

**Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm**

**Der Einfluss von anorganischem Nitrit auf die microRNA
Expression im akuten myokardialen
Ischämie/Reperfusionsschaden**

Dissertation

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

vorgelegt von
Daniel Messiha
2018

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. T. Rassaf

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. H. Al-Hasani

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Originalveröffentlichung:

Hendgen-Cotta UB, **Messiha D**, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2017;51.1:91–102

Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt ist weltweit einer der führenden Gründe für Morbidität und Mortalität. Die Revaskularisierung des ischämischen Myokards ist der zentrale Schritt in der Therapie des Myokardinfarktes. Obgleich bei ausbleibender Reperfusion das Myokard irreversibel geschädigt wird, stellt die Reperfusion selbst einen kritischen Schritt dar und führt zum so genannten Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden). Mechanismen zur Reduzierung des akuten I/R-Schadens sind noch nicht ausreichend verstanden.

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze Nukleotidsequenzen mit der Eigenschaft, akut die Translation von mRNAs zu inhibieren. Sie sind in zahlreiche kardiovaskuläre Pathologien involviert und nehmen modulierenden Einfluss auf apoptotische und zellenergetische Signalkaskaden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hypothesisiert, dass miRNAs bereits in der frühen Phase des I/R-Schadens dysreguliert werden. Weiterhin wurde untersucht, ob der kardioprotektive Nitrit-NO-Metabolismus auf diese Dysregulation Einfluss nehmen kann.^{1, 2}

Hierzu wurde ein *in vivo* Mausmodell mit 30 Minuten Ischämie und 5 Minuten Reperfusion gewählt. Der Interventionsgruppe wurde 5 Minuten vor Beginn der Reperfusion intrakavitär 1,67 µmol Nitrit/kg Körpergewicht injiziert. Der Kontrollgruppe wurde NaCl appliziert. Von den 290 detektierten miRNAs waren nach der Ischämie 6 miRNAs herunter- und nach der Reperfusion weitere 9 miRNAs hochreguliert. Nitrit verhinderte die Hochregulierung von fast 50% der im I/R-Schaden regulierten miRNAs. Genexpressions- und *in-silico* Analysen zeigten eine miRNA-mRNA Interaktion zwischen zwei dieser regulierten miRNAs (miR 146b und miR 339-3p) und der für IRAK-M kodierenden mRNA. Neben der Kongruenz beider miRNAs zu dem 3'UTR Ende der mRNA, weist auch die inverse Regulierung auf eine wahrscheinliche Interaktion hin. IRAK-M ist als anti-apoptotischer und anti-inflammatorischer Modulator bekannt. Bereits im hepatischen I/R-Schaden wurde IRAK-M als protektiv beschrieben.³ Funktionale Analysen (KEGG- und Panther Signalwege) zeigten nach Nitritapplikation in der frühen Reperfusion weitere 21 signifikant regulierte mRNA Transkripte, welche in apoptotische und zellenergetische Signalkaskaden involviert sind.

Unabhängig davon konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels *Next Generation Sequencing* und konsekutiver Verifizierung in Real Time RT qPCR Experimenten 3 kardiale miRNAs *in vivo* und *in vitro* erstbeschrieben werden („Chr M“, „Chr 6“, „Chr 10“). Eine Regulation im akuten I/R-Schaden oder nach Nitritapplikation zeigte sich nicht.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit eine spezifische miRNA Regulation im frühen myokardialen I/R-Schaden im *in vivo* Mausmodell gezeigt. Diese wurde durch exogene Nitritzufuhr im nanomolaren Bereich im Sinne einer Kardioprotektion beeinflusst. Weitere Arbeiten zur Aufklärung der kausalen und mechanistischen Hintergründe einer solchen Interaktion sind erforderlich.

Abstract

Disruption of blood flow to the myocardium is the underlying cause of myocardial infarction. While the foremost therapeutic goal is to reperfuse the ischemic myocardial areas, it is now known that reperfusion itself can add damage to the myocardium, the so-called ischemia/reperfusion (I/R) injury.

Therapeutic means to ameliorate the I/R-injury are incompletely understood.

MicroRNAs (miRNAs) are 18-24 long nucleotide sequences that can directly inhibit mRNA translation and thus can influence intracellular proteomics within seconds. MiRNAs are known to be involved in many cardiovascular pathologies by targeting apoptotic and cellular bioenergetic pathways among others. The main goal of this thesis was to examine miRNA regulation patterns within the first few minutes of the early I/R-injury and to elucidate whether application of the cardioprotective nitrite-nitric oxide metabolism can influence these miRNA regulation patterns.

To investigate the early phase of I/R-injury a *in vivo* mouse model with 30 minutes of ischemia and 5 minutes of reperfusion was chosen. In the last 5 minutes of ischemia, mice were treated intracardially with a single dose of either nitrite or saline. MiRNA levels were quantified by Real Time RT qPCR. After 30 minutes of ischemia, out of the 290 detected miRNAs 6 miRNAs were downregulated. After 5 minutes of reperfusion, 9 miRNAs were upregulated. Nitrite treatment prevented the upregulation of almost 50% of the dysregulated miRNAs in the reperfusion control group (e.g. miR 146b, miR 339-3p). *In-silico* analysis showed IRAK-M to be a putative target of those miRNAs (miR 146b, miR 339-3p) and was correspondingly inversely regulated on mRNA and protein level, which supports the *in-silico* findings. Further work is necessary to verify a direct interaction between miR 146b, miR 339-3p and IRAK-M. IRAK-M is known to have anti-apoptotic and anti-inflammatory capacities. Functional analysis studies (KEGG- and Panther-pathways) revealed 21 significantly regulated mRNA transcripts in the early I/R-injury after nitrite treatment, which are also involved in apoptotic and cellular bioenergetic pathways.

Furthermore, 3 *de-novo* miRNA sequences were described in this thesis ("*Chr M*", "*Chr 6*", "*Chr 10*"). They were detected by "Next Generation Sequencing" and verified by Real Time RT qPCR *in vivo* and *in vitro*. A specific regulation pattern during the course of early I/R-injury was not observed. Further studies are necessary to examine potential targets and to evaluate the functional significance of these 3 miRNAs.

In conclusion, with this thesis a specific *in vivo* miRNA regulation pattern of the early phase of I/R-injury was characterized. Nitrite treatment can acutely interfere with this miRNA regulation pattern within the first minutes of the I/R-injury in a cardioprotective fashion. This provides a new mechanistic understanding of the already known cardioprotective capacities of the nitrite-nitric oxide metabolism and can lead to new therapeutic options.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
β-MHC	schwere Kette des β-Myosins (<i>β-myosin heavy chain</i> , engl.)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i> , engl.)
Ca ²⁺	Kalzium
CaMKIIδ	Kalzium/calmodulin-abhängige Protein Kinase II (<i>Calcium/calmodulin-dependent Protein Kinase II</i> , engl.)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , engl.)
C _t	Schwellenwert-Zyklus (<i>cycle threshold</i> , engl.)
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
Drp-1	Dynamin verwandtes Protein 1 (<i>dynamin related protein 1</i> , engl.)
eGFR	endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor (<i>endothelial growth factor receptor</i> , engl.)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>Fibroblast Growth Factor</i> , engl.)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GTPase	Guanosintriphosphatase
HIF	Hypoxie induzierter Faktor (<i>hypoxia-inducible factor</i> , engl.)
HL-1	herzähnliche Zellen (<i>heart-like cells 1</i> , engl.)
HSPG	Heparansulfat Proteoglycan
I/R	Ischämie/Reperfusion
IAP	Inhibitoren der Apoptose (<i>inhibitors of apoptosis</i> , engl.)
IL-3	Interleukin-3
IRAK-M	Interleukin-1 Rezeptorassoziierte Kinase 3 (<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 3</i> , engl.)
LCA	linke Koronararterie (<i>left coronary artery</i> , engl.)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i> , engl.)

miR	Mikroribonukleinsäure (<i>micro ribonucleic acid</i> , engl.)
miRNA	Mikroribonukleinsäure (<i>micro ribonucleic acid</i> , engl.)
mRNA	Botenribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i> , engl.)
Na ⁺	Natriumion
Na ⁺ /Ca ²⁺ Austauscher	Natrium/Kalziumaustauscher
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na ⁺ /H ⁺ Austauscher	Natrium/Protonenaustauscher
Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ Symporter	Natrium/Hydrogenkarbonatsymporter
NGS	Sequenzierung der nächsten Generation (<i>next generation sequencing</i> , engl.)
NIK	Nuklearer Faktor κB induzierende Kinase (<i>nuclear factor-κB-inducing kinase</i> (engl.)
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> , engl.)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
pre-miRNA	Vorläufer Mikroribonukleinsäure (<i>precursor micro ribonucleic acid</i> , engl.)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i> , engl.)
RNase	Ribonuklease
RIP 1	Rezeptor interagierendes Protein 1 (<i>receptor interacting protein 1</i> , engl.)
rIPC	Ischämische Fern-Präkonditionierung (<i>remote ischemic preconditioning</i> , engl.)
RIPA	Radioimmunopräzipitationsversuch (<i>radioimmunoprecipitation assay</i> , engl.)
RISC	RNA-induzierter Hemmkomplex (<i>RNA-induced silencing complex</i> , engl.)
RORyt	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor γ</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i> , engl.)

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , engl.)
siRNA	kleine eingreifende Ribonukleinsäure (<i>small interfering ribonucleic acid</i> , engl.)
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure (<i>small ribonucleic acid</i> , engl.)
snoRNA	kleine nukleoläre Ribonukleinsäure (<i>small nucleolar ribonucleic</i> , engl.)
SNP	Natrium-Nitroprussid (<i>sodium nitroprusside</i> , engl.)
ss-cDNA	einzelsträngige komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>single stranded complementary desoxy-ribonucleic acid</i> , engl.)
THRAP1	Thyroidhormonrezeptor assoziiertes Protein 1 (<i>thyroid hormone receptor associated protein 1</i> , engl.)
totalRNA	Gesamtribonukleinsäure (<i>total ribonucleic acid</i> , engl.)
TRAF2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierte Faktor 2
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i> , engl.)
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion (<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , engl.)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Der myokardiale Ischämie-/Reperfusionsschaden.....	2
1.2	MiRNAs im kardiovaskulären System.....	4
1.2.1	Struktur und Wirkungsmechanismus der miRNAs.....	4
1.2.2	Biosynthese der miRNAs.....	5
1.2.3	Stellenwert der miRNAs im kardiovaskulären System.....	6
1.3	Nitrit-NO-Metabolismus im akuten myokardialen Ischämie-/ Reperfusionsschaden.....	10
1.4	Interaktion zwischen Nitrit-NO-Metabolismus und miRNAs.....	11
2.	Material und Methoden.....	13
2.1	Chemikalien.....	13
2.2	Versuchstiere.....	13
2.3	Versuchsprotokoll des myokardialen <i>in vivo</i> Ischämie/ Reperfusionsmodells.....	13
2.4	Kultivierung der Heart Like 1 (HL-1) Zellen.....	14
2.5	MiRNA- und totalRNA Extraktion aus Mäuseherzen <i>in vivo</i> und aus HL-1 Zellen <i>in vitro</i>	15
2.5.1	Herstellung von Mäuseherzhomogenaten.....	15
2.5.2	Pelletierung der HL-1 Zellen.....	15
2.5.3	Herstellung von HL-1 Zelllysaten.....	16
2.5.4	Proteinisolation aus den HL-1 Zellen.....	16
2.5.5	Extraktion von miRNA und totalRNA aus Mäuseherzhomogenaten und HL-1 Zelllysaten.....	16
2.6	Quantifizierung der miRNAs mittels Real Time RT qPCR <i>in vivo</i>	17
2.6.1	Herstellung der ss-cDNA.....	18
2.6.2	Durchführung der Real Time RT qPCR.....	18
2.6.3	Prinzip der Real Time Reverse Transkriptase quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (Real Time RT qPCR).....	19
2.6.3.1	Die Berechnung und Aussage des Cycle Threshold (C_t).....	20
2.6.3.2	Die Berechnung und Aussage des ΔC_t – Wertes.....	21
2.6.3.3	Die Berechnung und Aussage des $\Delta\Delta C_t$ – Wertes.....	21

2.7	Quantifizierung der mRNA Spiegel in der Reperfusionsgruppe nach Nitritapplikation vs. der Reperfusionskontrollgruppe.....	23
2.8	Bioinformatische Analyse der miRNA-mRNA Interaktionen.....	23
2.9	Single Tube Real Time RT qPCR mit spezialangefertigten Primern <i>in vivo</i>	23
2.9.1	Herstellung der ss-cDNA.....	24
2.9.2	Durchführung der single tube Real Time RT qPCR Reaktion.....	24
2.10	SDS-Page und Western Blot.....	25
2.11	<i>Next Generation Sequencing in vivo</i>	25
2.11.1	Prinzip des <i>Next Generation Sequencing</i>	25
2.11.2	Versuchsdurchführung des <i>Next Generation Sequencing</i>	26
2.11.3	Verifizierungsversuche des <i>Deep Sequencings</i> mittels single tube Real Time RT qPCR <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	27
2.12	Statistik.....	27
3.	Ergebnisse.....	29
3.1	Qualitätskontrollen.....	29
3.1.1	Spektrophotometrische quantitative Kontrolle der miRNAs.....	29
3.1.2	Endogene Kontrollen der Real Time RT qPCR Versuche.....	29
3.2	MiRNA Spiegel in der Basalgruppe <i>in vivo</i>	30
3.3	MiRNAs werden innerhalb von 30 Minuten Ischämie und im akuten I/R-Schaden <i>in vivo</i> dysreguliert.....	30
3.4	Anorganisches Nitrit beeinflusst die miRNA Regulation im akuten myokardialen I/R-Schaden <i>in vivo</i>	33
3.5	Anorganisches Nitrit beeinflusst die mRNA Regulation im akuten myokardialen I/R-Schaden <i>in vivo</i>	34
3.5.1	Analyse des mRNA Expressionsprofils nach Nitritapplikation im akuten myokardialen I/R-Schaden.....	35
3.5.2	Analyse von möglichen miRNA-mRNA-Protein Interaktionen nach Nitritapplikation in 5 Minuten Reperfusion.....	40
3.6	Nachweis neuer kardialer miRNAs.....	42
3.6.1	Verifizierung der neuen miRNAs in der Real Time RT qPCR.....	43
3.6.2	Die neuen miRNAs unterliegen innerhalb von 30 Minuten Ischämie und im akuten I/R-Schaden keiner Regulation.....	44

3.6.3	Anorganisches Nitrit hat auf die Regulation der neuen miRNAs im akuten myokardialen I/R-Schaden <i>in vivo</i> keinen Einfluss.....	44
4	Diskussion.....	45
5	Literaturverzeichnis.....	54
6	Abbildungsverzeichnis.....	63
7	Danksagung	

1. Einleitung

Der Myokardinfarkt ist weltweit eine der führenden Todesursachen des 21. Jahrhunderts. Länger anhaltende kardiale Ischämien führen zum Zelluntergang des Myokards. Daher ist die schnelle Wiedereröffnung verschlossener Herzkranzarterien unter anderem mittels Herzkatheteruntersuchung die optimale Therapie. Obgleich essentiell zur Behandlung akuter Myokardischämien führt diese Reperfusion paradoxerweise zu einer zusätzlichen Schädigung des Myokards - dem sogenannten Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden). Dieser wird wesentlich mitverursacht durch mitochondriale Kalzium-(phosphat)akkumulation und die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dies mündet in Zellschwellung, Zellruptur und einer funktionellen Schädigung des Sarkolemmes der Kardiomyozyten.⁴⁻⁸ Durch die aktuelle leitliniengerechte Standardtherapie mittels Herzkatheterintervention und Rekonstitution der Myokardperfusion in einem ischämischen Areal, gewinnt der I/R-Schaden zunehmend an Bedeutung. Allerdings konnten bis heute keine wirkungsvollen klinischen Strategien zur Reduzierung des I/R-Schadens in den Klinikalltag implementiert werden. MicroRNAs (miRNA) sind kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle, die eine wichtige Rolle in der Regulation kardialer Pathologien spielen. So haben miRNAs in den Umbauvorgängen nach kardialer Ischämie einen wesentlichen Stellenwert. Neuere Arbeiten legen nahe, dass miRNA-Konzentrationen über den Signalbotenstoff Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst werden können.⁹⁻¹¹ Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten wiederum für den akuten I/R-Schaden eine kardioprotektive Wirkung von NO, nach Generierung aus anorganischem Nitrit nachweisen.^{1, 12-14} Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der miRNA-Expression im akuten I/R-Schaden und eine mögliche differentielle Regulierung nach Applikation von anorganischem Nitrit. Im Folgenden soll zunächst auf den akuten myokardialen I/R-Schaden eingegangen werden, um dann zur Rolle von miRNAs und Nitrit/NO in ebendiesem überzuleiten und eine mögliche Interaktion mit Nitrit-NO Stoffwechselwegen zu beleuchten.

1.1 Der myokardiale Ischämie-/Reperfusionsschaden

Im Rahmen des Myokardinfarktes ist nicht nur die Phase der Ischämie kritisch für das Myokard. Auch die Myokardreperfusion kann vulnerables Myokard zusätzlich schädigen. Myozyten, die trotz Ischämie unmittelbar vor Reperfusionsbeginn noch vital sind, verlieren durch die Reperfusion teilweise ihre Funktionalität. Die Reperfusion bleibt nach wie vor unverzichtbare Sofortmaßnahme im Myokardinfarkt. Allerdings sind Strategien, die den akuten I/R-Schaden mildern können, zur weiteren Reduzierung des Infarktareals und zur Optimierung des klinischen Ergebnisses nach Myokardinfarkt wichtig.^{4, 5} Die genauen Ursachen des beobachteten Reperfusionsschadens sind noch nicht abschließend geklärt. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert:¹⁵ Hierzu zählen insbesondere die rasche pH Normalisierung, eine intrazelluläre Kalzium (Ca^{2+}) Überladung, die Generierung toxischer ROS und die Aufhebung der mitochondrialen Integrität¹⁶: Während der Ischämie akkumuliert Laktat intrazellulär, wodurch es zu einer pH-Wert Verschiebung in den azidotischen Bereich kommt. Mit Einleitung der Reperfusion wird der pH-Wert rasch normalisiert, welches zytotoxisch wirken kann.¹⁷ Kompensatorisch werden zellmembranständige Na^+/H^+ -Austauscher und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Symporter aktiviert, welche zu einer intrazellulären Na^+ -Akkumulation führen. Die intrazelluläre Na^+ Akkumulation kehrt die Triebkraft des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers um. Hierdurch wird eine intrazelluläre Kalziumakkumulation initiiert. Diese wird als weitere Grundlage des Reperfusionsschadens diskutiert.¹⁸ Intramyozytäre Kalziumüberladung stört die diastolische Relaxation des Herzens und ist an der Entstehung der kardialen Hypertrophie beteiligt.¹⁹ Ein weiteres gut untersuchtes Phänomen in der frühen Phase der Reperfusion ist die Generierung von ROS.²⁰ Die Reperfusion führt zur Depolarisation der Kardiomyozyten. Im Rahmen dessen wird der Rac-GTPase-Signalweg aktiviert, an dessen Ende die Aktivierung der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) steht.²¹ Die NADPH-Oxidase ist ein gut untersuchter und wichtiger Produzent von ROS. Sie überträgt Elektronen auf Sauerstoff und bildet das Superoxid-Radikal (O_2^-).²² Des Weiteren führt die Ischämie zu einer Funktionsstörung der mitochondrialen Elektronentransportkette. Mit Beginn der Reperfusion steht wieder ausreichend Sauerstoff zu Verfügung. Dieser kann über die beeinträchtigte mitochondriale Atmungskette nicht vollständig prozessiert werden. Dabei wird der akkumulierte Sauerstoff zu ROS (O_2^- , OH^-) umgesetzt. Diese führen durch

Peroxidation zu zellulären Schädigungen und werden als wesentliche Mediatoren des I/R-Schadens angesehen.^{23, 24}

Neben diesen zellulären Pathomechanismen weist der I/R-Schaden folgende vier klinische Entitäten auf:⁴

1. Myokardiales *stunning*. In diesem Zustand kommt es, trotz wiederhergestellter physiologischer Myokardperfusion, zu einer reversiblen Dysfunktion des Myokards; beispielsweise in Form einer reduzierten Kontraktilität und Kontraktilitätsgeschwindigkeit.²⁵

2. *No-reflow* Phänomene. Myokardgewebe, das durch Okklusion einer Koronararterie einer mehr als 30-minütigen Ischämie ausgesetzt wurde, zeigt nach Aufhebung der Okklusion für mehrere Stunden eine eingeschränkte Reperfusion.²⁶

3. Durch Reperfusion-induzierte Arrhythmien. Bereits nach sekunden- oder minutenlangen Ischämiephasen, kann eine Reperfusion lebensgefährliche ventrikuläre Tachykardien auslösen. Diese können zum plötzlichen Herztod führen. Nach längeren Ischämiephasen (Stunden bis Tage) kann eine Reperfusion neben ventrikulären Tachykardien auch Kammerflimmern und ventrikuläre Extrasystolen bedingen.²⁷

4. Der letale Reperfusionsschaden. Mit Beginn der Reperfusion wird viel Sauerstoff in vulnerables Myokard transportiert. Dieser schädigt über die Generierung von ROS die Kardiomyozyten zusätzlich, obwohl die Ischämie bereits beendet ist. Im Rahmen dessen kann eine Apoptose/Nekrose der Kardiomyozyten beobachtet werden.²⁴

Maßnahmen zur Reduzierung des I/R-Schadens sind somit von zentraler klinischer Bedeutung, um nach Beendigung der Ischämie eine weitere Schädigung des vulnerablen Myokards zu verhindern. Trotz intensiver Untersuchungen des I/R-Schadens stehen noch keine effektiven Strategien zur Verhinderung des Reperfusionsschadens im klinischen Alltag zur Verfügung. Ziel der aktuellen Forschung ist die Charakterisierung der am I/R-Schaden beteiligten Signalwege als mögliche Ziele neuer Therapiestrategien. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass miRNAs einen hohen Stellenwert in kardialen Umbauvorgängen nach kardialer Ischämie haben.²⁸⁻³⁰ Ob miRNAs auch in den ersten 5 Minuten des akuten myokardialen I/R-Schadens von Relevanz sind, ist bisher noch nicht ausreichend untersucht worden.

1.2 MiRNAs im kardiovaskulären System

1.2.1 Struktur und Wirkungsmechanismus der miRNAs

MiRNAs sind 18-24 Nukleotid lange, nicht kodierende einzelsträngige Nukleotidsequenzen, welche auf posttranskriptioneller Ebene die Proteinbiosynthese inhibieren können.³¹ 1993 wurde erstmalig der inverse Zusammenhang zwischen bestimmten Nukleotidsequenzen und Proteinspiegeln anhand der Nukleotidsequenz *lin-4* und des korrespondierenden Proteins LIN-14 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) dargestellt; *lin-4* stellt somit die erste entdeckte miRNA dar.³² Die miRNAs binden mit den Nukleotiden 2-7 (seed-Region) an die komplementäre Nukleotidsequenz auf der 3' UTR-Region der Ziel-messenger RNA (mRNA) und unterbinden hierdurch deren Translation.³³ Die Inhibition der Proteinbiosynthese wird hierbei entweder durch mRNA-Degradation oder durch die Unterbindung der Ribosom-mRNA-Interaktion herbeigeführt.³⁴ Mindestens 60% des humanen Genoms unterliegen einer Regulation durch miRNAs.³³

Es ist noch nicht abschließend geklärt, wie viele verschiedene miRNAs in Eukaryoten existieren und welche Aufgaben sie übernehmen. Während bereits mehrere hundert miRNAs in der Literatur beschrieben worden sind, wird die tatsächliche Gesamtzahl der miRNAs deutlich höher geschätzt.³⁵ Bisherige Methoden zur rein experimentellen Identifizierung von miRNAs sind begrenzt. Sie beruhen auf dem Sanger Prinzip zur Sequenzierung und der Analyse von cDNA-Bibliotheken. Dahingegen ermöglichen reine *in-silico* Verfahren zur Identifizierung von miRNA-Sequenzen zwar einen hohen Umsatz von untersuchten Sequenzen, weisen aber eine geringe Sensitivität auf und liefern oft falsch-positive Ergebnisse.³⁶ Die Entwicklung neuer Hybrid-Nachweismethoden, wie des *Next Generation Sequencing* (NGS) eröffnet hier umfassendere Möglichkeiten zur Erfassung bisher nicht bekannter miRNA-Sequenzen. NGS zeichnet sich durch eine höhere Kapazität als bei rein experimentellen Ansätzen aus bei gleichzeitig höherer Sensitivität als bei reinen *in-silico* Analysen.³⁷

1.2.2 Biosynthese der miRNAs

Im Zellkern erfolgt die Transkription des miRNA-Gens durch die RNA-Polymerase II. Das synthetisierte Transkript wird als pri-miRNA bezeichnet. Die pri-miRNA ist mehrere Kilobasen lang und enthält eine Haarnadelstruktur (*hairpin structure*), in welcher der Sequenzabschnitt der reifen miRNA (*mature miRNA*) eingebettet ist. Diese Haarnadelstruktur wird durch den Mikroprozessor, bestehend aus der RNase III Drosha und dem Kofaktor DGCR8 (Pasha), aus der pri-miRNA abgetrennt. Hierbei entsteht die 60-70 Nukleotid lange so genannte pre-miRNA.³⁸ Exportin-5 transportiert die pre-miRNA durch die Kernporen aus dem Nukleus in das Zytoplasma.³⁹ Hier erfolgt eine weitere enzymatische Spaltung: Die RNase III Dicer trennt von der pre-miRNA die 21-24 Nukleotid lange - und in weiten Teilen doppelsträngige - duplex miRNA ab. Der Strang der duplex miRNA mit der reifen miRNA-Sequenz (*mature miRNA*) wird hiernach auf das Protein Argonaute übertragen und dadurch stabilisiert. Gemeinsam mit weiteren Proteinen entsteht der *miRNA-induced silencing complex* (RISC). Der komplementäre Strang der duplex miRNA zerfällt (Abb.1).^{40, 41} Bindet der RISC über komplementäre Basenpaarung an die entsprechende Ziel-mRNA, so wird deren Translation entweder über mRNA-Degradation oder über die Unterbindung des Translationsvorganges blockiert.³⁴

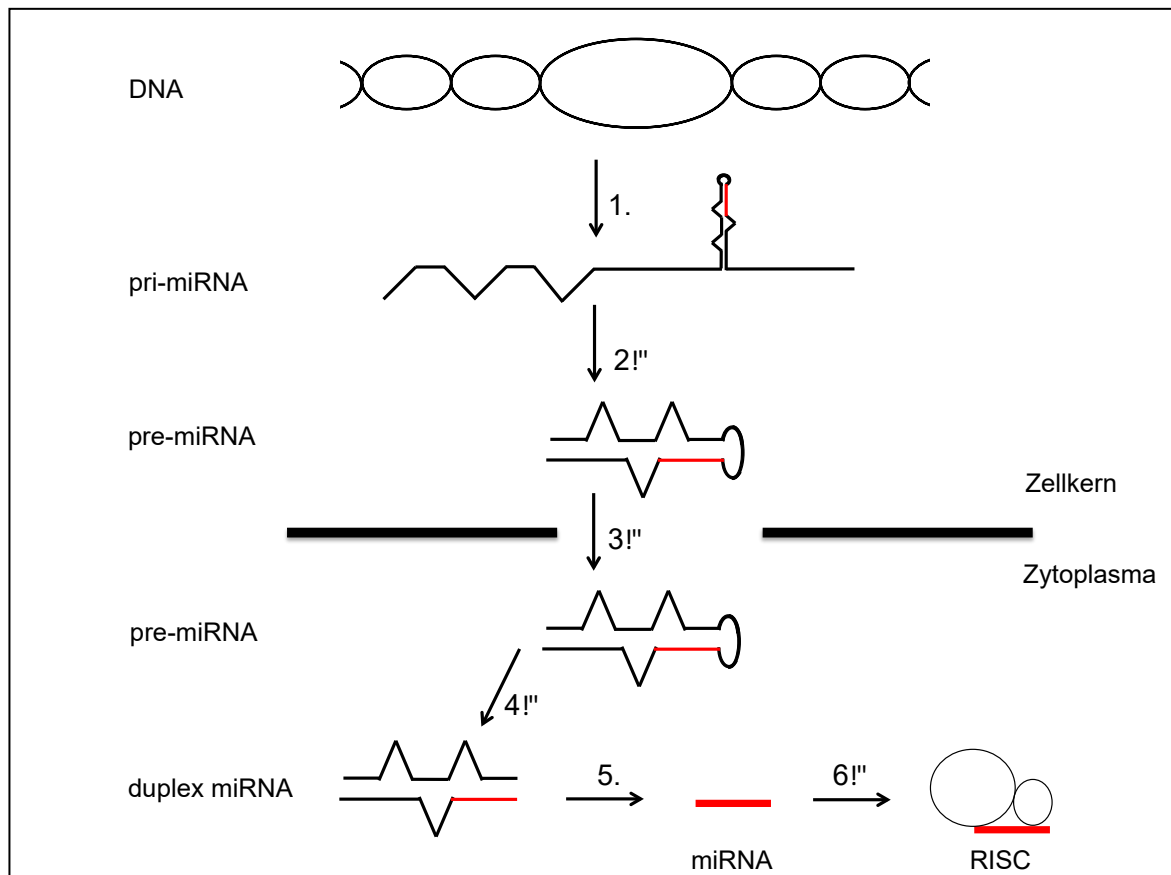


Abb. 1: Biosynthese der miRNAs. Das miRNA-Gen wird im Zellkern durch die RNA-Polymerase II abgelesen und hierdurch die pri-miRNA synthetisiert (1). Die RNase III Drosha schneidet aus der pri-miRNA eine Haarnadelstruktur (*hairpin structure*) aus, welche als pre-miRNA bezeichnet wird; diese enthält die reife miRNA-Sequenz (*mature miRNA*; rot) (2). Die pre-miRNA wird durch Exportin-5 durch eine Kernpore vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert (3). Hier wird die pre-miRNA durch Dicer in die duplex miRNA prozessiert (4). Der Strang mit der Reifen miRNA-Sequenz wird durch Argonaute stabilisiert. Gemeinsam mit weiteren Proteinen entsteht der *RNA-induced silencing complex* RISC (5,6).

1.2.3 Stellenwert der miRNAs im kardiovaskulären System

MiRNAs sind als Inhibitoren der Proteinsynthese in vielen physiologischen Stoffwechselwegen regulatorisch relevant.⁴² Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine miRNA die Translation mehrerer hundert Proteine regulieren kann.⁴³ Obgleich miRNAs in eine Vielzahl von Stoffwechselwegen involviert sind, führt bei den meisten miRNAs die Deletion einer einzelnen miRNA zu keinen erkennbaren Veränderungen im Organismus. Dies ist auf die redundante Regulierung von mRNAs durch verschiedene miRNAs zurückzuführen.⁴⁴ Wird dahingegen die kardiale RNase III Dicer eliminiert, welche für die enzymatische Spaltung der pre-miRNA in die duplex miRNA verantwortlich ist, hat dies klinische Auswirkungen

wie zum Beispiel die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz.⁴⁵ Die kardiale RNase III Dicer reguliert nämlich als Schlüsselenzym der miRNA-Synthese eine Vielzahl von miRNAs. Im Rahmen von zellulären Stresssituationen gewinnen auch einzelne miRNAs an Bedeutung.⁴⁶ Zelluläre Stresssituationen werden als solche definiert in denen es zu abrupten Änderungen der Zellhomöostase kommt. Viele miRNAs sind in Feedbackschleifen involviert. Die verstärkte Aktivierung oder Inhibierung einer miRNA im Rahmen solcher zellulären Stresssituationen beeinflusst die gesamte Feedbackschleife. Wie im Folgenden dargestellt wird, führt dieser Zusammenhang zur Potenzierung der miRNA-Wirkungen in zellulären Stresssituationen: Häufig werden die Gene der miRNA und der entsprechenden Ziel-mRNA vom selben Promotor und denselben Transkriptionsfaktoren reguliert. Werden in zellulären Stresssituationen bestimmte Genabschnitte stärker transkribiert und die Ziel-mRNA verstärkt translatiert, so kommt es simultan zu einer verstärkten Synthese der korrespondierenden miRNAs. Letzteres führt im Sinne einer negativen Feedbackschleife zur Translationsinhibierung der Ziel-mRNA.⁴⁶ Eine Deletion von bereits wenigen miRNAs gewinnt somit in Stresssituationen mit abrupten Änderungen der Zellhomöostase große Bedeutung, da entsprechende Feedbackschleifen und Rückkopplungsmechanismen entfallen. Die Folge ist eine unkontrollierte Proteintranslation. Da miRNAs als Regulatoren der Translation in zellulären Stresssituationen besondere Relevanz erlangen, wurde ihr Einfluss in zahlreichen kardiovaskulären Pathologien untersucht. Diese Pathologien stellen die beschriebenen zellulären Stresssituationen, welche mit einer Änderung der Zellhomöostase einhergehen, dar. Hierzu zählen Krankheitsbilder, wie beispielsweise Herzinsuffizienz, kardiale Hypertrophie, kardiale Arrhythmien, post-Infarkt Remodelling, Arteriosklerose und Vorhofflimmern.^{28-31, 47, 48} Die dabei eruierte kardiale Relevanz von miRNAs soll im Folgenden beispielhaft an der miR 208, miR 125a, miR 200c, miR 107, miR let 7b, miR 214 und miR 494 aufgezeigt werden. Noch nicht untersucht wurde dahingegen die Bedeutung von miRNAs in den ersten fünf Minuten des akuten myokardialen I/R-Schadens. Dabei ist dieser Zeitraum klinisch von entscheidender Bedeutung. Viele der für den Reperfusionsschaden ursächlichen Pathomechanismen nehmen hier ihren Ursprung und sind in der Regel im Rahmen der (interventionellen) Wiedereröffnung verschlossener Koronargefäße iatrogen bedingt und somit akuter

therapeutischer Maßnahmen zugänglich. Gleichzeitig kann vermutet werden, dass miRNAs durch ihre unmittelbare Einflussnahme auf die Proteintranslation als molekulare Schalter der Proteintranslation in den ersten fünf Minuten der Reperfusion akut modulierend eingreifen können.

Bei der Genese der kardialen Hypertrophie scheinen die miR 208 und let 7b von Relevanz zu sein: Die miR 208 spielt bei der Genese der kardialen Hypertrophie im Rahmen des Remodellings bei Nachlasterhöhung eine Rolle. Dabei inhibiert die miR 208 das *thyroid hormone receptor associated protein 1* (THRAP1), welches seinerseits eine Hochregulierung des *β -myosin heavy chain* (β -MHC) verhindert. β -MHC wird somit durch die miR 208 enthemmt und scheint bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie eine treibende Kraft zu sein. Entsprechend weisen miR 208 *Knock-out* Mäuse geringere β -MHC Spiegel und schwächere kardiale Hypertrophien auf.⁴⁹

Die miR let 7b inhibiert die Proteinsynthese des Myotrophins.⁵⁰ Transgene Mäuse, die Myotrophin überexprimieren, entwickeln eine kardiale Hypertrophie und konsekutiv eine Herzinsuffizienz.⁵¹ Ob die miR let 7b über Herunterregulierung des Myotrophins diese Effekte hemmen kann, bleibt noch zu untersuchen.

Beim post-Infarkt Remodelling spielt die miR 200c eine wichtige Rolle. Sie inhibiert die Synthese der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 α MAPK).⁵² Letztere spielt eine Rolle beim kardialen post-Infarkt Remodelling. 7 Tage nach einem Myokardinfarkt wiesen p38 α MAPK *Knock-out* Mäuse geringere Infarktareale und eine bessere ventrikuläre Pumpfunktion auf als Wildtyp-Mäuse.⁵³

In die regelrechte kardiale Entwicklung und Regeneration ist die miR 125a involviert. Sie kann über Anbindung an die 3'UTR der mRNA Region von Glypican-4 dessen Translation inhibieren. Glypican-4 ist als Heparansulfat Proteoglycan (HSPG) für die Funktion von heparin-bindenden Wachstumsfaktoren, wie den *Fibroblast Growth Factor* (FGF) oder für den Wnt-Signalweg von entscheidender Bedeutung.^{54, 55} Der Wnt-Signalweg spielt hierbei eine Schlüsselrolle in der Kardiomyozytendifferenzierung aus Vorläuferzellen.⁵⁶ Die Glypicanfamilie ist dabei von kardialer Relevanz: humane Studien zeigten, dass das Fehlen von Vertretern der Glypicanfamilie zum Simpson-Golabi-Behmel Syndrom mit kardiovaskulären Malformationen, ventrikulären und atrialen Septumdefekten führen kann.^{57, 58} Außerdem scheinen Glypicane eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Koronararterien zu spielen. Beim *Knock-out* des

Glypican-3 konnte in murinen *in vivo* Versuchen die Ausbildung von Fisteln zwischen Koronararterien und dem rechten Ventrikel beobachtet werden.⁵⁸

Auch apoptotische Stoffwechselwege, welche im Rahmen des Myokardinfarktes von Bedeutung sind werden über miRNAs reguliert. Der Hypoxie-induzierte Faktor 1 α (HIF-1 α) ist ein wichtiger Mediator der Apoptose unter hypoxischen Bedingungen, indem es das pro-apoptotische Protein p53 stabilisiert.⁵⁹ Die Proteinbiosynthese des HIF-1 α wird durch die miR 107 inhibiert⁶⁰. Es bleibt zu untersuchen, ob hierdurch ein anti-apoptotischer Effekt erzielt werden kann.

Die miR 214 ist an der intramyokardiozytären Regulierung der Kalziumhomöostase beteiligt, da sie die Synthese des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers inhibiert. Über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen Reperfusion ist die miR 214 hochreguliert und inhibiert die Synthese des Na⁺/Ca²⁺ Austauschers. Dieser Kompensationsmechanismus wirkt einer intrazellulären Kalziumüberladung und somit einer Apoptose der Kardiomyozyten entgegen. Außerdem inhibiert die miR 214 pro-apoptotische Proteine wie die Ca²⁺/Calmodulin abhängige Proteinkinase δ (CaMKII δ). Entsprechend zeigen miR 214 *Knock-out* Mäuse in den ersten 7 Tagen der Reperfusion, verglichen mit dem Wildtyp, eine stärkere Aktivität des Na⁺/Ca²⁺ Austauschers mit intrazellulärer Kalziumakkumulation und höheren Spiegeln der CaMKII δ . Hieraus folgt eine höhere Apoptoserate der Kardiomyozyten.²⁸

MiRNAs sind im I/R-Schaden auch an der Regulierung der NO-Synthese beteiligt, wie am Beispiel der miR 494 gezeigt werden soll: Die miR 494 wird im I/R-Schaden hochreguliert. Transgene Mäuse mit einer miR 494 Überexpression zeigen eine verstärkte Aktivierung des Akt-Signalweges (Proteinkinase B) im Myokard.⁶¹ Der Phosphoinositid-3-Kinase Signalweg (PI3K/AKT-Signalweg) führt zu einer verstärkten Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS). Folglich wird mehr Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert.⁶² NO wirkt im I/R-Schaden kardioprotektiv.^{1, 2, 12} Folglich weisen transgene Mäuse mit einer miR 494 Überexpression eine schnellere und umfassendere Erholung nach einem I/R-Schaden auf als Wildtyp-Kontrolltiere. Dies war an niedrigeren linksventrikulären enddiastolischen Drücken und einer besseren linksventrikulären Pumpfunktion im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Mäuse, bei denen der miR 494 Spiegel pharmakologisch reduziert wurde zeigten einen gegenteiligen Effekt.⁶¹

MiRNAs sind somit als akute Regulatoren der Proteinsynthese besonders in zellulären Stresssituationen, gekennzeichnet durch die abrupte Änderung der

Zellhomöostase, in kardiale Pathologien involviert.⁴⁶ Dies zeigt die hohe klinische Relevanz der miRNAs. Eine veränderte Regulierung von miRNAs kann in Stresssituationen Einfluss auf kardiale Funktionen nehmen. Initiale Daten zeigen, dass Nitrit/NO-Signalwege Einfluss auf die miRNA-Regulation haben.¹⁰ Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass im akuten I/R-Schaden Nitrit zu NO reduziert wird und selbst kardioprotektiv wirkt.¹² Ob miRNAs im akuten myokardialen I/R-Schaden einer Regulierung von Nitrit/NO unterliegen und hierüber kardioprotektiv wirken ist bisher nicht bekannt.

1.3 Nitrit-NO-Metabolismus im akuten myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden

Nitrit wirkt im experimentellen I/R-Schaden über die Reduktion zu NO kardioprotektiv.^{1, 2} In humanen Studien konnte bislang jedoch ein solcher Effekt nicht verifiziert werden. Ob dies auch im Patienten der Fall ist müssen weitere Studien untersuchen.^{63, 64} Allgemein erfolgt die Umwandlung von Nitrit zu NO unter hypoxischen Bedingungen maßgeblich über die Reduktaseaktivität des Desoxy-myoglobins.¹² Darüber hinaus ist auch die Xanthinoxidoreduktase in der Lage in der Reperfusion Nitrit zu NO umzuwandeln, allerdings im Wesentlichen unter anoxischen Bedingungen.⁶⁵ *In vivo* Nitritapplikation führt im *in vivo* Maus-Infarktmodell zu einer Reduzierung des I/R-Schades um ca. 50%, während dieser Effekt in Myoglobin-defizienten Mäusen nicht nachweisbar war.^{12 13, 66, 67}

Nitrat ist ein anorganisches Ion und kann über Nitrit zu NO reduziert werden. NO ist durch das freie Valenzelektron besonders reaktionsfreudig, biologisch aktiv und somit per definitionem ein Radikal. Ebenso kann NO direkt über die NO-Synthasen von der Aminosäure L-Arginin hergestellt werden, welche hierbei zu Citrullin umgewandelt wird.

Aus Nitrit generiertes NO inhibiert den Komplex I der Atmungskette und hemmt hierüber die Produktion von ROS, welche wichtige Mediatoren des Reperfusionsschadens darstellen.^{5, 68} Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten diesbezüglich zeigen, dass der kardioprotektive Effekt des *remote ischemic preconditioning* (rIPC) wesentlich auf Nitrit-Signalwegen beruht. Beim rIPC handelt es sich um kurze repetitiv-herbeigeführte Phasen der Ischämie und Reperfusion durch In- und Deflation einer Blutdruckmanschette am Arm. Durch das rIPC wurde herzfern endothelabhängig NO/Nitrit generiert. Dieses wurde hämatogen zum

ischämischen Myokard transportiert und unter hypoxischen Bedingungen Myoglobin-abhängig wieder zu NO reduziert. Weder in eNOS *Knock-out* Mäusen, noch in Myoglobin *Knock-out* Mäusen konnte der kardioprotektive Effekt des rIPC repliziert werden.¹³

1.4 Interaktion zwischen Nitrit-NO-Metabolismus und miRNAs

Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass im akuten I/R-Schaden Nitrit zu NO reduziert wird und selbst kardioprotektiv wirkt.^{1, 12} MiRNAs hingegen spielen eine wesentliche Rolle für pathophysiologische Signalwege kardialer Erkrankungen. Ob miRNAs in den ersten fünf Minuten des akuten I/R-Schadens dysreguliert sind und durch den Nitrit-NO-Metabolismus beeinflusst werden können, ist bisher nicht untersucht worden.

In einem 72h Modell wurde bereits gezeigt, dass die exogene Applikation von Nitrit und konjugierter Linolsäure einen Einfluss auf die Regulation einzelner miRNAs hat.^{9, 10} Applikation von exogenem Nitrit und konjugierter Linolsäure an Wildtyp-Mäusen vor einem durch permanente Koronararterienligatur herbeigeführten Myokardinfarkt, führt im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe postinfarktiell zu einer Hochregulierung der miRNA 499.¹⁰ Die miR 499 wirkt durch die Inhibition des *dynamin related protein 1* (Drp-1) kardioprotektiv. Drp-1 ist an der Mitochondrienfission beteiligt und wirkt somit proapoptotisch.⁶⁹ Folglich war in den mit Nitrit und Linolsäure behandelten Mäusen Drp-1 herunterreguliert. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe stellte sich über eine Linksverschiebung der Druck-Volumen Kurve im Arbeitsdiagramm des Herzens eine postinfarktuelle Verbesserung der kardialen Pumpfunktion dar.¹⁰ Ob ein solcher Zusammenhang zwischen Nitrit/NO-Signalwegen und der miRNA-Regulation auch in den ersten 5 Minuten des akuten I/R-Schadens besteht, wurde bisher noch nicht untersucht. Dabei ist gerade dieser Zeitraum unmittelbar nach der (interventionellen) Rekonstitution der Blutversorgung des Myokardgewebes entscheidend, da hier klinisch sinnvoll interveniert werden könnte. MiRNAs sind für ihre akute Inhibition der mRNA-Translation bekannt und können so kurzfristig Effekte erzielen. Hierdurch scheint die Phase der akuten Reperfusion, in der es akut zur Initiierung zahlreicher pathologischer Stoffwechselwege kommt, für eine Einflussnahme von miRNAs prädestiniert zu sein.

Während bisherige Daten eine Rolle sowohl für Nitrit als auch für miRNAs im I/R-Schaden nachweisen konnten, sind die genauen Hintergründe und Zusammenhänge nur unzureichend bekannt. Der Zusammenhang zwischen exogener Nitritapplikation und akut veränderter miRNA-Regulierung ist noch weitestgehend ungeklärt und im klinisch relevanten akuten I/R-Schaden noch nicht untersucht worden. Ob ein solcher Zusammenhang im akuten I/R-Schaden besteht, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Des Weiteren soll untersucht werden, ob neben den bisher beschriebenen miRNAs, mittels der modernen Nachweismethoden des *NGS* weitere miRNAs detektiert werden können.

Offene Fragen:

Aufgrund des derzeitigen Kenntnisstandes der Interaktion zwischen dem Nitrit-NO-Metabolismus und der miRNA-Regulation im akuten I/R-Schaden, ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende zentrale Fragestellungen:

1. Kommt es im akuten I/R-Schaden zu einer spezifischen Veränderung kardialer miRNA Spiegel?
2. Beeinflusst anorganisches Nitrit die Spiegel von miRNAs im reperfundierten Myokard?
3. Können durch *NGS* neue bisher nicht näher charakterisierte miRNAs nachgewiesen werden?

2 Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Wenn nicht anderweitig aufgeführt, wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich erworben (Taufkirchen, Deutschland).

2.2. Versuchstiere

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Tierversuche wurden durch die zuständige Behörde des Bundeslandes Nordrhein-Westfalen (Landesamt für Natur, Umwelt, und Verbraucherschutz NRW) genehmigt (LANUV NRW; AZ: 84-02.04.2012.A347). Es wurden ausschließlich männliche NMRI (Naval Medical Research Institute) Wildtyp-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden bis zum Versuchstag in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden gehalten. Das Alter der Mäuse betrug durchschnittlich 12 ± 3 Wochen. Das Körpergewicht betrug 42 ± 3 g.

2.3 Versuchsprotokoll des myokardialen *in vivo* Ischämie-/Reperusionsmodells

Die *in vivo* Tierversuche wurden durch den technischen Assistenten Dominik Semmler durchgeführt. Die Mäuse wurden mit Ketamin (45 mg/kg) und Xylazin (Rompun 10 mg/kg) intraperitoneal gewichtsadaptiert anästhesiert und nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe endotracheal intubiert. Die Narkosetiefe wurde anhand der motorischen Reaktion auf nozizeptive Stimuli an den Extremitäten evaluiert. Zur Intubation wurden die Mäuse an den Schneidezähnen in hängender Position fixiert und mit einer Pinzette die Zunge protrudiert. Unter Kaltlichtdurchleuchtung erfolgte die endotracheale Intubation unter Sicht mit einer sterilen peripheren Venenverweilkanüle (20 Gauge). Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Isofluran (1,2 Volumenprozent). Bei einem gewichtsadaptierten Atemzugvolumen von 2,1-2,5 ml/kg und einer Atemfrequenz von 100 Atemzügen pro Minute wurden die Mäuse mit 100% O₂ beatmet (Inspira, Harvard Apparatus, Hugo-Sachs, March-Hugstetten, Deutschland). Nach Rasur des Brustfells erfolgte die Freilegung des Herzens durch parasternale Thorakotomie und Inzision des Perikards. Durch Ligatur (6.0 Prolene, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) der linken Koronararterie (LCA) unter Sicht wurde eine reversible Ischämie herbeigeführt. In den *in vivo* I/R-Versuchen

betrug die Ischämiedauer 30 Minuten, und wurde von einer 5-minütigen Reperfusion gefolgt (Abb. 2). Nach 25 Minuten Ischämie wurde intrakavitär 1,67 μmol Nitrit/kg Körpergewicht injiziert. Als Kontrolle diente NaCl. Nach insgesamt 30 Minuten Ischämie wurde eine 5-minütige Reperfusion eingeleitet. Die Mäuseherzen wurden zu 3 Zeitpunkten entnommen: vor Einleitung der Ischämie, nach 30 Minuten Ischämie und nach 5 Minuten Reperfusion. Nach Entnahme der Herzen wurden diese mit Bikonkavess (BKSS) freiem Wasser blutfrei gespült, in

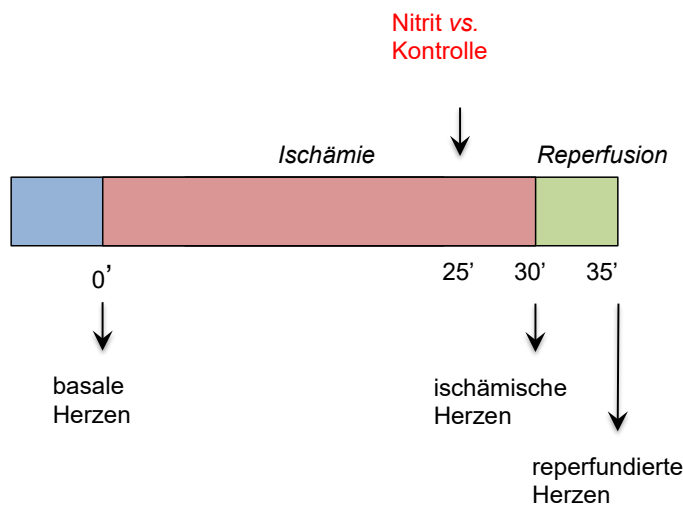


Abb. 2 Schema zum Ischämie-Reperfusionsmodell. Durch Ligatur der LCA wurde eine 30-minütige Ischämie-, durch anschließendes Lösen der Ligatur eine 5-minütige Reperfusionsphase herbeigeführt. Nach 25 Minuten Ischämie, beziehungsweise 5 Minuten vor Beginn der Reperfusion, wurde den Mäusen intrakavitär 1,67 $\mu\text{mol/kg}$ Nitrit, beziehungsweise NaCl als Kontrolle appliziert. Der Herzen wurden zum Zeitpunkt 0', 30' und 35' entnommen.⁷⁰

2.4 Kultivierung der *Heart Like 1* (HL-1) Zellen

Die HL-1 Zellen wurden mit freundlicher Genehmigung von Herrn Professor William C. Claycomb (Institut für Biochemie und molekulare Biologie, LSU Health New Orleans, USA) bereitgestellt. Die HL-1 Zellen wurden in T-75 Zellkulturflaschen kultiviert. Gemäß des Claycomb-Protokolls wurden die Zellkulturflaschen mit einer 3 ml Gelatin/Fibronektin Lösung beschichtet und für mindestens 1 h bei 37°C im Inkubator inkubiert. Das Claycomb-Medium wurde gemäß Protokoll vor Verwendung mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Norepinephrin, 1% Glutamin und 10% fetalem Kälberserum supplementiert. Täglich wurde in den T-75 Zellkulturflaschen 15 ml supplementiertes Claycomb Medium gewechselt und die Zellen alle 5 bis 7 Tage nach Protokoll 1:3 passagiert.

2.5 miRNA- und totalRNA Extraktion aus Mäuseherzen *in vivo* und aus HL-1 Kardiomyozyten *in vitro*

Zur simultanen Isolation der miRNA und totalRNA aus Mäuseherzen und HL-1 Zellen wurde das *MirVana miRNA Isolation Kit* (Ambion Life Technologies, Kalifornien, USA) nach Herstellervorgaben verwendet. Es wurde ausschließlich mit RNase freien Materialien gearbeitet.

2.5.1. Herstellung von Mäuseherzhomogenaten

Die bei -80°C aufbewahrten Mäuseherzen wurden vom Gefrierschrank bis zur weiteren Verarbeitung auf Trockeneis transportiert. Das Homogenisatorgefäß und Glaspistille wurden mit Ethanol und destilliertem Wasser vorgereinigt und auf Eis gelagert. Alle folgenden Schritte erfolgten im 4°C Kühlraum. Unmittelbar nach dem Wiegen, wurden die Herzen in ein zehnfaches Volumen des Lysis/Binding Puffers des mirVana miRNA Isolation Kits überführt und anschließend in einem Homogenisatorgefäß (Glas auf Glas) homogenisiert. Nach ausreichender Homogenisierung der Herzen wurde das Homogenat in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zu je 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Abhängig vom Gewicht der Herzen konnten je Herz 2 – 3 Aliquots asserviert werden.

2.5.2 Pelletierung der HL-1 Zellen

Die HL-1 Zellen wurden ohne Trypsinisierung geerntet. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis gekühlt. Das Nährmedium wurde entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 2 ml 4°C kaltem PBS gewaschen und dieses verworfen. Danach wurde den Zellen nacheinander zweimal 500 µl kaltes PBS hinzugefügt, diese manuell mit einem Zellschaber vom Wellboden gelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Bei 4°C wurden die Zelllösungen für 9 Minuten bei $1100 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden gewogen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.5.3 Herstellung von HL-1 Zelllysaten

HL-1 Zellen wurden auf einer 60,1 cm² Petrischale (TPP, Trasadingen, Schweiz) kultiviert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) einer Zelldichte von 90%-100%, wurden die Zellen geerntet und Zelllysate hergestellt. Hierzu wurde die Petrischale mit noch adhären HL-1 Zellen zur Reduktion des zellulären Metabolismus aus dem Inkubator auf Eis überführt. Das Nährmedium wurde entfernt und die Zellen zweimalig mit jeweils 15 ml, 4°C kaltem Phosphate buffered saline (PBS) durch vorsichtiges Schwenken der Petrischale gewaschen. Durch 600 µl Lysis-Binding-Puffer des mirVana miRNA Isolation Kits wurden die Zellen vom Zellboden gelöst. Anschließend erfolgte das manuelle Lösen der Zellen vom Petrischalenboden. Das Lysis-Binding-Puffer-Zellgemisch wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, gemixt, gewogen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.5.4 Proteinisolation aus den HL-1 Zellen

Zur Proteinisolation aus den HL-1-Zellpellets wurde dieses in 400 µl RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1% NP-40, Protease- und phosphatase inhibitor, pH 7,4) resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und repetitiv gemixt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm bei 4°C. Die Proteine befinden sich hiernach im Überstand, wurden in ein anderes Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.5.5 Extraktion von miRNA und totalRNA aus Mäuseherzhomogenaten und HL-1 Zelllysaten

Die Extraktion von miRNAs und totalRNAs aus HL-1 Zelllysaten erfolgte analog zu der aus Mäuseherzhomogenaten. Nach der Zugabe von „*microRNA Homogenate Additive*“ zum Homogenatvolumen/Zelllysativolumen (1:10) wurde das Gemisch 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufreinigungsschritte mit Acid-Phenol-Chloroform und Ethanol erfolgten gemäß Herstellerangaben. 700 µl der Homogenat-Ethanol Mischung wurden auf eine Filtereinheit pipettiert und anschließend zentrifugiert. Hiernach befindet sich die totalRNA im Filter, die miRNA im Filtrat.

Die totalRNA enthaltenden Filter wurden für insgesamt maximal 45 Minuten in Mikroreaktionsgefäßen zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Erneut wurde das miRNA-enthaltene Filtrat entsprechend Herstellerangaben mit 100%igem

Ethanol aufgereinigt und 700 µl dieses Filtrat-Ethanol Gemisches auf einen neuen Filter pipettiert und zentrifugiert. Dies wurde solange wiederholt, bis das gesamte Filtrat-Ethanol Gemisch durch den Filter zentrifugiert war.

Es folgten weitere Waschschr tte nach Herstellerangaben sowohl mit den miRNAs enthaltenen Filtern, als auch mit den totalRNA enthaltenen Filtern. Nach diesen Schritten befanden sich die aufgereinigten miRNAs beziehungsweise totalRNAs in den jeweiligen Filtern. Durch tröpfchenweise Hinzugabe von je 100 µl Aqua bidest. (95° C) auf die Filter und anschließender Zentrifugierung wurden die miRNAs beziehungsweise die totalRNAs aus den Filtern gelöst. Das gewonnene Eluat wurde in den mitgelieferten RNase freien Mikroreaktionsgefäßen bei -20°C gelagert. Der RNA Gehalt der Proben wurde vor jeder Verwendung mittels der NanoDrop-Spektrophotometrie (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) bestimmt. Hierbei wurden je 1,5 µl Probenvolumina verwendet. Neben dieser quantitativen Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte, jeweils mit einem Probenvolumen von 3 µl, ebenfalls eine qualitative Kontrolle der miRNAs mit RNA 6000 Nano LabChips und Small RNA Chips mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (BMFZ Düsseldorf, Prof. Dr. rer. nat. K hrer). Proben mit einer *RNA Integrity Number* (RIN) >8 wurden in die weiteren Analysen einbezogen.

2.6 Quantifizierung der miRNAs mittels Real Time RT qPCR *in vivo*

Zur Quantifizierung der miRNA Spiegel in den Mäuseherzhomogenaten wurde in einem ersten Schritt die bereits mit dem MirVana Kit (Ambion Life Technologies) isolierten miRNAs aus Mäuseherzen in *single stranded complementary desoxy-ribonucleic acid* (ss-cDNA) transkribiert. Die ss-cDNAs Transkripte wurden in einem zweiten Schritt auf *384-Well-TaqMan MicroRNA Array Platten Megaplex Pool A* (Applied Biosystems, Kalifornien, USA) aufgetragen und mittels Real Time RT qPCR quantifiziert. Als endogene Kontrollen wurden hierbei U6 snRNA, snoRNA 135 und snoRNA 202 verwendet.

2.6.1 Herstellung der ss-cDNA

Die ss-cDNA-Synthese wurde mittels der Megaplex Reverse Transkription Reaktion (applied biosystems) durchgeführt. Das endgültige Volumen der Reverse Transkription Reaktion betrug hierbei 7,5 µl und setzte sich aus 4,5 µl Mastermix (Zusammensetzung nach Herstellerangaben) und 3 µl miRNA-H₂O-Gemisch zusammen. Letzteres enthielt 300 ng miRNA. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Unter Berücksichtigung eines Exzessvolumens (12,5%), der den Verlusten beim Pipettieren Rechnung tragen sollte, wurde der oben genannte Mastermix hergestellt. Dabei enthält der Mastermix die „Megaplex RT Primer (Pool A)“, welche die zu den Ziel-miRNA Sequenzen komplementären Primern sind. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Gemisch für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Beladung des „Eppendorf Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit den Proben. Es erfolgte eine 167-minütige PCR-Reaktion, in der die miRNAs in ss-cDNAs umgeschrieben wurden (Tab. 1).

Tabelle 1 Protokoll für die Reverse Transkription zur ss-cDNA Synthese im „Eppendorf Mastercycler gradient Megaplex“ (Megaplex Reverse Transkription Protokoll)

Phase	Temperatur [°C]	Zeit
40 Zyklen	16	2 Minuten
	42	1 Minuten
	50	1 Sekunde
	85	5 Minuten

Die ss-cDNA als Produkt der Reverse Transkription Reaktion wurde maximal 2 Tage bei – 20°C gelagert. Lagerungen von mindestens 7 Tagen sind laut Hersteller bei Temperaturen von –15°C bis –25°C jedoch prinzipiell zulässig.

2.6.2 Durchführung der Real Time RT qPCR

In einem weiteren Schritt erfolgte die Vorbereitung und Beladung der 384-Well-TaqMan microRNA Array Platten mit der hergestellten ss-cDNA aus Mäuseherzhomogenaten. Dazu wurden sowohl die ss-cDNA, die miRNA Array Platten, als auch der „*TaqMan Universal Master Mix II, No UNG* (Uracil-N glycosylase)“ auf Raumtemperatur erwärmt. In einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß wurde je miRNA Array Platte das Reaktionsgemisch vorbereitet. Dazu wurden die ss-cDNA, der „*TaqMan Universal Master Mix II, No UNG*“ und nukleasefreies

Wasser (Millipore Wasser) gemischt. Es erfolgte die Bestückung der Platten mit dem Reaktionsgemisch, zu je 100 µl pro Tasche. Die Platten wurden anschließend gemäß Herstellerangaben zentrifugiert („Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge“, Hanau, Deutschland). Mit einem Array Verschlussystem (applied biosystems, Kalifornien, USA) erfolgte die Verriegelung der microRNA Array Platten, welche nun mit dem Real Time PCR Cyclyer (ABI PRISM® 7900HT, applied biosystems, Kalifornien, USA) gemessen wurden (Tab. 2).

Tabelle 2: Protokoll für die Real Time RT qPCR (ABI PRISM 7900HT, applied biosystems, Kalifornien, USA)

Phase	Temperatur [°C]	Zeit
	50	2 Minuten
	95	10 Minuten
40 Zyklen	95	15 Sekunden
	60	60 Sekunden

Die anderen vorbereiteten microRNA Array Platten wurden bis zu deren Messung abgedunkelt im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Jeweils 4 Ansätze wurden parallel bearbeitet.

2.6.3 Prinzip der Real Time Reverse Transkriptase quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (Real Time RT qPCR)

Die Real Time RT qPCR stellt eine Weiterentwicklung der 1983 von Kary Mullis und seinem Team entwickelten *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dar. Mithilfe der Real Time RT qPCR lassen sich Nukleotidabschnitte nicht nur exponentiell vervielfältigen, sondern auch in Echtzeit quantifizieren. In 3 aufeinanderfolgenden, rekurrenten Schritten der Denaturierung, Primerhybridisierung und Kettenelongation wird in 40 Zyklen die Ziel-ss-cDNA Sequenz exponentiell vervielfältigt. Jede der 3 Phasen wird durch eine spezifische Temperatur initiiert. Zu Beginn erfolgt die Erwärmung der Probe auf 96°C; hierdurch werden komplementäre Strangabschnitte denaturiert und somit voneinander getrennt. Es folgt eine Abkühlung der Probe auf 68°C, wodurch es zur Anlagerung der zur Zielsequenz komplementären Primer kommt (Primerhybridisierung). Bei erneuter Erwärmung der Probe auf 72°C wird die Phase der Kettenelongation in 5'-3' Richtung eingeleitet. Die Kettenelongation wird schließlich durch die erneute Erwärmung auf 96°C beendet. Um bei 72°C eine Kettenelongation zu

gewährleisten, wird eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet (Taq-Polymerase).

Gleichzeitig bindet eine TaqMan-Sonde an eine komplementäre Sequenz auf der ss-cDNA. Die TaqMan-Sonde besteht aus einem Reporter (6-Carboxyfluorescein, FAM) und einem Quencher (NFQ-MGB). Der Reporter, auch als Donorfluorochrom bezeichnet, gibt nach Anregung durch Licht einen Teil seiner Energie in Form eines Fluoreszenzsignals an die Umgebung ab. Der Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) ist in der Lage diese vom Reporter freigesetzte Energie aufzunehmen. Basierend auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) nimmt bei Intaktheit der TaqMan-Sonde und somit gegebener räumlicher Nähe von Reporter und Quencher, der Quencher die vom Reporter abgegebene Energie strahlungsfrei auf. Die Taq-Polymerase verfügt neben der 5'-3' Polymeraseaktivität, welche für die Elongation des komplementären Stranges benötigt wird, auch über eine 5'-3' Exonukleaseaktivität. Letztere trennt während der Phase der Kettenelongation den Reporter vom Quencher. Hiernach ist die räumliche Nähe von Reporter und Quencher nicht mehr gegeben; der Förster-Resonanzenergietransfer findet nicht mehr statt. Nun kommt es zur Emittierung eines Fluoreszenzsignals vom Reporter, welches detektiert werden kann.

2.6.3.1 Die Berechnung und Aussage des Cycle Threshold (C_t)

Der *Cycle Threshold* (C_t - Wert) gibt den PCR-Zyklus an, in dem das emittierte Fluoreszenzsignal (R_N) einen festgesetzten Schwellenwert (*threshold*) überschreitet. Somit ist der C_t - Wert ein relatives Maß für die ursprüngliche Konzentration der Ziel-ss-cDNA in der Probe. Enthält die Probe eine geringe Konzentration der Ziel-ss-cDNA, so wird der Schwellenwert erst nach einer größeren Zyklenzahl erreicht, als in Proben mit höherer Konzentration der Ziel-ss-cDNA. Um Fluktuationen des Fluoreszenzsignals zu eliminieren, wird ein passiver Referenzfarbstoff (ROXTM Passive Reference Dye) mitgemessen. Aus dem Quotienten der Intensität des Fluoreszenzsignals des Reporters (I_{Rep}) und der des Referenzfarbstoffes (I_{Ref}) ergibt sich der korrigierte Wert R_N (*normalized Reporter*):

$$R_N = I_{Rep} / I_{Ref}$$

Nach Subtraktion der basalen R_N - Werte ($R_{N \text{ basal}}$), welche sich auf die Zyklen 3 – 15 beziehen, ergibt sich der delta R_N – Wert (ΔR_N). In diesen Zyklen findet noch keine signifikante Änderung des emittierten Fluoreszenzsignals statt, weshalb sie als Basalwerte verwendet werden können:

$$\Delta R_N = R_N - R_{N \text{ basal}}$$

Mittels eines Algorithmus wird nun der Zyklus ermittelt, in dem der ΔR_N – Wert der jeweiligen Ziel-DNA-Sequenz der Probe einen festgesetzten Schwellenwert (Standardeinstellung: 0,2) überschreitet. Dieser Zyklus wird als *Cycle threshold* (C_t - Wert) bezeichnet.

2.6.3.2 Die Berechnung und Aussage des ΔC_t – Wertes

Um Konzentrationsunterschiede der verschiedenen Ziel-DNA-Sequenzen des gleichen Versuchsansatzes untereinander besser vergleichen zu können, wird der ΔC_t - Wert verwendet. Hierzu werden in der RealTime RT qPCR nicht nur die C_t - Werte der Ziel-DNA-Sequenzen gemessen, sondern auch die bekannter endogener Kontrollen (snoRNA 135, snoRNA202, U6). Endogene Kontrollen verändern unter jeglichen Versuchsbedingungen per definitionem ihre Konzentration nicht. Demzufolge ist es möglich deren C_t - Werte als Referenz-Basalwerte zu definieren. Der ΔC_t - Wert berechnet sich als Differenz des C_t - Wertes der jeweiligen Ziel-DNA-Sequenz und des mittleren C_t - Wertes der endogenen Kontrollen:

$$\Delta C_t = C_t (\text{Ziel-DNA-Sequenz}) - C_t (\text{endogene Kontrolle})$$

2.6.3.3 Die Berechnung und Aussage des $\Delta\Delta C_t$ – Wertes

Der $\Delta\Delta C_t$ - Wert erlaubt es zwei zu verschiedenen Zeitpunkten erhobene ΔC_t - Werte miteinander zu vergleichen. Durch Subtraktion der ΔC_t - Werte beider zu vergleichenden Gruppen errechnet sich der $\Delta\Delta C_t$ - Wert:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t1} - \Delta C_{t2}$$

Um diesen Wert als ein n-Faches darzustellen, wird der erhaltene $\Delta\Delta C_t$ – Wert in folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{n-fache Konzentration} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.7 Quantifizierung der mRNA Spiegel in der Reperfusionsgruppe nach Nitritapplikation vs. der Reperfusionskontrollgruppe

Die isolierte totalRNA wurde mittels NanoDrop-Spektrophotometrie und *fluorometric Qubit RNA assays* (Life Technology, Kalifornien, USA) quantitativ bestimmt. Hierbei wurden je 1,5 µl Probenvolumina verwendet. Neben dieser quantitativen Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte, jeweils mit einem Probenvolumen von 3 µl, ebenfalls eine qualitative Kontrolle der miRNAs mit Small RNA Chips und 6000 Nano LabChips mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer (BMFZ Düsseldorf, Prof. Dr. rer. nat. Köhrer). Die weitere mRNA Genexpressionsmessung wurde in Zusammenarbeit mit dem BMFZ Düsseldorf durchgeführt (WT Plus Reagent Kit; Affymetrix Inc.). Hierbei wurden 100ng totalRNA in cDNA transkribiert, mit Biotin markiert, auf einem Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Gene Expression Microarray für 16 Stunden bei 45°C hybridisiert und weiter nach Herstellerangaben bearbeitet.

2.8 Bioinformatische Analyse der miRNA-mRNA Interaktionen

Funktionelle bioinformatische Analysen der mRNA-Transkripte wurden mittels der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID Bioinformatics Database) durchgeführt.^{71, 72} Transkripte mit einem p-Wert von $p < 0,01$ und einer Expression $> 1,2$ -fach wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Daten wurden mit den Standardeinstellungen der Plattform erstellt und ausgewertet. Dabei wurden die Daten tabellarisch nach genetischer Ontologie gruppiert und sowohl in KEGG- als auch in Panther-Signalwegen visualisiert.^{73, 74} Mögliche miRNA-mRNA Interaktionen wurden mittels *in-silico* Analysen der Plattform *targetscan database 7.0* für die Spezies Maus untersucht.

2.9 Single Tube Real Time RT qPCR mit spezialangefertigten Primern *in vivo*

Single tube Real Time RT qPCR Versuche wurden durchgeführt, um die in den miRNA Array Experimenten regulierten miRNAs, welche laut *in-silico* Analysen eine miRNA-mRNA Interaktion aufweisen, zu verifizieren. Hierzu wurde in einem ersten Schritt das isolierte miRNA-Gemisch mittels einer Reverse Transkription Reaktion in komplementäre ss-cDNA umgeschrieben und anschließend eine Real Time RT qPCR durchgeführt. Als endogene Kontrolle diente hier die snoRNA 135.

2.9.1 Herstellung der ss-cDNA

Die ss-cDNA Generierung erfolgte mittels der Reverse Transkription Reaktion des TaqMan MicroRNA Assays (applied biosystems, Kalifornien, USA). In der Reverse Transkription Reaktion hatte jeder Ansatz ein Endvolumen von 15 µl, bestehend aus 7 µl Mastermix (Komponenten gemäß Herstellerangaben), 3 µl RT Primer, und 5 µl miRNA; letzteres in einer Konzentration von 3ng/µl. Die Reverse Transkriptase Reaktion des TaqMan MicroRNA Assays wurde im Thermocycler „Eppendorf Mastercycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt und dauerte jeweils 65 Minuten (Tab. 3).

Tabelle 3 Protokoll der Reverse Transkription (TaqMan MicroRNA Assay Protokoll)

Zeit [min]	Temperatur [°C]
30	16
30	42
5	85

2.9.2 Durchführung der single tube Real Time RT qPCR Reaktion

Die Real Time RT qPCR wurde auf 96-Well Platten in Triplikaten durchgeführt. Jedes Well wurde hierzu mit 1 µl des TaqMan Assay Mix, 1,33 µl der hergestellten ss-cDNA und 17,67 µl des separat hergestellten Mastermix beladen. Letzterer besteht je Ansatz aus 10 µl „TaqMan Universal PCR Master Mix II, no UNG“ und 7,67 µl destilliertem Wasser.

Die 96-Well Platte wurde versiegelt, und vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde die 96-Well Platte im „PCR Plate Spinner“ (VWR, Pennsylvania, USA) zentrifugiert und in der 7500 Fast Real Time PCR (Life Technologies, Kalifornien, USA) gemessen. Die Real Time RT qPCR umfasste 40 Zyklen (Tab. 4).

Tabelle 4 Protokoll für die single tube RealTime qPCR

Phase	Temperatur [°C]	Zeit
	95	10 Minuten
40 Zyklen	95	15 Sekunden
	60	60 Sekunden

2.10 SDS-Page und Western Blot

Mittels Western Blot wurde die Proteinkonzentration von IRAK-M in der mit Nitrit behandelten Reperfusiongruppe und der Reperfusionkontrollgruppe verglichen (n=5). Hierzu wurden die Herzen in jeweils 1 ml RIPA-Puffer in einem Homogenisatorgefäß (Glas auf Glas) homogenisiert. 500 µl wurden zur miRNA und totalRNA Extraktion gemäß der Herstellerangaben des miRVANA Isolation Kit weiterverarbeitet. Aus den restlichen 500 µl wurden die Proteine isoliert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben mit dem Bio-Rad DC Protein Assay gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Jeweils 30 µg Protein je Probe wurde nach 5-minütiger Hitzedenaturierung bei 95°C elektrophoretisch in SDS Polyacrylamidgelen entsprechend ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld bei 140 V für 50 Minuten aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend für 5 Minuten in 20%igem Ethanol equilibriert und bei einer konstanten Spannung von 20V für 7 Minuten auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Kontrolle des Proteintransfers erfolgte eine Ponceau Färbung. Hiernach wurde die Membran mit dem spezifischen IRAK-M Antikörper 1:1000 (Abcam, Cambridge, USA, pAB rabbit; ab8116) in 1% BSA und 0,1 % Na-Azid über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Spezies-spezifischen Sekundärantikörper (1:3000). Als Referenzkontrolle wurde alpha-Tubulin verwendet. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels Chemilumineszenz auf dem Imager 600 (GE Healthcare, Freiburg, Germany).

2.11 Next Generation Sequencing in vivo

2.11.1 Prinzip des Next Generation Sequencing

Das *Next Generation Sequencing* (NGS) ermöglicht es durch die simultane Amplifikation tausender RNA-Sequenzen diese schnell mit hoher Sensitivität und Spezifität zu detektieren.

Um unter den erkannten RNA Sequenzen bisher noch nicht beschriebene miRNAs zu identifizieren und falsch positive Ergebnisse zu reduzieren, wurde der miRDeep2 Algorithmus verwendet, welcher die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer miRNA-Sequenz angibt. Der Algorithmus berücksichtigt neben der für miRNAs typischen Nukleotidlänge von 18-24 Nukleotiden auch die charakteristische räumliche Struktur der Sequenzen (*mature miRNA sequence*, *star sequence*, *loop*).^{75, 37}

2.11.2 Versuchsdurchführung des *Next Generation Sequencing*

Zur Detektion noch nicht bekannter miRNA-Sequenzen mittels NGS wurde das TruSeq Kit von Illumina (San Diego, California, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Der Versuchsaufbau besteht aus 3 Schritten. Im ersten Schritt erfolgt die Reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA. Im zweiten Schritt erfolgt die Amplifizierung und im dritten Schritt die Sequenzierung der Nukleotidsequenzen. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Nano-Drop Spektrophotometrie (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) erfolgte die Verdünnung der Proben in RNase freiem Wasser auf 1 µg/5ml. Der im Kit enthaltene RNA 3' Adapter wurde den Proben hinzugegeben und das Gemisch im Thermocycler für 2 Minuten bei 70°C inkubiert. Hierdurch bindet der 3' Adapter an das 3' Ende der RNA Sequenzen. Nachfolgend wurde nach Herstellerangaben ein Mastermix angesetzt, hiervon jeweils 4 µl zu den Proben hinzugefügt und das Gemisch für 1 Stunde inkubiert. Analog zur Anbindung des 3' Adapters an das 3' Ende der RNA Sequenzen, erfolgt nach Hinzugabe des RNA 5' Adapters und Inkubation bei 28°C für 1 Stunde die Anbindung des 5' Adapters an das 5' Ende der RNA.

Die nun an den 5' und 3' Enden markierte RNA wurde im Folgenden in einer Reverse Transkriptase Reaktion in cDNA transkribiert. Hierzu wurde den Proben 0,5 µl dNTP Mix und der *RNA Reverse Transcriptase Primer* hinzugefügt und das Gemisch bei 70°C für 2 Minuten inkubiert. Nach Ansetzen eines Mastermix nach Herstellerangaben wurden hiervon zu jeder Probe 5,5 µl pipettiert. Das Endvolumen je Probe betrug 12,5 µl. Die Reverse Transkriptase Reaktion erfolgte bei 70°C für 1 Stunde im Thermocycler.

Nach Herstellung der cDNA wurde die Amplifizierung der RNA-Sequenzen mittels PCR durchgeführt. Hierzu wurde nach Herstellerangaben der im Kit enthaltene PCR Mix und RNA PCR Primer den Proben hinzugefügt. Nach Durchmischung und Zentrifugierung der Proben wurden diese auf Eis gelagert. Die weiteren Schritte zur Amplifizierung erfolgten im Thermocycler in 11 Zyklen von jeweils 10 Sekunden bei 98°C, 30 Sekunden bei 60°C und 15 Sekunden bei 72°C. Nach erfolgter PCR wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Gemäß Herstellerangaben wurde eine Gelelektrophorese mit einem 6% PAGE Gel durchgeführt. Hierzu wurde nach Beladung der Gele mit den Proben für 1

Stunde eine Spannung von 145 V angelegt. Die Gele wurden für 3 Minuten in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) eingelegt und mittels eines Transluminators sichtbar gemacht. Die Banden, welche mit den gesuchten miRNA-Strukturen mit einer Länge von 22 bis 33 Nukleotiden korrespondieren, wurden mit einem Skalpell aus den Gelen exzidiert und in ein perforiertes 0,5 µl Mikroreaktionsgefäß gelegt, welches in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß platziert wurde. Es erfolgte die Zentrifugierung bei 14000 rpm für 2 Minuten bis das Gelfragment durch die Perforierung des 0,5 µl Mikroreaktionsgefäßes in das 2 ml Mikroreaktionsgefäß gelangt ist. Durch Hinzugabe von 500 µl DNase freiem Wasser wurden die Gelfragmente über Nacht aufgelöst und auf den im Kit enthaltenen 5 µm Filter pipettiert. Nach weiteren Zentrifugierungs- und Aufreinigungsschritten mittels 70% Ethanol wurde das gewonnene Pellet in 10 µl 10 mM Tris-HCL resuspendiert. Die weitere Verarbeitung der Proben und die RNA-Sequenzierung erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Wei Chen im Max-Delbrück Institut Berlin.

2.11.3 Verifizierungsversuche des Deep Sequencings mittels single tube Real Time RT qPCR *in vivo* und *in vitro*

Gemäß den Ergebnissen der NGS Sequenzierungsanalysen wurde mit den 6 smallRNAs mit den höchsten *miRDeep2*-Scores single tube Real Time RT qPCR Versuche durchgeführt, um die Sequenzen zu verifizieren. Dies erfolgte sowohl aus Mäuseherzhomogenaten *in vivo*, als auch in HL-1 Zellen *in vitro*. Ein hoher *miRDeep2*-Score ist ein starker Indikator für das Vorliegen einer miRNA-Sequenz. Der Algorithmus berücksichtigt neben der für miRNAs typischen Nukleotidlänge von 18-24 Nukleotiden auch die charakteristische räumliche Struktur der Sequenzen und reduziert somit die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse (*mature miRNA sequence, star sequence, loop*).⁷⁵

2.12 Statistik

Die Daten der *microRNA Array cards* wurden mit der ExpressionSuite Software v.1.0.3 ausgewertet und in Form von Volcano Plots dargestellt (ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Daten wurden ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als signifikant reguliert betrachtet. MiRNAs, die lediglich in einer Gruppe detektiert wurden oder einen C_t -Wert > 35 aufwiesen, wurden aus der Analyse entfernt. Ansonsten wurde das Programm mit den

Standardeinstellungen bedient. Wenn nicht anders erwähnt, wurde der ungepaarte Student's t-Test zur Signifikanzbestimmung verwendet. Säulendiagramme wurden mit Graph Pad Prism erstellt (Graph Pad Software, San Diego Kalifornien USA, www.graphpad.com).

3. Ergebnisse

3.1 Qualitätskontrollen

3.1.1 Spektrophotometrische quantitative Kontrolle der miRNAs

Der miRNA Gehalt der Proben wurde mittels Nano-Drop Spektrophotometrie (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) bestimmt (Tab. 5). Basierend hierauf wurden äquivalent konzentrierte Verdünnungen mit RNase freiem Wasser hergestellt.

Tabelle 5: Nano-Drop Spektrophotometrie der miRNA-Proben

Probe	NanoDrop [ng/μg]
Basal 1	281,98
Basal 2	158,25
Basal 3	196,57
Basal 4	195,99
Ischämie Kontrolle 1	338,46
Ischämie Kontrolle 2	349,39
Ischämie Kontrolle 3	160,60
Reperfusion Kontrolle 1	227,86
Reperfusion Kontrolle 2	514,33
Reperfusion Kontrolle 3	265,56
Reperfusion Kontrolle 4	170,30
Ischämie + Nitrit 1	305,96
Ischämie + Nitrit 2	406,11
Ischämie + Nitrit 3	380,83
Reperfusion + Nitrit 1	287,81
Reperfusion + Nitrit 2	265,03
Reperfusion + Nitrit 3	157,78
Reperfusion + Nitrit 4	164,40

3.1.2 Endogene Kontrollen der Real Time RT qPCR Versuche

Als endogene Kontrollen für die Real Time RT qPCR Versuche wurde die snoRNA U6, snoRNA 135 und snoRNA 202 verwendet (Tab. 6).

Tabelle 6: C_T Mittelwerte der endogenen Kontrollen in den Versuchsgruppen

endogene Kontrolle	C _T Mittelwert	maximale Abweichung
snoRNA U6	17,814	+ 17,3 %
snoRNA 135	28,314	+ 14 %
snoRNA 202	27,282	- 11,6 %

3.2 miRNA Spiegel in der Basalgruppe *in vivo*

Zunächst wurden die miRNA Spiegel in Mäuseherzen unter basalen Bedingungen erfasst (n = 4). In der Real Time RT qPCR Messung der Basalgruppe wurden 290 murine miRNAs *in vivo* nachgewiesen.

3.3 miRNAs werden innerhalb von 30 Minuten Ischämie und im akuten I/R-Schaden *in vivo* dysreguliert

Unter basalen Bedingungen wurden 290 miRNAs detektiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Konzentrationen dieser miRNAs innerhalb einer 30-minütigen Ischämie und nach 5-minütiger Reperfusion des Myokards verändern. Hierzu erfolgte die miRNA Quantifizierung nach 30-minütiger Ischämie, sowie nach 5-minütiger Reperfusion mittels Real Time RT qPCR. Es wurden 6 miRNAs identifiziert, die innerhalb von 30 Minuten Ischämie signifikant herunterreguliert wurden (Basal n=4, Ischämie n=3; >2-fach; p<0,05 vs. Basal) (Tab. 7)⁷⁰.

Tabelle 7: 6 miRNAs wurden während 30 Minuten Ischämie herunterreguliert

miRNA	n-Fach
miR 301b	0,209
miR 181c	0,210
miR 23	0,238
let 7b	0,259
let 7a	0,351
miR 208	0,369

Innerhalb von 5 Minuten Reperfusion wurden 9 weitere miRNAs signifikant hochreguliert (Reperfusion n=4, Ischämie n=3; >2-fach; p<0,05 vs. Ischämie).⁷⁰

Tabelle 8: 9 miRNAs wurden während 5 Minuten Reperfusion hochreguliert

miRNA	n-Fach
miR 484	2,55
miR 98	2,902
miR 146b	2,996
miR 351	3,227
miR 191	3,491
miR 339-3p	3,665
miR 125a-5p	3,851
miR 433	4,397
miR 200c	4,745

Diese Daten zeigen, dass bereits der akute myokardiale I/R-Schaden einen Einfluss auf die Regulation kardialer miRNAs hat (Abb. 3).

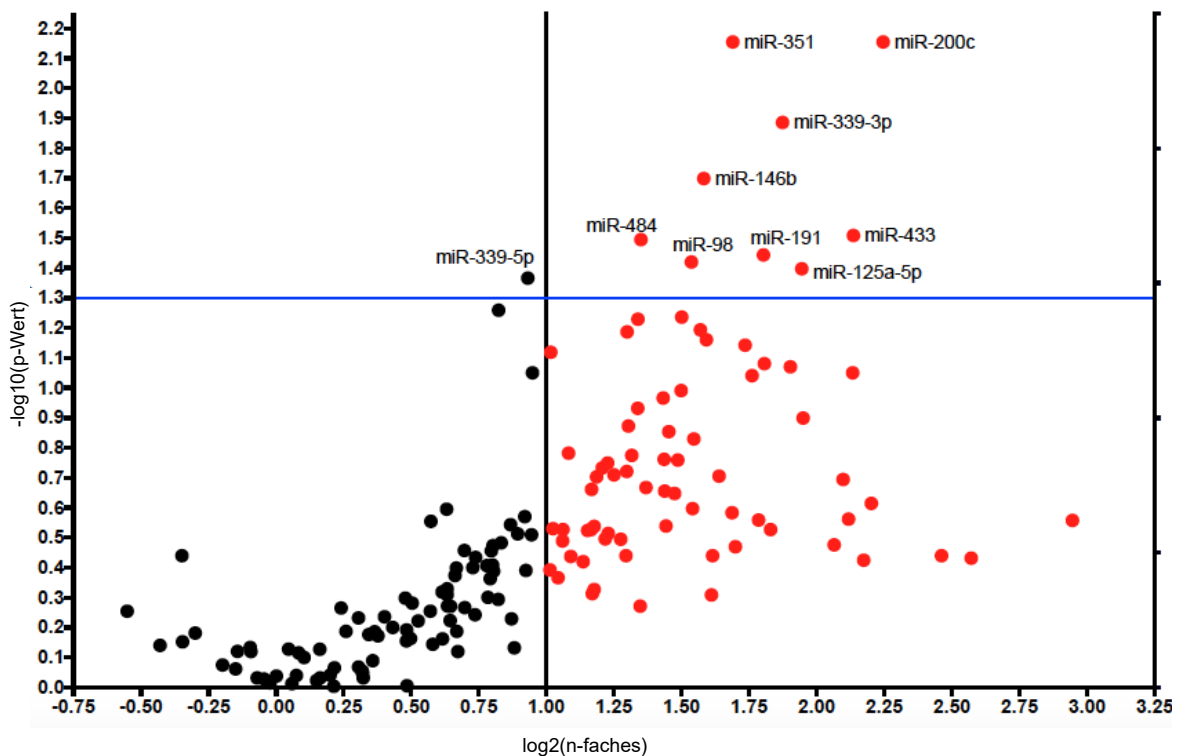
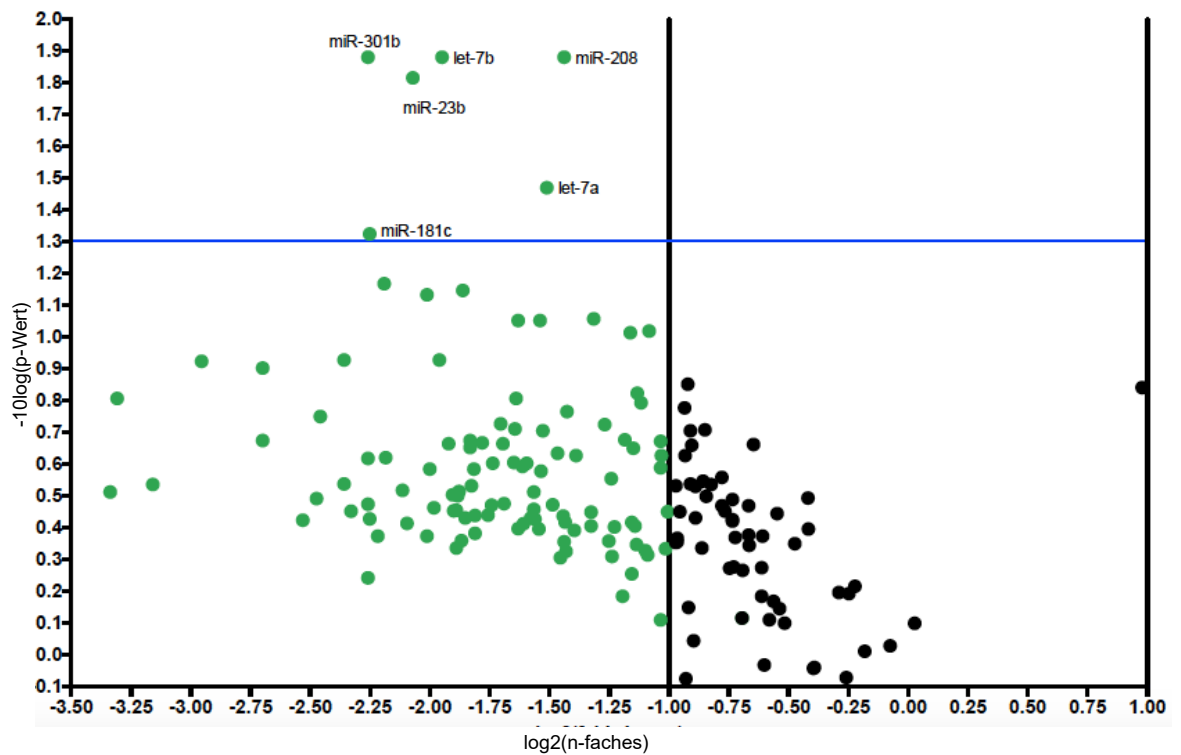


Abb. 3: Regulation der miRNAs nach 30 Minuten Ischämie und 5 Minuten Reperfusion. Die Volcano Plots zeigen die miRNA Regulation vor und nach der 30 minütigen Ischämie (**A**), sowie vor und nach der 5 minütigen Reperfusion (**B**). Rote Punkte stellen eine Hochregulierung >2-fach dar, während grüne Punkte eine Herunterregulierung von >2-fach anzeigen. Die blaue Horizontale markiert das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ($n = 3-4$).⁷⁰

3.4 Anorganisches Nitrit beeinflusst die miRNA Regulation im akuten myokardialen I/R-Schaden *in vivo*

Nachfolgend war es das Ziel zu untersuchen, ob anorganisches Nitrit einen Einfluss auf die Regulation der miRNAs im akuten myokardialen I/R-Schaden *in vivo* hat.

Hierzu wurde den Mäusen 5 Minuten vor Beginn der Reperfusion intrakavitär anorganisches Nitrit oder *Vehicle* (NaCl 0,9%) appliziert. Nach 5-minütiger Reperfusion des Myokards erfolgte die Quantifizierung der kardialen miRNA-Spiegel mittels Real Time RT qPCR. Zwischen der Reperusionskontrollgruppe und den mit Nitrit behandelten Mäuseherzen waren 6 miRNAs signifikant unterschiedlich reguliert (miR 17, miR 106a, miR 125a-5p, miR 146b, miR 339-3p, miR 433; $p < 0,05$, $n = 4$).

Nach Nitritapplikation wurden 2 miRNAs im Vergleich zur Reperfusion-kontrollgruppe signifikant hochreguliert (miR 17, miR 106a). 4 weitere miRNAs, die während der 5-minütigen Reperfusion hochreguliert wurden, wurden nach Nitritapplikation zwischen 2,2 und 3,5-Fach signifikant herunterreguliert (miR 146b, miR 339-3p, miR 125a-5p, miR 433; $n\text{-fach} > 2$; $n = 4$; $p < 0,05$) (Tab. 9, Abb. 4). Anorganisches Nitrit nimmt somit einen Einfluss auf die Regulation kardialer miRNAs im akuten I/R-Schaden und wirkt der durch die Reperfusion verursachten miRNA-Dysregulation entgegen.⁷⁰

Tabelle 9: miRNA Regulation in der Reperusionskontrollgruppe und nach Nitritapplikation jeweils bezogen auf die Ischämiegruppe

Auswirkungen der 5 Minuten Reperfusion			Auswirkungen der Nitritbehandlung in 5 Minuten Reperfusion		
↓-regulation	n-fach	p-Wert	↑-regulation	n-fach	p-Wert
			miR 17	2,696	0,032
			miR 106a	2,549	0,033
↑-regulation	n-fach	p-Wert	↓-regulation	n-fach	p-Wert
miR 484	2,55	0,032			
miR 98	2,902	0,038			
miR 146b	2,996	0,02	miR 146b	0,463	0,022
miR 351	3,227	0,007			
miR 191	3,491	0,036			
miR 339-3p	3,665	0,013	miR 339-3p	0,34	0,02
miR 125a-5p	3,851	0,04	miR 125a-5p	0,285	0,044
miR 433	4,397	0,031	miR 433	0,356	0,047
miR 200c	4,745	0,007			

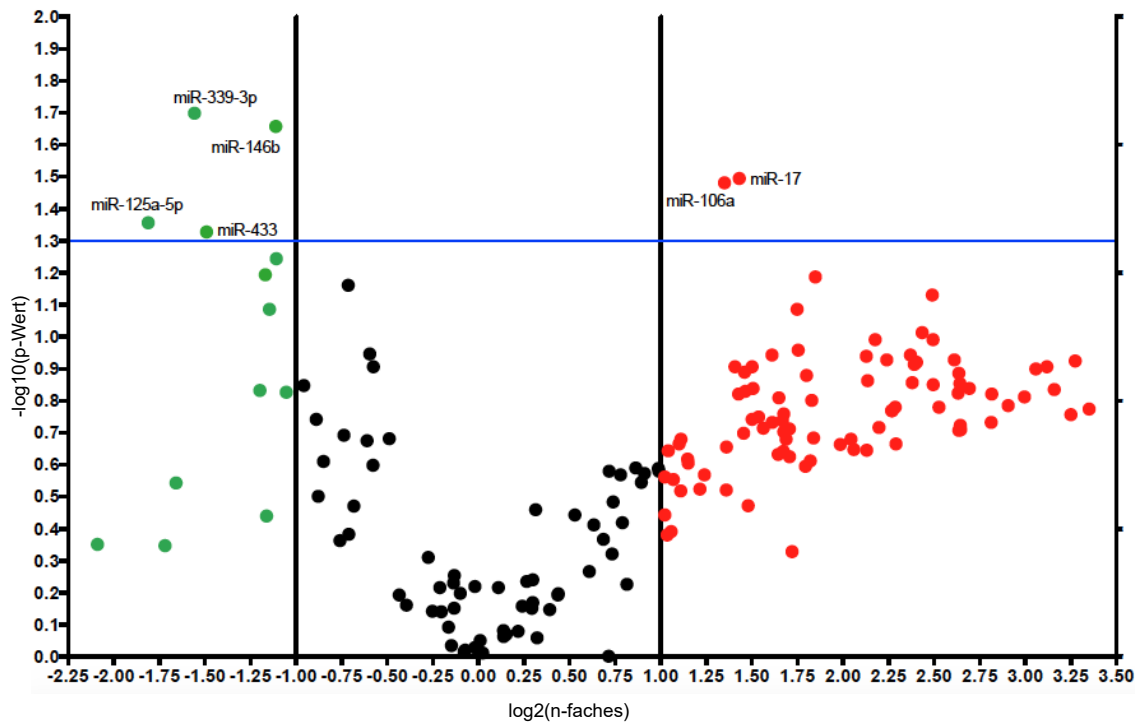


Abb. 4: Regulation der miRNAs nach Nitritapplikation im myokardialen I/R-Schaden bezogen auf die Reperfusionsskontrollgruppe. Nach Nitritapplikation werden im myokardialen I/R-Schaden 2 miRNAs hoch- und 4 miRNAs signifikant herunterreguliert. Die roten Punkte stellen eine Hochregulierung >2-Fach, die grünen Punkte eine Herunterregulierung von >2-Fach dar. Die blaue Horizontale markiert das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ($n=4$; $n\text{-fach} > 2$; $p < 0,05$).⁷⁰

3.5 Anorganisches Nitrit beeinflusst die mRNA Regulation im akuten myokardialen I/R-Schaden *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Nitritapplikation vor Einleitung einer myokardialen Reperfusion die miRNA-Expression akut beeinflusst. Nachfolgend wurden die Auswirkungen dessen auf mRNA Ebene untersucht. Das mRNA Expressionsprofil im akuten I/R-Schaden nach Nitritapplikation ist bisher noch nicht bekannt. Hierzu wurde mit weiteren Mäusen der Reperfusionsskontrollgruppe und der mit Nitrit behandelten Reperfusionsgruppe ($n=5$) Genexpressionsanalysen durchgeführt. 25.436 mRNA-Transkripte wurden identifiziert. Hiervon waren zu einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ 356 mRNA-Transkripte nach Nitritapplikation signifikant reguliert (Abb. 5).⁷⁰

3.5.1 Analyse des mRNA Expressionsprofils nach Nitritapplikation im akuten myokardialen I/R-Schaden

Nitritapplikation vor Beginn der Reperfusion bewirkt bereits in nanomolaren Konzentrationen am Ende der 5-minütigen Reperfusion eine signifikante Regulierung auf miRNA- und mRNA-Ebene. Um die biologische Relevanz der Einflüsse auf mRNA-Ebene zu untersuchen wurden die mRNA-Transkripte mit $p < 0,01$ und $> 1,2$ -fachen Regulierung mithilfe der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID Bioinformatics Database)* analysiert.^{71, 72} Als genetischer Hintergrund der Analysen wurde das gesamte Maus-Genom gewählt. Im Rahmen dieser Analyse zeigten sich 3 mit Nitrit assoziierte Ontologien: „zelluläre Komponente“, „biologischer Prozess“ und „molekulare Funktion“ (Tab. 10).

Weiterhin wurden Transkripte mit $p < 0,01$ und > 3 facher Regulierung in *KEGG*- (11 Gene) und *Panther-Signalwegen* (10 Gene) dargestellt (Abb. 5).⁷⁰

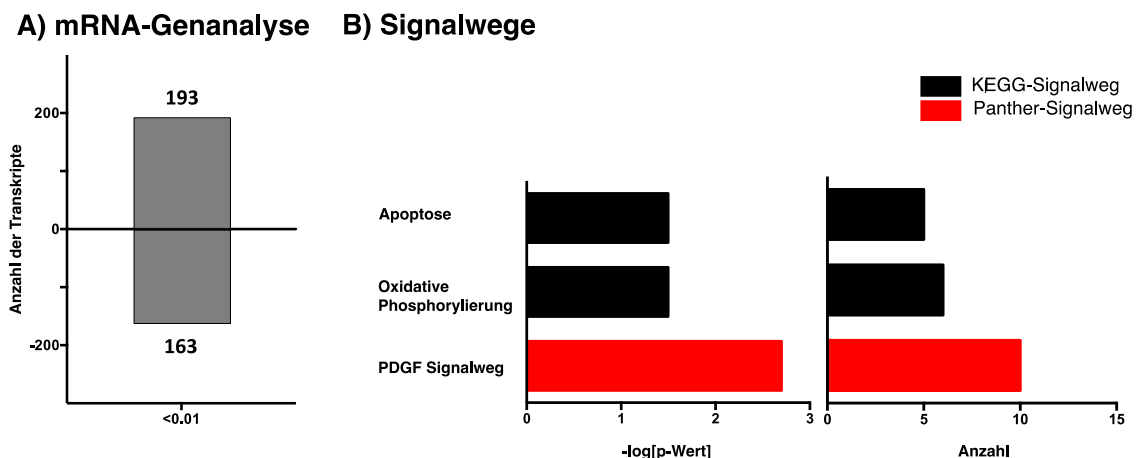


Abb. 5: mRNA-Genanalyse im myokardialen I/R-Schaden nach Nitritapplikation. In der Reperfusionsgruppe wurden nach Nitritapplikation bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe 193 mRNAs hoch- und 163 mRNAs herunterreguliert ($p < 0,01$) **(A)**. Mit Nitritapplikation assoziierte signifikante regulierte Signalwege in der DAVID-Signalweg Analyse ($p < 0,05$) **(B)**.⁷⁰

Tabelle 10: Nitrit assoziierte Ontologie im I/R-Schaden bezogen auf die Kontrollgruppe

biologischer Prozess	Anzahl	-log [p-Wert]	FDR
<i>nitrogen compound biosynthetic process</i>	15	4,38	0,07
<i>nucleotide biosynthetic process</i>	10	3,34	0,73
<i>nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid biosynthetic process</i>	10	3,25	0,90
<i>nucleobase, nucleoside and nucleotide biosynthetic process</i>	10	3,25	0,90
<i>generation of precursor metabolites and energy</i>	12	3,20	1,01
<i>purine nucleotide biosynthetic process</i>	8	2,68	3,33
<i>ribonucleotide biosynthetic process</i>	7	2,48	5,16
<i>electron transport chain</i>	7	2,46	5,39
<i>purine nucleotide metabolic process</i>	8	2,30	7,72
<i>ribonucleotide metabolic process</i>	7	2,23	9,04
<i>purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process</i>	6	2,14	11,16
<i>ribonucleoside triphosphate biosynthetic process</i>	6	2,14	11,16
<i>purine nucleoside triphosphate biosynthetic process</i>	6	2,12	11,63
<i>nucleoside triphosphate biosynthetic process</i>	6	2,10	12,12
<i>nucleus localization</i>	3	1,99	15,24
<i>purine ribonucleoside triphosphate metabolic process</i>	6	1,99	15,31
<i>ribonucleoside triphosphate metabolic process</i>	6	1,97	15,89
<i>purine nucleoside triphosphate metabolic process</i>	6	1,90	18,31
<i>purine ribonucleotide biosynthetic process</i>	6	1,89	18,94
<i>nucleoside triphosphate metabolic process</i>	6	1,76	24,41
<i>monovalent inorganic cation transport</i>	10	1,75	25,15
<i>purine ribonucleotide metabolic process</i>	6	1,71	27,38
<i>ATP biosynthetic process</i>	5	1,65	30,29
<i>porphyrin biosynthetic process</i>	3	1,65	30,68
<i>tetrapyrrole biosynthetic process</i>	3	1,65	30,68
<i>sodium ion transport</i>	6	1,62	32,10
<i>cell projection organization</i>	10	1,62	32,32
<i>actin filament-based process</i>	7	1,56	36,39
<i>oxidation reduction</i>	16	1,53	38,21
<i>ATP metabolic process</i>	5	1,52	38,68
<i>cytokine-mediated signaling pathway</i>	4	1,44	44,96
<i>response to wounding</i>	10	1,42	46,44
<i>transmembrane transport</i>	12	1,42	46,79
<i>tetrapyrrole metabolic process</i>	3	1,35	52,09
<i>porphyrin metabolic process</i>	3	1,35	52,09
zellulärer Prozess	Anzahl	-log [p-Wert]	FDR
<i>mitochondrial inner membrane</i>	11	2,16	8,63
<i>organelle inner membrane</i>	11	2,00	12,05
<i>mitochondrial membrane</i>	12	1,94	13,75
<i>microtubule organizing center</i>	8	1,85	16,91
<i>mitochondrial envelope</i>	12	1,76	20,07
<i>organelle envelope</i>	14	1,50	33,85
<i>mitochondrion</i>	27	1,49	34,38
<i>envelope</i>	14	1,49	34,57
<i>internal side of plasma membrane</i>	9	1,39	41,93
<i>nuclear body</i>	6	1,36	43,73
<i>nucleoplasm part</i>	13	1,34	45,28
molekulare Funktion	Anzahl	-log [p-Wert]	FDR
<i>hydrogen ion transmembrane activity</i>	5	1,73	22,41
<i>inorganic cation transmembrane transporter activity</i>	6	1,69	24,48
<i>monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity</i>	5	1,65	26,57
<i>nucleoside-triphosphatase regulator activity</i>	10	1,42	41,09

Im KEGG-Signalweg „Apoptose“ wurden nach Nitritapplikation in der Reperfusiongruppe 5 signifikant regulierte mRNA-Transkripte identifiziert. Hierzu zählen die *Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase 3* (*irak-3* = *irak-M*), *inhibitor of apoptosis protein* (*birc3*), *Tumornekrosefaktor Rezeptor 1* (*tnfrsf1a*), *Interleukin-3 Rezeptor* (*csf2rb2*) und die *Proteinkinase A* (*prkacb*) (Abb. 6, Tab. 11).⁷⁰

Tabelle 11: Signifikant regulierte Gene assoziiert mit Apoptose-Signalwegen nach Nitritapplikation und 5 Minuten Reperfusion bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe

Gensymbol	Bezeichnung	Regulation	n-fach	p-Wert
<i>irak3</i>	<i>Interleukin-1 rezeptorassoziierte Kinase 3</i>	↑	1,3	0,00839
<i>birc3</i>	<i>IAP</i>	↑	1,3	0,006267
<i>tnfrsf1a</i>	<i>TNF-R1</i>	↑	1,2	0,00256
<i>csf2rb2</i>	<i>IL-3R</i>	↑	1,2	0,00875
<i>prkacb</i>	<i>Proteinkinase A</i>	↑	1,1	0,002699

Nitritapplikation führte nach 5-minütiger Reperfusion zur Hochregulierung des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1. Gemäß der KEGG-Analysen werden hierdurch das „*Receptor-Interacting Protein 1*“ (*rip1*) und der „*Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierte Faktor 2*“ (*traf2*) reguliert. Diese können wiederum über den „*Nuclear factor-κB-inducing kinase*“ (*nik*) in den NFκB-Signalweg eingreifen. Hierdurch werden anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 und die Familie der „*inhibitors of apoptosis*“ (IAP) stabilisiert. IAP hemmt die Caspasen 3, 6, 7 und 9 und kann somit die Einleitung der Apoptose verhindern.

Weiterhin zeigte sich nach Nitritapplikation eine Hochregulierung von Proteinen der IRAK-Familie, welche gemäß der KEGG-Analysen ebenso über *rip1* in den NFκB-Signalweg eingreifen können und einen anti-apoptotischen Effekt medieren. Der nach Nitritapplikation hochregulierte Interleukin-3 (IL-3) Rezeptor wirkt laut der KEGG-Analysen über die ebenso hochregulierte Proteinkinase A (PKA) anti-apoptotisch. Die PKA inhibiert das Protein Bad und hemmt somit seine apoptotische Wirkung.^{70, 72, 76}

Im KEGG-Signalweg „oxidative Phosphorylierung“ wurden nach Nitritapplikation in der Reperfusionsgruppe 6 signifikant regulierte mRNA-Transkripte identifiziert. Hierzu zählen die *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 6* (*ndufb6*), *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1* (*ndufc1*), *cytochrome c oxidase, subunit VIIIb* (*cox8b*), *ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D1* (*atp6v0d1*) und die *NADH dehydrogenase* (*ndufv3*) (Abb. 6, Tab. 12).⁷⁰

Tabelle 12: Mit oxidativen Phosphorylierung-Signalwegen assoziierte signifikant regulierte Gene nach Nitritapplikation und 5 Minuten Reperfusion bezogen auf die Reperfusionskontrollgruppe

Gensymbol	Bezeichnung	Regulation	n-fach	p-Wert
<i>ndufb6</i>	<i>NADH Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 beta Untereinheit 6</i>	↓	1,2	0,004109
<i>ndufc1</i>	<i>NADH Dehydrogenase (Ubiquinon) 1</i>	↓	1,2	0,000641
<i>cox8b</i>	<i>Cytochrom c Oxidase, Untereinheit VIIIb</i>	↓	1,2	0,001633
<i>atp6v0d1</i>	<i>ATPase, H⁺ Transport, lysosomale V0 Untereinheit D1</i>	↓	1,1	0,008538
<i>ndufv3</i>	<i>NADH Dehydrogenase (Ubiquinon) Flavoprotein 3</i>	↓	1,1	0,001115
<i>atp6V0E2</i>	<i>ATPase, H⁺ Transport, lysosomale V0 Untereinheit E2</i>	↑	1,2	0,001728

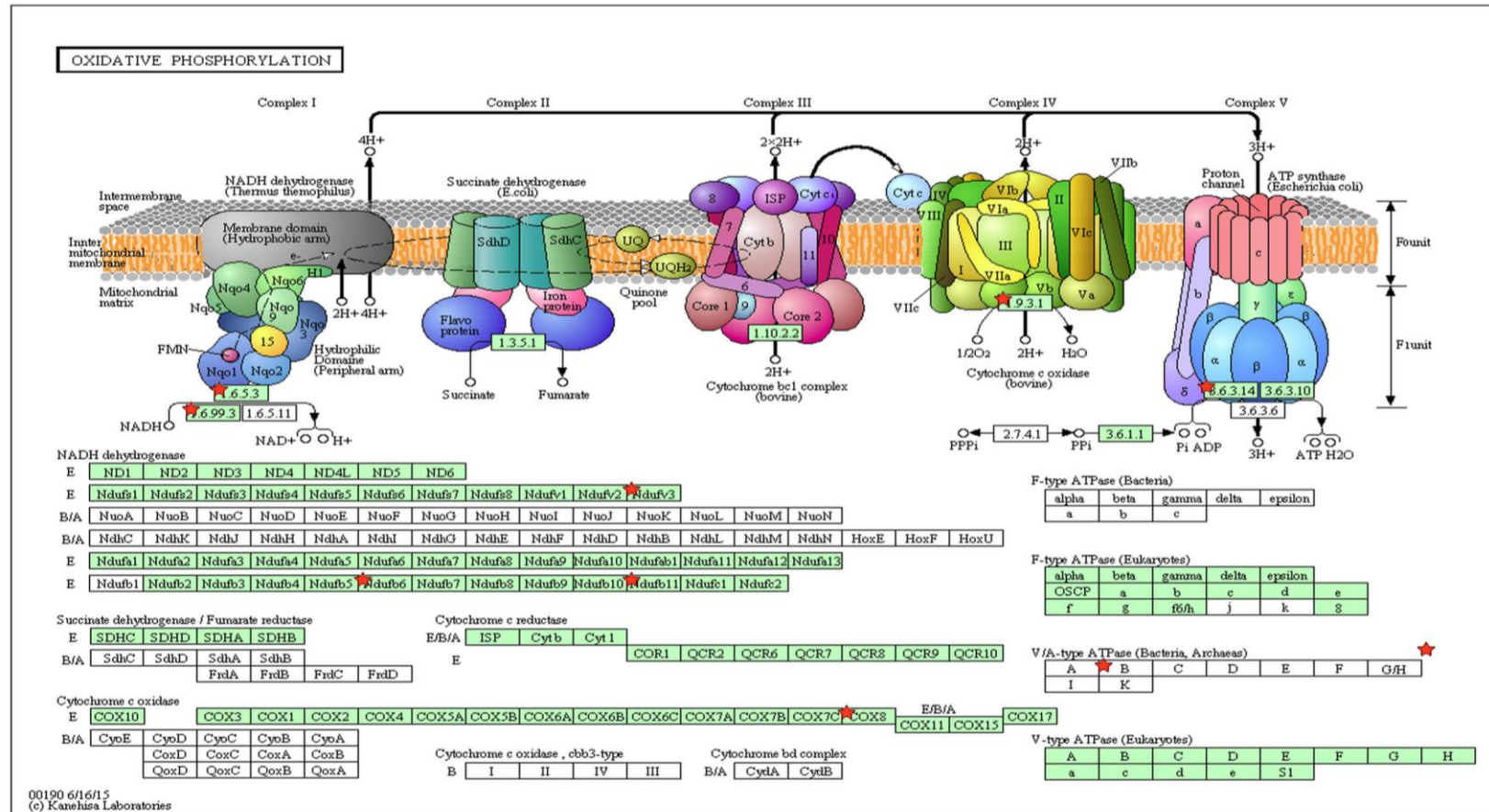


Abb. 6: Signalweg „oxidative Phosphorylierung“ nach KEGG-Analyse. Die roten Sterne markieren die signifikant regulierten mRNA-Transkripte nach Nitritapplikation und 5 Minuten Reperfusion in Bezug auf die unbehandelte Kontrollgruppe ($p < 0,05$).^{72, 76}

3.5.2 Analyse von möglichen miRNA-mRNA-Protein Interaktionen nach Nitritapplikation in 5 Minuten Reperfusion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Applikation von anorganischem Nitrit vor Beginn der Reperfusion einen Einfluss auf die miRNA- und mRNA-Regulation in den ersten 5 Minuten des myokardialen I/R-Schadens hat. Basierend darauf sollte eine mögliche miRNA-mRNA Interaktion im akuten I/R-Schaden identifiziert werden. Diese Analyse wurde mit *targetscan database 7.0* für die Mausspezies durchgeführt. In den apoptoserelevanten Signalwegen zeigten *in-silico* Analysen komplementäre Nukleotidsequenzen der herunterregulierten miR 146b, miR 339-3p und miR 433 für die 3'UTR Region der für IRAK-M kodierenden und um das 1,3-fache hochregulierten mRNA. Im Folgenden wurde eine mögliche Interaktion bestätigt. In single tube Real Time RT qPCR Versuchen wurde verifiziert, dass in der 5-minütigen Reperfusion nach Nitritapplikation die miR 146b und miR 339-3p signifikant herunterreguliert werden, während Irak-M auf mRNA- und Proteomebene korrespondierend hierzu verstärkt exprimiert wird ($n=5$; $p<0,05$). Die signifikante Regulation der miR 433 konnte in der single tube Real Time RT qPCR nicht bestätigt werden ($n=5$; $p>0,05$) (Abb. 7-9).⁷⁰

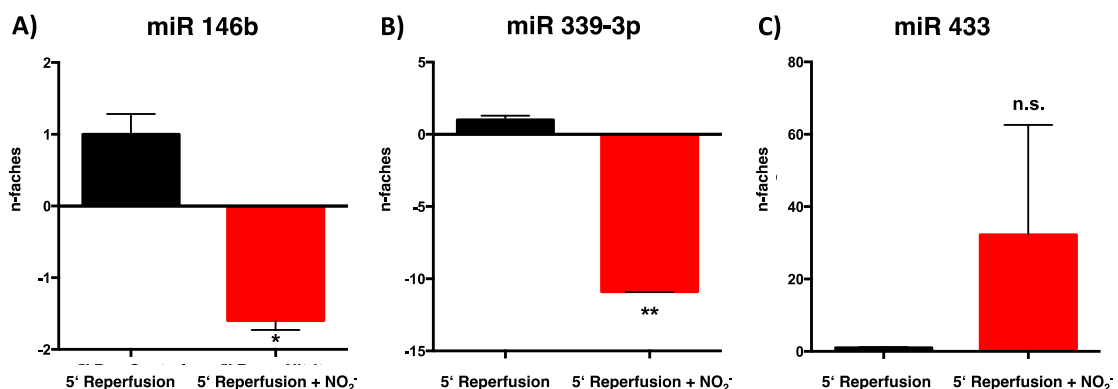


Abb. 7: Single tube Real Time qRT-PCR bestätigt, dass in der Reperfusionsgruppe nach Nitritapplikation miR 146b (A) und miR 339-3p (B) vermindert exprimiert werden, während miR 433 (C) unverändert bleibt ($n=5$; * $p<0,05$, ** $p<0,001$, ns $p\geq 0,05$).⁷⁰

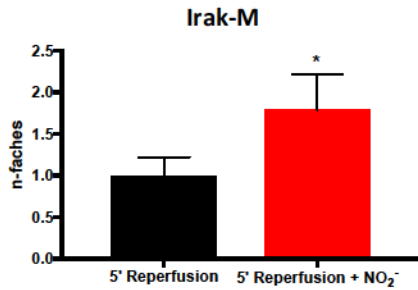


Abb. 8: Single tube Real Time qPCR zeigt, dass in der Reperfusionsgruppe nach Nitritbehandlung das Irak-M mRNA-Transkript signifikant höher exprimiert wird als in der Reperfusionskontrollgruppe (n=5; *p<0,05).⁷⁰

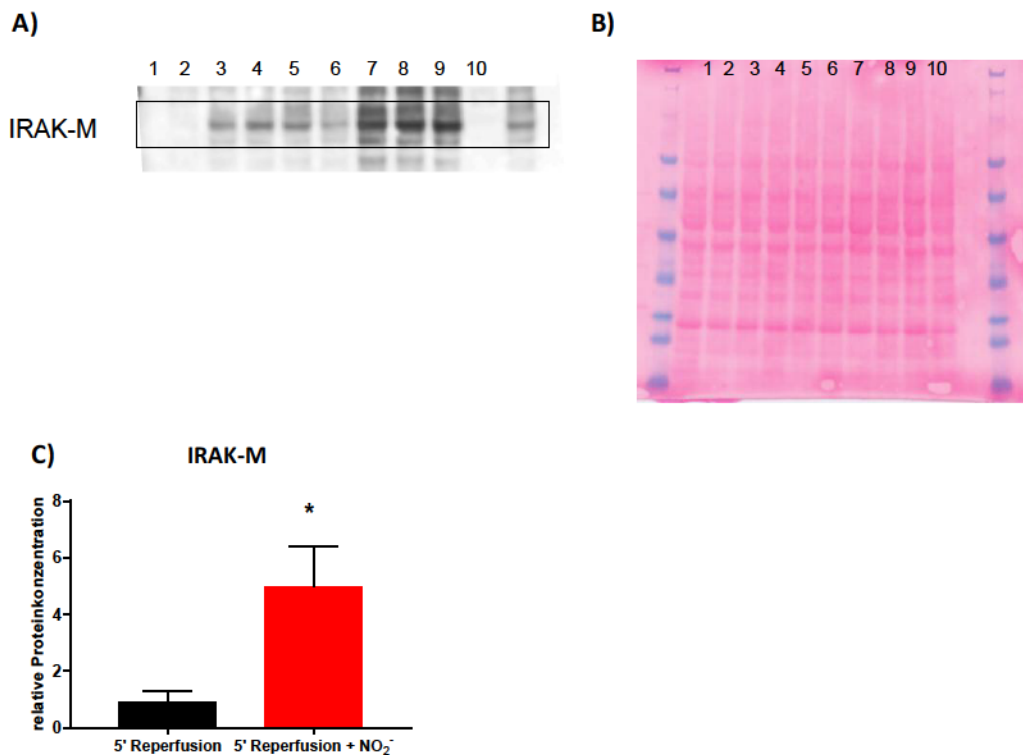


Abb. 9: Nitritapplikation führt im akuten myokardialen I/R-Schaden zur Hochregulierung von IRAK-M. Dargestellt ist der Western Blot mit IRAK-M (68 kDa) im myokardialen I/R-Schaden nach Nitritapplikation (1-3, 9, 10) im Vergleich zur Reperfusionskontrollgruppe (4-8) (A). Die Ponceau-Färbung als Proteinkontrolle zeigt an, dass alle Proben eine vergleichbare Proteinkonzentration haben (B). Nach Nitritapplikation wird das Protein IRAK-M im myokardialen I/R-Schaden im Vergleich zur Reperfusionskontrollgruppe hochreguliert (n=5; *p<0,05) (C).⁷⁰

3.6 Nachweis neuer kardialer miRNAs

Mittels NGS (Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Wei Chen, Max-Delbrück Institut Berlin) wurden in Mäuseherzhomogenaten (n=1) 66 bisher nicht beschriebene, prognostizierte kardiale *de-novo* miRNA-Sequenzen *in vivo* detektiert (Tab.13). Letztere wurden durch den *miRDeep2* Algorithmus⁷⁵ identifiziert, welcher neben der für miRNAs typischen Nukleotidlänge von 18-24 Nukleotiden auch die charakteristische räumliche Struktur (*mature miRNA sequence*, *star sequence*, *loop*) der Sequenzen berücksichtigt. Hierdurch können *nonsense* Sequenzen im Sinne falsch-positiver Ergebnisse von möglichen miRNA Sequenzen unterschieden werden. Je höher der errechnete *mirDeep2 Score* ist, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um die detektierte RNA-Sequenz tatsächlich um eine miRNA-Sequenz handelt. Zum endgültigen Nachweis einer miRNA Sequenz bedarf es eines positiven Real Time RT qPCR Ergebnisses.

Tabelle 13: 6 de-novo miRNA Sequenzen mittels NGS mit den höchsten miRDeep2-Scores

Bezeichnung	miRDeep2-Score	consensus mature sequence	consensus star sequence
<i>Chr M</i>	102555,5	gaauugaucaggacauaggggu	auuauaugucuucaaguucu
<i>Chr 8</i>	1386,2	ucaccuggacugacucucagg	gugaggcucaguauggggug
<i>Chr 10</i>	140,2	ucaggcuacagagcgagaaccu	agacucacuauguagcccaag
<i>Chr 6</i>	136,6	ugauuggaagacacucugcaaca	uagcagagguaccuauccauucc
<i>Chr 4</i>	118,6	ucucacuguccucugcacuagg	ucugugcaguaggcuguggguu
<i>Chr 2</i>	109,5	aacaccaggacugaaaacagccu	uuguuucaucuccuggguuugu

3.6.1 Verifizierung der neuen miRNAs in der Real Time RT qPCR

Mit den 6 der 66 prognostizierten miRNA-Sequenzen, welche die höchsten *miRDeep2*-Scores mit einer errechneten Wahrscheinlichkeit von $87\% \pm 7\%$ aufwiesen, wurden zur Verifizierung Real Time RT qPCR Analysen durchgeführt. Dabei wurden die prognostizierten kardialen miRNAs „Chr M“, „Chr 10“ und „Chr 6“ sowohl *in vivo* Mäuseherzen (n=5), als auch in *in vitro* HL-1-Zellen (n=3) verifiziert (Abb. 10).

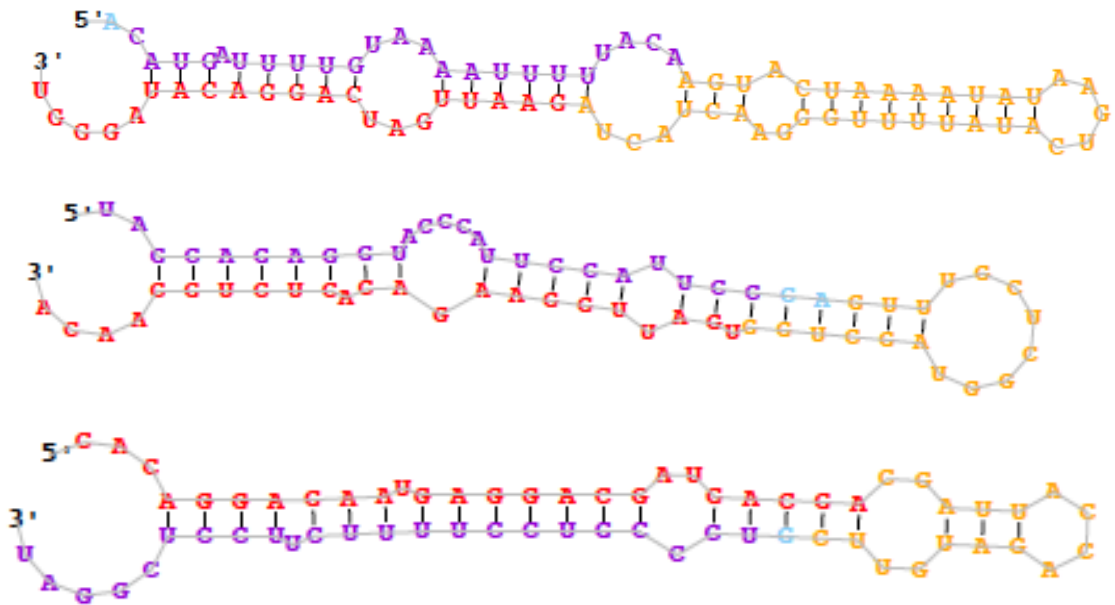


Abb. 10: Neue miRNAs. Mittels NGS generierte RNA-Sequenzen (Chr 6, Chr M, Chr 10) in zweidimensionaler Struktur, welche hier erstmals mittels Real Time RT qPCR *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen wurden. Dargestellt ist die pre-miRNA mit den charakteristischen Haarnadelstrukturen (*in vivo* Mäuseherzen n=5; *in vitro* HL-1 Zellen n=3, $p < 0,05$).³⁷

3.6.2 Die neuen miRNAs unterliegen innerhalb von 30 Minuten Ischämie und im akuten I/R-Schaden keiner Regulation

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die 3 erstmalig detektierten kardialen miRNAs innerhalb von 30 Minuten Ischämie und im akuten I/R-Schaden einer Regulation unterliegen.

Als endogene Kontrolle wurde die snoRNA 135 gewählt. Es konnte keine signifikante Regulation festgestellt werden (n=5; p>0,05).

3.6.3 Anorganisches Nitrit hat auf die Regulation der neuen miRNAs im akuten myokardialen I/R-Schaden *in vivo* keinen Einfluss

Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass 6 der bereits bekannten miRNAs durch intrakavitäre Nitritapplikation im nanomolaren Bereich in den ersten 30 Minuten der Ischämie und im akuten I/R-Schaden *in vivo* verändert reguliert werden. Ob die neuen miRNAs („*Chr6*“, „*ChrM*“, „*Chr10*“) ebenfalls einer solchen Regulierung unterliegen ist nicht bekannt. Zur Untersuchung dessen wurden die neuen miRNAs – obigem I/R-Modell (Abb. 2) folgend – nach 30 Minuten Ischämie und 5-minütiger Reperfusion mittels Real Time RT qPCR quantifiziert.

Die Analyse zeigte, dass Nitritapplikation keinen signifikanten Einfluss auf die miRNA-Expression der neuen miRNAs „*Chr6*“, „*ChrM*“ und „*Chr10*“ in der frühen Ischämie und Reperfusion hat (n=5; p>0,05).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die frühe Phase des myokardialen I/R-Schadens und eruiert mögliche miRNA-Regulationsmuster der frühen Reperfusion, sowie einen möglichen Einfluss des kardioprotektiven Nitrit-NO-Metabolismus auf diese miRNA-Regulation. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass miRNAs in der frühen Phase des myokardialen I/R-Schadens akut dysreguliert werden und stellt somit ein spezifisches miRNA-Muster der frühen Reperfusionsphase dar. Ebenso wird gezeigt, dass intrakavitäre Nitritapplikation innerhalb weniger Minuten hierauf Einfluss hat. Insbesondere die Präservierung der Basalwerte der miR 146b und miR 339-3p nach Nitritapplikation in der Reperfusionsgruppe scheint von zentraler Bedeutung zu sein. Dies geht mit erhöhten Proteinkonzentrationen des möglichen miR 146b, miR339-3p Zielproteins IRAK-M einher. IRAK-M besitzt anti-apoptotische und anti-inflammatorische Kapazitäten.^{3, 77-79} Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit 3 kardiale miRNAs, welche mittels NGS erstmalig detektiert wurden, in Real Time RT qPCR Analysen *in vivo* und *in vitro* verifiziert.

Es wurde ein *in vivo* I/R-Mausmodell mit 30 Minuten Ischämie und 5 Minuten Reperfusion gewählt. Den Mäusen wurde in den letzten 5 Minuten der Ischämie intrakavitär anorganisches Nitrit im nanomolaren Konzentrationen oder als Kontrolle Natriumchlorid injiziert (Abb. 2). Die Phase der frühen Reperfusion ist klinisch eine relevante Phase, da sie in unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang zu iatrogenen Maßnahmen der kathetergestützten Akuttherapie des Myokardinfarktes steht und somit weitere Akutmaßnahmen, die zur Reduktion des I/R-Schadens beitragen können, in diesem Zeitfenster einfach klinisch implementiert werden können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *in vivo* Nitritapplikation in den letzten 5 Minuten der Ischämie ebenso wirksam ist, wie eine frühere und längere Nitritapplikation.⁸⁰ Ebenso ist bekannt, dass die *in vivo* Reduktion von Nitrit zu NO nach 5 Minuten Reperfusion ihren Höchstwert erreicht.¹² Basierend darauf sind die gewählten Zeiträume zur Untersuchung des frühen I/R-Schadens geeignet.

Sowohl in der 30-minütigen Ischämie-, als auch in der 5-minütigen Reperfusionsgruppe konnte eine signifikante Dysregulation von insgesamt 15 miRNAs gezeigt werden (miR 301b, miR 181c, miR 23, let 7b, let 7a, miR 208, miR 484, miR 98, miR 146b, miR 351, miR 191, miR 339-3p, miR 125a-5p, miR

433, miR 200c). Der Stellenwert verschiedener miRNAs in zahlreichen kardiovaskulären Pathologien ist seit der Jahrtausendwende Gegenstand intensiver Forschung. Bisher konnte gezeigt werden, dass miRNAs in der Pathogenese der Herzinsuffizienz, kardialer Hypertrophie, kardialen Arrhythmien, post-Infarkt Remodelling, Arteriosklerose und Vorhofflimmern involviert sind.^{28-31, 47, 48}

Die erhöhten Serumspiegel der zirkulierenden miR 125a-5p in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz lässt zwischen systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz differenzieren und scheint somit spezifisch reguliert zu sein.⁸¹ Auch in der vorliegenden Arbeit war die miR 125a-5p im akuten myokardialen I/R-Schaden hochreguliert. Weitere Experimente sind notwendig um zu zeigen, ob die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten myokardial erhöhten miR 125a-5p Spiegel im Falle einer Progression der kardialen Schädigung zum Vollbild einer Herzinsuffizienz zu den in anderen Studien beobachteten erhöhten Serumspiegeln beitragen. Ferner ist die miR 125a-5p an Remodellingprozessen wie Inflammation und Angiogenese beteiligt.^{82, 83} Der Schwerpunkt der bisherigen Forschungsarbeiten zum Themenkomplex der miRNAs liegt somit – anders als in dieser Arbeit – auf den langfristigen Folgen des I/R-Schadens. Deshalb wurden bisher vor allem längere Reperusionszeiten (Tage bis Wochen) untersucht.^{28, 84-87} Hierbei wurde die miR 21 repetitiv als dysreguliert identifiziert.^{85, 87, 88} Die Tatsache, dass dies in dem hier untersuchten akuten I/R-Schaden nicht bestätigt werden konnte, spricht für ein in der vorliegenden Arbeit beschriebenes spezifisches miRNA-Muster der frühen Reperusionsphase. Auch im renalen I/R-Schaden konnte gezeigt werden, dass die miR 21 erst im späten I/R-Schaden dysreguliert wird.⁸⁹

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten miRNAs wurde lediglich ein Bruchteil im Verlauf der frühen Reperfusion dysreguliert (9 / 290 miRNAs). Dies spricht gegen unspezifische miRNA Dysregulationen, wie beispielsweise im Rahmen des Zelluntergangs im I/R-Schaden, bei denen globale miRNA Veränderungen zu erwarten wären und legt einen selektiven Mechanismus der miRNA Regulation in der frühen Reperfusion nahe. Es bleibt jedoch ungeklärt, ob es sich um ein spezifisches miRNA-Muster der Kardiomyozyten handelt oder ob andere Zellpopulationen, etwa kardiale Fibroblasten oder Endothelzellen für das gezeigte Ergebnis verantwortlich sind. Auch eine Beteiligung von extrakardialen

Zellpopulationen an den gezeigten miRNA Veränderungen wie beispielweise eingewanderte Immunzellen im Rahmen des I/R-Schadens wäre vorstellbar. Hierzu sind weitere Untersuchungen, vor allem *in vitro* Analysen mit Primärzellen notwendig. Ebenso verbleiben die genauen Mechanismen, die den veränderten miRNA-Spiegel zugrunde liegen ungeklärt. Denkbar wäre sowohl die aktive Neusynthese über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie auch eine Interaktion mit Drosha oder Dicer, welche an der enzymatischen miRNA Aktivierung beteiligt sind.⁴⁰ Auch eine Inhibition der miRNA Degradation oder die Stabilisierung der entsprechenden miRNAs im Zytoplasma wäre ein möglicher Mechanismus.

DAVID-Analysen zeigten in mit Nitrit behandelten reperfundierten Herzen eine Involvierung von 5 regulierten mRNA-Transkripten in apoptose-, sowie von 6 regulierten mRNA-Transkripten in atemungsketterelevanten Signalwegen. *In-silico* Analysen deckten eine miRNA-mRNA Interaktion zwischen 3 regulierten miRNAs (miR 146b, miR 339-3p, miR 433) und der 3' UTR Region, der für IRAK-M kodierenden ebenfalls regulierten mRNA auf. IRAK-M ist in apoptotische und immunologische Signalwege involviert. In der anschließenden single tube Real Time RT qPCR Analyse konnte die Herunterregulierung von 2 der 3 miRNAs (miR 146b, miR 339-3p) verifiziert und eine korrespondierende Hochregulierung von IRAK-M auf Genom- und Proteomebene bestätigt werden. Dies legt nahe, dass über die Herunterregulierung der miR 146b und miR 339-3p die Translation der Irak-M mRNA enthemmt wurde. Um einen kausalen Zusammenhang final zu beweisen, bedarf es weiteren *in vitro* Versuchen mit entsprechenden antagonisierenden miRNA Sequenzen und Luciferase-Assays.

Neben der Involvierung von miRNAs in Herzpathologien ist auch die kardioprotektive Rolle des Nitrit-NO-Metabolismus im I/R-Schaden bekannt.^{1, 2, 12} Nitritapplikation konnte im experimentellen I/R-Schaden über eine Myoglobin-abhängige Reduktion zu NO das Infarktareal um ca. 50% senken.¹² Für diese zyto- und kardioprotektive Rolle des Nitrits werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Hierzu gehören die Involvierung in die mitochondriale Atmungskette, in apoptotische Signalwege, die Hemmung der ROS Bildung und von inflammatorischen Signalwegen, wie beispielsweise die Inhibition der

Neutrophilenadhärenz zum Koronarendothel.^{2, 12, 68} Während eine solche Kardioprotektion im experimentellen I/R-Schaden gut untersucht ist, lässt sich dieser Effekt bislang nicht auf humane Studien übertragen.^{63, 64} Diese Diskrepanz könnte auf die unterschiedliche Hämodynamik und die verschiedene intra- und extravasale Flüssigkeitsverteilung zwischen den Spezies zurückzuführen sein. Eine entsprechende Dosisanpassung des anorganischen Nitrits ist unter Berücksichtigung dieser Parameter erforderlich ohne hämodynamisch relevante Dosierungen zu erreichen, welches konfundierend wirken würde. Allerdings konnte im Rahmen des akuten ST-Hebungsinfarktes nach intrakoronarer Nitritapplikation eine Reduktion der Entzündungsvorgänge unter anderem anhand von niedrigeren Blutplasmaspiegeln des hochsensitiven C-reaktiven Proteins im akuten I/R-Schaden gezeigt werden.⁹⁰

Erst kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen der Applikation von Nitrit und veränderten miRNA-Spiegeln formuliert, der auch in der vorliegenden Arbeit hypothetisiert und bestätigt wurde.^{9, 10} Andere Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass die gemeinsame Applikation von Nitrit und konjugierter Linolsäure vor einem experimentellen *in vivo* Myokardinfarkt im Mausmodell mit einer Hochregulierung der miRNA 433 assoziiert ist.¹⁰ *In vitro* Experimente zeigten 2015, dass die Applikation des NO-Donors Natrium-Nitroprussid (SNP) zu konsekutiven miRNA-Expressionsveränderungen führte.¹¹ SNP Applikation bedingte eine erhöhte Apoptoserate in einer Osteoblasten-Zellkultur. Gleichzeitig führte SNP zu einer Erhöhung der miRNA 1. Nach Eliminierung der miRNA 1 mittels einer AntagomiR nahm die Apoptoserate nach SNP Applikation signifikant ab. Dies lässt schlussfolgern, dass der Einfluss des SNP auf die Osteoblasten über die miRNA 1 mediiert wird.¹¹ Ferner konnte in hepatischen Epithelzellen gezeigt werden, dass exogenes NO die miRNA 155 hoch-, während endogenes NO die miRNA 155 herunterreguliert.⁹¹ Die genauen mechanistischen Hintergründe einer möglichen Nitrit-NO-miRNA-Interaktion bleiben weiterhin ungeklärt.

Da Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass Nitrit über eine Myoglobin-abhängige Reduktion zu NO im I/R-Schaden kardioprotektiv wirkt¹², kann spekuliert werden, dass eine Nitrit-NO-miRNA-Interaktion bestehen könnte. Ebenso wäre auch eine direkte Interaktion zwischen Nitrit und der miRNA-

Regulationskaskade vorstellbar. Die genaue Eruiierung eines solchen Zusammenhanges ist sinnvoll und bedarf weiterer Untersuchungen.

Nach Nitritapplikation zeigt sich in der frühen Reperfusion ein spezifisches miRNA-Muster. Obgleich diese Arbeit keinen direkten kausalen Zusammenhang zwischen Nitritapplikation und der miRNA Regulation zeigt, sprechen mehrere Gründe gegen unspezifische Veränderungen der miRNAs: Erstens, macht die gezeigte Präservierung der Basalgruppenwerte der in Ischämie und Reperfusion veränderten miRNAs einen unspezifischen Effekt unwahrscheinlich. Zweitens, wäre im Fall eines unspezifischen Effektes nach Nitritapplikation eine breitgefächerte globale miRNA Dysregulation zu erwarten. Dies ist hier nicht der Fall.

Die hier gezeigten Ergebnisse legen eine Interaktion auf molekularer Ebene nahe, wie beispielsweise die direkte Nitrierung von RNA Molekülen mit nachfolgender Stabilisierung beziehungsweise Destabilisierung der miRNA Sequenzen. Weiterhin wäre auch eine posttranslationale S-Nitrosylierung regulatorischer Proteine wie Dicer oder Drosha möglich, worüber ein Einfluss auf die miRNA Synthese ausgeübt werden könnte. Weitere Arbeiten sind erforderlich um die genauen Zusammenhänge aufzuzeigen. Es bleibt daher auch Spielraum für weitere Vermutungen: Nitrit verbessert die Koronarperfusion, wirkt sowohl vorlast-, als auch blutdrucksenkend und verringert somit die kardiale Ejektionsfraktion. Es wäre somit denkbar, dass die beobachteten miRNA Veränderungen nur indirekt durch den Einfluss des Nitrits auf die Hämodynamik mediiert werden. Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten jedoch ausschließen, dass die hier applizierte Nitritdosis im nanomolaren Bereich hämodynamische Relevanz hat und hierüber konfundierend wirken könnte.¹⁴

Intrakavitäre Nitritapplikation 5 Minuten vor Initiierung des akuten I/R-Schadens ist mit einer signifikanten Hochregulierung der miR 17 und miR 106a assoziiert. Interessanterweise besitzt die miR 17 antiapoptotische Kapazitäten, indem sie die Translation der mRNA des proapoptotischen Proteins Apaf-1 inhibiert und hierdurch die Einleitung der Apoptosekaskade verhindert.⁹² Dies zeigt, dass Nitrit den bekannten zytoprotektiven Effekt über die Hochregulierung der miR 17 im I/R-Schaden ausüben könnte.

Sowohl die miRNA Array Real Time RT qPCR, als auch die nachfolgend durchgeführten single tube Real Time RT qPCR konnten übereinstimmend

bestätigen, dass die miR 146b und miR 339-3p in der mit Nitrit behandelten Reperfusionsgruppe innerhalb von 5 Minuten im Vergleich zur Reperfusionskontrollgruppe signifikant herunterreguliert wurden. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass deren gemeinsames *predicted target* IRAK-M, sowie die korrespondierenden Proteinspiegel IRAK-M invers zu den miRNAs reguliert sind und somit eine mögliche Interaktion wahrscheinlich erscheinen lässt. Andere Arbeiten zeigten bereits eine initiale Interaktion zwischen der miR 146b und der IRAK-Familie auf.⁹³ Weitere Arbeiten zum Nachweis einer direkten Interaktion sind erforderlich.

Für die miR 146b wurde im *in vivo* Mausmodell bereits eine Involvierung in immunologische Prozesse, wie der Pathogenese der viralen Myokarditis gezeigt. *In vivo* Reduktion des miR 146b Spiegels reduzierte die Schwere der viralen Myokarditis. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung des miR 146b Spiegels zu einer Herunterregulierung von RORyt führt und hierrüber am Myokard anti-inflammatorisch wirkt.⁹⁴ Auch andere Arbeiten bestätigen eine pro-inflammatorische Wirkung der miR 146b.^{95, 96} Weiterhin zeigte sich, dass eine Reduktion der miR 146b Spiegel zu erhöhten eNOS- und endothelialen Wachstumsfaktorrezeptoren (eGFR) Konzentrationen führt und mit einer geringeren Kardiomyozyten-Apoptoserate einhergeht.⁹⁷ In der vorliegenden Arbeit wurden im *in vivo* I/R-Schaden erhöhte miR 146b Spiegel dokumentiert, welches nach Nitritapplikation nicht der Fall war. Vor diesem Hintergrund kann spekuliert werden, dass Nitrit über eine Reduzierung des miR 146b Spiegels in der 5-minütigen Reperfusion am Myokard einen anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen Effekt vermittelt und hierüber kardioprotektiv wirkt. Die Involvierung des Nitrit-Metaboliten NO in inflammatorische Stoffwechselwege ist bereits bekannt.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Auch die Reduzierung von Entzündungsreaktionen im akuten I/R-Schaden bei Patienten nach intrakoronarer Applikation von Nitrit wurde bereits gezeigt.⁹⁰

Diese Überlegungen werden dadurch gestützt, dass dem nach Applikation von Nitrit hochregulierten *predicted target* IRAK-M selbst anti-inflammatorische Kapazitäten zugeschrieben werden.^{78, 79, 101} Es konnte gezeigt werden, dass IRAK-M durch Inhibition von Entzündungskaskaden das postinfarktuelle Remodelling positiv beeinflussen kann.¹⁰¹ Weiterhin ist bekannt, dass Glukokortikoide ihre anti-inflammatorische Wirkung über die Hochregulierung von

IRAK-M medieren.⁷⁹ Die Applikation des NO-Donors GSNO steigert die Expression des anti-inflammatorisch wirkenden IRAK-M.⁷⁷ Durch Nitritapplikation konnte dies in der vorliegenden Arbeit im frühen myokardialen I/R-Schaden reproduziert werden und somit ein möglicher Regulationsweg über Nitrit-NO-Metabolite und miRNA-mRNA Interaktion hypothetisiert werden. Im hepatischen I/R-Rattenmodell vermittelt IRAK-M zudem den hepatoprotektiven Effekt der Hämoxxygenase-1,³ welches ähnliche protektive Effekte im myokardialen I/R-Schaden vermuten lässt.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die zugrundeliegende hypothetisierte Interaktion zwischen dem Nitrit-NO-Metabolismus, miR 146b, miR 339-3p und IRAK-M im myokardialen I/R-Schaden zu verifizieren.

Neben der Identifizierung einer Dysregulierung von miRNAs im frühen myokardialen I/R-Schaden, und einem Einfluss durch Nitrit-NO-Metabolite auf diese Regulation, konnten im Rahmen dieser Arbeit 3 neue kardiale miRNAs erstmalig beschrieben werden. Diese wurden mittels NGS erstmals detektiert und sowohl in Mäuseherzen *in vivo*, als auch in HL-1 Zellen *in vitro* verifiziert („ChrM“, „Chr6“, „Chr10“). Weitere *in vitro* Experimente an den einzelnen kardialen Zellpopulationen sind nötig, um eine definitive Aussage über das Verteilungsmuster dieser 3 neuen miRNAs zu treffen und zu klären, ob diese miRNAs spezifisch für die Kardiomyozyten-Zellpopulation sind. Eine differentielle Regulation dieser miRNAs im Rahmen des akuten myokardialen I/R-Schadens konnte nicht nachgewiesen werden. Es bleibt zu klären ob diese erstmals beschriebenen miRNAs im späten I/R-Schaden einer Regulation unterliegen. Ferner sind weitere Experimente zur Aufschlüsselung möglicher Ziel-mRNA Sequenzen und zur funktionellen Bedeutung dieser 3 miRNAs geplant. Denkbar sind *in vitro* Versuche mit entsprechenden antagonisierenden Sequenzen und konsekutiven Proteomanalysen mittels Western-Blots oder mittels *pulsed stable isotope labelling with amino acids in cell culture (pSILAC)*. Letzteres Verfahren bietet eine hochauflösendere Quantifizierung der zu vergleichenden Proteomgruppen, birgt jedoch auch technische Herausforderungen insbesondere bei der Herstellung der entsprechenden Kulturmedien für hochspezifische Zelllinien wie HL-1 Zellen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass miRNAs bereits im frühen I/R-Schaden akut dysreguliert werden und weist auf ein spezifisches miRNA Muster der frühen Reperfusionsphase hin. Nitritapplikation unmittelbar vor Ende der Ischämiephase beziehungsweise vor Beginn der Reperfusion konnte innerhalb weniger Minuten selektiven Einfluss auf die miRNA Regulation nehmen. Hierbei wurden nach Nitritapplikation kardioprotektiv wirkende miRNAs hoch- und schädigende miRNAs herunterreguliert. Die genauen mechanistischen Hintergründe sind noch ungeklärt. Es lässt sich aber eine Interaktion zwischen dem Nitrit-NO-Metabolismus und der miRNA Regulierungskaskade vermuten. Denkbar wäre beispielsweise eine direkte Nitrierung von RNA Molekülen oder die posttranslationale S-Nitrosylierung von regulatorischen Proteinen wie Dicer oder Drosha. Ferner wird gezeigt, dass nach Nitritapplikation in der frühen Reperfusion auch auf mRNA- und nachgeschalteter Proteomebene spezifische Regulationen stattfinden, welche in apoptotische und zellenergetisch relevante mitochondriale Stoffwechselwege eingreifen. *In-silico* Analysen deckten eine potenzielle Interaktion zwischen den im I/R-Schaden nach Nitritapplikation herunterregulierten miRNAs (miR 146b, miR 339-3p) und der für IRAK-M kodierenden mRNA auf. IRAK-M ist für seine anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkung, auch im Rahmen des myokardialen I/R-Schadens bekannt.¹⁰¹ In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Irak-M mRNA-Transkripte, als auch die IRAK-M Proteinkonzentrationen in der Reperfusionsphase unmittelbar nach Nitritapplikation invers zu den genannten korrespondierenden miRNAs miR 146b und miR 339-3p reguliert sind. Dies stützt den in *in-silico* Analysen gezeigten Zusammenhang. Die Aktivierung des anti-inflammatorisch und anti-apoptotisch wirkenden IRAK-M in der Phase der frühen Reperfusion könnte einen weiteren Mechanismus darlegen, welcher der bekannten kardioprotektiven Wirkung des Nitrit-NO Metabolismus zugrunde liegt. Andere Arbeiten zeigen bereits eine Interaktion zwischen miR 146b und der IRAK-Familie auf.⁹³ Weitere Arbeiten zur Bestätigung und mechanistischen Aufklärung einer direkten miRNA-mRNA Interaktion zwischen der miR 146b, miR 339-3p und IRAK-M in dem hier untersuchten akuten myokardialen I/R-Schaden beispielsweise mittels Luciferase-Assays oder *Knock-out* Mäusen sind notwendig. Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit einen möglichen Nitrit-NO-Metabolismus abhängigen kardioprotektiven Einfluss in der frühen Phase des I/R-Schadens auf, welcher auf molekularer

Ebene über eine miRNA-mRNA-Proteom Interaktion mediiert wird. Der hier gezeigte Zusammenhang erweitert das Verständnis der kardioprotektiven Wirkung der Nitrit-NO-Stoffwechselwege im akuten I/R-Schaden um einen wertvollen Aspekt auf molekularer Ebene bis hin zum Proteom. Wohlmöglich könnte unter Umgehung der Nitrit-NO-Stoffwechselwege pharmazeutisch direkt auf miRNA-Ebene der kardioprotektive Effekt in der akuten Phase des I/R-Schadens repliziert werden. Dies würde neue klinische Möglichkeiten zur Reduzierung des akuten I/R-Schadens eröffnen.

5 Literaturverzeichnis

1. Luedike P, Hendgen-Cotta UB, Sobierajski J, Totzeck M, Reeh M, Dewor M, Lue H, Krisp C, Wolters D, Kelm M, Bernhagen J and Rassaf T. Cardioprotection through S-nitros(yl)ation of macrophage migration inhibitory factor. *Circulation*. 2012;125:1880-9.
2. Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N and Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:13683-8.
3. Huang HF, Zeng Z, Wang KH, Zhang HY, Wang S, Zhou WX, Wang ZB, Xu WG and Duan J. Heme oxygenase-1 protects rat liver against warm ischemia/reperfusion injury via TLR2/TLR4-triggered signaling pathways. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2015;21:2937-48.
4. Yellon DM and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*. 2007;357:1121-35.
5. Ambrosio G, Zweier JL and Flaherty JT. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1991;23:1359-74.
6. Braunwald E and Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *The Journal of clinical investigation*. 1985;76:1713-9.
7. Eltzschig HK and Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine*. 2011;17:1391-401.
8. Hausenloy DJ and Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123:92-100.
9. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Gauria-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J and Feelisch M. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nature chemical biology*. 2005;1:290-297.
10. Qipshidze-Kelm N, Piell KM, Solinger JC and Cole MP. Co-treatment with conjugated linoleic acid and nitrite protects against myocardial infarction. *Redox biology*. 2013;2:1-7.
11. Lee YE, Hong CY, Lin YL and Chen RM. MicroRNA-1 participates in nitric oxide-induced apoptotic insults to MC3T3-E1 cells by targeting heat-shock protein-70. *International journal of biological sciences*. 2015;11:246-55.

12. Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M and Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:10256-61.
13. Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G and Kelm M. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circulation research*. 2014;114:1601-10.
14. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Luedike P, Berenbrink M, Klare JP, Steinhoff HJ, Semmler D, Shiva S, Williams D, Kipar A, Gladwin MT, Schrader J, Kelm M, Cossins AR and Rassaf T. Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. *Circulation*. 2012;126:325-34.
15. Turer AT and Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *The American journal of cardiology*. 2010;106:360-8.
16. de Lima Portella R, Lynn Bickta J and Shiva S. Nitrite Confers Preconditioning and Cytoprotection After Ischemia/Reperfusion Injury Through the Modulation of Mitochondrial Function. *Antioxidants & redox signaling*. 2015;23:307-27.
17. Bond JM, Herman B and Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;179:798-803.
18. Tani M and Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circulation research*. 1989;65:1045-56.
19. Li M, Wang N, Gong HQ, Li WZ, Liao XH, Yang XL, He HP, Cao DS and Zhang TC. Ca signal-induced cardiomyocyte hypertrophy through activation of myocardin. *Gene*. 2014.
20. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord EN, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa AS, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T and Murphy MP. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014;515:431-5.
21. Brandes RP, Weissmann N and Schroder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free radical biology & medicine*. 2014;76C:208-226.

22. Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007;87:245-313.
23. Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto M, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Osako T, Masuda A, Nonoyama A and et al. In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. *Circulation research*. 1984;55:168-75.
24. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD and Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circulation research*. 1984;54:277-85.
25. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR and Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *The Journal of clinical investigation*. 1975;56:978-85.
26. Krug A, Du Mesnil de R and Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circulation research*. 1966;19:57-62.
27. Manning AS and Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1984;16:497-518.
28. Aurora AB, Mahmoud AI, Luo X, Johnson BA, van Rooij E, Matsuzaki S, Humphries KM, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA and Olson EN. MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca(2)(+) overload and cell death. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122:1222-32.
29. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA and Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:13027-32.
30. Wang J, Huang W, Xu R, Nie Y, Cao X, Meng J, Xu X, Hu S and Zheng Z. MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012;16:2150-60.
31. Olson EN. MicroRNAs as therapeutic targets and biomarkers of cardiovascular disease. *Science translational medicine*. 2014;6:239ps3.
32. Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993;75:843-54.

33. Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19:92-105.
34. Huntzinger E and Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews Genetics*. 2011;12:99-110.
35. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-33.
36. Arsenic R, Treue D, Lehmann A, Hummel M, Dietel M, Denkert C and Budczies J. Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. *BMC clinical pathology*. 2015;15:20.
37. Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S and Rajewsky N. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotechnol*. 2008;26:407-415.
38. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S and Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415-9.
39. Yi R, Qin Y, Macara IG and Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003;17:3011-6.
40. Finnegan EF and Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2013;48:51-68.
41. Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2005;6:376-385.
42. Mendell JT and Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012;148:1172-87.
43. Selbach M, Schwanhauss B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R and Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455:58-63.
44. Ambros V. MicroRNAs: genetically sensitized worms reveal new secrets. *Curr Biol*. 2010;20:R598-600.
45. Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, Rojas M, Hammond SM, Schneider MD, Selzman CH, Meissner G, Patterson C, Hannon GJ and Wang DZ. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:2111-6.

46. Leung AK and Sharp PA. MicroRNA functions in stress responses. *Molecular cell*. 2010;40:205-15.
47. Adam O, Lohfelm B, Thum T, Gupta SK, Puhl SL, Schafers HJ, Bohm M and Laufs U. Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic research in cardiology*. 2012;107:278.
48. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G and Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature medicine*. 2007;13:486-91.
49. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J and Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316:575-9.
50. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M and Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics*. 2005;37:495-500.
51. Sarkar S, Leaman DW, Gupta S, Sil P, Young D, Morehead A, Mukherjee D, Ratliff N, Sun Y, Rayborn M, Hollyfield J and Sen S. Cardiac overexpression of myotrophin triggers myocardial hypertrophy and heart failure in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:20422-34.
52. Mateescu B, Batista L, Cardon M, Gruosso T, de Feraudy Y, Mariani O, Nicolas A, Meyniel JP, Cottu P, Sastre-Garau X and Mechta-Grigoriou F. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nature medicine*. 2011;17:1627-35.
53. Ren J, Zhang S, Kovacs A, Wang Y and Muslin AJ. Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2005;38:617-23.
54. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P and Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 1991;64:841-8.
55. Feng C, Li J, Ruan J and Ding K. MicroRNA-125a inhibits cell growth by targeting glypican-4. *Glycoconjugate journal*. 2012;29:503-11.
56. Zhang X, Shen MR, Xu ZD, Hu Z, Chen C, Chi YL, Kong ZD, Li ZF, Li XT, Guo SL, Xiong SH and Zhang CS. Cardiomyocyte differentiation induced in cardiac progenitor cells by cardiac fibroblast-conditioned medium. *Experimental biology and medicine*. 2014;239:628-37.
57. Lin AE, Neri G, Hughes-Benzie R and Weksberg R. Cardiac anomalies in the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet*. 1999;83:378-81.

58. Ng A, Wong M, Viviano B, Erlich JM, Alba G, Pflederer C, Jay PY and Saunders S. Loss of glypican-3 function causes growth factor-dependent defects in cardiac and coronary vascular development. *Developmental biology*. 2009;335:208-15.
59. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV and Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*. 1998;392:405-8.
60. Huang YF, Yang CH, Huang CC and Hsu KS. Vascular endothelial growth factor-dependent spinogenesis underlies antidepressant-like effects of enriched environment. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287:40938-55.
61. Wang X, Zhang X, Ren XP, Chen J, Liu H, Yang J, Medvedovic M, Hu Z and Fan GC. MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation*. 2010;122:1308-18.
62. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R and Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta physiologica Scandinavica*. 2000;168:81-8.
63. Siddiqi N, Neil C, Bruce M, MacLennan G, Cotton S, Papadopoulou S, Feelisch M, Bunce N, Lim PO, Hildick-Smith D, Horowitz J, Madhani M, Boon N, Dawson D, Kaski JC, Frenneaux M and investigators N. Intravenous sodium nitrite in acute ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial (NIAMI). *European heart journal*. 2014;35:1255-62.
64. Daniel A Jones CP, Shanti Velmurugan, Krishnaraj, Sinha Rathod MA, Sotiris Antoniou, Sven van Eijl, Andrew J Webb MAW, Mahesh K Parmar, and Ahluwalia AMaA. Randomised phase 2 trial of intra-coronary nitrite during acute myocardial infarction. *Circulation research*. 2015;116:437-447.
65. Zhang Z, Naughton D, Winyard PG, Benjamin N, Blake DR and Symons MC. Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;249:767-72.
66. Rassaf T, Flogel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M and Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circulation research*. 2007;100:1749-54.
67. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Rammos C, Petrescu AM, Meyer C, Balzer J, Kelm M and Rassaf T. Assessment of the functional diversity of human myoglobin. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2012;26:211-6.

68. Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L, Wang X, MacArthur PH, Shoja A, Raghavachari N, Calvert JW, Brookes PS, Lefer DJ and Gladwin MT. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204:2089-102.
69. Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR and Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nature medicine*. 2011;17:71-8.
70. Hendgen-Cotta UB, Messiha D, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial in vivo ischemia/reperfusion. *Free radical research*. 2017;51:91-102.
71. Huang DW, Sherman BT and Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009;4:44-57.
72. Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*. 2009;37:1-13.
73. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M and Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research*. 2016;44:D457-62.
74. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A and Narechania A. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research*. 2003;13:2129-41.
75. Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W and Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic acids research*. 2012;40:37-52.
76. Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009;4:44-57.
77. del Fresno C, Gomez-Garcia L, Caveda L, Escoll P, Arnalich F, Zamora R and Lopez-Collazo E. Nitric oxide activates the expression of IRAK-M via the release of TNF-alpha in human monocytes. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2004;10:213-20.
78. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R and Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2002;110:191-202.

79. Miyata M, Lee JY, Susuki-Miyata S, Wang WY, Xu H, Kai H, Kobayashi KS, Flavell RA and Li JD. Glucocorticoids suppress inflammation via the upregulation of negative regulator IRAK-M. *Nature communications*. 2015;6:6062.
80. Gonzalez FM, Shiva S, Vincent PS, Ringwood LA, Hsu LY, Hon YY, Aletras AH, Cannon RO, 3rd, Gladwin MT and Arai AE. Nitrite anion provides potent cytoprotective and antiapoptotic effects as adjunctive therapy to reperfusion for acute myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117:2986-94.
81. Wong LL, Armugam A, Sepramaniam S, Karolina DS, Lim KY, Lim JY, Chong JP, Ng JY, Chen YT, Chan MM, Chen Z, Yeo PS, Ng TP, Ling LH, Sim D, Leong KT, Ong HY, Jaufeerally F, Wong R, Chai P, Low AF, Lam CS, Jeyaseelan K and Richards AM. Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction. *European journal of heart failure*. 2015;17:393-404.
82. Banerjee S, Cui H, Xie N, Tan Z, Yang S, Icyuz M, Thannickal VJ, Abraham E and Liu G. miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288:35428-36.
83. Che P, Liu J, Shan Z, Wu R, Yao C, Cui J, Zhu X, Wang J, Burnett MS, Wang S and Wang J. miR-125a-5p impairs endothelial cell angiogenesis in aging mice via RTEF-1 downregulation. *Aging cell*. 2014;13:926-34.
84. Qin Y, Yu Y, Dong H, Bian X, Guo X and Dong S. MicroRNA 21 inhibits left ventricular remodeling in the early phase of rat model with ischemia-reperfusion injury by suppressing cell apoptosis. *International journal of medical sciences*. 2012;9:413-23.
85. Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ and Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovascular research*. 2009;82:21-9.
86. He B, Xiao J, Ren AJ, Zhang YF, Zhang H, Chen M, Xie B, Gao XG and Wang YW. Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. *Journal of biomedical science*. 2011;18:22.
87. Tang Y, Zheng J, Sun Y, Wu Z, Liu Z and Huang G. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *International heart journal*. 2009;50:377-87.
88. Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ and Fan GC. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation*. 2009;119:2357-66.

89. Kaucsar T, Revesz C, Godo M, Krenacs T, Albert M, Szalay CI, Rosivall L, Benyo Z, Batkai S, Thum T, Szenasi G and Hamar P. Activation of the miR-17 family and miR-21 during murine kidney ischemia-reperfusion injury. *Nucleic acid therapeutics*. 2013;23:344-54.
90. Jones DA, Khambata RS, Andiapen M, Rathod KS, Mathur A and Ahluwalia A. Intracoronary nitrite suppresses the inflammatory response following primary percutaneous coronary intervention. *Heart*. 2017;103:508-516.
91. Yuhas Y, Berent E and Ashkenazi S. Effect of nitric oxide on microRNA-155 expression in human hepatic epithelial cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2014;63:591-6.
92. Song S, Seo HH, Lee SY, Lee CY, Lee J, Yoo KJ, Yoon C, Choi E, Hwang KC and Lee S. MicroRNA-17-mediated down-regulation of apoptotic protease activating factor 1 attenuates apoptosome formation and subsequent apoptosis of cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;465:299-304.
93. Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WG, van Rijen PC, Gorter JA and Aronica E. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. *PloS one*. 2012;7:e44789.
94. Liu YL, Wu W, Xue Y, Gao M, Yan Y, Kong Q, Pang Y and Yang F. MicroRNA-21 and -146b are involved in the pathogenesis of murine viral myocarditis by regulating TH-17 differentiation. *Archives of virology*. 2013;158:1953-63.
95. Curtale G, Mirolo M, Renzi TA, Rossato M, Bazzoni F and Locati M. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:11499-504.
96. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM and Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 β -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *Journal of immunology*. 2008;180:5689-98.
97. Li JW, He SY, Feng ZZ, Zhao L, Jia WK, Liu P, Zhu Y, Jian Z and Xiao YB. MicroRNA-146b inhibition augments hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Molecular medicine reports*. 2015;12:6903-10.
98. Kubes P, Suzuki M and Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:4651-5.
99. Kurose I, Wolf R, Grisham MB and Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circulation research*. 1994;74:376-82.

100. Masini E, Gambassi F, Di Bello MG, Mugnai L, Raspanti S and Mannaioni PF. Nitric oxide modulates cardiac and mast cell anaphylaxis. *Agents and actions*. 1994;41 Spec No:C89-90.
101. Chen W, Saxena A, Li N, Sun J, Gupta A, Lee DW, Tian Q, Dobaczewski M and Frangogiannis NG. Endogenous IRAK-M attenuates postinfarction remodeling through effects on macrophages and fibroblasts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32:2598-608.

6 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Biosynthese der miRNAs

Abb. 2: Schema zum Ischämie-/Reperusionsmodell

Mod. nach: Hendgen-Cotta UB, **Messiha D**, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2017;51.1:91–102

Abb. 3: Regulation der miRNAs nach 30 Minuten Ischämie und 5 Minuten Reperfusion

Mod. nach: Hendgen-Cotta UB, **Messiha D**, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2017;51.1:91–102

Abb. 4: Regulation der miRNAs nach Nitritapplikation im myokardialen I/R-Schaden bezogen auf die Reperusionskontrollgruppe

Mod. nach: Hendgen-Cotta UB, **Messiha D**, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2017;51.1:91–102

Abb. 5: mRNA Genanalyse im myokardialen I/R-Schaden nach Nitritapplikation

Mod. nach: Hendgen-Cotta UB, **Messiha D**, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2017;51.1:91–102

Abb. 6: Signalweg „oxidative Phosphorylierung“ nach KEGG-Analyse

Huang DW, Sherman BT and Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009;4:44-57.

Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*. 2009;37:1-13.

Abb. 7: Single Tube Real Time qPCR

Mod. nach. Hendgen-Cotta UB, **Messiha D**, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2017;51.1:91–102

Abb. 8: Single Tube Real Time qPCR

Mod. nach. Hendgen-Cotta UB, **Messiha D**, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2017;51.1:91–102

Abb. 9: Nitritapplikation führt im akuten myokardialen I/R-Schaden zur Hochregulierung von IRAK-M

Mod. nach: Hendgen-Cotta UB, **Messiha D**, Esfeld S, Deenen R, Rassaf T and Totzeck M. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2017;51.1:91–102

Abb. 10: neue miRNAs

Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S and Rajewsky N. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. Nat Biotechnol. 2008;26:407-415.

7 Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Universitätsprofessor Dr. med. T. Rassaf für die Ermöglichung dieser Forschungsarbeit, seine fortwährende Motivation und konstruktive Kritik. Seine Begeisterung und Engagement für Forschung und wissenschaftliches Arbeiten haben mich nachhaltig geprägt und werden mir immer Vorbild sein.

Bei meinem Betreuer Herrn Privatdozent Dr. med. M. Totzeck möchte ich mich ganz ausdrücklich für seine uneingeschränkten Bemühungen bei theoretischen und praktischen Herausforderungen bedanken. Seine aufbauenden Worte und konstruktiven Vorschläge waren mir immer dann eine wichtige Stütze, wenn Herausforderungen im Labor unüberwindbar schienen. Er weckte meine wissenschaftliche Neugierde und verstand es eine Brücke zwischen Forschung und Klinik zu bauen. Durch ihn lernte ich zu erkennen, dass Forschung nicht nur ein Zusatz, sondern integraler Bestandteil einer lösungsorientierten klinischen Arbeitsweise ist.

In gleichem Maße zu Dank verpflichtet fühle ich mich Frau Dr. rer. nat. U. Hendgen-Cotta. Besonders bedanken möchte ich mich für die exzellente Betreuung im Labor und die Beteiligung am Fortschritt dieses Projektes. Jederzeit konnte ich sie bei Rückschlägen aufsuchen, denn sie verstand es durch ihre beruhigende Art und Expertise stets eine Lösung aufzeigen und positiv nach vorne zu blicken. Ihre Leidenschaft und Vision für die Forschung hinterlässt bei mir einen nachhaltigen Eindruck und prägt mein eigenes Verständnis von wissenschaftlichem Arbeiten.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Pia Stock, die mir beim Erlernen der technischen Grundlagen immer eine große und geduldige Hilfe war. Auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des kardiologischen Labors möchte ich mich für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Am meisten möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken. Ihr fortwährender familiärer Rückhalt ist mir in allen Lebenslagen eine unermessliche Stütze. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

