

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Pannen

Einfluss von Ischämie und ischämischer  
Präkonditionierung auf die Expression der  
microRNA-223 im Myokard der Ratte und  
Interaktion der microRNA-223 mit dem  
potentiellen Zielprotein PMCA1

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Erkan Şen  
(2017)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Du bist nicht ein Tropfen im Ozean.

Du bist der gewaltige Ozean in einem Tropfen.

Mawlana Dschalal ad-Din ar-Rumi (1207-1273)

*meiner Familie / aileme*

## ZUSAMMENFASSUNG

**EINLEITUNG** microRNAs (miRNAs) sind kleine, endogene, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die durch Bindung an *messengerRNA* (mRNA) die Translation von Zielproteinen negativ beeinflussen können. miRNAs spielen auch bei myokardialer Ischämie eine wichtige Rolle. Die ischämische Präkonditionierung (IPC) und die ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) können einen Ischämie-Reperfusionsschaden nach myokardialer Ischämie reduzieren. Die PMCA1 (*Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) ist ein für die Mikroregulation von intrazellulärem Calcium und die zelluläre Apoptose wichtiges Transportprotein und wurde als mögliches Ziel der miR-223 bei miR-223-defizienten Mäusen durch eine Massenspektrometriemessung identifiziert.

**ZIELE** Die bisher unbekannte differentielle myokardiale miR-223-Expression bei Ischämie und IPC/RIPC wurde mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qPCR) untersucht. Außerdem wurde geprüft, ob die PMCA1 in einem Luciferase Assay tatsächlich ein Zielprotein der miR-223 ist.

**METHODEN** Für die Messung der differentiellen miR-223-Expression wurden männliche Wistar-Ratten in sechs Gruppen randomisiert (jew. n = 6): 1. Scheinoperation (*Sham*; Kontrollgruppe); 2. 30-minütige Ischämie einer Koronararterie und 2h Reperfusion (I/R); 3. vier Zyklen einer IPC ohne nachfolgende I/R (IPC), 4. IPC wie in 3. mit nachfolgender I/R (IPC + I/R), 5. vier Zyklen einer RIPC ohne Ischämie einer Koronararterie (RIPC) und 6. RIPC wie in 5. mit nachfolgender I/R (RIPC + I/R). Das Infarktareal wurde mittels einer Farblösung (*Evans blue*) demarkiert und Gewebeproben aus dem Risikogebiet (sog. *area at risk* oder *AAR*) und Restherz (*non-AAR*) entnommen. Hieraus wurde RNA isoliert, mittels spezifischer Primer in cDNA transkribiert und die miR-223-Expression mit qPCR ermittelt. Zur Überprüfung der miR-223/PMCA1-Interaktion wurden die 3'-UTR-Sequenz der PMCA1 mit der putativen Bindungsstelle für miR-223 sowie die pre-miR-223 in Reporter- bzw. Expressionsplasmide inkloniert und in HEK 293-Zellen transfiziert (jew. n = 4). Die Aktivitätsunterschiede wurden mit Luciferase Assays gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils mit t-Tests,  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

**ERGEBNISSE** Die miR-223 war nach I/R in den AAR-Proben signifikant hochreguliert; am höchsten bei reiner Myokardischämie (I/R, ca. 26-fach,  $p < 0,01$ ), niedriger bei IPC (ca. 16-fach,  $p < 0,01$ ) oder bei RIPC (ca. 5-fach,  $p < 0,01$ ). Im Nicht-Risikogebiet (*non-AAR*) war der Expressionsunterschied der miR-223 nur bei IPC signifikant erhöht (ca. 2,5-fach erhöht,  $p < 0,05$ ). Die postulierte Interaktion zwischen der miR-223 und der PMCA1 konnte im Luciferase Assay nicht bestätigt werden: Die relative Luciferaseaktivität der Experimentalgruppe (ca. 0,99-fach) unterschied sich nicht zur Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ).

**DISKUSSION** Die miR-223-Expression ist im myokardialen Ischämiegebiet signifikant erhöht, die Hochregulation ist bei IPC und RIPC graduell geringer ausgeprägt. Die miR-223 gilt als neutrophil-spezifisch, die Hochregulation ist wahrscheinlich durch eine neutrophiläre Invasion in das Ischämiegewebe bedingt. Eine IPC oder RIPC könnte zu einer verminderten Invasion führen, was die geringere miR-223-Expression erklären würde. Für den fehlenden Nachweis einer miR-223/PMCA1-Interaktion im Luciferase Assay werden Kriterien für erfolgreiche miRNA-mRNA-Interaktionen überprüft; das Fehlen von AU-reichen Sequenzen der 3'-UTR außerhalb der Bindungsstelle und fehlende zusätzliche Bindungsstellen werden als Hauptursachen vermutet. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die vermuteten Erklärungen überprüfen zu können.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION** microRNAs (miRNAs) are small, endogenous, non-coding RNA molecules that can adversely affect the translation of target proteins by binding to their messengerRNA (mRNA). miRNAs also play an important role in myocardial ischemia. Ischemic preconditioning (IPC) and remote ischemic preconditioning (RIPC) can reduce ischemia reperfusion damage after myocardial ischemia. PMCA1 (plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase) is a transport protein essential for the microregulation of intracellular calcium as well as cellular apoptosis and was identified as a possible target of miR-223 in miR-223-deficient mice by mass spectrometry.

**OBJECTIVES** The unknown differential myocardial miR-223 expression after ischemia and IPC/RIPC was measured by quantitative real-time PCR (qPCR). Furthermore, it was investigated whether PMCA1 is a true target of miR-223 in luciferase assay experiments.

**METHODS** In order to measure the differential miR-223 expression, male Wistar rats were randomized into six groups (n = 6): 1. sham (control group); 2. 30 min ischemia of a coronary artery and 2h of reperfusion (I/R); 3. four cycles of IPC without subsequent I/R (IPC), 4. IPC as in 3. with subsequent I/R (IPC + I/R), 5. four cycles of RIPC without ischemia of a coronary artery (RIPC) and 6. RIPC as in 5. with subsequent I/R (RIPC + I/R). The infarction area was assessed using *Evans blue* dye and tissue samples were taken from the so-called *area at risk* (AAR) and remaining heart (non-AAR). RNA was then isolated, transcribed into cDNA by specific primers and miR-223 expression was determined with qPCR. To investigate the alleged miR-223/PMCA1 interaction, the 3'-UTR sequence of PMCA1 with the putative binding site for miR-223 and pre-miR-223 were cloned into reporter and expression plasmids, respectively, and transfected into HEK 293 cells (n = 4). The differences in activity were measured with luciferase assay experiments. The statistical analysis was performed with t-tests, p < 0.05 was considered significant.

**RESULTS** miR-223 was significantly upregulated after I/R in the AAR; the highest after myocardial ischaemia alone (I/R, approximately 26-fold, p < 0.01), lower with IPC (approximately 16-fold, p < 0.01) or with RIPC (approximately 5-fold, p < 0.01). In the non-AAR, the expression of miR-223 was only significantly increased in IPC (approximately 2.5-fold, p < 0.05). The alleged interaction between miR-223 and PMCA1 could not be confirmed in the luciferase assay experiments: the relative luciferase activity of the experimental group (about 0.99-fold) did not differ from the controls (p > 0.05).

**DISCUSSION** The miR-223 expression is significantly increased in the ischemic region of the myocardium; the upregulation is gradually lower with IPC or RIPC. miR-223 is considered to be neutrophil-specific; the upregulation is probably due to a neutrophil invasion of the ischemic tissue. IPC or RIPC could result in a reduced invasion, which would explain the lower miR-223 expression. In an attempt to explain the missing miR-223/PMCA1 interaction in the luciferase assay experiments, several criteria for successful miRNA-mRNA interactions are evaluated; the absence of AU-rich sequences of the 3'-UTR outside the binding site and missing additional binding sites between miR-223/PMCA1 are believed to be crucial. Further investigation is needed to verify the presumed explanations.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	<b>Grad Celsius</b>
A	<b>Adenin</b> (Nukleinbase)
AAR	<b>area at risk</b> (Risikogebiet)
AGO	<b>Argonautenproteine</b> (genregulierende Proteinfamilie)
ARE	<b>AU-rich elements</b> (AU-reiche Elemente)
ATP	<b>Adenosintriphosphat</b>
atp2b1	<b>ATPase Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Transporting 1</b> (PMCA1-Gen)
Bax	<b>Bcl-2-associated X protein</b> (pro-apoptotisches Protein)
Bcl-2	<b>B-cell lymphoma 2</b> (anti-apoptotisches Protein)
bp	<b>base pair</b> (Basenpaar)
C	<b>Cytosin</b> (Nukleinbase)
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
Caspase	<b>Cysteiny-Aspartat spezifische Protease</b> (pro-apoptotische Proteinfamilie)
cDNA	<b>complementary DNA</b> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Cl <sub>2</sub>	Chlorid
cm <sup>2</sup>	<b>centimeter<sup>2</sup></b> (10 <sup>-4</sup> m <sup>2</sup> )
DEPC	<b>Diethylpyrocarbonat</b>
DMEM	<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b>
DNA	<b>Desoxyribonucleinacid</b> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<b>Desoxyribonucleosidtriphosphat</b>
ds	<b>Doppelstrang</b> (engl. <i>double strand</i> )
DTT	<b>Dithiothreitol</b>
dTTP	<b>Desoxythymidintriphosphat</b>
EDTA	<b>Ethylendiamintetraacetat</b>
eNOS	<b>endotheliale NO-Synthase</b>
fw	<b>forward</b> (vorwärts)
g	Erdbeschleunigung (g ≈ 9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	<b>Guanin</b> (Nukleinbase)

H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HEK 293	<b>H</b> uman <b>e</b> mbrionic <b>k</b> idney 293 (Zelllinie)
HSF-1	<b>H</b> itzeschockfaktor <b>1</b> (Transkriptionsfaktor von HSP)
HSP	<b>H</b> itzeschockprotein (anti-apoptotische Proteinfamilie)
IPC	<i>I</i> schemic <i>p</i> reconditioning (ischämische Präkonditionierung)
I/R	Ischämie/ <b>R</b> eperfusion
LARS	<i>L</i> uciferase <i>A</i> ssay <i>R</i> eagent <i>S</i> tock
LB	<i>L</i> ysogeny <i>b</i> roth
M	<b>m</b> olar
miR	<i>m</i> icro <b>R</b> NA
miR-223	<i>m</i> icro <b>R</b> NA- <b>223</b>
miRISC	<i>m</i> icro <b>R</b> NA- <i>i</i> nduced <i>s</i> ilencing <i>c</i> omplex
miRNA	<i>m</i> icro <b>R</b> NA
mg	<b>m</b> illigram (10 <sup>-3</sup> g)
Mg	Magnesium
ml	<b>m</b> illiliter (10 <sup>-3</sup> l)
mM	<b>m</b> illimolar (10 <sup>-3</sup> M)
mm	<b>m</b> illimeter (10 <sup>-3</sup> m)
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	<i>m</i> essenger <b>R</b> NA
MQ	deionisiertes Wasser ( <i>M</i> illi- <i>Q</i> )
Na <sup>+</sup>	Natriumion
ng	<b>n</b> anogram (10 <sup>-9</sup> g)
nm	<b>n</b> anometer (10 <sup>-9</sup> m)
ONPG	<b>o</b> -Nitrophenyl-β-Galactopyranosid
PBS	<i>P</i> hosphate <i>b</i> uffered <i>s</i> aline
PCR	<i>P</i> olymerase <i>c</i> hain <i>r</i> eaction (Polymerasekettenreaktion)
PDCD4	<i>P</i> rogrammed <i>c</i> ell <i>d</i> eath <b>4</b> (pro-apoptotisches Protein)
PMCA1	<i>P</i> lasma <i>m</i> embrane <i>C</i> a <sup>2+</sup> - <i>A</i> TPase <b>1</b>

pre-miR	<b>preliminary miRNA</b>
pri-miR	<b>primary miRNA</b>
qPCR	<b>quantitative Real-time PCR</b>
RhoB	<b>Ras homolog gene family member B</b>
RIPC	<b>Remote ischemic preconditioning</b> (ischämische Fernpräkonditionierung)
RISC	<b>RNA-induced silencing complex</b>
RLB	<b>Reporter Lysis Buffer</b>
RNA	<b>Ribonucleinacid</b> (Ribonukleinsäure)
RNase	<b>Ribonuklease</b>
rno	<b>Rattus norvegicus</b>
RPM	<b>revolutions per minute</b> (Umdrehungen pro Minute)
RT	<b>Reverse Transkription</b>
RT-PCR	<b>Reverse Transkriptions-PCR</b>
rv	<b>reverse</b> (rückwärts)
SPS	<b>seed-pairing stability</b> (Stabilität der Basenpaarung)
T	<b>Thymin</b> (Nukleinbase)
TA	<b>target-site abundance</b> (Überfluss an Zielstellen)
TAE	<b>Tris-Acetat-EDTA</b>
Taq	<b>Thermus aquaticus</b> (Bakterium)
TNF $\alpha$	<b>Tumornekrosefaktor <math>\alpha</math></b>
TRBP	<b>HIV-1 transactivation response RNA-binding protein</b>
U	<b>Uracil</b> (Nukleinbase)
U	<b>Unit</b> (Einheit)
V	<b>Volt</b>
WLAR	<b>Working Luciferase Agent Reagent</b>
3'-UTR	<b>3'-untranslated region</b> (untranslatierte Region am 3'-Ende einer Basensequenz)
$\mu$ g	<b>Mikrogramm</b> ( $10^{-6}$ g)
$\mu$ l	<b>Mikroliter</b> ( $10^{-6}$ l)
$\mu$ M	<b>Mikromolar</b> ( $10^{-6}$ M)

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	microRNAs .....	1
1.2	miRNAs bei myokardialer Ischämie .....	5
1.3	miRNAs bei ischämischen Präkonditionierungen .....	9
1.4	Interaktion der miR-223 mit dem potentiellen Zielprotein PMCA1 .....	13
2	ZIELE DER ARBEIT.....	15
3	MATERIAL UND METHODEN.....	16
3.1	Material.....	16
3.1.1	Geräte.....	16
3.1.2	Benutzte Software.....	17
3.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	17
3.1.4	Reagenzien.....	18
3.1.5	Puffer.....	19
3.1.6	Stammlösungen .....	19
3.1.7	Enzyme .....	21
3.1.8	Oligonukleotide .....	21
3.1.9	Materialien für die Transformation und Zellkultur .....	21
3.2	Methoden .....	22
3.2.1	Versuchsprotokoll der <i>in vivo</i> Versuche .....	22
3.2.2	RNA-Isolation.....	24
3.2.3	Reverse Transkription .....	25
3.2.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	26
3.2.5	Design von Primern für 3'-UTR der PMCA1 und pre-miR-223 .....	28
3.2.6	Auswahl von Restriktionsendonukleasen .....	29
3.2.7	Polymerase-Kettenreaktion.....	32
3.2.8	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion .....	33
3.2.9	Restriktionsverdau .....	34
3.2.10	Ligation bzw. Einklonierung in Plasmidvektoren .....	34
3.2.11	Herstellung LB-Platten, Transformation und Übernachtskultur .....	35
3.2.12	Plasmidseparation.....	36
3.2.13	Minipräp, Maxipräp und <i>Glycerol-Stocks</i> .....	37
3.2.14	Sequenzierungsanalysen .....	38
3.2.15	Zellkultur und Transfektion .....	38

3.2.16	Luciferase und $\beta$ -Galactosidase Assays .....	41
4	ERGEBNISSE .....	43
4.1	miR-223-Expression im Rattenmyokard bei I/R, IPC und RIPC .....	43
4.1.1	Deskriptive Statistik.....	43
4.1.2	Gruppenvergleiche der Relativen Expression der miR-223.....	43
4.2	miR-223-Interaktion mit der 3'-UTR der PMCA1 .....	46
4.2.1	Kontrolle der Einklonierung: pre-miR-223 in <i>pcDNA 3.1(+)</i> .....	46
4.2.2	Kontrolle der Einklonierung: 3'-UTR der PMCA1 in <i>pMIR-Report</i> .....	47
4.2.3	Luciferase und $\beta$ -Galactosidase Assays.....	48
5	DISKUSSION .....	50
5.1	miR-223-Expression bei myokardialer Ischämie sowie IPC/RIPC.....	50
5.2	Untersuchung der Interaktion zwischen miR-223 und PMCA1 .....	55
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN .....	66
	LITERATURVERZEICHNIS .....	67
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	86
	TABELLENVERZEICHNIS .....	87
	ANHANG.....	88
	DANKSAGUNG .....	

# 1 EINLEITUNG

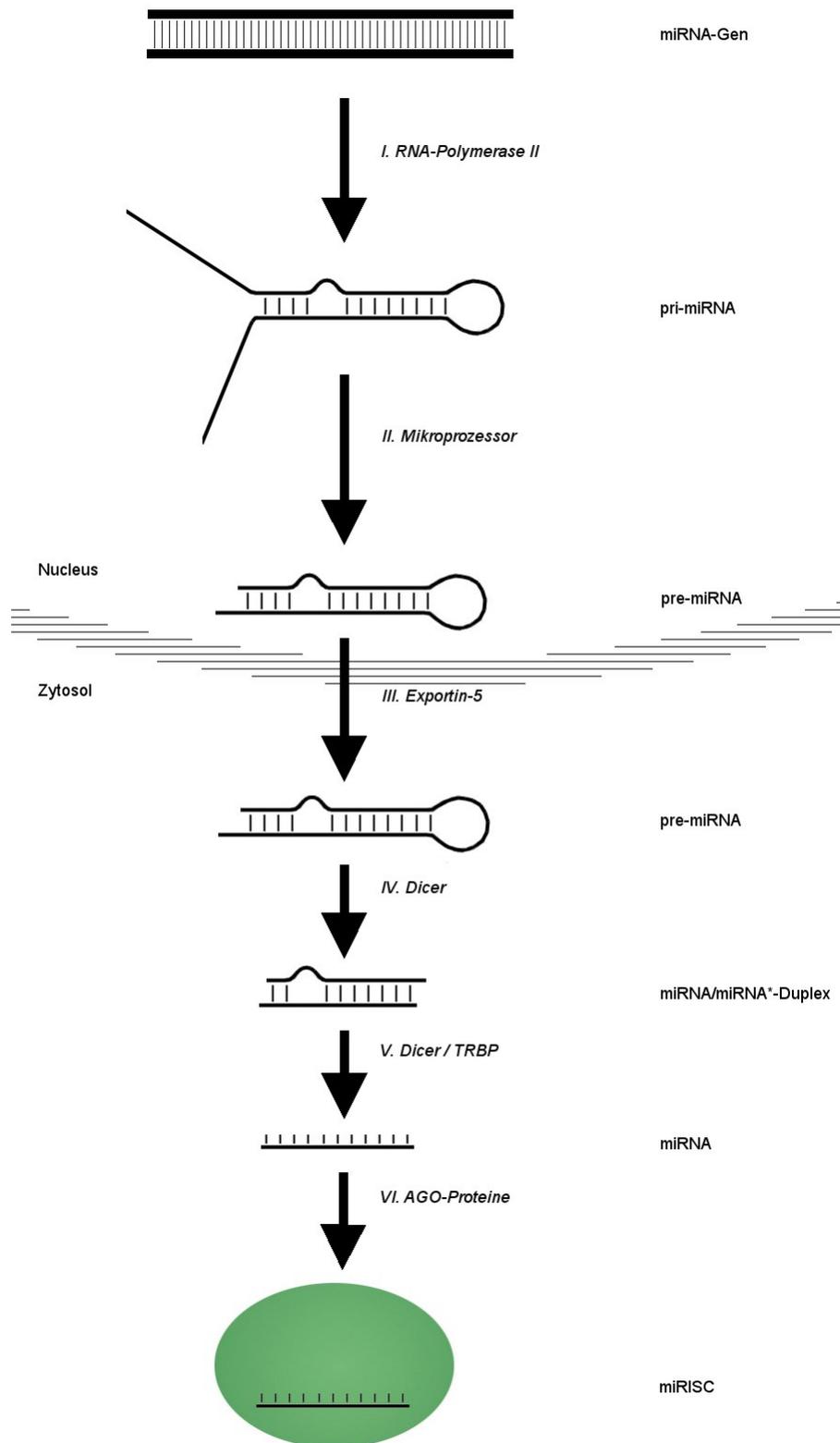
## 1.1 microRNAs

*microRNAs* (miRNAs) sind ca. 19-25 Nukleotide kurze, endogene, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die *messengerRNAs* (mRNAs) von Zielproteinen durch Repression oder Degradation inhibieren und dadurch in ihrer Expression negativ beeinflussen (Ambros 2001; Bartel 2004; Wienholds & Plasterk 2005; Singh et al. 2008). Es wird geschätzt, dass mehr als 60% aller proteinkodierenden Gene im Menschen von miRNAs beeinflusst werden und diese daher eine wichtige Rolle in intra- und extrazellulären Prozessen, zellulärer Differenzierung sowie in der Ätiologie von verschiedenen Krankheiten einnehmen (Friedman et al. 2008; He & Hannon 2004).

### *Biogenese der miRNAs*

Eine miRNA wird meist durch die RNA-Polymerase II (Lee et al. 2004; Abbildung 1, I) aus einem miRNA-Gen transkribiert, von denen über 1800 bisher beim Menschen bekannt sind (microRNA-Datenbasis *miRBase 21*, Universität Manchester, 2014; Kozomara & Griffiths-Jones 2011). Das Produkt ist eine bis einige hundert Basenpaare lange *primary miRNA* (pri-miRNA), die eine oder mehrere Haarnadelstrukturen (engl. *hairpin*) durch interne, komplementäre Basenpaarungen ausbildet sowie einen Poly-A-Schwanz (engl. *poly(A)-tail*) am 3'-Ende und eine 5'-*Cap*-Struktur als anderes Ende besitzt (Starega-Roslan et al. 2011). Diese wird noch im Kern von einem Multiproteinkomplex (sog. *Mikroprozessor*, Abbildung 1, II), bestehend aus der Ribonuclease *Drosha*, dem RNA-Bindungsprotein *DGCR8* (engl. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) sowie weiteren Proteinen erkannt und gespalten (Denli et al. 2004). Alternativ hierzu wird ein kleiner Anteil in einem sogenannten *miRtron*-Weg prozessiert (Ruby et al. 2007; Okamura et al. 2007). Dadurch wird die *preliminary miRNA* (pre-miRNA) gebildet, die ca. 60 Nukleotide lang ist und aktiv durch ein Kanalprotein (*Exportin-5*, *Exp-5*; Abbildung 1, III) mit Ran-Guanosintriphosphat (Ran-GTP) als essentiellm Cofaktor aus dem Kern in das Zytosol transportiert wird (Yi et al. 2003).

Im Zytosol wird die pre-miRNA von der Ribonuclease *Dicer* erkannt und in eine



**Abb. 1: Biogenese der miRNA.** Ein miRNA-Gen wird transkribiert, die entstandene *pri-miRNA* wird in eine *pre-miRNA* transformiert. Diese wird im Zytosol in eine *miRNA/miRNA\**-Duplexstruktur geschnitten, die wiederum in „reife“ miRNA und einen komplementären miRNA\*-Strang getrennt wird. Die entstandene miRNA wird in den *miRISC* aufgenommen, wo sie auf eine mRNA wirken kann.

miRNA /miRNA\*-Duplexstruktur zerschnitten (Bernstein et al. 2001; Abbildung 1, IV). Danach wird diese ds-miRNA wieder von *Dicer* sowie einem Hilfsprotein, dem *TRBP* (engl. *HIV-1 transactivation response RNA-binding protein*) in die „reife“ miRNA und die komplementäre miRNA\* getrennt (Haase et al. 2005; Abbildung 1, V). Die „reife“ miRNA wird über RNA-Bindeproteine der sogenannten *Argonauten-Familie* (*AGO*) in einen Ribonucleinproteinkomplex (*miRNP*) aufgenommen, der sowohl strukturell als auch funktionell einem *RISC* (*RNA induced silencing complex*) ähnelt und deshalb auch *miRISC* genannt wird (Kim & Nam 2006; MacRae et al. 2008; Abbildung 1, VI). Der komplementäre miRNA\*-Strang wird entweder im Zytosol belassen und degradiert (Kawamata & Tomari 2010) oder nimmt u.a. regulatorische Funktionen ein (Guo & Lu 2010).

### *Mechanismen der Genregulation durch miRNAs*

Welche der beiden miRNAs aus der Duplexstruktur biologisch aktiv wird, scheint von der thermodynamischen Stabilität ihrer ersten vier Basen am 5'-Ende abhängig zu sein (Schwarz et al. 2003). Es gibt auch Fälle, in denen sowohl die miRNA als auch der komplementäre miRNA\*-Strang zusammen mRNAs posttranslational hemmen (Ghildiyal et al. 2010; Okamura et al. 2008).

Im miRISC nehmen Proteine aus der *AGO*-Gruppe eine zentrale Rolle ein. Zum einen enthält jeder miRISC ein Mitglied der *AGO*-Familie, das an das 3'-Ende der reifen miRNA bindet. Außerdem interagiert dieses *AGO*-Protein auch mit dem 5'-Ende der inkorporierten miRNA. Somit wird die miRNA im miRISC gebunden und für die Interaktion mit einer Ziel-mRNA richtig orientiert (Pratt & MacRae 2009). Für die Erkennung von Ziel-mRNAs ist eine zumindest partielle Komplementarität zwischen miRNA und mRNA essentiell. Die *seed region*, die aus 2 bis 7 Basen am 5'-Ende der reifen miRNA besteht, geht eine perfekte Basenpaarung mit einer komplementären Sequenz in der 3'-UTR (engl. *untranslated region* = „nicht translatierte Region“) der Ziel-mRNA ein (Bartel 2009). Die Konsequenzen dieser Bindung bestehen vor allem in der Destabilisierung der mRNA und der damit verminderten Expression des transkribierten Zielgens (Guo et al. 2010). Andere Mechanismen beeinträchtigen direkt oder indirekt die ribosomale Translation. Diese besitzen unterschiedliche kinetische Kenngrößen, können theoretisch parallel ablaufen und zusammen zur

verminderten Genexpression beitragen (Morozova et al. 2012). Vereinzelt wurden auch miRNAs beschrieben, die durch Bindung an Promotorsequenzen von Zielgenen deren Expression fördern können (Place et al. 2008) oder auch posttranskriptionell über verschiedene Mechanismen die Translation von Ziel-mRNAs steigern können (Vasudevan et al. 2007). Nach computergestützten Berechnungen kann jede einzelne menschliche miRNA mit durchschnittlich 200 Zielen in potentiellen mRNAs aus dem menschlichen Genom interagieren; somit wird deutlich, dass miRNAs eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression spielen (Lewis et al. 2005).

### *Funktionen von miRNAs in menschlichen Zellen*

Die Expression einzelner miRNAs ist gewebspezifisch (Lagos-Quintana et al. 2002) und miRNAs sind essentiell für Zellproliferation, Apoptose sowie Zelldifferenzierung (Yu et al. 2012), Embryogenese (Bernstein et al. 2003), Stammzellendifferenzierung (Zhao et al. 2005; Ivey et al. 2008; Liu et al. 2012) sowie auch Hämatopoese beim Menschen (Bissels et al. 2012). Verschiedene Erkrankungen gehen mit unterschiedlichen Mustern einer dysregulierten miRNA-Expression einher, sodass diese zunehmend in den Fokus der klinischen Grundlagenforschung gestellt wird (Jiang et al. 2009). Fehlregulierte miRNA-Expressionslevel wurden bei onkologischen Erkrankungen beschrieben (Lu et al. 2005) und miRNAs als Onkogene bzw. Tumorsuppressoren (Saito & Saito 2012), potentielle Biomarker (Mo et al. 2012) oder auch als Faktoren für Metastasierung sowie Medikamentenresistenz (P.-S. Chen et al. 2012) diskutiert. Ferner wurden veränderte miRNA-Expressionen bei neurologisch-psychiatrischen Erkrankungen (wie Morbus Alzheimer, Morbus Huntington oder der Schizophrenie: Maes et al. 2009) und bei kardiovaskulären Pathologien beschrieben (Rhythmogenese: Yang et al. 2007; Luo et al. 2008; Kardiomyopathien: Ikeda et al. 2007; ischämische Herzerkrankungen: Fichtlscherer et al. 2011; Dorn II 2011).

### *Zusammenfassung*

miRNAs sind kurze, endogene, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Translation von Ziel-mRNAs durch Bindung an eine komplementäre Sequenz in der 3'-UTR der mRNA behindern und somit die Expression des Zielgens negativ beeinflussen. Sie

spielen eine immer größer werdende Rolle in verschiedensten biologischen Prozessen, unter anderem auch bei kardiovaskulären Pathologien.

## **1.2 miRNAs bei myokardialer Ischämie**

Die meisten Todesfälle weltweit sind bedingt durch kardiovaskuläre Erkrankungen (World Health Organization (WHO) 2016). Dabei spielt die myokardiale Ischämie als chronische ischämische Herzkrankheit oder als akuter Myokardinfarkt die Hauptrolle (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017). Hierunter versteht man die insuffiziente Perfusion des Herzmuskels, in deren Folge es zu einer Infarzierung des minderperfundierten Gebietes kommt (Renz-Polster & Krautzig 2008).

### *Pathophysiologie der myokardialen Ischämie*

Pathophysiologisch ist neben dem nekrotischen Untergang des infarzierten Gewebes auch die Apoptose von unmittelbar an das infarzierte Areal angrenzenden Kardiomyozyten von Bedeutung (Krijnen et al. 2002). Hier befindet sich nach dem akuten Infarktereignis noch Gewebe, das sich makroskopisch vom blassen, nekrotischen Areal unterscheidet, sich jedoch durch eine Farblösung nicht färben lässt, somit nicht mehr perfundiert und ebenfalls zum Infarktareal, der sogenannten *area at risk* (AAR), gezählt wird (Gerber 2007; Redfors et al. 2012). Einem Teil des Untergangs der Kardiomyozyten liegt nicht nur die Ischämie selbst zugrunde, sondern er wird auch durch die der Ischämie folgenden Reperfusionssphase induziert bzw. sogar verstärkt. Dieser *myokardiale Reperfusionsschaden* kann bis zu 50% des endgültigen Infarktareals bedingen und ist unter anderem durch oxidativen Stress, einen abrupten Anstieg intrazellulären Calciums, eine rasche Wiederherstellung des physiologischen pHs sowie durch eine Invasion neutrophiler Granulozyten in die Infarktzone bedingt (Yellon & Hausenloy 2007).

### *Folgen der myokardialen Ischämie*

Kurzfristig ist das Herz selbst direkt nach Wiederherstellung der adäquaten Perfusion in seiner Leistungsfähigkeit eingeschränkt. Dies ist entweder durch das sogenannte myokardiale *Stunning* (von engl. *stunning* = „betäubend“) bedingt, die

eine Latenz zwischen Wiederherstellung der Perfusion und der kompletten funktionellen Erholung des Myokards beschreibt, oder wird durch das sogenannte *Hibernating* Myokard (von engl. *hibernation* = „Winterschlaf“) erklärt, das ein in seiner Kontraktilität und seiner Teilnahme am Metabolismus eingeschränktes myokardiales Areal nach einer Ischämie bedeutet (Silvestri et al. 2009).

Langfristig werden nach dem myokardialen Schaden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und verschiedene Transkriptionsfaktoren vermehrt gebildet. Somit wird die Hypertrophie der verbliebenen Kardiomyozyten gefördert und das *Remodeling* der extrazellulären Matrix vorangetrieben. Hierdurch kommt es zu einer ventrikulären Dilatation und einer progredienten myokardialen Fibrose, die die kardiale Leistungsfähigkeit weiter reduzieren (Mann & Bristow 2005).

#### *miRNAs bei myokardialer Ischämie*

Aufgrund ihres regulatorischen Potentials auf die Genexpression sind miRNAs auch im Rahmen der kardialen Reaktion auf einen ischämischen Reiz von großem Interesse. Als Folge eines Ischämie-Reperfusion-Ereignisses wird eine jeweils verminderte Expression von miR-1 und miR-133a in Rattenherzen beschrieben. Diese war vergesellschaftet mit Expressionsänderungen der miR-1-Zielproteine *Bcl-2*, *HSP60*, *HSP70* und des miR-133a-Zielproteins *Caspase 9*, welche wichtige Proteine der zellulären Apoptose sind, wobei die Ziele der miR-1 als anti-apoptotisch und Proteine aus der Caspase-Familie als pro-apoptotisch gelten (He et al. 2011; Zhai et al. 2015; Xu et al. 2007). Eine Hemmung der herzspezifischen miR-208a im ischämisch-infarzierten Maus Herzen führte nach 28 Tagen zu besseren echokardiographischen Leistungsindizes und zu einer reduzierten Expression des pro-apoptotischen Proteins *Bax*, die Infarktgrößen unterschieden sich jedoch nicht signifikant (Tony et al. 2015). Die miR-22 scheint kardioprotektiv zu sein, indem sie über eine vermehrte Bildung von *Bcl-2*, eine reduzierte Expression von *Bax* sowie eine reduzierte Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie *TNF $\alpha$*  und *Interleukin-6* zu signifikant kleineren Apoptoseraten führt (Yang et al. 2016). Eine Hemmung der miR-126 hingegen reduzierte das Infarktareal nach Ischämie/Reperfusion und führte auch aufgrund einer verminderten Expression der *Caspase 3* zu einer geringer ausgeprägten Apoptose (Li et al. 2015). Im

ischämischen Mäuseherzen verringerte eine exogene Gabe von miR-21 sowie miR-146a die Infarktgröße signifikant und führte zu einer größeren, synergistischen Hemmung der Caspase 3 als die jeweils alleinige Applikation (Huang et al. 2016).

Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen und insbesondere beim Myokardinfarkt wird das Vorkommen zirkulierender miRNAs als potentielle Biomarker diskutiert (Fichtlscherer et al. 2011; Oerlemans et al. 2012; Creemers et al. 2012; Zile et al. 2011; Vogel et al. 2013; Voellenkle et al. 2010; Hoekstra et al. 2010). So waren im Plasma von Patienten mit akutem Myokardinfarkt die mit Kardiomyozyten assoziierten miRNAs miR-208b und miR-499 1600-fach bzw. 100-fach erhöht verglichen mit Nichtinfarkt-Kontrollplasma (Corsten et al. 2010); der diagnostische oder prognostische Nutzen dieser und weiterer zirkulierender miRNAs ist derzeit noch unklar (Devaux et al. 2015; Karakas et al. 2016).

Einzelne miRNAs besitzen gezielte Aufgaben bei der Regeneration nach einem Myokardinfarkt, die in Studien mit sogenannter *Loss-of-function* (engl.: „Verlust der Funktion“) bzw. *Gain-of-function* (engl.: „Gewinn der Funktion“) bei Mäusen belegt werden konnten. So wiesen zum Beispiel miR-126-defiziente Mäuse eine inadäquate Neovaskularisierung des Herzens nach Myokardinfarkt auf (Wang et al. 2008), eine gezielte Inhibition der miR-92a führte zu einer verbesserten Vaskularisierung des Postinfarkt-Myokards und damit zu einer verbesserten Erholung des verletzten Gewebes (Bonauer et al. 2009). Injektionen von miR-210 in das Postinfarkt-Myokard resultierten in einer höheren kardialen Pumpleistung als in unbehandelten murinen Postinfarkt-Herzen (Hu et al. 2010). Eine Behandlung mit dem Betablocker Propranolol hemmte die Expression von durch die miR-1 regulierten Signalwegen sowie Transkriptionsfaktoren und blockierte damit das arrhythmogene Potential der miR-1 (Lu et al. 2009). Diese und weitere beschriebene Zusammenhänge sorgten dafür, dass miRNAs auch als mögliche therapeutische Ziele zur Behandlung der myokardialen Ischämie betrachtet werden (Dorn II 2010; Ye et al. 2011).

#### *miR-223 bei myokardialer Ischämie*

Bei zirkulierenden miRNAs wurde eine signifikante Herunterregulierung der miR-223 im Blutplasma nach akutem Myokardinfarkt ermittelt, die weder mit dem Troponin-T-Spiegel noch mit der Leukozytenzahl im Blut korrelierte (Corsten et al.

2010). In einer prospektiven Studie wurde unter anderem der Plasmaspiegel der zirkulierenden miR-223 als prognostische Variable beschrieben, der v.a. zum Risiko eines Myokardinfarkts und der damit assoziierten Mortalität eine inverse Relation aufwies (Zampetaki et al. 2012). In anderen Studien konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden (Hoekstra et al. 2010; Devaux et al. 2015): so gab es hier keine Unterschiede in der miR-223-Expression bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung bzw. einem akuten Myokardinfarkt und gesunden Kontrollen. Die miR-223 wurde in diesem Zusammenhang sogar als *housekeeping*-Gen beschrieben (Hoekstra et al. 2010), wobei hier die miRNA-Signatur in peripheren, mononukleären Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen) untersucht wurde, die miR-223 jedoch als besonders spezifisch für neutrophile Granulozyten gilt (Johnnidis et al. 2008; Chen et al. 2004; Q. Chen et al. 2012).

In einer Studie von van Rooij et al. konnte gezeigt werden, dass die miR-223-Expression nach Myokardinfarkt deutlich erhöht war (ca. 16-fach nach drei Tagen in der Grenzzone zum Infarkt in einem *Microarray*, ca. 12-fach nach vierzehn Tagen in einer *Real-Time* PCR; van Rooij et al. 2008). Dong et al. ermittelten in ihrer miRNA *Microarray*-Untersuchung von sechs Stunden nach Myokardinfarkt entnommenem Rattenherzgewebe einen signifikanten miR-223-Anstieg von ca. 4-fach im Infarktareal, im dazu benachbarten Grenzareal betrug die gemessene Hochregulation ca. 9-fach (Dong et al. 2009).

### *Zusammenfassung*

Die Folgen einer myokardialen Ischämie spielen epidemiologisch weiterhin eine große Rolle. Pathophysiologisch ist neben der ischämiebedingten Nekrose von Herzmuskelzellen auch der durch Apoptose bedingte Untergang von infarktnahen Zellen bedeutsam. Als Reaktion auf diese Schädigung kommt es zu einer Aktivierung von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren, die die Herzfunktion weiter verschlechtern. Im Kontext einer myokardialen Ischämie wurden differentiell regulierte miRNAs im Infarkt- und hierzu benachbartem Gewebe beschrieben, einzelne miRNAs als Biomarker sowie andere als mögliche therapeutische Ziele vorgestellt. Es gibt Hinweise, dass die miR-223 bei myokardialer Ischämie sowohl im Infarkt- als auch zum hierzu benachbarten Gewebe hochreguliert ist.

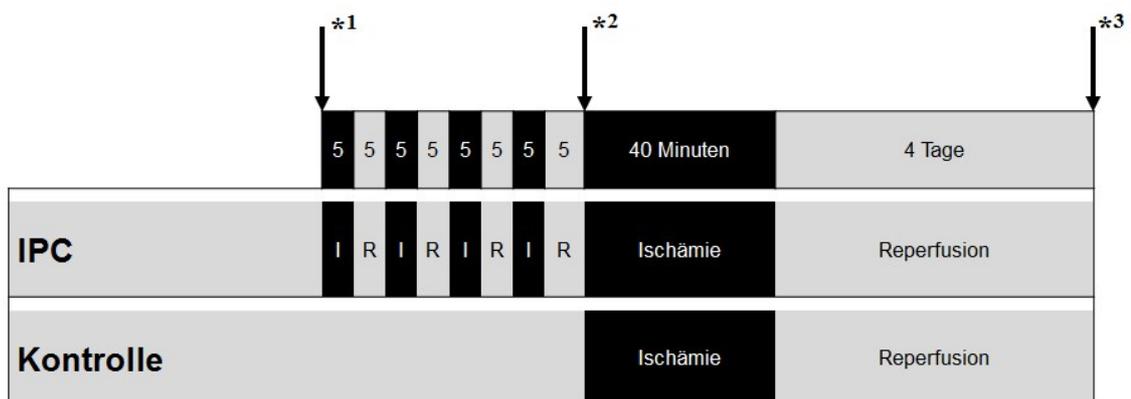
### 1.3 miRNAs bei ischämischen Präkonditionierungen

#### Die ischämische Präkonditionierung

Murry et al. stellten mit der ischämischen Präkonditionierung (IPC) eine Prozedur vor, in der eine Serie von kurzen, alternierenden Sequenzen von Ischämie und Reperfusion herzversorgender Arterien vor einer langen Ischämiephase das spätere myokardiale Infarktareal verkleinert. Hierfür unterbrachen sie mehrfach bei Hunden den Blutfluss der linken Koronararterie, jeweils gefolgt von Reperfusion (Abbildung 2). Darauf erfolgte ein länger andauernder Verschluss des Gefäßes. Hunde in der Kontrollgruppe erhielten nur die längere Okklusion, ohne IPC. Die IPC reduzierte das Infarktareal um 75% (Murry et al. 1986).

Eine IPC wurde auch als ein möglicher Mechanismus für den bereits klinisch bekannten positiven Effekt einer instabilen *Angina pectoris* (Engegefühl bzw. Schmerzen in der Brust) mehrere Stunden vor einem manifesten Myokardinfarkt (sog. *Präinfarktangina*) auf die spätere Infarktgröße und die klinische Prognose vermutet (Kloner et al. 1995).

Für die IPC werden zwei zeitlich unterschiedliche protektive Phasen beschrieben: zunächst die frühe Phase, die direkt unmittelbar nach der IPC-Prozedur beginnt, für ca. zwei bis drei Stunden andauert und *first window of protection* (engl.: „Erstes Schutzfenster“) genannt wird. Die späte Phase, die ca. 12 bis 24 Stunden nach einer



**Abb. 2: Das experimentelle Tiermodell von Murry et al. (1986).** Das Versuchsprotokoll umfasste zwei Gruppen: die Experimentalgruppe erhielt eine ischämische Präkonditionierung (IPC) vor einer 40-minütigen Ischämie (Beginn der Behandlung bei \*1), die Kontrollgruppe erhielt nur letzteres (Beginn des Treatments bei \*2). Die IPC-Gruppe erhielt vier Zyklen von jeweils 5 Minuten Ischämie („I“) und 5 Minuten Reperfusion („R“). Der längeren Ischämiephase folgte eine 4-tägige Reperusionsphase, nach deren Ende (\*3) das Herzgewebe entnommen wurde (modifiziert aus Murry et al. 1986).

IPC folgt und für drei bis vier Tage andauert wird als *second window of protection* (engl.: „Zweites Schutzfenster“) bezeichnet (Marber et al. 1993; Bolli 2000). Zwischen diesen beiden Phasen besteht keine Protektion. Während für die frühe Phase der IPC eine Aktivierung von existierenden Signalwegen bzw. -molekülen diskutiert wird, wird für die späte Phase der IPC eine Aktivierung von Genen und eine sukzessive *de-novo*-Synthese von Proteinen verantwortlich gemacht (Das & Das 2008). Es wurden darüber hinaus viele Triggerfaktoren, Signalwege sowie Endeffektoren beschrieben, die bei der IPC eine Rolle spielen und nicht nur auf Kardiomyozyten beschränkt sind (Bell & Yellon 2012).

#### *miRNAs bei der ischämischen Präkonditionierung*

Für die frühe Phase der IPC konnte gezeigt werden, dass die Expression der miR-21 im infarzierten Rattengewebe nach myokardialer Ischämie vermindert, im Grenzbereich dagegen erhöht ist. Eine Vorbehandlung mit einer IPC führte sechs Stunden nach der Myokardischämie zu einer Hochregulierung der miR-21 verglichen mit reiner Myokardischämie, wobei die Expression im Grenzbereich zum Infarkt erneut relativ höher war. Das Infarktareal war ebenfalls kleiner als bei der Ischämie ohne IPC. Zudem reduzierte eine induzierte Expression von miR-21 (über Adenovirus-vermittelte miR-21-Expression bzw. einen sog. *Ad-miR-21*-Vektor) das Infarktareal signifikant, indem es im Infarkt- und im dazu benachbarten Grenzareal zu einer verminderten Apoptose der Kardiomyozyten führte (Dong et al. 2009). Eine andere Studie konnte mit dem Protein *PDCD4* (engl. *programmed protein cell death 4*, „Programmiertes Zelltod-Protein“) ein direktes Ziel der miR-21 identifizieren, dessen Apoptose-fördernde Wirkung durch Repression seiner mRNA durch die hochregulierte miR-21 gehemmt werden konnte (Cheng et al. 2010).

Im Rahmen einer IPC wurden hochregulierte Expressionslevel von miR-1, miR-21 und miR-24 gefunden (IPC mit folgender 30-minütiger Ischämie und 60-minütiger Reperfusion bei isolierten Mäuseherzen). Ein Pool dieser miRNAs wurde dann *in vivo* direkt in das vermutete spätere Infarktareal des linken Mäuseventrikels 48 Stunden vor Ischämie/Reperfusion injiziert, was zu kleineren Infarktgrößen führte und somit einen IPC-Effekt der späten Phase wiedergab. Außerdem waren kardioprotektive Proteine wie *eNOS* (endotheliale Stickstoffsynthase), *HSP70*

(Hitzeschockprotein 70) bzw. der dazugehörige Transkriptionsfaktor *HSF-1* (Hitzeschockfaktor 1) hochreguliert (Yin et al. 2009).

Es wurden viele intrazelluläre Mechanismen beschrieben, die durch miRNAs vermittelt oder verstärkt den schützenden Effekt der IPC vermitteln. Hierbei induzieren einige miRNAs gezielt weitere kardioprotektive Proteine oder hemmen bekannte pro-apoptotische Gene bzw. Proteine. Letztere führen über die Aktivierung von Caspasen (Cysteinyl-Aspartat spezifische Proteasen) über mehrere Schritte zu einer Apoptose der Zelle. Diese können auch durch miRNAs direkt aktiviert werden (Salloum et al. 2010; Kukreja et al. 2011; Weiss et al. 2012).

#### *Die ischämische Fernpräkonditionierung*

Die ischämische Fernpräkonditionierung (engl. *remote ischemic preconditioning, RIPC*) basiert auf der Beobachtung, dass eine IPC (bestehend aus vier Episoden von jeweils 5-minütiger Ischämie und Reperfusion) des *Ramus circumflexus* der linken Koronararterie bei Hunden vor einer 60-minütigen Okklusion des *Ramus interventricularis anterior* ebenfalls der linken Koronararterie das der längeren Ischämie folgende Infarktareal signifikant reduzieren konnte. Somit konnte eine IPC in einem Koronarbett das Herzgewebe in einem anderen Koronarbett konditionieren (Przyklenk et al. 1993). Dieser Effekt konnte auch durch Präkonditionierungen herzentfernter Gewebe und Organe nachgewiesen werden, wie Gehirn, Nieren, Eingeweide, Haut und Skelettmuskel (Heusch 2012). Die der RIPC zugrundeliegenden Mechanismen der Übertragung des Ischämiesignals eines herzentfernten Organs bzw. Gewebes zum Myokard sind zum Teil noch ungeklärt; es werden humorale bzw. hormonale, neurale und systemische Signalwege diskutiert (Hausenloy & Yellon 2008; Shimizu et al. 2009; Lim et al. 2010; Gircz et al. 2014; Rassaf et al. 2014; Stoppe et al. 2016).

Weiteres Interesse erhielt die RIPC durch die Möglichkeit ihrer nicht-invasiven Auslösung, z.B. durch die transiente Ischämie und Reperfusion einer einzelnen Extremität, wodurch sie schon einige vielversprechende Ergebnisse lieferte (Kharbanda et al. 2009; Hausenloy & Yellon 2011). Zwei große Phase-III-Studien (*ERICCA* und *RIPHeart*) fanden jedoch keine zusätzlichen klinischen Vorteile einer RIPC (appliziert an den oberen Extremitäten) bei herzchirurgischen Patienten

(Hausenloy et al. 2015; Meybohm et al. 2015). Für das in beiden Studien verwendete intravenöse Narkotikum Propofol wurde zuvor ein antagonisierender Einfluss auf die positiven RIPC-Effekte beschrieben (Kottenberg et al. 2012), so dass das Design beider Studien kritisiert und die scheinbar nicht reproduzierbaren RIPC-Effekte hauptsächlich hierauf zurückgeführt wurden (Heusch & Gersh 2016). Allerdings gibt es Hinweise, dass auch das volatile Narkotikum Isofloran die sonst als robust beschriebenen RIPC-Effekte nivellieren kann (Lucchinetti et al. 2012). Derzeit bleibt unklar, ob und unter welchen genauen Bedingungen eine RIPC im klinischen Alltag einen zusätzlichen Nutzen bieten kann.

#### *miRNAs bei der ischämischen Fernpräkonditionierung*

Eine RIPC führte in einer Studie zu einer signifikant verminderten Expression der sonst im Myokard am häufigsten gefundenen miR-1 im ischämischen Rattenherzen nach 30 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. Zudem waren die proapoptischen Proteine *Bax* und *PDCD4* bei RIPC signifikant erniedrigt (Duan et al. 2012). Bei 60-minütiger Myokardischämie nach RIPC mit einer der Ischämie folgenden 6-stündigen Reperfusion kam es hingegen zu einer Hochregulation der miR-1 (ca. dreifach). Eine alleinige RIPC ohne folgende Ischämie induzierte nach 2 Stunden eine signifikante miR-1-Repression, nach 6 Stunden war die miR-1 wieder mit ca. 4-fach signifikant hochreguliert (Brandenburger et al. 2014).

Eine andere Studie schreibt der miR-144 eine zentrale Rolle in der Vermittlung des kardioprotektiven Effekts der RIPC zu. Eine myokardiale Ischämie führte mit RIPC zu einer signifikanten Hochregulation der miR-144, die ohne RIPC deutlich reprimiert war. Zudem wurden die RIPC-Effekte (reduzierte Infarktgröße sowie die bessere funktionelle Erholung der isolierten Herzen) durch eine Hemmung der miR-144 (via intravenöser Injektion eines spezifischen *AntagomiR* = Oligonucleotid mit perfekter Komplementarität gegenüber einer Ziel-miRNA) aufgehoben. Eine Infusion von miR-144 sowohl 60 Minuten als auch 24 Stunden vor einer Ischämie/Reperfusion führte zu reduzierten Infarktgrößen und geringeren Einschränkungen der kardialen Funktion. Somit wurde die miR-144 als mögliche therapeutische Option zum Schutz vor einem myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden beschrieben (Li et al. 2014).

## *Zusammenfassung*

Die IPC und RIPC sind Prozeduren, die einen Ischämie-Reperfusionsschaden nach myokardialer Ischämie reduzieren können. Für die Vermittlung des protektiven Effekts der IPC und RIPC werden neben verschiedenen Mechanismen auch miRNAs beschrieben, die pro-apoptotische Proteine hemmen.

### **1.4 Interaktion der miR-223 mit dem potentiellen Zielprotein PMCA1**

#### *PMCA1, Calcium und Apoptose*

Die PMCA1 (*plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1*) ist eine Isoform des Proteins PMCA, das für den Calciumhaushalt (Strehler et al. 2007) sowie für die Embryogenese essentiell und als einzige PMCA-Isoform als *housekeeping*-Protein physiologisch unabdingbar ist (Okunade et al. 2004).

Durch ATP-abhängige Phosphorylierung wird das transmembranäre Enzym in seiner molekularen Konfiguration geändert und verschiebt so aktiv ein Ca<sup>2+</sup>-Ion im Austausch mit einem H<sup>+</sup>-Ion nach extrazellulär. Sie wird in die vier verschiedenen Subtypen PMCA1-4 unterteilt, die eine unterschiedliche Verteilung im Gewebe besitzen: während die PMCA1 und -4 ubiquitär vorkommen, sind die PMCA2 und -3 vor allem auf Nervengewebe beschränkt (Brini & Carafoli 2009). Für die Wiederherstellung des Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extrazellulärem [Ca<sup>2+</sup>] ist der Anteil des ebenfalls transmembranären Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers insgesamt erheblich größer; der PMCA wird v.a. die Hauptrolle in der Mikroregulation der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase zugeschrieben (Giacomello et al. 2013).

Ein Verlust der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase kann zu einer Initiierung der Apoptose und damit zum Tod der Zelle führen. Dabei ist neben anderen die Aktivierung von Mitgliedern der Caspasen-Familie bedeutsam (Orrenius et al. 2003). Diese spalten gezielt einzelne PMCA-Subtypen, wobei die initiierte Apoptose durch die resultierende intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Überladung weiter voranschreitet und letztlich zum Zelltod führt (Schwab et al. 2002; Pászty et al. 2002; Pászty et al. 2007).

### *PMCA1 ein potentielles Zielprotein der miR-223*

Um die Interaktion zwischen miRNAs und potentiellen Zielproteinen zu beurteilen, wurde von Baek et al. in einem *gene knockout*- bzw. *KO*-Experiment das miR-223-Gen in Mäusen ausgeschaltet. In einer quantitativen Massenspektrometriemessung zeigte sich, dass 148 der ca. 4000 quantifizierten Proteine bei miR-223-KO-Mäusen um mehr als 50% stärker exprimiert wurden. Von diesen hatten mindestens 78 eine exakt komplementäre Basensequenz in der 3'-UTR ihrer mRNA zu den Basen 2-7 (sog. *7mer*) bzw. 2-8 (sog. *8mer*) der miR-223. Innerhalb dieser Proteine wurde auch die PMCA1 vorgestellt, die in Neutrophilen der miR-223-defizienten Mäuse ca. 1,6-fach höher exprimiert war als in Neutrophilen der entsprechenden Wildtypiere. Damit präsentierten sie die PMCA1 mit einer *8mer*-Bindungsstelle der 3'-UTR ihrer mRNA als putatives Ziel der miR-223, die sich mit der Analyse von computergestützten Vorhersageprogrammen für miRNA-Ziele deckte (Baek et al. 2008), u.a. auch der Vorhersage von *TargetScan.org* (Lewis et al. 2003).

### *Zusammenfassung*

Die PMCA1 ist essentiell für die Calcium-Homöostase, bei dessen Verlust es zu der Initiierung der zellulären Apoptose kommt, wobei Caspasen durch Spaltung der PMCA1 die Apoptose weiter vorantreiben. Im Rahmen eines *KO*-Experiments konnte gezeigt werden, dass miR-223-defiziente Mäuse verstärkt mRNA der PMCA1 exprimierten und die PMCA1 somit ein potentielles Ziel der miR-223 darstellt.

## 2 ZIELE DER ARBEIT

Die myokardiale Ischämie und ihre Folgen sind nach wie vor epidemiologisch weltweit von großer Bedeutung. Als mögliche zusätzliche therapeutische Optionen hierfür wurden die ischämischen Präkonditionierungen wie IPC oder RIPC betrachtet, die im Tiermodell jeweils kardioprotektive Effekte erbrachten, deren Umsetzung in den klinischen Alltag jedoch noch nicht den erhofften zusätzlichen Nutzen beweisen konnte. Pathophysiologisch ist neben der ischämiebedingten Nekrose von Herzmuskelzellen auch der durch Apoptose bedingte Untergang von infarktnahen Zellen bedeutsam. Neben anderen beeinflussen auch miRNAs im Ischämiegeschehen die Regulation der zellulären Apoptose des Kardiomyozyten. Bei der Initiierung einer Apoptose wird auch der essentielle Calciumkanal PMCA1 durch Caspasen gespalten, was durch Calciumüberladung der Zelle zum Zelltod führt. Die PMCA1 ist als potentiell Ziel der miR-223 beschrieben worden; es existieren Hinweise, dass die miR-223-Expression bei Myokardischämie hochreguliert ist, ihre differentielle Expression bei IPC/RIPC ist aber bisher unbekannt.

Hiervon ausgehend wurden folgende Fragen formuliert:

1. *Führt eine myokardiale Ischämie mit Reperfusion zu einer veränderten Expression der miR-223 im Risikogebiet (AAR) und im infarktfernen Gebiet?*
2. *Welchen Einfluss haben IPC und RIPC alleine und in Kombination mit Ischämie/Reperfusion auf die myokardiale miR-223-Expression?*
3. *Besteht eine funktionelle Interaktion zwischen der miR-223 und der potentiellen Ziel-mRNA der PMCA1?*

Als experimentelle Methode wurde zur Klärung der ersten beiden Fragen eine quantitative *Real-Time* PCR (*TaqMan® MicroRNA Assays*) mit cDNA aus transkribierter RNA aus infarziertem Rattenmyokard aus einem Tiermodell mit Proben aus Gruppen mit alleiniger Ischämie und IPC sowie RIPC jeweils mit und ohne nachfolgender myokardialer Ischämiephase durchgeführt. Zur Beantwortung der dritten Frage wurde mittels eines Luciferase Assays die Interaktion der miR-223 (einkloniert in den Expressionsvektoren *pcDNA 3.1(+)*) auf die 3'-UTR der PMCA1 (eingebracht in den Reportervektor *pMIR-Report System*) überprüft.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Agarosegelsystem	Analis, Suarlée (Belgien)
Dispergierstation	IKA Labortechnik, Staufen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Heizblock	neoLab, Heidelberg
Inkubatoren	Binder, Tuttlingen
Kamera	Photometrics, Tucson (USA)
Kühlschränke	Liebherr, Biberach an der Riss
Mikroskop	Motic, Wetzlar
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Minizentrifuge	VWR international, Darmstadt
<i>NanoDrop</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PCR-Cycler 1	Helena BioSciences, Gateshead (UK)
PCR-Cycler 2	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PCR-Kabinett	LTF Labortechnik, Wasserburg
<i>Plate Reader</i>	Biotek, Bad Friedrichshall
pH-Meter	Feinchemikalien Klees, Düsseldorf
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettor	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
<i>Real-Time PCR System (Modell 7300)</i>	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
sterile Werkbank	Kendro, Langenselbold
Ultratiefkühlschrank	ilShin, Hialeah (USA)
UV-Gerät	Biometra, Göttingen
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwarzbach

Zählkammer	LO-Laboroptik, Bad Homburg
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

### **3.1.2 Benutzte Software**

*7500 Fast Real-Time PCR System*

*Software*

Applied Biosystems, Carlsbad (USA)

*GIMP 2.8.18*

GIMP Development Team, [www.gimp.org](http://www.gimp.org)

*LightCycler Probe Design Software 2.0*

Roche, Basel (Schweiz)

*Mendeley Desktop 1.17.9*

Elsevier, Amsterdam (Niederlande)

*Office 365 University*

Microsoft, Redmond (USA)

*Paint.NET 3.5.10*

dotPDN LLC, [www.getpaint.net](http://www.getpaint.net)

*Primer-BLAST (BLAST und Primer 3)*

National Library of Medicine, Bethesda (USA)

*Prism 6*

GraphPad, La Jolla (USA)

### **3.1.3 Verbrauchsmaterialien**

60 mm-Platten

Sarstedt, Nümbrecht

175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen

Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)

96-Well-Platten (weiß)

Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)

96-Well-Platten (transparent)

Sarstedt, Nümbrecht

Filter-Tip Pipettenspitzen

Star Lab, Ahrensburg

Glaspipetten

Brand, Wertheim

Pipettenspitzen

Star Lab, Ahrensburg

Plastikpipetten

Corning Inc., Corning (USA)

Reaktionsgefäße 0,2, 0,5, 1,5 und 2,0 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Zellschaber

TPP, Trasadingen (Schweiz)

### 3.1.4 Reagenzien

100 bp-DNA Marker	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
ATP	Sigma Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Coenzym A	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Apotheke Uniklinik Düsseldorf
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol	Apotheke Uniklinik Düsseldorf
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
HBSS	Invitrogen, Darmstadt
Isopropanol	Apotheke Universitätsklinikum Düsseldorf
Luciferin	Acros Organics, Geel (Belgien)
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Darmstadt
Nukleotide	Axon, Kaiserslautern
ONPG	Acros Organics, Geel (Belgien)
<i>pcDNA 3.1(+)</i> Mammalian Expression <i>Vector</i>	Invitrogen, Darmstadt
<i>pMIR-REPORT System</i>	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
<i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAGEN Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen, Hilden
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
Rotiphenol	Carl Roth, Karlsruhe

<i>RT-Random-Primer</i>	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Darmstadt
<i>TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay</i>	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
Tris-Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>TRIzol Reagent Assay</i>	Invitrogen, Darmstadt

### 3.1.5 Puffer

FA-Ladepuffer	Carl Roth, Karlsruhe
M-MLV Puffer 5x	Promega, Mannheim
<i>Orange G</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Puffer B 10x	Invitrogen, Darmstadt
<i>5x Reporter Lysis Buffer</i>	Promega, Mannheim

### 3.1.6 Stammlösungen

<i>DEPC-Wasser</i>	1 ml DEPC in 1000 ml H <sub>2</sub> O (autoklaviert)
--------------------	---

<i>FA-Puffer 10x</i>	41,85 g 3-MOPS 4,102 g Sodium Acetat 2,92 g EDTA ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
----------------------	---

<i>100x Mg-Lösung</i>	0,1 M MgCl <sub>2</sub> 4,5 M β-Mercaptoethanol
-----------------------	--

<i>HBSS 10x</i>	20,0 g NaCl 0,93 g KCl 0,334 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (7,5 mM) 2,5 g Glucose 12,5 g Hepes ad 250 ml H <sub>2</sub> O
-----------------	---

<i>LARS</i>	22 mM Tricine, pH 7,8 1,177 mM (MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> 5H <sub>2</sub> O 2,94 mM MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 0,11 mM EDTA, Na-Salz 36,3 mM DTT 297 μM Coenzym A 583 μM ATP, Na-Salz
<i>WLAR</i>	9 Volumen LARS + 1 Volumen Luciferin

<i>LB-Medium</i>	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,0, autoklavieren
------------------	--

<i>PBS-Puffer (pH 7,2)</i>	80 g NaCl 2 g KCL 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
----------------------------	---

<i>Natriumphosphat 0,1 M</i>	41 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 9 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 50 ml H <sub>2</sub> O
------------------------------	---

<i>STET-Lösung</i>	8% Sucrose 5% Triton X-100 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA pH 8 50 mM Tris-HCl pH 8 ad 100 ml H <sub>2</sub> O
--------------------	--

<i>TAE-Puffer</i>	48,4 g Sigma 7-9 20,82 g EDTA Na 11,42 ml Eisessig ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
-------------------	---

### 3.1.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

(*Bam*H I, *Hind* III, *Spe* I) Promega, Mannheim

Reverse Transkriptase (M-MLV) Promega, Mannheim

*Taq*-Polymerase Axon, Kaiserslautern

### 3.1.8 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden bei der Firma Eurofins in Ebersberg bestellt.

3'-UTR-PMCA1 fw (*Spe* I): 5' -AGCGTACTAGTGCTTTCTGCCAGACCGA-3'

3'-UTR-PMCA1 rv (*Hind* III) 5' -AGCGTAAGCTTCTCCCTCCCTCCCATCAA-3'

pre-miR-223 fw (*Hind* III): 5' -AGCGTAAGCTTGTTCATGTTAGTGTCTGCC-3'

pre-miR-223 rv (*Bam*H I): 5' -AGCGTGGATCCGCTATCTGCTCAGTCCT-3'

### 3.1.9 Materialien für die Transformation und Zellkultur

*Escherichia coli* XL1-blue strain Stratagene (La Jolla, CA, USA)

Zelllinie HEK 293 American Type Culture Collection, Wesel

DMEM (mit Glukose) Pan Biotech, Aidenbach

Fetales Kälberserum (FCS) Biochrom, Berlin

Penicillin/ Streptomycin

Pan Biotech, Aidenbach

Trypsin/ EDTA

Pan Biotech, Aidenbach

## **3.2 Methoden**

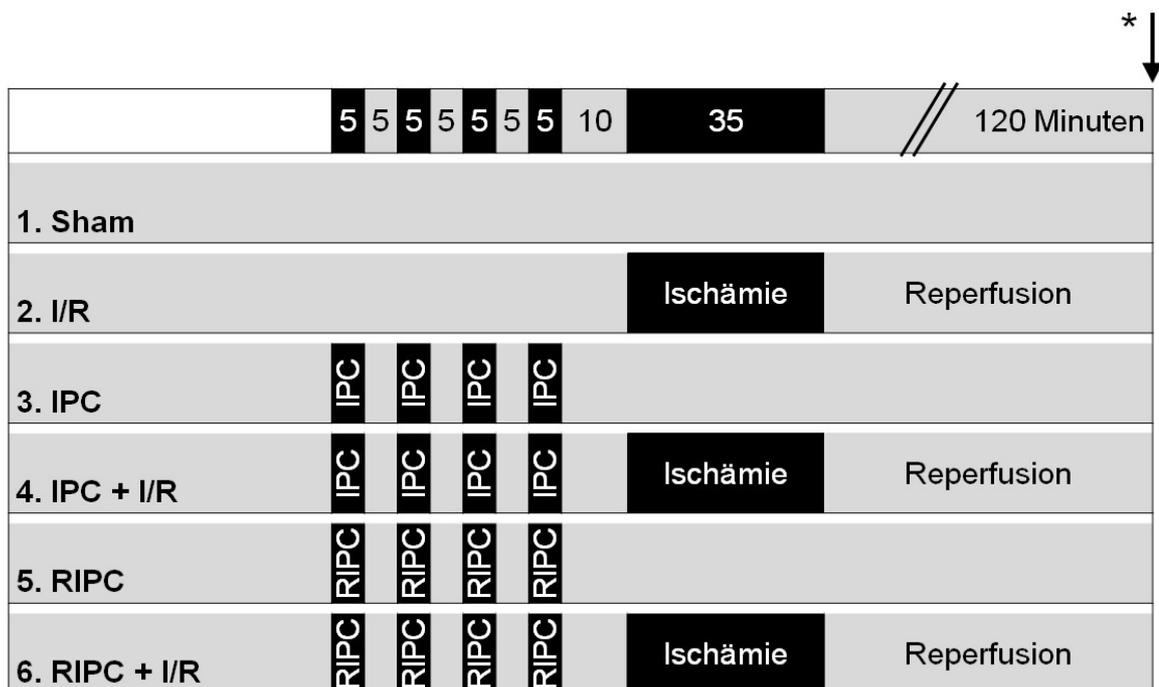
### **3.2.1 Versuchsprotokoll der *in vivo* Versuche**

Die ursprüngliche Durchführung der Tierversuche erfolgte durch die Arbeitsgruppe aus Heinen et al. (2011). Nach Zustimmung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, NRW (LANUV; Tierversuchsgenehmigung: AZ8.87-50.10.37.09.148) wurden männliche Wistar-Ratten mit Pentobarbital narkotisiert. Mittels einer linksseitigen Thorakotomie und einer folgenden Perikardiotomie wurde das Herz freigelegt. Um die linke Koronararterie wurde eine Schlinge aus einer Naht gelegt, die später reversibel das Gefäß verschließen konnte. Nach diesen vorbereitenden Maßnahmen folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase. Eine myokardiale Ischämie mit Reperfusion wurde jeweils durch Zuziehen bzw. Lösen der Schlinge um die linke Koronararterie realisiert; die myokardiale Ischämie wurde makroskopisch durch die Blässe bzw. Zyanose der AAR (Erläuterung siehe unten) sowie elektrokardiographisch durch ST-Hebungen in der Ableitung II nach Einthoven verifiziert. Die nichtinvasive RIPC wurde mittels selbst hergestellten Blutdruckmanschetten an den beiden hinteren Gliedmaßen der Ratte sowie Applikation eines Drucks von 250 mmHg umgesetzt. Die Ischämiekontrolle erfolgte per Laser-Doppler-Anemometrie.

Die Versuchstiere wurden randomisiert in sechs Versuchsgruppen aufgeteilt (jeweils n = 6, Abbildung 3). Die Gesamtversuchsdauer betrug in allen Gruppen 200 Minuten:

1. Kontrollgruppe = Sham (engl.: „vorgetäuscht“): nur Thorakatomie bzw. Perikardiotomie; keine Ischämie oder Reperfusion.
2. Ischämie/Reperfusion = I/R: 35 Minuten Okklusion eines Hauptastes der linken Koronararterie durch Ligatur mit folgenden 120 Minuten Reperfusion.

3. IPC allein = IPC: 4x 5-minütige Okklusion eines Hauptastes der linken Koronararterie mittels Schlinge mit jeweils 5-minütiger Reperfusion; keine weitere Intervention.
4. IPC mit folgender Ischämie/Reperfusion = IPC + I/R: IPC wie oben mit folgenden 35 Minuten Koronarokklusion sowie folgenden 120 Minuten Reperfusion.
5. RIPC allein = RIPC: 4x 5-minütige Kompression des oberen Drittels beider hinteren Gliedmaße mittels Blutdruckmanschette mit jeweils 5-minütiger Reperfusion; keine weitere Intervention.
6. RIPC mit folgender Ischämie/Reperfusion = RIPC + I/R: RIPC wie oben mit folgenden 35 Minuten Koronarokklusion sowie folgenden 120 Minuten Reperfusion.



**Abb. 3: Das experimentelle Tiermodell.** Entnahme der Rattenherzen am Zeitpunkt \* (Pfeil rechts oben). Graues Feld entspricht (Re-)Perfusion, schwarzes Feld Ischämie. *Sham* = scheinoperierte Kontrollgruppe ohne Intervention, I/R = Ischämie und Reperfusion, IPC = 4 Zyklen IPC ohne anschließende I/R, IPC + I/R = 4 Zyklen IPC mit folgender I/R, RIPC = 4 Zyklen RIPC ohne folgende I/R, RIPC + I/R = 4 Zyklen RIPC mit anschließender I/R. N=6 pro Gruppe (modifiziert nach Heinen et al. 2011).

Nach Abschluss der Reperfusionzeit wurden die Rattenherzen exzidiert, auf einen modifizierten Langendorff-Apparat montiert und zunächst mittels Perfusion einer Kochsalzlösung von Blutresten bereinigt. Anschließend wurde die linke Koronararterie erneut verschlossen und es erfolgte retrograd über die Aortenwurzel die Infusion einer Farblösung (*Evans blue*), mit der die Infarktareale demarkiert wurden: gesundes Herzgewebe ließ sich durch die Farblösung blau anfärben und stellte das Nichtrisikogebiet dar (non-AAR), das nicht angefärbte Herzareal wurde als Risikogebiet (engl. *area at risk*, abgekürzt AAR) definiert.

Es wurden aus den entnommenen Herzen jeweils Gewebeproben aus der AAR und der non-AAR entnommen. In den Gruppen 1 (*Sham*) und 5 (RIPC) wurden die Gewebeproben aus dem linken Ventrikel entnommen, da diese keiner I/R unterzogen wurden. Die Gewebe wurden nach Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2 RNA-Isolation**

Aus den Geweben wurde RNA mit *TRizol Reagent Assay* (Invitrogen) gemäß Herstellerprotokoll isoliert (Inkubationen jeweils bei Raumtemperatur): 100 mg eingefrorenes Gewebe wurde pulverisiert, in 1 ml Trizol-Lösung homogenisiert und zunächst 5 Minuten inkubiert. Nach Hinzugabe von 0,2 ml Chloroform wurde die Lösung erneut für 3 Minuten inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C für 15 Minuten wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen sowie nach Hinzugabe von 500 µl Isopropanol und Mischung erneut 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde nach einer Zentrifugation bei 12000 x g sowie 4 °C für 30 Minuten der Überstand verworfen, 1 ml Ethanol (75%) hinzugefügt und erneut zentrifugiert (7500 x g, 4 °C). Die RNA wurde nach Abnahme des Überstandes bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich durch Hinzugabe von 100 µl 95 °C heißem RNase-freiem Wasser aufgelöst. Nach Messung der RNA-Konzentrationen der Proben mittels *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific) und Überprüfung der Intaktheit der RNA mittels Gelelektrophorese wurde die RNA bei ca. -80 °C tiefgefroren aufbewahrt.

### 3.2.3 Reverse Transkription

Mit der Reversen Transkription (RT) wurde zunächst die RNA in komplementäre cDNA umgeschrieben, die in der folgenden quantitativen *Real-Time* PCR (qPCR) amplifiziert wurde. Für die RT-Reaktion wurden die Konzentrationen der RNA-Proben mittels *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert, zu einer Konzentration von 2 ng/μl verdünnt und dem Master Mix des *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) hinzugefügt. Als endogene Kontrolle wurde das Referenzgen U6 genommen (Brow & Guthrie 1988). Für die RT-Reaktion wurden jeweils 5 μl =10 ng RNA verwendet. Als Primer wurden spezifische miR-223- und U6-Primer von Applied Biosystems benutzt (miR-223: Assay ID 000526 und U6: Assay ID 001973; Tabellen 1 und 2).

100mM dNTPs (mit dTTP)	0,15 μl
MultiScribe Reverse Transcriptase, 50 U/μL	1,00 μl
10 x RT Puffer	1,50 μl
RNase Inhibitor, 20U/μL	0,19 μl
Nuclease-freies Wasser	4,16 μl
GESAMT	7,00 μl
<b>Tabelle 1: Komponenten des RT Master Mix pro Ansatz der RT</b>	

RT Master Mix Ansatz	7,00 μl
RNA 2 ng/μl	5,00 μl
RT Primer	3,00 μl
GESAMT	15,00 μl
<b>Tabelle 2: Reaktionsansatz der RT</b>	

Die RT-Reaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Applied Biosystems) gemäß folgenden Reaktionsbedingungen in einem *Thermocycler* (Phoenix Thermal Cycler, Helena BioSciences) durchgeführt (Tabelle 3).

30 Min	16 °C
30 Min	42 °C
5 Min	85 °C
∞	4 °C
<b>Tabelle 3: Reaktionsablauf der Reversen Transkription</b>	

Die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Benutzung bei ca. -80 °C tiefgefroren konserviert.

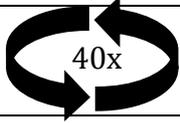
### 3.2.4 Quantitative *Real-Time* PCR

Zur Messung der Expressionsunterschiede der miR-223 wurde ein spezifischer Assay einer quantitativen *Real-Time* PCR (qPCR) nach dem *TaqMan*®-Verfahren verwendet (*TaqMan*® *MicroRNA* Assays, Assay ID 000526, Applied Biosystems). Bei diesem Verfahren wird ein Oligonukleotid benutzt, das an eine durch spezifische Primer amplifizierte DNA-Region bindet. Durch die Exonuclease-Aktivität der *Taq*-Polymerase wird dieses Oligonukleotid aufgespalten und das vorher am 3'-Ende vom sog. *Quencher*-Molekül (engl. *to quench* = auslöschen) inhibierte Fluorochrom am 5'-Ende kann nach Anregung durch den qPCR-Cycler fluoreszieren. Das Fluoreszenzsignal korreliert dabei mit der Menge synthetisierter DNA und zeigt einen exponentiellen Verlauf, bei dessen Beginn der sog. *Ct*-Wert (engl. *Cycle threshold*) den Zyklus beschreibt, bei dem sich die gemessene Fluoreszenz erstmals signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz unterscheidet (Heid et al. 1996).

Für die qPCR wurde die in der RT zuvor gewonnene cDNA von jeder Probe in einem Verhältnis von 1:30 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt; 1 µl dieser Lösung wurde als letzte Komponente in ein *Well* einer 96-*Well*-Platte pipettiert, in dem bereits Master Mix, Nuclease-freies Wasser und der *TaqMan*® *MicroRNA* Assay für die miR-223 (Assay ID 000526) bzw. U6 (Assay ID 001973) hinzugefügt worden waren (Tabelle 4).

TaqMan MicroRNA Assay (20x)	1,00 µl
RT-Produkt (1:30 verdünnt)	1,00 µl
TaqMan 2x PCR Master Mix	10,00 µl
Nuclease-freies Wasser	8,00 µl
GESAMT	20,00 µl
<b>Tabelle 4: Reaktionskomponenten pro Ansatz für die quantitative Real-Time PCR</b>	

Die *Real-Time* PCR-Experimente wurden nach den Reaktionsbedingungen in der Tabelle 5 in einem *ABI 7300HT Thermocycler* (Applied Biosystems) durchgeführt.

Enzym-Aktivierung		95 °C	10 Min
PCR: Denaturierung		95 °C	15 s
PCR: Anneal/Extend		60 °C	60 s
		4 °C	∞
<b>Tabelle 5: Reaktionsablauf der quantitativen Real-Time PCR (40 Zyklen)</b>			

In der weiteren statistischen Analyse zur Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede wurde die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode benutzt: für die Auswertung der qPCR-Daten wurden jeweils Gruppenmittelwerte der Ct-Werte der einzelnen Proben für miR-223 und das Referenzgen U6 gebildet. Die Differenz dieser Mittelwerte für miR-223 und U6 für eine Gruppe beschreibt

$$\overline{\Delta Ct} = \overline{Ct} \text{ (miR-223)} - \overline{Ct} \text{ (U6)}.$$

Die relative n-fache Expression (RE) der miR-223 im Vergleich zwischen Experimental- (EG) und Kontrollgruppe (CG) wurde über die inverse Zweierpotenz von  $\Delta\Delta Ct$  ermittelt:

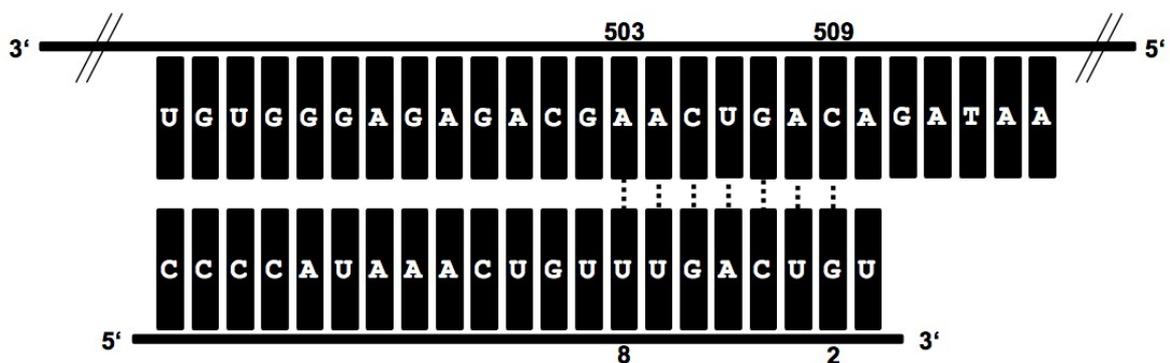
$$RE \text{ (miR-223)} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ (Schmittgen \& Livak 2008)},$$

wobei  $\Delta\Delta Ct = \overline{\Delta Ct} \text{ (EG)} - \overline{\Delta Ct} \text{ (CG)}$ . Für die Signifikanztestungen wurden neun einzelne Gruppenvergleiche zwischen Kontroll- und Experimentalgruppen mittels

ungepaarten, zweiseitigen Zweistichproben-t-Tests untersucht. Auf eine *Welch*-Korrektur wurde verzichtet. Ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3.2.5 Design von Primern für 3'-UTR der PMCA1 und pre-miR-223

Damit der Einfluss der miR-223 auf das Zielprotein PMCA1 beurteilt werden konnte, wurde mittels des online verfügbaren *Basic Local Alignment Tools (BLAST)* der *National Library of Medicine* (Zhang et al. 2000) die 3'-UTR der Codesequenz von *atp2b1* (= Gen von PMCA1, *NCBI Gene ID*: 29598, *Reference Sequence*: XM\_006241294.1) mit der Sequenz der miR-223 (*NCBI Gene ID*: 100314060, *mirBase*: MIMAT0000892) abgeglichen und ein geeignetes *seed match* bzw. eine Bindungsstelle identifiziert: **AACUGAC** (Position 503-509 in der 3'-UTR der *rno-atp2b1*, komplementäre Sequenz UUGACUG Position 8-2 (5' zu 3') von *rno-miR-223*; Abbildung 4). Dieses *Octamer* oder *8mer* wurde durch einen Abgleich mit *TargetScan.org* (Lewis et al. 2003) und *microRNA.org* (Betel et al. 2008) verifiziert. Ein *8mer* ist dabei definiert als perfekte Paarung der Basen 2-8 am 5'-Ende der miRNA mit komplementären Basen der mRNA, die von einem darauf folgenden Adenin der mRNA (bzw. einem Uracil der miRNA an Position 1) abgeschlossen wird (Friedman et al. 2008).



**Abb. 4:** Putatives *seed match* zwischen der 3'-UTR der PMCA und der miR-223. Oben ist die Sequenz (Strang 3' zu 5') der 3'-UTR der PMCA1 abgebildet, deren Basen an Position 503-509 ein *8mer-seed match* (gestrichelte Linien zwischen beiden Strängen) zu Position 2-8 der unten abgebildeten Sequenz (5' zu 3') der miR-223 bilden.

Für die Amplifizierung der Sequenzen der 3'-UTR der PMCA1 (*NCBI Reference Sequence*: XM\_006241294.1) wurden mit der Software *Primer 3* (Untergasser et al. 2012) Primer erstellt, die die Sequenz um das beschriebene *seed match* mit der miR-223 in einer PCR (engl. *Polymerase chain reaction*) vervielfältigen sollten. Die Sequenzen der ermittelten vorläufigen Primer wurden mit dem Online-Tool *Primer-BLAST* der *National Library of Medicine* bestätigt (Tabelle 6).

3'-UTR-PMCA1 fw:	5' -GCTTTCTGCCAGACCGA-3'
3'-UTR-PMCA1 rv:	5' -CTCCCTCCCTCCCATCAA-3'
<b>Tabelle 6: Vorläufige Primersequenzen für die 3'-UTR der PMCA1</b>	

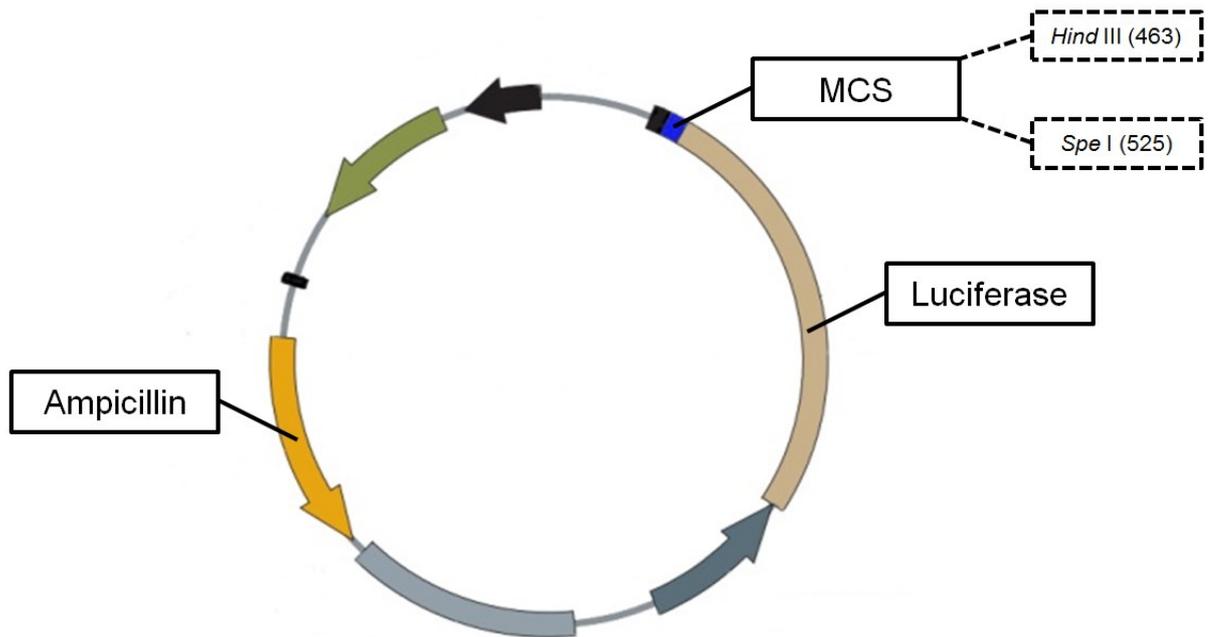
Analog zu der geschilderten Vorgehensweise wurden für die pre-miR-223 (*NCBI Reference Sequence*: NR\_031936.1; *mirBase*: MI0000963), die die reife miR-223-Sequenz (*mirBase*: MIMAT0000892) enthält, vorläufige Primer im Bereich der pre-miR-223 (*ENA Sequence*: DQ680071.1) erstellt und verifiziert (Tabelle 7).

pre-miR-223 fw:	5' -GTCATGTTAGTGTCTGCC-3'
pre-miR-223 rv:	5' -GCTATCTGCTCAGTCCT-3'
<b>Tabelle 7: Vorläufige Primersequenzen für die pre-miR-223</b>	

### 3.2.6 Auswahl von Restriktionsendonukleasen

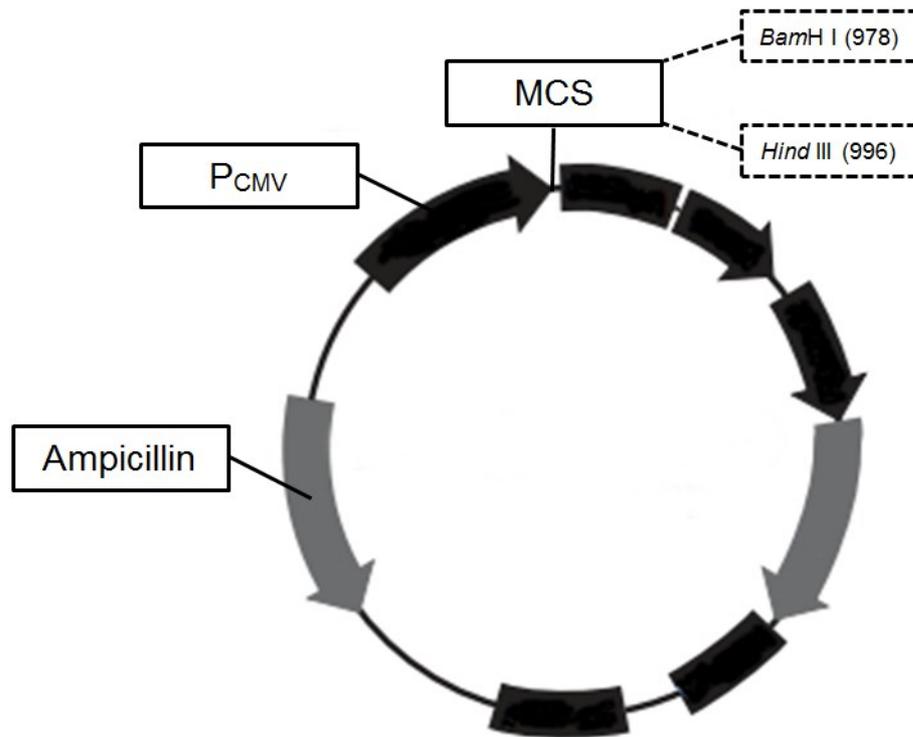
Für die Einklonierung der 3'-UTR der PMCA1 in das Reporterplasmid *pMIR-Report miRNA Expression Reporter Vector System* (Applied Biosystems, Katalognummer AM5795) sowie pre-miR-223 in das Expressionsplasmid *pcDNA 3.1<sup>(+)</sup> Mammalian Expression Vector* (Invitrogen, Katalognummer V79020) wurden geeignete Restriktionsendonukleasen in den jeweiligen *Multiple Cloning Sites* (MCS, auch Polylinker genannt) der Plasmide identifiziert:

- *Spe* I und *Hind* III für 3'-UTR der PMCA1/*pMIR-Report System* (Abbildung 5) und
- *Bam*H I und *Hind* III für pre-miR-223/*pcDNA 3.1<sup>(+)</sup>* (Abbildung 6).



**Abb. 5: pMIR-Report System zur Einklonierung der 3'-UTR der PMCA1.** In der *Multiple Cloning Site* (MCS) dieses Plasmids wurden zwei geeignete Restriktionsendonukleasen für die 3'-UTR der PMCA1 identifiziert: *Spe I* an Position 525 und *Hind III* an Position 463. Mit diesen Enzymen wurde das *Insert* (= 3'-UTR der PMCA1) in die MCS hineinkloniert. Diese ist direkt im Anschluss an die Luciferase-Gensequenz; eine erniedrigte Expression der Luciferase (bzw. erniedrigte Lumineszenz in der Messung) kann auf einen miRNA-Einfluss auf die 3'-UTR in der MCS hinweisen. In dem Plasmid ist auch ein Ampicillin-Resistenzgen vorhanden, das mit diesem Plasmid transfizierte Bakterien in Ampicillin-haltigen Nährböden selektiv wachsen lässt (Bearbeitete Abbildung aus dem Herstellerprotokoll).

Die Erkennungssequenzen der jeweiligen Restriktionsendonukleasen wurden den o.g. vorläufigen Primersequenzen für 3'-UTR der PMCA1 bzw. pre-miR-223 hinzugefügt, damit das PCR-Produkt sowie der Zielvektor hier durch die Endonukleasen geschnitten und später miteinander ligiert werden konnten.



**Abb. 6: pcDNA 3.1(+)-Vektor zur Einklonierung der pre-miR-223.** Dieses Plasmid bietet mit Schnittstellen für *BamH I* (Position 978) und *Hind III* (Position 996) zwei geeignete Loci an, um die pre-miR-223-Sequenz in die MCS einzuklonieren. Die MCS schließt sich dem Promoter für CMV ( $P_{CMV}$ ; *Human cytomegalovirus immediate-early promoter*) an, der eine hohe Expression der in die MCS einklonierten Sequenzen gewährleisten soll. Auch hier befindet sich ein Ampicillin-Resistenzgen (Bearbeitete Abbildung aus dem Herstellerprotokoll).

Diese Restriktionsendonukleasen wiesen die Erkennungssequenzen und Restriktionsschnittstellen in der Tabelle 8 auf.

<u>Restriktionsendonuklease</u>	<u>Erkennungssequenz</u>	<u>Restriktionsschnittstelle</u>
<i>Hind III</i>	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	5'-A   AGCTT-3' 3'-TTCGA   A-5'
<i>Spe I</i>	5'-ACTAGT-3' 3'-TGATCA-5'	5'-A   CTAGT-3' 3'-TGATC   A-5'
<i>BamH I</i>	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	5'-G   GATCC-3' 3'-CCTAG   G-5'

**Tabelle 8: Eigenschaften der gewählten Restriktionsendonukleasen**

Mit diesen Restriktionssequenzen wurden die zuvor ermittelten vorläufigen Primer ergänzt und die Zielsequenzen in einer folgenden PCR amplifiziert. Die modifizierten Primer-Sequenzen für die 3'-UTR der PMCA1 und pre-miR-223 sind in Tabelle 9 wiedergegeben (Restriktionsstellen unterstrichen).

3'-UTR-PMCA1 fw ( <i>Spe</i> I):	5' -AGCGT <u>ACTAGT</u> GCTTTCTGCCAGACCGA-3'
3'-UTR-PMCA1 rv ( <i>Hind</i> III)	5' -AGCGT <u>AAGCTT</u> CTCCCTCCCTCCCATCAA-3'
miR-223 fw ( <i>Hind</i> III)	5' -AGCGT <u>AAGCTT</u> GTCATGTTAGTGTCTGCC-3'
miR-223 rv ( <i>Bam</i> H I)	5' -AGCGT <u>GGATCC</u> GCTATCTGCTCAGTCCT-3'
<b>Tabelle 9: Modifizierte Primersequenzen für 3'-UTR der PMCA1 und pre-miR-223</b>	

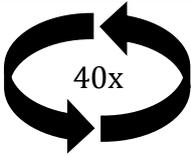
### 3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion

In einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden zunächst bei ca. 95 °C für ca. 15 Minuten die Wasserstoffbrückenbindungen des Doppelstrangs der Ausgangs-DNA (auch Matrizen-DNA genannt) aufgebrochen, so dass sie als auch die Primer sich vollständig voneinander lösen und nur noch als Einzelstränge vorliegen. Dieser Schritt wird auch Initialisierung oder *Initial Step* genannt. Danach laufen drei Schritte sequentiell in einer vorgegebenen Anzahl von Zyklen ab: erneut wird das Reaktionsgemisch auf ca. 95 °C erhitzt, damit zu Beginn jedes Zyklus Einzelstränge vorliegen (1. Denaturierung oder engl. *Melt*). Dann wird bei einer Primerspezifischen Temperatur die Anlagerung der Primer an die nun vorliegende Einzelstrang-DNA ermöglicht (2. Hybridisierung des Primers bzw. engl. *Anneal*) und schließlich im dritten Schritt verlängert die thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (sog. *Taq*-Polymerase) bei ca. 72 °C nach der Primersequenz den noch nicht „fertigen“ Strang mit freien Nukleotiden (3. Elongation oder engl. *Extend*). Nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen folgt ein finaler Elongationsschritt bei ca. 72 °C für 5 bis 15 Minuten, damit die noch verbleibende Einzelstrang-DNA vollständig verlängert wird. So wird eine selektive Amplifizierung der vorhandenen Ursprungs-DNA (sog. *template DNA*) ermöglicht (Saiki et al. 1988; Sonnemans et al. 2002). Neben den spezifischen Temperaturen, der Dauer der einzelnen Schritte oder der Anzahl der optimalen Zykluszahl, kann auch der

Reaktionsansatz unterschiedlich sein und wird zunächst für die PCR von 3'-UTR der PMCA1 erörtert (Tabellen 10 und 11).

10x Puffer B	2,50 µl
dNTP	1,00 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,25 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,00 µl
Primer <i>fw</i>	1,00 µl
Primer <i>rv</i>	1,00 µl
<i>template</i> DNA	1,00 µl
MQ	ad 25,00 µl

**Tabelle 10: Reaktionskomponenten pro Ansatz der PCR von 3'-UTR der PMCA1**

<i>Initial Step</i>		95 °C	15 Min
<i>Melt</i>		95 °C	30 s
<i>Anneal</i>		55 °C	30 s
<i>Extend</i>		72 °C	45 s
<i>Final Step</i>		72 °C	10 Min
		4 °C	∞

**Tabelle 11: Reaktionsablauf der PCR von 3'-UTR der PMCA1 (40 Zyklen)**

Bei der pre-miR-223-PCR wurden von den Primern *fw* und *rv* sowie *template* DNA jeweils 0,5 µl eingesetzt (restliche Komponenten idem). Die PCR bestand aus 30 Zyklen, der *Anneal*-Schritt wurde bei 58° C für 45 s durchgeführt, darauf folgte der *Extend*-Schritt bei 72° C für 30 s (restlicher Reaktionsablauf identisch wie für die PCR der 3'-UTR der PMCA1 aufgeführt).

### 3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Zur Differenzierung von PCR-Produkten oder auch Produkten von Restriktionsverdau-Reaktionen wurde zunächst ein Agarose-Gel hergestellt: die Menge an benötigter Agarose hängt dabei von der zu erwartenden Größe der zu trennenden DNA ab (1%: > 500 bp, 1,5%: 200-500 bp und 2%: < 200 bp; % (w/v)

der benutzten Menge des TAE Puffers). Das Agarose-TAE-Puffer-Gemisch wurde aufgeköcht, nach dem Abkühlen zur farblichen Demarkierung der DNA mit Ethidiumbromid versetzt (ca. 1 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) auf 35 ml Gel) und das Gel in die Elektrophoreseform gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x *Orange G* als Ladepuffer im Verhältnis 5:1 gemischt (d.h. 5 Teile DNA, 1 Teil *Orange G*) und in die Kammern des ausgehärteten Elektrophoresegels pipettiert. Zusätzlich wurde in die erste Kammer des Gels zur Beurteilung der Größe der PCR-Produkte ein DNA-Marker hinzugefügt. Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in 1x TAE Puffer bei einer Spannung von 80 V für ca. 20-30 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden in einer Dunkelkammer mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Bei weiterer Verwendung der PCR-Produkte wurden diese mithilfe des *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen) gemäß Herstellerprotokoll aus dem Gel extrahiert, die Konzentrationen mittels *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific) gemessen und bei ca. -80 °C tiefgefroren aufbewahrt.

### **3.2.9 Restriktionsverdau**

Für den Restriktionsverdau mit den Endonucleasen *Spe I*, *Hind III* sowie *BamH I* wurden jeweils zunächst 3 µg DNA mit 2 µl Puffer (10 x) vermischt, jeweils 0,5 µl der Restriktionsenzyme (10 U/µl) und deionisiertes Wasser (*Milli-Q* oder *MQ*) zu einer Gesamtmenge von 20 µl (pro Reaktion) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert, danach für 30 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert. Die Reaktionsprodukte wurden in einer Gelelektrophorese mit 1% Agarose in TAE-Lösung überprüft und die korrekten Insertionen zur weiteren Sequenzierung gemäß *QIAEX II Gel Extraction Kit*-Protokoll (Qiagen) aus dem Gel extrahiert.

### **3.2.10 Ligation bzw. Einklonierung in Plasmidvektoren**

Die eingesetzten DNA-Fragmente waren die mittels Restriktionsendonucleasen verdauten PCR-Produkte der 3'-UTR der PMCA1 bzw. pre-miR-223 (das sog. *Insert*,

engl.: „Einfügung“) und die verdauten Vektoren *pMIR-Report System* bzw. *pcDNA 3.1<sup>(+)</sup>*, die jeweils sog. *sticky ends* (engl.: „klebrige Enden“) aufwiesen.

Die Ligation wurde mittels *T4 DNA Ligase Kit* (Invitrogen, Katalognummer 15224-017) realisiert. Dabei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen (Tabelle 12).

5X Ligase Reaktionspuffer	4,00 µl
Vektor	30 fmol
<i>Insert</i>	90 fmol
Totale DNA	2,00 µl
<i>T4 DNA Ligase</i>	1,00 µl
MQ	ad 20,00 µl
<b>Tabelle 12: Reaktionsansatz der T4 DNA Ligase-Reaktion</b>	

Das Verhältnis *Insert* zu Vektor betrug nach Protokoll 3:1, der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert.

Beide Ligationen (3'-UTR der PMCA1 in *pMIR-Report System* und pre-miR-223 in *pcDNA 3.1<sup>(+)</sup>*) wurden entweder direkt auf Eis verbracht, um unmittelbar in folgenden bakteriellen Transformationen eingesetzt zu werden oder wurden bei -20 °C über Nacht konserviert.

### 3.2.11 Herstellung LB-Platten, Transformation und Übernachtskultur

Für die im Weiteren erklärte bakterielle Transformation wurden Platten aus einem LB-Agar-Gemisch nach folgenden Schritten hergestellt: Zunächst wurden 1,5 g Agar in 100 ml LB-Medium gemischt und aufgeköcht. Nach Abkühlen wurde Ampicillin (100 µg/ml Lösung) hinzugefügt und jeweils 20 µl der Lösung auf Bakterialschalen verteilt.

Durch die Transformation erfolgte die Übertragung der Plasmidvektoren, in denen zusätzlich eine Ampicillinresistenz-Sequenz vorhanden ist, in kompetente Bakterienzellen (*Escherichia coli XL1-blue strain*, Stratagene, La Jolla, USA). Hierfür wurden kompetente *Escherichia coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, 10 µl des Ligationsreaktionsproduktes zu 100 µl der Zellen hinzugefügt und das Gemisch für

30 Minuten auf Eis gelassen. Dann erfolgte der sogenannte „Hitzeschock“: das Gemisch wurde für 5 Minuten auf 37 °C erhitzt und dann für 10 Minuten auf Eis gelagert. Nach Hinzufügen von 1 ml LB-Medium wurde das Gemisch für 1 Stunde bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 5000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C, wonach der Überstand entfernt und die Zellen mit LB-Medium resuspendiert wurden. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin) verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne bakterielle Kolonien aus den LB-Agarplatten (Hinweis auf erfolgreiche Transformation der Plasmide aufgrund neu erworbener Resistenz gegenüber Ampicillin) in 5 ml LB-Medium überführt, 500 µg Ampicillin hinzugefügt und die so erstellte Kultur über Nacht bei 37 °C sowie 45° Neigung unter ständigem, leichtem Schütteln inkubiert.

### **3.2.12 Plasmidseparation**

Die Plasmid-DNA wurde über eine sogenannte *Rapid boil plasmid separation* (detailliertes Protokoll im nächsten Absatz) isoliert: die Zellen werden dabei lysiert, was die Plasmid-DNA freisetzt, wohingegen ein Großteil der genomischen Bakterien-DNA innerhalb der Zelltrümmer nach Zentrifugation als Überstand verworfen wird. Der verbleibende Anteil der genomischen DNA wird durch Hitze denaturiert, die Plasmid-DNA kann sich aufgrund ihrer Struktur (sog. *Supercoiled DNA*) schnell nach der Hitzedenaturierung reassoziieren. In den letzten Stufen werden die Reste der genomischen DNA über eine Ethanol-Präzipitation entfernt und die verbleibende, „reine“ Plasmid-DNA resuspendiert (Harwood 1996).

Im Einzelnen umfasste die Plasmidseparation folgende Schritte: 1,5 ml der Übernachtskultur wurden bei 12000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Präzipitat wurde in 350 µl STET-Lösung resuspendiert. Dann wurden 25 µl frisch zubereitetes Lysozym (10 mg/ml) hinzugefügt und die Proben für 40 s bei 100 °C aufgeköcht. Anschließend erfolgte die sofortige Zentrifugation bei 12000 x g für 10 Minuten, wonach das Präzipitat (= Zelltrümmer) entfernt, 375 µl Isopropanol zum Überstand hinzugefügt und das Gemisch bei -70 °C für 30 Minuten inkubiert wurde. Danach wurden die Proben bei 12000 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl

95% Ethanol gewaschen und bei 12000 x g sowie 4 °C für 1 Minute zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol verworfen, die Proben für 10 Minuten luftgetrocknet, das Pellet in 50 µl TE-Lösung resuspendiert und schließlich bei -20 °C gelagert.

Die separierte Plasmid-DNA wurde anschließend einem erneuten Restriktionsverdau zugeführt und die Größe der Insertionen in die Plasmide mittels Gelelektrophorese überprüft.

### **3.2.13 Minipräp, Maxipräp und *Glycerol-Stocks***

Aus den Übernachtskulturen mit den korrekten Plasmiden wurde mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll mit folgenden Schritten die Plasmid-DNA extrahiert: 1,5 ml der Übernachtskultur wurden bei 5000 rpm und 4 °C für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das verbliebene Pellet mit einer Tris-Lösung (50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8,0, Lysozym 4 mg/ml, RNase A 400 µg/ml) resuspendiert und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine alkalische Lyse mit 300 µl einer NaOH-Lösung (0,2 M NaOH, 1% SDS sterilfiltriert), wonach 300 µl 2,55 M K-Ac pH 4,8 hinzugefügt und das Gemisch bei 12000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit 500 µl Rotiphenol, nach kräftigem Vortexen wurde anschließend bei 12000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Chloroform versetzt und erneut bei 12000 rpm sowie 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert; dieser Schritt wurde wiederholt. Der Überstand wurde zu gleichem Anteil mit Isopropanol für 15 Minuten auf Eis inkubiert und bei 12000 rpm sowie 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Die Plasmid-DNA (= Pellet) wurde mit eisgekühltem 70%igen Ethanol gewaschen und bei 12000 rpm sowie 4 °C für 1 Minute zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet luftgetrocknet und in 30 µl MQ resuspendiert.

Mittels *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific) wurden die Konzentrationen der Produkte gemessen und diese in Sequenzierungsanalysen (s. Kapitel 3.2.14) eingesetzt. Aus den Übernachtskulturen wurden auch sog. *Glycerol-Stocks* hergestellt, um die Konservierung der Bakterien mit eingeführter Plasmid-DNA bei -80 °C zu ermöglichen (auf 0,25 ml 100% Glycerol 0,75 ml aus der Übernachtskultur

aufschichten, vorsichtig durchmischen und bei -80 °C lagern). Diese konnten später bei Bedarf aufgetaut werden, in neue Übernachtskulturen überführt werden und größere Mengen an Plasmid konnten über eine *Maxipräp* (*Plasmid Maxi Kit*, Qiagen, Vorgehen nach Herstellerprotokoll) gewonnen werden.

### **3.2.14 Sequenzierungsanalysen**

Die Korrektheit der Insertionen wurde mittels Sequenzierungsanalysen im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Genomics & Transcriptomics Labor (GTL); Leiter: Prof. Dr. Karl Köhrer) überprüft.

### **3.2.15 Zellkultur und Transfektion**

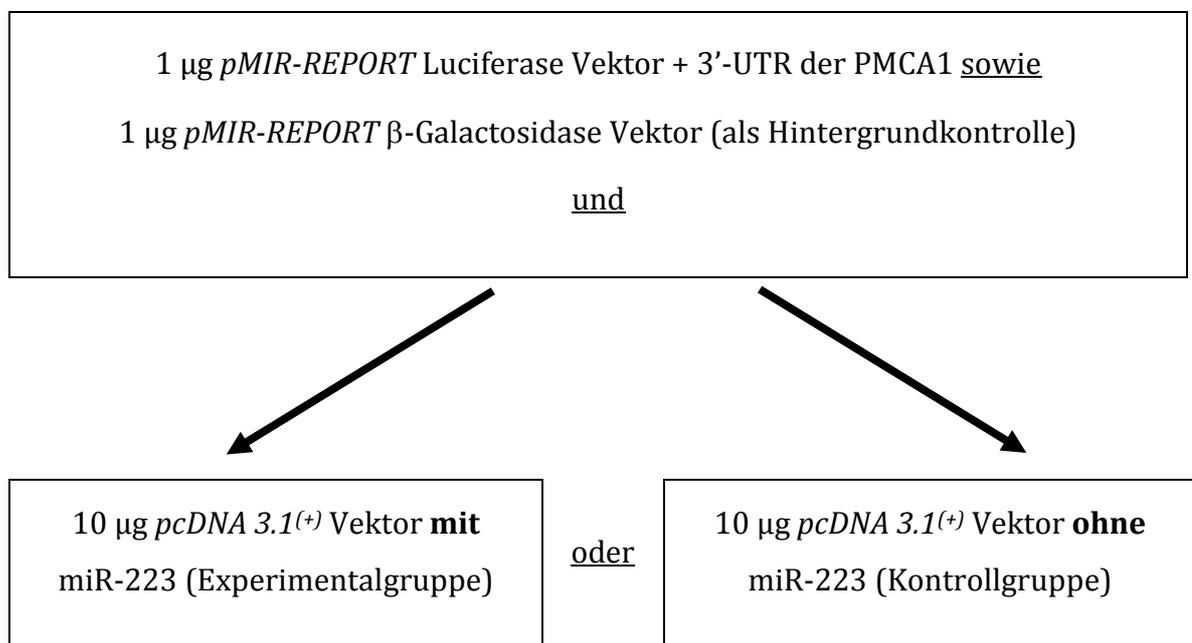
Alle Transfektionsexperimente wurden in HEK 293-Zellen durchgeführt; in diesen Zellen sind die zytoplasmatischen Proteine *Dicer*, *TRBP* und *AGO* vorhanden, die für die Umwandlung einer pre-miRNA in eine „reife“ miRNA notwendig sind (Sakurai et al. 2011). Somit konnte man davon ausgehen, dass nach erfolgter Transfektion die aus dem Expressionsplasmid *pcDNA 3.1<sup>(+)</sup>* transkribierte pre-miR-223 auch in die biologisch aktive miR-223 überführt wurde.

Die HEK 293-Zellen wurden auf folgende Weise gesplittet: das Kulturmedium bestand aus DMEM/Glucose, 10% inaktiviertes FCS und 0,5 % Penicillin/Streptomycin. Pro 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurde der Zellrasen mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen, danach 4 ml Trypsin auf die Zellen hinzugefügt und ggfs. durch zusätzliches Klopfen die Zellen gelöst. Zum Stoppen der Trypsin-Reaktion wurden 10 ml Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Von der Zellsuspension wurden 0,5 bis 2 ml in der Flasche belassen und mit 25 ml neuem Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für die Transfektion wurden die Plasmidvektoren (*pMIR-Report* mit PMCA1 bzw.  $\beta$ -Galactosidase – letzteres als Kontrollplasmid – sowie *pcDNA 3.1<sup>(+)</sup>* Vektor mit pre-miR-223 bzw. Leervektor) in die HEK 293-Zellen überführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden 10<sup>6</sup> Zellen (gezählt in Zählkammer, LO-Laboroptik) pro 60 mm-Zellkulturplatte (Sarstedt) in ein Gesamtvolumen von 4 ml gesät und bei 37 °C

inkubiert. Die einzelnen Schritte waren wie folgt: Zunächst wurde das Kulturmedium aus einer 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit zuvor gesplitteten HEK 293-Zellen entfernt, der verbliebene Inhalt mit 10 ml PBS-Lösung gewaschen. Dann wurden 3 ml Trypsin (37 °C) hinzugefügt und die Mischung für 1-2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden durch Beklopfen der Flasche die Zellen gelöst. Mit zusätzlichen 17 ml Kulturmedium wurden die Zellen resuspendiert und 18 ml der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. 25 ml Kulturmedium wurden zu den verbliebenen 2 ml Zellsuspension in der Flasche für die weitere Kultivierung hinzugefügt. Aus der entnommenen Zellsuspension wurden zu 30 µl weitere 30 µl Trypanblau-Lösung hinzugefügt und die vitalen Zellen in der Zählkammer (LO-Laboroptik) gezählt. Danach wurden 10<sup>6</sup> Zellen pro 60 mm-Platte gesät, Kulturmedium zu einem Volumen von 4 ml hinzugefügt und die Zellen bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert.

Am Tag der Transfektion wurde zunächst das Medium in den Kulturplatten erneuert. Für die Transfektion selbst wurde pro Platte eingesetzt:



Die Konzentrationen der Vektoren wurden vor Beginn der Transfektion mittels *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific) ermittelt. Die Transfektion selbst wurde nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationstechnik durchgeführt: Dazu wurde die DNA-Mischung mit Calciumchlorid und Wasser vermischt sowie unter Bläschenbildung in

eine HBSS-Lösung pipettiert. Je 500 µl der DNA-HBSS-Mischung wurden in vier neue 60 mm-Zellkulturplatten überführt und bei 37 °C inkubiert. Im Einzelnen wurde auf folgende Weise verfahren: Zunächst wurde das Kulturmedium 2 Stunden vor der Transfektion entfernt und durch neues Kulturmedium ersetzt. Dann wurde die 10x HBSS-Lösung auf 2x HBSS verdünnt und der pH auf  $7,08 \pm 0,05$  eingestellt. Die Lösung wurde in der Zellkulturbank sterilfiltriert. Nun wurden die Reaktionslösungen zubereitet: in einem Reaktionsgefäß wurden 1100 µl von 2x HBSS und in einem anderen Reaktionsgefäß DNA, 990 µl MQ sowie 110 µl 2,5 M Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) gemischt verteilt. Dann wurde unter Bläschenbildung langsam die DNA-Calciumchlorid-Mischung (Luftinsufflation via Pipette) in die HBSS-Lösung pipettiert. Anschließend wurden 500 µl der DNA-HBSS-Mischung auf eine Zellkulturplatte überführt und nach vorsichtigem Mischen bzw. Schwenken der Platte bei 37 °C inkubiert. Nach ca. 12 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt, nach ca. 48 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Pro Gruppe (Experimental- und Kontrollgruppe) wurden jeweils vier Platten parallel behandelt. Zum Ernten wurden die Zellen von den Zellkulturplatten abgelöst, zentrifugiert und der Überstand jeweils entfernt. Dann wurde mit *Reporter Lysis Buffer (RLB)* das Pellet resuspendiert, in Eis inkubiert und danach erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Dieser Überstand diente als Material für die weiteren Messungen. Im Einzelnen wurden folgende Schritte unternommen: Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 2 ml kalter PBS-Lösung gewaschen, die PBS-Lösung wurde anschließend entfernt. Dann wurde erneut 1 ml PBS-Lösung hinzugefügt die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und geerntet. Die Zellen wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zweimal bei jeweils 12000 x g sowie 4 °C für 3 Minuten mit jeweiligem Entfernen des Überstandes zentrifugiert. Dann wurden 50 µl 1x RLB hinzugefügt, das Pellet durch Vortexen resuspendiert und auf Eis für 5 Minuten gelagert. Als Nächstes wurde das Gemisch bei 12000 x g sowie 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Luciferase und  $\beta$ -Galactosidase Assays bereitgestellt.

### 3.2.16 Luciferase und $\beta$ -Galactosidase Assays

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen der miR-223 und der putativen Bindungsregion in der 3'-UTR der PMCA1-mRNA wurde das *pMIR-REPORT System* (Applied Biosystems) verwendet: in den Vektor, der für Luciferase kodiert (*pMIR-Report Luciferase*), wurde die 3'-UTR der PMCA1-mRNA mit dem *seed match* in die sogenannte *Multiple Cloning Site (MCS)* inkloniert. Durch die vermutete Bindung der miR-223 an diese Bindungsstelle in der 3'-UTR der PMCA1-mRNA in der MCS, die sich an die Gensequenz der Luciferase anschließt, sollte ein regulatorischer Effekt dieser miRNA auf die 3'-UTR der PMCA1 simuliert werden, die Expression der Luciferase müsste in diesem Fall verringert sein. Die Luciferase ist ein Enzym, das Luciferin in Anwesenheit von ATP und Sauerstoff unter Katalyse oxidiert; hierbei wird Licht freigesetzt, das gemessen werden kann (Greer & Szalay 2002). Die Lumineszenz-Messung dieser Luciferin-Luciferase-Reaktion wurde nach Hinzufügen einer *WLAR-Lösung (Working Luciferase Assay Reagent: 1 Volumen Luciferin zu 9 Volumina Luciferase Assay Reagent Stock bzw. LARS sowie DTT)* zu den Transfektionsprodukten bei einer Emission von 560 nm in einem *Plate Reader* (Biotek) durchgeführt. In eine weiße, nicht transparente 96-Well-Platte wurden 5  $\mu$ l Zellextrakt auf 20  $\mu$ l mit RLB verdünnt übertragen; 20  $\mu$ l von RLB alleine dienen als Kontrolle. In jedes *Well* mit Zellextrakt bzw. mit Kontrolle wurden 100  $\mu$ l der WLAR-Lösung hinzugefügt und anschließend die Lumineszenz gemessen.

Als Hintergrund- sowie Transfektionskontrolle wurde ein  $\beta$ -Galactosidase Assay (*pMIR-Report  $\beta$ -Gal Control Plasmid; Applied Biosystems*) durchgeführt: Hier wurde das Transfektionsprodukt mit ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) in Reaktion gebracht, bei dem  $\beta$ -Galactosidase mit ONPG reagiert und als Reaktionsprodukt o-Nitrophenol entsteht. Die Menge an o-Nitrophenol ist bei den verwendeten Mengen von ONPG nur von der Konzentration der  $\beta$ -Galactosidase und der Zeit abhängig, so dass die Menge des o-Nitrophenols als Maß für die Plasmidaktivität (Hintergrundkontrolle) bzw. die Konzentration des Plasmids in dem Transfektionsprodukt (somit auch Transfektionseffizienz) dient. Hierzu wurde in eine transparente 96-Well-Platte das verdünnte Zellextrakt (30  $\mu$ l), 100x Mg-Lösung (3  $\mu$ l), 1x ONPG (66  $\mu$ l) sowie 0,1 M Natriumphosphat (pH 7,5; 201  $\mu$ l) zu je 300  $\mu$ l pipettiert und die gesamte Platte für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Photoabsorption bei einer Wellenlänge von 420 nm in einem *Plate Reader* (Biotek) ermittelt. Als Umrechnungsfaktor wurde die Formel

$$\beta\text{-Galactosidase-Einheiten} = (380 * A_{420}) / \text{Zeit (Minuten)}$$

benutzt (380 = Konstante des ONPG-Umsatz der  $\beta$ -Galactosidase;  $A_{420}$  = Absorption bei 420 nm), die Zeit betrug 10 Minuten (s.o.).

Für die statistische Signifikanzanalyse wurden die Gruppen mittels eines ungepaarten, einseitigen Zweistichproben-t-Tests untersucht. Auf eine Welch-Korrektur wurde verzichtet. Ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 miR-223-Expression im Rattenmyokard bei I/R, IPC und RIPC

#### 4.1.1 Deskriptive Statistik

In insgesamt neun Gruppenvergleichen wurde der Unterschied in der miR-223-Expression zwischen den einzelnen Experimental- (#2-#6) und der jeweiligen Kontrollgruppe (#1) mittels der Quantitativen *Real-Time* PCR ermittelt (Tabelle 13). Die ermittelten n-fachen Expressionsunterschiede bzw.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte lagen zwischen ca. 0,5-fach (#2: I/R, non-AAR) und ca. 26-fach (#2: I/R, AAR).

Versuchsgruppe	$\overline{\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	SD	SEM	95% CI
#1: Sham	0,906	1*	1,057	0,432	[-0,203 ; 2,015]
#2: I/R, non-AAR	2,125	0,523	0,766	0,313	[1,321 ; 2,929]
#2: I/R, AAR	-2,527	26,031	1,177	0,481	[-3,763 ; -1,292]
#3: IPC, non-AAR	-0,286	2,447	1,012	0,413	[-1,347 ; 0,776]
#3: IPC, AAR	-1,824	15,986	0,658	0,380	[-3,458 ; -0,189]
#4: IPC+I/R, non-AAR	0,082	1,348	0,762	0,313	[-0,718 ; 0,882]
#4: IPC+I/R, AAR	-2,311	22,410	0,940	0,384	[-3,298 ; -1,324]
#5: RIPC	1,840	0,967	0,847	0,346	[0,948 ; 2,730]
#6: RIPC+I/R, non-AAR	0,725	0,770	1,315	0,537	[-0,655 ; 2,104]
#6: RIPC+I/R, AAR	-1,322	4,877	0,555	0,226	[-1,904 ; -0,740]

**Tabelle 13: Deskriptive Statistik der miR-223-qPCR.** #1-6 gibt die Gruppen 1-6 wieder, teilweise mit AAR und non-AAR pro Gruppe. Für die Gruppe 1 (*Sham*) wurden Mittelwerte aller durchgeführten qPCR-Experimente gebildet. Das  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  für *Sham* per definitionem 1 (\*). Standardabweichung (SD), Standardfehler (SEM) und Konfidenzintervalle (95% CI) beziehen sich auf die  $\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Gruppen.

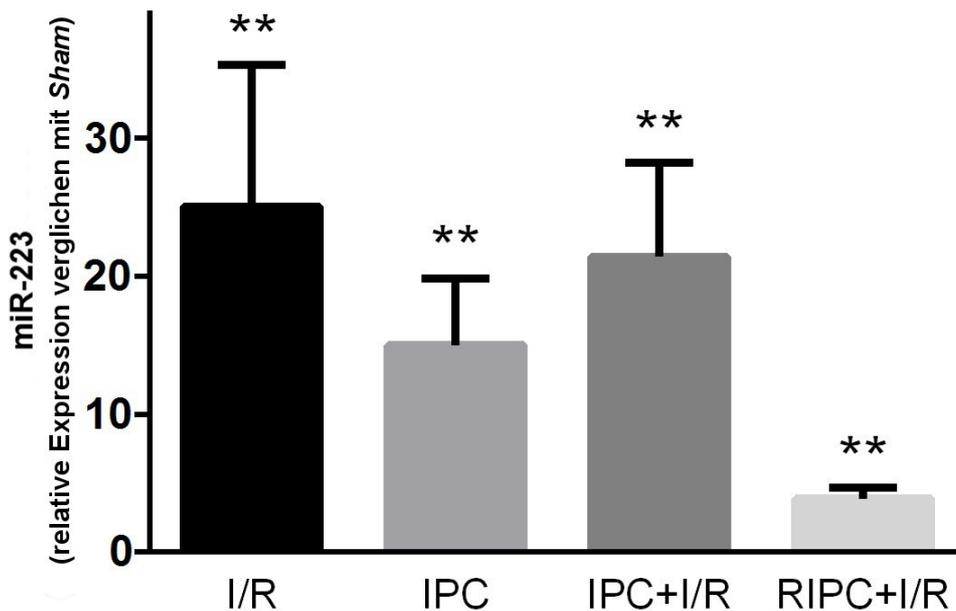
#### 4.1.2 Gruppenvergleiche der Relativen Expression der miR-223

Die relative miR-223-Expression war in der AAR in allen Behandlungsgruppen signifikant erhöht im Vergleich mit der *Sham*-Gruppe: ca. 26-fach bei #2: I/R, ca. 22-fach bei #4: IPC+I/R, ca. 16-fach bei #3: IPC und ca. 5-fach bei #6: RIPC+I/R (je n = 6; p jeweils < 0,01; Tabelle 14 und Abbildung 7).

Experimentalgruppe	Relative Expression vs. <i>Sham</i>	p-Wert
#2: I/R, AAR	26,0	< 0,0001
#3: IPC, AAR	16,0	0,0003
#4: IPC+I/R, AAR	22,4	< 0,0001
#6: RIPC+I/R, AAR	4,9	0,0002

**Tabelle 14: Relative Expression der miR-223 in der AAR.** In allen Gruppen waren die Expressionsunterschiede vs. *Sham* signifikant erhöht, dabei am höchsten in der Gruppe #2: I/R mit ca. 26-fach ( $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , je n = 6; p jeweils < 0,01).

## Relative Expression der miR-223 in der AAR



**Abb. 7: Relative Expression der miR-223 der AAR.** In allen Gruppen wird eine signifikant vermehrte Expression der miR-223 verglichen mit *Sham* ermittelt (Relative Expression =  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$ , je n = 6, \*\* p < 0,01 vs. *Sham*).

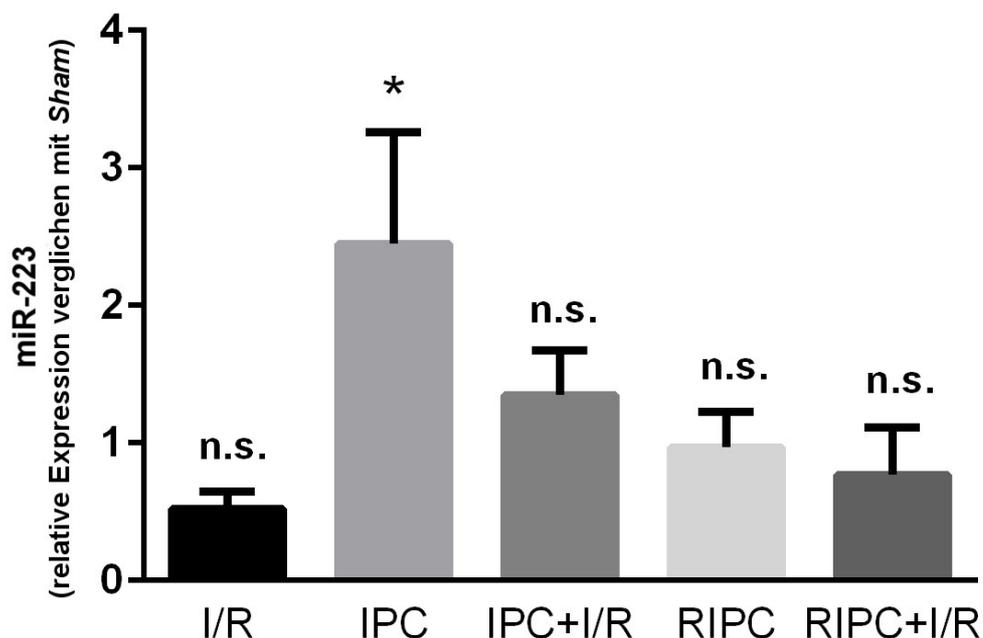
In den übrigen non-AAR-Gruppen und in der Gruppe 5 (RIPC allein) war bis auf die Gruppe 3 (IPC allein, ca. 2,5-fach, p < 0,05) kein signifikanter Unterschied in der miR-223-Expression gegenüber der *Sham*-Behandlung festzustellen, wobei in der

Gruppe 2 (I/R) eine starke Tendenz hinsichtlich geringerer Expression der miR-223 in der non-AAR gesehen wurde, die fast signifikant war ( $p = 0,0735$ ; Tabelle 15, Abbildung 8).

Experimentalgruppe	Relative Expression vs. <i>Sham</i>	p-Wert
#2: I/R, non-AAR	0,5	0,0735
#3: IPC, non-AAR	2,4	0,0333
#4: IPC+I/R, non-AAR	1,3	0,5353
#5: RIPC	1,0	0,2530
#6: RIPC+I/R, non-AAR	0,8	0,6913

**Tabelle 15: Relative Expression der miR-223 in der non-AAR bzw. bei RIPC.** In den non-AAR-Gruppen und bei RIPC waren die Expressionsunterschiede mit Ausnahme der Gruppe #3: IPC (ca. 2,5-fach erhöhte Expression der miR-223,  $p < 0,05$ ) nicht signifikant erhöht, wobei in der I/R-Gruppe die miR-223 fast signifikant niedriger exprimiert wurde (je  $n = 6$ ;  $p > 0,05$ ).

## Relative Expression der miR-223 in der non-AAR



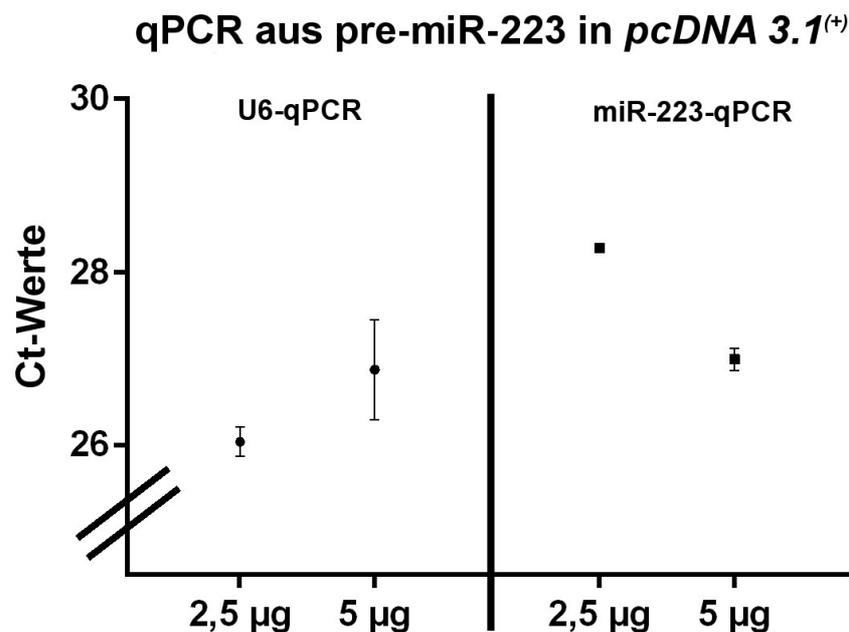
**Abb. 8: Relative Expression der miR-223 in der non-AAR bzw. bei RIPC.** Nur die IPC-Gruppe weist einen signifikanten Unterschied in der relativen miR-223-Expression auf (Relative Expression =  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$ , je  $n = 6$ , \*  $p < 0,05$  vs. *Sham*, n.s. = nicht signifikant vs. *Sham*).

## 4.2 miR-223-Interaktion mit der 3'-UTR der PMCA1

### 4.2.1 Kontrolle der Einklonierung: pre-miR-223 in *pcDNA 3.1(+)*

Um zu überprüfen, ob die pre-miR-223 korrekt in den Plasmidvektor *pcDNA 3.1(+)* einkloniert wurde, also miR-223 von diesem exprimiert wurde, wurde eine qPCR (*TaqMan® MicroRNA Assay* für miR-223 und U6) mit unterschiedlichen Mengen an *template* aus *pcDNA 3.1(+)* mit einklonierter pre-miR-223 aus transformierten kompetenten Bakterienzellen durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass miR-223 durch den *pcDNA 3.1(+)*-Vektor mit einklonierter pre-miR-223 gebildet wird und die miR-223-Menge ungefähr proportional zur eingesetzten *template*-Menge von pre-miR-223 in *pcDNA 3.1(+)* ist: durchschnittliche Ct-Werte bei 5 µg = 27,0 und bei 2,5 µg = 28,3; der Unterschied zwischen beiden *template*-Mengen ist in diesem Fall  $\approx 2,5$ -fach (je  $n = 2$ ). Die Ct-Werte der U6-qPCRs unterschieden sich zwischen 2,5 und 5 µg kaum (26,0 bzw. 26,9; Abbildung 9).

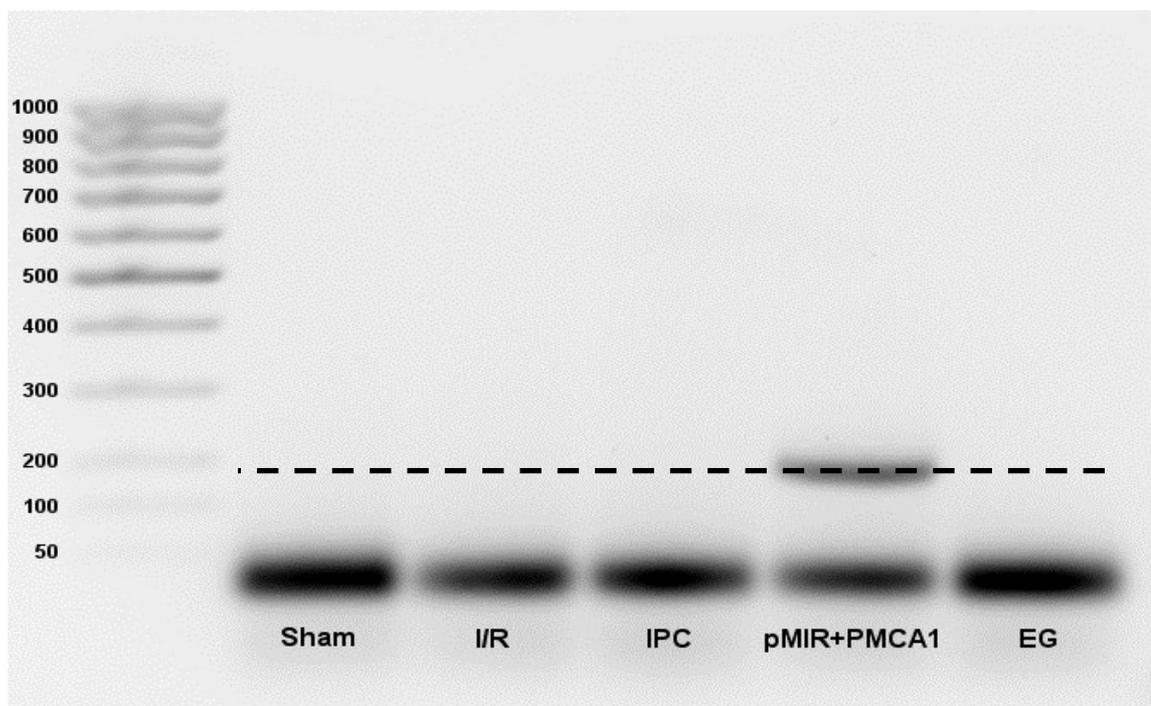


**Abb. 9: miR-223-qPCR mit cDNA aus *pcDNA 3.1(+)*.** Dargestellt sind die Ct-Werte aus den miR-223- bzw. U6-qPCRs mit unterschiedlichen *template*-Mengen aus *pcDNA 3.1(+)* mit einklonierter pre-miR-223. Die Abszisse wurde zur besseren Darstellung durch  $y = 25$  gelegt. In der x-Achse sind die jeweilig benutzten *template*-Mengen abgebildet. Die Ct-Werte der jeweiligen qPCR von 0 µg wurden nicht detektiert und werden hier nicht dargestellt. Die Ct-Werte der U6-qPCR unterscheiden sich kaum. Die Ct-Werte der pre-miR-223-qPCR sind hingegen bei Verdopplung der Menge an *template* (2,5 µg zu 5 µg) um ca. 1,3 kleiner, was einer erhöhten relativen Expression von ca. 2,5-fach entspricht (MW  $\pm$  SEM,  $n = 2$ ).

Es konnte also gezeigt werden, dass der Plasmidvektor *pcDNA 3.1(+)* mit einklonierter pre-miR-223 korrekt miR-223 exprimiert und die Konzentration der gebildeten miR-223 nur von der Menge des Plasmidvektoren abhängt.

#### 4.2.2 Kontrolle der Einklonierung: 3'-UTR der PMCA1 in *pMIR-Report*

In der PCR mit den Primern für die 3'-UTR der PMCA1 zeigte nur der Plasmidvektor als *DNA-template* das korrekte Produkt (175 bp) in der anschließend durchgeführten Gelelektrophorese (Abbildung 10). Darüber hinaus konnte die korrekte Identität der durch eine Gelextraktion gewonnenen DNA aus dieser Bande mittels DNA-Sequenzierung bestätigt werden (siehe Anhang). Folglich konnte bestätigt werden, dass die 3'-UTR der PMCA1 korrekt in das Reporterplasmid *pMIR-Report System* einkloniert wurde und letzteres für die Transfektionen und den folgenden Luciferase Assay verwendet werden konnte.



**Abb. 10: Gelelektrophorese der PCR mit Primern für 3'-UTR der PMCA1.** Auf der linken Seite ist ein 100 bp-Marker aufgetragen (50-1000 bp). In allen *template*-DNA als auch in der endogenen Kontrolle (EG) sind sog. *Primer Dimer* (PCR-Produkte < 50 bp) zu erkennen: hier haben sich Primer aneinander hybridisiert und waren so amplifiziert. Die gesuchte DNA-Sequenz (3'-UTR der PMCA1) konnte in dem klonierten Plasmidvektor *pMIR-Report* nachgewiesen werden (175 bp, gestrichelte Linie bei 200 bp, invertiertes Bild).

### 4.2.3 Luciferase und $\beta$ -Galactosidase Assays

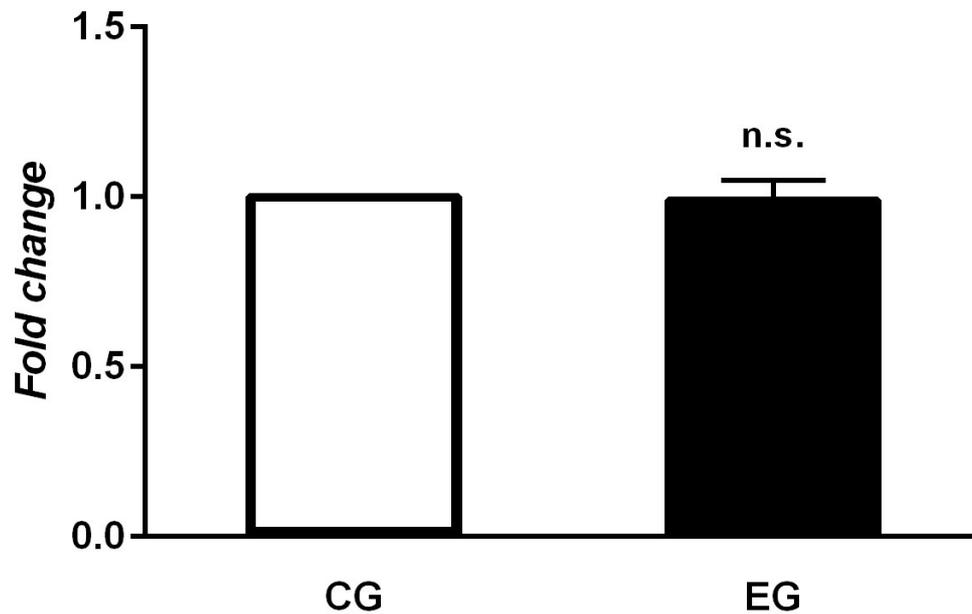
Es wurden insgesamt zehn Versuchsreihen durchgeführt, wobei zwei Reihen, bei denen der Variationskoeffizient (*Coefficient of Variation* oder *CV%*) von Experimental- (EG) oder Kontrollgruppe (CG) größer als 0,3 war, aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der relativen Luciferase-Aktivität (in der folgenden Tabelle als *Fold change*) zwischen miR-223 und 3'-UTR der PMCA1 (EG) verglichen mit 3'-UTR der PMCA1 alleine (CG; je n = 4, p jeweils > 0,05, Tabelle 16).

Versuchsreihe	<i>Fold change</i>	p-Wert
1	1,0	0,9767
2	1,0	0,7032
3	0,9	0,4736
4	0,9	0,2589
5	0,8	0,0907
6	0,9	0,0981
7	0,9	0,2912
8	0,9	0,2338

**Tabelle 16: Unterschiede in der Luciferase-Aktivität.** In den acht zur Analyse zugelassenen Versuchsreihen wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Luciferase-Aktivität zwischen Experimental- und Kontrollgruppen gefunden (je n = 4, p jew. > 0,05).

Auch Variationen der verwendeten Mengen an Plasmid-DNA führten zu keinem anderen Ergebnis. Insgesamt ist festzustellen, dass die Unterschiede zwischen Experimental- und Kontrollgruppe bzw. die *Fold changes* um 1,0 streuen, d.h. die gemittelten Lumineszenzwerte der Gruppen ungefähr gleich sind (Abbildung 11).

## Luciferase und $\beta$ -Galactosidase Assays



**Abb. 11: Vergleich der Gruppen in den Luciferase und  $\beta$ -Galactosidase Assays.** Die relativen Luciferase-Aktivitäten bzw. *Fold changes* der Experimentalgruppe (EG, d.h. Luciferase Assay mit in *pcDNA 3.1(+)* einklonierterter pre-miR-223-Sequenz) unterschieden sich in den einzelnen Versuchsreihen und auch im Durchschnitt (hier dargestellt) nicht von der Kontrollgruppe (CG, d.h. Luciferase Assay mit *pcDNA 3.1(+)* ohne einklonierter miR-223-Sequenz; n = 8, n.s. = nicht signifikant).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 miR-223-Expression bei myokardialer Ischämie sowie IPC/RIPC

Zur Untersuchung der differentiellen miR-223-Expression bei myokardialer Ischämie und IPC bzw. RIPC wurde eine *Real-Time* PCR (*TaqMan® MicroRNA Assays*) mit cDNA aus transkribierter RNA aus infarziertem Rattenmyokard aus einem Tiermodell mit Proben aus Versuchsgruppen mit alleiniger Ischämie und IPC sowie RIPC jeweils mit und ohne nachfolgender myokardialer Ischämiephase durchgeführt. Die Untersuchungen wurden getrennt nach Herzproben aus AAR und non-AAR vorgenommen.

#### *Zusammenfassende Aussagen der Ergebnisse*

Ausgehend von den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen können bezüglich der miR-223-Expresion bei myokardialer Ischämie bzw. IPC oder RIPC folgende Aussagen gemacht werden:

*Die relative Expression der miR-223 bei myokardialer Ischämie ist in allen AAR-Herzproben (Ischämie/Reperfusion = I/R ohne Präkonditionierung, alleinige IPC, IPC bzw. RIPC mit nachfolgender I/R) signifikant erhöht (jeweils  $p < 0,01$ , Abbildung 7).*

*Es gibt keinen Unterschied in den non-AAR-Herzproben hinsichtlich der miR-223-Expression bei myokardialer Ischämie (jeweils  $p > 0,05$ , Abbildung 8). Nur in der Gruppe 3 (IPC) ist die miR-223 auch in non-AAR signifikant erhöht (ca. 2,5-fach,  $p < 0,05$ , Abbildung 8).*

*Eine ischämische Präkonditionierung (IPC) als auch eine ischämische Fernkonditionierung (RIPC) vor einer längeren Ischämiephase führen zu geringeren miR-223-Expressionen im AAR-Gebiet verglichen mit alleiniger Myokardischämie ohne Präkonditionierung. Dabei ist die miR-223-Expression bei RIPC + I/R am kleinsten (I/R alleine mit den größten Werten, gefolgt von IPC + I/R und alleiniger IPC).*

### *Einordnung der Ergebnisse in die wissenschaftliche Literatur*

Van Rooij et al. (2008) untersuchten drei und vierzehn Tage nach Infarkt in einem miRNA *Microarray* die Expressionsunterschiede von miRNAs im Herzgewebe von Mäusen. Hierbei wurde drei Tage nach Infarkt für die miR-223 ein 15,5-facher Anstieg in der Grenzzone (engl. *border zone*, am ehesten mit dem AAR-Gebiet vergleichbar) zum Infarkt festgestellt, 14 Tage später war ein Anstieg von 3,2-fach (verglichen zur Kontrollgruppe) zu verzeichnen. Im nicht infarzierten, entfernten Myokard (am ehesten der non-AAR entsprechend) wurde drei Tage nach Infarkt kein signifikanter Anstieg detektiert, 14 Tage später hingegen gab es eine 6-fache Hochregulierung. Diese differentielle Reaktion der miR-223 konnte in derselben Studie in einer qPCR-Untersuchung mit menschlichem, infarziertem Herzgewebe nicht in demselben zeitlichen Muster bestätigt werden: So gab es drei Tage nach dem Infarkt nur im zum Infarkt entfernten Gewebe einen miR-223-Anstieg (ca. 4-fach), vierzehn Tage danach war die Hochregulierung sowohl hier (ca. 10-fach) als auch im Grenzbereich zum Infarkt (ca. 12-fach) deutlich größer (van Rooij et al. 2008).

Die Ergebnisse des *Microarray* und der qPCR von van Rooij et al. und die in dieser Arbeit präsentierten Daten sind nur sehr eingeschränkt miteinander vergleichbar, da das untersuchte Myokardgewebe aus unterschiedlichen, nicht vollständig kongruenten Arealen gewonnen wurde und unterschiedliche Messpunkte benutzt wurden.

Tendenziell zeigen beide Untersuchungen in die gleiche Richtung: bereits zwei Stunden nach Myokardischämie konnte eine starke, signifikante Hochregulation der miR-223 im AAR-Gebiet nachgewiesen werden (ca. 26-fach); bei van Rooij et al. war der Anstieg in der Grenzzone ca. 16-fach nach drei Tagen und ca. 3-fach nach vierzehn Tagen. Interessanterweise war in der qPCR der Studie von van Rooij et al. der Anstieg der miR-223 in der Grenzzone erst nach 14 Tagen erhöht (ca. 12-fach).

Schwieriger zu vergleichen sind die Ergebnisse bezüglich der miR-223-Expression im zum Infarkt entfernten Myokard, da hier gänzlich unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte verwendet wurden. Während hier zwei Stunden nach Myokardischämie keine signifikante Hochregulation der miR-223 festgestellt wurde, wurde in den veröffentlichten qPCR-Daten der Studie von van Rooij et al. sowohl

nach drei (ca. 4-fach) als auch nach vierzehn Tagen (ca. 10-fach) eine signifikant verstärkte Expression der miR-223 beschrieben.

Dong et al. (2009) verwendeten ein ähnliches tierexperimentelles Modell und untersuchten Rattenherzproben aus infarziertem, nekrotischem Gebiet, dem hierzu benachbarten Areal (der AAR entsprechend) und nichtinfarziertem Gewebe (der non-AAR entsprechend) in einem miRNA *Microarray* sechs Stunden nach Myokardinfarkt. Sie ermittelten einen 3,7-fachen miR-223-Anstieg im infarzierten Areal; im AAR-Gebiet, das sich ebenfalls mit *Evans blue* nicht anfärben ließ, war sie 8,9-fach hochreguliert. Somit war die miR-223 nach Myokardinfarkt sowohl direkt im nekrotischen Infarktgewebe als auch im Gebiet der AAR signifikant höher exprimiert (Dong et al. 2009).

Die hier vorliegenden Daten sind im Einklang mit den Ergebnissen von Dong et al.: auch hier gibt es eine deutliche Hochregulation der miR-223 (hier zwei Stunden) nach einem Myokardinfarkt im AAR-Gebiet (ca. 26-fach vs. ca. 9-fach).

#### *Geringere Hochregulation der miR-223 bei IPC und RIPC*

Die differentielle Expression der miR-223 bei IPC oder RIPC war bisher unbekannt. In der einzigen publizierten Studie mit miR-223 und ischämischer Präkonditionierung schlossen Dong et al. die miR-223-Expression nach einer IPC nicht in ihre Analysen ein.

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass die miR-223 bei vorheriger IPC bzw. RIPC mit folgender I/R geringer hochreguliert wird als bei alleiniger I/R (ca. 22-fach bei IPC + I/R bzw. ca. 5-fach bei RIPC + I/R vs. ca. 26-fach bei alleiniger I/R). Diese graduellen Unterschiede in der Hochregulation waren spezifisch im AAR-Gebiet detektierbar, im non-AAR-Gebiet gab es keinen signifikanten Unterschied in der miR-223-Expression verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine alleinige IPC führte zu einer ca. 16-fachen miR-223-Expression im AAR-Gebiet, auch im non-AAR-Gebiet war die miR-223 mit ca. 2,5-fach vermehrt exprimiert. Ebenso führte eine RIPC mit nachfolgender I/R führte zu einer ca. 5-fach erhöhten miR-223-Expression, während eine alleinige RIPC zu keinen veränderten miR-223-Leveln führte (bei alleiniger RIPC konnte bei fehlendem Myokardinfarkt keine AAR von einer non-AAR

unterschieden werden). Somit scheint eine vorherige IPC bzw. RIPC zu einem verminderten Anstieg der miR-223-Expression im AAR-Gebiet bei myokardialer Ischämie zu führen.

#### *Erklärungsansätze und Ausblick*

Als neue Erkenntnis aus dieser Arbeit ist der scheinbare negativ-regulatorische Einfluss einer ischämischen Präkonditionierung (IPC) bzw. einer ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC) vorzustellen, die beide zu niedrigeren miR-223-Expressionen nach I/R führen.

Dieser Zusammenhang könnte darin begründet sein, dass im AAR-Gebiet eine inflammatorische Reaktion abläuft, die – unter anderem – durch eine leukozytäre Invasion abgebildet wird. Die miR-223 wurde als spezifisch für neutrophile Granulozyten und ihre Vorstufen beschrieben (Johnnidis et al. 2008; Chen et al. 2004; Q. Chen et al. 2012) und die leukozytäre Invasion besteht nach Myokardischämie aus dieser Subpopulation (Frangogiannis et al. 2002). So ist denkbar, dass die vermehrte Expression der miR-223 mindestens zum Teil durch die neutrophile Zellvermehrung im Gewebe bedingt ist; diese scheint a) größer zu werden, je größer der ischämische bzw. Infarktreiz ist und b) kleiner zu werden, sobald eine Form der Präkonditionierung (IPC oder RIPC) vor einem identischen Infarktreiz gesetzt wird. So erscheint auch plausibel, weshalb es im non-AAR-Gebiet des Infarkttherzen keine erhöhte miR-223-Expression gab: hier ist das Gewebe gesund und es fehlt die lokale, leukozytäre Invasion der neutrophilen Granulozyten, die den miR-223-Expressionsanstieg mindestens zum Teil bedingt.

Für die miR-223 wurde eine regulatorische Rolle in der Granulopoese und inflammatorischen Reaktion beschrieben (Johnnidis et al. 2008), so dass vermutet werden kann, dass der Expressionsanstieg der miR-223 im Infarktgebiet nicht alleine oder monokausal die spätere Infarktgröße bedingt, sondern diese miRNA von den neutrophilen Granulozyten auch zur Autoregulation gebildet wird. Eine vorherige ischämische Präkonditionierung könnte deshalb zu niedrigeren miR-223-Expressionslevel führen, da diese Autoregulation dynamisch zu verstehen sein müsste und die Reize in den Phasen der kurzen Ischämien der IPC bzw. RIPC bereits graduelle neutrophil-granulozytären Invasionen der späteren Infarkt- bzw. AAR-

Areale provozieren könnten. Somit würde sich die miR-223 eher als diagnostisches statt als therapeutisches Ziel etwaiger weitergehender Untersuchungen anbieten. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Ischämie, neutrophiler Invasion und miR-223-Hochregulation ist auch bei anderen Organen und Geweben anzunehmen. So waren zum Beispiel auch nach hepatischer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion die miR-223-Expression signifikant erhöht (Yu et al. 2009). Die erhöhte miR-223-Expression in ischämisch beschädigten Muskelzellen wurde in einer anderen Studie direkt mit der leukozytären Invasion des Gewebes in Verbindung gebracht und die miR-223 als „inflammatorische microRNA“ beschrieben (Greco et al. 2009).

Der Zusammenhang zwischen leukozytärer Invasion bei myokardialer Ischämie und differentieller miR-223-Expression wird hier aus bekannten Erkenntnissen der aktuellen Literatur abgeleitet, konkrete Daten hierzu müssten jedoch in Folgeuntersuchungen gewonnen und analysiert werden. So könnten zum Beispiel Gewebsschnitte (z.B. aus dem hier verwendeten Tiermodell) hergestellt und auf neutrophile Granulozyten mittels der spezifisch anfärbbaren Marker *MPO* (Myeloperoxidase) und *ASD* (Naphthol ASD-Chloroazetatesterase) analysiert werden. Dabei wäre insbesondere die Korrelation zwischen miR-223-Expression und Neutrophilen-Zellzahl in den AAR-Gebieten der Infarktgruppen von Interesse.

#### *Erhöhte miR-223-Expression im Nichtinfarktgebiet bei alleiniger IPC*

Interessanterweise ist bei der IPC allein auch die miR-223-Expression im Nichtinfarktgebiet (non-AAR) signifikant erhöht. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass der lokale IPC-Reiz im gesamten Herzen zu einer graduell vermehrten neutrophil-granulozytären Akkumulation führt. Dies wäre auch kongruent zu den Erkenntnissen von Przylenk et al., die nachweisen konnten, dass eine IPC eines Koronarbetts das Infarktareal eines anderen Koronarbetts reduzieren konnte (Przyklenk et al. 1993). Außerdem würde dies die Ergebnisse von van Rooij et al. erklären, bei denen es im zum Infarkt entfernten gesunden Myokard zu einem Anstieg der miR-223-Expression in einer qPCR kam (drei Tage nach Myokardischämie bzw. Infarkt, Anstieg ca. 4-fach; van Rooij et al. 2008). Die neutrophiläre Invasion ist vor allem durch die Phase der Reperfusion bedingt

(Frangogiannis et al. 2002) und dies könnte deshalb nach IPC zu einer global vermehrten miR-223-Expression führen.

Es scheint jedoch auch dem Umstand zu widersprechen, dass es in der Gruppe IPC mit Ischämie/Reperfusion zu keiner veränderten miR-223-Expression im non-AAR-Gebiet kam. Hier kann als Erklärungsansatz der starke chemotaktische Reiz einer zellulären Nekrose einer manifesten myokardialen Ischämie angeführt werden, der zudem durch die Apoptose von benachbarten Myokardzellen noch verstärkt wird (Frangogiannis et al. 2002). So wäre denkbar, dass sich die Verteilung der neutrophilen Granulozyten als Orte der vermehrten miR-223-Expression nach IPC mit manifestem Infarkt sich weg von der non-AAR in die Nähe des Infarktes bzw. der AAR verschieben.

Die Chemotaxis im Rahmen des Myokardinfarkts zieht die neutrophilen Granulozyten in den ersten sechs Stunden in die Infarktzone, in den nächsten 24 Stunden wird eine Migration in das Myokardgewebe selbst beschrieben (Fröhlich et al. 2013). Die Geschwindigkeit der Leukozytenadhäsion in die reperfundierte AAR nach Infarkt ist dabei innerhalb der ersten Stunde am größten (Dreyer et al. 1991).

Die durchschnittliche Halbwertszeit gebildeter miRNAs wird auf ca. fünf Tage geschätzt (Gantier et al. 2011), es wurden bis zu 14 Tage nach Indexischämie erhöhte miR-223-Expressionslevel im Grenzgebiet zum Myokardinfarkt beschrieben (van Rooij et al. 2008); der miR-223-Effekt im Rahmen der Myokardischämie scheint robust zu sein. Letztlich müssten die gefundenen Effekte der IPC im non-AAR-Gebiet in weiteren Untersuchungen näher untersucht werden.

## **5.2 Untersuchung der Interaktion zwischen miR-223 und PMCA1**

Die PMCA1 ist als ein putatives Zielprotein der miR-223 beschrieben worden. Sie ist ein wichtiges *housekeeping*-Protein, das im Rahmen einer zellulären Apoptose proteolytisch durch Caspasen gespalten wird. Neben anderen beeinflussen auch miRNAs im Ischämiegeschehen die Regulation der zellulären Apoptose des Kardiomyozyten. Zur Klärung, ob die PMCA1 tatsächlich ein Ziel der miR-223 darstellt, die miR-223 also möglicherweise aktiv zur zellulären Apoptose (z.B. im Rahmen einer Myokardischämie) beiträgt, wurde mittels Luciferase Assay der

Einfluss der in den Expressionsvektor *pcDNA 3.1(+)* einklonierten miR-223 auf die in den Reportervektor *pMIR-Report System* einklonierte 3'-UTR der PMCA1 überprüft.

#### *Zusammenfassende Aussage der Ergebnisse*

Die Ergebnisse zu der untersuchten miR-223/PMCA1-Interaktion lassen sich wie folgt zusammenfassen:

*Die miR-223 scheint keinen einheitlichen, systematischen Einfluss auf die 3'-UTR der PMCA1 zu haben, obwohl hier ein perfektes 8mer seed match im Vorfeld identifiziert werden konnte und die PMCA1 als putatives Zielprotein der miR-223 beschrieben wurde.*

Es kann also gezeigt werden, dass trotz nachweislichen Expressionen von 3'-UTR der PMCA1 und von miR-223 in den Reporter- bzw. Expressionsvektoren keine funktionelle Interaktion zwischen der miR-223 und ihrem vermeintlichen *8mer seed match* in der 3'-UTR der PMCA1 in dem durchgeführten Experiment stattfindet.

Erwartet wurde aufgrund des Nachweises einer Interaktion (Baek et al. 2008), der Auffindung eines perfekten *8mer seed matches* in der 3'-UTR der PMCA1 für die miR-223 sowie aus mechanistischen Überlegungen (erhöhte neutrophil-granulozytäre Invasion von Infarkt- bzw. AAR-Gewebe mit folgender, hier vorher nachgewiesenen Hochregulation der miR-223 in einem apoptotischen Milieu), dass die PMCA1 bzw. deren mRNA ein Ziel der miR-223 darstellt und durch diese reprimiert wird. Dies hätte sich in niedrigeren Lumineszenzwerten im Luciferase Assay ausdrücken müssen; tatsächlich unterscheiden sich stattdessen die Experimental- und Kontrollgruppen nicht.

Da kein systematischer Einfluss der miR-223 auf die 3'-UTR der PMCA1 gefunden werden konnte, wurde auf eine weitere Kontrolle mit mutierten Sequenzen der 3'-UTR der PMCA1 und auf ein weiterführendes Western Blot verzichtet.

### *Kritische Evaluation der verwendeten Methoden*

Bei nicht bestätigten Hypothesen stellt sich die Frage, ob die interne Validität der Untersuchung ausreichend bzw. die Untersuchung überhaupt geeignet war, die Hypothese zu beurteilen (Hager et al. 2001).

Im vorgestellten Fall wurde versucht, mithilfe einer *in silico* Vorhersage einer perfekten komplementären Basenpaarung zwischen Zielprotein (3'-UTR der PMCA1-mRNA) und miRNA (miR-223) sowie *in vitro* durchgeführten Einklonierungen von Effektor-DNA in einen Expressionsvektor (miR-223 in *pcDNA 3.1(+)*) und Ziel-DNA in einen Reportervektor (3'-UTR der PMCA1-mRNA in *pMIR-Report System*) einen systematischen regulierenden Effekt der miRNA auf das Zielprotein mittels eines Luciferase Assays nachzuweisen.

Im Reportervektor *pMIR-Report System* ist das Luciferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* vor der *MCS* kodiert. In die *MCS* wurde das mittels der Restriktionsendonucleasen *Spe I* und *Hind III* vorbereitete *Insert* (mit der Sequenz der 3'-UTR der PMCA1, in der die Bindungsstelle für die miR-223 enthalten war) im Restriktionsverdau ligiert. Es wurden die Empfehlungen des Herstellers bezüglich der Enden des *Inserts* (sog. *sticky ends*) und auch der Auswahl der Restriktionsendonucleasen beachtet.

Anhand der Menge der transkribierten Luciferase im Zellysate konnte man nach Anregung in einer Lumineszenzmessung Aussagen über den regulatorischen Einfluss der miR-223 auf die *MCS* machen (genauer durch miR-223-Bindung an die Bindungsstelle in der spezifizierten 3'-UTR der PMCA1 in der *MCS*). Die miR-223 wurde aus dem Expressionsplasmid *pcDNA 3.1(+)* mit einklonierter pre-miR-223 in der *MCS* gebildet. Aus der transkribierten pre-miR-223 wird über die zytoplasmatischen Proteine *Dicer*, *TRBP* und *AGO* der transfizierten HEK 293-Zelle letztlich miR-223 gebildet (siehe auch Kapitel 1.1 *microRNAs* bzw. Abbildung 1). Die Effektivität der miR-223-Bindung in die Bindungsstelle der 3'-UTR der PMCA1 in der *MCS* des Reportervektors müsste zu einer geringeren Transkription der Luciferase und somit zu geringeren Lumineszenzwerten in der Messung gegenüber der Kontrollgruppe (hier *pcDNA 3.1(+)* ohne einklonierte pre-miR-223) führen.

Um die Varianz bezüglich der Zahl und Vitalität der lysierten transfizierten Zellen sowie Pipettier- und Anwendungsfehler zu minimieren, wurde jeder Vergleich viermal pro Experiment durchgeführt.

Die Korrektheit der Einklonierungen konnte vor der Durchführung der Transfektionen durch eine qPCR (miR-223) bzw. Sequenzierungen (3'-UTR der PMCA1) bestätigt werden. Die endogenen Kontrollen ( $\beta$ -Galactosidase Vektoren) verifizierten ebenfalls den Erfolg der Transfektionen.

Um einen Experimentatoreffekt auszuschließen, wurden die einzelnen Schritte der PCR von 3'-UTR der PMCA1 und miR-223, Restriktionsverdau, Einklonierungen in *pMIR-Report System* und *pcDNA 3.1(+)*, Transfektionen in HEK 293-Zellen sowie Messung der Luciferase-Aktivität im Luciferase Assay von einem anderen Experimentator durchgeführt, wobei ebenfalls kein Einfluss der miR-223 auf die 3'-UTR der PMCA1 nachgewiesen werden konnte.

Darüber hinaus konnten – als Hinweis auf ein geeignetes Modellsystem – mittels der verwendeten Calcium-Phosphat-Präzipitationstechnik mit HEK 293-Zellen sowie weiteren Materialien und Protokollen unseres Labors in zeitgleich laufenden Experimenten signifikante Effekte von anderen miRNAs auf ihre Ziel-mRNAs gezeigt werden. Variationen der Plasmid-DNA-Mengen erbrachten ebenfalls keine differierenden Ergebnisse. Hinsichtlich der verwendeten Methoden ist folglich keine Einschränkung der internen Validität auszumachen.

Ergänzend muss aber auch angeführt werden, dass letztendlich der Nachweis auf Proteinebene entscheidend für den Beweis einer tatsächlichen miRNA-mRNA-Interaktion ist. Ein quantitativer Western Blot hierzu war geplant gewesen, wurde aber bei fehlendem Hinweis auf eine Interaktion im Luciferase Assay nicht mehr durchgeführt.

### *Erklärungsansätze*

Anscheinend ist selbst eine perfekte *8mer*-Basenpaarung zwischen 3'-UTR der mRNA und miRNA nicht alleine ausschlaggebend für die folgende Regulation der mRNA durch die miRNA. Didiano und Hobert untersuchten die miRNA *lsy-6*, die endogen in Neuronen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* vorkommt: von 14 mRNAs, in deren 3'-UTRs sechs bis zwölf Basenpaare lange putative *seed matches* zu

lsy-6 identifiziert wurden, wurde nur eine einzige mRNA in ihrer Expression durch lsy-6 negativ beeinflusst (Didiano & Hobert 2006).

Garcia und Kollegen griffen diese Beobachtung auf und replizierten die Untersuchung des Einflusses von lsy-6 auf seine mutmaßlichen *Targets* mit Luciferase Assays in menschlichen Epithelzellen (HeLa-Zelllinie). Der Befund der Studie von Didiano und Hobert konnte bestätigt werden: erneut wurde nur eine einzige von 14 mRNAs, die ein putatives *seed match* zu lsy-6 besaßen, von dieser auch negativ beeinflusst. Die Autoren führten als Erklärungsansatz die *seed-pairing stability* (SPS bzw. engl.: „Stabilität der Basenpaarung“ zwischen 3'-UTR der mRNA und der miRNA) sowie die *target-site abundance* (TA bzw. engl.: „Überfluss an Zielstellen“ für die jeweilige miRNA an der 3'-UTR der mRNA) an. Sie manipulierten die SPS und TA der lsy-6 bzw. der jeweiligen 3'-UTR-Bindungsstellen und konnten so die negative Beeinflussung der putativen Ziel-mRNAs deutlich steigern. Dabei ist eine höhere SPS und eine niedrigere TA nach ihren Untersuchungen entscheidend für die Bindung der miRNA an die 3'-UTR-Bindungsstelle der Ziel-mRNA und nicht alleine die perfekte komplementäre Basenpaarung zwischen 3'-UTR der mRNA und der miRNA. Diese war als Vorhersage für eine Interaktion von miRNA und mRNA zu vernachlässigen, d.h. auch nicht perfekte Bindungsstellen führten zu einem Effekt der miRNA auf die mRNA, falls die SPS hoch genug und die TA ausreichend niedrig war (Garcia et al. 2011).

Sun et al. untersuchten erfolgreich die negative Regulation eines anderen Zielproteins der miR-223: die *Ras homolog gene family member B* oder kurz *RhoB* (Sun et al. 2010). Sie bestätigten, dass RhoB ein effektives Ziel-Protein der miR-223 ist, konnten aber auch beobachten, dass die zwei putativen und effektiven *seed matches* in der 3'-UTR der RhoB für die miR-223 differentiell zu der Repression von RhoB beitrugen. Dabei war die Repression stärker (und somit die miRNA-mRNA-Interaktion effektiver), wenn *upstream* (d.h. in Richtung des 5'-Endes der mRNA) die Basensequenz eine hohe Anzahl von Adenin (A)- und Uracil (U)-Basen besaß (sog. *AU-rich elements* oder *ARE*, engl.: „AU-reiche Elemente“). Wurde die *upstream* liegende AU-reiche Sequenz der zu einer stärkeren Repression führenden, anderen Bindungsstelle in die vorher graduell zu einer schwächeren Repression führende Bindungsstelle inkloniert, war die Repression der mRNA durch die letztere Bindungsstelle deutlich stärker bzw. genau identisch zu der anderen Bindungsstelle.

### *Überprüfung von 5 Kriterien einer erfolgreichen miRNA-mRNA-Interaktion*

Grimson et al. unterstrichen die Beobachtung, dass allein die *seed matches* zwischen miRNA und 3'-UTR der Ziel-mRNA nicht immer für eine funktionelle Repression ausreichend sind und stellten darüber hinaus fünf Eigenschaften der Umgebung der Bindungsstelle von miRNA und 3'-UTR der Ziel-mRNA vor, die die Wirksamkeit einer miRNA-mRNA-Interaktion beeinflussen (Grimson et al. 2007). Diese werden in einem Vergleich zwischen einer erfolgreichen Interaktion (miR-223 auf RhoB, beide *seed matches* im Anhang) sowie einer in den Experimenten dieser Arbeit vorgestellten, nicht erfolgreichen Interaktion (miR-223 auf PMCA1, *seed match* siehe Abbildung 4 und im Anhang) überprüft und im Folgenden ausführlicher vorgestellt.

1. Anzahl der Bindungsstellen einer miRNA in derselben 3'-UTR bzw. Nähe der Bindungsstellen von anderen miRNAs.

Besitzt eine 3'-UTR multiple Bindungsstellen für ein und dieselbe miRNA, scheint die Repression der dazugehörigen mRNA tendenziell größer zu sein. Liegen diese nahe zusammen, war die Repression insgesamt größer als die einzelnen, kumulativen Effekte der miRNA-3'-UTR-Verbindungen. Dieser kooperative Effekt konnte auch mit zwei verschiedenen miRNAs mit separaten, nahe zueinander liegenden Bindungsstellen in derselben 3'-UTR bestätigt werden. Grimson et al. erklären dies dadurch, dass die Wahrscheinlichkeit einer miRNA-mRNA-Interaktion bei multiplen Bindungsstellen erhöht ist und dass ein verstärkender Effekt der mRNA-Repression bei synchroner miRISC-Bindung an die 3'-UTR der mRNA entstehen könnte.

Die 3'-UTR der mRNA von RhoB besitzt zwei *seed matches* für miR-223 (*8mer* an Positionen 1311-1317 sowie ein *7mer* bei 644-650), die 3'-UTR der PMCA1 bietet eine Bindungsstelle an (Position 503-509). Die Gesamt-repression beider Bindungsstellen in der 3'-UTR der RhoB betrug nach miR-223-Cotransfektion ca. 55%, miR-223-Bindungen an einzelnen Bindungsstellen führten jeweils zu geringeren Repressionen von RhoB (ca. 40% und ca. 25%).

Dieses Kriterium scheint für die fehlende miR-223/PMCA-Interaktion relevant zu sein und könnte durch das Einklonieren einer weiteren Bindungsstelle in die 3'-UTR

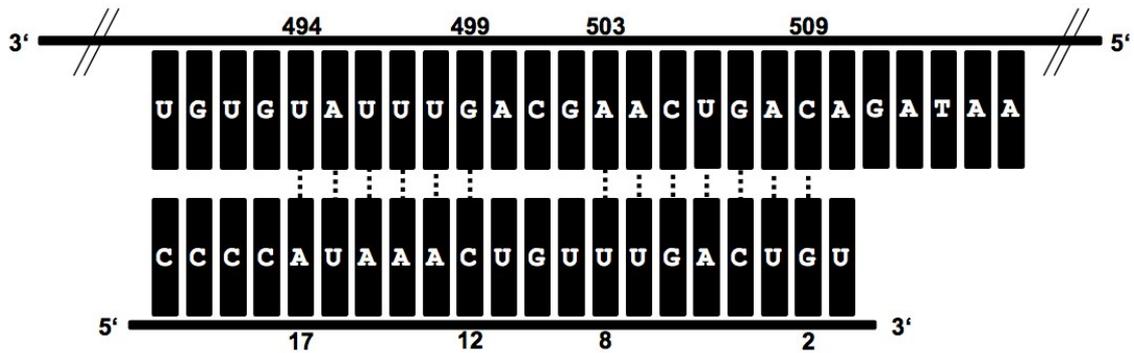
der PMCA1 und einer Wiederholung der durchgeführten Experimente überprüft werden.

## 2. Zusätzliche Paarung der Nukleotide 12-17 der miRNA an der 3'-UTR der mRNA.

miRNAs, die neben der Basenpaarung im *seed match* zusätzlich mit ihren Nukleotiden 12-17 noch komplementäre Basenpaarungen mit der 3'-UTR der Ziel-mRNA eingehen konnten, waren signifikant erfolgreicher in der Herabregulation. Dabei war es wichtig, dass die zusätzliche 3'-Paarungen von den Nukleotiden 12-17 (oder noch besser 13-16) der miRNA ausgingen; abseits dieser Positionen hatte eine zusätzliche Paarung eine eher die Repression schwächenden Einfluss. Als Erklärung für diesen Effekt spekulieren die Autoren, dass die Geschwindigkeit der Dissoziation des gebundenen miRISC durch die zusätzliche Bindung verlangsamt werden könnte. Darüber hinaus vermuten sie, dass es pro miRNA-Familie und allen ihrer kanonischen Bindungsstellen (*6-8mer*) nur zwei zusätzliche 3'-Paarungen gibt.

Beide *seed matches* der 3'-UTR der RhoB gehen noch weitere Basenpaarungen in Richtung ihres 5'-Endes mit der miR-223 ein: 3 bp an Positionen 1303-1305 der 3'-UTR mit 13-15 und sogar 5 bp an Positionen 638-642 der 3'-UTR mit 12-16 der miR-223. In der 3'-UTR der PMCA1 befindet sich lediglich eine zur Nukleinbase 12 der miR-223 (Cytosin) komplementäre Base an Position 499 (Guanin).

Somit erscheint auch dieses Kriterium für die fehlende miR-223/PMCA1-Interaktion wichtig zu sein und könnte durch die Einklonierung einer zusätzlichen komplementären Basensequenz zu den Basen 12-17 der miR-223 (CAAAUA) an Positionen 494-499 der 3'-UTR der PMCA1 untersucht werden. Somit wäre Sequenz der modifizierten 3'-UTR der Positionen 494-509 der 3'-UTR: ...UAUUUGACGAACUGAC... (grau unterlegt das ursprüngliche *seed match*; siehe auch Abbildung 12). Mit dieser Modifikation bzw. dem erfüllten Kriterium wäre in einer Wiederholung der experimentellen Schritte eine (stärkere) Interaktion zwischen miR-223 und PMCA1 zu erwarten.



**Abb. 12: Vorgeschlagene modifizierte Sequenz der 3'-UTR der PMCA1.** Mit dieser Modifikation bieten sich der miR-223 (untere Sequenz) zwei verschiedene Bindungsstellen in der 3'-UTR der PMCA1 (obere Sequenz) an: neben der bekannten Bindungsstelle von Position 2-8 (Position 503-509 der Sequenz der 3'-UTR der PMCA1 entsprechend) eine weitere von Position 12-17 (bzw. Position 494-499). Gemäß den vorgestellten Kriterien für eine erfolgreiche miRNA-mRNA-Interaktion wäre mit dieser Modifikation ein stärkerer Einfluss der miR-223 auf diese veränderte 3'-UTR der PMCA1 zu erwarten.

### 3. Menge von AU-reichen Basen in der Nähe des seed matches.

*Seed matches* oder Bindungsstellen in der 3'-UTR der mRNAs, in deren unmittelbaren Umgebung eine hohe Zahl von Adenin (A) oder Uracil (U) als Nukleinbasen (bzw. Adenosin oder Uridin als Nukleoside) als AU-reiche Elemente vorhanden waren, wurden signifikant häufiger von korrespondierenden miRNAs reprimiert. Die Autoren vermuten, dass durch den AU-Reichtum um die Bindungsstelle herum die Sekundärstruktur der mRNA instabiler werden könnte und somit der Zugang der miRNA an die Bindungsstelle der mRNA verbessert werden könnte.

Beim Vergleich der *seed matches* der miR-223 zwischen RhoB und PMCA1 fällt auf, dass im Gegensatz zu RhoB in der 3'-UTR der PMCA1 weder *upstream* noch *downstream* (in Richtung des 3'-Endes) *ARE* vorhanden sind (Sequenz siehe Anhang). Die *8mer*-Bindungsstelle der miR-223 an der 3'-UTR der RhoB besitzt sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung mehrere *ARE*-Bereiche. Diese trugen in den Untersuchungen von Sun et al. auch stärker zu der Gesamt-repression von RhoB durch miR-223 bei (Sun et al. 2010).

Somit ist auch dieses Kriterium bei der miR-223/PMCA1-Interaktion nicht erfüllt. Ihre Relevanz könnte durch die Einklonierung von AU-reichen Elementen in 3'- und 5'-Richtung der 3'-UTR der PMCA1 und erneuter Überprüfung der Interaktion verifiziert werden.

4. Position der Bindungsstelle mindestens 15 Nukleotide entfernt vom Stopp-Codon.

3'-UTR-Bindungsstellen für miRNAs, die sich näher als 15 Nukleotide vom Stopp-Codon befinden, waren signifikant seltener in der Lage, durch eine miRNA-Interaktion die mRNA zu beeinflussen. Dies erklären Grimson et al. dadurch, dass mRNAs die Ribosomen mit ca. 15 Nukleotiden abwärts vom Stopp-Codon betreten und die Ribosomen jeden miRISC von der mRNA trennen würden.

Alle *seed matches* der 3'-UTR der RhoB und der PMCA1 befinden sich mehrere Hundert Basenpaare vom Stopp-Codon entfernt, weshalb dieses Kriterium als mögliche Ursache für die fehlende miR-223/PMCA1-Interaktion als irrelevant einzustufen ist; eine in diese Richtung gehende Modifikation der durchgeführten Experimente scheint nicht sinnvoll zu sein.

5. Position der Bindungsstelle an beiden Enden der 3'-UTR.

miRNAs konnten mRNAs stärker reprimieren, wenn sich ihre Bindungsstellen nicht in der Mitte, sondern eher an beiden Enden der 3'-UTR der mRNA befand. Die Autoren nehmen an, dass dies durch einen einfacheren Zugang der miRNA an die Bindungsstelle zustande kommen könnte, da die mittleren Regionen von besonders langen 3'-UTR-Sequenzen Interaktionen mit Ribosomen von einer Seite oder den Proteinen eingehen können, die auf der anderen Seite mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA verbunden sind. Darüber hinaus könnte eine größere Nähe des miRISC an die Ribosomen dessen Proteintranslation der Ziel-mRNA effektiver unterdrücken.

Dieses Kriterium kann nicht allein den Unterschied der miR-223-Interaktion zwischen RhoB- bzw. PMCA1-3'-UTR erklären, da die Bindungsstelle in der 3'-UTR der PMCA1 in den ersten 500 von insgesamt ca. 3500 Basen liegt. Interessanterweise kann es aber eine Rolle spielen in der Erklärung des

Repressionsunterschieds zwischen beiden Bindungsstellen der miR-223 in der 3'-UTR der RhoB: das erste *seed match* liegt etwa genau in der Mitte der 3'-UTR (ab Position 644 von insgesamt ca. 1400 Basenpaaren) und eine miR-223-Interaktion hier führt zu einer schwächeren Repression von RhoB als eine Bindung der miR-223 an die Bindungsstelle, die sich ca. 600 Basenpaare weiter *downstream* befindet. Sun et al. konnten jedoch auch nachweisen, dass nicht die absolute Position der Bindungsstelle in der 3'-UTR der mRNA per se, sondern die Anzahl von ARE-Bereichen entscheidend waren, in dem sie vor die „mittig“ gelegene, graduell zu schwächerer Repression führende Bindungsstelle die *upstream*-Sequenz der zu einer stärkeren Repression führenden Bindungsstelle inklonierten und der Unterschied in der Repression aufgehoben wurde (Sun et al. 2010). Folglich ist wahrscheinlich nicht die absolute Position allein, sondern tatsächlich der Reichtum an ARE für eine effektive miRNA-mRNA-Interaktion essentiell.

Nichtsdestotrotz könnte die Anwendbarkeit dieses Kriteriums durch die Verschiebung der Bindungsstelle der miR-223 in der 3'-UTR der PMCA1 von Positionen 503-509 der Originalsequenz in Richtung der 5'- und 3'-Enden der Sequenz überprüft werden. Auch hier müsste allerdings der Mindestabstand von 15 Basen zum Stopp-Codon beachtet werden (siehe Kriterium 4).

#### *context+ score*

Diese und andere Kriterien drücken sich letztlich auch in dem von Garcia et al. vorgestellten *context+ score* für putative *seed matches* zwischen miRNAs und Ziel-mRNAs aus (Garcia et al. 2011), der mithilfe mathematischer Algorithmen berechnet werden kann und z.B. von *TargetScan.org* (*Whitehead Institute for Biomedical Research*; Lewis et al. 2003) ausgegeben wird: der *context+ score* für das *seed match* zwischen 3'-UTR der PMCA1 und miR-223 beträgt -0,13; die Werte für die Bindungsstellen zwischen 3'-UTR der RhoB und miR-223 betragen -0,44 und -0,11 (dabei ist der Wert umgekehrt proportional zu der vorhergesagten effektiven Interaktion zwischen miRNA und Ziel-mRNA bzw. folgender Repression der mRNA durch die miRNA; tabellarische Gegenüberstellung der *context+ scores* sowie weiterer Parameter von RhoB und PMCA1 mit miR-223 im Anhang).

### *Ausblick*

Zusammenfassend kann für den Vergleich der miR-223-*seed matches* in den 3'-UTR der PMCA1 und von RhoB konstatiert werden, dass die nicht messbare Repression der PMCA1 vor allem durch das Fehlen von ARE um die Bindungsstelle herum sowie das Fehlen von zusätzlichen komplementären Basenpaarungen außerhalb des *seed match* bedingt gewesen sein kann.

Die vorgestellten Modifizierungen der Versuchsbedingungen (hier im Wesentlichen die Modifikation der Sequenz der 3'-UTR gemäß der vorgestellten Kriterien) könnten experimentell zu einer verstärkten miR-223/PMCA1-Interaktion führen, würden aber dennoch nicht erklären, warum mit den Originalsequenzen nicht die nachgewiesene miR-223/PMCA1-Interaktion (miR-223-*knock out* mit vermehrter Expression der PMCA1 in der Massenspektrometriemessung, Baek et al. 2008) repliziert werden kann. Möglicherweise führen aber auch der miR-223 oder der PMCA1 jeweils zugehörige, vom vermeintlichen Interaktionspartner unabhängige Einflüsse und Mechanismen zu dem fehlenden Nachweis einer direkten miR-223/PMCA1-Interaktion. Hier erscheint eine weitere experimentelle Überprüfung als äußerst aufwendig, wenn gleich nicht sinnvoll realisierbar.

Theoretisch denkbar ist auch, dass die robust erscheinende, aber mit ca. 1,6-fach knapp oberhalb der von den Autoren der Originalarbeit festgelegten Schwelle von 1,5-fach liegende vermehrte Expression von PMCA1 (bzw. dem proprietären Gen *Atp2b1*) in neutrophilen Granulozyten der miR-223-KO-Mäuse im Umkehrschluss nicht alleine die Annahme eines monokausalen Einflusses der miR-223 auf die PMCA1 rechtfertigt und in Wiederholung der Originalexperimente (auch mit Einbeziehung anderer Spezies) bestätigt werden müsste.

Konsequenterweise müssten so in einer Replizierung aller Experimente nicht mehr zu eruierende, konfundierende Einflüsse ausgeschlossen werden; somit sind auch hier weiterführende Untersuchungen notwendig, damit für die fehlende Interaktion zwischen miR-223 und PMCA1 die aufgeführten Erklärungen überprüft und geltend gemacht werden können.

## 6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Rolle von miRNAs bei myokardialer Ischämie ist von enormer Bedeutung, auch wenn viele miRNAs unterschiedlich im Myokard bei chronischer oder akuter Ischämie reguliert werden. Einige wenige miRNAs (wie die miR-1, miR-21 oder miR-29) scheinen nicht nur hinsichtlich ihrer Expression auf das myokardiale Ischämiegeschehen zu reagieren, sondern wurden bereits über mögliche Zielgene und -interaktionen als wichtige funktionelle miRNAs beschrieben. Auch im Rahmen einer IPC oder RIPC werden miRNAs differentiell exprimiert und nehmen somit einen Einfluss auf die Expression von möglichen Zielgenen. Diese können protektiv auf das Myokard einwirkend sein, in anderen Fällen jedoch können sie auch eine der intrazellulären Kaskaden initiieren, die schließlich über die Apoptose des Kardiomyozyten zum Infarkt beitragen. Im Rahmen einer IPC oder RIPC wurden auch direkte antiapoptotische Effekte beschrieben, die größtenteils zum Erhalt der intrazellulären Calcium-Homöostase führten, das Überleben des Kardiomyozyten sicherten und letztlich zu geringeren Infarktgrößen führten.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die miR-223 im Infarktgeschehen signifikant hochreguliert bzw. stärker exprimiert wird. Diese Hochregulation war bei IPC oder RIPC graduell geringer, so dass bei der Vermittlung des kardioprotektiven Effektes nach IPC oder RIPC eine Herabregulation der miR-223 eine Rolle spielen könnte. Ob dieser Zusammenhang korrekt und kausal oder alleine durch eine neutrophiläre Invasion des entzündeten Gewebes bedingt ist, muss in weiterführenden Experimenten noch untersucht werden.

Eine aus Voruntersuchungen erwartete Interaktion der miR-223 mit einem Zielprotein, der PMCA1 konnte hier experimentell nicht bestätigt werden, obwohl miR-223 und 3'-UTR der PMCA1 eine perfekte komplementäre Bindungsstelle besitzen. Möglicherweise ist das Fehlen von AU-reichen Elementen um die Bindungsstelle sowie das Fehlen von zusätzlichen komplementären Basenpaarungen außerhalb der Bindungsstelle verantwortlich für die fehlende Wechselwirkung. Auch hier müssten weitere Experimente überprüfen, ob die fehlende Interaktion im Luciferase Assay replizierbar ist, Modifikationen der Bindungsstelle zu einer effektiven Herunterregulation des Zielproteins führen und die PMCA1 tatsächlich ein Zielprotein der miR-223 darstellt.

## LITERATURVERZEICHNIS

Ambros, V., **2001**. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107(7), pp.823–826.

Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., & Bartel, D.P., **2008**. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), pp.64–71.

Bartel, D.P., **2004**. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), pp.281–97.

Bartel, D.P., **2009**. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), pp.215–33.

Bell, R.M. & Yellon, D.M., **2012**. Conditioning the whole heart--not just the cardiomyocyte. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 53(1), pp.24–32.

Bernstein, E., Caudy, a a, Hammond, S.M., & Hannon, G.J., **2001**. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), pp.363–6.

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M. a, Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A. a, Elledge, S.J., Anderson, K. V, & Hannon, G.J., **2003**. Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics*, 35(3), pp.215–7.

Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., & Sander, C., **2008**. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic acids research*, 36(Database issue), pp.D149-53.

Bissels, U., Bosio, A., & Wagner, W., **2012**. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica*, 97(2), pp.160–7.

Bolli, R., **2000**. The late phase of preconditioning. *Circulation research*, 87(11), pp.972–83.

Bonauer, 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., Zeiher, A.M., & Dimmeler, S., **2009**. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*, 324(5935), pp.1710–1713.

Brandenburger, T., Grievink, H., Heinen, N., Barthel, F., Huhn, R., Stachuletz, F., Kohns, M., Pannen, B., & Bauer, I., **2014**. Effects of remote ischemic preconditioning and myocardial ischemia on microRNA-1 expression in the rat heart in vivo. *Shock (Augusta, Ga.)*, 42(3), pp.234–8.

Brini, M. & Carafoli, E., **2009**. Calcium pumps in health and disease. *Physiological reviews*, 89(79), pp.1341–1378.

Brow, D.A. & Guthrie, C., **1988**. Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature*, 334(6179), pp.213–8.

Chen, C.-Z.Z., Li, L., Lodish, H.F., & Bartel, D.P., **2004**. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), pp.83–6.

Chen, P.-S., Su, J.-L., & Hung, M.-C., **2012**. Dysregulation of MicroRNAs in cancer. *Journal of biomedical science*, 19(1), p.90.

Chen, Q., Wang, H., Liu, Y., Song, Y., Lai, L., Han, Q., Cao, X., & Wang, Q., **2012**. Inducible MicroRNA-223 Down-Regulation Promotes TLR-Triggered IL-6 and IL-1 $\beta$  Production in Macrophages by Targeting STAT3 J. P. B. Viola, ed. *PLoS ONE*, 7(8), p.e42971.

Cheng, Y., Zhu, P., Yang, J., Liu, X., Dong, S., Wang, X., Chun, B., Zhuang, J., & Zhang, C., **2010**. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against

ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovascular research*, 87(3), pp.431–9.

Corsten, M.F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D.R., Staessen, J. a, Heymans, S., & Schroen, B., **2010**. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation Cardiovascular genetics*, 3(6), pp.499–506.

Creemers, E.E., Tijssen, A.J., & Pinto, Y.M., **2012**. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation research*, 110(3), pp.483–95.

Das, M. & Das, D.K., **2008**. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB life*, 60(4), pp.199–203.

Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H. a, Ketting, R.F., & Hannon, G.J., **2004**. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), pp.231–5.

Devaux, Y., Mueller, M., Haaf, P., Goretti, E., Twerenbold, R., Zangrando, J., Vausort, M., Reichlin, T., Wildi, K., Moehring, B., Wagner, D.R., & Mueller, C., **2015**. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. *Journal of Internal Medicine*, 277(2), pp.260–271.

Didiano, D. & Hobert, O., **2006**. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nature structural & molecular biology*, 13(9), pp.849–51.

Dong, S., Cheng, Y., Yang, J., Li, J., Liu, X., Wang, X., Wang, D., Krall, T.J., Delphin, E.S., & Zhang, C., **2009**. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *The Journal of biological chemistry*, 284(43), pp.29514–25.

Dorn, G.W., **2011**. MicroRNAs in cardiac disease. *Translational Research*, 157(4), pp.226–235.

Dorn II, G.W., **2010**. Therapeutic potential of microRNAs in heart failure. *Current cardiology reports*, 12(3), pp.209–15.

Dreyer, W.J., Michael, L.H., West, M.S., Smith, C.W., Rothlein, R., Rossen, R.D., Anderson, D.C., & Entman, M.L., **1991**. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation*, 84(1), pp.400–411.

Duan, X., Ji, B., Wang, X., Liu, J., Zheng, Z., Long, C., Tang, Y., & Hu, S., **2012**. Expression of MicroRNA-1 and MicroRNA-21 in Different Protocols of Ischemic Conditioning in an Isolated Rat Heart Model. *Cardiology*, 122(1), pp.36–43.

Fichtlscherer, S., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., & Sessa, W.C., **2011**. Circulating MicroRNAs: Biomarkers or Mediators of Cardiovascular Diseases? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(11), pp.2383–2390.

Frangogiannis, N.G., Smith, C.W., & Entman, M.L., **2002**. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular research*, 53(1), pp.31–47.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., & Bartel, D.P., **2008**. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), pp.92–105.

Fröhlich, G.M., Meier, P., White, S.K., Yellon, D.M., & Hausenloy, D.J., **2013**. Myocardial reperfusion injury: Looking beyond primary PCI. *European Heart Journal*, 34(23), pp.1714–1724.

Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M. a, Hertzog, P.J., Mackay, F., & Williams, B.R.G., **2011**. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic acids research*,

39(13), pp.5692–703.

Garcia, D.M., Baek, D., Shin, C., Bell, G.W., Grimson, A., & Bartel, D.P., **2011**. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 18(10), pp.1139–46.

Gerber, B.L., **2007**. Risk area, infarct size, and the exposure of the wavefront phenomenon of myocardial necrosis in humans. *European heart journal*, 28(14), pp.1670–2.

Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z., & Zamore, P.D., **2010**. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA\* strands into the RNA interference pathway. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(1), pp.43–56.

Giacomello, M., De Mario, A., Scarlatti, C., Primerano, S., & Carafoli, E., **2013**. Plasma membrane calcium ATPases and related disorders. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(3), pp.753–62.

Giricz, Z., Varga, Z. V., Baranyai, T., Sipos, P., Pálóczi, K., Kittel, Á., Buzás, E.I., & Ferdinandy, P., **2014**. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 68, pp.75–8.

Greco, S., De Simone, M., Colussi, C., Zaccagnini, G., Fasanaro, P., Pescatori, M., Cardani, R., Perbellini, R., Isaia, E., Sale, P., Meola, G., Capogrossi, M.C., Gaetano, C., & Martelli, F., **2009**. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(10), pp.3335–46.

Greer, L.F. & Szalay, A.A., **2002**. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*, 17(1), pp.43–74.

Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., & Bartel, D.P., **2007**. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*, 27(1), pp.91–105.

Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., & Bartel, D.P., **2010**. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), pp.835–40.

Guo, L. & Lu, Z., **2010**. The fate of miRNA\* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PloS one*, 5(6), p.e11387.

Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A., & Filipowicz, W., **2005**. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO reports*, 6(10), pp.961–7.

Hager, W., Spies, K., & Heise, E., **2001**. *Versuchsdurchführung und Versuchsbericht* 2nd ed., Göttingen: Hogrefe Verlag.

Harwood, A.J., **1996**. The rapid boiling method for small-scale preparation of plasmid DNA. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 58, pp.265–7.

Hausenloy, D.J., Candilio, L., Evans, R., Ariti, C., Jenkins, D.P., Kolvekar, S., Knight, R., Kunst, G., Laing, C., Nicholas, J., Pepper, J., Robertson, S., Xenou, M., Clayton, T., Yellon, D.M., & ERICCA Trial Investigators, **2015**. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *The New England journal of medicine*, 373(15), pp.1408–1417.

Hausenloy, D.J. & Yellon, D.M., **2008**. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovascular research*, 79(3), pp.377–86.

Hausenloy, D.J. & Yellon, D.M., **2011**. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nature reviews. Cardiology*, 8(11), pp.619–29.

He, B., Xiao, J., Ren, A.-J., Zhang, Y.-F., Zhang, H., Chen, M., Xie, B., Gao, X.-G., & Wang, Y.-W., **2011**. Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. *Journal of biomedical science*, 18(1), p.22.

He, L. & Hannon, G.J., **2004**. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*, 5(7), pp.522–31.

Heid, C. a, Stevens, J., Livak, K.J., & Williams, P.M., **1996**. Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), pp.986–994.

Heinen, N.M., Pütz, V.E., Görgens, J.I., Huhn, R., Grüber, Y., Barthuber, C., Preckel, B., Pannen, B.H., & Bauer, I., **2011**. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits a signaling pattern different from local ischemic preconditioning. *Shock (Augusta, Ga.)*, 36(1), pp.45–53.

Heusch, G., **2012**. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet*, 6736(12), pp.1–10.

Heusch, G. & Gersh, B.J., **2016**. ERICCA and RIPHeart: two nails in the coffin for cardioprotection by remote ischemic conditioning? Probably not! *European heart journal*, 37(2), pp.200–2.

Hoekstra, M., van der Lans, C. a C., Halvorsen, B., Gullestad, L., Kuiper, J., Aukrust, P., van Berkel, T.J.C., & Biessen, E. a L., **2010**. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(3), pp.792–7.

Hu, S., Huang, M., Li, Z., Jia, F., Ghosh, Z., Lijkwan, M. a, Fasanaro, P., Sun, N., Wang, X., Martelli, F., Robbins, R.C., & Wu, J.C., **2010**. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation*, 122(11 Suppl), pp.S124-31.

Huang, W., Tian, S.-S., Hang, P.-Z., Sun, C., Guo, J., & Du, Z.-M., **2016**. Combination of microRNA-21 and microRNA-146a Attenuates Cardiac Dysfunction and Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in Mice. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 5(3), p.e296.

Ikedo, S., Kong, S.W., Lu, J., Bisping, E., Zhang, H., Allen, P.D., Golub, T.R., Pieske, B., & Pu, W.T., **2007**. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological genomics*, 31(3), pp.367–73.

Ivey, K.N., Muth, A., Arnold, J., King, F.W., Yeh, R.-F., Fish, J.E., Hsiao, E.C., Schwartz, R.J., Conklin, B.R., Bernstein, H.S., & Srivastava, D., **2008**. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 2(3), pp.219–29.

Jiang, Q., Wang, Y., Hao, Y., Juan, L., Teng, M., Zhang, X., Li, M., Wang, G., & Liu, Y., **2009**. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), pp.D98-104.

Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummelkamp, T.R., Fleming, M.D., & Camargo, F.D., **2008**. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 451(7182), pp.1125–9.

Karakas, M., Schulte, C., Appelbaum, S., Ojeda, F., Lackner, K.J., Münzel, T., Schnabel, R.B., Blankenberg, S., & Zeller, T., **2016**. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease—results from the large AtheroGene study. *European heart journal*.

Kawamata, T. & Tomari, Y., **2010**. Making RISC. *Trends in biochemical sciences*, 35(7), pp.368–76.

Kharbanda, R.K., Nielsen, T.T., & Redington, A.N., **2009**. Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice. *Lancet*, 374(9700), pp.1557–65.

Kim, V.N. & Nam, J.-W., **2006**. Genomics of microRNA. *Trends in genetics : TIG*, 22(3), pp.165–73.

Kloner, R.A., Shook, T., Przyklenk, K., Davis, V.G., Junio, L., Matthews, R. V, Burstein, S., Gibson, C.M., Poole, W.K., Cannon, C.P., McCabe, C.H., & Braunwald, E., **1995**. Previous Angina Alters In-Hospital Outcome in TIMI 4. *Circulation*, 91(1), p.37 LP-45.

Kottenberg, E., Thielmann, M., Bergmann, L., Heine, T., Jakob, H., Heusch, G., & Peters, J., **2012**. Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol - a clinical trial. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 56(1), pp.30–8.

Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S., **2011**. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), pp.D152-7.

Krijnen, P. a J., Nijmeijer, R., Meijer, C.J.L.M., Visser, C. a, Hack, C.E., & Niessen, H.W.M., **2002**. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *Journal of clinical pathology*, 55(11), pp.801–11.

Kukreja, R., Yin, C., & Salloum, F., **2011**. MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection. *Molecular Pharmacology*, 80(4), pp.558–564.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T., **2002**. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB*, 12(9), pp.735–9.

Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V., **2004**. A short history of a short RNA. *Cell*, S116(2 Suppl), pp.S89–S92.

Lewis, B.P., Burge, C.B., & Bartel, D.P., **2005**. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*,

120(1), pp.15–20.

Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., & Burge, C.B., **2003**. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7), pp.787–98.

Li, B., Tao, Y., & Huang, Q., **2015**. Effect and mechanism of miR-126 in myocardial ischemia reperfusion. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), pp.18990–18998.

Li, J., Rohailla, S., Gelber, N., Rutka, J., Sabah, N., Gladstone, R.A., Wei, C., Hu, P., Kharbanda, R.K., & Redington, A.N., **2014**. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 109(5).

Lim, S.Y., Yellon, D.M., & Hausenloy, D.J., **2010**. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 105(5), pp.651–655.

Liu, J., Githinji, J., Mclaughlin, B., Wilczek, K., & Nolta, J., **2012**. Role of miRNAs in neuronal differentiation from human embryonic stem cell-derived neural stem cells. *Stem cell reviews*, 8(4), pp.1129–37.

Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., & Golub, T.R., **2005**. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), pp.834–838.

Lu, Y., Zhang, Y., Shan, H., Pan, Z., Li, X., Li, B., Xu, C., Zhang, B., Zhang, F., Dong, D., Song, W., Qiao, G., & Yang, B., **2009**. MicroRNA-1 downregulation by propranolol in a rat model of myocardial infarction: a new mechanism for ischaemic cardioprotection. *Cardiovascular research*, 84(3), pp.434–41.

Lucchinetti, E., Bestmann, L., Feng, J., Freidank, H., Clanachan, A.S., Finegan, B.A., & Zaugg, M., **2012**. Remote ischemic preconditioning applied during isoflurane

inhalation provides no benefit to the myocardium of patients undergoing on-pump coronary artery bypass graft surgery: lack of synergy or evidence of antagonism in cardioprotection? *Anesthesiology*, 116(2), pp.296–310.

Luo, X., Lin, H., Pan, Z., Xiao, J., Zhang, Y., Lu, Y., Yang, B., & Wang, Z., **2008**. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *The Journal of biological chemistry*, 283(29), pp.20045–52.

MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V, & Doudna, J. a, **2008**. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), pp.512–7.

Maes, O.C., Chertkow, H.M., Wang, E., & Schipper, H.M., **2009**. MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Current genomics*, 10(3), pp.154–68.

Mann, D.L. & Bristow, M.R., **2005**. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*, 111(21), pp.2837–49.

Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M., & Yellon, D.M., **1993**. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 88(3), pp.1264–1272.

Meybohm, P., Bein, B., Brosteanu, O., Cremer, J., Gruenewald, M., Stoppe, C., Coburn, M., Schaelte, G., Böning, A., Niemann, B., Roesner, J., Kletzin, F., Strouhal, U., Reyher, C., Laufenberg-Feldmann, R., Ferner, M., Brandes, I.F., Bauer, M., Stehr, S.N., Kortgen, A., Wittmann, M., Baumgarten, G., Meyer-Treschan, T., Kienbaum, P., Heringlake, M., Schön, J., Sander, M., Treskatsch, S., Smul, T., Wolwender, E., Schilling, T., Fuernau, G., Hasenclever, D., Zacharowski, K., & RIPHeart Study Collaborators, **2015**. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *The New England journal of medicine*, 373(15), pp.1397–407.

Mo, M.-H., Chen, L., Fu, Y., Wang, W., & Fu, S.W., **2012**. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *Journal of Cancer*, 3, pp.432–48.

Morozova, N., Zinovyev, A., Nonne, N., Pritchard, L.-L., Gorban, A.N., & Harel-Bellan, A., **2012**. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(9), pp.1635–55.

Murry, C.E., Jennings, R.B., & Reimer, K.A., **1986**. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), pp.1124–1136.

Oerlemans, M.I.F.J., Mosterd, A., Dekker, M.S., de Vrey, E. a, van Mil, A., Pasterkamp, G., Doevendans, P. a, Hoes, A.W., & Sluijter, J.P.G., **2012**. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO molecular medicine*, 4(11), pp.1176–85.

Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., & Lai, E.C., **2007**. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), pp.89–100.

Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., & Lai, E.C., **2008**. The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nature structural & molecular biology*, 15(4), pp.354–63.

Okunade, G.W., Miller, M.L., Pyne, G.J., Sutliff, R.L., O'Connor, K.T., Neumann, J.C., Andringa, A., Miller, D. a, Prasad, V., Doetschman, T., Paul, R.J., & Shull, G.E., **2004**. Targeted ablation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *The Journal of biological chemistry*, 279(32), pp.33742–50.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P., **2003**. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), pp.552–65.

Pászty, K., Antalffy, G., Hegedüs, L., Padányi, R., Penheiter, A.R., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., & Enyedi, A., **2007**. Cleavage of the plasma membrane Ca<sup>+</sup>ATPase during apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099, pp.440–50.

Pászty, K., Verma, A.K., Padányi, R., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., & Enyedi, A., **2002**. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 277(9), pp.6822–9.

Place, R.F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E.J., & Dahiya, R., **2008**. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), pp.1608–13.

Pratt, A.J. & MacRae, I.J., **2009**. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of biological chemistry*, 284(27), pp.17897–901.

Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R.A., & Whittaker, P., **1993**. Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87(3), pp.893–899.

Rassaf, T., Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U.B., Shiva, S., Heusch, G., & Kelm, M., **2014**. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circulation Research*, 114(10), pp.1601–1610.

Redfors, B., Shao, Y., & Omerovic, E., **2012**. Myocardial infarct size and area at risk assessment in mice. *Experimental and Clinical Cardiology*, 17(4), pp.268–272.

Renz-Polster, H. & Krautzig, S. eds., **2008**. Koronare Herzkrankheit / Akutes Koronarsyndrom. In *Basislehrbuch Innere Medizin*. München: Elsevier, pp. 63–86.

van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J. a, & Olson, E.N., **2008**. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(35), pp.13027–13032.

Ruby, J.G., Jan, C.H., & Bartel, D.P., **2007**. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), pp.83–6.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., & Erlich, H. a, **1988**. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), pp.487–491.

Saito, Y. & Saito, H., **2012**. MicroRNAs in cancers and neurodegenerative disorders. *Frontiers in genetics*, 3(September), p.194.

Sakurai, K., Amarzguioui, M., Kim, D.H., Alluin, J., Heale, B., Song, M.S., Gatignol, A., Behlke, M.A., & Rossi, J.J., **2011**. A role for human Dicer in pre-RISC loading of siRNAs. *Nucleic Acids Research*, 39(4), pp.1510–1525.

Salloum, F.N., Yin, C., & Kukreja, R.C., **2010**. Role of microRNAs in cardiac preconditioning. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 56(6), pp.581–8.

Schmittgen, T.D. & Livak, K.J., **2008**. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), pp.1101–1108.

Schwab, B.L., Guerini, D., Didszun, C., Bano, D., Ferrando-May, E., Fava, E., Tam, J., Xu, D., Xanthoudakis, S., Nicholson, D.W., Carafoli, E., & Nicotera, P., **2002**. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell death and differentiation*, 9(8), pp.818–31.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P.D., **2003**. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), pp.199–208.

Shimizu, M., Tropak, M., Diaz, R.J., Suto, F., Surendra, H., Kuzmin, E., Li, J., Gross, G., Wilson, G.J., Callahan, J., & Redington, A.N., **2009**. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clinical science (London, England: 1979)*, 117(5), pp.191–200.

Silvestri, P., Di Russo, C., Rigattieri, S., Fedele, S., Todaro, D., Ferraiuolo, G., Altamura, G., & Loschiavo, P., **2009**. MicroRNAs and ischemic heart disease: towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic targets. *Recent patents on cardiovascular drug discovery*, 4(2), pp.109–18.

Singh, S.K., Pal Bhadra, M., Girschick, H.J., & Bhadra, U., **2008**. MicroRNAs--micro in size but macro in function. *The FEBS journal*, 275(20), pp.4929–44.

Sonnemans, D.G.P., de Windt, L.J., de Muinck, E.D., & Doevendans, P. a., **2002**. Methods in molecular cardiology: the polymerase chain reaction. *Netherlands Heart Journal*, 10(10), pp.412–418.

Starega-Roslan, J., Koscianska, E., Kozlowski, P., & Krzyzosiak, W.J., **2011**. The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(17), pp.2859–71.

Statistisches Bundesamt (Destatis), **2017**. *Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2015*, Wiesbaden.

URL:

<https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf>

(zuletzt abgerufen am 10.04.2017)

Stoppe, C., Meybohm, P., & Goetzenich, A., **2016**. Remote Ischaemic Conditioning - Eine Übersicht. *AINS - Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie*, 51(10), pp.596–603.

Strehler, E.E., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., & Caride, A.J., **2007**. Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 5), pp.919–22.

Sun, G., Li, H., & Rossi, J.J., **2010**. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic acids research*, 38(1), pp.239–52.

Tony, H., Meng, K., Wu, B., Yu, A., Zeng, Q., Yu, K., & Zhong, Y., **2015**. MicroRNA-208a Dysregulates Apoptosis Genes Expression and Promotes Cardiomyocyte Apoptosis during Ischemia and Its Silencing Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Mediators of Inflammation*, 2015, pp.1–11.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., & Rozen, S.G., **2012**. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), pp.1–12.

Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. a, **2007**. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), pp.1931–4.

Voellenkle, C., van Rooij, J., Cappuzzello, C., Greco, S., Arcelli, D., Di Vito, L., Melillo, G., Rigolini, R., Costa, E., Crea, F., Capogrossi, M.C., Napolitano, M., & Martelli, F., **2010**. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiological genomics*, 42(3), pp.420–6.

Vogel, B., Keller, A., Frese, K.S., Kloos, W., Kayvanpour, E., Sedaghat-Hamedani, F., Hassel, S., Marquart, S., Beier, M., Giannitis, E., Hardt, S., Katus, H. a, & Meder, B., **2013**. Refining diagnostic microRNA signatures by whole-miRNome kinetic analysis in acute myocardial infarction. *Clinical chemistry*, 59(2), pp.410–8.

Wang, S., Aurora, A.B., Johnson, B.A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. a, Richardson, J. a, Bassel-Duby, R., & Olson, E.N., **2008**. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental cell*, 15(2), pp.261–71.

Weiss, J.B., Eisenhardt, S.U., Stark, G.B., Bode, C., Moser, M., & Grundmann, S., **2012**. MicroRNAs in ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 2(3), pp.237–47.

Wienholds, E. & Plasterk, R.H., **2005**. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*, 579(26), pp.5911–5922.

World Health Organization (WHO), **2016**. *World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*, Geneva, Switzerland.

URL:

[http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2016/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/)  
(zuletzt abgerufen am 10.04.2017)

Xu, C., Lu, Y., Pan, Z., Chu, W., Luo, X., Lin, H., Xiao, J., Shan, H., Wang, Z., & Yang, B., **2007**. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *Journal of cell science*, 120(Pt 17), pp.3045–52.

Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., Chen, G., & Wang, Z., **2007**. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature medicine*, 13(4), pp.486–91.

Yang, J., Chen, L., Ding, J., Zhang, J., Fan, Z., Yang, C., Yu, Q., & Yang, J., **2016**. Cardioprotective effect of miRNA-22 on hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte injury in neonatal rats. *Gene*, 579(1), pp.17–22.

Ye, Y., Perez-Polo, J.R., Qian, J., & Birnbaum, Y., **2011**. The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury. *Physiological genomics*, 43(10), pp.534–42.

Yellon, D.M. & Hausenloy, D.J., **2007**. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*, 357(11), pp.1121–35.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., & Cullen, B.R., **2003**. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), pp.3011–6.

Yin, C., Salloum, F.N., & Kukreja, R.C., **2009**. A Novel Role of MicroRNA in Late Preconditioning: Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Heat Shock Protein 70. *Circulation Research*, 104(5), pp.572–575.

Yu, C.-H., Xu, C.C.-F., & Li, Y.Y.-M., **2009**. Association of MicroRNA-223 expression with hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Digestive diseases and sciences*, 54(11), pp.2362–2366.

Yu, Z., Li, Y., Fan, H., Liu, Z., & Pestell, R.G., **2012**. miRNAs regulate stem cell self-renewal and differentiation. *Frontiers in genetics*, 3(September), p.191.

Zampetaki, A., Willeit, P., Tilling, L., Drozdov, I., Prokopi, M., Renard, J.-M., Mayr, A., Weger, S., Schett, G., Shah, A., Boulanger, C.M., Willeit, J., Chowienczyk, P.J., Kiechl, S., & Mayr, M., **2012**. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(4), pp.290–9.

Zhai, C., Tang, G., Peng, L., Hu, H., Qian, G., Wang, S., Yao, J., Zhang, X., Fang, Y., Yang, S., & Zhang, X., **2015**. Inhibition of microRNA-1 attenuates hypoxia/re-oxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes by directly targeting Bcl-2 but not GADD45Beta. *American journal of translational research*, 7(10), pp.1952–1962.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W., **2000**. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*, 7(1-2), pp.203-14.

Zhao, Y., Samal, E., & Srivastava, D., **2005**. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436(7048), pp.214-220.

Zile, M.R., Mehurg, S.M., Arroyo, J.E., Stroud, R.E., DeSantis, S.M., & Spinale, F.G., **2011**. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 4(6), pp.614-9.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1:</i> Biogenese der miRNA .....	2
<i>Abb. 2:</i> Das experimentelle Tiermodell von Murry et al. (1986) .....	9
<i>Abb. 3:</i> Das experimentelle Tiermodell.....	23
<i>Abb. 4:</i> Putatives <i>seed match</i> zwischen der 3'-UTR der PMCA und der miR-223 .....	28
<i>Abb. 5:</i> <i>pMIR-Report</i> System zur Einklonierung der 3'-UTR der PMCA1 .....	30
<i>Abb. 6:</i> <i>pcDNA 3.1(+)</i> -Vektor zur Einklonierung der pre-miR-223 .....	31
<i>Abb. 7:</i> Relative Expression der miR-223 der AAR.....	44
<i>Abb. 8:</i> Relative Expression der miR-223 in der non-AAR bzw. bei RIPC.....	45
<i>Abb. 9:</i> miR-223-qPCR mit cDNA aus <i>pcDNA 3.1(+)</i> .....	46
<i>Abb. 10:</i> Gelelektrophorese der PCR mit Primern für 3'-UTR der PMCA1 .....	47
<i>Abb. 11:</i> Vergleich der Gruppen in den Luciferase und $\beta$ -Galactosidase Assays .....	49
<i>Abb. 12:</i> Vorgeschlagene modifizierte Sequenz der 3'-UTR der PMCA1.....	62

### Legende:

Abb. 1: Bearbeitete Abbildung aus *Wikimedia Commons* (URL: [en.wikipedia.org/wiki/microrna](http://en.wikipedia.org/wiki/microrna); zuletzt abgerufen am 08.04.2017).  
Abbildung lizenziert unter *Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported License* zur freien Verwendung und Bearbeitung.

Abb. 5 + 6: Bearbeitete Abbildungen aus Herstellerprotokollen mit freundlicher schriftlicher Genehmigung von *Life Technologies Ltd.*

Sonstige: eigene Abbildungen.

## TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1:</i> Komponenten des RT Master Mix pro Ansatz der RT .....	25
<i>Tabelle 2:</i> Reaktionsansatz der RT .....	25
<i>Tabelle 3:</i> Reaktionsablauf der Reversen Transkription .....	26
<i>Tabelle 4:</i> Reaktionskomponenten pro Ansatz für die quantitative <i>Real-Time</i> PCR..	27
<i>Tabelle 5:</i> Reaktionsablauf der quantitativen <i>Real-Time</i> PCR (40 Zyklen).....	27
<i>Tabelle 6:</i> Vorläufige Primersequenzen für die 3'-UTR der PMCA1 .....	29
<i>Tabelle 7:</i> Vorläufige Primersequenzen für die pre-miR-223.....	29
<i>Tabelle 8:</i> Eigenschaften der gewählten Restriktionsendonukleasen.....	31
<i>Tabelle 9:</i> Modifizierte Primersequenzen für 3'-UTR der PMCA1 und pre-miR-223	32
<i>Tabelle 10:</i> Reaktionskomponenten pro Ansatz der PCR von 3'-UTR der PMCA1 .....	33
<i>Tabelle 11:</i> Reaktionsablauf der PCR von 3'-UTR der PMCA1 (40 Zyklen) .....	33
<i>Tabelle 12:</i> Reaktionsansatz der T4 DNA Ligase-Reaktion .....	35
<i>Tabelle 13:</i> Deskriptive Statistik der miR-223-qPCR .....	43
<i>Tabelle 14:</i> Relative Expression der miR-223 in der AAR .....	44
<i>Tabelle 15:</i> Relative Expression der miR-223 in der non-AAR bzw. bei RIPC .....	45
<i>Tabelle 16:</i> Unterschiede in der Luciferase-Aktivität.....	48

## ANHANG

*Verwendete Sequenz aus der 3'-UTR der rno-PMCA1-mRNA als Insert für PCR und Einklonierungen (175 bp, unterstrichen ist das seed match für miR-223); Kernsequenz aus: Nucleotide Database, Reference Sequence: XM\_006241294.1; National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine)*

GCUUUCUGCCAGACCGAGGGUGCUUUUUUGGGGGUGUGGGAGAGACGAACUGACAGAUAAACAACGGCGCGA  
GUGGCCUGUGGGUCGUCAGUGGUACCUAACCUUGUCCUGACCGUGUACUAGCAGAGCUGUGGUUUUAUCUCAG  
UACUUGAUGGGAGGGAGGGAGGAGUGACGCU

*Komplette Sequenz der rno-pre-miR-223 (110 bp, unterstrichen die darin erhaltene Sequenz der miR-223;; mirBase 20: MI0000963, University of Manchester; Gene ID: 100314060, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine)*

UCUGGCCUUCUGCAGUGUUACGCUCCGUGUAUUUGACAAGCUGAGUUGGACACUCUGUGUGGUAGAGUGUCA  
GUUUGUCAAAUACCCCAAGUGUGGCUCAUGCUUAUCAG

*Komplette Sequenz der rno-miR-223 (21 bp, unterstrichen ist das seed match für die 3'-UTR der PMCA1. mirBase 20: MIMAT0000892, University of Manchester)*

UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC

*Ergebnis der Sequenzierungen der in pMIR-Report einklonierten 3'-UTR der PMCA1*  
(Die obere Sequenz ist die Originalsequenz der ausgewählten 3'-UTR der PMCA1,  
die untere die Sequenz aus der Sequenzierung der Einklonierungen, unterstrichen  
ist das putative *seed match* der miR-223. Durch die Primer wurde U durch T ersetzt.  
*BLASTn; National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of  
Medicine)*

### Sequenzierung mit M13fwd-Primer (forward-Primer)

Übereinstimmung: 173/176 (98%)  
Lücken: 1/176 (0%)  
Strang: +/+

```

1   GCTTTCTGCCAGACCGAGGGTGCTTTTTTGGGGGTGTGGGAGAGACGAACTGACAGATAA 60
   |||
89  GCTTTCTGCCAGACCGAGGGTGCTTTTTTGGGGGTGTGGGAGAGACGAACTGACAGATAA 148

61  ACAACGGCGCGAGTGGCCTGTGGGTCGTCAGTGGTACCTAACCTTGTCTGACCGTGTAC 120
   |||
149 ACAACGGCGCGAGTGGCCTGTGGGTCGTCAGTGGTACCTAACCTTGTCTGACCGTGTAC 208

121 TAGCAGAGCTGTGGTTTATCTCAGTACTTGATGGGAGGGAGGGAGGAG-TGACGCT 175
   |||X|X|X|
209 TAGCAGAGCTGTGGTTTATCTCAGTACTTGATGGGAGGGAGGGAGAAGCTTACGCT 264

```

### Sequenzierung mit M13rv-Primer (reverse-Primer)

Übereinstimmung: 173/176 (98%)  
Lücken: 1/176 (0%)  
Strang: +/-

```

1   GCTTTCTGCCAGACCGAGGGTGCTTTTTTGGGGGTGTGGGAGAGACGAACTGACAGATAA 60
   |||
272 GCTTTCTGCCAGACCGAGGGTGCTTTTTTGGGGGTGTGGGAGAGACGAACTGACAGATAA 213

61  ACAACGGCGCGAGTGGCCTGTGGGTCGTCAGTGGTACCTAACCTTGTCTGACCGTGTAC 120
   |||
212 ACAACGGCGCGAGTGGCCTGTGGGTCGTCAGTGGTACCTAACCTTGTCTGACCGTGTAC 153

121 TAGCAGAGCTGTGGTTTATCTCAGTACTTGATGGGAGGGAGGGAGGAG-TGACGCT 175
   |||X|X|X|
152 TAGCAGAGCTGTGGTTTATCTCAGTACTTGATGGGAGGGAGGGAGAAGCTTACGCT 97

```

*seed match der rno-miR-223 in der 3'-UTR der PMCA1 (Positionen 503-509; TargetScan.org, Whitehead Institute for Biomedical Research)*

```

PMCA1 3'-UTR      5' ...GGUGUGGGAGAGACGAACUGACA...
                    |||||
rno-miR-223      3'   CCCCAUAAACUGUUUGACUGU

```

*1. seed match der rno-miR-223 in der 3'-UTR der RhoB (Positionen 644-649; TargetScan.org, Whitehead Institute for Biomedical Research)*

```

RhoB 3'-UTR      5' ...UGGGAAGACAUUUGC--AACUGACU...
                    |||||  |||||
rno-miR-223      3'   CCCCAUAAACUGUUUGACUGU

```

*2. seed match der rno-miR-223 in der 3'-UTR der RhoB (Positionen 1311-1317; TargetScan.org, Whitehead Institute for Biomedical Research)*

```

RhoB 3'-UTR      5' ...AUUUUUUUUAAAUAACUGACA...
                    |||  |||||
rno-miR-223      3'   CCCCAUAAACUGU-UUGACUGU

```

*Tabellarische Gegenüberstellung von Vorhersageparametern für die miR-223-Interaktion zwischen PMCA1/atp2b1 bzw. den Bindungsstellen für RhoB. (TargetScan.org, Whitehead Institute for Biomedical Research)*

<b>Vorhersageparameter</b>	<b>PMCA/atp2b1</b>	<b>1. seed match RhoB</b>	<b>2. seed match RhoB</b>
<i>site-type contribution</i> (Grimson et al. 2007)	-0,247	-0,120	-0,247
<i>3' pairing contribution</i> (Grimson et al. 2007)	0,013	-0,044	-0,018
<i>local AU contribution</i> (Grimson et al. 2007)	0,089	0,025	-0,084
<i>position contribution</i> (Grimson et al. 2007)	0,013	0,029	-0,089
<i>TA contribution</i> (Garcia et al. 2011)	-0,016	-0,011	-0,016
<i>SPS contribution</i> (Garcia et al. 2011)	0,017	0,014	0,017
<i>context+ score</i> (Garcia et al. 2011)	-0,13	-0,11	-0,44
<i>P<sub>CT</sub></i> (Friedman et al. 2008)	0,43	< 0,1	0,47

## DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer und bei meinem Betreuer PD Dr. med. Timo Brandenburger für die Bereitstellung des Themas, die Integration in ihre Arbeitsgruppe sowie für die über die Jahre unzähligen beantworteten Fragen, Hilfestellungen und der moralischen Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Hilbert Grievink, PhD, bedanken, der mir bei den Experimenten stets freundlich und geduldig mit Rat und Tat behilflich war. Besonderer Dank gilt auch unseren fleißigen Laborantinnen Claudia Dohle und Yvonne Grüber, die mich bei der Einführung in die Labortätigkeit und einzelnen Experimenten immer nett und hilfsbereit unterstützt haben. Meiner Mitstreiterin und -doktorandin Friederike Stachuletz danke ich für den Austausch und die Hilfsbereitschaft auch Jahre über die gemeinsame Zeit im Labor hinaus.

Gewidmet ist diese Dissertation meiner Familie.

Meine Eltern haben mich während meiner langen Studienzeit, zuerst im Psychologie-, dann auch noch im Medizinstudium, materiell und immateriell im Laufe der vielen Jahre stets unterstützt, aufgebaut und die nötige Motivation gegeben. Dafür gebührt ihnen mein ewiger Dank, *sağolun varolun!*

Mit meiner Frau Hatice habe ich im Laufe dieser Dissertation eine Familie gegründet, der auch Nachwuchs geschenkt wurde. *Hatçem* stand mir immer treu, geduldig und verständnisvoll zur Seite und hat mir zur nötigen Zeit den Rücken gestärkt. Ich bin dir unendlich dankbar.

Für ihre Unterstützung danke ich allen genannten als auch nicht genannten Personen vom ganzen Herzen und wünsche ihnen alles Gute, viel Glück und Gesundheit.