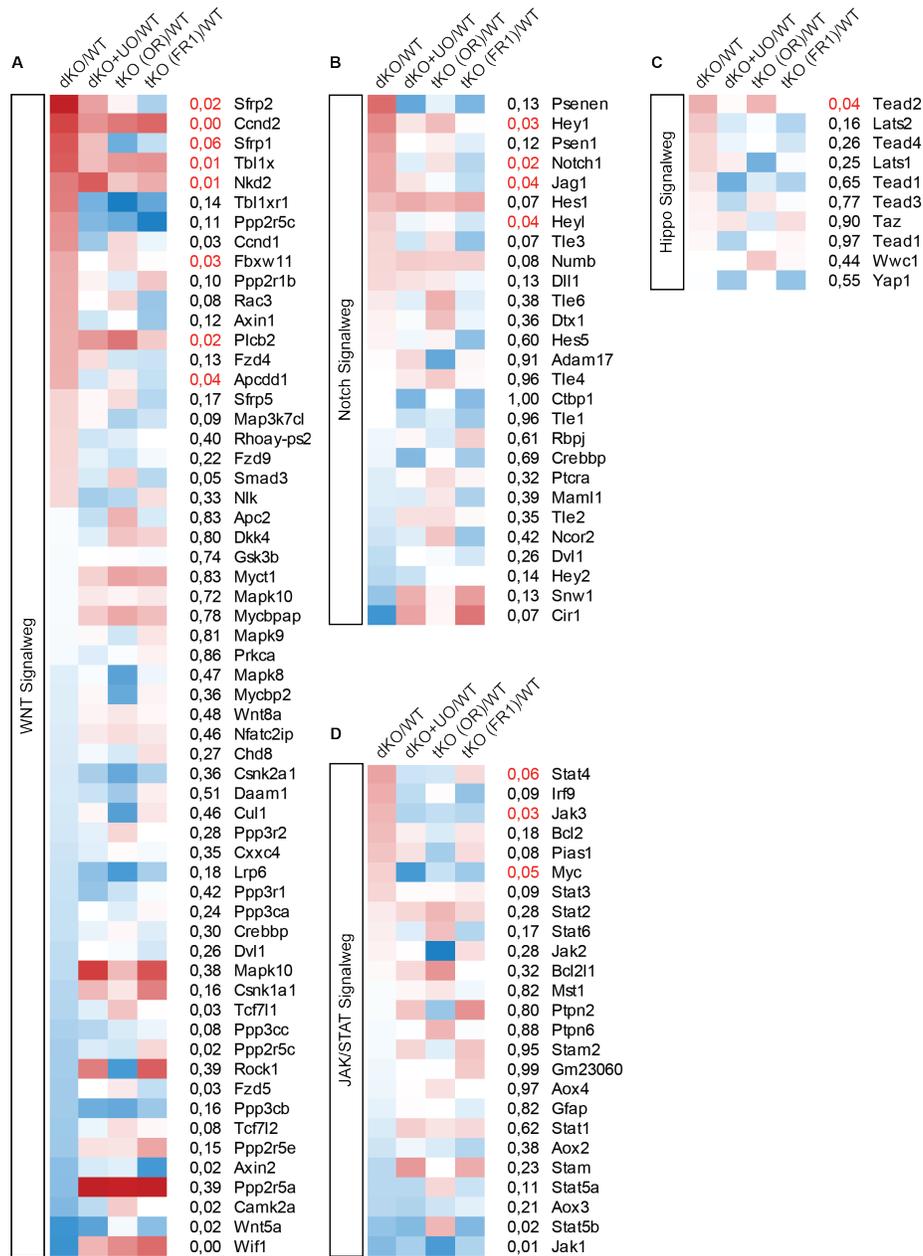
**Abbildung 33 – Inhibierung der miR-1/133a Gene im adulten Herzen.**

(A) Schematische Darstellung des miR-1-2/133a-1 Zielvektors und des resultierenden mutierten miR-1/133a Allels. (B+C) qRT-PCR-Analyse der pri-miR-Expression in adulten Herzen (B; WT: n = 5; dKO: n = 5; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (pri-miR-1-1): \*\*\*\* < 0,0001; p-Wert (pri-miR-133a-2): \*\*\*\* < 0,0001; p-Wert (pri-miR-1-2): \*\*\* < 0,001; p-Wert (pri-miR-133a-1): \*\*\* < 0,001) und isolierten Kardiomyozyten (C; n = 4-5 pro Gruppe; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (pri-miR-1-2): \*\* < 0,01; p-Wert (pri-miR-133a-1): \* < 0,05) 14 (Herzen) oder 21 (isolierte Kardiomyozyten) Tage nach Tamoxifen induzierter Aktivierung der Rekombination. (D+E) Northern-Blot-Analyse der Expression von reifer miR-1/133a in adulten Herzen. Für die Normalisierung wurde die ubiquitär exprimierte U6 snRNA verwendet. Die Inhibierung der miR-1/133a Gene im adulten Herzen wurde von Dr. Johannes Besser durchgeführt.



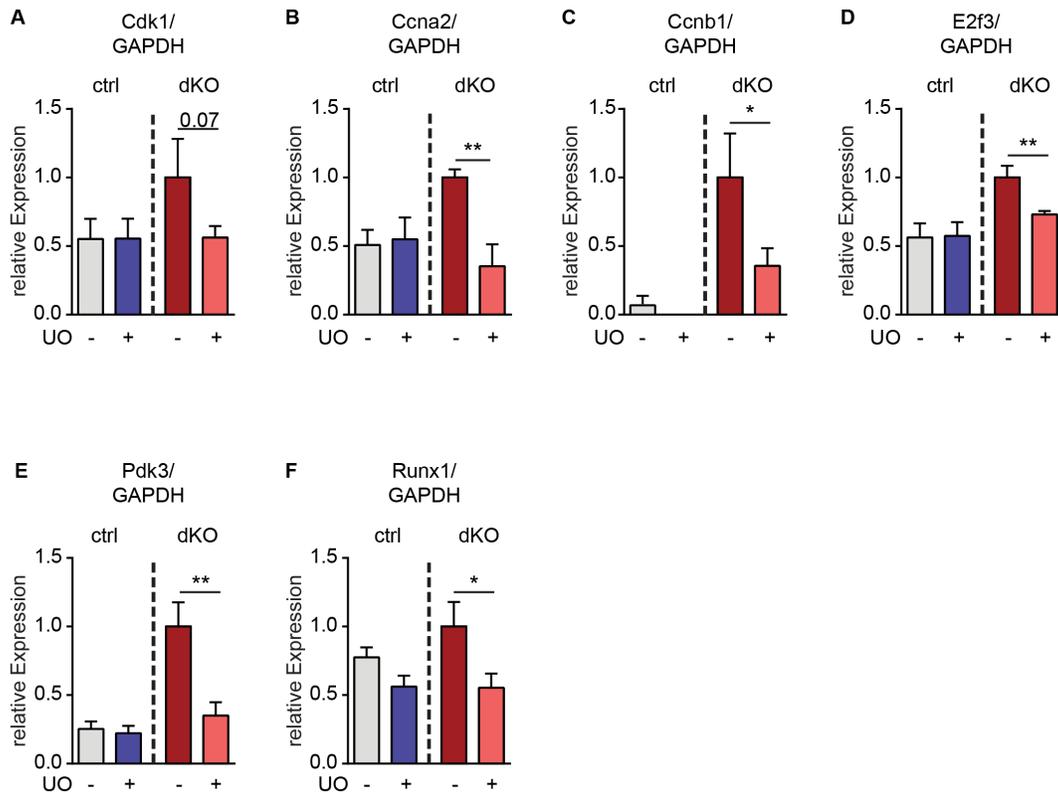
**Abbildung 34 – Der Knockout von miR-1/133a hat eine erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 in Kardiomyozyten zur Folge.**

(A) qPCR-Analyse der miR-1/133a Expression in adulten Kardiomyozyten (Wildtyp: n = 6; dKO: n = 6) 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion. Die miR-1/133a Expression ist in den Doppelknockout Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontrollen stark reduziert während in den Nicht-Kardiomyozyten (Nicht-K.) Fraktionen (WT: n = 5; dKO: n = 6) beider Gruppen keinerlei miR-1/133a Expression detektiert wird (nd= nicht detektiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte: \* < 0,05). (B+C) qRT-PCR-Analyse der Osmr und Fgfr1 Expression in adulten Kardiomyozyten (B; Osmr: Wildtyp: n = 4, dKO: n = 4; Fgfr1: Wildtyp: n = 4, dKO: n = 4; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte: \* < 0,05) und Nicht-Kardiomyozyten (C; Osmr: Wildtyp: n = 4, dKO: n = 3; Fgfr1: WT: n = 5, dKO: n = 4; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; p-Werte: > 0,05, nicht signifikant) in Wildtyp und mir-1/133a Doppelknockout Mäusen zeigt im Vergleich eine deutlich erhöhte Expression von Osmr und Fgfr1 in Doppelknockout Kardiomyozyten. Nicht-Kardiomyozyten zeigen keinen Unterschied innerhalb der Gruppen. Die relative Expression wurde auf GAPDH normalisiert. Die verwendeten Zellen wurden 3 Wochen nach der ersten Injektion von Tamoxifen isoliert. Die Durchführung und Auswertung dieser Experimente erfolgte durch Dr. Johannes Besser.



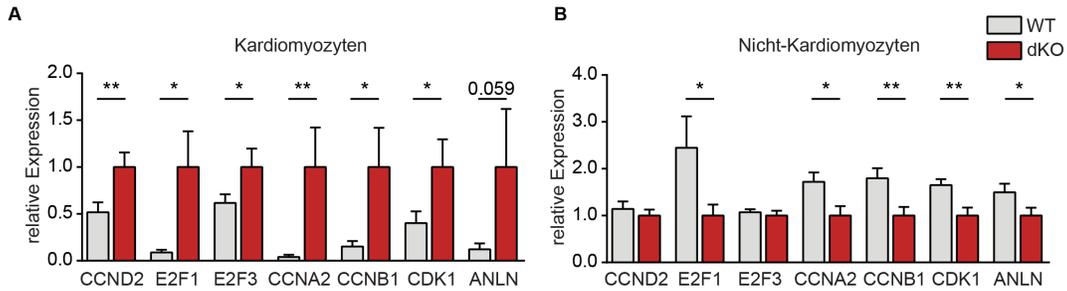
**Abbildung 35 – Der Doppelknockout von miR-1/133a führt zu keiner Anreicherung von Genen im Zusammenhang mit dem WNT-, Notch-, JAK/STAT- und Hippo Signalweg.** Microarray basierte GSEA (broadinstitute.org) Analyse von adulten Mausherzen (n = 3 pro Gruppe; rot = Angereichert in dKO Herzen; blau = Angereichert in Wildtyp Herzen) 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigt sowohl in dKO als auch tKO Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen keine Anreicherung von Genen die mit dem WNT-, Notch-, JAK/STAT- und Hippo Signalweg Zusammenhang stehen. Angegebene p-Werte beziehen sich auf den FC von dKO/WT.





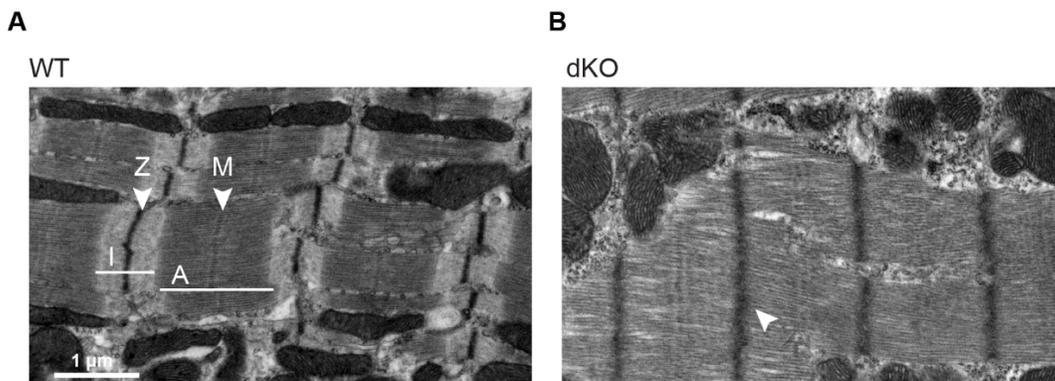
**Abbildung 37 – Inhibierung des ERK-Signalweges mit UO126 normalisiert die erhöhte Expression von Zellzyklusmarkern in miR-1/133a Doppelknockout Herzen.**

(A-F) qRT-PCR Analyse der Genexpression von Zellzyklusmarker (*Cdk1* (A); *Ccna2* (B); *Ccnb2* (C); *E2f2* (D)) und Downstream liegende Ziele vom OSMR/FGFR1 Signalweg (*Pdk3* (E); *Runx1* (F)) in Wildtyp und miR-1/133a Doppelknockout Herzen mit (WT: n = 7; dKO: n = 6; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (*Cdk1* in dKO): 0,07, nicht signifikant; p-Wert (*Ccna2* in dKO): \*\* < 0,01; p-Wert (*Ccnb1* in dKO): \* < 0,05; p-Wert (*E2f3* in dKO): \*\* < 0,01; p-Wert (*Pdk3* in dKO): \*\* < 0,01; p-Wert (*Runx1* in dKO): \* < 0,05; p-Werte (in WT): > 0,05, nicht sigifikant) und ohne (WT: n = 10; dKO: n = 4; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test) UO126 Behandlung. Die mir-1/133a Doppelknockout Herzen weisen im Vergleich zu den Wildtyp Herzen eine erhöhte Expression der untersuchten Marker auf, welche durch eine Zugabe vom MEK/ERK- Inhibitor UO126 normalisiert werden. Die Untersuchungen und Auswertungen wurden von Dr. Johannes Besser und Dr. Katharina Wysub-Lis durchgeführt.



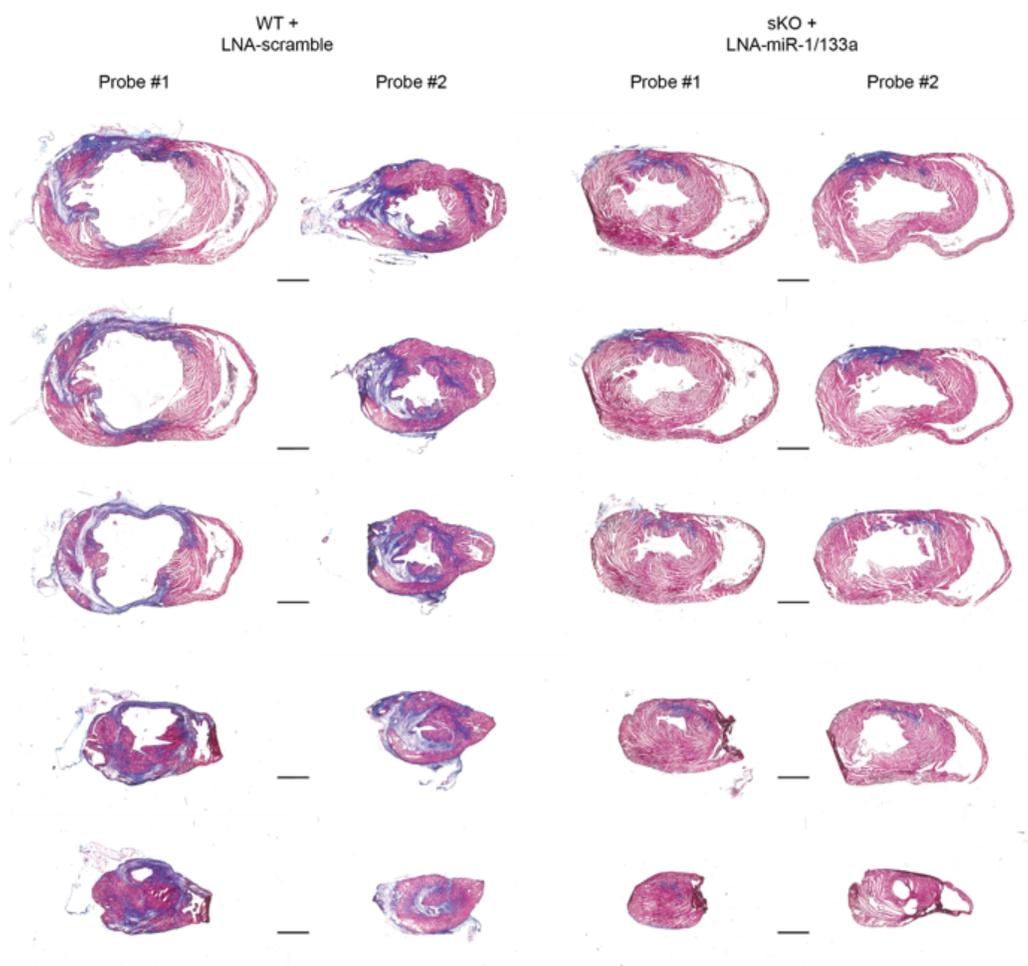
**Abbildung 38 – Deutliche Erhöhung von Zellzyklusmarkern in miR-1/133a Doppelknockout Kardiomyozyten.**

(A+B) qRT-PCR Analyse verschiedener Zellzyklusmarker in Kardiomyozyten (A; WT: n = 8-12; dKO: n = 7-9; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert (CCND2): \*\* < 0,01; p-Wert (E2F1): \* < 0,05; p-Wert (E2F3): \* < 0,05; p-Wert (CCNA2): \*\* < 0,01; p-Wert (CCNB1): \* < 0,05; p-Wert (CDK1): \* < 0,05; p-Wert (ANLN): 0,059, nicht signifikant) und Nicht-Kardiomyozyten (B; WT: n = 6-7; dKO: n = 6-7; Mittelwert  $\pm$  SEM; ungepaarter einseitiger t-Test; p-Wert(CCND2, E2f3): > 0,05, nicht signifikant; p-Wert (E2F1): \* < 0,05; p-Wert (CCNA2): \* < 0,05; p-Wert (CCNB1): \*\* < 0,01; p-Wert (CDK1): \*\* < 0,01; p-Wert (ANLN): \* < 0,05) 3 Wochen nach der ersten Tamoxifen Injektion. Die Expression der Zellzyklusmarker ist in den Doppelknockout Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontrollen deutlich erhöht. In der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion ist die Expression der Zellzyklus Marker in Doppelknockout Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontrollen verringert. Die Untersuchung und Auswertung erfolgte durch Dr. Johannes Besser.



**Abbildung 39 – Der miR-1/133a Doppelknockout ist mit einer Dedifferenzierung der Kardiomyozyten verbunden.**

(A+B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von adulten Kardiomyozyten (WT (A): n = 3; dKO (B): n = 2) 50 Tage nach der ersten Tamoxifen Injektion. Maßstabsbalken = 1 µm. Die Sarkomere der Doppelknockout Kardiomyozyten weisen unscharfe Z-Scheiben (weißer Pfeil) und Anzeichen einer Desorganisation auf. Die Untersuchung und Auswertung erfolgte durch Dr. Johannes Besser.



**Abbildung 40 – Darstellung des verringerten Infarktbereichs nach einer Runterregulation von miR-1/133a vor einem Myokardinfarkt.**

Trichrom Färbung von Herzschnitten 14 Tage nach einem Myokardinfarkt. Die Injektion der Kontroll-LNA (LNA-scramble) in Wildtypiere und der Kombination von miR-1-LNA und miR-133a-LNA (LNA-miR-1/133a) in sKO Tiere (single Knockout) erfolgte intravenös 7 Tage vor dem Myokardinfarkt. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Böttger für das spannende Projekt und die hervorragende Betreuung bedanken. Für die Geduld und dafür, dass seine Tür immer offen stand für hilfreiche Denkanstöße und Diskussionen.

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. Thomas Braun danke ich für die Aufnahme in sein Department, den zahlreichen Diskussionen, Denkanstößen und Vorschlägen während der Seminare und der Finanzierung des Projektes.

Prof. Dr Reinhard Dammann möchte ich für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation an der Universität Gießen danken.

Meinen Kooperationspartnern Thomas Kubin, Manfred Richter und Sven Zukunft danke ich für ihre Unterstützung und dem direkten Beitrag zu dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des MPI HLR und FGI. Ganz besonders möchte ich dabei Marion Wiesnet und Brigitte Matzke danken ohne deren Unterstützung ich so manches Experiment nicht hinbekommen hätte. Und natürlich den Tierpflegern für ihre zuverlässige Arbeit.

Allen Gruppenmitgliedern meiner Arbeitsgruppe danke ich für die Zusammenarbeit, konstruktive Hilfe und Diskussionsbereitschaft. Danke für die tolle Zeit Ina, Kerstin, Maria, Salma, und Theresa. Und auch ein Danke dafür an Christian nach Schweden.

Meinen Freunden, insbesondere Jerome, Andi, Ben, Julia, Masl und Sylvia für den permanenten starken Rückhalt, die vielen ermutigenden und motivierenden Gespräche und die stete Geduld auch in schwierigen Phasen. Zudem noch Viktor und Caitlin für die Hilfe und Unterstützung gerade in der letzten Phase dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung, den Rückhalt und der Zuversicht, auch in schwierigen Phasen mein Ziel konsequent weiterzuverfolgen.