

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

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

Der Einfluss der ischämischen Fernpräkonditionierung auf die
Expression von microRNAs im Rattenherz *in vivo*

Dissertation

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

vorgelegt von

Malte Kohns Vasconcelos, MSc (Lond) PgDip (Oxon) DTM&H (Lond)

2020

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

gez.:

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

Erstgutachter: PD Dr. med. Timo Brandenburger

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

BRANDENBURGER, T., GRIEVINK, H., HEINEN, N., BARTHEL, F., HUHN, R., STACHULETZ, F., KOHNS, M., PANNEN, B. & BAUER, I. 2014. Effects of Remote Ischemic Preconditioning and Myocardial Ischemia on MicroRNA-1 Expression in the Rat Heart In Vivo. *Shock*, 42, 234-238

KOHNS, M., HUHN, R., BAUER, I., BRANDENBURGER, T. 2019. Mirna-Mediated Mechanisms of Cardiac Protection in Ischemic and Remote Ischemic Preconditioning - A Qualitative Systematic Review. *Shock*, 51(1): 44-51

Zusammenfassung / Summary

Introduction: The increase of tissue tolerance against ischaemia reperfusion injury by previous brief periods of ischaemia is called ischaemic preconditioning. Ischaemic preconditioning has an effect both locally and in organs and tissues located elsewhere in the body, the latter effect is called remote ischaemic preconditioning (RIPC). The effect is of special importance in the heart. The effector mechanisms are yet unclear, but a reduced apoptotic rate contributes to decreased cell death. MicroRNAs are non-coding strands of RNA that post-transcriptionally influence the expression of other proteins. They play a major role in cardiac pathologies and could therefore be important in the context of ischaemic preconditioning. In order to collect the current knowledge on the role of miRNAs in ischaemic preconditioning a systematic literature search was conducted. Nine microRNAs (miR-1, -21, -24, -27b, -144, -195, -206, -210 und -320) have been described as differentially expressed in cell culture studies, animal experiments and clinical trials in humans. MiR-1 is found in cardiac tissue and influences the expression of anti-apoptotic Bcl-2.

Method: Cardiac tissue from an animal model was used in microRNA micro arrays to determine the differential expression profile following RIPC and subsequent ischaemia and reperfusion compared to ischaemia and reperfusion alone. Database searches were performed to identify predicted binding partners for miR-1 which is categorised as likely relevant in the available literature. After validating the micro array results by quantitative PCR the expression of Bcl2 mRNA was measured by quantitative PCR.

Results: Micro array data showed a miR-1 reduction after RIPC consistent with the previous literature and a differential expression of an additional 10 microRNAs. Several genes with interactions to apoptosis signal pathways are potential targets for miR-1-family microRNAs, e.g. Bach2, Fubp1 and Mxd1. Reduction of miR-1 expression in remotely preconditioned myocardium was confirmed by quantitative PCR but no concurrent change in Bcl-2 mRNA was observed.

Discussion: RIPC is associated with a changed miRNA expression profile in rat myocardium. Differential expression of miR-1 was confirmed by qPCR. Bcl-2 does not seem to play a role in an effect of RIPC mediated by miR-1. Further studies regarding the function of miR-1 family microRNAs and miR-144 in ischaemic preconditioning are necessary.

Einleitung: Die Erhöhung der Toleranz von Geweben gegenüber einem Ischämie-Reperfusionsschaden durch vorbereitende kurze ischämische Phasen wird als ischämische Präkonditionierung bezeichnet. Ischämische Präkonditionierung wirkt sowohl lokal als auch an anderswo im Körper liegenden Organen und Geweben, wobei letzterer Fall als ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) bezeichnet wird. Am Herzen ist dieser Effekt von besonderer Wichtigkeit. Die wirkenden Mechanismen sind bislang unklar, Verringerung der Apoptoserate hat jedoch einen wichtigen Anteil am verringerten Zelluntergang. MicroRNAs (miRNAs) sind nicht-kodierende RNA-Stränge, die posttranskriptional die Expression von Proteinen beeinflussen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei kardialen Pathologien und könnten daher auch eine Bedeutung im Kontext der ischämischen Präkonditionierung haben. Zur Erhebung des aktuellen Wissensstands über die Rolle von miRNAs in der ischämischen Präkonditionierung wurde eine systematische Literaturrecherche in biomedizinischen Datenbanken durchgeführt. Neun miRNAs (miR-1, -21, -24, -27b, -144, -195, -206, -210 und -320) wurden bislang in unabhängigen Studien übereinstimmend in Zellkulturversuchen, Tierexperimenten und klinischen Studien am Menschen als differentiell exprimiert beschrieben. Die miRNA miR-1 kommt in Herzmuskelgewebe vor und beeinflusst die Expression von anti-apoptotisch wirkendem Bcl-2.

Methode: Mit Herzgewebe aus einem Tiermodell zu RIPC wurde mittels microRNA-Mikroarray das differentielle Expressionsprofil von miRNAs im Herzmuskelgewebe nach RIPC und nachfolgender Ischämie und Reperfusion gegenüber Ischämie und Reperfusion alleine bestimmt. Für die im Zusammenhang mit der verfügbaren Literatur als wahrscheinlich relevant eingestufte miR-1 wurden durch Datenbankrecherche vorhergesagte Bindungspartner identifiziert. Nach Validierung des Mikroarrayergebnisses durch quantitative PCR wurde die Expression von Bcl-2-mRNA über quantitative PCR bestimmt.

Ergebnisse: In den eigenen Microarraydaten zeigte sich übereinstimmend eine Verringerung der Expression von miR-1 und eine differentielle Expression von 10 weiteren miRNAs. Als Zielstrukturen der miR-1 konnten zahlreiche Gene, die in Signalwege der Apoptose involviert sind, identifiziert werden (unter anderem Bach2, Fubp1 und Mxd1). Die Verringerung der Expression von miR-1 im fernpräkonditionierten Myokard ließ sich in der quantitativen PCR bestätigen, eine gleichzeitige Veränderung der Expression von Bcl-2 mRNA fand sich jedoch nicht.

Diskussion: RIPC geht mit einem veränderten Expressionsprofil von miRNAs im Myokard der Ratte einher. Die differentielle Expression der miR-1 konnte mittels qPCR bestätigt werden. Bcl-2 scheint keine Rolle bei der miR-1 vermittelten Wirkung von RIPC zu spielen. Weitere Untersuchungen zur Funktion der miR-1-Familie und zu miR-144 im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung sind notwendig.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	mmu	<i>Mus musculus</i>
AAR	<i>Area at risk</i>	mPTP	mitochondrial permeability transition pore
ATP	Adenosintriphosphat	mRNA	messenger RNA
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	mTOR	mammalian target of rapamycin
Ca²⁺	Zweifach positiv geladenes Calcium-Ion	µg	Mikrogramm
CD	<i>Compact Disk</i>	µl	Mikroliter
cDNA	komplementäre DNA	µM	Mikromol
Ct	<i>threshold cycle</i>	Na⁺	Einfach positiv geladenes Natrium-Ion
ddCT	<i>Delta-delta threshold cycle</i> (Methode)	ng	Nanogramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nm	Nanometer
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate	NTP	Nukleotidtriphosphate
g	Erdbeschleunigung	p	p-Wert
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
H⁺	Einfach positiv geladenes Wasserstoff-Ion	PKC	Proteinkinase C
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor	qPCR	quantitative PCR
IPC	(lokale) ischämische Präkonditionierung	RIPC	ischämische Fernpräkonditionierung
I/R	Ischämie – Reperfusion	RNA	Ribonukleinsäure
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen	RNAse	Ribonuklease
kDa	Kilodalton	rno	<i>Rattus norvegicus</i>
miRNA	MicroRNA	rpm	Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter	RT	Reverse Transkription
mM	Millimol	s	Sekunde
		U	<i>Unit</i>
		UTR	untranslatierter Bereich

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung / Summary	i
Abkürzungsverzeichnis	iii
Inhaltsverzeichnis	iv
I. Einleitung	1
Ischämie-Reperfusionsschaden am Herzen	1
Klinische Bedeutung	1
Molekulare Mechanismen des Zelluntergangs beim Reperfusionsschaden.....	2
Ischämische Fernpräkonditionierung und mögliche Mechanismen	4
Tiermodell zum Ischämie-Reperfusionsschaden.....	5
microRNAs.....	7
Biosynthese	7
Funktionen von miRNAs	9
Gewebespezifität und evolutionäre Konservierung.....	10
MiRNAs im Kontext von kardialer Ischämie und Präkonditionierung	11
Ziele der Arbeit.....	17
II. Material und Methoden	18
Allgemeiner Laborbedarf	18
Molekularbiologische Techniken	18
RNA-Isolation und Qualitätskontrolle	18
RNA-Micro-Arrays.....	20
Reverse Transkription.....	22
quantitative PCR mit Taqman-Assays.....	23
Identifizierung von Zielgenen mittels Datenbankrecherche	25
III. Ergebnisse	26

RNA-Micro-Arrays	26
Identifizierung von Zielgenen für miR-1 mittels Datenbankrecherche	29
qPCR für miR-1	32
qPCR für Bcl-2 mRNA.....	33
Vorhersage von Bindungspartnern anderer differentiell exprimierter miRNAs zwischen RIPC+I/R und I/R	34
IV. Diskussion	37
Diskussion der Methoden	37
Diskussion der Ergebnisse für die Bedeutung von miRNAs bei RIPC.....	40
VI. Referenzen.....	45
VII. Anhang: miRNA MicroArray Ergebnisse RIPC + I/R vs. I/R	60

I. Einleitung

Ischämie-Reperfusionsschaden am Herzen

Klinische Bedeutung

Versorgungsstörungen des Herzmuskelgewebes können bei verschiedenen Erkrankungen, allen voran der Koronaren Herzkrankheit, vorkommen. Die herausragende epidemiologische Bedeutung dieser Störungen ist unbestritten. Nach der Global Burden of Disease Study 2015 stehen weltweit ischämische Ereignisse am Herzen auf den vorderen Plätzen der Sterbestatistiken [1].

Gewebe geht bei unterbundener Blutzufuhr und damit ohne Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr einerseits und ohne Abtransport von schädigenden Stoffwechselprodukten andererseits zu Grunde. Zusätzlich kommt es auch nach der Wiederherstellung der Versorgung zu einer Schädigung von Gewebe, deren letzte und irreversible Ausprägung als letaler Reperfusionsschaden bezeichnet wird. Zellen, die während einer vorangegangenen Ischämie nur reversibel geschädigt waren, gehen nach der Wiedereröffnung des Blutstromes unter [2]. Die Entdeckung, dass es speziell während der wiederhergestellten Durchblutung von zuvor minderversorgtem Gewebe zu einem Untergang von Herzgewebe kommt, wurde erstmals von Jennings et al. beschrieben [3]. Die Autoren beobachteten damals eine Zerstörung des Sarkolemm, Kontraktionen der Myofibrillen, das Auftreten von intramitochondrialen Kalziumphosphatpartikeln und Zellschwellung, die nach Wiedereröffnung der kardialen Blutzufuhr nach vorübergehender Unterbrechung beim Hund auftraten.

Der Anteil an der letztlichen Gewebeschädigung nach kardialer Ischämie, der durch den Reperfusionsschaden erklärt wird, kann bis zu 50% betragen [4]. Der fortgesetzte Zelluntergang durch Reperfusionsschaden kann bis zu drei Tage nach dem eigentlichen Ischämieereignis andauern [5]. Durch umschriebene Veränderung der Refraktärzeit des Herzmuskelgewebes trägt der Reperfusionsschaden außerdem zur Entstehung von Arrhythmien und damit zur Mortalität nach kardialer Ischämie bei [6, 7].

Molekulare Mechanismen des Zelluntergangs beim Reperfusionsschaden

Verschiedene molekulare Prozesse des Reperfusionsschadens sind beschrieben worden:

Calciumüberladung

Während der Ischämie sinkt durch Stoffwechselprodukte der anaeroben Glykolyse der pH-Wert im Cytoplasma. Die vermehrt vorhandenen H^+ -Ionen werden von der Zelle im Bestreben, wieder einen physiologischen intrazellulären pH-Wert herzustellen über den membranären Na^+/H^+ -Austauscher nach extrazellulär verschoben [8]. Nach Einsetzen der Reperfusion werden die extrazellulär akkumulierten H^+ -Ionen plötzlich abtransportiert, was akut zu einem erhöhten Gradienten über die Zellmembran und damit zu einem rapiden Einstrom von Na^+ -Ionen führt, der durch einen Austausch der Na^+ -Ionen gegen Ca^{2+} -Ionen über den membranären Na^+/Ca^{2+} -Austauscher und zu einer intrazellulären Akkumulation von Ca^{2+} -Ionen führt [8, 9]. Die Überladung mit Ca^{2+} -Ionen wird weiterhin dadurch verschlimmert, dass der hypoxiebedingte ATP-Mangel noch nicht ausgeglichen werden konnte und daher die ATP-abhängige Ca^{2+} -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum nur unzureichend funktioniert [9].

Die intrazelluläre Überladung mit Ca^{2+} -Ionen führt über Aktivierung von Calpain zu einer Spaltung und Aktivierung des Proteins BH3 interacting-domain death agonist (BID)[10]. BID ist eines der Proteine, welche den mitochondrialen Apoptoseweg einleiten können. BID wird in seiner Funktion durch Bcl-2 antagonisiert [11, 12]. Des Weiteren wird zum Ausgleich der erhöhten Ca^{2+} -Konzentration Ca^{2+} in die Mitochondrien aufgenommen, wo es die mitochondrial permeability transition pore (mPTP) öffnet und so zum Untergang des Mitochondriums und zur Nekrose der Zelle führt [13].

Oxidativer Stress

Unter Hypoxie- und Reperfusionsbedingungen kommt es auf verschiedenen Wegen zur gesteigerten Bildung von Superoxidionen (O_2^-). Die besonders in Endothelzellen hoch exprimierte Xanthinoxidoreduktase (XO) generiert unter aeroben Bedingungen, wie sie bei der Reperfusion entstehen, O_2^- zum Abbau einer Akkumulation von Hypoxanthin, das als Folge der intrazellulären ATP-Depletion während der Ischämie angefallen ist [14]. Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) generiert ebenfalls O_2^- , wenn ihr beispielsweise als

Folge der Ischämie Coenzyme fehlen [15]. Monoaminoxidasen und weitere mitochondriale Enzyme erzeugen unter bereits bestehendem oxidativem Stress vermehrt O_2^- , was kombiniert mit der verminderten mitochondrialen Reduktionsfähigkeit unter Energiemangel zur weiteren Akkumulation von O_2^- führt [16]. Ein Einstrom von neutrophilen Granulozyten während der Reperfusion und deren Reaktion auf durch Zelluntergang entstandene Entzündungssignale führt durch Aktivierung der leukozytären NADPH-Oxidase (NOX) zur schnellen Entstehung hoher Mengen von O_2^- [14]. O_2^- ist hochreaktiv und kann direkt durch Oxidation zellulärer Strukturen zu deren Funktionsverlust und Zelluntergang führen. Weiterhin werden O_2^- zu schwächer reaktivem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt, das Zellmembranen frei passieren kann. Die Apoptosesignal-regulierende Kinase-1 (ASK-1) registriert einen Anstieg von H_2O_2 und vermittelt über den Jun-N-terminale Proteinkinase (JNK)-Signalweg eine Inhibition von Bcl-2 und eine Aktivierung von Aktivator-Protein-1 (AP1), was die Apoptose einleitet [17-19].

Weitere Mechanismen

Epigenetische Prozesse wie die Herabregulierung von PKC_{epsilon} durch DNA-Methylierung oder eine verringerte unspezifische Histonacetylierung begünstigen die Entstehung eines Reperfusionsschadens, im letzteren Fall möglicherweise über eine Herabregulierung von Bcl-2 [20, 21]. Überexpression und Aktivierung von Aktivierendem Transkriptionsfaktor 6 (ATF6) resultierte in verringertem Reperfusionsschaden [22]. Teilweise durch den im Absatz zu oxidativem Stress erwähnten Mechanismus, teilweise durch direkte physikalische Verschlechterung der Mikrozirkulation und Wettbewerb um Nährstoffe und möglicherweise auch durch zielgerichtete zytotoxische Effekte spielt eine Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle bei der Entstehung eines Reperfusionsschadens [23]. Über bislang nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen führt weiterhin eine niedrige Konzentration weiblicher Sexualhormone zu einer Verringerung des Reperfusionsschadens [24].

Ischämische Fernpräkonditionierung und mögliche Mechanismen

1986 wurde entdeckt, dass eine myokardiale Schädigung nach Ischämie geringer ausfällt, wenn der letalen Ischämiephase kurze, nicht zum Zelluntergang führende Phasen einer Ischämie und Reperfusion vorausgehen [25]. Die kurzen Ischämie-Reperfusionsphasen werden seitdem als ischämische Präkonditionierung (*ischaemic preconditioning*, IPC) bezeichnet. Einige Jahre später folgte die Beobachtung, dass dieser schützende Effekt ebenfalls besteht, wenn Gewebe an anderer Stelle im Körper der konditionierenden Ischämie ausgesetzt ist als das Gewebe, welches die letale Ischämiephase erleidet [26]. Dieses Phänomen erhielt den Namen ischämische Fernpräkonditionierung (*remote ischaemic preconditioning*, RIPC) und wurde anfangs alternativ auf humorale oder neuronale Mechanismen zurückgeführt. Der protektive Effekt ist hierbei im Tiermodell durch Bluttransfusion von einem präkonditionierten Tier auf ein nicht präkonditioniertes Tier übertragbar und wirkt auch am transplantierten oder explantierten Herzen [27-29]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie stellte zudem fest, dass eine Depletion von Mikrovesikeln aus Langendorff-Effluat den protektiven Effekt des Effluats aufhebt [30].

Klinisch nutzbar gemacht wurde das Konzept durch die Entdeckung, dass empfindliche Organe wie das Herz auch geschützt werden, wenn die präkonditionierende Ischämie am Skelettmuskel stattfindet [31]. Seit 2006 findet RIPC klinische Anwendung am Menschen [32].

Der humorale Faktor, welcher RIPC vermittelt, und der wirkende Mechanismus bleiben weiterhin unzureichend verstanden. Eine Proteomstudie an Blut von fernpräkonditionierten Tieren konnte gegenüber Kontrolltieren keine differentiell exprimierten Proteine mit einer Größe von >8 kDa identifizieren [33]. Gestützt durch die Beobachtung, dass sich unter Naloxongabe die protektiven Effekte von RIPC weitgehend aufheben lassen, werden endogene Opioide als aussichtsreiche Kandidaten angesehen [34]. Die Wirkung von Opioiden könnte sich über eine Hemmung der Öffnung der mPTP entfalten [35]. Weiterhin diskutiert werden Adenosin und Bradykinin als Vermittler einer neuronalen Wirkung am Zielorgan, wobei für Bradykinin mit der Aktivierung von PKC_{epsilon} ein plausibler Mechanismus demonstriert wurde [36, 37]. Ebenfalls über PKC_{epsilon}-Aktivierung wirkt möglicherweise Calcitonin gene-related Peptid (CGRP).

Ab etwa 24 Stunden nach IPC wird ein starker ischämieprotektiver Effekt durch Heraufregulierung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) beschrieben, die Bedeutung dieses Effektes in der RIPC ist jedoch umstritten [38]. Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) bewirkt über Induktion antiapoptotisch wirkender Wachstumsfaktoren und Stabilisierung von p53 eine erhöhte Ischämietoleranz von Gewebe [39]. Durch pharmakologische Aktivierung von Hypoxie-induzierbarer Faktor-Prolyl-4-Hydroxylase (HIF-P4H), einem Enzym das HIF inaktiviert, konnte im Tierexperiment die protektive Wirkung von RIPC aufgehoben werden [40].

Im Zielorgan scheint RIPC eine günstige Veränderung des Genexpressionsmusters zu bewirken, wobei entzündungshemmende und anti-apoptotische Proteine vermehrt exprimiert werden [41]. Neben den aufgezählten epigenetischen Prozessen an der DNA, welche die Transkription beeinflussen, werden daher auch posttranskriptionelle Modifikatoren der Proteinexpression als Vermittler der protektiven Wirkung von RIPC diskutiert. Auf kleine RNA soll im Hauptteil dieser Arbeit gesondert eingegangen werden.

Tiermodell zum Ischämie-Reperfusionsschaden

Vielfach wird zur Untersuchung der Mechanismen, welche die schützende Wirkung der Präkonditionierung vermitteln, auf Tiermodelle zurückgegriffen. Ein solches Modell wurde auch in unserer Arbeitsgruppe etabliert [42]. Da die in dieser Arbeit eingesetzten Gewebeproben aus Versuchen mit diesem Tiermodell stammen, wird das Modell kurz dargestellt. Eine Übersicht bietet Abbildung 1.

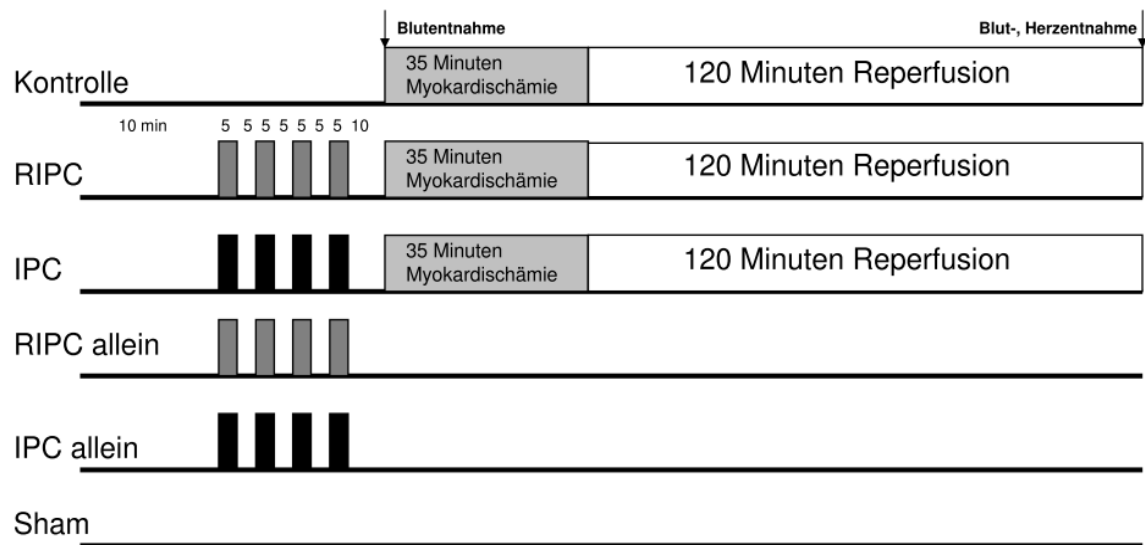


Abb. 1: Aufbau der Präkonditionierungs- und Ischämie-Reperfusion(I/R)-Studie, die dieser Arbeit zu Grunde liegt

IPC: (lokale) ischämische Präkonditionierung, RIPC: ischämische Fernpräkonditionierung

Männliche Wistar-Ratten wurden mittels intraperitonealer Pentobarbitalgabe narkotisiert und intubiert. Nach linksseitiger Thoraxeröffnung wurde eine Schlinge um den Ramus interventricularis anterior gelegt. Ischämische Präkonditionierung wurde lokal durch wiederholtes Zuziehen der Schlinge oder als RIPC durch Abpressen des Blutzuflusses an beiden Hinterläufen mittels einer Blutdruckmanschette erreicht. Die Myokardischämie wurde schließlich durch 35 Minuten andauerndes Zuziehen der Schlinge erreicht. Nach einer Reperusionszeit von 120 Minuten wurden die Versuchstiere getötet und die Herzen entnommen. Am Herz wurde die Größe des infarzierten Areals als Teil des Versorgungsgebietes des Ramus interventricularis anterior (area at risk, AAR) vermessen und ein Teil der AAR für weitere funktionelle Untersuchungen unmittelbar in flüssigen Stickstoff überführt.

In beiden Fällen (lokale und RIPC) zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung in der durchschnittlichen Größe des Infarktareals (Abbildung 2) [42].

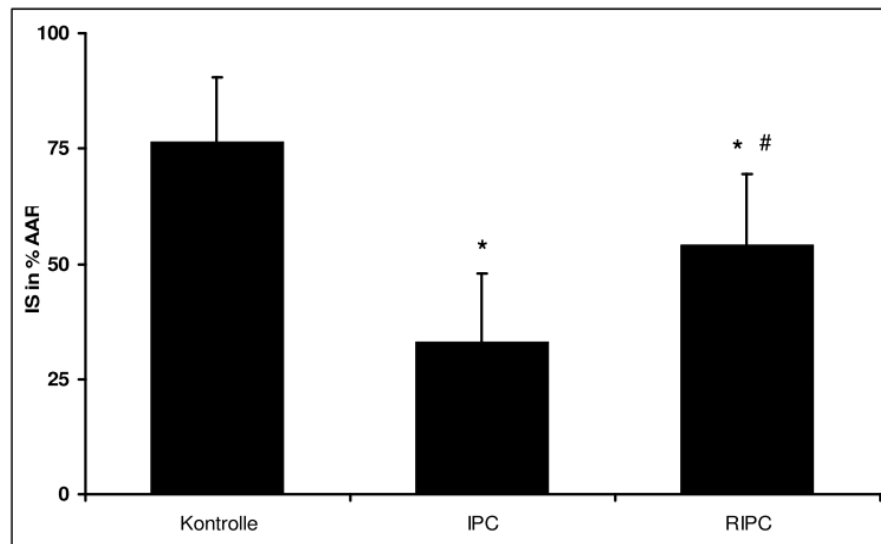


Abb. 2.: Infarktgrößen (IS) als prozentualer Anteil der AAR [42]

* $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ im Vergleich zur IPC-Gruppe

microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nichtkodierende Einzelstrang-RNA-Sequenzen, die durch Interaktion mit messenger RNA (mRNA) posttranskriptionell die Expression von Proteinen modulieren. Erstmals beschrieben wurde eine miRNA 1993 von der Arbeitsgruppe von Victor Ambros bei Untersuchungen an *C. elegans* [43]. Seitdem wurden über 700 verschiedene miRNAs beschrieben, die vermutlich mindestens ein Drittel der menschlichen Gene in ihrer Expression beeinflussen [44].

Biosynthese

Einen Überblick über die Biosynthese von miRNAs bietet Abbildung 3 [45].

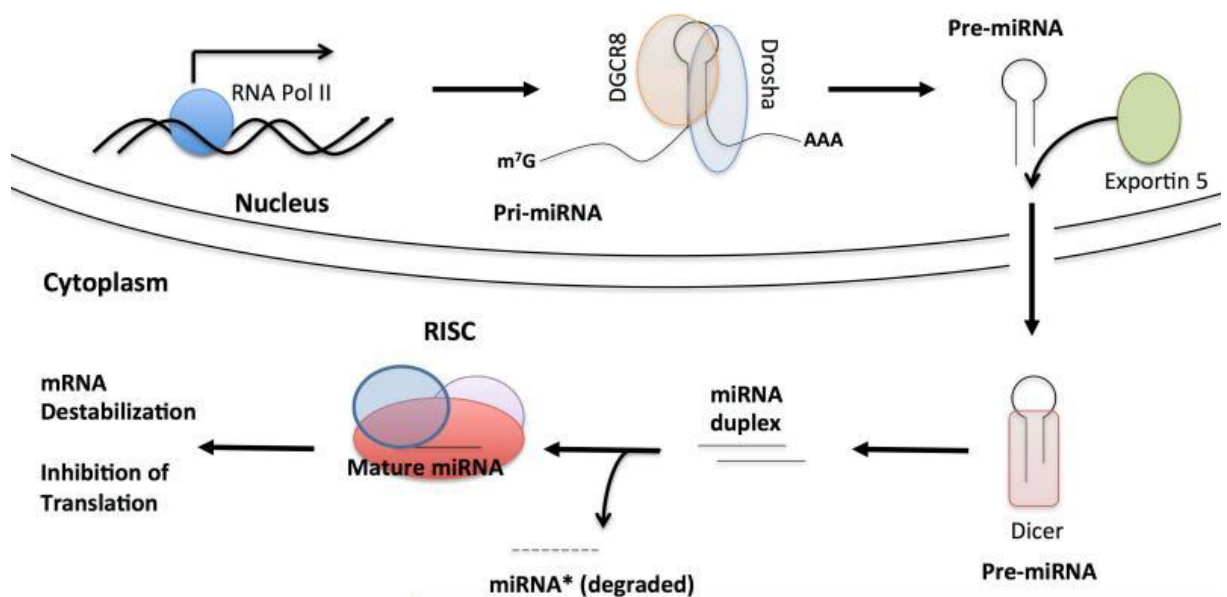


Abb. 3: Übersicht über die Biosynthese von miRNAs

Die RNA-Polymerase II bildet pri-miRNA, die von Drosha zu pre-miRNA prozessiert und aus dem Zellkern exportiert wird. Dicer bildet aus pre-miRNA reife miRNA. [45]

Die Promotorregionen für miRNAs gleichen überwiegend denen proteinkodierender Gene und häufig werden miRNAs im Laufe der Transkription von mRNA mit transkribiert. Die Expression von schätzungsweise ca. einem Viertel aller charakterisierten miRNAs wird jedoch über eigene einzigartige Promotorregionen gesteuert [46]. Ein beschriebener posttranskriptioneller Mechanismus der Expressionsregulation von miRNAs ist die Regulation von Proteinuntereinheiten des Drosha-Komplexes, bei deren Fehlen oder teilweise Fehlen große Anteile der miRNAs nicht prozessiert werden [47]. Für miRNAs, die aus dem Spleißen von mRNAs entstehen, gibt es einen alternativen Prozessierungsweg unter Umgehung von Drosha und mit direkter Verarbeitung durch Dicer [48]. Im Laufe der Prozessierung können miRNAs an beiden Enden editiert werden [49, 50].

Vollständig prozessierte, reife miRNAs haben intrazelluläre Halbwertszeiten von mindestens 20 Stunden und sind damit deutlich stabiler als mRNAs [51]. Schnellerer Abbau von miRNAs findet statt als Folge von Bindung an eine Ziel-mRNA oder durch Urydilierung am 3'-Ende, wobei für beide Mechanismen Ausnahmen beschrieben sind, die das Gegenteil bewirken [52, 53]. Ein weiterer Mechanismus, der zum Abbau führt,

ist komplementäre Paarung mit passgenauen, von Viren hergestellten RNAs, die auf diesem Weg gezielt Funktionen der Virusabwehr zu unterdrücken scheinen [54].

Funktionen von miRNAs

miRNAs inhibieren die Synthese der jeweiligen Proteine ihrer Ziel-mRNAs. Diese Funktion erfüllen sie sowohl durch die Induktion des Abbaus (Degradierung) der Ziel-mRNA als auch durch eine Hemmung der Translation. Sie modifizieren somit posttranskriptionell die Expression von Proteinen.

Nach Fertigstellung reifer miRNAs lagern sich diese im miRNA-induzierten Silencing Komplex (miRISC) mit mehreren Proteinen zusammen. Die miRNA dient im miRISC als Schablone, mit der komplementäre mRNA identifiziert wird [55]. Die Interaktion zwischen miRNA und Ziel-mRNA geschieht über komplementäre Basenpaarung. Perfekte Komplementarität der Stränge ist dabei im Tierreich selten und führt unmittelbar zur Degradierung der Ziel-mRNA [56]. Stattdessen sind typischerweise Basen 2-8 in der 5'-proximalen Seedregion komplementär zur 3'-UTR-Region der mRNA [56]. Die nachfolgende Degradierung wird von Proteinen der Argonaut-Familie (Ago), die Teil des miRISC sind, übernommen [55].

Die Translation kann sowohl im Stadium der Initiation als auch danach gehemmt werden, gemeinsam ist den Prozessen, dass mRNA, komplementäre miRNA und Ago-Proteine sich in als P-bodies bezeichneten Komplexen anreichern, die arm an Ribosomen und die Translation initiiierenden Faktoren sind [57].

Die Funktionen, die miRNAs mit der Modulation der Proteinexpression übernehmen, sind vielseitig. Dicer-defiziente Mausembryonen, die damit auch defizient an reifen miRNAs sind, verlieren alle Stammzellen und sterben frühzeitig ab [58]. Während eine Analyse der Verteilung durch Sequenzvergleich vorhergesagter Ziel-mRNAs nahelegt, dass miRNAs vor allem Zellentwicklung (inkl. Apoptose) und -adhäsion beeinflussen, sind dies so grundlegende zelluläre Prozesse, dass sie in jedem funktionalen System des Organismus auch lange nach der Embryonalzeit entscheidenden Einfluss haben [59].

Wenn mehrere miRNAs gleiche oder ähnliche Sequenzen in der Seedregion aufweisen und gleiche vorhergesagte Ziel-mRNAs haben, sich aber ansonsten unterscheiden, werden sie zu einer Familie zusammengefasst [60]. Innerhalb einer Familie sind miRNAs oft auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert.

Gewebespezifität und evolutionäre Konservierung

Die Expressionsmuster verschiedener miRNAs sind zwischen verschiedenen Geweben und während verschiedener Entwicklungsschritte in hohem Maße variabel [61, 62]. Einzelne Gewebe zeigen dabei charakteristische Signaturen. So sind beispielsweise im Vergleich 17 verschiedener Mausorgane im erwachsenen Herzen miR-24 und miR-133a besonders hoch exprimiert, miR-1, miR-29b und miR-101 kommen ausschließlich in Herz- und Skelettmuskel und miR-142-5p ausschließlich im erwachsenen Herzen vor [61]. Die miR-1-Familie umfasst bei der Maus die miRNAs mmu-miR-1a-1, mmu-miR-1a-2, mmu-miR-1b und mmu-miR-206.

Im Blutplasma kommen miRNAs sowohl frei als auch in Vesikeln vor und sind stabil [63]. Zellen schleusen gezielt miRNAs in Vesikeln aus, die sich nicht in ihrem eigenen Zytoplasma finden, und diese Vesikel sind in der Lage funktionsfähige miRNAs (und mRNAs) auf andere Zellen zu übertragen [64, 65]. Hierdurch kommen miRNAs als mögliche Substanzen in Frage, welche die Effekte ischämischer RIPC vermitteln.

Die für miRNAs kodierenden Sequenzen sind evolutionär hoch konserviert und Verlust von miRNAs im Laufe der Evolution ist selten, während bei der Entwicklung zu komplexeren Organismen neue Familien von miRNAs hinzugefügt und Funktionen bestehender miRNAs eher über die posttranskriptionale Editierung variiert werden [49]. Wegen der hohen evolutionären Konservierung von miRNAs müssen Zielregionen in mRNAs ebenfalls konserviert sein, wenn kein Funktionsverlust erfolgen soll. Aus diesem Grund wird die evolutionäre Konservierung der betreffenden mRNA-Region bei der Vorhersage von miRNA-Zielen berücksichtigt.

MiRNAs im Kontext von kardialer Ischämie und Präkonditionierung

Die Literaturrecherche zur Erhebung des aktuellen Wissenstands zur Rolle von miRNAs bei IPC und RIPC identifizierte 7 *Conference Abstracts* [66-72] und 19 publizierte Originalarbeiten [73-91] mit relevanten Ergebnissen. Die Methode und detaillierten Ergebnisse können dem veröffentlichten Übersichtsartikel entnommen werden [92], im Folgenden werden die Ergebnisse mit besonderer Relevanz für diese Arbeit noch einmal zusammengefasst. Tabellen 1, 2 und 3 im Anhang enthalten weitere Ergebnisse der einzelnen besprochenen Arbeiten.

Tabelle 1: Übersicht über veröffentlichte Arbeiten aus Zellkulturexperimenten [92]

Autor, Jahr	Design	hochregulierte miRNAs	herunterregulierte miRNAs	protektiver Mechanismus
Kim, 2009 [74]	primäre mesenchymale Rattenstammzellen, 6h Anoxie nach 3x 10 min Anoxie vs 6h Anoxie, gezielte miR-210-Messung	miR-210		auf HIF-1a-Erhöhung folgt miR-210-Überexpression, welche Casp8ap2-Expression und damit Apoptose verringert
Rane, 2009 [75]	neonatale Rattenkardiomyozyten, Anoxie nach 4x 1h Anoxie vs Anoxie (Länge der letalen Anoxie ungenannt), gezielte miR-199a-Messung		miR-199a	miR-199a hemmt die hypoxie-induzierte Bildung von HIF-1a; miR-199a-Verlust führt außerdem zur Akkumulation von Sirt-1, Sirt-1 wird zur hypoxie-induzierten Bildung von HIF-1a benötigt
Kim, 2012 [81]	primäre mesenchymale Rattenstammzellen, 6h Anoxie nach 2x 10 min Anoxie vs 6h Anoxie, gezielte miR-210-Messung	miR-210		miR-210-Transfektion führt zu gleicher erhöhter Hypoxietoleranz wie Präkonditionierung; in Co-Kultur mit Kardiomyozyten lokalisiert miR-210 zu Gap junctions, Kardiomyozyten zeigen niedrigere Casp8ap2-Expression
Kim, 2012 [82]	primäre mesenchymale Rattenstammzellen, 6h Anoxie nach 2x 10 min Anoxie vs 6h Anoxie, gezielte miR-210-Messung	miR-107		auf HIF-1a-Erhöhung folgt miR-107-Überexpression, welche PDCD10-Expression und damit Apoptose verringert; dies unabhängig vom miR-210/Casp8ap2-Mechanismus
Barile, 2015 (CA) [71]	Mesenchymale Stammzellen und kardiale Progenitorzellen	miR-210, miR-132, miR-146a		Exosomen aus beiden Zellreihen wirkten nach Injektion in

	aus humaner Primärkultur, Anoxie-Präkonditionierung, miRNA gemessen in Exosomen			Rattenmyokard protektiv gegen Ischämieschaden
He, 2016 (CA) [72]	H9c2-Zellen (embryonale Mauskardiomyozyten), 5h Anoxie nach 1x 10min Anoxie vs 5h Anoxie	miR133b-5p		Transfektion mit miR-133b-5p-Inhibitor blockiert Zellprotektion, Fas-Erniedrigung und verringerte Caspase-3 und -8 Aktivierung durch Präkonditionierung
Zhang, 2016 [91]	primäre mesenchymale Rattenstammzellen, Anoxie für 6, 12 oder 24h vs Normoxie		miR-206 in allen Hypoxiegruppen	Zellen mit niedrigen miR-206-Niveaus weisen mehr Pim-1, niedrigere Apoptoserate und besseres Überleben nach Injektion in Rattenherzen auf

HIF-1a: Hypoxia-induced factor 1 alpha, Casp8ap2: Caspase 8 associated protein 2, Sirt-1: Sirtuin 1, PDCD10: Programmed cell death protein 10

Tabelle 2: Übersicht über veröffentlichte Arbeiten aus Tierversuchen [92]

Autor, Jahr	Design	hochregulierte miRNAs	herunterregulierte miRNAs	protektiver Mechanismus
Dong, 2009 [73]	IPC+I/R vs I/R, miRNAs 6h nach I/R per Microarray	let-7e, miR-16, miR-21, miR-214, miR-320	miR-26a, miR-126, miR-352, miR-499	adenoviraler miR-21-Transfer bewirkt in vivo Reduktion der Apoptose
Li, 2009 (CA) [66]	Hinterlauf-RIPC vs Sham, miRNAs im Anschluss per Microarray	miR-206, miR-346	17 ungenannte	-
Yin, 2009 [76]	IPC+I/R vs I/R an Langendorffherzen, miRNAs im Anschluss per Northern Blot	miR-1, miR-21, miR-24		Injektion isolierter Gesamt-miRNA in Herzen in vivo, Nachweis der Aufnahme mittels qPCR, I/R, Proteinmessung nach 4h (Erhöhung von eNOS, HSF-1 und HSP70 gegenüber Kontrolle ohne Injektion), verringerte Infarktgröße 24h nach I/R
Cheng, 2010 [77]	IPC+I/R vs I/R, Messung von miR-1 im Plasma im Anschluss		miR-1	miR-1-Menge im Plasma korreliert mit Infarktgröße, in anschließender Observationsstudie an Menschen bestätigt
Cheng, 2010 [78]	IPC+I/R vs I/R, miRNAs 3h nach I/R per Microarray	let-7b, let-7c, let-7e, miR-15b, miR-16, miR-21, miR-22, miR-92a, miR-151, miR-195, miR-214, miR-320, miR-361	miR-26a, miR-26b, miR-27a, miR-27b, miR-30a, miR-30b-5p, miR-30c, miR-125a-5p, miR-126, miR-322, miR-352, miR-499	miR-21-Knockdown hebt die protektive Wirkung von IPC durch Aufhebung der Verringerung von Apoptose auf
Chun, 2010 (CA) [67]	I/R an Langendorffherzen			infundierte miR-471 verringert I/R-Schaden
Tranter, 2011 [79]	IPC+I/R vs I/R, miRNAs 24h nach I/R per qPCR von 12 vorhergesagten miRNAs		miR-378*, miR-711	beide miRNAs reduzieren endogene HSP70.3-Niveaus
Duan, 2012 [80]	RIPC (Femoralarterie vor Herzentnahme)+I/R vs IPC+I/R vs I/R, miRNAs 1h nach I/R per qPCR	IPC-Gruppe: miR-1 und miR-21	RIPC-Gruppe: miR-1	in beiden präkonditionierten Gruppen Verringerung von HSP70, PDCD4 und Bax; Bcl-2 unverändert; verringerte Apoptose
Varga, 2012 [69]	IPC+I/R vs I/R, miRNAs 2h nach I/R per Microarray	10 differentiell exprimierte miRNAs entdeckt (miR-320, miR-139-5p und miR-139-3p)		
Wang, 2012 [83]	IPC vs Sham, miRNAs im Anschluss per Microarray	miR-142-3p, miR-144, miR-290-5p, miR-294*, miR-451, miR-551b, miR-706, miR-762, miR-763	miR-1, miR-27b, miR-133a*, miR-200a, miR-297b-3p, miR-466a-5p, miR-466b-5p, miR-466i, miR-467b*, miR-	kein protektiver Effekt von IPC auf nachfolgenden I/R-Schaden bei miR-144/451-KO-Mäusen; IPC reduziert Rac-1-Expression in WT-Mäusen, Rac-1-Inhibition in KO-Mäusen stellt die

			574-5p, miR-675-5p, miR-805	protektive Wirkung von IPC wieder her
Brandenburger, 2014 [84]	Hinterlauf-RIPC+I/R vs I/R, miRNAs 2h nach I/R per Microarray	miR-30e*, miR-324-5p, miR-484	let-7f, miR-1, miR-128a, miR-200b, miR-221, miR-351, miR-500, miR-667	miR-1 senkt BDNF-Menge in co-transfizierter Zellkultur, aber keine differentielle Expression in vivo
Kukreja, 2014 (CA) [70]	IPC vs Ko, miRNAs nach unbestimmter Zeit mit unbestimmten Verfahren	miR-1, miR-21, miR-24		Behandlung von Herzen mit diesen miRNAs vermittelt protektive Wirkung, die sich durch miR-21-Inhibition wieder aufheben ließ
Li, 2014 [85]	Hinterlauf-RIPC+I/R vs I/R, miRNAs 1h nach I/R per Microarray	miR-19a, miR-19b, miR-32, miR-96, miR-142-5p, miR-144, miR-200c, miR-293*, miR-323-3p, miR-341:9.1, miR-375, miR-489, miR-689, miR-693-5p, miR-707	miR-27a*, miR-148a*, miR-203*, miR-302*, miR-682, miR-712	miR-144 im Plasma nach RIPC erhöht; in vivo Injektion von Mäusen mit miR-144 hat die gleiche protektive Wirkung wie RIPC; nach Injektion verringerte mTOR-Expression im Herz, eine Stunde nach Injektion erhöhte phospho-Akt, phospho-GSK3b und phospho-p44/42 MAP-Kinase
Varga, 2014 [87]	IPC+I/R vs I/R, miRNAs 2h nach I/R per Microarray	miR-125b*, miR-139-3p, miR-139-5p, miR-188, miR-192, miR-212, miR-320, miR-532-3p		In vitro Transfektion mit miR-125b* oder miR-139-5p wirkt protektiv gegen Hypoxie-induzierten Zelluntergang bei Kardiomyozyten

IPC: Ischämische Präkonditionierung, I/R: Ischämie und Reperfusion, RIPC: Ischämische Fernpräkonditionierung, eNOS: endothelial nitric oxide synthase, HSF-1: Heat shock factor 1, HSP: Heat shock protein, qPCR: quantitative (real-time) PCR, PDCD4: Programmed cell death protein 4, BDNF: Brain-derived neurotrophic factor, mTOR: mechanistic Target of Rapamycin, GSK3b: Glycogen synthase kinase 3 beta

Tabelle 3: Übersicht über veröffentlichte Arbeiten aus klinischen Studien am Menschen [92]

Autor, Jahr	Design	hochregulierte miRNAs	herunterregulierte miRNAs	protektiver Mechanismus
Slagsvold, 2014 [86]	RIPC (Arm)+Aortenligatur vs Aortenligatur, miRNA aus Myokardbiopsien 15min nach Reperfusion per Mikroarray	keine differenziell exprimierten miRNAs		Mitochondriale Respiration in der Kontrollgruppe eingeschränkt und in der RIPC-Gruppe erhalten; erhöhte Akt-Phosphorylierung in RIPC
Krogstad, 2015 [88]	RIPC (Arm) + Koronararterienbypass vs Koronararterienbypass, miRNA aus Plasma 30 min nach RIPC per Mikroarray	keine differenziell exprimierten miRNAs		

Hu, 2016 [89]	RIPC (Bein) + Aortenligatur vs Aortenligatur, Beginn RIPC erst nach Ligatur, miRNA aus Myokardbiopsien 5min nach Reperfusion per Mikroarray	miR-21, miR-24, miR-1275	miR-1, miR-17, miR- 20a, miR-130a, miR- 140-5p, miR-195	Erhöhte Expression von Bcl-2
Pryds, 2016 [90]	RIPC vs Kontrolle in Patienten mit induzierbarer Myokardischämie bei KHK, miRNA aus Plasma nach RIPC	miR-144		

IPC: Ischämische Präkonditionierung, I/R: Ischämie und Reperfusion, RIPC: Ischämische Fernpräkonditionierung, KHK: Koronare Herzkrankheit

miR-1

Die wie zuvor beschrieben skelett- und herzmuskelspezifische miR-1 wird in 6 Studien an Tieren [70, 76, 77, 80, 83, 84] und einer am Menschen [89] als differentiell exprimiert nach ischämischer Präkonditionierung beschrieben. In RIPC-Studien war miR-1 im Herzgewebe nach Präkonditionierung immer niedriger exprimiert als ohne Präkonditionierung.

Bei lokaler ischämischer Präkonditionierung zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse mit Herauf- und Herabregulierung der miR-1. Dies scheint nicht von der nach Präkonditionierung oder Ischämie vergangenen Zeit abhängig zu sein.

Für die vorhergesagten Bindungspartner Bcl-2 und Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) zeigten sich ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse [80, 84, 89]. Eine Studie, die miR-1 bei lokaler Präkonditionierung erhöht und bei RIPC erniedrigt fand, zeigte in beiden Gruppen übereinstimmend eine Verringerung von Heat-Shock-Protein(HSP)70, Programmed cell death protein (PDCD)4 und Bcl-2-associated X protein (Bax) und eine verminderte Apoptose [80].

Nach Ergebnissen einer Studie scheint die miR-1-Menge im Plasma bei Ratten und Menschen positiv mit der Infarktgröße am Herzen zu korrelieren [77].

miR-144

In zwei Tierversuchen (einmal RIPC, einmal lokal) zeigte sich im Myokard und übereinstimmend dazu im Plasma nach RIPC im gleichen Tierversuch und in einer klinischen Studie am Menschen eine höhere Expression von miR-144 [83, 85, 90].

miR-144-Knockoutmäuse reagierten im Gegensatz zu Wildtyptieren auf lokale Präkonditionierung nicht mit Verminderung von Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac)-1, Rac-1 Inhibition stellte in Knockoutmäusen die Möglichkeit der Protektion wieder her [83]. In vivo-Injektion reiner miR-144 hatte im Tierexperiment die gleiche protektive Wirkung wie RIPC und führte zu einer Verminderung von mammalian target of rapamycin (mTOR) und verminderten Phosphorylierung von Proteinkinase B (Akt), Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3b) und p44/42 Mitogen-activated protein (MAP-)Kinase [85].

mir-206

In Rattenprimärkulturzellen wurde eine verminderte Expression von miR-206 nach mindestens 6stündiger Hypoxie gezeigt, die mit einer vermehrten Pim-1-Expression und verminderter Apoptose einherging [91]. Im Tierversuch zeigte Rattenmyokard nach ischämischer Präkonditionierung eine verringerte miR-206-Expression [66].

Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage behandelt, ob ein miRNA-vermittelter Mechanismus für die protektive Wirkung von RIPC auf das Herzgewebe während I/R bedeutsam ist.

Die folgenden Arbeitsziele wurden hierzu behandelt:

1. Zeigt sich im Herzgewebe nach RIPC und I/R ein differentielles miRNA-Expressionsmuster und lassen sich differentiell exprimierte miRNAs verifizieren?
2. Was sind mögliche Bindungspartner der identifizierten miRNAs, die eine protektive Wirkung vermitteln könnten?
3. Lässt sich eine Interaktion zwischen regulierter miRNA und identifizierter Zielstruktur nachweisen?

II. Material und Methoden

Allgemeiner Laborbedarf

Nicht im Einzelnen näher bezeichnete Laborchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Sigma oder Roth bezogen. Gelkammern für Elektrophoresetechniken der Firma BioRad (Hercules, CA) und eine Spannungsquelle der Firma amersham pharmacia Biotech (Amersham, UK) wurden verwendet.

Molekularbiologische Techniken

RNA-Isolation und Qualitätskontrolle

Homogenisierung von Herzgewebe

Das zuvor beschriebene Tierexperiment wurde unter dem Aktenzeichen 8.87-50.10.37.09.148 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen genehmigt. Die gewonnenen Herzgewebeproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C gelagert. Zur RNA-Isolation wurden die Herzen in flüssigen Stickstoff überführt. Im tiefgefrorenen Zustand wurden Stücke von etwa 150g abgeteilt und durch Zertrümmern mit einem Hammer in ebenfalls in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Geräten (nach dem Prinzip eines passgenauen Stahlstößels in einem Stahlmörser) zerkleinert. Das entstandene Pulver wurde umgehend in Reaktionsgefäße gegeben, in denen 1 ml Trizol-Reagens (invitrogen, Carlsbad, CA) vorgelegt worden war. Eine weitere Homogenisierung fand durch Zerkleinern mit einem Gewebehomogenisierer statt. Eine kurze Reinigung der verwendeten Geräte fand nach Material von jedem Tier, eine gründliche jeweils zwischen der Aufarbeitung von Material verschiedener Gruppen statt.

Zu den homogenisierten Proben wurden jeweils 200µl Chloroform hinzugegeben. Chloroform, Zellmaterial und Trizol-Reagens wurden durch Schütteln gemischt und drei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Proben bei 12000g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die oberste der drei entstandenen Phasen abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und

durch Vortexen mit 500µl Isopropanol gemischt. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde diese Mischung bei 12000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, zum Pellet wurde 1ml 70% Ethanol hinzugeben. Das Pellet wurde durch kurzes Vortexen abgelöst, dann bei 7600g und 4°C für 10 Minuten wieder herabzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes und Hinzugeben von wiederum 1ml 70% Ethanol wurde der letzte Schritt einmal wiederholt. Danach wurde der Überstand vorsichtig und vollständig abgenommen, das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 100µl RNase-freiem Wasser (bei RNA aus Herzgewebe) bei 60°C aufgelöst und umgehend auf Eis gestellt.

Messung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop

Im Anschluss wurde die Menge der gewonnenen RNA photometrisch durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt. Dazu wurde jeweils ein 1µl großer Tropfen der nochmals gründlich gemischten RNA-Isolate auf die Messvorrichtung des NanoDrop-Gerätes (Thermo Fisher, Waltham, MA) gegeben. Hierbei wurden für jede Probe Doppelbestimmungen durchgeführt, um Fehler wegen nicht vollständig gelöster RNA auszuschließen. Um einen Einfluss von im Rahmen der Isolation nicht entfernten Verunreinigungen auf die Folgereaktionen auszuschließen, wurden nur Proben mit 260nm zu 280nm Absorptionsquotienten zwischen 1,8 und 2,2 weiterverwendet.

RNA-Agarosegel

Zur Sicherstellung, dass die isolierte RNA nicht degradiert war, wurden jeweils 2,5µg der isolierten RNA auf ein 2%-Agarosegel gegeben und in TAE-Puffer aufgetrennt. Als Ladepuffer wurden 5µl Blue/Orange-Ladepuffer der Firma Promega zu 15µl in Wasser verdünnter RNA hinzugefügt. Für weitere Reaktionen wurde nur isolierte RNA verwendet, bei denen nach Ethidiumbromidfärbung scharfe Banden der ribosomalen RNA auf dem Gel erkennbar waren.

Zusammenfassend wurde also eine mehrfache Qualitätskontrolle der isolierten RNA durchgeführt. Einerseits wurde die Reinheit durch Ermittlung des 260/280nm-Quotienten in der photometrischen Konzentrationsbestimmung ermittelt, andererseits wurde eine erfolgte Degradation durch Darstellung intakter ribosomaler RNA

ausgeschlossen. Des Weiteren stellt die Verwendung der Kombination von Stem-loop-Primern und TaqMan-Sonden (Applied Biosystems, Foster City, CA) sicher, dass nur die spezifische Zielsequenz in der qPCR detektiert wird.

RNA-Micro-Arrays

Um bei der Vielzahl der bekannten miRNAs Kandidaten zu identifizieren, die für die Fragestellung von Bedeutung sein könnten und danach eine Theorie zu entwickeln, die einer genaueren Überprüfung unterzogen würde, wurde ein Screening auf Expressionsveränderungen der miRNAs mittels eines miRNA-Arrays durchgeführt. Genutzt wurden Taqman Array MicroRNA Cards von Applied Biosystems (Foster City, CA) für Mäuse und Ratten. Für die Erstellung eines Profils aller angebotenen miRNAs wurden jeweils beide Karten (A und B) genutzt. Eingesetzt wurden die Gruppen Sham, RIPC, Infarkt und Infarkt nach RIPC jeweils vom letzten Zeitpunkt (120 Minuten Reperfusion). Die isolierte RNA der einzelnen Tiere dieser Gruppen wurde entsprechend der im NanoDrop gemessenen Konzentrationen an gesamt-RNA so gepoolt, dass RNA der einzelnen Tiere zu gleichen Teilen für die folgenden Reaktionen eingesetzt wurde. Der Gesamt-RNA-Pool jeder Gruppe enthielt 100 ng Gesamt-RNA pro μl .

Die Reverse Transkription (RT) aller untersuchten miRNAs wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit Megaplex Primer Pools der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA) durchgeführt. Alle beschriebenen Chemikalien stammten aus dem TaqMan MicroRNA Reverse Transkription Kit von Applied Biosystems (Foster City, CA). Da jeweils beide Arraykarten genutzt wurden, wurden für jede Gruppe zwei separate Ansätze (A und B entsprechend den TaqMan Assays auf den qPCR-Karten) im gleichen Lauf eingesetzt. Das mit dieser Methode entstehende cDNA-Profil entspricht dem miRNA Profil in der eingesetzten Probe [93]. Jeder Ansatz enthielt 3 μl gepoolte gesamt-RNA der entsprechenden Gruppe und 4,5 μl Reaktionsmischung, bestehend aus

- 0,8 μl des entsprechenden Primer-Pools A bzw. B
- 0,2 μl 100 μM dNTPs
- 1,5 μl MultiScribe Reverse Transkriptase mit einer Aktivität von 50 U/ μL
- 0,8 μl 10x RT-Puffer

- 0,9µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,1µl RNase Inhibitor mit einer Aktivität von 20 U/µL
- 0,2µl nukleasefreies Wasser.

Die Reaktionsmischung wurde als MasterMix angesetzt, durch mehrfaches Invertieren gemischt und jeweils in Wells einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurde gesamt-RNA wie oben beschrieben zu jedem Well hinzugegeben, die Platte mit Folie versiegelt und durch kurzes Anzentrifugieren bei 4°C wurde sichergestellt, dass RNA und Reaktionsmischung vollständig vermischt wurden. Alle beschriebenen Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Platte wurde im Thermocycler mit 40 Zyklen à 2 Minuten 16°C, 1 Minute 42°C und 1 Sekunde 50°C schließlich einmalig 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung am gleichen Tag bei -20°C gelagert.

Für die anschließende qPCR wurden je Karte 6µl der entstandenen cDNA mit 444µl RNase-freiem Wasser und 450µl TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG zusammengegeben und durch vortexen gemischt. Jeweils 100µl des entstandenen Mastermix wurden in die acht Einfüllöffnungen der Arraykarte gegeben. Durch zentrifugieren in einer Ausschwingrotorzentrifuge für 2 Minuten bei 1200 rpm konnte in allen Fällen wie vom Hersteller beschrieben, eine gleichmäßige, aber nicht vollständige, Entleerung der Einfüllöffnungen erzielt werden. Die Versiegelung der Karten erfolgte danach mit der hierfür vorgesehenen Versiegelungshilfe der Herstellerfirma. Mittels einer handelsüblichen Schere wurden anschließend die Einfüllöffnungen abgetrennt. Die Programmierung der für die Arrays benötigten qPCR-Läufe erfolgte durch Import der Standardversuchsaufbaudaten von der mitgelieferten Hersteller-CD. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Real-Time StatMiner Software (Integromics, Granada, Spanien) durch die Core Unit for Integrated Functional Genomics am Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF) an der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Reverse Transkription

Außer im Fall der miRNA-Arrays (s. dort) wurden alle folgenden Reaktionen für jede gewonnene Probe einzeln durchgeführt.

Zum Umschreiben der isolierten RNA in cDNA für die weitere Arbeit wurden drei verschiedene Verfahren verwendet, je nachdem, welchem weiteren Zweck die cDNA zugeführt werden sollte. cDNA für die Real-Time PCR wurde für die Untersuchung von miRNAs mit spezifischen Primern und für die Untersuchung von mRNAs mit dem High-Capacity-RNA-to-cDNA-Kit von Applied Biosystems (Foster City, CA) gewonnen.

Als spezifische RT-Primer für die miRNAs wurden die im entsprechenden TaqMan-Assay mitgelieferten Primer verwendet. Als Ausgangsmenge an RNA wurden 10ng Gesamt-RNA eingesetzt. Hierfür wurde ein Teil der isolierten Gesamt-RNA zuvor auf einer Konzentration von 2ng/ μ l mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Ein Reaktionsansatz von insgesamt 15 μ l in einem 0,2 μ l Reaktionsgefäß enthielt neben den 5 μ l RNA noch folgende Komponenten:

- 1,5 μ l 10x RT-Puffer
- 0,15 μ l dNTPs 100mM
- 0,19 μ l RNase-Inhibitor
- 1 μ l MultiScript Reverse Transkriptase
- 4,16 μ l RNase-freies Wasser
- 3 μ l spezifische RT-Primer

Die Komponenten außer der RNA und den Primern wurden als Mastermix angesetzt, von dem auf jeden Reaktionsansatz 7 μ l gegeben wurden. Die aufgeführten Reagenzien stammten aus dem RT-Kit von Applied Biosystems. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt, die Komponenten wurden durch kurzes Vortexen gemischt und mittels Anzentrifugieren mit einer Minisch zentrifuge blasenfrei an den Boden des Reaktionsgefäßes gebracht. Die Reverse Transkription wurde in einem Helena Biosciences Phoenix Thermocycler mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 30 Minuten 16° C, 30 Minuten 42° C und 5 Minuten 85° C. Die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80° C eingefroren.

Für die Reverse Transkription von mRNAs wurde der High-Capacity-RNA-to-cDNA-Kit von Applied Biosystems (Foster City, CA) verwendet. In jedem Ansatz wurde 1µg Gesamt-RNA eingesetzt. Ein Teil der isolierten RNA wurde hierfür auf eine Konzentration von 0,5µg/µl verdünnt. Jeder 20µl-Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 2µl verdünnter RNA, 4µl Mastermix wie im Kit enthalten und 14µl RNase-freiem Wasser. Da der eingesetzte Mastermix bereits unspezifische Primer enthält, konnte mit diesem Verfahren cDNA für alle im Folgenden untersuchten Gene gewonnen werden. Die Reaktionen wurden auf Eis in 0,2µl-Reaktionsgefäßen angesetzt und wie im vorigen Absatz beschrieben gemischt. Die Reverse Transkription wurde in einem Thermocycler mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 Minuten 25° C, 30 Minuten 42° C und 5 Minuten 85° C.

quantitative PCR mit Taqman-Assays

Durchführung

Die Bestätigung der in den Arrays gefundenen Ergebnisse für miR-1 (assay ID: 4427975), sowie die Untersuchung eines Effektes auf die Menge der Kandidatengen-messenger-RNA für Bcl-2 (assay ID: 4331182_m1) wurden quantitativ durch Real-Time PCR mit TaqMan-Assays der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA) durchgeführt. Als Referenzgen wurde für miRNAs U6 (assay ID: 001973) und für mRNA GAPDH (assay ID: 4331182_g1) gewählt. Für mRNA und miRNA wurde die qPCR nach dem gleichen Schema durchgeführt.

In beiden Fällen wurde zur Sicherstellung der vergleichbaren PCR-Effizienz zwischen Ziel- und Referenzgen und zur Feststellung einer cDNA-Verdünnung, die Ct-Werte in einem möglichst günstigen Bereich (zwischen 20 und 30) hervorbringen sollte, zuerst eine Platte mit unterschiedlich verdünnter cDNA gemessen. In beiden Fällen wurde schließlich eine Verdünnung von 1:100 gewählt.

Material aller Tiere einer Gruppe wurde jeweils auf einer 96-Well-Platte aufgetragen, wobei für jedes Tier Triplikate angelegt wurden. Ziel- und Referenzgen wurden für jedes Tier auf derselben Platte bestimmt.

In jedem Fall wurden DEPC-Wasser und TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG zusammengegeben, in den Wells der Reihe H vorgelegt und mit einer Mehrkanalpipette in die Reaktionswells gegeben. Der entsprechende TaqMan-Assay und die passende cDNA wurden danach einzeln hinzugegeben. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis ausgeführt. Um die Sonden in den TaqMan-Assays möglichst kurz einer Anregung durch Licht auszusetzen, wurden sie erst kurz vor der Verwendung aufgetaut. Beim Pipettieren wurde bei Assays und cDNA für jedes Well eine neue Spitze verwendet und genau einmal auf und ab pipettiert, um nicht durch Unterschiede im Adhäsionsverhalten der Reagenzien hohe Abweichungen innerhalb der Triplikate hervorzurufen. Nach der Zugabe aller Komponenten wurden die Platten mit Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und dann umgehend in den Thermocycler gegeben.

Pro Reaktionsansatz wurden dabei folgende Mengen verwendet:

miRNA: 10µl MasterMix + 8µl Wasser + 1µl verdünnte cDNA + 1µl Assay

mRNA: 10µl MasterMix + 5µl Wasser + 4µl verdünnte cDNA + 1µl Assay

Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert:

Standardmodus, 20µl Reaktionsvolumen, initial 10 Minuten 95°C, dann 40 Zyklen 15s 95°C und 60s 60°C.

Auswertung

Die relative Expression wurde mithilfe der ddCT-Methode ausgedrückt, der aus der Differenz zwischen den Ct-Wert-Differenzen von Ziel- und Referenzgen in zwei Proben den Exponenten zur Basis 2 bildet. (Die Basis 2 drückt aus, dass sich die Menge an vorliegender DNA in einer PCR im optimalen Reaktionsbereich in jedem Zyklus verdoppelt). Der ddCT-Wert gibt demnach an, um ein wie viel-faches sich Ausgangsmenge der Zielsequenz in einer Probe im Vergleich zu einer anderen befindet. Da ddCT-Werte zwar einen anschaulichen Anhaltspunkt für mögliche Veränderungen bieten, aber für den Vergleich von Gruppen noch weiter statistisch verarbeitet werden müssen und Abweichungen nicht darstellen können, wurden die Rohdaten mit der frei zugänglichen internetbasierten Software REST2009 für die Analyse von Genexpressionsunterschieden verarbeitet [94].

Identifizierung von Zielgenen mittels Datenbankrecherche

Die im Internet frei zugängliche Datenbank TargetScanMouse 7.1 (www.targetscan.org) wurde genutzt, um mögliche Zielgene der miR-1 zu identifizieren. Nach Auswahl des Organismus „Ratte“ erfolgte zunächst der Abgleich möglicher Bindungsstellen im Bcl-2-Gen (ENSMUST00000112751.1) gegen die miR-1-3p/206-3p-Familie.

Danach wurden vorhergesagte Bindungspartner für alle miRNAs abgefragt, die neben dieser Arbeit in weiteren während der Literaturrecherche identifizierten Arbeiten als differentiell exprimiert nach ischämischer Präkonditionierung beschrieben wurden. Die 10 wahrscheinlichsten Bindungspartner wurden mittels manueller Durchsicht der Gene Reference into Function (GeneRIF)-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) auf eine mögliche Einordnung in Mechanismen der Zellschädigung beim Reperfusionsschaden untersucht.

Die gleichen Schritte wurden für die übrigen zwischen den Gruppen RIPC + I/R und I/R differentiell exprimierten miRNAs durchgeführt.

Die TargetScan 7.1-Software nutzt zur Vorhersage von Bindungspartnern ein lineares Regressionsmodell mit 14 Parametern (context++ score), welche Eigenschaften der miRNA, der möglichen Ziel-mRNA und der Bindungsstelle sind. Diese Eigenschaften sind beispielsweise wie stark die Bindungsstelle evolutionär konserviert ist, wie wahrscheinlich es ist, dass die Region um die Bindungsstelle ungefalted ist, die Länge der 3'-UTR-Region und die vorhergesagte Stabilität der Paarung zwischen Bindungsstelle und miRNA-Seedregion. Die Entwicklung und Validierung des Modells sind publiziert [95].

III. Ergebnisse

RNA-Micro-Arrays

In der folgenden Tabelle 4 sind die im Array zwischen RIPC mit nachfolgender Ischämie und Reperfusion gegenüber Ischämie und Reperfusion ohne vorherige RIPC als differentiell exprimiert gemessenen microRNAs nach Stärke des Unterschieds sortiert aufgeführt. Vollständige Ergebnisse mit Messdaten der Duplikate finden sich in Tabelle I im Anhang.

Tabelle 4: Zwischen RIPC + I/R und I/R differentiell exprimierte microRNAs im MicroArray

miRNA	ddCt	p-Wert	RIPC+I/R Mittelwert	I/R Mittelwert
mmu-miR-135a-4373140	9.23881	1.54E-226	20.625915	11.387105
mmu-miR-423-5p-4395451	8.21557	1.42E-179	20.625915	12.410345
mmu-miR-93*-4395250	7.90832	1.52E-166	20.607825	12.699505
mmu-miR-708-4395452	7.70235	4.36E-158	20.625915	12.923565
mmu-miR-342-5p-4395657	7.36808	7.78E-145	20.625915	13.257835
mmu-miR-99b*-4395307	7.24754	3.36E-140	20.607825	13.360285
mmu-miR-184-4373113	4.640085	5.93E-87	17.55863	12.918545
mmu-miR-141*-4395643	3.925525	1.94E-42	16.726435	12.80091
mmu-miR-135b-4395372	3.785885	1.66E-58	16.64623	12.860345
mmu-miR-136-4395641	2.402535	1.40E-24	15.75451	13.351975
mmu-miR-148b-4373129	2.083945	6.87E-19	14.48133	12.397385
mmu-let-7f-4373164	1.863825	2.03E-15	11.63045	9.766625
mmu-miR-760-4395439	1.69376	5.40E-13	14.118805	12.425045
mmu-miR-678-4381076	1.51008	1.26E-10	13.935105	12.425025
mmu-miR-455*-4378098	1.450145	6.53E-10	14.39412	12.943975
mmu-miR-200b-4395362	1.436345	9.45E-10	13.31191	11.875565
mmu-miR-221-4373077	1.431425	1.08E-09	11.69326	10.261835
mmu-miR-1-4395333	1.343345	1.05E-08	5.1091	3.765755
mmu-miR-142-5p-4395359	1.289675	3.94E-08	14.22431	12.934635
mmu-miR-181a-1*-4373086	1.17851	5.17E-07	14.477505	13.298995

rno-miR-1-4395765	1.165435	6.89E-07	3.11966	1.954225
mmu-miR-667-4386769	1.163365	7.21E-07	12.5993	11.435935
mmu-miR-26b*-4395555	1.120895	1.80E-06	14.431845	13.31095
mmu-miR-500-4395736	1.116015	2.00E-06	13.5868	12.470785
mmu-miR-128a-4395327	1.099495	2.82E-06	13.57724	12.477745
mmu-miR-335-5p-4373045	1.077105	4.47E-06	14.42127	13.344165
mmu-miR-351-4373345	1.010205	1.68E-05	12.60601	11.595805
mmu-let-7a-4373169	0.942925	5.91E-05	10.62028	9.677355
mmu-miR-29c*-4381131	0.881875	1.72E-04	12.936705	12.05483
mmu-miR-224-4395683	0.841315	3.39E-04	12.58441	11.743095
mmu-miR-345-5p-4395658	0.831205	3.99E-04	12.59493	11.763725
mmu-miR-107-4373154	0.820645	4.73E-04	13.54659	12.725945
Y1-4386739	0.809755	5.62E-04	8.3083125	7.4985575
mmu-miR-331-5p-4395344	0.798025	6.76E-04	12.14782	11.349795
mmu-miR-384-5p-4395732	0.789505	7.71E-04	12.13122	11.341715
mmu-let-7c-4373167	0.755855	1.28E-03	10.1073	9.351445
mmu-miR-181c-4373115	0.754395	1.31E-03	12.79568	12.041285
mmu-miR-877*-4395678	0.745425	1.50E-03	11.31618	10.570755
mmu-miR-322*-4395636	0.720845	2.14E-03	10.12291	9.402065
rno-miR-17-3p-4395779	0.695095	3.07E-03	12.60658	11.911485
rno-miR-352-4381119	0.69165	3.22E-03	12.281955	11.590305
mmu-miR-690-4381086	0.657335	5.11E-03	7.040685	6.38335
mmu-miR-378*-4373024	0.645045	6.00E-03	10.93634	10.291295
mmu-miR-685-4386748	0.639685	6.43E-03	7.00018	6.360495
mmu-miR-322-4378107	0.636425	6.71E-03	8.57453	7.938105
mmu-miR-126-5p-4373269	0.624695	7.79E-03	5.58181	4.957115
rno-miR-28*-4395557	0.608345	9.56E-03	9.49867	8.890325
mmu-miR-202-3p-4373311	0.594725	1.13E-02	13.5089	12.914175
mmu-miR-15a-4373123	0.592625	0.011590017	9.59036	8.997735
mmu-miR-301b-4395730	0.589645	1.20E-02	11.56996	10.980315
mmu-miR-146a-4373132	0.587505	0.012329254	5.58124	4.993735

mmu-miR-33*-4395247	0.587095	1.24E-02	13.58358	12.996485
mmu-miR-151-3p-4373304	0.579975	1.35E-02	10.93423	10.354255
rno-miR-30d*-4395416	0.574535	1.44E-02	13.52901	12.954475
mmu-miR-27a*-4395556	-0.61015	9.35E-03	10.257835	10.867985
mmu-miR-467b*-4381092	-0.671045	4.26E-03	12.92062	13.591665
mmu-miR-326-4373335	-0.684555	3.55E-03	12.40205	13.086605
mmu-miR-208-4373091	-0.733155	1.79E-03	12.35609	13.089245
rno-miR-99a*-4395774	-0.764645	1.13E-03	12.61539	13.380035
mmu-miR-323-3p-4395338	-0.929965	7.45E-05	12.90103	13.830995
mmu-miR-324-5p-4373052	-1.226945	1.73E-07	12.11426	13.341205
mmu-miR-484-4381032	-1.431575	1.07E-09	6.92441	8.355985
mmu-miR-425*-4373202	-1.463135	4.59E-10	12.83543	14.298565
rno-miR-24-1*-4395780	-1.668115	1.20E-12	12.43344	14.101555
rno-miR-463-4395751	-2.694935	1.67E-30	12.15795	14.852885
mmu-miR-188-5p-4395431	-3.923675	1.04E-62	13.40773	17.331405
mmu-miR-30e*-4373057	-4.001605	3.77E-65	4.23514	8.236745
mmu-miR-805-4395577	-5.680625	6.95E-87	9.90799	15.588615
mmu-miR-327-4395611	-6.597085	1.66E-116	13.603245	20.20033
mmu-miR-9*-4395342	-6.85012	1.85E-125	13.35021	20.20033
rno-miR-346-4381113	-7.03753	2.62E-132	13.55469	20.59222
mmu-miR-199a-5p-4373272	-7.13432	6.46E-136	13.4579	20.59222
mmu-miR-452-4373281	-8.01194	6.98E-171	12.58028	20.59222

microRNAs angegeben mit Speziesbezeichnung, p-Werte in Exponentialschreibweise (Basis 10); die Mittelwerte bezeichnen jeweils das arithmetische Mittel der Doppelansätze (gepoolt je Gruppe) auf der gleichen Arraykarte

Die erhobenen Messwerte wurden wie zuvor beschrieben an die Core Unit for Integrated Functional Genomics am Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF) an der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gegeben und dort unter Berücksichtigung der internen Validierungsergebnisse und der gleichzeitigen Testung zahlreicher microRNAs bioinformatisch ausgewertet. Im Ergebnis zeigte sich eine verminderte Expression von 9 miRNAs in der AAR der Tiere nach RIPK im

Vergleich zur AAR von nicht präkonditionierten Tieren. Hierbei wurden die miR-1 der Ratte (rno) und die miR-1 der Maus (mmu) separat bestimmt und zeigten wie erwartet ein sehr ähnliches Ergebnis. Drei miRNAs waren nach RIPC höher exprimiert. Eine Übersicht über die Ergebnisse nach bioinformatischer Auswertung bietet die folgende Tabelle 5.

Tabelle 5: Differentiell exprimierte miRNAs zwischen RIPC+I/R und nur I/R

miRNA	Relative Expression RIPC+I/R vs I/R
mmu-let-7f	0,275
mmu-miR-200b	0,370
mmu-miR-221	0,371
mmu-miR-1	0,394
rno-miR-1	0,446
mmu-miR-667	0,446
mmu-miR-500	0,461
mmu-miR-128a	0,467
mmu-miR-351	0,496
mmu-miR-324-5p	2,341
mmu-miR-484	2,697
mmu-miR-30e*	16,018

microRNAs angegeben mit Speziesbezeichnung, ein Wert <1 zeigt eine verringerte Expression in der Gruppe mit RIPC an, ein Wert >1 eine erhöhte

Die Expression von miR-1 im Myokard von Ratten nach RIPC worauf weniger als die Hälfte vermindert im Vergleich zum Myokard von Ratten ohne RIPC. Im nächsten Schritt sollten nun einerseits mögliche Bindungspartner für miR-1 identifiziert und andererseits das Ergebnis der Arrays durch eine qPCR der einzelnen Tiere bestätigt werden.

Identifizierung von Zielgenen für miR-1 mittels Datenbankrecherche

Der Abgleich von Bcl-2-mRNA mit miR-1 ergab, dass keine Interaktion zwischen miRNA und mRNA vorhergesagt wurde.

Tabelle 6: 10 mit höchster Wahrscheinlichkeit *in silico* vorhergesagte Bindungspartner für miRNAs der miR-1-Familie

Zielgen (kurz)	Vollständiger Genname	interagierende miRNA	Beschriebene Funktion
Bach2	BTB and CNC homology 2	miR-206-3p	Bach2 fungiert als Transkriptionsregulator und hat im Immunsystem sowie in bestimmten Krebszellen überwiegend proliferationsfördernde Wirkung [96]. Seine Transkription wird jedoch vom bcr-abl-Fusionsprotein bei chronisch-myeloischer Leukämie unterdrückt [97]. In Betazellen des Pankreas wurde eine anti-apoptotische Wirkung durch verminderte JNK-Phosphorylierung beschrieben [96].
Mgat5	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5	miR-1a-3p	Für Mgat5 sind Funktionen bei der Zellmigration und bei der Gewebeinvasion von Krebszellen beschrieben [98-100], das Protein spielt eine entscheidende Rolle in der Frühschwangerschaft [101].
Mea1	male enhanced antigen 1	miR-1a-3p	Mea1 hat bislang keine Einträge in der GeneRIF-Datenbank. Es wird vermehrt in der späten Spermatogenese exprimiert.[102]
Entpd7	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	miR-206-3p	Das kodierte Protein zeigt strukturelle Ähnlichkeit zu E-Typ Nukleotidasen, die am extrazellulären Nukleotidabbau beteiligt sind, seine Funktion ist nicht charakterisiert [103].
Eif1ax	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked	miR-1a-3p	Eif1ax bzw. eIF1A ist an der Bildung des Ribosoms und Identifikation des AUG-Startcodons auf mRNA beteiligt und damit wesentlich für die Translation in der Proteinsynthese [104].
Gpd2	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	miR-206-3p	Die mitochondriale Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase oxidiert in der Atmungskette Glycerol-3-Phosphat zu Glyceronphosphat [66]. Eine vermehrte Expression wurde als Faktor in der vermehrten Entstehung von oxidativem Stress beim Prostatakarzinom beschrieben [66].
Serp1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	miR-1a-3p	Serp1 erfüllt nicht näher bestimmte Funktionen als Transkriptionsfaktor und wurde bei Prostatakarzinomen als positiver prädiktiver Marker beschrieben [105].
Fubp1	far upstream element (FUSE) binding protein 1	miR-1a-3p	Fubp1 vermittelt eine vermehrte Expression des Transskriptionsfaktors c-Myc, der einerseits proliferationsfördernde Wirkungen hat und andererseits die Expression von Bcl-2 negativ beeinflusst und damit apoptosefördernde Wirkung zeigt [106, 107]. Nach eingeleiteter Apoptose sinkt die Konzentration von Fubp1 in der Zelle, wodurch die Zelle in Zyklusarrest versetzt wird [107].
Mxd1	MAX dimerization protein 1	miR-1a-3p	Mxd1 kodiert das MAD-Protein, welches mit c-Myc um eine Dimerisierung mit dem MAX-Protein konkurriert [108]. Im Gegensatz zum c-Myc-MAX-Dimer hat das MAD-MAX-Dimer als Transkriptionsfaktor proliferationshemmende Wirkung. Akt-Aktivierung fördert den Abbau von MAD [108].
Tecpr2	tectonin beta-propeller repeat containing 2	miR-1a-3p	Tecpr2 stimuliert den intrazellulären Proteinabbau durch Förderung der Akkumulation von Autophagosomen [109].

Vorhersagen durch TargetScan 7.1 Software

Außer der Herabregulierung von miR-1 wurde in den Arrays keine Expressionsveränderung entdeckt, die bereits in ähnlichen Studien beschrieben wurde. Die Suche nach möglichen Bindungspartnern konzentrierte sich daher und entsprechend der ursprünglichen Hypothese zunächst auf die miR-1-Familie. Mittels TargetScan-Software wurden 729 vorhergesagte Bindungspartner für die miR-1-Familie identifiziert. Die wahrscheinlichsten 10 sind in Tabelle 6 auf der vorigen Seite aufgeführt, sortiert nach absteigender durch die Wahrscheinlichkeit einer durch das zuvor beschriebene prädiktive Regressionsmodell vorhergesagten Interaktion.

Zusammenfassende Beurteilung

Da miR-1 in verschiedenen Studien differentielle Expression in beide Richtungen zeigte, könnten mRNAs von Genen mit apoptosefördernden und -hemmenden Produkten für weitere Untersuchungen gleichermaßen in Frage kommen. Bach2, Fubp1 und Mxd1 erscheinen durch ihre gut dokumentierte Interaktion mit anderen Prozessen in der Einleitung der Apoptose als besonders geeignete Ziele für weitere Untersuchungen.

Die Suche nach Publikationen, die einen oder mehrere dieser für miR-1 vorhergesagten Bindungspartner verifizieren, lieferte keine Treffer. Die Eigenschaft von Serp1 als vorhergesagter Bindungspartner für miR-1 wird in einer veröffentlichten Publikation erwähnt [110]. Bislang wurde also keines der hier genannten Proteine als Bindungspartner von miR-1 bestätigt.

Im Rahmen dieser Arbeit folgte die weitere Untersuchung eines Mechanismus der ursprünglichen Hypothese, auch wenn Bcl-2 in der Datenbankrecherche nicht als unmittelbarer Bindungspartner von miR-1 vorhergesagt wurde.

qPCR für miR-1

Zur Bestätigung der in der Array-Messung detektierten Expressionsunterschiede für miR-1 wurden ergänzende Messungen mittels qPCR für individuelle Tiere jeweils als Triplikate durchgeführt. Die Expression von miR-1 zeigte sich sowohl bei RIPC ohne nachfolgende I/R (Relative Expression 0,49, $p=0,006$) als auch in der AAR nach I/R ohne vorherige RIPC (Relative Expression 0,24, $p=0,01$) und nach RIPC und I/R (Relative Expression 0,32, $p=0,02$) erniedrigt gegenüber der Menge im Myokard von Sham-Tieren (Abb. 4).

Die miR-1-Expression in den Gruppen I/R und RIPC+I/R ist jedoch nahezu identisch und im Vergleich der Gruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

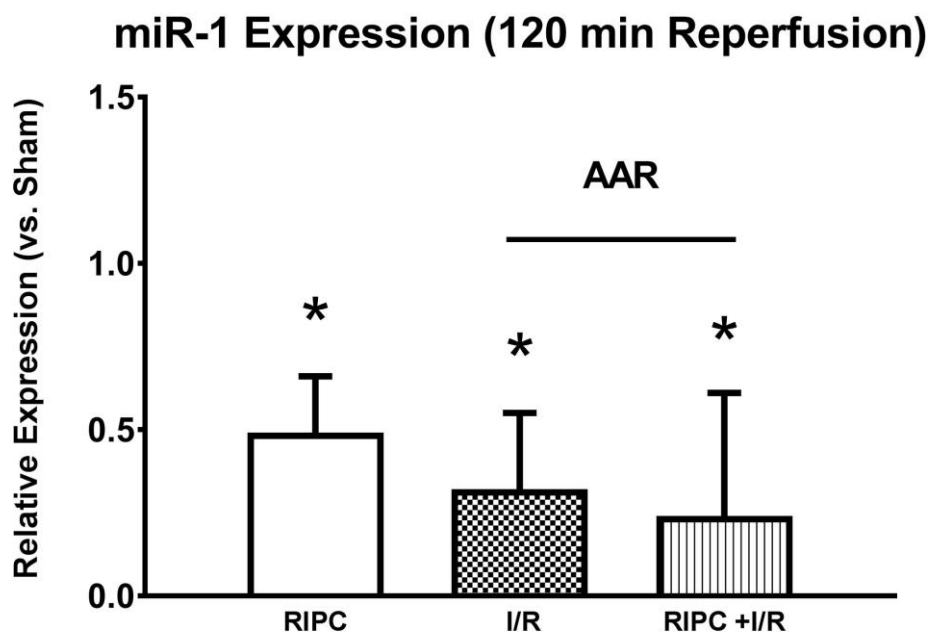


Abb. 4: Relative miR-1 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham) nach Ischämie und 2 Stunden Reperfusion.

AAR: area at risk, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. * $p<0.05$

qPCR für Bcl-2 mRNA

Wegen der zuvor veröffentlichten Ergebnisse [19, 80], die unterstützen, dass ein miR-1-abhängiger protektiver Mechanismus über das anti-apoptotische Protein Bcl-2 vermittelt sein könnte, wurde die Bcl-2-Expression in Myokardzellen untersucht.

Im ersten Schritt erfolgte die Quantifizierung von Bcl-2 mRNA mittels qPCR. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 zusammengefasst, die relative Expression im Vergleich zur Sham-Gruppe betrug 0,55 für RIPC, 0,94 für I/R und 0,70 für RIPC+I/R. Erneut zeigt sich im Vergleich der Gruppen nur I/R und RIPC+I/R kein Unterschied ($p=0,122$), die Gruppen unterscheiden sich außerdem ebenfalls nicht im Vergleich zu den Sham-Tieren.

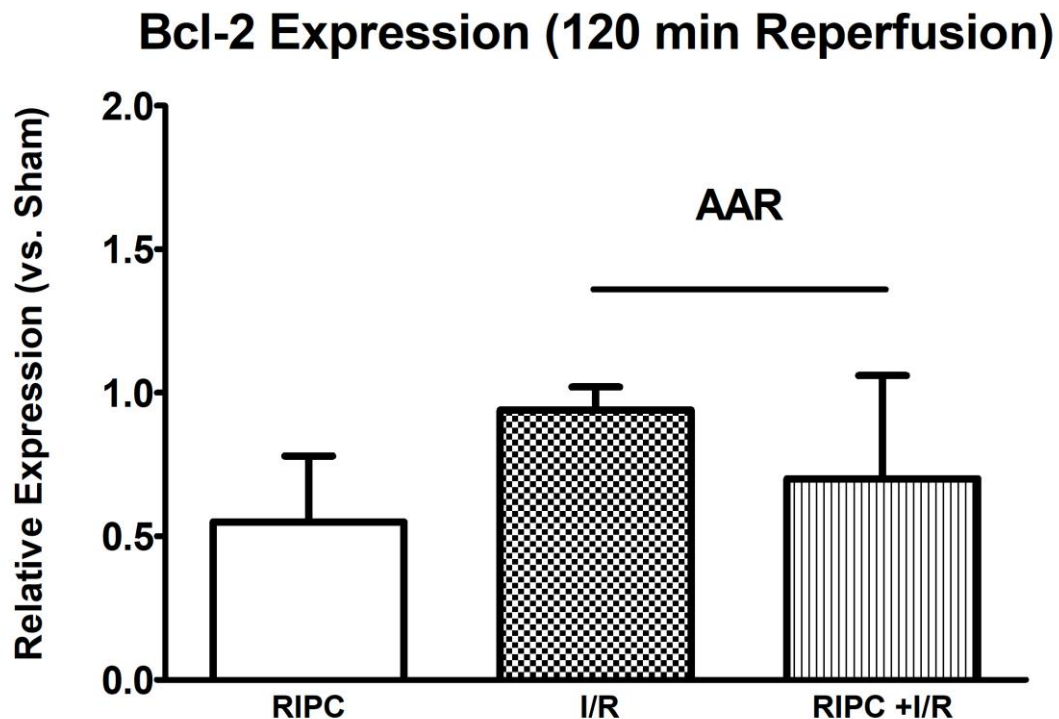


Abb. 5: Relative miR-1 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham) nach Ischämie und 2 Stunden Reperfusion.

AAR: area at risk, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Vorhersage von Bindungspartnern anderer differentiell exprimierter miRNAs zwischen RPC+I/R und I/R

Analog zur Vorhersage von Zielgenen für miR-1 wurden auch für die übrigen differentiell exprimierten miRNAs Zielgensuchen durchgeführt. Die vorhergesagten Bindungspartner mit einem context-Score über 1 sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst, wobei Tabelle 7 die Bindungspartner der herabregulierten miRNAs (mit Ausnahme von miR-1) und Tabelle 8 jene für heraufregulierte miRNAs enthält.

Die Zielgenvorhersage wurde beschränkt auf miRNAs, die evolutionär hochkonserviert sind. Daher wurde für mmu-miR-667, mmu-miR-500, mmu-miR-128a, mmu-miR-30e* keine Vorhersage erstellt.

Tabelle 7: *In silico* vorhergesagte Bindungspartner für herabregulierte miRNAs zwischen RIPC+I/R und I/R

Zielgen (kurz)	Vollständiger Genname	interagierende miRNA	Beschriebene Funktion
Wasf3	WAS protein family, member 3	miR-200b-3p	Wasf3 wird alternative als WAVE3 bezeichnet (Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein 3). Wasf3 unterdrückt die Expression von pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 (PDK2) und damit die Phosphorylierung von Akt [111]. In Folge davon ist eine Akkumulation von p53 und eine Reduktion von Bcl-2 beschrieben [111].
Lcor	ligand dependent nuclear receptor corepressor	miR-200b-3p	Für Lcor sind verschiedene Funktionen in der Modifikation von Androgenrezeptorantworten beschrieben und die Expression korreliert bei bestimmten hormonsensitiven Karzinomen mit dem Gesamtüberleben [112, 113]. Weiterhin wurde eine Anhebung der phagozytischen Kapazität von Makrophagen nach erhöhter Lcor-Expression beschrieben [114]. Kardiovaskuläre Effekte sind nicht beschrieben.
Msi1	musashi RNA-binding protein 1	miR-351-5p	Vermittelt über PKR/eIF2 α trägt Msi1 <i>in vitro</i> zur Chemoresistenzbildung von Krebszellen bei und erhöhte Expression ist mit der Ausbildung von Stammzeleigenschaften vergesellschaftet [115]. Durch Erhöhung der mRNA-Stabilität vermehrt Msi1 die Expression mehrerer proliferationsfördernder Proteine (u.a. mTor und myc) [116].
Paip2	polyadenylate-binding protein-interacting protein 2	miR-221-3p	Paip2 erhöht die mRNA-Stabilität von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und kann so eine vermehrte Stimulation der Angiogenese vermitteln [117].
Atpaf1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	miR-221-3p	Erhöhte Atpaf1-Expression vermittelt <i>in vitro</i> ischämische Zellschädigung. Dieser Effekt wird durch Proteine der 2-oxoglutarate and iron dependent dioxygenase-Familie aufgehoben [118].
Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	miR-221-3p	Humanes Ddit4 wird auch als REDD1 (regulated in development and DNA damage response-1) bezeichnet. Es vermittelt die HIF1 α -abhängige Suppression von mTOR unter Hypoxie [119]. Bei Ausschaltung der Induzierbarkeit von Ddit4 akkumuliert HIF1 α ohne einen Effekt auf die mTOR-Expression zu bewirken [119].
Fubp1	far upstream element (FUSE) binding protein 1	miR-200b-3p	s. Tabelle 3
Foxg1	forkhead box G1	miR-200b-3p	Für Foxg1 sind keine kardiovaskulären Funktionen oder generelle Funktionen in der Regulation der Zellproliferation beschrieben. Foxg1 ist gut charakterisiert, da Foxg1-Mutationen eine der ursächlichen Mutationen für das X-chromosomal vererbte Rett-Syndrom sind [120].
Slc5a3	solute carrier family 5, member 3	miR-200b-3p	Slc5a3 ist ein Ionentransporter und wird im Menschen wird ebenfalls mit dem Namen sodium-myoinositol transporter (SMIT) bezeichnet. SMIT aktiviert NOX2 und damit die Bildung von ROS, insbesondere ausgelöst durch extrazelluläre Hyperglykämie [121]. Die Expression von SMIT ist in Ratten-, Mäuse- und Menschenherzen nachgewiesen [122].
Pygo1	pygopus 1	miR-351-5p	Pygo1 ist als Kofaktor in der Transduktion des Wnt-Signals beteiligt, Funktionen in kardiovaskulären Regulationsmechanismen wurden bislang nicht beschrieben [123].
Bmf	BCL2 modifying factor	miR-351-5p	Bmf ist als proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie in mehrere Regulationswege der Apoptose eingebunden und wird durch JNK-Phosphorylierung heraufreguliert [124]. Insbesondere wurde Bmf als zentrales Protein der Anoikis beschrieben [125].

Hectd2	HECT domain containing 2	miR-221-3p	Hectd2 ist in der Signaltransduktion von Androgenrezeptoren beteiligt [126] und kann außerdem über einen bislang unbekannten Mechanismus an der Hemmung unspezifischer Entzündungsreaktionen beteiligt sein [127]. Funktionen im kardiovaskulären System sind nicht beschrieben.
Erg	avian erythroblastosis virus E-26 (v-ets) oncogene related	miR-200b-3p	Erg wurde als prognostischer Marker in Patienten mit acuter myeloischer Leukämie und mit Prostatakarzinomen untersucht [128, 129]. Erg wird über ERK phosphoryliert und bewirkt dann die transkriptionelle Aktivierung mehrerer Zielgene [130].
Purb	purine rich element binding protein B	miR-324-5p	Purb (oder Purbeta) bindet Einzelstrang-DNA und die Bindungsfähigkeit ist ein möglicher negativer prognostischer Marker in AML [131]. Es sind bisher keine kardiovaskulären Funktionen beschrieben.

Vorhersagen durch TargetScan 7.1 Software

Tabelle 8: *In silico* vorhergesagte Bindungspartner für heraufregulierte miRNAs zwischen RIPC+I/R und I/R

Zielgen (kurz)	Vollständiger Genname	interagierende miRNA	Beschriebene Funktion
Scn4a	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha	mmu-miR-484	Scn4a codiert für einen spannungsabhängigen Natriumkanal in der Skelettmuskulatur [132]. Mutationen, die eine adäquate Inaktivierung verhindern, resultieren im klinischen Bild der hyperkaliämischen periodischen Paralyse [132]. Der Kanal ist am Herzmuskel nicht exprimiert.
Arsi	arylsulfatase i	mmu-miR-484	Arsi wird in Retinazellen exprimiert, eine Rolle bei der Ausbildung retinaler Entwicklungsstörungen wurde vermutet, konnte aber bislang nicht belegt werden [133].
Tbc1d13	TBC1 domain family, member 13	mmu-miR-484	Tbc1d13 wird spezifisch durch RAB35 aktiviert und vermittelt die Membranexpression von GLUT4 und mögliche Funktionen in der Zilienbildung an Epithelien [134, 135].
Rgs8	regulator of G-protein signaling 8	mmu-miR-484	Rgs8 ist ein Regulator of G-protein signaling-Protein mit unpezifischen Funktionen in der Modulation der G-Protein-Rezeptor-Antwort [136]. Bislang sind keine spezifischen Funktionen von Rgs8 geichert, Missense-Mutationen wurden als prädestinierend für Brustkrebs angenommen, dies wurde aber bislang nicht belegt [137].
Bach2	BTB and CNC homology 2	mmu-miR-484	s. Tabelle 3
Rab37	RAB37, member RAS oncogene family	mmu-miR-324-5p	Rab37 vermittelt über Regulation der Exozytose von tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) die Inaktivierung von matrix metalloproteinase 9 (MMP9) und verhindert so die Metastasierung solider Tumoren [138]. Gemeinsam mit transmembrane protein 22 (TMEM22) fördert Rab37 das Wachstum von Nierenzellkarzinomen [139].
Mchr1	melanin-concentrating hormone receptor 1	mmu-miR-324-5p	Mchr1 ist ein G-Protein-Rezeptor, der im Tiermodell Funktionen im Energiestoffwechsel übernimmt [140]. In einer menschlichen Population wurden Unterschiede in den Muskel- und Körperfettanteilen je nach Mchr1-Polymorphismus beobachtet [140].
Sreb1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	mmu-miR-484	Für Sreb1 sind proliferationsfördernde Effekte von Sreb1 in Krebszellen beschrieben, die durch ROS ausgelöst werden [141].
Purb	purine rich element binding protein B	mmu-miR-324-5p	s. Tabelle 4

Vorhersagen durch TargetScan 7.1 Software

IV. Diskussion

Der Mechanismus, der der protektiven Wirkung von ischämischer Präkonditionierung auf Herzmuskelgewebe zu Grunde liegt, ist bislang nicht aufgedeckt. Die vorliegende Arbeit hat den aktuellen Wissensstand zur Bedeutung von miRNAs für die ischämische Präkonditionierung zusammengetragen und in eigenen experimentellen Arbeiten im Tierversuch bei RIPC differentiell exprimierte miRNAs identifiziert und eine Hypothese zu einem möglichen Mechanismus getestet. Die vorliegende und publizierte Arbeit ist die erste, die systematisch den Wissensstand der publizierten Forschung zusammenfasst, und kann daher den Anstoß für die Generierung neuer Hypothesen geben.

Diskussion der Methoden

Die Anzahl der bekannten miRNAs hat über die letzten Jahre stetig zugenommen und vermutlich gibt es zahlreiche noch nicht beschriebene miRNAs [142]. Mutmaßlich sind vor allem hochexprimierte miRNAs bekannt und gut charakterisiert [143]. Auch Änderungen bei gering exprimierten miRNAs können aber bedeutende biologische Effekte haben [144]. Die Auswahl der hier untersuchten miRNAs war notwendigerweise von der gewählten Arrayplattform abhängig.

Neben der Beschränkung auf vorausgewählte miRNAs haben verschiedene Arrayplattformen auch durch Primerdesign und technische Abläufe unterschiedlichen Bias bei der Detektion von Expressionsmustern [143, 145]. Um den zugrundeliegenden Bias bei verschiedenen Plattformen auszugleichen haben andere Autoren mehrere Arraysysteme parallel genutzt und nur übereinstimmende Ergebnisse als bedeutsam eingeschätzt [145].

Die vorliegenden laborexperimentellen Arbeiten nutzen Gewebe von männlichen Ratten. Eine grundlegende Diskussion der Erkenntnismöglichkeiten aus Tierversuchen für die menschliche Biologie würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Shanks et al. kommen in ihrer mittlerweile mehr als 250-fach zitierten Publikation von 2009 zu dem Schluss, dass Versuche an Menschen oder menschlichem Gewebe Tierversuchen

vorzuziehen sind, wo sie wirtschaftlich und ethisch vertretbar sind. [146] Die randomisierte klinische Studie von Slagsvoldt et al. demonstriert, dass dies für die vorliegenden Versuche, auch für die Gewinnung von Herzgewebe aus der AAR, möglich ist.[86] Dem Problem der Bearbeitung von Gewebe aus einem Modellorganismus wurde insoweit begegnet, dass nur evolutionär hoch konservierte microRNAs einer eingehenderen Untersuchung unterzogen wurden.

Die weitere Bestätigung von miRNA-Expressionsunterschieden und die Untersuchung möglicher Bindungspartner musste sich zum Zeitpunkt der Arbeit auf jeweils einen einzigen Kandidaten beschränken. In diesem Sinne versucht die vorliegende Arbeit eine konkrete, aus der veröffentlichten Literatur abgeleitete Hypothese zu überprüfen. Eine weitere Untersuchung der übrigen differentiell exprimierten miRNAs und weiterer vorhergesagter Bindungspartner wäre wünschenswert. Dies gilt insbesondere, da nach heutigem Wissensstand sowohl andere miRNAs als auch andere Proteine als aussichtsreichere Kandidaten gelten können. Dies wird weiter unten ausführlicher diskutiert.

Wie in der Einleitung erläutert, lässt sich die Schädigung beim I/R-Schaden in eine frühe und eine späte Phase unterteilen. Die hier berichtete Sequenz der Experimente legt die Annahmen zu Grunde, dass:

1. eine differentielle miRNA-Expression innerhalb kurzer Zeit nach Präkonditionierung entsteht
2. die Bindung zwischen miRNA und mRNA ebenfalls innerhalb kurzer Zeit entsteht und zum Abbau der mRNA führt
3. dies zu einer Änderung der Proteinkonzentration innerhalb von etwa zwei Stunden führt.

Da gute experimentelle Daten über die Geschwindigkeit der Proteinregulation durch miRNAs nach wie vor fehlen[147], können eine oder mehrere dieser Annahmen falsch sein. Daher lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht unbedingt schließen, dass ein miR-1-abhängiger, Bcl-2-vermittelter Mechanismus keine Rolle für die protektive Wirkung der RIPC spielt. Hinweise für eine Wirkung in der frühen Phase, wie sie in den zugrundeliegenden Tierversuchen gezeigt wurde, ergeben sich jedoch nicht.

Für den Fall, dass sich die Hinweise auf einen solchen Mechanismus verdichtet hätten, wären die vorliegenden Experimente nicht hinreichend gewesen, um einen direkten kausalen Zusammenhang zu belegen. In diesem Fall wären weitere Versuche zum Nachweis einer miRNA-mRNA-Bindung sowie der Nachweis einer Änderung der mRNA- und Proteinexpression nach experimenteller Änderung der miRNA-Konzentration, wie von uns andernorts beschrieben[84, 148], notwendig gewesen.

Auch nach Auswahl der TargetScan-Software, die von den zur Verfügung stehenden Instrumenten die niedrigste Rate falsch-positiver Vorhersagen trifft [149], muss als Limitation angegeben werden, dass die Auswahl der möglichen Zielproteine letztlich auf theoretischen Überlegungen beruht und insofern nur dazu dienen kann, Hypothesen für weitere Arbeiten zu generieren.

Diskussion der Ergebnisse für die Bedeutung von miRNAs bei RIPC

In 26 publizierten Arbeiten wurden übereinstimmend zwischen mehreren unabhängigen Experimenten in den Modellen Zellkultur, Tierversuch und klinische Studie am Menschen bisher 9 miRNAs als nach ischämischer Präkonditionierung vermehrt oder vermindert exprimiert beschrieben.

Zwei dieser miRNAs (miR-1 und miR-206) gehören dabei zur miR-1-Familie. Damit ist diese Familie die einzige, die bisher in allen Modellen identifiziert wurde. Während miR-1 in RIPC-Studien durchgehend als supprimiert beschrieben wurde, entdeckten einige Studien zur lokalen Präkonditionierung eine erhöhte Expression. Der Mechanismus, der eine differentielle Expression von miR-1 bewirkt und vermittelt, war bislang Ziel keiner publizierten Studie. Wegen der Gewebespezifität von miR-1 und einer mehrfach gezeigten Interaktion mit Bcl-2 ist die Hypothese naheliegend, dass der protektive Effekt ischämischer Präkonditionierung über eine Herabregulation von miR-1 vermittelt sein könnte [19, 150].

Für miR-1 sind zahlreiche Funktionen im Myokard beschrieben. In der Regulation der Myokardentwicklung kommt miR-1 eine herausragende Bedeutung zu [151-153]. Während Myokarditis wurde eine vermehrte Expression von miR-1 gezeigt, die mit einer Reduzierung von connexin-4 und einer erhöhten Arrhythmogenität der Kardiomyozyten einherging [154, 155]. Bei Myokardhypertrophie zeigt eine vermehrte miR-1-Expression hingegen protektive Wirkung durch Unterdrückung von Insulin-like growth factor-1 induzierter Progression der Hypertrophie [156]. Weiterhin kann miR-1-Überexpression im Rattenmodell eine hypertonie-induzierte Myokardfibrose verringern [157].

Für Mechanismen einer miR-1-vermittelten protektive Wirkung in ischämischem und danach reperfundiertem Gewebe gibt es einige experimentelle Hinweise, allerdings zeigen Gewebe mit erhöhter und erniedrigter miR-1-Konzentration gleichgerichtete Wirkungen bezüglich Expression pro- und anti-apoptotisch wirkender Proteine, Apoptoserate und Gesamtüberleben. Der mögliche Mechanismus, über den eine miR-1-Wirkung vermittelt wird, scheint also komplex und an verschiedenen Stellen beeinflussbar zu sein. Wenn miR-1 eine kausale Rolle in der Vermittlung der Schutzwirkung von ischämischer Präkonditionierung spielt, dann ist es naheliegend

anzunehmen, dass miR-1 als Koeffektor mit anderen Prozessen zusammenwirkt und durch Wirkung dieser alternativen Prozesse in seiner Wirkung überschattet oder entkoppelt werden kann. Abbildung 6 gibt einen Überblick über bisher beschriebene und vorhergesagte Zielgene der miR-1-Familie mit ihren pro- und anti-apoptotischen Wirkungen.

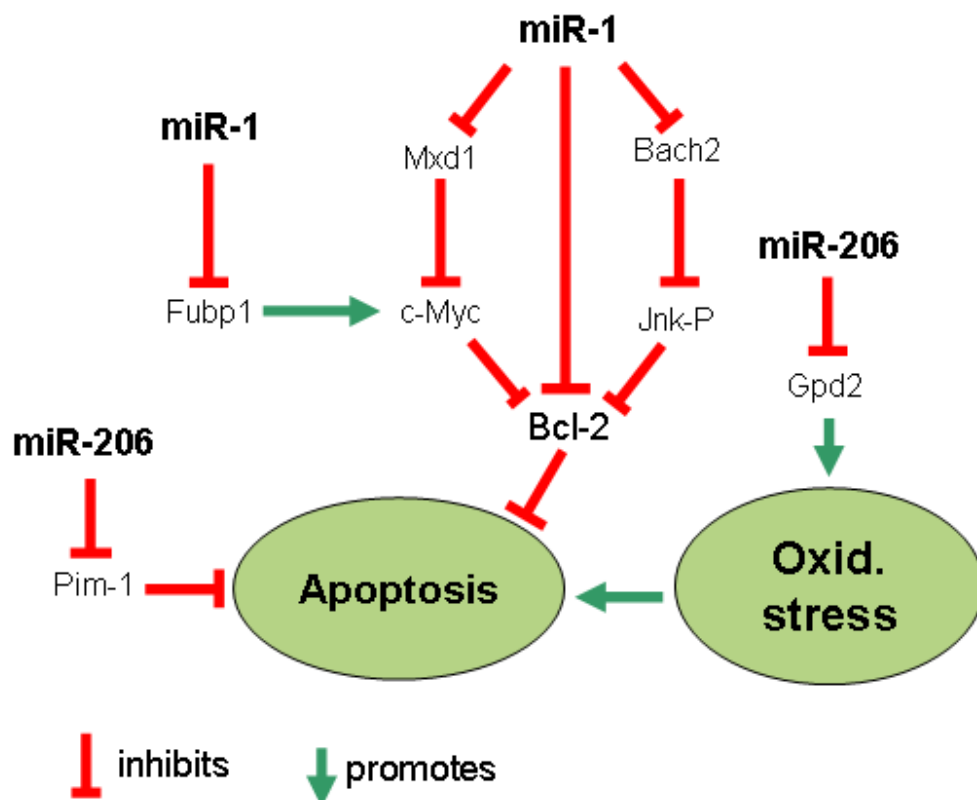


Abb. 6: Mögliche Wirkbeziehungen von miR-1 und miR-206 [92]

Bach2: BTB and CNC homology 2, Bcl-2: B-cell lymphoma 2 Fubp1: far upstream element (FUSE) binding protein 1, Gpd2: glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial, Jnk: c-Jun N-terminale Kinase (P: phosphoryliert), Mxd1: MAX dimerization protein 1, c-Myc und Pim sind nicht-abgekürzte Eigennamen, die ebenfalls Proteine bezeichnen

Es ist naheliegend, dass durch I/R hervorgerufene Veränderungen in der miRNA-Expression im Vergleich I/R gegen Sham zu Tage treten und dass ein möglicher protektiver Effekt von RIPC durch das Verhindern der sichtbaren Veränderung vermittelt sein könnte. Daher wäre ein Vergleich zwischen den differentiellen Expressionsmustern in den Vergleichen I/R gegen Sham und I/R gegen RIPC+I/R und eine Analyse von Zielgenen mit gegenläufigen Expressionsunterschieden in diesen Vergleichen sinnvoll. Wegen der Vielzahl und Unübersichtlichkeit der erwartbaren Wechselwirkungen, wäre für diese Untersuchung jedoch eine bioinformatische Lösung notwendig, die für diese Arbeit nicht zur Verfügung stand.

Zahlreiche Hinweise auf die Identität des Faktors oder der Faktoren, die RIPC vermitteln, machen miRNAs zu aussichtsreichen Kandidaten. Wie in der Einleitung beschrieben, sollte sich die Suche auf sehr kleine Proteine oder Nicht-Protein-Moleküle, die mit dem Plasma transportiert werden, konzentrieren. Seit Beschreibung von in Exosomen oder frei im Plasma transportierten miRNAs und dem Nachweis, dass miRNAs in Zielzellen aufgenommen werden und dort biologische Wirkungen entfalten, wird deutlich, dass miRNAs das bisher bekannte Profil des vermittelnden Faktors aufweisen. Im Gegensatz hierzu konnte eine der beiden Studien am Menschen, die zirkulierende miRNAs im Plasma untersuchten, trotz demonstrierter protektiver Wirkung der ischämischen Präkonditionierung keine differentiell exprimierten miRNAs nachweisen. Hinzu kommt, dass Zelluntergang miRNAs freisetzen kann, und ohne einen demonstrierten Mechanismus die Frage, ob ein verringertes Vorliegen auf verringerten Zelltod oder einen gezielten Vorgang zurückgeführt werden kann, nur schwer zu beantworten ist. Aus den bislang identifizierten miRNAs kann am ehesten miR-144 als guter Kandidat für den vermittelnden Faktor gelten. Sie kommt vermehrt im Plasma ischämisch präkonditionierter Patienten und Tiere vor – was mit der Hypothese der Freisetzung als Botenstoff vereinbar wäre – und zeigt sowohl endogen als auch exogen experimentell bestätigte Wirkung auf an der Apoptose beteiligte Proteine. Leider konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine differentielle Expression von miR-144 nachgewiesen werden.

Der bislang stärkste Hinweis auf eine Bedeutung der in dieser Arbeit untersuchten Hypothese zu einem Mechanismus ergibt sich aus der Arbeit von Hu et al. (2016), in der in Myokardbiopsien von Patienten nach RIPC und Ischämie mit nachfolgender Reperfusion sowohl eine Verringerung von miR-1 als auch eine Vermehrung von Bcl-2 zu sehen war. Während sich in den hier beschriebenen Versuchen eine Verringerung der miR-1-Expression im ischämisch präkonditionierten Herz zeigen ließ, gelang es nicht, eine korrespondierende Erhöhung von Bcl-2 zu zeigen. Da Bcl-2 nicht in verschiedenen Aktivierungszuständen vorzuliegen scheint, lässt sich über die Expression von Bcl-2 auf seine Funktion zurückschließen.[158] Im Fall des hier besprochenen Versuchs ist die gezeigte Schutzwirkung der ischämischen Präkonditionierung daher nicht über Bcl-2 vermittelt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass Bcl-2 in Zellen verschiedener Zellarten vorkommt und die hier angewendete Gewebekomogenisierungsmethode nicht zwischen verschiedenen Zellarten unterscheidet. Es kann also nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, dass die gezeigten RNA- und Proteinexpressionsmuster die Verhältnisse in Kardiomyozyten widerspiegeln. Mittels RNA-Sequenzierung ermittelte RNA-Expressionsmuster unterscheiden sich zwischen den im Myokard dominierenden Zellpopulationen erheblich [159]. Expressionsunterschiede in den Zellgruppen sind mit der hier angewendeten Methode nicht darstellbar, so dass das Expressionsprofil in Kardiomyozyten im Vergleich zu Fibroblasten und Endothelzellen nicht dargestellt werden konnte. Weiterhin ist gerade während Gewebsschädigung auch eine Verzerrung der Ergebnisse beispielsweise durch unterschiedliche Mengen infiltrierender Leukozyten denkbar. Gesamt-RNA-Sequenzierung aus einzelnen Zellen oder getrennten Zellpopulationen wäre geeignet, über die möglichen unterschiedlichen Expressionsprofile Aufschluss zu geben [160].

Es ist theoretisch plausibler, dass eine veränderte Bcl-2-Expression im längeren Verlauf nach Präkonditionierung eine wichtige Rolle spielt, da der hier beobachtete Zeitverlauf von weniger als drei Stunden nach Beginn der Präkonditionierung nur eingeschränkt Möglichkeiten für die Modulation von Proteinmengen durch vermehrte oder verminderte Translation bietet, so dass Messungen zu späteren Zeitpunkten ebenfalls eine sinnvolle Ergänzung des gewählten Ansatzes darstellen würden.

Die Etablierung eines Zellkulturmodells in Kardiomyozyten zu Überexpression und Knockdown einzelner miRNAs kann helfen, um exakte Versuchsbedingungen zu schaffen und molekulare Interaktionen genauer aufzuklären. Obwohl die Etablierung eines solchen Modells während der Laborarbeiten zur vorliegenden Arbeit nicht gelang, war sie später in unserer und anderen Arbeitsgruppen erfolgreich.[71, 84, 87, 148]

VI. Referenzen

1. GBD 2015 Collaborators, *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1459-1544.
2. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
3. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
4. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
5. Zhao, Z.Q., et al., *Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion*. J Surg Res, 2000. **94**(2): p. 133-44.
6. Levites, R., V.S. Banka, and R.H. Helfant, *Electrophysiologic effects of coronary occlusion and reperfusion. Observations of dispersion of refractoriness and ventricular automaticity*. Circulation, 1975. **52**(5): p. 760-5.
7. El-Chami, M.F., et al., *New-onset atrial fibrillation predicts long-term mortality after coronary artery bypass graft*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(13): p. 1370-6.
8. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Ion transport and energetics during cell death and protection*. Physiology (Bethesda), 2008. **23**: p. 115-23.
9. Sanada, S., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(5): p. H1723-41.
10. Chen, M., et al., *Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 29181-6.
11. Hardwick, J.M. and L. Soane, *Multiple functions of BCL-2 family proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).

12. Scorrano, L., et al., *BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis*. Science, 2003. **300**(5616): p. 135-9.
13. Bopassa, J.C., et al., *Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(6): p. H2750-5.
14. Raedschelders, K., D.M. Ansley, and D.D. Chen, *The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion*. Pharmacol Ther, 2012. **133**(2): p. 230-55.
15. Roe, N.D. and J. Ren, *Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases*. Vascul Pharmacol, 2012. **57**(5-6): p. 168-72.
16. Kaludercic, N., et al., *Monoamine oxidase B prompts mitochondrial and cardiac dysfunction in pressure overloaded hearts*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(2): p. 267-80.
17. Yamamoto, K., H. Ichijo, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8469-78.
18. Sinha, K., et al., *Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis*. Arch Toxicol, 2013. **87**(7): p. 1157-80.
19. Tang, Y., et al., *MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2*. Int Heart J, 2009. **50**(3): p. 377-87.
20. Meyer, K., H. Zhang, and L. Zhang, *Direct effect of cocaine on epigenetic regulation of PKCepsilon gene repression in the fetal rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(4): p. 504-11.
21. Kim, H.J., et al., *Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(3): p. 892-901.
22. Martindale, J.J., et al., *Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6*. Circ Res, 2006. **98**(9): p. 1186-93.
23. Kalogeris, T., et al., *Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.

24. Ross, J.L. and S.E. Howlett, *Age and ovariectomy abolish beneficial effects of female sex on rat ventricular myocytes exposed to simulated ischemia and reperfusion*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38425.
25. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
26. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
27. Dickson, E.W., et al., *Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence*. J Thromb Thrombolysis, 1999. **8**(2): p. 123-9.
28. Kristiansen, S.B., et al., *Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a K_{ATP} channel-dependent mechanism*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2005. **288**(3): p. H1252-H1256.
29. Konstantinov, I.E., et al., *Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a K_{ATP} channel-dependent mechanism*. Transplantation, 2005. **79**(12): p. 1691-5.
30. Giricz, Z., et al., *Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2014. **68**: p. 75-78.
31. Kharbanda, R.K., et al., *Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2881-3.
32. Cheung, M.M., et al., *Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(11): p. 2277-82.
33. Lang, S.C., et al., *Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using proteomic methods?* Basic Res Cardiol, 2006. **101**(2): p. 149-58.

34. Patel, H.H., et al., *Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(10): p. 1317-23.
35. Zhang, S.Z., et al., *Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning*. Anesthesiology, 2006. **105**(3): p. 550-6.
36. Liem, D.A., et al., *Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2002. **283**(1): p. H29-H37.
37. Wolfrum, S., et al., *Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC ϵ -isoform*. Cardiovascular Research, 2002. **55**(3): p. 583-589.
38. Yellon, D.M. and J.M. Downey, *Preconditioning the Myocardium: From Cellular Physiology to Clinical Cardiology*. Physiological Reviews, 2003. **83**(4): p. 1113-1151.
39. An, W.G., et al., *Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha*. Nature, 1998. **392**(6674): p. 405-8.
40. Kant, R., et al., *Remote renal preconditioning-induced cardioprotection: a key role of hypoxia inducible factor-prolyl 4-hydroxylases*. Mol Cell Biochem, 2008. **312**(1-2): p. 25-31.
41. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(3): p. 377-86.
42. Heinen, N.M., et al., *Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits a signaling pattern different from local ischemic preconditioning*. Shock, 2011. **36**(1): p. 45-53.
43. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
44. Du, T. and P.D. Zamore, *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Development, 2005. **132**(21): p. 4645-52.
45. Blahna, M.T. and A. Hata, *Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis*. FEBS Lett, 2012. **586**(14): p. 1906-12.

46. Corcoran, D.L., et al., *Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5279.
47. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
48. Havens, M.A., et al., *Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(10): p. 4626-40.
49. Wheeler, B.M., et al., *The deep evolution of metazoan microRNAs*. Evol Dev, 2009. **11**(1): p. 50-68.
50. Landgraf, P., et al., *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1401-14.
51. Gantier, M.P., et al., *Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(13): p. 5692-703.
52. Ameres, S.L., et al., *Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1534-9.
53. Li, J., et al., *Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis*. Curr Biol, 2005. **15**(16): p. 1501-7.
54. Cazalla, D., T. Yario, and J.A. Steitz, *Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1563-6.
55. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
56. Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, and W. Filipowicz, *Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?* Trends in Cell Biology, 2007. **17**(3): p. 118-126.
57. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.
58. Bernstein, E., et al., *Dicer is essential for mouse development*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 215-217.
59. Nakahara, K. and R.W. Carthew, *Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(2): p. 127-33.

60. Kamanu, T.K., et al., *Exploration of miRNA families for hypotheses generation*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2940.
61. Babak, T., et al., *Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference*. Rna, 2004. **10**(11): p. 1813-9.
62. Williams, A.E., et al., *Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development*. Dev Dyn, 2007. **236**(2): p. 572-80.
63. Wang, K., et al., *Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(20): p. 7248-59.
64. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
65. Diehl, P., et al., *Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation*. Cardiovasc Res, 2012. **93**(4): p. 633-44.
66. Li, J., et al., *Remote ischemic preconditioning modifies cardiac micro RNA expression in vivo: First observations in a mouse model*. Journal of the American College of Cardiology, 2009. **53** (10): p. A310.
67. Chun, B.J., et al., *A role for miR-471 in cardiac ischemia-reperfusion injury*. FASEB Journal. Conference: Experimental Biology, 2010. **24**(no pagination).
68. Helsley, R.N., et al., *MicroRNA regulation of Hsp70.3 protein expression in late ischemic preconditioning*. FASEB Journal. Conference: Experimental Biology, 2010. **24**(no pagination).
69. Varga, Z.V., et al., *Identification of microRNAs involved in ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by pre- and postconditioning*. Cardiovascular Research, 2012. **93**: p. S110.
70. Kukreja, R.C., *Role of microrna and cardioprotection*. Cardiology (Switzerland), 2014. **128**: p. 219.
71. Barile, L., et al., *Exosomes from human cardiac progenitor cells, but not those from patient-matched bone marrow-derived mesenchymal stem cells, improve cardiac function after myocardial infarction in vivo*. European Heart Journal, 2015. **36**: p. 169.

72. He, S., Z. Han, and Y. Zhang, *MicoRNA-133b-5p plays an important role in hypoxia preconditioning mediated cardio protection in H9C2 cells by inhibiting FAS and Caspase apoptosis signaling*. Anesthesia and Analgesia, 2016. **123 (3 Supplement 2)**: p. 36-37.
73. Dong, S., et al., *MicroRNA expression signature and the role of MicroRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(43): p. 29514-29525.
74. Kim, H.W., et al., *Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(48): p. 33161-8.
75. Rane, S., et al., *Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes*. Circulation Research, 2009. **104**(7): p. 879-86.
76. Yin, C., F.N. Salloum, and R.C. Kukreja, *A novel role of microRNA in late preconditioning: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70*. Circulation Research, 2009. **104**(5): p. 572-575.
77. Cheng, Y., et al., *A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction*. Clinical Science, 2010. **119**(2): p. 87-95.
78. Cheng, Y., et al., *Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4*. Cardiovascular Research, 2010. **87**(3): p. 431-439.
79. Tranter, M., et al., *Coordinated post-transcriptional regulation of Hsp70.3 gene expression by microRNA and alternative polyadenylation*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(34): p. 29828-29837.
80. Duan, X., et al., *Expression of MicroRNA-1 and MicroRNA-21 in different protocols of ischemic conditioning in an isolated rat heart model*. Cardiology (Switzerland), 2012. **122**(1): p. 36-43.
81. Kim, H.W., et al., *Stem cell-based delivery of Hypoxamir-210 to the infarcted heart: Implications on stem cell survival and preservation of infarcted heart function*. Journal of Molecular Medicine, 2012. **90**(9): p. 997-1010.

82. Kim, H.W., et al., *Concomitant activation of miR-107/PDCD10 and hypoxamir-210/Casp8ap2 and their role in cytoprotection during ischemic preconditioning of stem cells*. Antioxidants and Redox Signaling, 2012. **17**(8): p. 1053-1065.
83. Wang, X., et al., *Loss of the miR-144/451 cluster impairs ischaemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting Rac-1*. Cardiovascular Research, 2012. **94**(2): p. 379-390.
84. Brandenburger, T., et al., *Effects of Remote Ischemic Preconditioning and Myocardial Ischemia on MicroRNA-1 Expression in the Rat Heart In Vivo*. Shock, 2014. **42**(3): p. 234-238.
85. Li, J., et al., *MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning*. Basic research in cardiology, 2014. **109**(5): p. 423.
86. Slagsvold, K.H., et al., *Remote ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and activates pro-survival protein kinase Akt in the left ventricle during cardiac surgery: a randomized trial*. International Journal of Cardiology, 2014. **177**(2): p. 409-17.
87. Varga, Z.V., et al., *MicroRNAs associated with ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischemic pre- and postconditioning: ProtectomiRs*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2014. **307**(2): p. H216-H227.
88. Krogstad, L.E.B., K.H. Slagsvold, and A. Wahba, *Remote ischemic preconditioning and incidence of postoperative atrial fibrillation*. Scandinavian Cardiovascular Journal, 2015. **49**(3): p. 117-122.
89. Hu, Q., et al., *Apoptosis-related microRNA changes in the right atrium induced by remote ischemic preconditioning during valve replacement surgery*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 18959.
90. Pryds, K., et al., *Effect of remote ischemic conditioning on myocardial perfusion in patients with suspected ischemic coronary artery disease*. Journal of Nuclear Cardiology, 2016: p. 1-10.
91. Zhang, Y., et al., *microRNA-206 is involved in survival of hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells through targeting Pim-1 kinase*. Stem Cell Research & Therapy, 2016. **7**(1): p. 61.

92. Kohns, M., et al., *MiRNA-Mediated Mechanisms of Cardiac Protection in Ischemic and Remote Ischemic Preconditioning-A Qualitative Systematic Review*. Shock, 2019. **51**(1): p. 44-51.
93. Mestdagh, P., et al., *High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(21): p. e143.
94. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
95. Agarwal, V., et al., *Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs*. Elife, 2015. **4**.
96. Marroqui, L., et al., *BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic beta-cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2*. Diabetes, 2014. **63**(7): p. 2516-27.
97. Zhu, Z., et al., *Bach2 regulates aberrant activation of B cell in systemic lupus erythematosus and can be negatively regulated by BCR-ABL/PI3K*. Exp Cell Res, 2018. **365**(1): p. 138-144.
98. Gao, Y., et al., *beta1,6 GlcNAc branches-modified protein tyrosine phosphatase Mu attenuates its tyrosine phosphatase activity and promotes glioma cell migration through PLCgamma-PKC pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **505**(2): p. 569-577.
99. Li, B., et al., *Effect of GnT-V knockdown on the proliferation, migration and invasion of the SMMC7721/R human hepatocellular carcinoma drug-resistant cell line*. Mol Med Rep, 2016. **13**(1): p. 469-76.
100. Xiao, J., et al., *beta1,6 GlcNAc branches-modified protein tyrosine phosphatase alpha enhances its stability and promotes focal adhesion formation in MCF-7 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **482**(4): p. 1455-1461.
101. Deng, Q., et al., *N-acetylglucosaminyltransferase V inhibits the invasion of trophoblast cells by attenuating MMP2/9 activity in early human pregnancy*. Placenta, 2015. **36**(11): p. 1291-9.

102. Lau, Y.F., K.M. Chan, and R. Sparkes, *Male-enhanced antigen gene is phylogenetically conserved and expressed at late stages of spermatogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(21): p. 8462-6.
103. Robson, S.C., J. Seigny, and H. Zimmermann, *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 409-30.
104. Haimov, O., et al., *Efficient and Accurate Translation Initiation Directed by TISU Involves RPS3 and RPS10e Binding and Differential Eukaryotic Initiation Factor 1A Regulation*. Mol Cell Biol, 2017. **37**(15).
105. Zheng, L., et al., *Diagnostic value of SFRP1 as a favorable predictive and prognostic biomarker in patients with prostate cancer*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0118276.
106. Sochalska, M., et al., *MYC selects against reduced BCL2A1/A1 protein expression during B cell lymphomagenesis*. Oncogene, 2017. **36**(15): p. 2066-2073.
107. Yang, L., et al., *Far upstream element-binding protein 1 (FUBP1) is a potential c-Myc regulator in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its expression promotes ESCC progression*. Tumour Biol, 2016. **37**(3): p. 4115-26.
108. Okada, M., et al., *A balance of Mad and Myc expression dictates larval cell apoptosis and adult stem cell development during Xenopus intestinal metamorphosis*. Cell Death Dis, 2017. **8**(5): p. e2787.
109. Oz-Levi, D., et al., *Mutation in TECPR2 reveals a role for autophagy in hereditary spastic paraparesis*. Am J Hum Genet, 2012. **91**(6): p. 1065-72.
110. Mansuri, M.S., M. Singh, and R. Begum, *miRNA signatures and transcriptional regulation of their target genes in vitiligo*. J Dermatol Sci, 2016. **84**(1): p. 50-58.
111. Huang, S., et al., *WAVE3 promotes proliferation, migration and invasion via the AKT pathway in pancreatic cancer*. Int J Oncol, 2018. **53**(2): p. 672-684.
112. Asim, M., et al., *Ligand-dependent corepressor acts as a novel androgen receptor corepressor, inhibits prostate cancer growth, and is functionally inactivated by the Src protein kinase*. J Biol Chem, 2011. **286**(43): p. 37108-17.

113. Palijan, A., et al., *Ligand-dependent corepressor LCoR is an attenuator of progesterone-regulated gene expression*. J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30275-87.
114. Jiang, A., et al., *miR-615-3p promotes the phagocytic capacity of splenic macrophages by targeting ligand-dependent nuclear receptor corepressor in cirrhosis-related portal hypertension*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(6): p. 672-80.
115. Chen, H.Y., et al., *Musashi-1 promotes chemoresistant granule formation by PKR/eIF2alpha signalling cascade in refractory glioblastoma*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. **1864**(5 Pt A): p. 1850-1861.
116. Kudinov, A.E., et al., *Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(9): p. 2143-2153.
117. Onesto, C., et al., *Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34217-26.
118. Saito, K., et al., *OGFOD1, a member of the 2-oxoglutarate and iron dependent dioxygenase family, functions in ischemic signaling*. FEBS Lett, 2010. **584**(15): p. 3340-7.
119. Zhou, F., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, regulated in development and DNA damage response-1 and mammalian target of rapamycin in human placental BeWo cells under hypoxia*. Placenta, 2016. **45**: p. 24-31.
120. Ehrhart, F., N.B. Sangani, and L.M.G. Curfs, *Current developments in the genetics of Rett and Rett-like syndrome*. Curr Opin Psychiatry, 2018. **31**(2): p. 103-108.
121. Mak, K.M., et al., *Nuclear factor of activated T cells 5 deficiency increases the severity of neuronal cell death in ischemic injury*. Neurosignals, 2012. **20**(4): p. 237-51.
122. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
123. Schwab, K.R., et al., *Pygo1 and Pygo2 roles in Wnt signaling in mammalian kidney development*. BMC Biol, 2007. **5**: p. 15.

124. Lei, K. and R.J. Davis, *JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2432-7.
125. Hausmann, M., et al., *BCL-2 modifying factor (BMF) is a central regulator of anoikis in human intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(30): p. 26533-40.
126. Sun, T., et al., *MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A*. Oncogene, 2014. **33**(21): p. 2790-800.
127. Coon, T.A., et al., *The proinflammatory role of HECTD2 in innate immunity and experimental lung injury*. Sci Transl Med, 2015. **7**(295): p. 295ra109.
128. Kristensen, G., et al., *5hmC Level Predicts Biochemical Failure Following Radical Prostatectomy in Prostate Cancer Patients with ERG Negative Tumors*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(5).
129. Mahotka, C., et al., *Nucleolin promotes execution of the hematopoietic stem cell gene expression program*. Leukemia, 2018. **32**(8): p. 1865-1868.
130. Fish, J.E., et al., *Dynamic regulation of VEGF-inducible genes by an ERK/ERG/p300 transcriptional network*. Development, 2017. **144**(13): p. 2428-2444.
131. Kelm, R.J., Jr., et al., *Characterization of purine-rich element binding protein B as a novel biomarker in acute myelogenous leukemia prognostication*. J Cell Biochem, 2018. **119**(2): p. 2073-2083.
132. Jiang, D., et al., *Structural basis for gating pore current in periodic paralysis*. Nature, 2018. **557**(7706): p. 590-594.
133. Oshikawa, M., R. Usami, and S. Kato, *Characterization of the arylsulfatase I (ARSI) gene preferentially expressed in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 482-94.
134. Davey, J.R., et al., *TBC1D13 is a RAB35 specific GAP that plays an important role in GLUT4 trafficking in adipocytes*. Traffic, 2012. **13**(10): p. 1429-41.
135. Yoshimura, S., et al., *Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation*. J Cell Biol, 2007. **178**(3): p. 363-9.

136. Benians, A., M. Nobles, and A. Tinker, *Participation of RGS8 in the ternary complex of agonist, receptor and G-protein*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 1045-7.
137. Wiechec, E., et al., *High-resolution melting analysis for mutation screening of RGS11, RGS16, and RGS8 in breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011. **20**(2): p. 397-407.
138. Tsai, C.H., et al., *Small GTPase Rab37 targets tissue inhibitor of metalloproteinase 1 for exocytosis and thus suppresses tumour metastasis*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4804.
139. Dobashi, S., et al., *Involvement of TMEM22 overexpression in the growth of renal cell carcinoma cells*. Oncol Rep, 2009. **21**(2): p. 305-12.
140. Fontaine-Bisson, B., et al., *Melanin-concentrating hormone receptor 1 polymorphisms are associated with components of energy balance in the Complex Diseases in the Newfoundland Population: Environment and Genetics (CODING) study*. Am J Clin Nutr, 2014. **99**(2): p. 384-91.
141. Fan, X.X., et al., *Suppression of Lipogenesis via Reactive Oxygen Species-AMPK Signaling for Treating Malignant and Proliferative Diseases*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(5): p. 339-357.
142. Bentwich, I., et al., *Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs*. Nat Genet, 2005. **37**(7): p. 766-70.
143. Nelson, P.T., et al., *Technical variables in high-throughput miRNA expression profiling: much work remains to be done*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1779**(11): p. 758-65.
144. Johnston, R.J. and O. Hobert, *A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 845-9.
145. Gan, L., S. Schwengberg, and B. Denecke, *MicroRNA profiling during cardiomyocyte-specific differentiation of murine embryonic stem cells based on two different miRNA array platforms*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25809.
146. Shanks, N., R. Greek, and J. Greek, *Are animal models predictive for humans?* Philos Ethics Humanit Med, 2009. **4**: p. 2.

147. Hausser, J., et al., *Timescales and bottlenecks in miRNA-dependent gene regulation*. Mol Syst Biol, 2013. **9**: p. 711.
148. Grievink, H., et al., *Interaction between microRNA-1 and brain derived neurotrophic factor in the context of remote ischemic preconditioning*. European Journal of Anaesthesiology, 2011. **28**: p. 53.
149. Riffo-Campos, A.L., I. Riquelme, and P. Brebi-Mieville, *Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose?* Int J Mol Sci, 2016. **17**(12).
150. Zhai, C., et al., *Inhibition of microRNA-1 attenuates hypoxia/re-oxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes by directly targeting Bcl-2 but not GADD45Beta*. Am J Transl Res, 2015. **7**(10): p. 1952-62.
151. Townley-Tilson, W.H., T.E. Callis, and D. Wang, *MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(8): p. 1252-5.
152. *Antiretroviral Therapy for HIV Infection in Infants and Children: Towards Universal Access: Recommendations for a Public Health Approach: 2010 Revision*. . 2010, World Health Organization: Geneva.
153. Chistiakov, D.A., A.N. Orekhov, and Y.V. Bobryshev, *Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction)*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **94**: p. 107-121.
154. Xu, H.F., et al., *MicroRNA-1 represses Cx43 expression in viral myocarditis*. Mol Cell Biochem, 2012. **362**(1-2): p. 141-8.
155. Lu, Y., et al., *MicroRNA-1 downregulation by propranolol in a rat model of myocardial infarction: a new mechanism for ischaemic cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(3): p. 434-41.
156. Hua, Y., Y. Zhang, and J. Ren, *IGF-1 deficiency resists cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of microRNA-1 and microRNA-133a*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(1): p. 83-95.
157. Karakikes, I., et al., *Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(2): p. e000078.

158. Ludwig, L.M., et al., *Killing Two Cells with One Stone: Pharmacologic BCL-2 Family Targeting for Cancer Cell Death and Immune Modulation*. *Frontiers in Pediatrics*, 2016. **4**: p. 135.
159. Quaife-Ryan, G.A., et al., *Multicellular Transcriptional Analysis of Mammalian Heart Regeneration*. *Circulation*, 2017. **136**(12): p. 1123-1139.
160. Villani, A.C. and K. Shekhar, *Single-Cell RNA Sequencing of Human T Cells*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1514**: p. 203-239.

VII. Anhang: miRNA MicroArray Ergebnisse RIPc + I/R vs. I/R

Ziel-miRNA	DDCt	p-Wert	RIPc+I/R Mittelwert	Nur I/R Mittelwert	DCt nur I/R A	DCt nur I/R B	DCt RIPc+I/R A	DCt RIPc+I/R B	Validierung
mmu-miR-135a-4373140	9.23881	1.54E-226	20.625915	11.387105	11.58305	11.19116	20.625915	Fehler	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-423-5p-4395451	8.21557	1.42E-179	20.625915	12.410345	12.60629	12.2144	20.625915	Fehler	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-93*-4395250	7.90832	1.52E-166	20.607825	12.699505	12.89545	12.50356	Fehler	20.607825	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-708-4395452	7.70235	4.36E-158	20.625915	12.923565	13.11951	12.72762	20.625915	Fehler	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-342-5p-4395657	7.36808	7.78E-145	20.625915	13.257835	13.45378	13.06189	20.625915	Fehler	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-99b*-4395307	7.24754	3.36E-140	20.607825	13.360285	13.55623	13.16434	Fehler	20.607825	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-184-4373113	4.640085	5.93E-87	17.55863	12.918545	13.11449	12.7226	17.567675	17.549585	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-141*-4395643	3.925525	1.94E-42	16.726435	12.80091	12.996855	12.604965	Fehler	16.726435	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-135b-4395372	3.785885	1.66E-58	16.64623	12.860345	13.05629	12.6644	16.655275	16.637185	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-136-4395641	2.402535	1.40E-24	15.75451	13.351975	13.54792	13.15603	15.763555	15.745465	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-148b-4373129	2.083945	6.87E-19	14.48133	12.397385	12.59333	12.20144	14.490375	14.472285	Zielgen nicht detektiert
mmu-let-7f-4373164	1.863825	2.03E-15	11.63045	9.766625	9.96257	9.57068	11.639495	11.621405	validiert
mmu-miR-760-4395439	1.69376	5.40E-13	14.118805	12.425045	12.62099	12.2291	14.12785	14.10976	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-678-4381076	1.51008	1.26E-10	13.935105	12.425025	12.62097	12.22908	13.94415	13.92606	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-455*-4378098	1.450145	6.53E-10	14.39412	12.943975	13.13992	12.74803	14.403165	14.385075	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-200b-4395362	1.436345	9.45E-10	13.31191	11.875565	12.07151	11.67962	13.320955	13.302865	validiert
mmu-miR-221-4373077	1.431425	1.08E-09	11.69326	10.261835	10.45778	10.06589	11.702305	11.684215	validiert
mmu-miR-1-4395333	1.343345	1.05E-08	5.1091	3.765755	3.9617	3.56981	5.118145	5.100055	validiert
mmu-miR-142-5p-4395359	1.289675	3.94E-08	14.22431	12.934635	13.13058	12.73869	14.233355	14.215265	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-181a-1*-4373086	1.17851	5.17E-07	14.477505	13.298995	13.49494	13.10305	14.48655	14.46846	Zielgen nicht detektiert
rno-miR-1-4395765	1.165435	6.89E-07	3.11966	1.954225	2.15017	1.75828	3.128705	3.110615	validiert
mmu-miR-667-4386769	1.163365	7.21E-07	12.5993	11.435935	11.63188	11.23999	12.608345	12.590255	validiert
mmu-miR-26b*-4395555	1.120895	1.80E-06	14.431845	13.31095	13.506895	13.115005	14.44089	14.4228	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-500-4395736	1.116015	2.00E-06	13.5868	12.470785	12.66673	12.27484	13.595845	13.577755	validiert

mmu-miR-128a-4395327	1.099495	2.82E-06	13.57724	12.477745	12.67369	12.2818	13.586285	13.568195	validiert
mmu-miR-335-5p-4373045	1.077105	4.47E-06	14.42127	13.344165	13.54011	13.14822	14.430315	14.412225	Zielgen nicht detektiert
mmu-miR-351-4373345	1.010205	1.68E-05	12.60601	11.595805	11.79175	11.39986	12.615055	12.596965	validiert
mmu-let-7a-4373169	0.942925	5.91E-05	10.62028	9.677355	9.8733	9.48141	10.629325	10.611235	validiert
mmu-miR-29c*-4381131	0.881875	1.72E-04	12.936705	12.05483	12.250775	11.858885	12.94575	12.92766	validiert
mmu-miR-224-4395683	0.841315	3.39E-04	12.58441	11.743095	11.93904	11.54715	12.593455	12.575365	validiert
mmu-miR-345-5p-4395658	0.831205	3.99E-04	12.59493	11.763725	11.95967	11.56778	12.603975	12.585885	validiert
mmu-miR-107-4373154	0.820645	4.73E-04	13.54659	12.725945	12.92189	12.53	13.555635	13.537545	validiert
Y1-4386739	0.809755	5.62E-04	8.3083125	7.4985575	6.60155	8.395565	7.124835	9.49179	validiert
mmu-miR-331-5p-4395344	0.798025	6.76E-04	12.14782	11.349795	11.54574	11.15385	12.156865	12.138775	validiert
mmu-miR-384-5p-4395732	0.789505	7.71E-04	12.13122	11.341715	11.53766	11.14577	12.140265	12.122175	validiert
mmu-let-7c-4373167	0.755855	1.28E-03	10.1073	9.351445	9.54739	9.1555	10.116345	10.098255	validiert
mmu-miR-181c-4373115	0.754395	1.31E-03	12.79568	12.041285	12.23723	11.84534	12.804725	12.786635	validiert
mmu-miR-877*-4395678	0.745425	1.50E-03	11.31618	10.570755	10.7667	10.37481	11.325225	11.307135	validiert
mmu-miR-322*-4395636	0.720845	2.14E-03	10.12291	9.402065	9.59801	9.20612	10.131955	10.113865	validiert
rno-miR-17-3p-4395779	0.695095	3.07E-03	12.60658	11.911485	12.10743	11.71554	12.615625	12.597535	validiert
rno-miR-352-4381119	0.69165	3.22E-03	12.281955	11.590305	11.78625	11.39436	12.291	12.27291	validiert
mmu-miR-690-4381086	0.657335	5.11E-03	7.040685	6.38335	6.579295	6.187405	7.04973	7.03164	validiert
mmu-miR-378*-4373024	0.645045	6.00E-03	10.93634	10.291295	10.48724	10.09535	10.945385	10.927295	validiert
mmu-miR-685-4386748	0.639685	6.43E-03	7.00018	6.360495	6.55644	6.16455	7.009225	6.991135	validiert
mmu-miR-322-4378107	0.636425	6.71E-03	8.57453	7.938105	8.13405	7.74216	8.583575	8.565485	validiert
mmu-miR-126-5p-4373269	0.624695	7.79E-03	5.58181	4.957115	5.15306	4.76117	5.590855	5.572765	validiert
rno-miR-28*-4395557	0.608345	9.56E-03	9.49867	8.890325	9.08627	8.69438	9.507715	9.489625	validiert
mmu-miR-202-3p-4373311	0.594725	1.13E-02	13.5089	12.914175	13.11012	12.71823	13.517945	13.499855	validiert
mmu-miR-15a-4373123	0.592625	0.011590017	9.59036	8.997735	9.19368	8.80179	9.599405	9.581315	validiert
mmu-miR-301b-4395730	0.589645	1.20E-02	11.56996	10.980315	11.17626	10.78437	11.579005	11.560915	validiert
mmu-miR-146a-4373132	0.587505	0.012329254	5.58124	4.993735	5.18968	4.79779	5.590285	5.572195	validiert

mmu-miR-33*-4395247	0.587095	1.24E-02	13.58358	12.996485	13.19243	12.80054	13.592625	13.574535	validiert
mmu-miR-151-3p-4373304	0.579975	1.35E-02	10.93423	10.354255	10.5502	10.15831	10.943275	10.925185	validiert
rno-miR-30d*-4395416	0.574535	1.44E-02	13.52901	12.954475	13.15042	12.75853	13.538055	13.519965	validiert
mmu-miR-27a*-4395556	-0.61015	9.35E-03	10.257835	10.867985	11.06393	10.67204	10.26688	10.24879	validiert
mmu-miR-467b*-4381092	-0.671045	4.26E-03	12.92062	13.591665	13.78761	13.39572	12.929665	12.911575	Kontrollgen nicht detektiert
mmu-miR-326-4373335	-0.684555	3.55E-03	12.40205	13.086605	13.28255	12.89066	12.411095	12.393005	validiert
mmu-miR-208-4373091	-0.733155	1.79E-03	12.35609	13.089245	13.28519	12.8933	12.365135	12.347045	validiert
rno-miR-99a*-4395774	-0.764645	1.13E-03	12.61539	13.380035	13.57598	13.18409	12.624435	12.606345	validiert
mmu-miR-323-3p-4395338	-0.929965	7.45E-05	12.90103	13.830995	14.02694	13.63505	12.910075	12.891985	Kontrollgen nicht detektiert
mmu-miR-324-5p-4373052	-1.226945	1.73E-07	12.11426	13.341205	13.53715	13.14526	12.123305	12.105215	validiert
mmu-miR-484-4381032	-1.431575	1.07E-09	6.92441	8.355985	8.55193	8.16004	6.933455	6.915365	validiert
mmu-miR-425*-4373202	-1.463135	4.59E-10	12.83543	14.298565	14.49451	14.10262	12.844475	12.826385	Kontrollgen nicht detektiert
rno-miR-24-1*-4395780	-1.668115	1.20E-12	12.43344	14.101555	14.2975	13.90561	12.442485	12.424395	Kontrollgen nicht detektiert
rno-miR-463-4395751	-2.694935	1.67E-30	12.15795	14.852885	15.04883	14.65694	12.166995	12.148905	Kontrollgen nicht detektiert
mmu-miR-188-5p-4395431	-3.923675	1.04E-62	13.40773	17.331405	17.52735	17.13546	13.416775	13.398685	Kontrollgen nicht detektiert
mmu-miR-30e*-4373057	-4.001605	3.77E-65	4.23514	8.236745	8.43269	8.0408	4.244185	4.226095	validiert
mmu-miR-805-4395577	-5.680625	6.95E-87	9.90799	15.588615	Fehler	15.588615	9.917035	9.898945	Kontrollgen nicht detektiert
mmu-miR-327-4395611	-6.597085	1.66E-116	13.603245	20.20033	Fehler	20.20033	13.61229	13.5942	Kontrollgen nicht detektiert
mmu-miR-9*-4395342	-6.85012	1.85E-125	13.35021	20.20033	Fehler	20.20033	13.359255	13.341165	Kontrollgen nicht detektiert
rno-miR-346-4381113	-7.03753	2.62E-132	13.55469	20.59222	20.59222	Fehler	13.563735	13.545645	Kontrollgen nicht detektiert
mmu-miR-199a-5p-4373272	-7.13432	6.46E-136	13.4579	20.59222	20.59222	Fehler	13.466945	13.448855	Kontrollgen nicht detektiert
mmu-miR-452-4373281	-8.01194	6.98E-171	12.58028	20.59222	20.59222	Fehler	12.589325	12.571235	Kontrollgen nicht detektiert

Tabelle I: Übersicht der Ergebnisse aus den RNA-Micro-Arrays im Vergleich der Gruppen RIPc + I/R oder nur I/R

Danksagung

In erster Linie danke ich Inge Bauer und Timo Brandenburger für die Betreuung und jahrelange Geduld. Dank gebührt außerdem Yvonne Grüber und Claudia Dohle für die praktische Anleitung im Labor und die Hilfe bei der Durchführung von zahlreichen Versuchen, die es am Ende nicht in diese Arbeit geschafft haben – vor allem ein Freisemester aus Zellkultur und Proteinbiochemie.

Weiterhin danke ich Prof. Ertan Mayatepek und Prof. Marc Jacobsen. Für vieles, aber im Zusammenhang mit dieser Arbeit insbesondere für die Jahre andauernde schonende Vermittlung der Tatsache, dass es sich bei einer Dissertation nicht um Selbstverwirklichung, sondern um einen notwendigen Zwischenschritt wissenschaftlichen Arbeitens handelt. Ebenfalls danken muss ich Prof. Laura Rodrigues am Department for Infectious Disease Epidemiology an der London School of Hygiene and Tropical Medicine, die mir beibringen konnte, dass man als Wissenschaftler keine Zeit hat, an etwas zu arbeiten, dass man nicht irgendwann publiziert.

Weiterhin geht mein Dank an Prof. Klaus Pfeffer, der mich nach meinen Jahren im Ausland auch ohne abgeschlossene Promotion nach Düsseldorf zurückgeholt hat.

Der größte Dank geht aber natürlich an meine Familie: Meinen Bruder, der umstandslos vorgemacht hat, wie man es abschließt, meinen Vater, der mich immer wieder erinnert hat, und meine Mutter, die mich schließlich mit Geld bestechen wollte, damit ich diese Arbeit zum Abschluss bringe. Am allerthankbarsten bin ich meiner Frau Quitéria, die wegen meiner wissenschaftlichen Arbeiten nicht nur zahlreiche Reisen nach London und letztlich einen gemeinsamen Umzug in die Schweiz erdulden musste, sondern dann für die vorliegende Arbeit auch noch die Wochenenden auf mich verzichtet hat.