

Aus der Klinik für Anästhesiologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Pannen

**Die Effekte von Fernpräkonditionierung und myokardialer Ischämie auf
die Expression von *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) im
Rattenherz und Untersuchungen zur Interaktion von BDNF und
microRNA-1**

Dissertation

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

vorgelegt von
Friederike Stachuletz

2018

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

gez.:

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

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Timo Brandenburger

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

Für Mama und Papa

Überall lernt man nur von dem, den man liebt.

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832) dt. Dichter

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeit:

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* 2014 Sep;42(3):234-8

ZUSAMMENFASSUNG

Die myokardiale Ischämie ist die Haupttodesursache in Deutschland. Es wurden verschiedene therapeutische Strategien entwickelt, um den Myokardschaden zu reduzieren. Hierzu zählt die ischämische Fernpräkonditionierung des Herzens (*remote ischemic preconditioning*, RIPC): Durch wiederholte, kurze Ischämien der peripheren Skelettmuskulatur wird der Schaden einer nachfolgenden Ischämie am Myokard verringert. Die molekularen Mechanismen, die im Rahmen der RIPC zur Myokardprotektion führen, sind nicht vollständig identifiziert. Wir konnten zeigen, dass die muskelspezifische Micro-RNA-1 (miR-1) nach RIPC im Myokard verändert exprimiert wird. Der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), ein Neurotrophin, gilt als mögliches Zielgen der miR-1.

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob 1.) die Gen- und Proteinexpression von BDNF im Myokard im Rahmen der RIPC, äquivalent zur veränderten miR-1-Expression, modifiziert ist und 2.) BDNF als Zielgen der miR-1 verifiziert werden kann.

Männliche Wistar-Ratten wurden in 4 Gruppen randomisiert (n=6): Scheinoperation, RIPC, Kombination aus RIPC mit Ischämie und Reperfusion (I/R) sowie I/R allein. Die Gewebeentnahme erfolgte nach 120 Minuten Reperfusion. Aus den myokardialen Gewebeproben wurde RNA isoliert und mittels *real-time* PCR (qPCR) wurden die Veränderungen in der BDNF-Genexpression bei Ischämiegeschehen überprüft. Die Identifikation von BDNF als mögliches Zielgen der miR-1 erfolgte softwaregestützt mittels *TargetScan*. Als Interaktionsnachweis wurde ein Luciferase-Reporter-Assay mit Kotransfektion der miR-1 und den putativen Bindungsstellen in der BDNF mRNA in HEK-293-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle diente die Kotransfektion der miR-1 und einer mutierten Bindungsregion. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte nach 48 h. Die Veränderungen der BDNF-Proteinexpression wurden mittels ELISA im Myokard der Versuchstiere und nach lentiviraler Transduktion der miR-1 aus dem Zellüberstand von ubiquitär BDNF-exprimierenden U87-Zellen gemessen. Statistik: t-Test, $p < 0,05$.

Nach 120 Minuten Reperfusion zeigte sich in der qPCR eine 4-fach höhere BDNF-Genexpression nach I/R kombiniert mit RIPC, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch in der AAR der I/R-Gruppe war die Expression der BDNF mRNA etwa 3-fach erhöht. Die *TargetScan*-Analyse zeigte drei putative Bindungsstellen zwischen der miR-1 und der mRNA von BDNF. Kotransfektion von miR-1 und den putativen Bindungsstellen der mRNA des BDNF in HEK 293-Zellen führte zu einer signifikanten Abnahme des Luciferase-Signals auf 31% im Vergleich zum mutierten Kontrollplasmid. Im ELISA der myokardialen Gewebeproben zeigte sich keine signifikant veränderte Proteinexpression des BDNF nach RIPC. Im ELISA des Zellüberstands nach lentiviraler miR-1-Transduktion in U87-Zellen zeigte sich eine signifikant geringere BDNF-Expression (Faktor 0,5) im Vergleich zur Transduktion mit einem Kontrollvektor.

Zum ersten Mal konnte BDNF als mögliches Zielgen der miR-1 identifiziert und eine Interaktion zwischen miR-1 und BDNF *in vitro* nachgewiesen werden. Die veränderte BDNF-Genexpression bestätigt die Involvierung des Moleküls in die molekularen Prozesse bei I/R und RIPC. Die Ergebnisse sind die Grundlage für weitere Untersuchungen und zukünftig zu möglichen therapeutischen Strategien im Hinblick auf die Protektion des Myokards durch ischämische Ereignisse.

ABSTRACT

Myocardial ischemia is one of the main causes of death in Germany. In order to minimize ischemic myocardial injury it is necessary to develop therapeutic strategies. One of these strategies is termed remote ischemic preconditioning (RIPC): repeated short ischemia of peripheral skeletal muscle reduces the injury of a subsequent myocardial ischemia. The molecular mechanisms leading to myocardial protection within the context of RIPC are not fully identified. We were able to show that muscle-specific micro-RNA-1 (miR-1) is differentially expressed in the myocardium after RIPC. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin, could be a potential target gene of miR-1.

The aim of the study was to investigate whether 1.) gene and protein expression of BDNF in the myocardium is modified within the context of RIPC, according to altered miR-1 expression and 2.) BDNF can be confirmed as a target gene of miR-1.

Male Wistar rats were randomly assigned to 4 groups (n=6): sham operation, RIPC, combination of RIPC with ischemia and reperfusion (I/R), and I/R alone. Myocardial tissue was extracted after 120 min of reperfusion. RNA was isolated from the myocardial tissue samples and reverse transcribed into DNA. Altered BDNF mRNA expression was analyzed by real-time PCR (qPCR). Target Scan was used to predict BDNF as a possible target gene of miR-1. To verify the possible interaction between BDNF and miR-1, luciferase-reporter assay was performed with cotransfection of miR-1 and the putative binding sites in BDNF mRNA in HEK-293 cells. Cotransfection of miR-1 and a mutated binding region served as negative control. Activity of Luciferase was measured after 48 h. Changes in BDNF protein expression were measured by ELISA in rat myocardium and in cell supernatant of ubiquitous BDNF-expressing U87 cells after lentiviral transduction of the miR-1. Statistical analysis: t-test, $p < 0.05$.

After 120 minutes of reperfusion I/R combined with RIPC led to a four-fold upregulation of BDNF mRNA expression compared to the control group. In the AAR of the I/R group, BDNF mRNA expression was 3-fold upregulated. TargetScan analysis showed three putative binding sites between miR-1 and BDNF mRNA. Cotransfection of miR-1 and the putative binding sites of BDNF mRNA in HEK 293 cells led to a significant decrease of the luciferase signal to 31% compared to cotransfection of miR-1 and the mutated control plasmid. There was no alteration of BDNF protein expression in myocardium measured by ELISA. ELISA of cell supernatant after lentiviral miR-1 transduction in U87 cells showed significantly decreased BDNF protein expression (factor 0.5) compared to transduction with an empty control vector.

For the first time BDNF was identified as possible target gene of miR-1 and an interaction between miR-1 and BDNF was detected *in vitro*. Altered BDNF gene expression confirms the involvement of BDNF in the molecular processes of I/R and RIPC. The results represent an important approach to further studies and in the future to possible therapeutic strategies for myocardial protection in the context of ischemic events.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK-MB	<i>muscle type Creatininkinase</i> = muskelspezifische Kreatininkinase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FA	Formaldehyd
FUGW	flap-Ub promoter-GFP-WRE = lenitiviraler Transfektionsvektor
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> = grün fluoreszierendes Protein
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i> = humane embryonale Nierenzellen
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
I/R	Ischämie und Reperfusion
IPC	<i>ischemic preconditioning</i> = ischämische Präkonditionierung
kb	Kilobase (1000 Basenpaare)
LARS	<i>Luciferase Assay Reagent Stock</i>

LB	<i>lysogeny broth</i>
M	molar
min	Minute
miRNA	Micro-RNA
ml	Milliliter
mM	milli molar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mut	mutiert
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NGF	<i>nerve growth factor</i> = Nervenwachstumsfaktor
NO	<i>nitric oxide</i> = Stickstoffmonoxid
ONPG	O-Nitrophenyl- β -Galactopyranoside
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative oder <i>real-time</i> PCR
RIPC	<i>remote ischemic preconditioning</i> = ischämische Fernpräkonditionierung
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
RLB	<i>Reporter lysis buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPM	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
S	Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
SD	<i>standard deviation</i> = Standardabweichung
SRF	<i>serum response factor</i>
STEMI	<i>ST-segmental elevation myocardial infarction</i> = ST-Strecken Hebungsinfarkt
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UTR	<i>untranslated region</i> = untranslatierter Bereich
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Kardiale Ischämien	1
1.2 Ischämische Präkonditionierung	2
1.3 Fernpräkonditionierung (<i>remote ischemic preconditioning</i> , RIPC)	4
1.4 Micro-RNA	8
1.5 Micro-RNA im Kontext von Ischämie / Reperfusion	10
1.6 Micro-RNA-1	10
1.7 <i>Brain derived neurotrophic factor</i> (BDNF)	12
Fragestellung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte.....	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.3 Reagenzien	17
2.1.4 Puffer	18
2.1.5 Stammlösungen	18
2.1.6 Enzyme	20
2.1.7 Oligonukleotide	20
2.1.8 Vektoren	21
2.1.9 Materialien für die Zellkultur	21
2.1.9.1 Verbrauchsmaterial.....	22
2.2 Methoden	22

2.2.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1.1	RNA-Isolierung	23
2.2.1.2	Reverse Transkription	25
2.2.1.3	Konventionelle Polymerasekettenreaktion.....	26
2.2.1.4	<i>Real-time</i> PCR	27
2.2.1.5	ELISA	28
2.2.1.6	Klonierung.....	29
2.2.2	Methoden in der Zellkultur	33
2.2.2.1	allgemeine Kulturbedingungen	33
2.2.2.2	Splitten der Zellen	34
2.2.2.3	Zellzählung.....	34
2.2.3	Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen.....	34
2.2.3.1	Zellernte.....	38
2.2.4	Luciferase- <i>Reporter-Assay</i>	39
2.2.5	Lentivirale Transduktion	40
2.2.6	Statistik	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Nachweis der Genexpression von BDNF nach RIPC und I/R im Herzgewebe der Ratte mittels qPCR	43
3.2	Nachweis der Proteinexpression von BDNF nach RIPC und I/R im Herzgewebe der Ratte mittels ELISA	45
3.3	Nachweis der molekularen Interaktion zwischen miR-1 und BDNF mittels Luciferase- <i>Reporter-Assay</i>	46
3.4	Quantifizierung der BDNF-Proteinexpression mittels ELISA nach lentiviraler Transduktion von U87-Zellen mit einem miR-1-Vektor	48

4	Diskussion	49
4.1	Diskussion der Methodik.....	49
4.2	Diskussion der Ergebnisse	50
5	Abbildungsverzeichnis	58
6	Literaturverzeichnis	59

Einleitung

1.1 Kardiale Ischämien

Eine Ischämie bezeichnet das Missverhältnis von Sauerstoffversorgung zu Sauerstoffbedarf eines Gewebes.

Laut Daten des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2014 gehören ischämische Ereignisse des Herzens, wie der akute Myokardinfarkt und Angina-Pectoris-Anfälle im Rahmen der chronisch ischämischen Herzkrankheit zu den Haupttodesursachen in Deutschland (Abb.1).

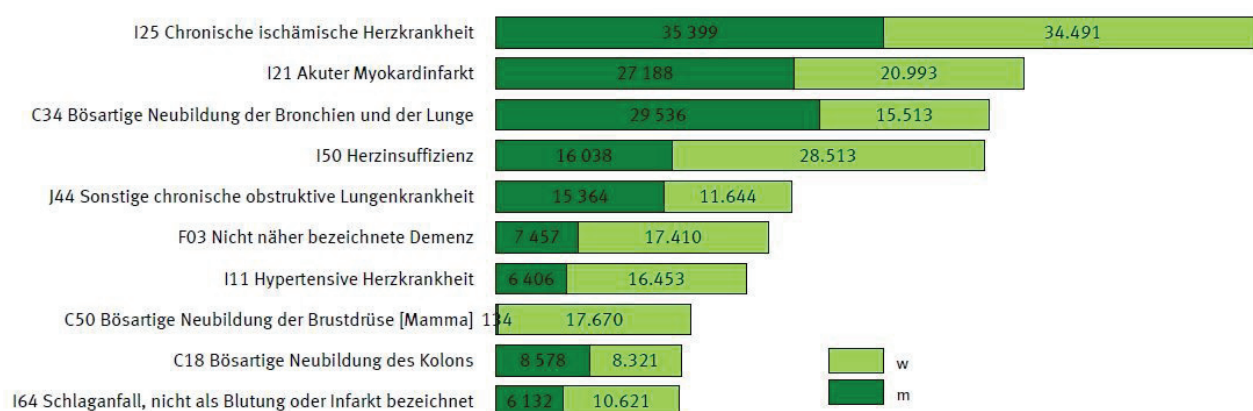


Abbildung 1: Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes in Deutschland in 2014. Hier abgebildet sind in Balkenform die häufigsten Todesursachen (inklusive ICD-10 Klassifikation) in Deutschland im Jahr 2014 in absoluter Fallzahl, nach ihrer Häufigkeit von oben abnehmend geordnet. In Hellgrün dargestellt ist die absolute Zahl der weiblichen Verstorbenen, in Dunkelgrün dargestellt ist die absolute Zahl der männlichen Verstorbenen. (nach Statistisches Bundesamt, Fachserie 12, Reihe 4 - 2014)

Diese Ischämien in der myokardialen Strombahn entstehen meistens durch arteriosklerotische Veränderungen der Herzkranzarterien. Die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque führt über die Einwanderung von Thrombozyten zur Bildung eines Thrombus, der im schlimmsten Fall die gesamte nachfolgende Blutstrombahn okkludiert. Es kommt zu einer Minderdurchblutung des Myokards und damit zu einer Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff. Das Absterben von Zellen ist nicht nur auf die Minderdurchblutung zurückzuführen, sondern auch auf die im Rahmen der Reperfusion auftretenden Prozesse wie oxidativer Stress^[1], Anstieg

des intrazellulären Calciumspiegels^[2] und rasche Änderung des pH-Wertes^[3]. Experimentelle Studien zeigen, dass die endgültige Infarktgröße bis zu 50% durch den Reperfusionsschaden verursacht wird.^[4]

Durch beide Prozesse - Ischämie und Reperfusion - wird das Myokard dauerhaft geschädigt. Langfristig entsteht im Myokard eine Gewebenarbe, die dazu führt, dass die Kontraktilität an dieser Stelle eingeschränkt ist und die Pumpleistung des Herzens abnehmen kann. Durch die Narbenbildung können ebenfalls das Reizleitungssystem des Herzens geschädigt werden und nachfolgend Rhythmusstörungen auftreten.

Für die Entstehung der Arteriosklerose gibt es zahlreiche Risikofaktoren. Führend sind vor allem Nikotinabusus^[5], Adipositas (einhergehend mit Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie)^[6, 7], Diabetes mellitus^[8] und arterielle Hypertonie^[9].

Die Reduzierung dieser Risikofaktoren führt zu einem verminderten Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden und daran zu versterben.^[10, 11] Bei bereits bestehenden arteriosklerotischen Veränderungen kann man durch Sport, Änderung der Essgewohnheiten und Stressreduktion das Ausmaß der Arteriosklerose und damit auch das Risiko für myokardiale Ischämien senken.^[12, 13] Weiterhin ist mittels Pharmaka ein positiver Einfluss auf die o.g. Risikofaktoren zu erzielen: Betablocker und Calciumantagonisten senken den Blutdruck und Wirkstoffe wie Acetylsalicylsäure senken, bei bereits bestehender Arteriosklerose, das Risiko für folgende Ischämien des Myokards.^[14-16] Außer den beschriebenen Maßnahmen werden Strategien erforscht, die vor, während oder nach einer Ischämie eingesetzt werden können und dazu beitragen, die Myokardschädigung durch Ischämie und Reperfusion (I/R) zu minimieren. Zu diesen Strategien zählt die ischämische Präkonditionierung (IPC), ein Phänomen, das im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

1.2 Ischämische Präkonditionierung

Die IPC dient dem Ziel der Verringerung des Gewebes Schadens bei Ischämie-/Reperfusionseignissen. Dabei wird das Gewebe durch kurze, mehrfach wiederholte Ischämiephasen mit anschließender Reperfusion auf die (vermeintlich) nachfolgende

längere Ischämie vorbereitet. Dies kann am Herzen z.B. durch kurzzeitigen Verschluss einer Herzkranzarterie erzielt werden. Erstmals wurde der positive Effekt der IPC am Myokard in den 80er Jahren von Murry et al. beschrieben. Verglichen mit einer Kontrollgruppe konnte bei Hunden die Infarktgröße nach IPC auf 25% gesenkt werden.^[17] Für die IPC wurde auch an anderen Organen, wie Leber und Niere, ein protektiver Effekt nachgewiesen.^[18, 19] Auch bei anderen Spezies konnte am Myokard eine Reduzierung der Infarktgröße nach vorheriger Protektion durch z.B. Heinen et al. gezeigt werden.^[20] Welche molekularen Prozesse im Rahmen der IPC ablaufen, ist bisher nicht ausreichend geklärt. Zusammenfassend erklärte Heusch 2015, dass die Protektion bei der IPC in zwei Phasen verläuft.^[21] Zunächst erfolgt eine sofortige Protektion nach Abschluss des Präkonditionierungsprotokolls für etwa zwei Stunden durch akut verfügbare Signalmoleküle (= *first window of protection*).^[17] Verzögert (24-48 h nach Präkonditionierung) setzt ein zweiter Protektionsmechanismus, basierend auf veränderter Proteinexpression ein (= *second window of protection*).^[22] Grundsätzlich ist nach Heusch eine Signalkaskade für die Protektion verantwortlich: Die Präkonditionierung führt zur Freisetzung von Triggermolekülen und über Mediatoren werden entsprechende Effektoren der Kardioprotektion aktiviert.^[21] Es gibt eine Vielzahl von Studien, die verschiedene Mechanismen als Teil der o.g. Kaskade sehen und somit als (mit-)verantwortlich für die Protektion heranziehen.

Als Trigger können u.a. Stickstoffmonoxid (NO), das die Kontraktilität des Myokards bei ischämischem Geschehen verbessert,^[23] und Adenosin, das während IPC von Kardiomyozyten und Endothel freigesetzt wird,^[24, 25] genannt werden. Eine Studie von Dickson et al. machte durch Bluttransfusionen zwischen Kaninchen deutlich, dass der kardioprotektive Effekt nach ischämischer Präkonditionierung übertragbar ist und der Protektion demnach humorale Mechanismen zugrunde liegen müssen. In dieser tierexperimentellen Studie erhielt eine Versuchsgruppe eine IPC und Fernpräkonditionierung (RIPC) parallel vor einer Myokardischämie und ihr Blut wurde auf Tiere transferiert, die nachfolgend einer längeren Myokardischämie ausgesetzt waren. Der Myokardschaden war in beiden Tiergruppen vergleichbar reduziert.^[26] Zu den intrazellulären Mediatoren, die das IPC-Signal weiterleiten, zählen die Proteinkinase C, deren Inhibierung eine Aufhebung der Protektion durch IPC

verursacht,^[27] und die mitogen-aktivierte Proteinkinase p38, deren Aktivität bei IPC signifikant ansteigt.^[28] Die Effektoren der Protektion sind vor allem Mitochondrien. Durch Öffnung von mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanälen wird der Energiehaushalt der Kardiomyozyten optimiert.^[29] Die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle wird unter anderem von NO und der Proteinkinase C vermittelt.^[30, 31] Nach Murry et al. werden nach IPC innerhalb der Mitochondrien der intrazelluläre ATP-Verbrauch und die anaerobe Glykolyse reduziert, was zu einer Verminderung des ischämischen Zelltodes führt.^[32] Innerhalb der Mitochondrien gelten besonders die *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) als wichtige Effektoren, bzw. die Inhibierung der Öffnung dieser Poren. Die mPTP sind Multiproteinkomplexe und liegen in einer Kontaktschicht zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran.^[33] Physiologisch sind die Poren hauptsächlich geschlossen, sie öffnen sich bei erhöhten Calciumkonzentrationen und regulieren so die Permeabilität der mitochondrialen Membranen.^[34] Im Rahmen myokardialer Ischämie und vor allem zum Zeitpunkt der Reperfusion werden die mPTP längerfristig geöffnet und es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c. Dies wird für kontraktile Dysfunktion und Apoptose des Myokards verantwortlich gemacht.^[35, 36] Durch Hemmung der Öffnung der mPTP mittels Cyclosporin A konnte im isolierten Rattenmyokard ein verbesserter linksventrikulärer Druck sowie eine reduzierte Infarktgröße nach I/R gezeigt werden.^[37, 38] Ein weiterer Effektor ist das Zytoskelett der Kardiomyozyten. Durch IPC wird die osmotische Fragilität des Zytoskeletts reduziert.^[39]

Aufgrund ihrer Invasivität ist die IPC risikoreich und für klinische Studien nicht geeignet. Eine andere Form der Präkonditionierung, die sich sowohl invasiv als auch nicht-invasiv durchführen lässt, ist die RIPC, die im nächsten Kapitel beschrieben wird.

1.3 Fernpräkonditionierung (*remote ischemic preconditioning*, RIPC)

RIPC soll, ähnlich wie die IPC, Gewebe auf bevorstehende Sauerstoffmangelversorgung vorbereiten und so den Gewebeschaden durch eine nachfolgende Ischämie mit Reperfusion verringern. Hierbei wird die Präkonditionierung an einem Gewebe oder Organ durchgeführt, das vom Gewebe, das geschützt werden soll, weiter entfernt liegt.

Bei der invasiven Form der RIPC wird in den kurzen Ischämiephasen z.B. die *Arteria femoralis* mit dem Ziel einer Myokardprotektion verschlossen. Das Prinzip gleicht dem der IPC: kurze, aufeinanderfolgende Ischämiephasen mit anschließender Reperfusion. Die lange Ischämiephase, die in diesem Fall einen Myokardinfarkt simuliert, wird allerdings wie bei der IPC direkt am Gewebe, das Protektion erfahren soll, also z.B. am *Ramus interventricularis anterior* (RIVA), erzeugt.

1993 wurde RIPC erstmalig von Przyklenk et al. beschrieben. Es wurde gezeigt, dass durch RIPC nicht nur das Gewebe der direkten Strombahn bei nachfolgender Ischämie geschützt wird, sondern auch das Myokard, das nicht direkt von der Ischämie betroffen war.^[40] Ausgehend von dieser Publikation wurde in den folgenden Jahren das Feld der RIPC weiter erforscht und es konnte gezeigt werden, dass auch Gewebe, das vom Ort der ischämischen Konditionierung weit entfernt ist, Protektion erfährt. Gho et al. zeigten reduzierte myokardiale Infarktgrößen nach mehrfachem Verschluss der *Arteria mesenterica anterior* bei Ratten.^[41] Durch Verschluss der *Arteria renalis* erzielten Pell et al. eine Reduktion der Infarktgröße des Herzens mit ähnlich starkem Effekt wie bei der IPC.^[42] Auch eine kurzfristige Ischämie in cerebralem Gewebe führte nach Tokuna et al. zur Reduzierung myokardialer Infarkte.^[43] Birnbaum et al. führten die RIPC mittels Verschluss der *Arteria femoralis* durch und konnten ebenfalls eine protektive Wirkung für das Myokard erreichen.^[44]

Die o.g. Methoden der RIPC zur Protektion des Myokards über verschiedene Organsysteme sind allesamt invasiv, RIPC kann jedoch auch nicht-invasiv über eine Ischämie der Skelettmuskulatur mittels *Tourniquet* oder Blutdruckmanschette durchgeführt werden. Die erstmalige Durchführung einer nicht-invasiven RIPC mit Nachweis einer Myokardprotektion gelang im Jahr 2002 am Hinterlauf von Schweinen.^[45] 2012 konnten Dow et al. als weiteren positiven Effekt der RIPC zeigen, dass das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien, als Folge des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) am Myokard, bei Ratten mit RIPC-Behandlung signifikant geringer ist als in der Kontrollgruppe.^[46] Auch in unserer Arbeitsgruppe ist die nicht-invasive Form der RIPC seit mehreren Jahren etabliert.^[20, 47-49]

Da diese Methode der RIPC sehr einfach anzuwenden ist, findet sie bereits Einsatz in klinischen Studien. So wurde gezeigt, dass Patienten im Rahmen einer Bypassoperation

signifikant geringere Troponin-T- und -I-Serumlevel aufwiesen und so der postoperative Myokardschaden als geringer eingeschätzt werden kann als in der Kontrollgruppe bei präoperativer Durchführung einer RIPC mittels Blutdruckmanschette lokalisiert am Oberarm.^[50-52] Liang et al. zeigten eine verbesserte endotheliale Funktion und eine vermehrte Ausschüttung von endothelialen Progenitorzellen nach RIPC bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung.^[53] In einer klinischen Studie von Ghaemian et al. konnte bei Patienten mit elektiver perkutaner Stentimplantation gezeigt werden, dass eine vorherige RIPC Thoraxschmerzen und ST-Veränderungen während der Intervention verringert und die Troponin-T-Kontrolle im Serum der Patienten nach 24 Stunden signifikant geringer ausfällt als in der Vergleichsgruppe. In derselben Studie wurde gezeigt, dass diese RIPC keinen signifikanten Effekt auf akute Herzereignisse in der Nachsorge hat.^[54]

Aktuelle Publikationen führen auch Einschränkungen der RIPC in klinischen Studien an. Jones et al. präsentierten erstmalig klinische Ergebnisse zur Anwendung der RIPC bei Neugeborenen. Es wurde der Effekt der RIPC auf die Troponin-T-Serumlevel nach Operationen mit Einsatz eines kardiopulmonalen Bypasses beschrieben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den Untersuchungsgruppen.^[55] McCrindel et al. zeigten, dass das *Outcome* von Kindern nach kardiochirurgischen Eingriffen nicht verbessert wird, wenn zuvor eine RIPC durchgeführt wurde.^[56] Meybohm et al. präsentierten Ergebnisse, dass RIPC keinen relevanten Vorteil bietet für Patienten vor elektiven kardiochirurgischen Eingriffen.^[57] Hausenloy et al. zeigten in einer *Multicenter*-Studie, dass mittels RIPC vor einer Bypass-OP bei Patienten ein Jahr postoperativ kein Überlebensvorteil gegenüber der Kontrollgruppe erzielt werden kann.^[58] Und auch Lomivorotov et al. beschrieben in ihrer klinischen Studie, dass RIPC den Myokardschaden nach koronararterieller Bypassoperation nicht verringert.^[59]

Ähnlich zur Methode der IPC sind die molekularen Mechanismen, die im Rahmen der RIPC ablaufen, nicht ausreichend identifiziert. Auch die Protektion im Rahmen der RIPC wird biphasisch vermittelt. Zunächst beginnt die akute Phase direkt nach dem initialen

ischämischen Ereignis und dauert etwa drei Stunden an. Die verzögerte Phase beginnt nach zwölf bis 24 Stunden und kann bis zu vier Tagen andauern.^[60]

Man unterscheidet nach Gill et al. in der Identifizierung zwischen humoralen, neuronalen und systemischen Faktoren der Protektion.^[61] Zu den humoralen Faktoren, die im Gewebe der RIPC freigesetzt, in die Blutbahn ausgeschüttet werden und anschließend intrazelluläre Signalwege aktivieren, zählen u.a. Adenosin und Bradykinin.^[42, 62] Eine Studie von Gho et al. zeigte, dass durch Hexamethonium, einem neuronalen Antagonist am nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor,^[63] die protektive Wirkung von RIPC, über eine Blockade des neuronalen Signalwegs, aufgehoben wird.^[41] Eine systemische Auswirkung der RIPC stellt die Hemmung der Gentranskription proinflammatorischer Mediatoren in humanen Leukozyten dar.^[64]

Die verschiedenen Faktoren aktivieren unterschiedliche molekulare Mechanismen, die an der Protektion beteiligt sind. Wie bei der IPC werden die Effekte der RIPC ebenfalls über mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle vermittelt.^[65] Die Rolle, die NO bei der Protektion im Rahmen der RIPC spielt, ist unklar. Bei NO-Inhibition wird der Effekt der RIPC nicht aufgehoben.^[66] Dennoch wird Nitrit während einer kardialen Ischämie in Kardiomyozyten zu NO reduziert und bewirkt eine Reduktion von Zellschäden und Infarktgröße.^[67, 68] Die Rolle der Proteinkinase C, die im Rahmen der IPC an der Protektion des Myokards beteiligt ist, bleibt bei der RIPC bislang unklar.^[69] Im Rahmen der molekularen Mechanismen ist außerdem das Protein Connexin 43 zu nennen, dessen Proteinexpression nach einem ischämischen Ereignis am Herzen vermindert ist. Im Rahmen der RIPC wird dieser Effekt aufgehoben.^[49] Cai et al. untersuchten Interleukin-10-*Knock-Out*-Mäuse und beschrieben eine Aufhebung des protektiven Effektes (verringerte Infarktgröße und verbesserte myokardiale Kontraktilität) durch RIPC in diesen Tieren.^[70] In einer klinischen Studie bei Patienten mit kardialer Operation zeigten Cabrera-Fuentes et al. erhöhte RNase 1-Level im Plasma der Patienten, die präoperativ mit RIPC behandelt wurden. Eine weitere Studie derselben Arbeitsgruppe zeigte zuvor die kardioprotektive Wirkung der o.g. RNase 1.^[71, 72]

Einen neuen Ansatz zur Identifikation der molekularen Signalwege brachte die Entdeckung sogenannter Micro-RNAs (miRNAs). Der Zusammenhang zwischen miRNAs

und dem Protektionsmechanismus der RIPC wurde erstmals 2012 von Duan et al. hergestellt. Die Ergebnisse zeigten Veränderungen der miR-1- und miR-21-Expression während der RIPC. ^[73] Dong et al. konnten zeigen, dass verschiedene miRNAs im Infarktgebiet und auch im Myokard peripher des Infarktgebietes nach einem Infarkt in ihrer Expression verändert sind. ^[74]

1.4 Micro-RNA

Der Begriff Micro-RNA (miRNA) wurde 2001 von Lagos-Quintana et al. geprägt. ^[75] Bis heute wurden mehrere hundert verschiedene humane miRNAs identifiziert ^[76] und man geht davon aus, dass mindestens ein Drittel der menschlichen Gene durch miRNAs reguliert werden. ^[77] MiRNAs sind kleine, ca. 22 Nukleotide lange, nicht-codierende RNA-Moleküle, die an komplementäre *messenger* RNA (mRNA) binden können.

Zunächst entsteht im Zellkern ein durch RNA-Polymerase II transkribiertes, Primärtranskript (pri-miRNA) der miRNA, ^[78] das u.a. von dem Protein Drosha in das etwa 70 Nukleotid lange Vorläufermolekül pre-miRNA prozessiert wird. ^[79] Diese Pre-miRNA hat eine typische Haarnadelform (Hairpin), die sich durch interne Basenpaarung ausbildet ^[75, 80, 81] (Abb. 2).

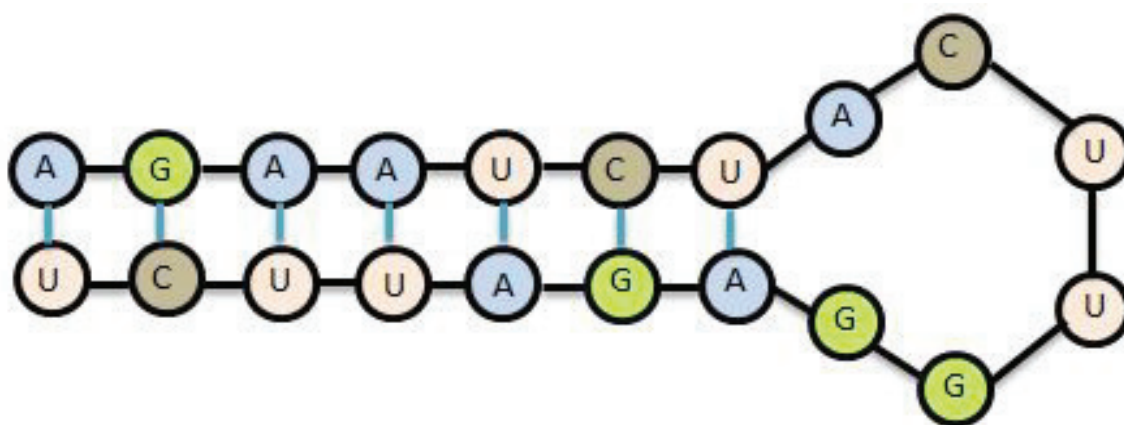


Abbildung 2: schematische Darstellung der Haarnadelstruktur der pre-miRNA mit Basenpaarfolge, A = Adenin, C = Cytosin, U = Uracil, G = Guanin und Wasserstoffbrückenbindung zwischen den jeweils komplementären Nukleinbasen.

Durch Bindung an Exportin-5 wird die Pre-miRNA in das Zytosol transportiert^[82, 83] und dort von dem Enzymkomplex Dicer, der RNase-Eigenschaft besitzt, zu einer reifen miRNA prozessiert, die in Doppelstrang-Form vorliegt.^[84, 85] Eine zytoplasmatische Helikase spaltet den Doppelstrang der miRNA und die Einzelstränge können nun an komplementäre Stellen in der nicht translatierten Region (3'-UTR) einer mRNA binden.^[86] Bei exakter Basenpaarung zwischen der Kernregion der miRNA und der Bindungsregion in der 3'-UTR der mRNA entsteht ein *RNA-induced silencing complex* (RISC), der die mRNA abbaut.^[87, 88] Bei nicht exakter Basenpaarung wird die mRNA nicht abgebaut, sondern durch die Bindung der miRNA blockiert, sodass sie nicht mehr abgelesen werden kann.^[89, 90] Beide Vorgänge führen zu einer Inhibierung der Proteintranslation. Über diesen Weg sind miRNAs an der posttranskriptionalen Genexpression regulativ beteiligt und beeinflussen biologische Prozesse wie Hämatopoese,^[91] Angiogenese,^[92, 93] Wundinflammation,^[94] Apoptose,^[95-97] Zelldifferenzierung und -proliferation^[98-101] sowie pathologische Prozesse wie Karzinogenese,^[102, 103] Gewebefibrosierung^[104, 105] und die Entstehung von Diabetes mellitus.^[106]

Bezogen auf myokardiales Gewebe regulieren miRNAs die Herzentwicklung.^[107] Außerdem sind sie involviert bei einer Vielzahl unterschiedlicher Herzerkrankungen. Ikeda et al. zeigten, dass insgesamt 43 verschiedene miRNAs bei dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie sowie bei Aortenstenose im humanen Myokard ein verändertes Expressionsmuster aufweisen.^[108] Fichtlscherer et al. beschrieben reduzierte Serumlevel u.a. der miR-126, miR-17 und miR-92a bei Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung verglichen mit gesunden Probanden.^[109]

Die Expressionslevel der einzelnen miRNAs sind zell- und gewebespezifisch. Im Lebergewebe ist beispielsweise die miR-122 mit 72% aller dort identifizierten miRNAs am häufigsten, im Milzgewebe die miR-143, in Kolonzellen die miR-142 (beide mit je etwa 30%) und im Myokard mit 45% die miR-1.^[110]

Regulativ beteiligt sind miRNAs auch im Rahmen von Ischämiegeschehen und bei IPC bzw. RIPC. Hierauf wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

1.5 Micro-RNA im Kontext von Ischämie / Reperfusion

Van Rooij et al. zeigten in einer tierexperimentellen Studie an Mäusen, dass verschiedene miRNAs nach einem Myokardinfarkt sowohl im direkten ischämischen als auch im peripheren Myokard, verglichen mit einer Kontrollgruppe ohne Myokardinfarkt, verändert exprimiert werden.^[111] Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten nach I/R sowie RIPC insgesamt 25 differenziell exprimierte miRNAs im Myokard der Ratte identifiziert werden.^[48] Nach I/R kann die micro-RNA-1 (miR-1) die Apoptose von Kardiomyozyten über das Protein Bcl-2 und die miR-320 über das *heat-shock protein 20* die Regulation des Gewebeschadens beeinflussen.^[112, 113] Duan et al. analysierten die miR-1- und miR-21-Expression im Myokard von Ratten im Rahmen von IPC und RIPC. Sowohl die miR-1 als auch die miR-21 wurden bei ischämischer Präkonditionierung im Myokard vermehrt exprimiert. Bei RIPC zeigte sich die miR-1-Expression im Myokard vermindert.^[73] Weitere Hinweise auf eine wichtige Rolle von miRNAs bei der Präkonditionierung lieferte eine Studie von Yin et al.: Die nach IPC aus dem Myokard von Ratten isolierten miRNAs reduzierten bei Injektion in den linken Ventrikel gesunder Ratten vor einer Ischämie die Infarktgröße signifikant.^[114] Die hohen Expressionslevel im gesunden Myokard^[115] sowie die gezeigten starken Veränderungen der Expression bei pathologischen Prozessen des Myokards^[116, 117] lassen die miR-1 als interessante miRNA im Kontext von I/R sowie IPC und RIPC erscheinen.

1.6 Micro-RNA-1

Bereits bei der ersten Beschreibung von miRNAs durch Lagos-Quintana et al. im Jahr 2001 wurde auch die miR-1 erwähnt und entschlüsselt.^[75] Seitdem ist sie Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und vermutlich eine der am besten erforschten miRNAs. Die miR-1 ist muskelspezifisch, sie wird in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert^[118] und ist mit einem Anteil von etwa 45% die miRNA, die im Myokard am stärksten exprimierte miRNA.^[110] Es wurden bereits einige Zielgene identifiziert, die durch die miR-1 regulativ beeinflusst werden und die alle auch eine Rolle bei verschiedenen Funktionen der Kardiomyozyten spielen. Zu diesen Zielgenen gehören u.a.

Calmodulin,^[119] ein Protein, das den Calciumhaushalt und damit die Funktion der Kardiomyozyten reguliert,^[120] *Insulin-like-growth-Factor 1*,^[121] ein Wachstumsfaktor, der in die Regulation von Zellgröße, -proliferation und -überleben der Kardiomyozyten involviert ist,^[122, 123] Connexin 43,^[124] das Haupttunnelprotein der *Gap junctions* von Kardiomyozyten^[125] und Bcl-2,^[112] ein Protein, das u.a. in Kardiomyozyten die Apoptose inhibiert.^[126] Aufgrund des hohen Expressionslevels der miR-1 im Myokard, liegt der Fokus des wissenschaftlichen Interesses in den Zusammenhängen zwischen der miR-1 und biologischen sowie pathologischen Prozessen im Herzgewebe. Durch einen spezifischen kardialen *Dicer-Knockout* bei Mäusen und die aus dem Fehlen des Proteins resultierenden reduzierten miRNA-Level konnte gezeigt werden, dass die miR-1 eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Herzentwicklung und -funktion spielt.^[127] Bei spontaner myokardialer Differenzierung von Mäusestammzellen *in vitro* ist die miR-1 erhöht.^[128] Ai et al. konnten zeigen, dass bei Mäusen mit herzspezifischer Überexpression der miR-1 ein ungünstiges strukturelles *Remodeling* erzeugt wird, was zu eingeschränkter Kontraktilität führt.^[129]

Bezüglich pathologischer Prozesse des Myokards wird der miR-1 ebenfalls eine große Rolle zugeschrieben. So ist die miR-1 bei induzierter Herzhypertrophie bei Ratten *in vivo* signifikant herunterreguliert.^[130] Eine Studie von Kuwabara et al. zeigte, dass die miR-1-Serumwerte bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und Patienten mit instabiler Angina Pectoris signifikant erhöht bzw. die miR-1-Expression im myokardialen Infarktgebiet erniedrigt ist.^[131] Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten in einer tierexperimentellen Studie eine signifikante Reduktion der miR-1-Expression im Myokard der Ratte infolge von RIPC.^[48] Slagsvold et al. beschrieben 2014 bei Patienten, die vor koronarer Bypassoperation eine RIPC erhielten, eine verringerte miR-1-Expression im Myokard des rechten Vorhofes.^[132] Im Rahmen der Entschlüsselung der molekularen Mechanismen, die durch miR-1 ausgelöst werden, identifizierten wir das Protein *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) als putatives Zielgen der miR-1. Auf die biologischen Funktionen dieses Proteins bezieht sich das nächste Kapitel.

1.7 *Brain derived neurotrophic factor (BDNF)*

BDNF gehört zur Gruppe der Neurotrophine. Als Neurotrophine werden Proteine klassifiziert, die als Nervenwachstumsfaktoren dienen. Sie steuern bzw. beeinflussen die Entwicklung und Differenzierung von neuronalen Stammzellen und das Wachstum und die Regeneration von adulten Neuronen. Mitte der 1980er Jahre wurde BDNF erstmalig beschrieben. Der erste Nachweis des Proteins gelang 1982 Barde et al. aus dem Gehirngewebe von Schweinen.^[133] BDNF ist ein basisches homodimeres Protein,^[134] das von Neuronen in verschiedenen Arealen des zentralen Nervensystems (ZNS) wie Großhirn, Kleinhirn und dem Hippokampus produziert wird.^[135, 136] Die interzellulären Signale von BDNF werden über Phosphorylierung der Rezeptoren *Tyrosine receptor kinase B* (TrkB), einer Tyrosinkinase, und p75^{NTR} vermittelt.^[137, 138] Diese Rezeptoren stoßen verschiedene Signalkaskaden an, die zu zellulären Veränderungen führen. BDNF wirkt direkt stimulierend auf die Zellmigration von Körnerzellen^[139] und ist essenziell für die (embryonale) Entwicklung des Nervensystems bei Ratten.^[140] BDNF übernimmt entscheidende Funktionen bei den Prozessen früher neuronaler Differenzierung, neuronalem Überleben bei Substanz P (einem Neuropeptid) exprimierenden Neuronen und bei der Stimulation von axonaler Regeneration.^[141-144] Auch bei der Schmerzempfindung ist BDNF vermutlich als regulativer Faktor beteiligt. Im Rahmen neuropathischer Schmerzen wurde eine erhöhte BDNF-Synthese in Spinalganglien nachgewiesen.^[145] In experimentellen Studien bei Ratten mit selektiver BDNF-Blockade zeigten die Tiere schlechtere Ergebnisse bei den Funktionen Lernen^[146] und Gedächtnisentwicklung^[147]. Ein weiterer sehr wichtiger Effekt von BDNF ist die Inhibierung neuronaler Apoptose über die Phosphorylierung von TrkB und teilweise über einen direkten antiinflammatorischen Effekt auf Körnerzellen.^[148, 149]

Neben den o.g. physiologischen Funktionen von BDNF wird dem Protein auch eine Bedeutung bei pathologischen Prozessen des ZNS, wie den Erkrankungen Alzheimer und Parkinson, aufgrund erniedrigter BDNF-Proteinexpressionslevel bzw. geringerer Aktivität von BDNF-immunreaktiven Zellen in humanem cerebralem Gewebe, und über TrkB-Modulation bei der Neuroblastomentstehung zugeschrieben.^[150-152]

Zunehmend konnte BDNF nicht nur in Zellen des Nervensystems, sondern auch in anderen Geweben wie dem Myokard nachgewiesen werden.^[153, 154]

Die Funktionen, die es hier einnimmt, sind bisher noch unzureichend erforscht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass BDNF bei der Entwicklung der Koronararterien^[155] und, über die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase, bei der Pathogenese der Arteriosklerose der Koronararterien eine Rolle spielt.^[156] Kreusser et al. führten 2008 eine Studie durch, die zeigte, dass BDNF vermutlich über die (Dys-) Regulation des Noradrenalinhaushaltes in die Entwicklung kongestiver Herzfehler involviert ist.^[157]

Der Zusammenhang zwischen BDNF und kardiovaskulärer Mortalität ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Katare et al. zeigten in einer tierexperimentellen Studie mit Ratten höhere BDNF-Level bei Tieren, die nach einem Myokardinfarkt eine intermittierende Diät erhalten hatten und in dieser Gruppe ein verbessertes Überleben (zusammenhängend mit geringerer kardiomyozytärer Hypertrophie und geringerer kardialer Fibrosierung) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit regulärer Ernährung nach Myokardinfarkt.^[158] In einer großen schwedischen Langzeitstudie über 15 Jahre zeigten Halldén et al., dass eine BDNF-Genvariation, die bei Individuen mit Rauchen und Adipositas assoziiert ist, ebenfalls eine signifikante positive Korrelation mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität aufweist.^[159] Cao et al. beschrieben 2012 eine durch BDNF initiierte und über TrkB vermittelte Zellmigration von Endothelzellen kardialer Gefäße und eine dadurch verbesserte Regenerationsmöglichkeit des Myokards nach stattgehabter Ischämie.^[70]

Als potenzielles Zielgen der miR-1 und aufgrund regulativer Beteiligung an pathologischen Prozessen im Myokard, wurde das Protein BDNF in unsere Studie integriert.

Fragestellung der Arbeit

Myokardiale Ischämien gehören zu den Haupttodesursachen in Deutschland. Um die negativen Folgen einer Ischämie zu verringern, werden protektive Mechanismen in Bezug auf das Myokard untersucht. Zu diesen protektiven Mechanismen gehört RIPC. Die molekularen Vorgänge, die im Rahmen der RIPC ablaufen, sind weitestgehend unbekannt. Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass zwei Stunden nach RIPC die Expression der miR-1 im Myokard der Ratte reduziert wird.^[48] Die Bedeutung dieser miR-1 Expressionsänderung nach RIPC ist bisher unklar.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expressionsunterschiede von BDNF im Rahmen von RIPC und I/R darzustellen und einen molekularen Zusammenhang zwischen miR-1 und BDNF zu untersuchen. Diese Fragestellungen erfolgten mit dem erweiterten Ziel, einen Teil der molekularen Mechanismen zu entschlüsseln, die der Myokardprotektion im Rahmen der RIPC zugrunde liegen.

Konkret sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss haben RIPC, I/R und RIPC + I/R auf die mRNA-Expression von BDNF im Herzgewebe?
2. Welchen Einfluss haben RIPC, I/R und RIPC + I/R auf die Proteinexpression von BDNF im Herzgewebe?
3. Kann eine funktionelle Interaktion zwischen miR-1 und BDNF verifiziert werden?
4. Könnte diese potenzielle Interaktion zu einer Veränderung der BDNF-Proteinexpression beitragen?

Zur Beantwortung der Fragen wurde folgender methodischer Ansatz gewählt:

Männliche Wistar-Ratten wurden mit oder ohne vorherige RIPC einer 35-minütigen myokardialen Ischämie unterzogen. Sham-operierte Tiere und Tiere, die lediglich RIPC erhielten, dienten als Kontrollen. Nach 120-minütiger Reperfusion sowie zu den korrespondierenden Zeitpunkten in Sham- und RIPC-behandelten Versuchstieren, wurde jeweils Herzgewebe entnommen. Die BDNF-mRNA und -Proteinexpressionslevel im Herzgewebe wurden mittels *real-time* PCR (qPCR) bzw. *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt.

Die Bestätigung der *in silico*-Vorhersage der Bindung zwischen miR-1 und BDNF-mRNA wurde mittels Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt. Die weitere Untersuchung der funktionellen Interaktion zwischen miR-1 und BDNF erfolgte auf Proteinebene mittels ELISA nach Überexpression der miR-1 in U87 Glioblastomzellen durch lentivirale Transduktion.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelsystem	Analisis, 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
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PCR-Cycler	Helena BioSciences, Gateshead (UK)
	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PCR-Kabinett	LTF Labortechnik, Wasserburg
pH-Meter	Feinchemikalien Klees, Düsseldorf
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettor	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
<i>Plate Reader</i>	Biotek, Bad Friedrichshall
<i>Real-time PCR System</i>	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
sterile Werkbank	Kendro, Langenselbold
Ultratiefkühlschrank	ilShin, Hialeah (USA)
UV-Gerät	Biometra, Göttingen
<i>Vortexer</i>	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwarzbach
Zählkammer	Laboroptik, Bad Homburg
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platten (weiß)	GreinerBio-One, Kremsmünster(Österreich)
96-Well-Platten (transparent)	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Filter-Tip</i> Pipettenspitzen	Star Lab, Ahrensburg
Pipettenspitzen	Star Lab, Ahrensburg
Plastikpipetten	Corning Incorporated, Corning (USA)
Reaktionsgefäße 0,2, 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Reagenzien

100 bp-Marker	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Apotheke Uniklinik Düsseldorf
Chloroquin	Sigma Aldrich, Steinheim
Coenzym A	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Complete</i> -Lösung	Roche, Grenzach-Wyhlen
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe
DTT 1 M	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA 0,5 M	Merck, Darmstadt
ELISA-Kit	Promega, Mannheim
Ethanol 90%	Apotheke Uniklinik Düsseldorf
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
HBSS	Invitrogen, Darmstadt
Helipur®	Braun, Melsungen
Isopropanol	Apotheke Universitätsklinikum Düsseldorf
Luciferin	Acros Organics, Geel (Belgien)

Magnesiumchlorid 25 mM	Invitrogen, Darmstadt
Millipore-Wasser	Merck, Darmstadt
Nukleotide	Axon, Kaiserslautern
Nukleotide (100mM)	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
ONPG	Acros Organics, Geel (Belgien)
<i>Orange G</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Polybren	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Random-Primer 10x</i>	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
RNase-Inhibitor 20 U/μl	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
<i>RT-Random-Primer</i>	Promega, Mannheim
<i>TaqMan® Gene Expression Assay</i>	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix</i>	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
Tris-Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim
Trizol	Invitrogen, Darmstadt
XL1 blue e.coli Zellen	Stratagene, Böblingen

2.1.4 Puffer

FA-Ladepuffer	Carl Roth, Karlsruhe
Ligase-Puffer	Invitrogen, Darmstadt
M-MLV Puffer 5x	Promega, Mannheim
Puffer B 10x	Invitrogen, Darmstadt
<i>Reporter Lysis Buffer</i>	Promega, Mannheim
Reverser Transkriptionspuffer 10x	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)

2.1.5 Stammlösungen

DEPC-Wasser	1 ml DEPC
	1000 ml H ₂ O
	Autoklavieren

FA-Puffer 10x	41,85 g 3-MOPS 4,102 g Natrium Acetat 2,92 g EDTA ad 1000 ml H ₂ O
LARS	2 ml 1 M Glycylglycine 1 ml 100 mM MgCl ₂ 20 µl 500 mM EDTA 50.8 mg DTT 27.8 mg ATP 21.3 mg Coenzym A
LB-Medium	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt
PBS-Puffer (pH 7,2)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml H ₂ O
Natriumphosphat 0,1 M (pH 7,5)	41 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 9 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 50 ml H ₂ O
TAE-Puffer	48,4 g Sigma 7-9 20,82 g EDTA Na 11,42 ml Eisessig ad 1000 ml H ₂ O

2.1.6 Enzyme

<i>MultiScribe</i> TM Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
Hind III	Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase (M-MLV)	Promega, Mannheim
Spe I	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	Invitrogen, Darmstadt
Taq-Polymerase	Axon, Kaiserslautern

2.1.7 Oligonukleotide

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

<i>BDNF_forward</i>	5'-GGC AGG TTC GAG AGG TCT GA-3'
<i>BDNF_reverse</i>	5'-CGC TGT GAC CCA CTC GCT AA-3'
<i>GAPDH_forward</i>	5'-CAT TGT TGC CAT CAA CGA CC-3'
<i>GAPDH_reverse</i>	5'-TCA CAC CCA TCA CAA ACA TG-3'
<i>miR-1_forward</i> HindIII	5'-AGT CGT <u>AAG CTT</u> TCA ATC TCT AAC AAG CTA ATC TCT-3'
<i>miR-1_reverse</i> EcoRI	5'-AGT CGT <u>GAA TTC</u> TTG ACA GTA GGT TAA TCC AAA GT-3'
<i>miR-1_forward</i> BsrGI	5'-agcgt gtaca agTAA CAA GCT AAT CTC TGC ACA-3'
<i>miR-1_reverse</i> EcoRI	5'-agtcgt gaattc TTG ACA GTA GGT TAA TCC AAA GT-3'
<i>miR-1 Bindungsregion</i>	5'- <u>CTAGT</u> TT AAA AGT CTG CAT TAC ATT CCT ACA TTG TAG AAA ATT TGA ACC AAA ACAT TCC G ACA TTG TAG GGA ATG GTA CTT GAG ACA TTC CTA-3'

5'-AGCTT AGG AAT GTC TCA AGT ACC ATT CCC **TAC AAT**
GT CGG AAT GTT TTG GTT CAA ATT TTC **TAC AAT GT** AGG
 AAT GTA ATG CAG ACT TTT AAA-3'

miR-1 Bindungsregion
 (mutiert)

5'-*CTA GTT* TAA AAG TCT GCA TTA *TAT TGA* TAC ATT GTA
 GAA AAT TTG AAC CAA AAT ATT *GAG* **ACA TTG TAG** GGA
 ATG GTA CTT GAG *ATA TTG* ATA-3'

5'-*A GCT TAT* CAA TAT CTC AAG TAC CAT TCC **CTA CAA**
TGT *CTC AA TAT TTT* GGT TCA AAT TTT **CTA CAA TGT** *ATC*
 AAT ATA ATG CAG ACT TTT AAA-3'

2.1.8 Vektoren

pcDNA3.1-Plasmid

Invitrogen, Darmstadt

pMIR-Report-Luciferase-Plasmid

Invitrogen, Darmstadt

pMIR-Report-βgal-Control-Plasmid

Invitrogen, Darmstadt

pFUGW Expressionsplasmid

pCMVΔR8.91 Packungsplasmid

pCMVG Expressionsplasmid

freundlicherweise zur Verfügung gestellt
 von Prof. Dr. G. Thiel, Institut für
 Medizinische Biochemie und
 Molekularbiologie der Medizinischen
 Fakultät der Universität des Saarlandes

2.1.9 Materialien für die Zellkultur

Zelllinie: HEK 293

American Type Culture Collection, Wesel

Zelllinie: HEK 293T/17

American Type Culture Collection, Wesel

Zelllinie: U87 Glioblastomzellen	American Type Culture Collection, Wesel
DMEM (mit Glukose)	Pan Biotech, Aidenbach
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Penicillin/ Streptomycin	Pan Biotech, Aidenbach
Trypsin/ EDTA	Pan Biotech, Aidenbach

2.1.9.1 Verbrauchsmaterial

0,45 µm Spritzenfilter	Carl Roth, Karlsruhe
13/ 15/ 50 ml konische Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
60 mm Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
175 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	TPP, Trasadingen (Schweiz)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Herzgewebeproben stammen aus einer tierexperimentellen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe. Das experimentelle Protokoll wurde mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen durchgeführt (Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung: AZ 8.87-50.10.37.09.148). Ausgewachsene männliche Wistar-Ratten wurden mittels intraperitonealer Pentobarbital-Injektion (80 mg/kg Körpergewicht, Erhaltungsdosis 40 mg/kg pro Stunde) über einen rechtsseitigen Jugulariskatheter narkotisiert. Nach linksseitiger lateraler Thorakotomie und Perikardiotomie wurde der RIVA mittels chirurgischer Naht (5/0) umschlossen.

Die Tiere wurden in vier Gruppen zu je sechs Tieren (n=6) randomisiert: Sham, RIPC, RIPC mit anschließender I/R, Kontrollgruppe mit ausschließlicher I/R. Die RIPC erfolgte in vier Intervallen über je fünf Minuten mittels Blutdruckmanschetten an beiden Hinterläufen, die myokardiale Ischämie durch 35-minütigen Verschluss des RIVA. Nach zweistündiger Reperfusionzeit wurden die Herzen entnommen (Abb.3). Vor Organentnahme wurde den Versuchstiergruppen, bei denen eine I/R durchgeführt wurde, bei verschlossenem RIVA 5-10 ml Evans Blue injiziert, um die *Area at Risk* (AAR), das Areal, das direkt im Einflussgebiet des RIVA liegt, von dem Gewebe der *non AAR* (durch Evans Blue angefärbt) differenzieren und separat untersuchen zu können. Die myokardialen Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

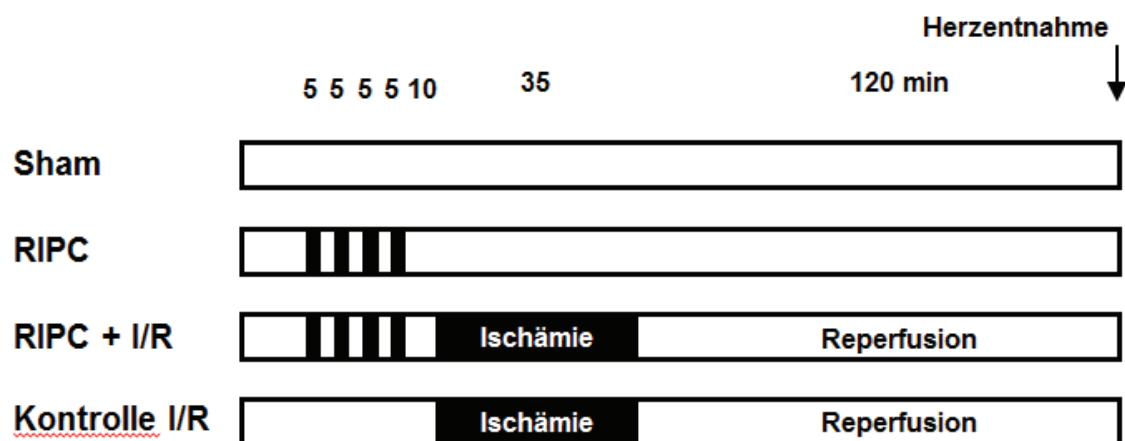


Abbildung 3: Schematische Darstellung des RIPC-Versuchsprotokolls mit den randomisierten Tiergruppen Sham, RIPC, RIPC Ischämie/Reperfusion und Kontrolle Ischämie/Reperfusion (n=6 pro Gruppe). Narkotisierung und Thorakotomie in allen Versuchstiergruppen, in den Gruppen RIPC und RIPC + I/R Fernpräkonditionierung über Okklusion der Arteria femoralis mittels Blutdruckmanschette in 4 Zyklen für je 5 Minuten und 5-minütiger Reperfusion, 10 Minuten Reperfusion, 35 Minuten myokardiale Ischämie in den Gruppen RIPC + I/R und Kontrolle I/R durch Abbinden der linken Koronararterie, 120 Minuten Reperfusion mit anschließender Organentnahme. [modifiziert nach ^[48]]

2.2.1.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte aus den myokardialen Gewebeproben des in 2.2.1 beschriebenen RIPC-Versuchsprotokolls.

Für die RNA-Isolierung wurden 50-100 mg gefrorenes Gewebe mit dem Potter pulverisiert, in 1 ml Trizol homogenisiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, die Lösung vermenget und erneut zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 12.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, um sie mit 0,5 ml Isopropanol zu mischen und erneut zehn Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Es folgten ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 12.000 g und 4 °C für 30 Minuten mit Verwerfen des Überstandes und das Reinigen der RNA mit 1 ml 75 prozentigem Ethanol und Zentrifugation bei 7.500 g und 4 °C. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Nach Abnehmen des Überstandes wurde die RNA bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde die RNA durch Zugabe von 100 µl 60 °C heißem RNase-freiem Wassers aufgelöst. Die RNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop Photospektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific quantifiziert. Vor jeder Messreihe wurde eine Negativprobe mit RNase-freiem Wasser durchgeführt.

Mittels Agarosegel wurde die Intaktheit der RNA überprüft. Hierzu wurde ein Gel aus 1,8 g Agarose, 15 ml Formaldehyd (FA)-Puffer und 135 ml DEPC-Wasser hergestellt. Nach Erhitzen wurden 3 µl Ethidiumbromid und 2,7 ml FA hinzugefügt. Von den RNA-Proben wurden 2,5 µg in 15 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser angesetzt, mit 3 µl *Loading Buffer* vermischt und zehn Minuten auf 70 °C erhitzt. Die Proben wurden aufs Gel aufgetragen und mit einer Spannung von 120 Volt für etwa eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt. Bei intakter RNA stellte sich diese im Gel als zwei einzelne Banden dar, die 18S und 28S Untereinheit der ribosomalen RNA. Die RNA-Proben wurden nach erfolgreicher RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert. Für die weitere Verwendung ergaben sich sechs Probengruppen mit je n=6 (Tab. 1).

Probe	Name
1	Sham
2	RIPC
3	RIPC I/R AAR
4	RIPC I/R non AAR
5	Kontrolle I/R AAR
6	Kontrolle I/R non AAR

Tabelle 1: RNA-Probengruppen aus dem RIPC-Versuchsprotokoll zur Durchführung von qPCR und ELISA. AAR = *Area at risk* , I/R= Ischämie/Reperfusion.

2.2.1.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist eine Methode, um RNA in komplementäre DNA umzuschreiben. Es erfolgte die Umschreibung der RNA, die mittels RNA-Isolierung gewonnen wurde. Für die Durchführung verwendeten wir zwei unterschiedliche Protokolle.

Für die in Kapitel 2.2.1.6 beschriebene Klonierung wurde die RNA im Rahmen einer klassischen Polymerasekettenreaktion (PCR) umgeschrieben. Hierzu wurden 2 µg RNA mit 1 µl *Random Primer* fünf Minuten auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurden 5 µl Puffer, 1,25 µl dNTPs, 0,75 µl RNase-Inhibitor und 1 µl reverse Transkriptase hinzugefügt und mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Das Reagenziengemisch wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Zur RNA-Umschreibung in DNA für die anschließende Durchführung einer qPCR wurde der *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* der Firma Applied Biosystems verwendet. Um den *Master Mix* zu erstellen wurden zehnfach *Random Primer*, 100 mM dNTPs, *Multiscribe*TM reverse Transkriptase, zehnfach reverser Transkriptionspuffer und Nuklease-freies Wasser pipettiert. Pro Reaktion wurden je 10 µl *Master Mix* und 10 µl RNA zusammengefügt. Alle RNA-Proben wurden zuvor auf eine Konzentration von 1 µg/ 10µl verdünnt. Die Umschreibung erfolgte im PCR-Cycler bei 25 °C für zehn

Minuten, bei 37 °C für 120 Minuten und durch abschließendes Erhitzen der Proben auf 85 °C für fünf Minuten. Nach Beenden der Reaktion wurden die DNA-Proben zur weiteren Verwendung für die qPCR bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3 Konventionelle Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient der millionenfachen Replikation eines spezifischen DNA-Abschnittes. Die Reaktion wird in die Schritte Denaturieren, Primerhybridisierung und DNA-Synthese eingeteilt. Die Anzahl der Zykluswiederholungen entspricht Erfahrungswerten für die jeweiligen Primer.

Die notwendigen Reagenzien (Tab. 2) wurden pipettiert und der PCR-Cycler für die Reaktionsdurchführung genutzt.

Die konventionelle PCR nutzen wir als Grundlage für die in Kapitel 2.2.1.6 beschriebene Klonierung. Hierfür wurde die miR-1 mittels PCR amplifiziert.

Es galten folgende Reaktionsbedingungen: initiale Denaturierung (95 °C, 15 min), 35 Zyklen mit den Phasen Denaturierung (95 °C, 30 s), Primerhybridisierung (58 °C, 30 s), DNA-Synthese (72 °C, 30 s) und Abschluss der Reaktion (72 °C, 10 min).

Komponente		Volumen (µl)
10x Puffer		2,5
dGTP	je 10 mM	1,0
dATP		
dTTP		
dCTP		
Taq Polymerase		0,25
25 mM MgCl ₂		2,0
Primer <i>forward</i>	je 100 pmol/µl	0,5
Primer <i>reverse</i>		0,5
DNA		1
H ₂ O		ad 25

Tabelle 2: Komponenten mit jeweiliger Konzentrations- und Volumenangabe zur Durchführung einer konventionellen PCR. Volumenangabe in µl, Gesamtvolumen pro Reaktionsgefäß 25 µl. dGTP =

Desoxyguanosintriphosphat, dATP = Desoxyadenosintriphosphat, dTTP = Desoxythymidintriphosphat, dCTP = Desoxycytidintriphosphat

Anschließend an die PCR wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. Hierzu wurde zunächst mit TAE-Puffer und Agarose eine 1,5-prozentige Agaroselösung aufgeköcht und pro 35 ml Gel je 1 µl EtBr hinzugefügt. Nach auskühlen und aushärten des Gels wurden die DNA-Proben, unter Zugabe von Orange G Puffer, aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Größenbestimmung diente ein 100 bp Marker. Für jede PCR wurde eine Negativprobe erstellt, die anstatt der DNA H₂O enthielt. Je nach Größe des Gels erfolgte die Elektrophorese bei 90 Volt (70 ml Gel) oder 130 Volt (130 ml Gel) für etwa 60 Minuten. Die EtBr-gefärbte DNA wurde im UV-Licht sichtbar und mit einem Kamerasystem ausgewertet.

2.2.1.4 Real-time PCR

Zur Durchführung der *real-time* PCR, auch quantitative PCR (qPCR) genannt, wurden Taqman[®]-Sonden verwendet. Hierbei wird zusätzlich zu den Primern eine Sonde in Form eines Oligonukleotids eingesetzt, die an den DNA-Einzelstrang bindet. Am 5'- und am 3'-Ende dieser Sonde sind je ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluochrom), genannt *reporter* und *quencher*, lokalisiert. Durch Licht wird der *reporter* angeregt und gibt seine Energie in Form von Licht einer veränderten Wellenlänge wieder ab. Befinden sich *reporter* und *quencher* in räumlicher Nähe, gibt der *reporter* seine Energie an den *quencher* weiter. Während der DNA-Doppelstrangsynthese werden *reporter* und *quencher*, durch Abbau der Sonde, räumlich voneinander getrennt und die vom *reporter* abgegebene Energie kann gemessen werden. Je mehr DNA entsteht, desto höher ist die messbare Fluoreszenz.

Wir verwendeten den TaqMan[®] Gene Expression Assay für BDNF (Assay ID: 02531967_s1) und GAPDH (Assay ID: 01775763_g1), sowie den notwendigen Master Mix nach dem Protokoll der Firma Applied Biosystems (Tab. 3).

Komponente	Volumen (μ l)
TaqMan® Gene Expression Assay (20x)	1
DNA	4
TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix	10
Nuklease-freies Wasser	5
Gesamtvolumen	20

Tabelle 3: Komponenten und Volumenangabe des TaqMan® Gene Expression Assay zur Durchführung einer qPCR. Volumenangabe in μ l, Gesamtvolumen pro Reaktionsgefäß 20 μ l.

In allen Versuchsreihen wurden die verwendeten Proben mit je n=6 pipettiert und die Versuchsreihe insgesamt in dreifacher Ausführung angelegt. Als *Housekeeping-Gene* diente GAPDH zur Normierung der BDNF-Expression. Der Thermocycler wurde mit folgenden Reaktionsbedingungen programmiert: zwei Minuten bei 50 °C, zehn Minuten bei 95 °C, 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95 °C und 60 Sekunden bei 60 °C.

Die relative BDNF-Expression wurde mittels der $\Delta\Delta$ Ct-Methode und unter Nutzung des *relative Expression Software tool* (REST) berechnet. ^[160]

2.2.1.5 ELISA

Das ELISA-Verfahren dient dem quantitativen Nachweis der Expression von Proteinen.

Die Grundlage hierfür sind farbstoffgekoppelte Antikörper-Reaktionen.

Unter der Annahme, dass die miR-1 hemmend auf die BDNF-Expression wirkt, wurde die Proteinexpression von BDNF mittels ELISA bestimmt.

Es wurde das BDNF Emax® ImmunoAssay System, sowie das dazugehörige Versuchsprotokoll der Firma Promega verwendet.

Eine 96-Well ELISA-Platte wurde mit Antikörper bedeckt. Damit der Antikörper auf der Platte haften blieb, wurden Anti-BDNF-Antikörper und *Coating* Puffer (0,025 M Natriumbicarbonat, 0,025 M Natriumcarbonat, pH 9,7) in jedes Well gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zwölf bis 18 Stunden wurde die Platte einmal gewaschen. Anschließend wurde eine Mischung aus *Block-* und *Sample-*Puffer aufgetragen, die Platte eine Stunde inkubiert und gewaschen.

Für diese Arbeit wurden zwei Versuchsreihen mit dem BDNF-ELISA durchgeführt. Zum einen wurden die myokardialen Proben aus dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen RIPC-Versuchsprotokoll verwendet [in Lyse-Puffer (20 mM Tris-Puffer, pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 10% Glycerol, 1 mM Phenylmethanesulfonylfluorid, 0,5 mM Natriumvanadat, 10 µM Aprotinin, 100 µM Leupeptin) gelöst] (Tab. 1, Kapitel 2.2.1.1). Zum anderen wurde als Probe der Zellüberstand einer lentiviralen Transduktion verwendet, die in Kapitel 2.2.4 näher erläutert wird (n=4).

Es wurde eine BDNF-Standardreihe mit einer Anfangskonzentration von 1:2000 und schrittweiser 1:2-Verdünnung erstellt. In die anderen *Wells* wurden je 100 µl des Gewebelysats pipettiert und die Platte wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte insgesamt fünf Mal gewaschen. Anschließend wurde der Anti-BDNF-Antikörper aufgetragen, die Platte wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und fünf Mal gewaschen. Schließlich wurde der Antikörper gegen BDNF-AK aufgetragen. Es erfolgte eine letzte Inkubationsphase von einer Stunde und fünffaches Waschen der Platte. Während dieser letzten Inkubation wurde die TMB-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) bei Raumtemperatur equilibriert. Zuletzt erfolgte die Zugabe der TMB-Lösung auf die ELISA-Platte, nach zehn Minuten wurde die Reaktion durch das Hinzugeben von Salzsäure gestoppt und die Platte im *Plate Reader* bei 450 nm gemessen. Der Farbumschlag der enzymatischen Reaktion gilt als proportional zur Konzentration des Proteins in der jeweiligen Probe. Daher ist der ELISA eine Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis.

2.2.1.6 Klonierung

Der Vorgang der Klonierung beschreibt den Einbau eines spezifischen DNA-Abschnittes in einen Vektor und die anschließende Multiplikation dieses Vektors.

Dieses Verfahren war notwendig, um die transiente Transfektion von HEK 293-Zellen und den *Luciferase-Reporter-Assay* (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4) sowie die lentivirale Transduktion (Kapitel 2.2.5) mit der miR-1 durchführen zu können.

Für die eigentliche Klonierung benötigt man die gewünschte DNA-Sequenz der miR-1 (Genbank: NR_032116.1). Die Sequenz wurde mittels PCR aus den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Gewebeprobe gewonnen. Die Klonierung bestand aus mehreren Schritten.

2.2.1.6.1 Vorbereitung Klonierung (Luciferase-Reporter-Assay)

Für die in Kapitel 2.2.3 beschriebene Transfektion von HEK 293-Zellen wurde die miR-1 in einen pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor einkloniert.

Für die PCR der 296 bp großen miR-1-Sequenz nutzten wir einen *forward-Primer* mit HindIII-Restriktionsstelle (5'-AGT CGT AAG CTT TCA ATC TCT AAC AAG CTA ATC TCT-3') und einen *reverse-Primer* mit EcoRI-Restriktionsstelle (5'-AGT CGT GAA TTC TTG ACA GTA GGT TAA TCC AAA GT-3') (Restriktionsstellen unterstrichen).

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben, gemeinsam mit einem 100 bp-Marker, auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mit dem QIAEX II - Kit nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert (Qiagen, Hilden).

Zusätzlich wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert, die jeweils die drei potenziellen Bindungsstellen der miR-1 in der 3'-UTR der BDNF mRNA enthielten (5'-CTAGT TT AAA AGT C TG CAT TAC ATT CCT **ACA TTG TAG** AAA ATT TGA ACC AAA ACAT TCC G **ACA TTG TAG** GGA ATG GTA CTT GAG ACA TTC CTA-3' und 5'-AGCTT AGG AAT GTC TCA AGT ACC ATT CCC **TAC AAT GT** CGG AAT GTT TTG GTT CAA ATT TTC **TAC AAT GT** AGG AAT GTA ATG CAG ACT TTT AAA-3') (Restriktionsstellen unterstrichen, fett gekennzeichnet Separationsregionen der drei potenziellen Bindungsstellen). Das hybridisierte doppelsträngige DNA-Fragment wurde, mit den Enzymen HindIII und SpeI, in den unten aufgeführten Schritten am 3'-Ende des *Firefly* Luciferase Gens in einen pMIR-REPORT-Luciferase-Expressionsvektor einkloniert (pMIR + WT BDNF; WT = Wildtyp). Als negative Kontrolle wurden die potenziellen Bindungsstellen in gleicher Weise in einen Vektor einkloniert, mit dem Unterschied, dass hierbei die Bindungsstellen unterbrochen wurden (5'-*CTA GT T TAA AAG TCT GCA TTA TAT TGA TAC ATT GTA GAA AAT TTG AAC CAA AAT ATT GAG* **ACA TTG TAG** GGA ATG GTA CTT GAG ATA TT G ATA-3'

und 5'-A GCT T A T CAA T AT CTC AAG TAC CAT TCC **CTA CAA TGT C TC** AA TAT TTT GGT TCA AAT TTT **ctacaatgt** A TC AAT ATA ATG CAG ACT TTT AAA-3') (mutierte Nukleotide kursiv) (pMIR + mut BDNF; mut = mutiert).

2.2.1.6.2 Vorbereitung Klonierung (lentivirale Transduktion)

Für die lentivirale Transduktion wurde die miR-1 in einen pFUGW-Vektor inkloniert.

Für die PCR der 288 bp großen miR-1-Sequenz nutzten wir einen *forward-Primer* mit BsrGI-Restriktionsstelle (5'-agcgt**ttgtaca**agTAA CAA GCT AAT CTC TGC ACA-3') und einen *reverse-Primer* mit EcoRI-Restriktionsstelle (5'-agtcgt**gaattc**TTG ACA GTA GGT TAA TCC AAA GT-3') (Restriktionsstellen fett).

Äquivalent zum Vorgehen in Kapitel 2.2.1.6.1 wurden die Proben im Anschluss an die PCR auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA extrahiert.

2.2.1.6.3 Ligation

Die nachfolgenden Schritte der Klonierung (bis einschließlich Kapitel 2.2.1.6.5) wurden für alle Vektoren in gleicher Weise durchgeführt.

Um die spezifischen DNA-Abschnitte in ein Plasmid einzuklonieren, wurden die Vektoren (pcDNA3.1(+), pMIR-REPORT-Luciferase und pFUGW) mit entsprechenden Enzymen geschnitten. Wir verwendeten die beiden Restriktionsenzyme Hind III und SpeI. Diese Enzyme erzeugen sog. *cohesive ends* mit einer Art Überhang, sodass zwischen geöffnetem Plasmid und der einzufügenden DNA komplementäre Enden bestehen.

Um die DNA ins Plasmid einzuklonieren, wurden das Enzym Ligase und ein spezieller Ligase-Puffer verwendet.

Für die Reaktion wurden die DNA (das sogenannte *Insert*) und das Plasmid (der sogenannte Vektor) in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Dieses Verhältnis wurde gewählt, um einen Wiederverschluss der Plasmide aufgrund von zu geringer *Insertmenge* zu verhindern. Zu DNA und Vektor wurden 4 µl Ligase-Puffer und 1 µl Ligase (1 U/µl) hinzugefügt und mit Wasser auf eine Gesamtmenge von 20 µl pipettiert. Die Reagenzien wurden durchmischt und eine Stunde bei Raumtemperatur

inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 1 µl 0,5 M EDTA-Lösung inaktiviert.

Parallel zur Ligationsreaktion wurde jeweils eine entsprechende Negativprobe durchgeführt. Hierbei wurden die gleichen Reagenzien mit Ausnahme des *Inserts* verwendet.

2.2.1.6.4 Transformation und Selektion

Für die Transformation, das Einbringen des Plasmids mit integrierter miR-1-DNA bzw. integrierter miR-1-Bindungsregion und die Multiplikation in Bakterienzellen, verwendeten wir kompetente Zellen des Stammes *Escherichia coli*-XL1-blue.

Es wurden 8 µl der Ligationsreaktion mit 100 µl der kompetenten Zellen vermischt und 30 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte für zehn Minuten ein Hitzeschock bei 37 °C. Danach wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt, die Mischung eine Stunde unter Bewegung bei 37 °C inkubiert und für fünf Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, um die Zellen zu ernten. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert.

Auf zuvor hergestellten 1,5 prozentigen Agarplatten (1,5 g Agar-Agar pro 100 ml LB-Medium), die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, wurden die Zellen mit einem Glasspatel ausgestrichen. Zu jeder Agarplatte wurde eine entsprechende Kontrolle mit der Negativprobe der Ligationsreaktion ausgestrichen. Die Zellen, die erfolgreich transformiert wurden, also diejenigen Zellen, die nach der Reaktion das Plasmid enthielten, konnten aufgrund einer auf dem Plasmid integrierten Resistenz gegen Ampicillin auf den Agarplatten wachsen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag wurde die Anzahl an Kolonien ausgewertet.

2.2.1.6.5 DNA-Gewinnung

Nach erfolgreicher Transformation wurde die reine DNA der miR-1 bzw. der miR-1-Bindungsregion isoliert. Hierfür wurden je drei Kulturen von den Platten entnommen und über Nacht in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Die Kulturplatten wurden nach Entnahme bei 4 °C gelagert.

Die DNA-Isolation erfolgte durch verschiedene Wasch- und Zentrifugationsschritte nach dem Protokoll und mit dem Material des Miniprep Kits (Qiagen, Hilden). Zur Kontrolle der korrekten Plasmidisolierung wurden eine PCR und ein Agarosegel mit 100 bp-Marker zur Größenkontrolle angefertigt. Die DNA-Konzentration der Proben wurde mittels NanoDrop quantifiziert.

Für die abschließende Beurteilung der DNA-Abschnitte wurden Proben im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) Leiter: Prof. Dr. Karl Köhler) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sequenziert. Das Ergebnis wurde mit Hilfe des Computerprogramms *CHROMAS* Version 1.45 (Technelysium, DNA Sequencing Software, South Brisbane, Australia) mit der jeweiligen Originalsequenz abgeglichen.

Nach erfolgreicher Sequenzkontrolle wurden von den erhaltenen Kulturplatten nochmals drei Kulturen in LB-Medium über Nacht inkubiert und ein Maxiprep durchgeführt (Qiagen, Hilden), um eine größere Menge der DNA zu sichern und in einem Glycerol-Stock (800 µl Bakteriensuspension + 200 µl Glycerol) bei -80 °C zu konservieren. Nach Abschluss des Maxipreps wurde die Konzentration der DNA-Probe erneut mit Hilfe eines NanoDrop quantifiziert.

2.2.2 Methoden in der Zellkultur

2.2.2.1 allgemeine Kulturbedingungen

Für die nachfolgend beschriebenen Methoden wurden HEK 293-Zellen (embryonale menschliche Nierenzellen), HEK 293T/17-Zellen (embryonale menschliche Nierenzellen) sowie U87-Zellen (humane Glioblastom-Zelllinie) verwendet, die permanent bei 37 °Celsius und 5 % CO₂ kultiviert wurden. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10 % inaktiviertem FCS und 50 U/ml Penicillin/ 50 µg/ml Streptomycin verwendet. Alle Verfahren wurden in der sterilen Werkbank durchgeführt.

2.2.2.2 Splitten der Zellen

Die Zellen wurden bei einer Dichte von maximal 80 % gesplittet. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine 175 cm² Kulturflasche. Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden 4 ml Trypsin für drei Minuten zu den Zellen gegeben. Durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurde die Trypsinreaktion gestoppt. Von der Zellsuspension wurden zwischen 0,5 und 2 ml in der Flasche belassen und mit 25 ml frischem Kulturmedium versorgt. Dieser Vorgang wurde alle drei bis vier Tage wiederholt.

2.2.2.3 Zellzählung

Wie für das Splitten der Zellen beschrieben, wurde zunächst das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit 37 °C warmem Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und es wurden 30 µl der Zellsuspension in einer Zählkammer quantifiziert. Vitale Zellen (Ausschluss von Trypanblau) wurden in einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop gezählt und das Volumen der Zellsuspension für 1×10^6 Zellen pro 60 mm Kulturplatte berechnet. Das Gesamtvolumen wurde mit Kulturmedium auf 4 ml pro Kulturplatte aufgefüllt.

2.2.3 Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen

Die potenziellen Bindungsstellen der miR-1 wurden in einen pMIR-REPORT-Luciferase-Expressionsvektor und die PCR-amplifizierte miR-1 in einen pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor inkloniert (siehe Kapitel 2.2.1.6). Für die Versuchsreihe wurden HEK 293-Zellen mit diesen beiden o.g. Plasmiden kotransfiziert. Als internes Kontrollplasmid wurde der pMIR-REPORT β -Galaktosidase-Vektor verwendet. Als Kontrolle diente ein weiterer pMIR-REPORT Luciferase-Expressionsvektor ohne miR-1-Bindungsregion. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuchsreihen mit je vier

Kulturplatten pro transfiziertem Plasmid durchgeführt (n=4). Zwei Stunden vor Transfektion wurde das Kulturmedium der Zellen erneuert. Es wurde der DNA-Mix bestehend aus 10 µg pcDNA 3.1-miR-1 (Abb.4), 1 µg pMIR + WT BDNF oder 1 µg pMIR + mut BDNF (Abb. 5) sowie 1 µg pMIR-REPORT β -Galactosidase (Abb. 6) mit Wasser auf 990 µl aufgefüllt und mit 110 µl Calciumchlorid vermischt. Dieser DNA-Mix wurde langsam mit einer Pipette in 1100 µl HBSS getropft. Das HBSS wurde für jeden Versuchsablauf frisch angesetzt: HBSS wurde 1:2 mit Millipore-Wasser verdünnt und auf einen pH von exakt 7,08 eingestellt. Je 500 µl dieser Gesamtmischung wurden auf eine 60 mm Kulturplatte mit Zellen pipettiert. Die Platten wurden leicht geschwenkt. Als Hinweis für eine erfolgreiche Transfektion waren schwarze Präzipitate des Calciumchlorids unter dem Mikroskop darstellbar.

Die Zellen nehmen die Plasmide vermutlich per Endozytose auf, der genaue Mechanismus ist jedoch bisher nicht geklärt.

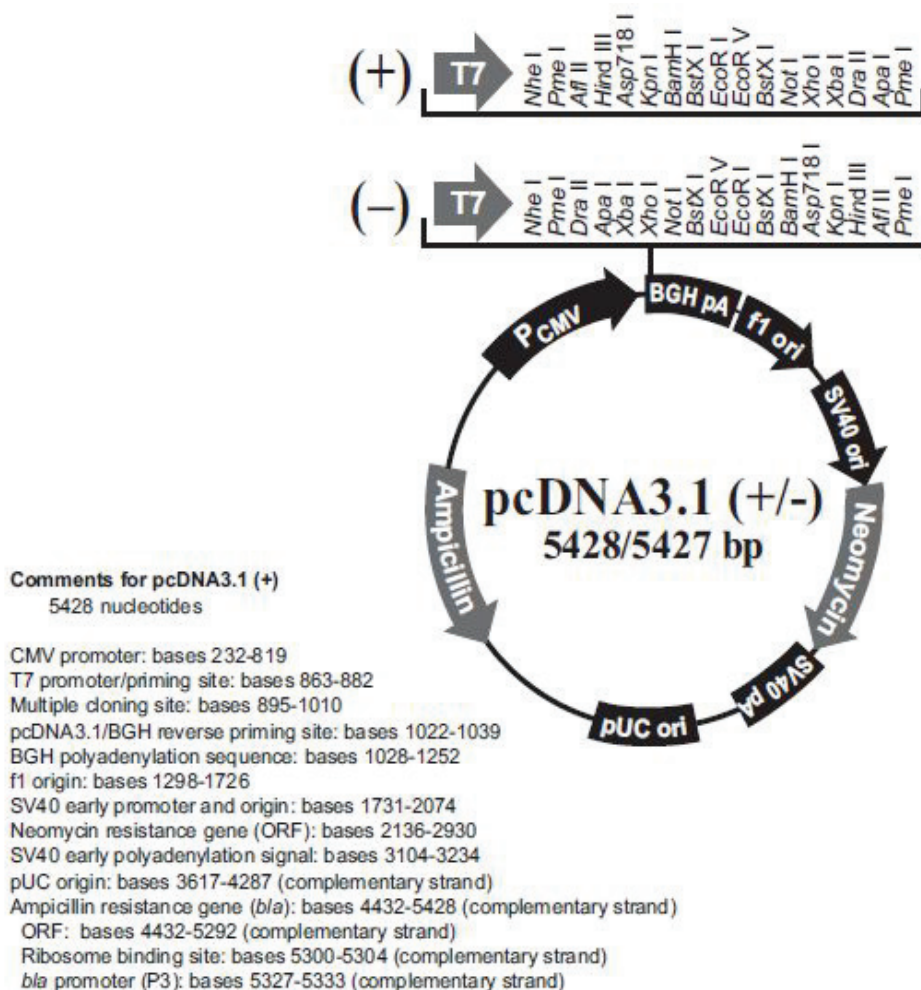


Abbildung 4: pcDNA3.1-Plasmid der Firma Invitrogen, das zur Transfektion der miR-1 verwendet wurde. 5428 Basenpaare umfassendes Plasmid, dargestellt sind die einzelnen Sequenzen des Plasmids: Promotorregionen CMV (Cytomegalievirus), SV40 (*Simian Virus 40*) und BGH (*bovine growth hormone*), Ampicillin- und Neomycinresistenzgen, Ausgangspunkte der Replikation f1, pUC und SV40, sowie die Enzymrestriktionsstelle zur Einklonierung von DNA. ORF = *open reading frame*. (nach Invitrogen, User manual, Catalog nos. V790-20 and V795-20, Version K, 10 November 2010, 28-0104)

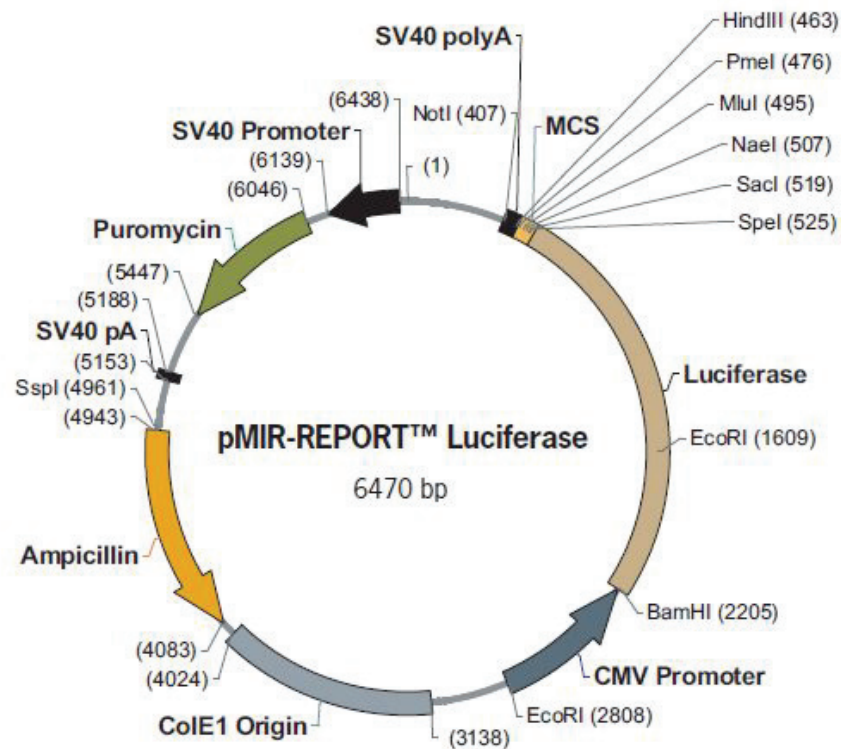


Figure 1. pMIR-REPORT Luciferase

CMV Promoter: 2210–2813
 Firefly luciferase: 540–2210
 MCS: 467–539
 SV40 Poly(A): 404–467
 SV40 Promoter: 6139–6438

Puromycin: 5447–6046
 SV40 pA signal: 5153–5188
 Ampicillin: 4083–4943
 ColE1 Origin: 3138–4024

Abbildung 5: pMIR-Report-Plasmid der Firma Invitrogen, das zur Transfektion der miR-1 Bindungsregion (BDNF) verwendet wurde. 6470 Basenpaare umfassendes Plasmid, dargestellt sind die einzelnen Sequenzen des Plasmids: Promotorregionen CMV (Cytomegalivirus) und SV40 (*Simian Virus 40*), Restriktionsenzymschnittstelle MCS (*multiple cloning site*) und Restriktionsenzymschnittstellen der Enzyme EcoRI, BamHI, SspI und NotI, Ampicillin- und Puromycinresistenzgen, Ausgangspunkte der Replikation SV40 und ColE1 (*Colicin E1*) sowie die Luciferase-Region (nach Applied Biosystems, User manual pMIR-Report™ System Part Number AM5795).

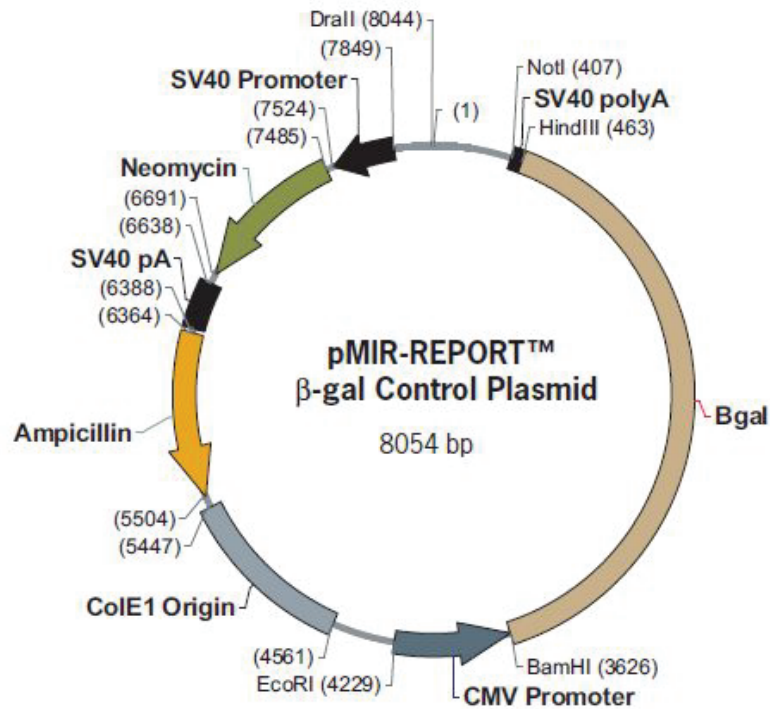


Figure 2. pMIR-REPORT β -gal Control Plasmid

CMV Promoter: 3627–4232

β -gal: 463–3627

SV40 Poly(A): 404–463

SV40 Promoter: 7524–7849

Neomycin: 6691–7485

SV40 pA signal: 6388–6638

Ampicillin: 5504–6364

ColE1 Origin: 4561–5447

Abbildung 6: pMIR-Report- β -gal-Control-Plasmid der Firma Invitrogen, das bei der Transfektion

verwendet wurde: 8054 Basenpaare umfassendes Plasmid, dargestellt sind die einzelnen Sequenzen des Plasmids: Promotorregionen CMV (Cytomegalievirus) und SV40 (*Simian Virus 40*), Restriktionsenzymststellen (Drall, NotI, HindIII, BamHI und EcoRI), Ampicillin- und Neomycinresistenzgen, Ausgangspunkte der Replikation SV40 und ColE1 (*Colicin E1*), sowie β -Galactosidase-Region (nach Applied Biosystems, User manual, pMIR-Report™ System, Part Number AM5795).

2.2.3.1 Zellernte

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden die Zellen mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen. Es wurde erneut 1 ml PBS-Puffer hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte gelöst.

Die Zellsuspension wurde mit 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50 μ l 1 x Reporter Lysis Puffer aufgelöst. Die

Suspension wurde 15 Minuten zentrifugiert und der entstandene klare Überstand wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, um damit die Luciferase- und β -Galactosidase-Messungen durchzuführen.

2.2.4 Luciferase-Reporter-Assay

Für die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität wurden transparente 96-Well-Platten verwendet.

Es wurde für jedes *Well* ein *Master Mix* aus 3 μ l Magnesiumchlorid, 66 μ l 1 x ONPG und 201 μ l 0,1 M Natriumphosphat erstellt. Zu diesem *Mix* wurde 30 μ l Zellextrakt hinzugefügt. Vor der Messung wurde die Platte für zehn bis 15 Minuten bei 37 °C inkubiert bis eine leicht gelbe Färbung der Lösung entstand. Die Absorption der Proben wurde im *Plate Reader* (Synergy 2, Biotek) bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen (A_{420}). Für die spätere statistische Auswertung per t-Test wurden die β -Galactosidase-Einheiten berechnet. Eine definierte Konstante von 380 für den ONPG-Umsatz der β -Galactosidase wurde miteinbezogen.

$$\beta\text{-Galactosidase-Einheit} = \frac{380 \times A_{420}}{\text{Zeit (min)}}$$

Für die Messung der Luciferase-Signale wurden weiße 96-Well-Platten verwendet, da sich die Signale in einer transparenten Platte gegenseitig beeinflussen würden. Um optimale Reaktionsbedingungen zu erzielen, wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Es wurde für jedes *Well* ein *Master Mix* erstellt. Dieser enthielt 86,73 μ l LARS, 3,27 μ l DTT und 10 μ l Luciferin. Außerdem wurden 5 μ l RLB und 5 μ l Zellextrakt in jedes *Well* pipettiert. Zuletzt wurde mit einer Mehrkanal-Pipette zügig die Luciferin-Lösung in die *Wells* gegeben, da die Luciferase-Reaktion sofort stattfindet und die Lumineszenz instabil ist. Die Proben wurden im *Plate Reader* bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Dieser Assay beruht darauf, dass bei molekularer Interaktion die miR-1 an die 3'-UTR der BDNF mRNA bindet. Wenn dies der Fall ist, wird das Luciferase-Signal schwächer, da die Luciferase auf demselben Plasmid wie die miR-1-Bindungsregion lokalisiert ist.

In der Kontrollreihe, bei der eine Kotransfektion von miR-1 und mutierter miR-1-Bindungsregion vorgenommen wurde, kommt es zu keiner Bindung, das Luciferase-Signal bleibt unverändert und dient der Messung als Kontrollwert.

2.2.5 Lentivirale Transduktion

Das Prinzip der lentiviralen Transduktion beruht grundsätzlich auf der Eigenschaft der Lentiviren, in Zellen einzudringen und so Fremd-DNA, in unserem Versuchsmodell den zuvor klonierten pFUGW miR-1-Expressionsvektor, in die Zellen einzuschleusen. Zunächst wurden mit Hilfe von sogenannten Packungszellen intakte Viruspartikel entsprechend dem Protokoll von Lois et al. erzeugt.^[161] Die HEK 293T/17-Packungszellen wurden, wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, gezählt und anschließend in einer Zahl von $2,2 - 2,3 \times 10^6$ pro 60 mm Platte mit je 4 ml Medium ausplattiert. Es erfolgte eine Kultivierung über ein bis zwei Tage bis zu einer Konfluenz von 80 – 90 %. Anschließend erfolgte die Transfektion der Packungszellen nach der Calcium-Chlorid-Methode wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Der hier verwendete DNA-Mix enthielt neben dem pFUGW miR-1 Transfervektor (6,6 µg/ Kulturschale) das pCMVΔR8.91 Packungsplasmid (5,0 µg/ Kulturschale) und das pCMVG Expressionsplasmid (2,3 µg/ Kulturschale). Als weiterer Unterschied wurde dem DMEM-Medium 2,5 µl Chloroquinlösung pro Milliliter Medium zugesetzt. Die Chloroquinlösung wurde jeweils frisch angesetzt: 51,59 mg Chloroquin pro 10 ml Wasser (Menge je nach Bedarf). Das Chloroquin hat die Eigenschaft, die Transfektionseffizienz zu verbessern. Die Transfektion wurde in vierfacher Ausführung durchgeführt; als Kontrolle dienten vier Kulturschalen mit Transfektion eines leeren pFUGW Vektors (n=4). Die Zellen wurden für acht bis zehn Stunden im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag der Transfektion erfolgten ein Waschschrift der Zellen mit PBS-Puffer sowie ein Wechsel des Kulturmediums. Nach weiteren 48 bis 60 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellüberstände mit enthaltenen intakten Viruspartikeln abpipettiert, mit speziellen Spritzenfiltern in sterile Reaktionsgefäße überführt und die Packungszellen verworfen.

Anschließend erfolgte die lentivirale Transduktion. Hierfür verwendeten wir U87-Zellen, eine Zelllinie, die ubiquitär BDNF exprimiert.^[162] Die U87-Zellen wurden mit einer Zahl von etwa 650.000 Zellen pro 75 cm² Kulturflasche ausgesät. Die Viren enthaltenden Überstände aus der Transfektion der HEK 293T-Zellen wurden pro Milliliter mit 1 µl Polybrenstocklösung versetzt; diese wurde für jeden Versuch frisch angesetzt mit 8 mg Stocklösung pro Milliliter Wasser und diente zur Verbesserung der Transduktionseffizienz.^[163] Je 8 ml dieser Mischung wurden den U87-Zellen zugeführt. Die U87-Zellen wurden für vier bis sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium entfernt, die noch darin enthaltenen Viren wurden inaktiviert und frisches Medium zu den Zellen hinzugegeben.

Nach weiteren 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die transduzierten U87-Zellen geerntet. Zunächst wurde mit Hilfe des auf den Plasmiden enthaltenen GFP die Transduktionseffizienz ermittelt: Alle transduzierten Zellen enthielten GFP und zeigten bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop grüne Fluoreszenz. Im Verhältnis zu den nicht-fluoreszierenden Zellen konnte die Effizienz der Transduktion bestimmt werden. Für den Schritt der Zellernte wurde jeweils der Überstand abpipettiert und in Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden mittels mit *Complete*-Lösung versetztem Lyse-Puffer von der Platte gelöst und ebenfalls in Reaktionsgefäße überführt. Überstand und Zelllysat wurden bei -80 °C gelagert.

Aus dem Zelllysat wurde anschließend ein ELISA zur Ermittlung des BDNF-Proteingehaltes durchgeführt. Dieser wurde, wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben, durch den entstandenen Farbumschlag im *Plate Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet.

2.2.6 Statistik

Die angegebenen Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung oder Standardfehler dar. Die Versuchsgruppen zeigen alle eine Fallzahl von mindestens $n=3$. Die mittlere Differenz zwischen jeweils zwei untersuchten Gruppen wurde mittels *student's t*-Test bestimmt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant angenommen.

Die graphische Darstellung erfolgte unter Verwendung der *GraphPad Prism Software* Version 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Genexpression von BDNF nach RIPC und I/R im Herzgewebe der Ratte mittels qPCR

Um den Einfluss von RIPC und I/R auf die Genexpression von BDNF zu überprüfen, wurde anhand der in 2.2.1 beschriebenen Gewebeproben eine qPCR durchgeführt (n=6). Nach 120 Minuten Reperfusionzeit war die BDNF-Genexpression in den AAR-Proben der Tiere behandelt mit RIPC kombiniert mit I/R um mehr als das Vierfache erhöht (relative Expression $4,44 \pm 1,04$, $p = 0,006$). Auch in den AAR-Proben der Tiergruppe, die nur eine I/R erhielt, war die BDNF-Genexpression signifikant hochreguliert (relative Expression $3,14 \pm 0,71$, $p = 0,006$). Ebenso zeigte sich in den non AAR-Proben der Tiergruppe RIPC kombiniert mit I/R ein signifikanter Anstieg der BDNF-Genexpression (relative Expression $2,6 \pm 0,87$, $p = 0,02$), jedoch nicht in den non AAR-Proben der Gruppe I/R (relative Expression $1,68 \pm 0,49$, $p = 0,15$) verglichen mit der Sham-Tiergruppe. RIPC allein führte zu keiner signifikanten Änderung in der BDNF-Genexpression verglichen mit den Sham-Tieren (relative Expression $0,8 \pm 0,24$, $p = 0,46$) (Abb. 7).

BDNF mRNA Expression (120 min reperfusion)

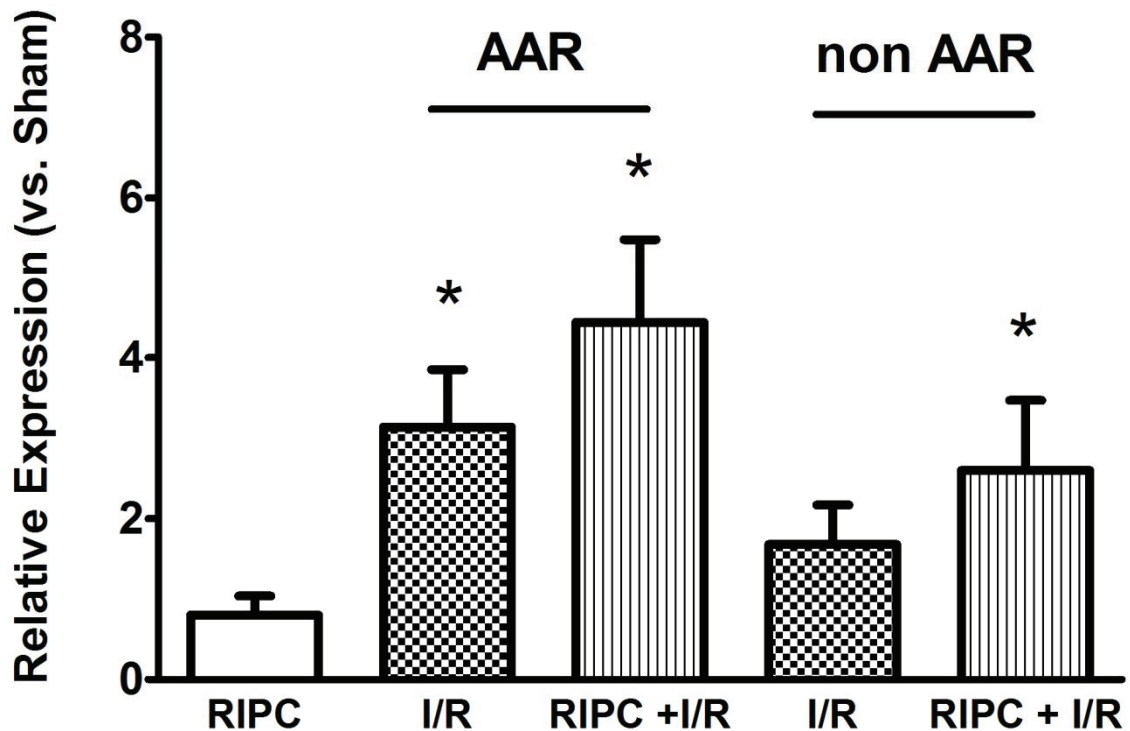


Abbildung 7: Relative BDNF-mRNA-Expression vs. Sham (120 Minuten Reperfusion). Gezeigt ist die relative BDNF-mRNA-Expression in den myokardialen Gewebeproben der unterschiedlichen Versuchsgruppen der RIPC-Versuchsreihe jeweils verglichen mit den Sham-Versuchstieren, n=6, Gewebeentnahme nach 120 Minuten Reperfusionszeit, gemessen mittels qPCR. RIPC = Fernpräkonditionierung, I/R = Ischämie und Reperfusion, RIPC + I/R = Fernpräkonditionierung kombiniert mit Ischämie und Reperfusion, AAR = *Area at risk* (direktes Versorgungsareal der verschlossenen Herzkranzarterie bezogen auf die Ischämie), non AAR = *non Area at risk* (Myokard, das sich nicht im direkten Einflussgebiet der verschlossenen Herzkranzarterie befindet). MW ± SE, *p < 0,05 vs. Sham [modifiziert nach ^[48]]

3.2 Nachweis der Proteinexpression von BDNF nach RIPC und I/R im Herzgewebe der Ratte mittels ELISA

Um den Einfluss von RIPC und I/R auf die Proteinexpression von BDNF im Myokard zu überprüfen, wurden ebenfalls die in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Gewebeproben mit $n=6$ verwendet. Zur Bestimmung der Proteinlevel wurde ein ELISA durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass nach 120-minütiger Reperfusionzeit keine der Tiergruppen eine signifikant veränderte BDNF-Proteinexpression verglichen mit den Sham-Tieren aufweist (RIPC relative Proteinexpression $0,99 \pm 0,17$, $p = 0,945$; RIPC + I/R: relative Proteinexpression $1,32 \pm 0,50$, $p = 0,232$; I/R: relative Proteinexpression $1,38 \pm 0,75$, $p = 0,284$) (Abb. 8).

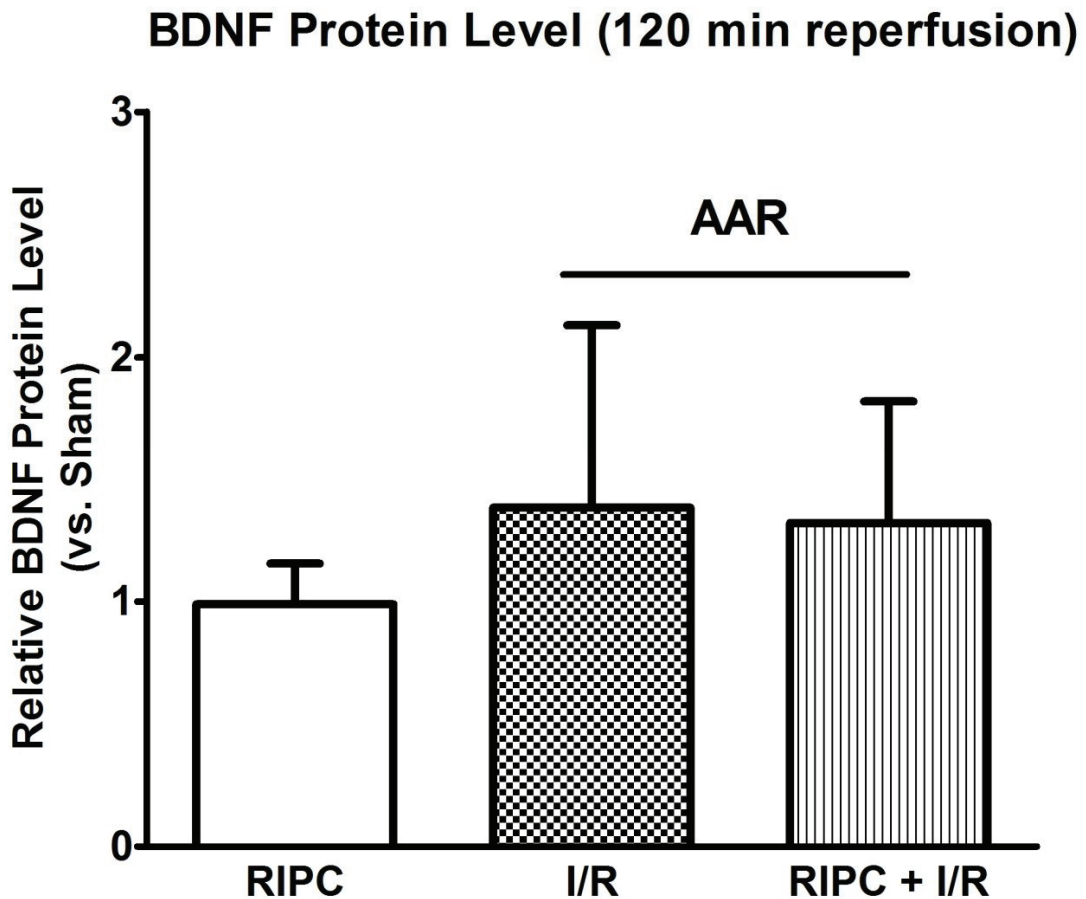


Abbildung 8: Relative BDNF-Proteinexpression nach RIPC (120 Minuten Reperfusion). Gezeigt ist die relative BDNF-Proteinexpression in den myokardialen Gewebeproben der unterschiedlichen Versuchsgruppen der RIPC-Versuchsreihe jeweils verglichen mit den Sham-Versuchstieren, $n=6$, Gewebeentnahme nach 120 Minuten Reperfusionzeit, gemessen mittels ELISA. RIPC =

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten, dass die Luciferase-Aktivität in den Zellen, in denen miR-1 und BDNF kotransfiziert wurden, signifikant geringer war als in Zellen, denen miR-1 und eine mutierte BDNF-Bindungsregion zugeführt wurde. Das Luciferasesignal war in der Messung der mit miR-1 und BDNF kotransfizierten Zellen auf 31 % abgesunken im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,31 \pm 0,06$, $p < 0,001$) (Abb. 10).

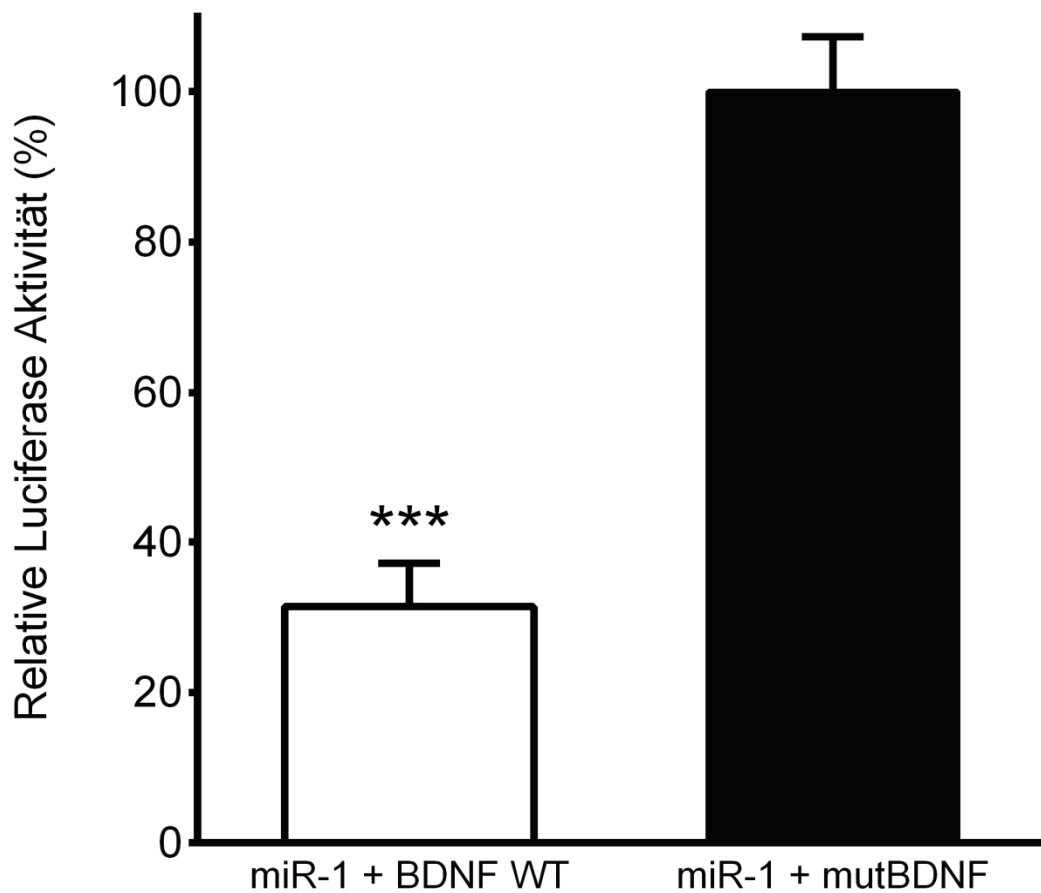


Abbildung 10: Relative Luciferase-Aktivität nach Transfektion von HEK 293-Zellen. Gezeigt ist die relative Luciferase-Aktivität in % nach Kotransfektion von miR-1 und BDNF 3'-UTR (links) im Vergleich zu einer Kotransfektion der miR-1 und einer mutierten BDNF 3'-UTR (rechts) in HEK 293-Zellen. miR-1 = microRNA 1, BDNF = *brain derived neurotrophic factor*, WT = Wildtyp, mutBDNF = mutierte Bindungsregion des BDNF. $n=4$; $MW \pm SD$, *** $p < 0,001$ [modifiziert nach ^[48]]

Diese Ergebnisse bestätigten eine starke Interaktion zwischen der miR-1 und der 3'-UTR des BDNF.

3.4 Quantifizierung der BDNF-Proteinexpression mittels ELISA nach lentiviraler Transduktion von U87-Zellen mit einem miR-1-Vektor

Um die Auswirkung der miR-1 auf die BDNF-Proteinexpression zu überprüfen, wurde die miR-1 mittels lentiviraler Transduktion in BDNF-exprimierenden U87-Zellen überexprimiert.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war der Proteingehalt von BDNF 48 Stunden nach miR-1-Transduktion im Zellüberstand signifikant erniedrigt (relative Proteinexpression $0,52 \pm 0,02$, $p = 0,033$) (Abb. 11). Dieses Experiment zeigte, dass die miR-1 das Proteinlevel von BDNF negativ beeinflusst.

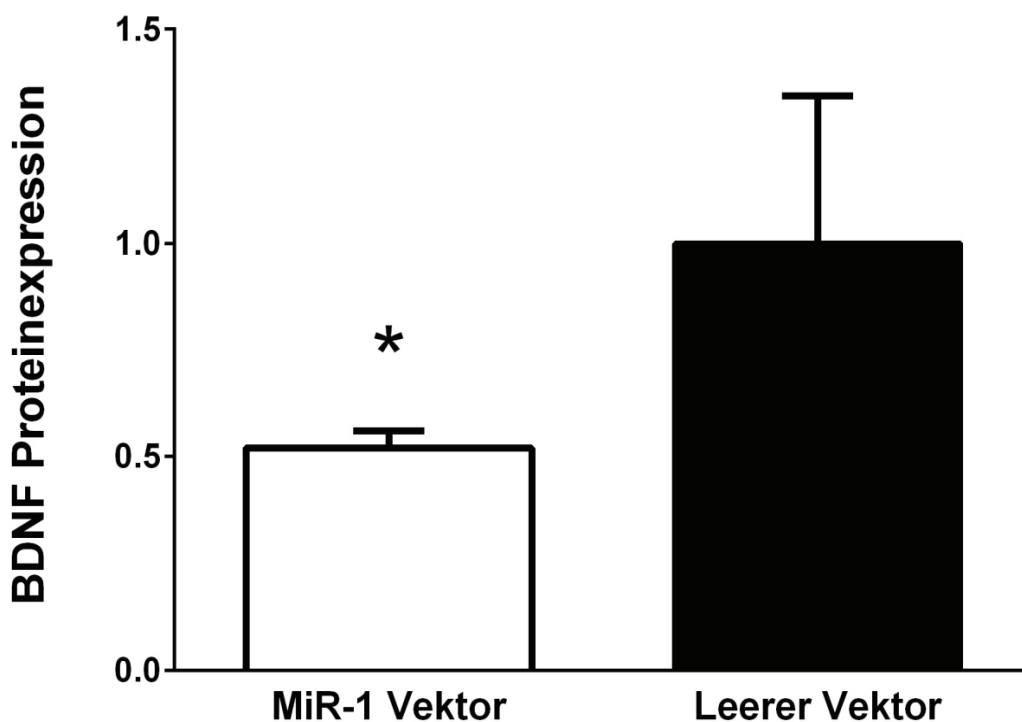


Abbildung 11: Relative BDNF-Proteinexpression nach lentiviraler Transduktion von U87-Zellen. Dargestellt ist die relative BDNF-Proteinexpression gemessen im Zellüberstand 48 Stunden nach lentiviraler Transfektion der miR-1 (links) bzw. eines leeren Vektors (rechts) in U87-Zellen mittels ELISA. miR-1 = microRNA 1. $n=4$; $MW \pm SD$, $*p < 0,05$ [modifiziert nach ^[48]]

4 Diskussion

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die miR-1 nach zwei Stunden Reperfusion in der RIPC-Gruppe signifikant herunterreguliert war.^[48] Hieraufhin wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die veränderten miR-1-Expressionsmuster nach RIPC und I/R mit veränderten BDNF-Expressionsmustern einhergehen und ob zwischen miR-1 und BDNF ein funktioneller Zusammenhang besteht.

Wir konnten erstmalig einen funktionellen Zusammenhang zwischen der miR-1 und der mRNA des Proteins BDNF zeigen und somit die Annahme aufgrund des Ergebnisses der *in silico*-Analyse bestätigen, dass BDNF ein putatives Zielgen der miR-1 ist. Außerdem zeigen unsere Ergebnisse, dass die BDNF-Genexpression zwei Stunden nach RIPC in Kombination mit I/R und nach I/R (in den AAR-Proben) signifikant hochreguliert wird. Weiterhin konnte im Zellkulturexperiment auch eine Abnahme der BDNF-Proteinexpression nach miR-1-Transduktion gezeigt werden. Im Myokard der Ratte konnten zwei Stunden nach RIPC bzw. I/R keine veränderten BDNF-Proteinexpressionsmuster nachgewiesen werden.

4.1 Diskussion der Methodik

Als Grundlage für die qPCR und einen Teil der ELISA-Untersuchungen dienten myokardiale Gewebeproben aus dem *in vivo* Experiment mit Ratten. Die gesamte Versuchsreihe wurde anhand eines Zeitprotokolls von dem gleichen Operateur durchgeführt. Das Protokoll wurde bezüglich Ischämiezyklen und Reperfusionszeit anhand von bereits, auch in unserer Arbeitsgruppe, etablierten RIPC-Versuchsprotokollen erstellt.^[20, 45, 60]

Die qPCR ist eine etablierte Methode zur quantitativen Messung spezifischer DNA-Sequenzen. Eine Alternative im Sinne einer qualitativ gleichwertigen Methode existiert aktuell nicht.

Zur Auswertung verschiedener Proteinlevel wurde in dieser Arbeit die ELISA-Methode genutzt. Diese ist leicht verfügbar und, im Gegensatz zu einer *Western-Blot*-Analyse, sowohl einfacher als auch günstiger in der Anwendung, da sie weniger zeitaufwendig und die Durchführung schneller zu erlernen ist. Im Gegensatz zu einer *Western-Blot*-

Analyse erfolgt beim ELISA keine elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches, sondern gezielt die Detektion eines bestimmten Proteins. Da die Detektion weiterer Proteine und die Größenanalyse des Proteins BDNF keine Relevanz für die durchgeführten Untersuchungen hatte, wurde auf eine *Western-Blot*-Analyse verzichtet. Die Detektion und relative Quantifizierung von BDNF mittels ELISA war für unsere Untersuchung ausreichend.

Einschränkend in Bezug auf den Luciferase-Reporter-Assay ist die Klonierung der drei potenziellen Bindungsstellen der miR-1 in das verwendete Plasmid zu nennen. Diese wurden jeweils durch eine weitere Nukleotidsequenz separiert, jedoch liegen sie *in vivo* nicht so nah beieinander. Dies könnte möglicherweise durch nicht optimale Bindung zu einem verfälschten Ergebnis (falsch erhöht) bei Nachweis der funktionellen Interaktion zwischen miR-1 und BDNF führen.

Die Methode der Transfektion durch Calciumchlorid wird häufig verwendet und ist relativ kostengünstig, bedarf jedoch einiger Übung und ist von verschiedenen Parametern, wie dem exakt einzustellenden pH-Wert des Puffers und der Konfluenz der Zellen, stark abhängig. Bei ungenauer Einstellung dieser Parameter verringert sich die Transfektionseffizienz bis hin zum vollständigen Misslingen der Transfektion.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig einen funktionellen Zusammenhang zwischen der miR-1 und der 3'-UTR der BDNF mRNA und zeigen, dass die Interaktion dieser beiden Moleküle *in vitro* zu einer verminderten BDNF-Proteinexpression führt.

Die BDNF-Genexpression zeigte sich in der qPCR in den AAR-Proben nach I/R mit oder ohne RIPC und auch bei non AAR-Proben nach RIPC + I/R signifikant erhöht, aber nicht in den non AAR-Proben bei I/R allein. Möglicherweise kann dies durch die Tatsache erklärt werden, dass bei RIPC + I/R das myokardiale Gewebe der non AAR, im Gegensatz zu non AAR-Proben der Gruppe I/R, zwei verschiedenen Fernkonditionierungsprozessen ausgesetzt ist (der Hinterlaufischämie durch RIPC und der entfernten Ischämie des AAR-Gewebes) und die BDNF-Genexpression so stärker beeinflusst wird. In unseren Ergebnissen der qPCR war BDNF, gemessen im Myokard, bei allen Ischämiegeschehen erhöht, jedoch nicht bei alleiniger Fernkonditionierung.

Am höchsten war die BDNF-Expression bei Tieren, die mit einer Kombination aus RIPC und I/R behandelt wurden. Allein durch RIPC kann der protektive Effekt von BDNF also nicht angestoßen werden. Die nachfolgende Ischämie ist wahrscheinlich essenziell für diesen Prozess. Diese Beobachtung impliziert, dass RIPC zur Triggerung einer vermehrten BDNF-Expression nur sinnvoll ist, wenn ein kardiochirurgischer Eingriff oder ein anderes myokardiales schädigendes Ereignis bevorsteht. In diesem Zusammenhang sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, ob eine prophylaktisch erhöhte BDNF-Expression auch bei Patienten mit hohem kardialen Risiko potenziell schädigenden Herzereignissen vorbeugt. Die Ergebnisse der qPCR bestätigen außerdem aktuelle Daten, dass BDNF im Myokard exprimiert wird^[164] und sie bestätigen die Vermutung, dass BDNF bei Ischämiegeschehen am Myokard verändert exprimiert wird^[165, 166] und somit in die ablaufenden molekularen Prozesse involviert ist.

Für den Nachweis eines molekularen Zusammenhangs zwischen miR-1 und BDNF führten wir, als Ergänzung zur qPCR, die nur den indirekten Nachweis einer Interaktion darstellen kann, einen Luciferase-Reporter-Assay durch. Unsere Ergebnisse mittels Luciferase-Reporter-Assay zeigten einen signifikanten Abfall des Luciferasesignals bei Kotransfektion der miR-1 und der mRNA des BDNF im Vergleich zur Kotransfektion der miR-1 und einer mutierten BDNF-mRNA. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine starke molekulare Interaktion zwischen der miR-1 und dem Protein BDNF stattfindet.

Es konnte in den durchgeführten Studien im Myokardgewebe mittels ELISA keine signifikant veränderte BDNF-Proteinexpression in Korrelation zur erhöhten BDNF-Genexpression nachgewiesen werden. Demnach fehlt bislang der *in vivo*-Nachweis einer Interaktion von miR-1 und BDNF. Dies kann möglicherweise auf den Zeitpunkt der Gewebeentnahme zurückgeführt werden. Vermutlich ist eine längere Latenz zwischen RIPC und / oder I/R und der Gewebeentnahme notwendig, um die Hemmung von BDNF durch die miR-1 auch auf Proteinebene *in vivo* nachzuweisen. Hier müsste man weitere Untersuchungszeitpunkte wählen, um dies näher zu charakterisieren. Es sollten insbesondere Untersuchungszeitpunkte gewählt werden, die in der späten Phase der Protektion (24-48h nach RIPC) liegen.

Der fehlende *in vivo*-Nachweis einer Interaktion könnte auch auf die insgesamt eher geringen BDNF-Expressionslevel im Myokard zurückzuführen sein oder darauf, dass der funktionelle Zusammenhang der beiden Moleküle möglicherweise keine biologische Bedeutung in Bezug auf das Myokard hat.

Liu et al. konnten zeigen, dass bei Patienten, die 18 Stunden vor einer elektiven Koronarangiographie mit RIPC behandelt wurden, signifikant geringere Troponin I- und CK-MB (*Muscle type Creatininkinase*)-Level messbar waren als bei der Kontrollgruppe ohne RIPC und, dass bei den Patienten, bei denen RIPC angewendet wurde, auch langfristig (6 Monate *follow-up*) signifikant weniger akute Herzereignisse auftraten.^[167] Demnach ist möglicherweise auch für die molekulare Ebene ein Untersuchungszeitpunkt mehrere Wochen bzw. Monate nach RIPC relevant.

Die weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen miR-1 und BDNF *in vivo* sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein. Interessant wäre beispielsweise eine Versuchsreihe mit miR-1-*Knockout*-Mäusen, um die Veränderungen in der BDNF-Expression und die Auswirkungen dieser Veränderungen auf zelluläre Prozesse zu untersuchen. Jedoch muss bedacht werden, dass BDNF ebenfalls wichtige und vielseitige Funktionen im Nervensystem reguliert. Ein miR-1-*Knockout* könnte dazu führen, dass bei entkoppelter BDNF-Expression bei den *Knockout*-Mäusen zunächst Defizite im neuronalen Bereich auffallen und diese die myokardiale Beeinträchtigung in den Hintergrund stellen. Zusätzlich reguliert die miR-1 eine Reihe anderer Proteine^[121, 168, 169], die bei einem *Knockout* ebenfalls betroffen wären und die Ergebnisse bezüglich BDNF verfälschen könnten. Idealerweise sollte nur das Myokard vom miR-1-*Knockout* betroffen sein, um die Veränderungen diesbezüglich selektiv sichtbar zu machen. Zhao et al. führten bereits Untersuchungen zum *Knockout* der miR-1-2 (Mitglied der miR-1-Familie) in Mäuseembryos, die an Herzfehlern verstarben, durch. Es wurden phänotypisch perikardiale Ödeme und ein unterentwickeltes ventrikuläres Myokard beschrieben.^[170]

Zusammenfassend betrachtet wurde von uns untersucht, auf welchen molekularen Wegen die RIPC ihren nachweislich kardioprotektiven Effekt ausübt.

Kritisch untersucht werden müssen auch mögliche negative Effekte auf RIPC und den Zusammenhang mit miR-1- und BDNF-Expressionslevel. Oosterlinck et al. zeigten in einer Studie die Reduktion des kardioprotektiven Effekts nach ischämischer Präkonditionierung bei Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 und/ oder metabolischem Syndrom.^[171] Darüber hinaus zeigten Behnenburg et al. eine Aufhebung des protektiven Effekts der RIPC durch Alterung im Tierexperiment mit Ratten.^[47] Hierbei gilt es zu untersuchen, ob z.B. durch Diabetes mellitus und fortschreitendes Alter auch die Veränderungen der miR-1- und BDNF-Expression beeinflusst werden. Zusätzlich zu weiteren Versuchsreihen bezüglich eines *in vivo*-Nachweises sollte auch der genaue molekulare Mechanismus (die Kaskade), der über miR-1 und BDNF zu einer myokardialen Protektion führt, Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Einen weiteren Baustein dieser Kaskade könnte der *serum response factor* (SRF), ein DNA-bindendes Protein, das als sog. Transkriptions-Aktivator fungiert, darstellen. Dieses Molekül hemmt nachgewiesenermaßen die miR-1-Expression.^[172] Eine Studie von Tritsch et al. zeigt nicht nur den Zusammenhang zwischen SRF und der miR-1, sondern auch, dass das Zusammenspiel dieser Moleküle Auswirkungen auf die Entwicklung von Herzfehlern hat.^[173] Ob und, wenn ja, welche Rolle SRF bei Vorgängen wie RIPC und Ischämie einnimmt muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Wir haben die Kaskade während der RIPC im Myokard zumindest zum Teil entschlüsselt: Die RIPC führt zu einer verminderten Genexpression der miR-1 nach 120 Minuten Reperfusion, was mit einer erhöhten BDNF-mRNA-Expression einhergeht. Außerdem haben wir den direkten Nachweis einer molekularen Interaktion zwischen miR-1 und BDNF *in vitro* dargestellt, was die Theorie der o.g. Kaskade unterstützt. Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, die Kaskade zu bestätigen und insbesondere ein *in vivo*-Modell zu entwickeln, das die Zusammenhänge aller beteiligten Moleküle darstellt.

Die Frage, die bei dieser Kaskadentheorie offenbleibt, ist der exakte molekulare Wirkmechanismus des Proteins BDNF. Die Eigenschaft von BDNF, die neuronale Apoptose zu verhindern, wurde bereits in verschiedenen experimentellen Modellen bestätigt.^[174, 175] Es liegt daher nahe, anzunehmen, dass BDNF auch im Myokard als antiapoptotisches Protein fungiert und so seinen protektiven Effekt nach myokardialer

Ischämie ausübt. Dennoch muss diese Annahme Gegenstand weiterer experimenteller Untersuchungen sein, um den Effekt der Apoptoseinhibition durch BDNF auch im Myokard nachzuweisen. Eine Studie von Donovan et al. beschrieb als ersten Hinweis auf einen antiapoptotischen Effekt von BDNF im Herzen das Ergebnis einer vermehrten Apoptose des Endothels intrakardialer Gefäße bei BDNF-defizienten Mäusen.^[176] Diese Studie gibt einen Hinweis darauf, dass BDNF nicht nur direkt während bzw. nach der RIPK einen positiven Einfluss am Myokard ausübt, sondern auch bei länger verlaufenden Erkrankungen am Endothel eine Rolle spielt und so ebenfalls den Myokardschaden gering hält. Simkhovich et al. zeigten 2003 in einer Genchip-Studie die Veränderung mehrerer mRNAs nach kurzer Ischämie im Myokard von Ratten. Hierzu gehörte auch die mRNA des BDNF.^[165] Weiterhin veröffentlichten Hubold et al. 2009 Daten, die eine neuronale Protektion für BDNF bei neuronaler Präkonditionierung mittels Hypoxie nahe legten.^[177] Diese neuronale Präkonditionierung kann nicht exakt auf myokardiale Präkonditionierung übertragen werden, dennoch könnten die molekularen Mechanismen, zumindest teilweise, übereinstimmen. Zudem ist auch die o.g. Studie von Simkhovich et al.^[165] vielversprechend bezüglich der Theorie, dass BDNF bei myokardialer Ischämie Funktionen auf molekularer Ebene einnimmt und so die Myokardprotektion reguliert. Weitere Studien gehen ebenfalls dem Vorkommen von BDNF im Endothel der Herzkammern, der Koronararterien und der Aorta nach. In einer dieser Studien von Prigent-Tessier et al. wurde in einem *in vivo*-Experiment mit Ratten gezeigt, dass arterielle Hypertonie mit geringen endothelialen BDNF-Leveln korreliert und dass physisches Training zu erhöhten endothelialen BDNF-Leveln führt.^[178] Eine weitere Studie zeigte reduzierte BDNF-Plasmalevel bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom.^[179] Weitere aktuelle Daten zeigen, dass BDNF in den pathologischen Entstehungsmechanismus der Arteriosklerose involviert ist: Golden et al. beschrieben eine Korrelation zwischen den Plasma-BDNF-Leveln und multiplen Risikofaktoren für das metabolische Syndrom^[180] und Jiang et al. beschrieben in ihrer Studie durch niedrige BDNF-Serumlevel sogar eine 4-Jahres-Vorhersagbarkeit bezüglich Mortalität und kritischen Herzereignissen bei Patienten mit Angina Pectoris.^[181] Diese Studien machen deutlich, dass geringe BDNF-Level mit arterieller Hypertonie und der

Entstehung der Arteriosklerose, zwei Risikofaktoren für ein akutes Herzereignis, demnach Risikofaktoren für eine akute Myokardischämie, korrelieren. Es gilt herauszufinden, ob erhöhte BDNF-Serumspiegel dazu beitragen, arterielle Hypertonie und/ oder Arteriosklerose und somit nachfolgend das Risiko einer myokardialen Ischämie zu verringern und ob BDNF-Serumspiegel, genau wie die BDNF-mRNA-Expression im Myokard, nach RIPC und I/R ebenfalls erhöht sind. Der Nachweis veränderter BDNF-Serumspiegel ist besonders interessant im Hinblick auf aktuelle Studien, die belegen, dass der protektive Effekt der RIPC über den Transfer von humanem Blutplasma auf andere Individuen übertragbar ist. ^[182-184]

BDNF ist Gegenstand zahlreicher aktueller Untersuchungen, jedoch beziehen sich diese Untersuchungen in der Mehrheit auf die Rolle von BDNF im neuronalen Geschehen. Wie bereits erwähnt, wurde von unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen RIPC und dem Protein BDNF veröffentlicht. ^[48] Eine Studie von Okada et al. zeigte jedoch, dass BDNF-Serumlevel, vermittelt über das zentrale Nervensystem, nach Myokardinfarkt bei Ratten erhöht sind. ^[185] Eine weitere Studie belegte, dass eine bei Rauchern und Übergewichtigen entdeckte BDNF-Genvarianz bei diesen Individuen das Risiko kardiovaskulärer Mortalität signifikant anhebt. ^[159] Diese Ergebnisse belegen das Interesse der aktuellen Forschung am Zusammenhang von BDNF mit kardiovaskulären Krankheitsbildern.

Weiterhin gilt es zu untersuchen, ob die BDNF-Level auch durch andere Mechanismen oder Wirkstoffe erhöht werden können. Eine Studie von Schmolesky et al. beschrieb den Anstieg des BDNF-Serumlevels bei gesunden männlichen Erwachsenen nach Durchführen von Aerobic-Übungen. ^[186]

In unserer Studie bleibt der Nachweis erhöhter BDNF-Serumlevel bei myokardialer Ischämie bzw. vorheriger Protektion offen. Wir haben ausschließlich das Myokard auf BDNF hin untersucht. Auch der direkte Nachweis eines protektiven Effektes von BDNF auf das Myokard nach einem Ischämieereignis muss noch erfolgen.

Im Kontext der aktuellen Wissenschaft steht die miR-1 im Vordergrund. Viele Studien beschreiben die Veränderungen der miR-1 bei Vorgängen im Myokard, teilweise auch

bei Ischämie. Der klinische Nutzen der miR-1 muss noch umfangreich untersucht werden. Eine wichtige Studie ist beispielsweise die von Sluijter et al., die kardiomyozytäre Progenitor-Zellen (CMPC) untersuchte. Diese CMPC sind ortsständig im Herzgewebe, sie können sich u.a. in kontraktierende Myozyten differenzieren. Hieraus kann ein vielversprechender Nutzen bei Myokardschäden entstehen, da man sie in ein geschädigtes Areal transplantieren kann, um dort den Schaden ausgleichen. Laut Sluijter et al. war es die miR-1, die die Proliferation dieser humanen CMPC regulierte.^[187] Die miR-1, die nachweislich eine regulative Rolle spielt bei der Proliferation und Differenzierung von Kardiomyozyten,^[118, 170] könnte in Zukunft möglicherweise durch den Effekt der Entwicklung von Kardiomyozyten direkt als therapeutisches *Target* eingesetzt werden.^[188, 189] Die Veränderungen der miR-1-Expression spielen sich jedoch nicht nur im Myokard ab, auch im Serum können nach ischämischen Ereignissen am Herzen veränderte miR-1-Level gemessen werden. Die Studie von Cheng et al. zeigte eine positive Korrelation zwischen miR-1-Serumleveln und Infarktgröße sowie geringere miR-1-Serumlevel nach vorheriger ischämischer Präkonditionierung.^[190] Hierzu wäre auch ein interessanter Forschungsansatz, ob die verminderte miR-1-Expression nur durch IPC oder beispielsweise auch medikamentös erzeugt werden kann.

Die Beobachtung veränderter Serum-Level nach ischämischen Ereignissen führte auch zu Diskussionen zum Nutzen der miR-1 als Biomarker nach akutem Myokardinfarkt.^[191] Hierzu gibt es bereits klinische Studien: Liebetrau et al. zeigten erhöhte miR-1-Serumlevel bei Patienten nach transkoronarer Operation einer Septumhypertrophie (ein Operationsverfahren, das eine myokardiale Ischämie verursacht). Die höchsten miR-1-Serumlevel wurden 75 Minuten postoperativ gemessen.^[192] Eine Studie von Cheng et al. beschrieb erhöhte miR-1-Level im Urin bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Bei Ratten nach Myokardinfarkt waren die miR-1-Level im Urin 24 Stunden nach dem Infarktereignis am höchsten.^[193]

Zum einen steht mit der miR-1 also ein Biomarker zur Diskussion, der ergänzend zum derzeitigen Gold-Standard Troponin T^[194] für die Diagnostik des Myokardinfarktes herangezogen werden könnte. Liebetrau et al. gaben die höchste Konzentration der miR-1 im Serum 75 Minuten nach dem Ischämieereignis an, was einen früheren

Zeitpunkt darstellt als die Messbarkeit des Troponin T (3-6 Stunden nach Myokardinfarkt). Zum anderen wird mit der miR-1 zum ersten Mal ein Infarktmarker vorgestellt, der auch im Urin messbar ist. Allerdings ist hier noch eine Vielzahl von Untersuchungen nötig, um v.a. die Sensitivität und Spezifität der miR-1 bei einem akuten Myokardinfarkt zu ermitteln und zu überprüfen, ob diese Faktoren denen des Troponin T gleichwertig oder gar überlegen sind. Zusätzliche Punkte, die bei der klinischen Anwendung eine große Bedeutung haben, sind die Kostenintensivität der Abnahme und der Messung der miR-1 sowie die zeitliche Verfügbarkeit der Untersuchungsmethodik.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass miR-1 und BDNF vielversprechende Moleküle bei der Entschlüsselung molekularer Mechanismen bei Ischämieereignissen am Myokard sind, die *in vitro* zusammen agieren. Weitere Studien sind notwendig, um den Zusammenhang der Moleküle *in vivo* und in klinischen Studien darzustellen. Es sollten in Zukunft Untersuchungen zum möglichen klinischen, ggf. sogar zum therapeutischen Nutzen von miR-1 und BDNF erfolgen.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Todesursachenstatistik in Deutschland – Fachserie 12, Reihe 4 – 2014, Seite 4 (Abbildung 2), Statistisches Bundesamt Wiesbaden,

<https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> ; Zugriff am 21.04.2016

Abb. 2: Schematische Darstellung der Haarnadelstruktur der pre-miRNA, in Anlehnung an Fig.17 <http://homes.cs.washington.edu/~bornholt/dnastorage-asplos16/> ; Zugriff am 30.03.2014

Abb. 3: Schematische Darstellung des RIPC-Versuchsprotokolls; modifiziert nach [48]

Abb. 4: pcDNA3.1-Plasmid der Firma Invitrogen, Quelle: Invitrogen, *User manual*, *Catalog nos. V790-20 and V795-20*, Version K, 10 November 2010, 28-0104 (www.invitrogen.com); Download des *User manual* am 01.06.2014

Abb. 5 + 6: pMIR-Report-Plasmid und pMIR-Report- β gal-Control-Plasmid der Firma Invitrogen, Quelle: Applied Biosystems, *User manual*, pMIR-Report™ System, *Part Number AM5795* (www.invitrogen.com); Download des *User manual* am 01.06.2014

Abb. 7: Relative BDNF-mRNA-Expression vs. Sham (120 Minuten Reperfusion); modifiziert nach ^[48]

Abb. 8: Relative BDNF-Proteinexpression nach RIPC (120 Minuten Reperfusion); modifiziert nach ^[48]

Abb. 9: Ergebnis der *TargetScan*-Analyse (www.targetscan.org)

Abb. 10: Relative Luciferase-Aktivität nach Transfektion von HEK 293-Zellen; modifiziert nach ^[48]

Abb. 11: Relative BDNF-Proteinexpression nach lentiviraler Transduktion von U87-Zellen; modifiziert nach ^[48]

6 Literaturverzeichnis

1. Zweier, J.L., *Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury.* J Biol Chem, 1988. **263**(3): p. 1353-7.
2. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury.* Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
3. Lemasters, J.J., et al., *The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes.* EXS, 1996. **76**: p. 99-114.
4. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury.* N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
5. Csordas, A. and D. Bernhard, *The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke.* Nat Rev Cardiol, 2013. **10**(4): p. 219-30.
6. Van Gaal, L.F., G.A. Vansant, and I.H. De Leeuw, *Upper body adiposity and the risk for atherosclerosis.* J Am Coll Nutr, 1989. **8**(6): p. 504-14.
7. Bonora, E., et al., *Influence of body fat and its regional localization on risk factors for atherosclerosis in young men.* Am J Epidemiol, 1992. **135**(11): p. 1271-8.
8. Wagenknecht, L.E., et al., *Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and carotid wall thickness: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study.* Diabetes Care, 1998. **21**(11): p. 1812-8.
9. Holme, I., et al., *Risk factors and raised atherosclerotic lesions in coronary and cerebral arteries. Statistical analysis from the Oslo study.* Arteriosclerosis, 1981. **1**(4): p. 250-6.
10. Frattaroli, J., et al., *Angina pectoris and atherosclerotic risk factors in the multisite cardiac lifestyle intervention program.* Am J Cardiol, 2008. **101**(7): p. 911-8.
11. Ornish, D., et al., *Intensive lifestyle changes for reversal of coronary heart disease.* JAMA, 1998. **280**(23): p. 2001-7.
12. Dod, H.S., et al., *Effect of intensive lifestyle changes on endothelial function and on inflammatory markers of atherosclerosis.* Am J Cardiol, 2010. **105**(3): p. 362-7.
13. Ornish, D., *Can lifestyle changes reverse coronary heart disease?* World Rev Nutr Diet, 1993. **72**: p. 38-48.
14. Volker, W. and V. Faber, *Aspirin reduces the growth of medial and neointimal thickenings in balloon-injured rat carotid arteries.* Stroke, 1990. **21**(12 Suppl): p. IV44-5.
15. Ranke, C., et al., *Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis.* Circulation, 1993. **87**(6): p. 1873-9.
16. Monroe, V.S., et al., *Pharmacologic plaque passivation for the reduction of recurrent cardiac events in acute coronary syndromes.* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(4 Suppl S): p. 23S-30S.
17. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.* Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
18. Hahn, O., et al., *The effect of ischemic preconditioning on redox status during liver resections--randomized controlled trial.* J Surg Oncol, 2011. **104**(6): p. 647-53.

19. Toosy, N., et al., *Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury*. BJU Int, 1999. **84**(4): p. 489-94.
20. Heinen, N.M., et al., *Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits a signaling pattern different from local ischemic preconditioning*. Shock, 2011. **36**(1): p. 45-53.
21. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 674-99.
22. Marber, M.S., et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. Circulation, 1993. **88**(3): p. 1264-72.
23. Heusch, G., et al., *Endogenous nitric oxide and myocardial adaptation to ischemia*. Circ Res, 2000. **87**(2): p. 146-52.
24. Schulz, R., et al., *Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin*. Circulation, 1998. **98**(10): p. 1022-9.
25. Schulz, R., et al., *Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine*. Pflugers Arch, 1995. **430**(2): p. 273-82.
26. Dickson, E.W., et al., *Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence*. J Thromb Thrombolysis, 1999. **8**(2): p. 123-9.
27. Ytrehus, K., Y. Liu, and J.M. Downey, *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H1145-52.
28. Nakano, A., et al., *Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK*. Circ Res, 2000. **86**(2): p. 144-51.
29. O'Rourke, B., *Myocardial K(ATP) channels in preconditioning*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 845-55.
30. Sasaki, N., et al., *Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide*. Circulation, 2000. **101**(4): p. 439-45.
31. Sato, T., B. O'Rourke, and E. Marban, *Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C*. Circ Res, 1998. **83**(1): p. 110-4.
32. Murry, C.E., et al., *Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode*. Circ Res, 1990. **66**(4): p. 913-31.
33. Kroemer, G. and J.C. Reed, *Mitochondrial control of cell death*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 513-9.
34. Bernardi, P., et al., *The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target*. FEBS J, 2006. **273**(10): p. 2077-99.
35. Borutaite, V., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 357-66.
36. Heusch, G., K. Boengler, and R. Schulz, *Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(2): p. 151-4.
37. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.

38. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(12): p. 1461-9.
39. Baines, C.P., et al., *Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 2): p. H1361-8.
40. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
41. Gho, B.C., et al., *Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue*. Circulation, 1996. **94**(9): p. 2193-200.
42. Pell, T.J., et al., *Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 2): p. H1542-7.
43. Tokuno, S., et al., *Spontaneous ischemic events in the brain and heart adapt the hearts of severely atherosclerotic mice to ischemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(6): p. 995-1001.
44. Birnbaum, Y., S.L. Hale, and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1641-6.
45. Kharbanda, R.K., et al., *Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2881-3.
46. Dow, J., et al., *The effect of acute versus delayed remote ischemic preconditioning on reperfusion induced ventricular arrhythmias*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2012. **23**(12): p. 1374-83.
47. Behmenburg, F., et al., *Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2016.
48. Brandenburger, T., et al., *Effects of remote ischemic preconditioning and myocardial ischemia on microRNA-1 expression in the rat heart in vivo*. Shock, 2014.
49. Brandenburger, T., et al., *Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 228.
50. Hausenloy, D.J., et al., *Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial*. Lancet, 2007. **370**(9587): p. 575-9.
51. Thielmann, M., et al., *Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with crystalloid cardioplegic arrest*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(5): p. 657-64.
52. D'Ascenzo, F., et al., *Remote ischaemic preconditioning in coronary artery bypass surgery: a meta-analysis*. Heart, 2012. **98**(17): p. 1267-71.
53. Liang, Y., et al., *Long-term, regular remote ischemic preconditioning improves endothelial function in patients with coronary heart disease*. Braz J Med Biol Res, 2015. **48**(6): p. 568-76.
54. Ghaemian, A., et al., *Remote ischemic preconditioning in percutaneous coronary revascularization: a double-blind randomized controlled clinical trial*. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2012. **20**(5): p. 548-54.
55. Jones, B.O., et al., *Remote ischemic preconditioning in cyanosed neonates undergoing cardiopulmonary bypass: A randomized controlled trial*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013.

56. McCrindle, B.W., et al., *Remote ischemic preconditioning in children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a single-center double-blinded randomized trial*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(4).
57. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1397-407.
58. Hausenloy, D.J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery*. N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1408-17.
59. Lomivorotov, V.V., et al., *Remote ischaemic preconditioning does not protect the heart in patients undergoing coronary artery bypass grafting*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2012. **15**(1): p. 18-22.
60. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(3): p. 450-6.
61. Gill, R., et al., *Remote ischemic preconditioning for myocardial protection: update on mechanisms and clinical relevance*. Mol Cell Biochem, 2015. **402**(1-2): p. 41-9.
62. Schoemaker, R.G. and C.L. van Heijningen, *Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(5): p. H1571-6.
63. Paton, W.D. and H. Steinberg, *A class experiment on ganglion block in human subjects*. Br Med J, 1956. **2**(4993): p. 622-6.
64. Konstantinov, I.E., et al., *The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans*. Physiol Genomics, 2004. **19**(1): p. 143-50.
65. Konstantinov, I.E., et al., *Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism*. Transplantation, 2005. **79**(12): p. 1691-5.
66. Petrishchev, N.N., et al., *Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning?* Pathophysiology, 2001. **7**(4): p. 271-274.
67. Corti, P. and M.T. Gladwin, *Is nitrite the circulating endocrine effector of remote ischemic preconditioning?* Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1554-7.
68. Rassaf, T., et al., *Circulating Nitrite Contributes to Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning*. Circ Res, 2014.
69. Hausenloy, D.J., S. Lecour, and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(5): p. 893-907.
70. Cao, L., et al., *BDNF-mediated migration of cardiac microvascular endothelial cells is impaired during ageing*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(12): p. 3105-15.
71. Cabrera-Fuentes, H.A., et al., *RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor-alpha in cardiac ischaemia/reperfusion injury*. Thromb Haemost, 2014. **112**(6): p. 1110-9.
72. Cabrera-Fuentes, H.A., et al., *RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection*. Eur J Cardiothorac Surg, 2015.
73. Duan, X., et al., *Expression of MicroRNA-1 and MicroRNA-21 in Different Protocols of Ischemic Conditioning in an Isolated Rat Heart Model*. Cardiology, 2012. **122**: p. 36-43.

74. Dong, S., et al., *MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction*. J Biol Chem, 2009. **284**(43): p. 29514-25.
75. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
76. Bentwich, I., et al., *Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs*. Nat Genet, 2005. **37**(7): p. 766-70.
77. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
78. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
79. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
80. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. Genes Dev, 2002. **16**(6): p. 720-8.
81. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
82. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(16): p. 4776-85.
83. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
84. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
85. Ketting, R.F., et al., *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans*. Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2654-9.
86. Salzman, D.W., J. Shubert-Coleman, and H. Furneaux, *P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32773-9.
87. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
88. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
89. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
90. Zeng, Y., R. Yi, and B.R. Cullen, *MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9779-84.
91. Kluiver, J., et al., *The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies*. Leukemia, 2006. **20**(11): p. 1931-6.
92. Ji, R., et al., *MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation*. Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1579-88.
93. Urbich, C., A. Kuehbachner, and S. Dimmeler, *Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(4): p. 581-8.

94. Das, A., et al., *Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation*. J Immunol, 2014. **192**(3): p. 1120-9.
95. Taira, N., et al., *Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. 717-22.
96. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6029-33.
97. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
98. Song, G., et al., *The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation*. Gene, 2014. **533**(2): p. 481-7.
99. Fukuda, Y., H. Kawasaki, and K. Taira, *Exploration of human miRNA target genes in neuronal differentiation*. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 2005(49): p. 341-2.
100. Nguyen, H.T. and M. Frasch, *MicroRNAs in muscle differentiation: lessons from Drosophila and beyond*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(5): p. 533-9.
101. Silber, J., et al., *miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells*. BMC Med, 2008. **6**: p. 14.
102. Mirnezami, A.H., et al., *MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets*. Eur J Surg Oncol, 2009. **35**(4): p. 339-47.
103. Wu, M., et al., *Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs*. Carcinogenesis, 2008. **29**(9): p. 1710-6.
104. Chung, A.C., et al., *miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(8): p. 1317-25.
105. Jiang, X., et al., *MicroRNAs and the regulation of fibrosis*. FEBS J, 2010. **277**(9): p. 2015-21.
106. Ciccacci, C., et al., *MicroRNA genetic variations: association with type 2 diabetes*. Acta Diabetol, 2013. **50**(6): p. 867-72.
107. Cordes, K.R. and D. Srivastava, *MicroRNA regulation of cardiovascular development*. Circ Res, 2009. **104**(6): p. 724-32.
108. Ikeda, S., et al., *Altered microRNA expression in human heart disease*. Physiol Genomics, 2007. **31**(3): p. 367-73.
109. Fichtlscherer, S., et al., *Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease*. Circ Res, 2010. **107**(5): p. 677-84.
110. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. **12**(9): p. 735-9.
111. van Rooij, E., et al., *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13027-32.
112. Tang, Y., et al., *MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2*. Int Heart J, 2009. **50**(3): p. 377-87.
113. Ren, X.P., et al., *MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20*. Circulation, 2009. **119**(17): p. 2357-66.
114. Yin, C., F.N. Salloum, and R.C. Kukreja, *A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70*. Circ Res, 2009. **104**(5): p. 572-5.

115. Schneider, M., et al., *Cell-specific detection of microRNA expression during cardiomyogenesis by combined in situ hybridization and immunohistochemistry*. J Mol Histol, 2011. **42**(4): p. 289-99.
116. Girmatsion, Z., et al., *Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation*. Heart Rhythm, 2009. **6**(12): p. 1802-9.
117. Bostjancic, E., N. Zidar, and D. Glavac, *MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction*. Dis Markers, 2009. **27**(6): p. 255-68.
118. Zhao, Y., E. Samal, and D. Srivastava, *Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis*. Nature, 2005. **436**(7048): p. 214-20.
119. Ikeda, S., et al., *MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(8): p. 2193-204.
120. Little, G.H., et al., *Critical role of nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdeltaB in cardiomyocyte survival in cardiomyopathy*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 24857-68.
121. Elia, L., et al., *Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions*. Circulation, 2009. **120**(23): p. 2377-85.
122. Latronico, M.V., et al., *Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1015**: p. 250-60.
123. Santini, M.P., et al., *Enhancing repair of the mammalian heart*. Circ Res, 2007. **100**(12): p. 1732-40.
124. Xu, H.F., et al., *MicroRNA-1 represses Cx43 expression in viral myocarditis*. Mol Cell Biochem, 2012. **362**(1-2): p. 141-8.
125. van Kempen, M.J., et al., *Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart*. Circ Res, 1991. **68**(6): p. 1638-51.
126. Misao, J., et al., *Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1506-12.
127. Chen, J.F., et al., *Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2111-6.
128. Takaya, T., et al., *MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells*. Circ J, 2009. **73**(8): p. 1492-7.
129. Ai, J., et al., *Overexpression of microRNA-1 impairs cardiac contractile function by damaging sarcomere assembly*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(3): p. 385-93.
130. Sayed, D., et al., *MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 416-24.
131. Kuwabara, Y., et al., *Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage*. Circ Cardiovasc Genet, 2011. **4**(4): p. 446-54.
132. Slagsvold, K.H., et al., *Remote ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and influences myocardial microRNA expression in atrial myocardium during coronary bypass surgery*. Circ Res, 2014. **114**(5): p. 851-9.
133. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J, 1982. **1**(5): p. 549-53.

134. Rosenthal, A., et al., *Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor*. *Endocrinology*, 1991. **129**(3): p. 1289-94.
135. Ernfors, P., et al., *Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family*. *Neuron*, 1990. **5**(4): p. 511-26.
136. Hofer, M., et al., *Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain*. *EMBO J*, 1990. **9**(8): p. 2459-64.
137. Soppet, D., et al., *The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor*. *Cell*, 1991. **65**(5): p. 895-903.
138. Meakin, S.O. and E.M. Shooter, *The nerve growth factor family of receptors*. *Trends Neurosci*, 1992. **15**(9): p. 323-31.
139. Borghesani, P.R., et al., *BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells*. *Development*, 2002. **129**(6): p. 1435-42.
140. Kaisho, Y., et al., *Regional expression of the nerve growth factor gene family in rat brain during development*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **174**(1): p. 379-85.
141. Kalcheim, C. and M. Gendreau, *Brain-derived neurotrophic factor stimulates survival and neuronal differentiation in cultured avian neural crest*. *Brain Res*, 1988. **469**(1-2): p. 79-86.
142. Knusel, B., et al., *Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(3): p. 961-5.
143. Alderson, R.F., et al., *Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture*. *Neuron*, 1990. **5**(3): p. 297-306.
144. Lindsay, R.M., *Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons*. *J Neurosci*, 1988. **8**(7): p. 2394-405.
145. Obata, K. and K. Noguchi, *BDNF in sensory neurons and chronic pain*. *Neurosci Res*, 2006. **55**(1): p. 1-10.
146. Linnarsson, S., A. Bjorklund, and P. Ernfors, *Learning deficit in BDNF mutant mice*. *Eur J Neurosci*, 1997. **9**(12): p. 2581-7.
147. Ma, Y.L., et al., *Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats*. *Neuroscience*, 1998. **82**(4): p. 957-67.
148. Jian, Z., et al., *Activation of Ras and protection from apoptotic cell death by BDNF in PC12 cells expressing TrkB*. *Cell Signal*, 1996. **8**(5): p. 365-70.
149. Kubo, T., et al., *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1995. **85**(2): p. 249-58.
150. Connor, B., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997. **49**(1-2): p. 71-81.
151. Mogi, M., et al., *Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease*. *Neurosci Lett*, 1999. **270**(1): p. 45-8.
152. Nakagawara, A., et al., *Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(1): p. 759-67.
153. Timmusk, T., et al., *Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene*. *Neuron*, 1993. **10**(3): p. 475-89.

154. Yamamoto, M., et al., *Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues.* Neurochem Res, 1996. **21**(8): p. 929-38.
155. Wagner, N., et al., *Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1.* Genes Dev, 2005. **19**(21): p. 2631-42.
156. Ejiri, J., et al., *Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease.* Circulation, 2005. **112**(14): p. 2114-20.
157. Kreusser, M.M., et al., *Differential expression of cardiac neurotrophic factors and sympathetic nerve ending abnormalities within the failing heart.* J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(2): p. 380-7.
158. Katare, R.G., et al., *Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway.* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(3): p. 405-12.
159. Hallden, S., et al., *Smoking and obesity associated BDNF gene variance predicts total and cardiovascular mortality in smokers.* Heart, 2013. **99**(13): p. 949-53.
160. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
161. Lois, C., et al., *Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors.* Science, 2002. **295**(5556): p. 868-72.
162. Angelucci, F., et al., *Paroxetine rapidly modulates the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in a human glioblastoma-astrocytoma cell line.* Pharmacology, 2011. **87**(1-2): p. 5-10.
163. Davis, H.E., et al., *Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation.* Biophys J, 2004. **86**(2): p. 1234-42.
164. Tirassa, P., et al., *RT-PCR ELISA method for the analysis of neurotrophin mRNA expression in brain and peripheral tissues.* J Biotechnol, 2000. **84**(3): p. 259-72.
165. Simkhovich, B.Z., et al., *Brief episode of ischemia activates protective genetic program in rat heart: a gene chip study.* Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 450-9.
166. Hiltunen, J.O., et al., *Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion.* J Pathol, 2001. **194**(2): p. 247-53.
167. Liu, Z., et al., *Late remote ischemic preconditioning provides benefit to patients undergoing elective percutaneous coronary intervention.* Cell Biochem Biophys, 2014. **70**(1): p. 437-42.
168. Li, D., et al., *MicroRNA-1 inhibits proliferation of hepatocarcinoma cells by targeting endothelin-1.* Life Sci, 2012. **91**(11-12): p. 440-7.
169. Yang, B., et al., *The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2.* Nat Med, 2007. **13**(4): p. 486-91.
170. Zhao, Y., et al., *Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2.* Cell, 2007. **129**(2): p. 303-17.
171. Oosterlinck, W., et al., *Diabetes mellitus and the metabolic syndrome do not abolish, but might reduce, the cardioprotective effect of ischemic postconditioning.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2013. **145**(6): p. 1595-602.
172. Zhang, X., et al., *Regulation of cardiac microRNAs by serum response factor.* J Biomed Sci, 2011. **18**: p. 15.

173. Tritsch, E., et al., *An SRF/miR-1 axis regulates NCX1 and Annexin A5 protein levels in the normal and failing heart*. Cardiovasc Res, 2013. **98**(3): p. 372-80.
174. Zhang, J., et al., *rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model*. Int J Clin Exp Pathol, 2011. **4**(5): p. 496-504.
175. Zhang, Y., et al., *Brain-derived neurotrophic factor inhibits phenylalanine-induced neuronal apoptosis by preventing RhoA pathway activation*. Neurochem Res, 2010. **35**(3): p. 480-6.
176. Donovan, M.J., et al., *Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization*. Development, 2000. **127**(21): p. 4531-40.
177. Hubold, C., et al., *Increased serum brain-derived neurotrophic factor protein upon hypoxia in healthy young men*. J Neural Transm, 2009. **116**(10): p. 1221-5.
178. Prigent-Tessier, A., et al., *Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression*. Cardiovasc Res, 2013.
179. Manni, L., et al., *Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes*. Int J Cardiol, 2005. **102**(1): p. 169-71.
180. Golden, E., et al., *Circulating brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10099.
181. Jiang, H., et al., *Association of plasma brain-derived neurotrophic factor and cardiovascular risk factors and prognosis in angina pectoris*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(1): p. 99-103.
182. Zhao, Y., et al., *Transfusion of Plasma Collected at Late Phase after Preconditioning Reduces Myocardial Infarct Size Induced by Ischemia-reperfusion in Rats In vivo*. Chin Med J (Engl), 2017. **130**(3): p. 303-308.
183. Hildebrandt, H.A., et al., *Kinetics and Signal Activation Properties of Circulating Factor(s) From Healthy Volunteers Undergoing Remote Ischemic Pre-Conditioning*. JACC Basic Transl Sci, 2016. **1**(1-2): p. 3-13.
184. Zhao, Y., et al., *Effects of plasma collected 48 hours after transient limb ischemia on blood pressure recovery in homogenic rats after myocardial ischemia reperfusion in vivo*. Chin Med J (Engl), 2013. **126**(15): p. 2894-9.
185. Okada, S., et al., *Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(8): p. 1902-9.
186. Schmolesky, M.T., D.L. Webb, and R.A. Hansen, *The effects of aerobic exercise intensity and duration on levels of brain-derived neurotrophic factor in healthy men*. J Sports Sci Med, 2013. **12**(3): p. 502-11.
187. Sluijter, J.P., et al., *MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 859-68.
188. Xin, M., E.N. Olson, and R. Bassel-Duby, *Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(8): p. 529-41.
189. Kuppusamy, K.T., H. Sperber, and H. Ruohola-Baker, *MicroRNA regulation and role in stem cell maintenance, cardiac differentiation and hypertrophy*. Curr Mol Med, 2013. **13**(5): p. 757-64.
190. Cheng, Y., et al., *A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction*. Clin Sci (Lond), 2010. **119**(2): p. 87-95.

191. Kukreja, R.C., C. Yin, and F.N. Salloum, *MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection*. Mol Pharmacol, 2011. **80**(4): p. 558-64.
192. Liebetrau, C., et al., *Release kinetics of circulating muscle-enriched microRNAs in patients undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(11): p. 992-8.
193. Cheng, Y., et al., *A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(5): p. 668-76.
194. Al-Otaiby, M.A., H.S. Al-Amri, and A.M. Al-Moghairi, *The clinical significance of cardiac troponins in medical practice*. J Saudi Heart Assoc, 2011. **23**(1): p. 3-11.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Timo Brandenburger und Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer für die Integrierung in ihre Arbeitsgruppe, die Zurverfügungstellung des Themas und die große Hilfsbereitschaft bei allen meinen Anliegen. Auch Prof. Dr. med. Benedikt Pannen als Klinikleiter danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen.

Großer Dank gilt ebenso Hilbert Grievink, PhD, der mir unermüdlich in der experimentellen Zusammenarbeit geholfen und Zusammenhänge erklärt hat.

Für reibungslose Abläufe und tatkräftige Unterstützung danke ich Claudia Dohle, Yvonne Grüber und Antje Nebert. Für wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen und Hilfsbereitschaft danke an Erkan Sen.

Außerdem danke ich meinen lieben Freundinnen Catrin Kanyi, Nadija Wegener und Magdalena Berg für produktive Diskussionen und Formatänderungen, sowie guten Zuspruch. Für mentale Unterstützung und Motivation danke ich meiner lieben Familie, Sophie und Jan.