

Geschlechtsspezifische Expression von miRNAs und ihre Rolle im Frühstadium linksventrikulärer Hypertrophie

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

CLAUDIA ESCHEN

aus Ibbenbüren

2012

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek im Zeitraum vom April 2008 bis August 2012 am Institut für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM) und am Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Schmülling
2. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek

Disputation am 13.02.2013

Inhaltsverzeichnis

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	V
ZUSAMMENFASSUNG.....	VIII
SUMMARY.....	X
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 LINKSVENTRIKULÄRE HYPERTROPHIE.....	1
1.1.1 <i>Geschlechterunterschiede bei pathologischer Myokardhypertrophie</i>	2
1.2 MIKRORNAS.....	3
1.2.1 <i>Transkriptionelle Regulation von miRNAs</i>	5
1.2.2 <i>Inhibition von Translationen durch miRNAs</i>	5
1.2.3 <i>Die Rolle von miRNAs bei linksventrikulärer Hypertrophie</i>	6
1.2.4 <i>MiRNA-21</i>	7
1.2.5 <i>MiRNA-26</i>	8
1.2.6 <i>MiRNA-29</i>	9
1.3 ÖSTROGEN UND PROGESTERON	9
1.3.1 <i>Steroidregulation von miRNAs</i>	11
1.3.2 <i>Östrogen-regulierte miRNAs</i>	13
1.3.3 <i>Progesteron-regulierte miRNAs</i>	13
1.3.4 <i>Regulation der Expression des Progesteronrezeptors durch miRNAs</i>	14
1.4 THERAPEUTISCHE UND DIAGNOSTISCHE ANWENDUNGEN VON MI RNAS	15
1.5 ZIELE UND FRAGESTELLUNG	15
2 MATERIAL	17
2.1 BIOLOGISCHES MATERIAL	17
2.1.1 <i>Tiere</i>	17
2.1.2 <i>Zelllinien</i>	17
2.1.3 <i>Bakterienstämme</i>	17
2.1.4 <i>Plasmide</i>	17
2.1.5 <i>Enzyme</i>	17
2.1.6 <i>Antikörper</i>	18
2.1.7 <i>Oligonukleotide</i>	18
2.1.8 <i>Längenmarker für DNA und Proteine</i>	20
2.2 VERBRAUCHSMATERIAL UND CHEMIKALIEN	20
2.2.1 <i>Puffer und Medien</i>	20
2.2.2 <i>Chemikalien</i>	20
2.2.3 <i>Kits</i>	22
2.3 GERÄTE	22
2.4 SOFTWARE/DATENBANKEN	23
2.5 SONSTIGES.....	23

3	METHODEN	25
3.1	MIRNA-MICROARRAY	25
3.1.1	<i>Auswertung des Microarrays</i>	25
3.1.2	<i>Überrepräsentationsanalyse der Zielgene regulierter miRNAs mit CPDB</i>	26
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
3.2.1	<i>Transformation in Bakterien</i>	26
3.2.2	<i>Methoden mit DNA</i>	27
3.2.3	<i>Methoden mit RNA/miRNA</i>	30
3.3	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	34
3.3.1	<i>Isolierung von Proteinen aus Herzgewebe und Zellen</i>	34
3.3.2	<i>Photometrische Konzentrationsmessung von Proteinen nach Bradford¹⁸⁴</i>	34
3.3.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	35
3.3.4	<i>Western Blot</i>	36
3.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	37
3.4.1	<i>Zellkultivierung</i>	37
3.4.2	<i>Transiente Transfektion der Zellen</i>	38
3.4.3	<i>Luciferase-Reporter-Assay</i>	39
3.4.4	<i>MTT-Test</i>	39
3.5	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN.....	40
3.5.1	<i>Tiere und Tierhaltung</i>	40
3.5.2	<i>Transverse Aortenstenose (TAC)</i>	40
3.5.3	<i>Ovarektomie</i>	41
3.5.4	<i>In vivo-Behandlung mit E2 und P4</i>	41
3.5.5	<i>In vivo-Behandlung mit E2 und nachfolgende Isolierung kardialer Myozyten</i>	41
3.6	STATISTISCHE ANALYSE.....	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	AUSPRÄGUNG LINKSVENTRIKULÄRER HYPERTROPHIE ZWEI WOCHEN NACH AORTENSTENOSE	43
4.2	MICROARRAY	44
4.2.1	<i>81 miRNAs wurden im linken Ventrikel detektiert</i>	44
4.2.2	<i>Regulation von miRNAs durch hypertrophen Stress und Geschlecht</i>	46
4.3	ÜBERREPRÄSENTATION VON ZIELGENEN REGULIERTER MIRNAS IN HERZ-ASSOZIIERTEN SIGNALWEGEN	46
4.4	VALIDIERUNG DES MICROARRAYS MITTELS QRT-PCR	50
4.5	REGULATION VON MIRNAS IN KARDIOMYOZYTEN NACH E2-BEHANDLUNG <i>IN VIVO</i>	53
4.6	REGULATION VON MIRNAS IM LV NACH E2- UND P4-BEHANDLUNG <i>IN VIVO</i>	55
4.6.1	<i>Zellspezifische Regulation von miRNAs durch E2</i>	57
4.7	MIRNA-21	58
4.7.1	<i>Stärkere Expression von miR-21 im linken Ventrikel von Männchen</i>	58
4.7.2	<i>Ovarektomie induziert die Expression von miR-21 im LV</i>	59
4.7.3	<i>E2- und P4-Behandlung in vivo inhibiert miR-21 im LV von Weibchen</i>	60
4.7.4	<i>E2-Behandlung in vivo inhibiert miR-21 in weiblichen Kardiomyozyten</i>	61

4.7.5	<i>E2 und P4 inhibieren die miR-21-Induktion bei Hypertrophie.....</i>	62
4.7.6	<i>Zielgene von miR-21 werden geschlechtsspezifisch reguliert.....</i>	63
4.8	MIRNA-26A.....	65
4.8.1	<i>Der Progesteronrezeptor wird durch miRNAs reguliert.....</i>	66
4.8.2	<i>MiRNA-26a inhibiert die Expression von PR.....</i>	67
4.8.3	<i>PR-Expression wird während kardialer Hypertrophie induziert.....</i>	68
4.8.4	<i>MiR-26a-Inhibition und gleichzeitige P4-Stimulation schützt Myozyten vor CoCl₂- induzierter Apoptose.....</i>	69
4.8.5	<i>Geschlechterabhängige Inhibition von miR-26a durch P4 und E2.....</i>	71
4.9	MIRNA-29B.....	73
5	DISKUSSION.....	77
5.1	FRÜHSTADIUM DER LINKSVENTRIKULÄREN HYPERTROPHIE.....	77
5.2	REGULATION VON MIRNAS WÄHREND LINKSVENTRIKULÄRER HYPERTROPHIE.....	78
5.3	WEITREICHENDE INHIBITION VON MIRNAS DURCH WEIBLICHE HORMONE IM HERZEN.....	79
5.3.1	<i>Geschlechtsspezifische und zellspezifische Regulation von miRNAs durch weibliche Hormone.....</i>	80
5.3.2	<i>Regulation von miRNAs durch Estradiol.....</i>	81
5.3.3	<i>Regulation von miRNAs durch Progesteron.....</i>	82
5.4	MIRNA-21.....	83
5.5	MIRNA-26A.....	84
5.6	MIRNA-29B.....	86
5.7	AUSBLICK UND MEDIZINISCHE RELEVANZ.....	87
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	91
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	101
	TABELLENVERZEICHNIS.....	102
	DANKSAGUNG.....	103
	PUBLIKATIONEN.....	104
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	105

Verwendete Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Amp	Ampicillin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
c	centi
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CoCl ₂	Kobaltchlorid
Cy3	Cyanin-3
Cy5	Cyanin-5
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dextrin, Dex	(2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2	17 β -Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
ESR1/2	Östrogenrezeptorgene
Et-1	Endothelin-1
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
<i>FBS (FCS)</i>	<i>Fetal bovine serum (fetal calf serum)</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
kg, mg, μ g, ng	Kilogramm, milligramm, mikrogramm, nanogramm
KM	Kardiomyozyten
l	Liter
LB	<i>Luria broth</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LV	linker Ventrikel
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
M	molar bzw. mol/l
mA	milliampere
MH	Myokardhypertrophie
min	Minute(n)
miR	Mikro-Ribonukleinsäure
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
mM, μ M, nM	millimolar, mikromolar, nanomolar
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Größe der Stichprobe

NP-40	Nonidet P-40
nt	Nukleotid
OP	Operation
OVX	Ovarektomie
p	Signifikanzwert
P4	Progesteron
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGR	Progesteronrezeptorgen
PR	Progesteronrezeptor
pre-miRNA	<i>precursor</i> miRNA
pri-miRNA	<i>primary</i> miRNA
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Sham	Schein-
SOVX	schein-ovarektomiert
Std.	Stunde(n)
T	Thymin
TAC	<i>Transverse aortic constriction</i> (Aortenkonstriktion)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>

Abkürzungen von Gennamen

ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BMP6	bone morphogenetic protein 6
Cdc42	cell division cycle 42
COL1A1/2	collagen, type I, alpha 1
COL3A1	collagen, type III, alpha 1
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DNMT	DNA (cytosine-5-)-methyltransferases
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
ESR1/2	estrogen receptor 1/2
ERK	extracellular-signal regulated kinases
GPCR	G protein-coupled receptor
GATA4	GATA binding protein 4
GSK-3	glykogen synthase kinase 3
HAND2	heart and neural crest derivatives expressed 2
HDAC	histon deacetylases
HCN2	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2

HCN4	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
IRX5	iroquois homeobox 5
AP1 (JUN)	jun proto-oncogene
MTDH	metadherin
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MEF2	myocyte enhancer factor-2
MYOD1	myogenic differentiation 1
MYH11	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PGR	progesterone receptor
PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)
RHOA	ras homolog family member A
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
SRF	serum response factor
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
SMAD1	SMAD family member 1
SMAD3	SMAD family member 3
SMAD4	SMAD family member 4
SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
TGF β	transforming growth factor, beta 1

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Identifizierung geschlechtsspezifisch exprimierter miRNAs und ihrer Rolle im Frühstadium linksventrikulärer Hypertrophie. Geschlechterunterschiede bei der Entwicklung, Ausprägung und Morbidität von kardialer Hypertrophie sind seit langem bekannt, die molekularen Ursachen sind jedoch weitestgehend unklar. Geschlechtsspezifische Genexpression bei kardialer Hypertrophie und geschlechterabhängige Effekte von Östrogen im Herzen wurden bereits nachgewiesen, aber für miRNAs ist über solche Regulationen im Herzen noch nichts bekannt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass eine kurzzeitige Behandlung mit Estradiol *in vivo* zu einer weitreichenden, geschlechtsspezifischen Regulation von miRNAs in murinen Kardiomyozyten führt. Insgesamt 11 miRNAs wurden durch Estradiol nur bei den Weibchen inhibiert. Im gesamten linken Ventrikel hatte Progesteron im Vergleich mit Estradiol einen stärkeren Einfluss auf die Regulation von miRNAs. Die Wirkung von Progesteron war hier ebenfalls limitiert auf das weibliche Geschlecht und führte zu einer Inhibition von 8 miRNAs.

Im Fall von miR-26a, einer durch Estradiol und Progesteron geschlechtsspezifisch regulierten miRNA, konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es die Expression des Progesteronrezeptors in einer Kardiomyozytenzelllinie hemmt. Untermauert wurde diese Beobachtung mit der Detektion einer verstärkten Expression des Progesteronrezeptors im hypertrophen, linken Ventrikel, die mit einer entsprechenden Herabregulation von miR-26a einherging. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von miR-26a und gleichzeitige Stimulation mit Progesteron in einer Kardiomyozytenzelllinie vor Apoptose schützt. Diese Ergebnisse sowie der beobachtete starke Effekt von Progesteron auf die Expression von miRNAs im linken Ventrikel belegen den bisher unterschätzten Einfluss von Progesteron im Herzen und verlangen nach einer verstärkten Erforschung der Rolle von Progesteron und seiner Rezeptoren bei kardiovaskulären Erkrankungen. In dieser Studie wurde mit miR-26a ein neues Zielmolekül identifiziert, um den durch Apoptose vermittelten Übergang von der kompensatorischen zur maladaptiven, exzentrischen Form kardialer Hypertrophie zu verhindern.

Die stärkste, geschlechtsspezifische Inhibition durch Estradiol in Kardiomyozyten und im linken Ventrikel wurde für miR-21 nachgewiesen. Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, dass Ovariectomie zu einem Anstieg von miR-21 im Herzen führt und dass Estradiol und Progesteron synergistisch den Anstieg von miR-21 bei Kardiomyozytenhypertrophie inhibieren. Es ist bekannt, dass miR-21 positiv die Entwicklung von Fibrose reguliert.

Weiterhin wurde eine geschlechtsspezifische Expression von miR-29b, einer anti-fibrotisch wirkenden miRNA, mit höheren Werten bei Weibchen im Frühstadium kardialer Hypertrophie identifiziert. Dies entspricht der nachgewiesenen, geringeren Entwicklung von Fibrose bei kardialer Belastung im weiblichen Geschlecht und lässt einen funktionellen Zusammenhang vermuten.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass miR-29b und miR-21 an der Entwicklung von Geschlechterunterschieden bei Fibrose teilhaben.

Summary

The aim of this work was to identify sex-specifically expressed miRNAs and their role in left ventricular hypertrophy. Sex-related differences in the development, severity and morbidity of cardiac hypertrophy are well known. The underlying molecular mechanisms are, however, still unclear. Sex-specific expression of mRNAs and proteins in cardiac hypertrophy and sex-dependent effects of estrogen have been detected in the heart, but for miRNAs such regulations are not yet known.

The results of this study show for the first time that treatment with estradiol *in vivo* leads to a broad, sex-specific regulation of many miRNAs in murine cardiomyocytes. 11 miRNAs were shown to be inhibited by estradiol only in females. Comparing the effects of progesterone and estradiol on the regulation of miRNAs in the entire left ventricle, progesterone displayed stronger effects than estradiol. The effect of progesterone in the left ventricle was also limited to the female sex and led to an inhibition of 8 miRNAs.

It could be proved that one sex-specifically regulated miRNA, miR-26a, inhibits the expression of the progesterone receptor in a cardiomyocyte cell line. Supporting this observation, our findings reveal a downregulation of miR-26a and a corresponding upregulation of the progesterone receptor in the hypertrophic left ventricle. Moreover, it could be shown that an inhibition of miR-26a and a simultaneous stimulation with progesterone in cardiomyocytes protects against apoptosis. These results and the observed powerful effect of progesterone on the expression of miRNAs in the left ventricle emphasize the influence of progesterone in the heart and call for an increased research of progesterone and its receptors in cardiovascular diseases, an area still underrepresented in medical research. This study has identified miR-26a as a new target to potentially prevent the transition from compensatory to the maladaptive, eccentric form of cardiac hypertrophy by apoptosis.

The strongest sex-specific inhibition by estradiol was detected for miR-21 in cardiomyocytes and in the left ventricle. Accordingly, an increase of miR-21 in the left ventricle after ovariectomy was observed and it could be shown that estradiol and progesterone synergistically inhibit the induction of miR-21 during cardiomyocyte hypertrophy. It is known that miR-21 positively regulates the development of fibrosis.

In addition, a sex-specific expression of miR-29b, an anti-fibrotic miRNA, with higher values in females was identified during the early stage of cardiac hypertrophy. This is consistent with observations of a lower degree of fibrosis in females and therefore indicates a functional relationship.

The results suggest that miR-29b and miR-21 contribute to sex-related differences in the development of fibrosis in cardiac hypertrophy.

1 Einleitung

1.1 Linksventrikuläre Hypertrophie

Herzkrankheiten sind die häufigste Todesursache in den westlichen Staaten. Die Ursachen sind multifaktoriell; sie sind genetisch und umweltbedingt. Zum einen liegen sie in Lebensgewohnheiten wie zu wenig Bewegung, fettreichem Essen (Übergewicht), Rauchen und Stress. Diese Faktoren führen zu Krankheiten wie Bluthochdruck, arterieller Verkalkung oder Diabetes, die bei chronischen Zuständen und ohne hinreichende medizinische Behandlung sekundär zu Veränderungen des Herzens und linksventrikulärer Hypertrophie führen. Weiterhin gibt es eine Vielzahl von Genvarianten, die die Entstehung von myokardialer Hypertrophie (MH) begünstigen¹⁻².

Linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) ist die kompensatorische Reaktion des Herzens auf Stressfaktoren wie Bluthochdruck, Aortenstenose, Myokardinfarkt, Übergewicht, Schwangerschaft oder Training. Um den gesteigerten Pumpanforderungen zu genügen und den mechanischen Stress auf die Herzwände zu verringern, reagiert das Herz mit einer Verdickung der Ventrikelwände. Es wird unterschieden zwischen pathologischer und physiologischer LVH. Physiologische Hypertrophie des Herzens entsteht z. B. während der Schwangerschaft oder durch sportliche Aktivitäten („Sportlerherz“)³⁻⁵. Sie läuft ohne apoptotische oder fibrotische Veränderungen ab und ist reversibel⁶⁻⁸. Pathologische Hypertrophie wird durch Bluthochdruck oder durch Aortenstenose ausgelöst und geht einher mit weitreichenden strukturellen Veränderungen des Herzens, das *kardiale Remodeling*. Apoptotisch absterbende Myozyten werden durch proliferierende Fibroblasten ersetzt, verursachen eine übermäßige Produktion und Akkumulation von Kollagenen und Veränderungen der extrazellulären Matrix; es entsteht interstitielle Fibrose^{4 9 10}. Es kommt ausserdem zur Reexpression fötaler Gene⁷. Diese zunächst nützlichen, kompensatorischen Veränderungen führen dauerhaft zu einer krankhaften, maladaptiven Umwandlung des Herzmuskels, steigern das Risiko von Arrhythmien und enden im chronischen Zustand mit Herzversagen¹¹⁻¹². Initiatoren für molekulare Veränderungen bei pathologischer Myokardhypertrophie sind mechanischer Stress¹³⁻¹⁴, sowie die Ausschüttung neurohumoraler Faktoren wie Angiotensin und Endothelin-1¹⁵⁻¹⁶. Dadurch aktivierte und für die Hypertrophieentwicklung entscheidende Signalwege umfassen Calcineurin-NFAT, PI3K/Akt/GSK-3, ERK-MAPK, GPCRs etc^{9 17}. Reexprimierte Transkriptionsfaktoren, die zu vermehrter Proteinproduktion und den strukturellen Veränderungen führen, sind u. a. MEF2, HDAC, SRF und GATA4^{9 17}.

Anhand ihrer morphologischen Ausprägungsformen wird die Hypertrophie in konzentrische oder exzentrische Hypertrophie unterteilt^{4 9 18-19}. Konzentrische Hypertrophie bezeichnet eine relative Verdickung der Ventrikelwand im Verhältnis zum Kammerolumen¹⁹. Diese Veränderung, vorrangig hervorgerufen durch gesteigerte Drucklast (*pressure overload*), entsteht durch neue parallel hinzugefügte Sarkomere und somit in die Breite wachsende Kardiomyozyten^{4 9 19}. Bei der exzentrischen Hypertrophie kommt es zu einem Anstieg der Herzmasse mit gleichzeitiger Vergrößerung der Kammern^{3 19}. Dies entsteht vor allem bei gesteigerter Volumenlast (*volume overload*) durch seriell hinzugefügte Sarkomere und damit in die Länge wachsende Myozyten^{4 9 19}. Bei chronischen Herzkrankheiten kann exzentrische Hypertrophie als Folgestadium der konzentrischen Hypertrophie durch das Absterben von Myozyten und Verdünnung der Wände entstehen¹². Dies führt zur Herzdilatation, Verlust der Pumpfähigkeit und größerem klinischen Risiko für Herzversagen.

1.1.1 Geschlechterunterschiede bei pathologischer Myokardhypertrophie

Frauen leben in Deutschland durchschnittlich ca. 5 Jahre länger als Männer (Statistisches Bundesamt, 2011). Bei dem Durchschnittsalter kardiovaskulär zu erkranken liegen Frauen ca. 10 Jahre zurück²⁰. Geschlechterunterschiede bei Myokardinfarkt²¹⁻²², Bluthochdruck²³, Herzversagen²⁴⁻²⁵ und kardialem Remodeling²⁶⁻²⁷ sind bekannt. Auch bei der Inzidenz, der klinischen Prognose und der Ausprägung von MH und Herzinsuffizienz gibt es Unterschiede zwischen den Geschlechtern. In der *EuroHeart Failure*-Studie von 2003 verglichen Wissenschaftler die Daten von ca. 5000 Patienten mit diagnostizierter Herzinsuffizienz; 61 % der Männer hatten mittel bis starke linksventrikuläre, systolische Dysfunktion, während nur 35 % der Frauen von dieser Funktionsminderung des Herzens betroffen waren²⁸. Carroll et al.²⁷ beobachteten in einer weiteren Patientengruppe, dass bei gleichem Ausmaß von Aortenstenose bei fast allen gemessenen Herzfunktionen Männer signifikant schlechtere Werte aufwiesen als Frauen. Viele Studien zeigten weiterhin, dass die Entwicklung und die Ausprägung von MH bei Frauen geringer ist²⁹⁻³¹. In einem Tiermodell wurde gezeigt, dass Geschlechterunterschiede erst in der chronischen Form von MH auftreten³². Die bessere klinische Prognose von Frauen bei MH und Herzinsuffizienz wird darauf zurückgeführt, dass diese eher die konzentrische Hypertrophie entwickeln, während Männer früher zur exzentrischen und dilatativen Form der Hypertrophie tendieren, die schneller zu Herzversagen führt^{20 28 30 33}. Es kann weiterhin ein schnellerer Rückgang von MH nach Aortenklappenimplantation bei Frauen im Vergleich zu Männern beobachtet werden³⁴. Auch auf zellulärer Ebene sind Geschlechterunterschiede bekannt; Frauen entwickeln z. B. weniger

Kardiomyozytenapoptose bei Herzversagen^{26 35-36}, welches dazu beitragen könnte, dass Männer schneller zur dilatativen Form von MH tendieren.

Molekulare Untersuchungen zeigten, dass MH bei männlichen Tieren hauptsächlich zu einer Expressionsveränderung der Remodeling-Gene führt³². Auch bei Männern mit Aortenstenose wurde gezeigt, dass Gene der extrazellulären Matrix (Kollagene I/III, MMP2/9) stärker heraufreguliert werden als bei Frauen mit Aortenstenose³⁴. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung männlicher und weiblicher Fibroblasten mit E2 zu einer entgegengesetzten Expression dieser Gene führt; bei Weibchen wird die Expression dieser Gene durch E2 gehemmt, während bei den Männchen die Expression induziert wird³⁴. In Übereinstimmung damit wurde nachgewiesen, dass männliche Tiere bei MH ein stärkeres Maß an Fibrose entwickeln³⁷. Bei Weibchen sind bei MH vorrangig Gene des Metabolismus reguliert³².

Es wurde gezeigt, dass Geschlechterunterschiede bei MH am stärksten vor der Menopause der Frauen auftreten und nach der Menopause zurückgehen³⁸. Man geht daher von einer protektiven Rolle der weiblichen Geschlechtshormone auf das Herz aus^{20 39-40}. Viele Studien konnten bereits zeigen, dass weibliche Hormone die Ausprägung von Hypertrophie reduzieren⁴¹⁻⁴². Langangelegte Studien mit Hormonersatztherapien für den Schutz vor Herzkrankheiten mussten jedoch abgebrochen werden, weil diese eher eine entgegengesetzte Wirkung zeigten⁴³⁻⁴⁷. Über die Zusammensetzung⁴⁸⁻⁵⁰, den optimalen Zeitpunkt⁵¹, die Dosierung und den Einnahmeweg der Hormone^{48 50} wird seitdem diskutiert.

1.2 MikroRNAs

MikroRNAs (miRNAs) sind 21-22 nt lange, nicht-kodierende RNAs. Durch homologe Bindung an die 3'-UTR von Zielgen-mRNAs inhibieren sie deren Translation. Abhängig von der Homologie können miRNAs als Translationsrepressoren wirken, oder bei exakter Sequenzhomologie den Abbau der mRNAs herbeiführen⁵²⁻⁵⁴.

MiRNAs sind wie andere Gene im Genom kodiert. Ihre Transkription erfolgt durch die RNA-Polymerase II⁵⁵. Die so entstehenden pri-miRNAs (*primary* miRNAs) sind 100-1000 nt lang und können in einer Transkriptionseinheit mehrere, verschiedene miRNAs umfassen. Diese pri-miRNAs werden im Nukleus durch den ‚Drosha-Mikroprozessor-Komplex‘, bestehend aus dem RNaseIII-Enzym Drosha, dem RNA-Bindeprotein DGCR8 und mehreren, interagierenden Komponenten, in ca. 70 nt lange *hairpin*-förmige pre-miRNAs (*precursor* miRNAs) weiterprozessiert⁵⁶ (siehe auch Abbildung 1). Die pre-miRNAs werden daraufhin mit Hilfe des Enzyms Exportin-5 aktiv in

das Zytoplasma exportiert⁵⁷. Im Zytoplasma erfolgt die Weiterverarbeitung in doppelsträngige miRNAs anhand des Dicer-Komplexes⁵⁸. Durch die Trennung der beiden Doppelstränge entsteht die reife einzelsträngige miRNA, die daraufhin in den RISC (*RNA-induced silencing complex*)–Komplex eingebunden wird. Dieser besteht u. a. aus den Proteinen Dicer, TRBP und Ago2⁵⁹. Innerhalb des RISC-Komplexes gelangt die miRNA an die 3'UTR ihrer Zielgene und bindet diese durch homologe Basenpaarbindung. Die Bindung des gesamten miRNA-RISC-Komplexes an die Zielgen-mRNA führt zur Hemmung der Translation oder sogar zum Abbau der mRNA des entsprechenden Gens. Zellulären Strukturen, den *P-bodies*, wurde nachgewiesen, an der miRNA/mRNA-Hemmung teilzuhaben⁶⁰. Sie sammeln gehemmte mRNAs und verhindern für längere Zeit ihren Abbau sowie den Zugang von Translationskomplexen.

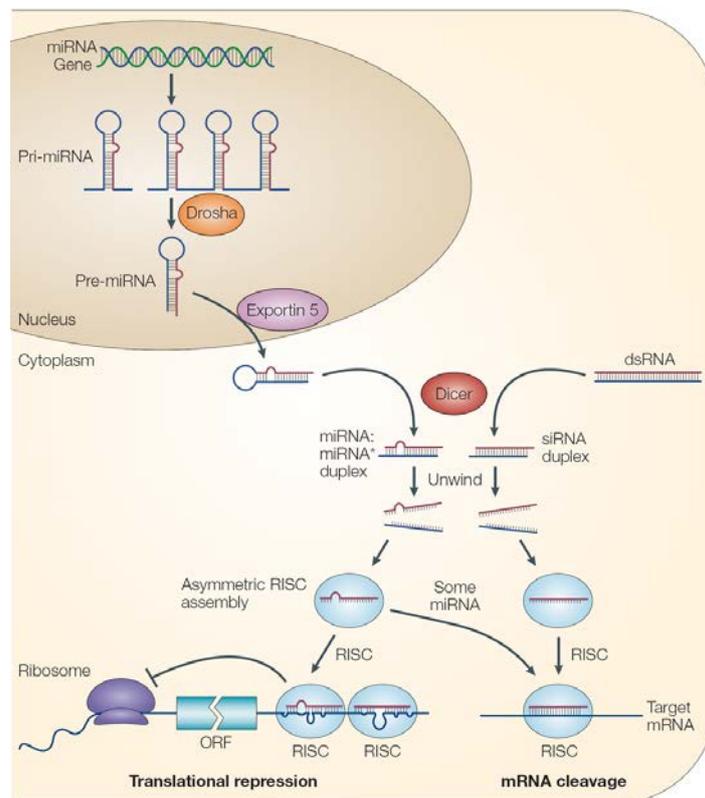


Abbildung 1: **MiRNA-Synthese und translationelle Inhibition durch miRNAs.** (Abbildung aus He et al., 2004⁶¹)

Organismen, denen das Dicer Enzym fehlt und die somit keine reifen miRNAs generieren können, sind embryonal letal⁶²⁻⁶³. Beim Menschen sind derzeit 1577 pre-miRNAs und 1921 miRNAs, bei der Maus (*M. musculus*) 741 pre-miRNAs und 1157 miRNAs bekannt (miRBase, Juli 2012).

1.2.1 Transkriptionelle Regulation von miRNAs

MiRNAs werden im Nukleus transkribiert und ihre Expression wird wie die anderer Gene anhand von Transkriptionsfaktoren reguliert. MiRNA-Gene liegen entweder als eigenständige Gene mit Promoter vor oder sind intron- oder exon-ständig innerhalb anderer Gene kodiert und werden gemeinsam mit diesen kotranskribiert. Bekannte Transkriptionsfaktoren von miRNAs im Herzen sind u.a. SRF, MYOD, MEF2, und MYOCD⁶⁴⁻⁶⁷. Es wurde gezeigt, dass ca. 169 miRNA-Gene (etwa ein Drittel aller zu dem Zeitpunkt bekannten miRNAs) von Säugetieren mindestens ein SRF-Bindeelement (CArG) in ihrer Promotorregion haben^{66 68}. SRF wurde als induzierender Faktor für miR-1 und -133 und als inhibierend für miR-21 nachgewiesen⁶⁹. Für miR-1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass es transkriptionelles Ziel von MyoD und Mef2 ist⁶⁷. Weitere Transkriptionsfaktoren von miRNAs im Herzen umfassen GATA4, NFAT, STAT3, SMAD3, AP1⁶⁸. Diese, sowie die oben genannten Transkriptionsfaktoren, gehören zu den wichtigsten im Herzen. Man spricht daher davon, dass die Transkription von miRNAs im Herzen von einem Netzwerk myogener Faktoren kontrolliert wird^{64 70}. Die transkriptionelle Regulation von miRNAs und mRNAs wird somit zum großen Teil von den gleichen Faktoren gesteuert.

1.2.2 Inhibition von Translationen durch miRNAs

Schätzungen zufolge kann eine durchschnittliche miRNA die Expression von bis zu zweihundert Zielgenen regulieren⁷¹⁻⁷², häufig mehrere Zielgene des gleichen Signalwegs. Eine Zielgen-mRNA kann ausserdem von mehreren miRNAs synergistisch reguliert werden. Eine kooperative Reprimierung ist besonders wahrscheinlich, wenn sich die jeweiligen Bindestellen innerhalb der 3'UTR in lokaler Nähe zueinander befinden⁷³⁻⁷⁴. Viele Gene scheinen durch selektiven Druck spezifische miRNA-Bindestellen in ihrer 3'UTR über viele Spezies hinweg konserviert zu haben⁷⁵. Andere wiederum scheinen unter evolutionären Druck zu stehen, komplementäre Bindestellen von koexprimierten miRNAs, z.B. durch Reduktion der 3'UTR-Länge, zu vermeiden⁷⁶⁻⁷⁷. Dies bekräftigt die funktionelle Bedeutung von miRNAs im Laufe der Evolution und in Prozessen in der Entwicklung der Organismen.

MiRNAs binden über die sogenannte *seed*, eine hochkonservierte 7-8 nt lange Sequenz am 5'-Ende der miRNA, mittels komplementärer Basenpaarbindung an die 3'-UTR der Zielgen-mRNA⁷⁸. Sequenzstudien von mRNA-Regulationen nach miRNA-Überexpression konnten zeigen, dass die *seed* und *seed*-umgebende Nukleotide in 3'UTRs der regulierten Gene die am stärksten korrelierenden Motive darstellten⁷⁹. Eine, der *seed* komplementäre, in der 3'UTR der mRNA vorhandene Sequenz ist jedoch

nicht immer eine hinreichende Bedingung für eine funktionelle Repression, ebenso ist eine komplementäre *seed* nicht immer notwendig^{73 80}.

Verschiedene Mechanismen von miRNA-induzierter Translationsinhibition durch Bindung des RISC-Komplexes an die Zielgen-mRNA wurden bislang nachgewiesen. Sie reichen von kotranslationeller Proteindegradierung über die Inhibierung der Translationsinitiierung oder -elongation bis hin zum *Drop-off* des Ribosomkomplexes⁵⁴. Bei einer durch den miRNA-RISC-Komplex ausgelösten Deadenylierung kommt es darüber hinaus in einigen Fällen zum vollständigen Abbau der Zielgen-mRNA⁸¹. Microarray-Analysen von Zielgen-Transkripten bei miRNA-Transfektionen weisen daraufhin, dass solche Degradierungen relativ häufig sind^{71 79}. Einige Studien zeigten weiterhin, dass miRNA-Bindungen an die 5'UTRs von Genen ebenfalls vorkommen und die Expression dieser Zielgene beeinflussen können⁸². Dies scheint aber in der Minderheit aller Fälle stattzufinden, denn Sequenzstudien zwischen transfizierten miRNAs und regulierten Zielgenen ergaben nur in der 3'UTR nicht in der 5'UTR signifikante Korrelationen⁷⁹.

1.2.3 Die Rolle von miRNAs bei linksventrikulärer Hypertrophie

Auch an physiologischen und pathologischen Prozessen des Kardiovaskularsystems sind miRNAs beteiligt. Grundlegende Rollen von miRNAs im Herzen wurden anhand von Deletionen verschiedener Komponenten der miRNA-Biogenese identifiziert. So wurde mittels herzspezifischer Dicer-Deletion gezeigt, dass miRNAs essentiell für die Kardiogenese sind⁸³. In adulten Mäusen löste ein kardiomyozytenspezifischer *Knock-out* von Dicer Ventrikelvergrößerung, hypertrophes Wachstum der Kardiomyozyten, Fibrose, Induktion fötaler Gene und weitere funktionelle Defekte aus⁸⁴. Eine kardiomyozytenspezifische DGCR8-Deletion führte zur Dilatation des linken Ventrikels und zu frühzeitigem Herzversagen⁸⁵. Bei Menschen mit Herzversagen konnte darüber hinaus eine Abnahme der Proteinlevel von Dicer nachgewiesen werden⁸⁶.

Die im Herzen am stärksten exprimierten miRNAs umfassen miR-1, -133, -30, -126-3p, -26a und let-7⁸⁷. Tiefensequenzierungsdaten ergaben, dass miR-1 einen ca. 40 %igen Anteil aller miRNAs im Herzen ausmacht⁸⁵. Muskelspezifisch und gemeinsam exprimierte miRNAs sind miR-1 und miR-133⁶⁷⁻⁶⁸. Ihre Expression ist bei LVH reduziert^{65 67 83 88-89}. *In vitro*-Überexpression von miR-1 und -133 inhibierte Myozytenhypertrophie und *in vivo*-Inhibition von miR-133 verursachte starke Hypertrophie⁹⁰. Identifizierte Zielgene von miR-133 sind RhoA, Cdc42, Nelf-A/WHSC2⁹⁰. Zielgene von miR-1 sind Transkriptionsfaktoren von Skelettmuskelgenen wie HDAC4⁶⁵ und IRX5⁸³ und die Schrittmacherkanäle HCN2 und HCN4⁸⁹. Darüber hinaus wurde durch Überexpres-

rung von miR-1 während der Entwicklung des Herzen die Expression von Hand2 inhibiert und die Zahl an proliferierenden ventrikulären Kardiomyozyten reduziert⁶⁷. Eine miR-1-Knockout-Maus zeigte verschiedene Fehlfunktionen im Herzen, wie z. B. in der Regulation der Zellzykluskontrolle, Kardiomorphogenese und elektrischen Weiterleitung⁸³. Eine weitere herzspezifische miRNA, miR-208, ist in einem Intron vom α -MHC-Gen kodiert und reguliert durch Inhibition von Thrap1 die Expression von β -MHC⁹¹. Tiere mit einer genetischen Deletion von miR-208 waren vor Myozytenhypertrophie und Fibrose geschützt⁹¹. Einzelne miRNAs sind somit in der Lage die Entwicklung oder das Fortschreiten von MH grundlegend zu beeinflussen⁹². Überexpression von miR-195 im Herzen von Mäusen beispielsweise war ausreichend um krankhaftes Herzwachstum und Herzversagen auszulösen^{92 93}. Die Überexpression von speziellen miRNAs in kultivierten Kardiomyozyten führte zur Aktivierung von fötalen Genen und zu zellulärer Hypertrophie⁹³⁻⁹⁴.

Abgesehen von den muskelspezifischen miRNAs miR-1, miR-133 und miR-208 werden viele weitere miRNAs während MH differentiell exprimiert, wie z. B. miR-21, -23, -24, -26, -27, -29, -30, -149, -195, -199 und -214^{88 95-96 97 93}. Viele der Regulationen wurden in Tiermodellen kardialer Hypertrophie identifiziert. Untersuchungen der miRNA-Expressionen bei Menschen mit Aortenstenose⁹⁸ oder Herzversagen^{93-94 99} zeigten jedoch, dass viele beobachtete Regulationen bei Mensch und Tier übereinstimmen.

In den nächsten Abschnitten werden die bisher bekannten Funktionen von drei im Herzen relevanten miRNAs zusammengefasst, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

1.2.4 MiRNA-21

MiR-21 ist eine nahezu ubiquitär exprimierte miRNA, deren Level bei vielen pathologischen Zuständen stark zunimmt. Ihre Expression wird in den meisten Tumortypen stark verstärkt, weshalb sie auch als *oncomir* bezeichnet wird. Ebenso spielt miR-21 im Herzen eine wichtige Rolle und ist bei vielen Herzkrankheiten heraufreguliert. Bei MH ist sie eine der am stärksten überexprimierten miRNAs^{88 93 95}. Im Herzen sind für miR-21 profibrotische und anti-apoptotische Funktionen nachgewiesen worden. Thum et al.⁹⁷ zeigten, dass miR-21 hauptsächlich in den kardialen Fibroblasten exprimiert wird und hier bei Hypertrophie stark induziert wird. Mithilfe von Antagomirbehandlung *in vivo* konnten sie nachweisen, dass miR-21 Spry1 inhibiert und somit die ERK-MAP-Kinase-Aktivität reguliert⁹⁷. Dies führte zu verringertem Ausmaß von kardialer Fibrose, kardialem Remodeling, Myozytenhypertrophie und kardialer Dysfunktion⁹⁷. In einer anderen Studie konnten jedoch in miR-21-Knockout-Mäusen keine Unterschiede zu den wildty-

pischen Tieren in Hypertrophie- und Fibroseentwicklung, sowie im MAP-Kinase-Signalweg beobachtet werden¹⁰⁰. Eine genetische Deletion von miR-21 könnte durch kompensatorische Mechanismen¹⁰⁰⁻¹⁰¹ ausgeglichen werden und weist häufig Unterschiede zu kurzfristiger, pharmakologischer Inhibition von Zielgenen auf¹⁰¹. In der gleichen Studie konnte aber eine Behandlung mit LNA-modifizierten miR-21-Antagomirs ebenfalls keinen protektiven Effekt auf LVH und Fibrose bewirken¹⁰⁰. Eine neue Publikation konnte jedoch wieder zeigen, dass die Inhibition von miR-21 die Entwicklung von Fibrose im atrialen Myokard verhindert¹⁰². Darüber hinaus ist für miR-21 auch in anderen Organen (Niere, Lunge) eine pro-fibrotische Funktion nachgewiesen worden¹⁰³⁻¹⁰⁶. In Ischämie/*Preconditioning*-Studien konnte miR-21 via Pcd4 eine protektive, anti-apoptotische Rolle nachgewiesen werden¹⁰⁷. Validierte Zielgene von miR-21 sind Pcd4, RhoB, Sprouty1/2, Apaf1, Faslg, Pten, Btg2, Bcl-2 etc.

MiR-21 gehört weiterhin zu den miRNAs, bei denen eine Regulation durch E2 und MPA in Brustkrebszellen¹⁰⁸ und endometrialen Zellen¹⁰⁹ identifiziert wurde (siehe 1.3.2 und 1.3.3).

1.2.5 MiRNA-26

MiR-26 gehört zu den im Herzen am stärksten exprimierten miRNAs, wurde hier bislang jedoch weit weniger stark untersucht als miR-21. Ihre funktionelle Rolle wurde hauptsächlich in apoptotischen Prozessen identifiziert. Während der Entwicklung von Myoblasten zu Myotuben nimmt miR-26a stark zu und trägt durch die Repression von Ezh2, einem Inhibitor der Skelettmuskelzellendifferenzierung, zur Myogenese bei¹¹⁰. Zhang et al.¹¹¹ bestätigten EZH2 und identifizierten MTDH als Zielgene in MCF7-Brustkrebszellen und beobachteten einen proapoptotischen Effekt von miR-26a. Auch während der Differenzierung von menschlichen, glatten Muskelzellen der Aorta (AoSMCs) ist die Expression von miR-26a hochreguliert¹¹². Die Autoren dieser Studie zeigten weiterhin, dass miR-26a die Expression von ACTA2, MYH11, SMAD1 und SMAD4 reguliert und die Inhibition von miR-26a in SMCs zur Proliferationsreduktion und zu einem Anstieg von Apoptose führt. In Kardiomyozyten wurde wiederum eine proapoptotische Funktion von miR-26a durch direkte Inhibition von GSK-3 β und eine Regulation des Bcl-2/Bax-Verhältnisses nachgewiesen¹¹³.

MiR-26a wurde ebenfalls als E2- und MPA-regulierte¹⁰⁹ miRNA identifiziert (siehe 1.3.2 und 1.3.3), sowie als eine der miRNAs, die die Expression des Progesteronrezeptors reguliert (1.3.4).

1.2.6 MiRNA-29

Die Familie der miR-29 besteht aus miR-29a, -b, und -c. Sie werden bicistronisch exprimiert, wobei jeweils miR-29a und -29b-1 und miR-29c und -29b-2 koexprimiert werden¹¹⁴. Die bislang identifizierten Funktionen von miR-29 liegen in der Regulation von Kollagenen und Fibrose¹¹⁴⁻¹¹⁶, sowie von DNA-Methyltransferasen¹¹⁷⁻¹¹⁸. Im Herzen wird miR-29 hauptsächlich in den Fibroblasten exprimiert⁷⁰ und in der Randzone eines Myokardinfarkts (MI) wurde ihre Expression stark reduziert detektiert¹¹⁴. In der gleichen Studie konnte nachgewiesen werden, dass TGF β die Transkription von miR-29 hemmt, während miR-29 wiederum die Expression von Elastin (ELN), Fibrillin 1 (FBN1) und den Kollagenen COL1A1/2 und COL3A1 reguliert¹¹⁴. Weiterhin wurde gezeigt, dass miR-29b die Expression der Methyltransferasen DNMT3A und -3B und DNMT1 reguliert und eine Überexpression von pre-miR-29b zur Demethylierung und darauffolgender Reexpression von Östrogenrezeptor- α führt¹¹⁷.

1.3 Östrogen und Progesteron

Östrogene sind Steroidhormone und gehören zu den weiblichen Geschlechtshormonen. Ihr vorherrschendes und aktivstes Molekül bei Menschen ist 17 β -Estradiol (E2). Östrogene werden zum größten Teil in den Eierstöcken produziert, daraufhin ins Blut abgegeben und zirkulieren somit durch den gesamten Körper. Serumlevel von E2 schwanken bei Frauen abhängig vom Menstruationszyklus zwischen 30-600 ng/l und sinken in den Wechseljahren unter 10 ng/l. Bei Männern liegen die Werte von E2 ebenfalls um 10 ng/l und sind somit mindestens 10-20-fach geringer als bei geschlechtsreifen Frauen. E2 wird bei den Männern hauptsächlich in den Hoden und durch Umwandlung von Testosteron produziert. Bei C57BL/6-Mäusen liegen die E2-Spiegel bei Weibchen um 10 ng/l und bei Männchen bei ca. 4 ng/l³¹. Eine weitere wichtige Gruppe der weiblichen Geschlechtshormone ist die der Gestagene, deren Hauptvertreter Progesteron (P4) ist, das bei Frauen ebenfalls hauptsächlich im Eierstock produziert wird. Während der Schwangerschaft ist es von großer Bedeutung und Serumwerte können um das 200-fache steigen. Außerhalb der Schwangerschaft sind bei Frauen vor der Menopause abhängig vom Zyklus Werte zwischen 0,3-25 μ g/l im Blut normal. Nach der Menopause gleichen sich die Werte mit 0,2 μ g/l denen der Männer an.

E2 und P4 übermitteln ihre Wirkung als Liganden durch Bindung an die entsprechenden Rezeptoren, den Östrogen- (ER) oder Progesteronrezeptoren (PR). Direkte, genomische Effekte werden durch die Bindung an zytoplasmatische Östrogenrezeptoren erzielt, welche daraufhin ihre Konformation verändern und in den Zellkern wandern¹¹⁹.

¹²⁰. Hier binden sie als Dimere mit verschiedenen Kofaktoren (z. B. Ap1, Sp1) an Promotoren spezifischer Zielgene und verändern deren transkriptionelle Aktivität¹²¹⁻¹²². Für die ERs sind spezielle Erkennungssequenzen bekannt; die *estrogen response elements* (ERE = 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3'). Nicht-genomische und somit indirekte, aber schnellere Wirkung können Steroide durch membrangebundene Rezeptoren (wie ER, GPR30 und MAPR¹²³⁻¹²⁴) vermitteln. Ligandenbindung löst dabei intrazelluläre Signalkaskaden aus. Weitere nicht-genomische Effekte werden durch Bindung an die zytoplasmatischen Rezeptoren und folgenden intrazellulären Interaktionen mit Kofaktoren erreicht.

Zwei verschiedene ER-Isoformen wurden identifiziert; ER α (ESR1) und ER β (ESR2)¹²⁵⁻¹²⁶. Sie werden von verschiedenen Genen kodiert, zellspezifisch unterschiedlich stark exprimiert und haben verschiedene Zielgene und Funktionen. In einigen Fällen spielen sie entgegensätzliche Rollen. So wurde ER α als proliferativ gezeigt, während ER β anti-proliferativ wirkte¹²⁷. Studien in Zellkultur konnten weiterhin belegen, dass ER β die Aktivität von ER α inhibiert¹²⁸. Auch im Herzen werden die beiden Isoformen exprimiert. Anhand von ER β -KO-Tieren konnte nachgewiesen werden, dass die ER β -Deletion bei Weibchen zu verstärkter Hypertrophie führt, welches auf eine protektive Rolle von ER β hindeutet^{31 129}. Weiterhin wurde gezeigt, dass ER β -KO-Tiere stärkere Kardiomyozytenhypertrophie und Apoptose bei Hypertrophie entwickeln³⁷. Bei Weibchen verringerte ER β die Entwicklung von Fibrose^{37 130}. Physiologische Effekte von E2 auf das Herz umfassen Vasodilatation durch verstärkte Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion¹³¹⁻¹³², Verringerung des Blutdrucks⁴⁹, Senkung des LDL/HDL-Cholesterolspiegels sowie antioxidative Effekte¹³³.

Der Progesteronrezeptor (PR) kommt in drei Isoformen vor, PR-A (94 kDa), PR-B (116 kDa) und PR-C (60 kDa). Die Isoformen werden anhand unterschiedlicher Promoterregionen vom gleichen Gen transkribiert; PR-A ist eine gekürzte Version von PR-B mit 164 Aminosäuren am N-terminalen Ende weniger¹³⁴⁻¹³⁵. PR-C ist wesentlich kleiner als die beiden anderen Isoformen, es besitzt keine DNA-Bindestelle und es ist noch fraglich, ob es *in vivo* überhaupt exprimiert und funktionell tätig ist¹³⁵. Obwohl PR-A und PR-B zum größten Teil gleich sind, konnte mehrfach gezeigt werden, dass sie einzigartige, spezifische Effekte haben und an völlig unterschiedliche Promotoren binden können¹³⁶⁻¹³⁹. Während PR-B hauptsächlich als Transkriptionsaktivator agiert, ist PR-A eher als Repressor u. a. auch von PR-B bekannt¹³⁹⁻¹⁴¹.

PR ist ebenfalls im Herzen exprimiert, dieses gilt somit als progesteronresponsives Gewebe¹⁴²⁻¹⁴³. Während die Rolle der ERs und von E2 im Herzen sehr stark untersucht ist, wurde über den Einfluss von P4 weit weniger geforscht. Beobachtete physiologi-

sche Effekte von P4 auf das Herz umfassen die Steigerung der Herzauswurfraction¹⁴⁴, Verringerung des arteriellen Druckes¹⁴⁵⁻¹⁴⁶, Dilatation von Herzarterien¹⁴⁷, sowie eine Steigerung der Proteinsynthese im Herzmuskel^{148 149}. Morrissy et al.¹⁴⁹ konnten zeigen, dass P4 durch die Induktion von Bcl-xl und eine dadurch folgende Reduktion von Apoptose eine protektive Wirkung auf Kardiomyozyten hat.

1.3.1 Steroidregulation von miRNAs

Eine Regulation der miRNA-Expression durch Steroide ist auf verschiedene Weise möglich. Steroide können über ihre Rezeptoren genomisch wie auch bei mRNAs als Transkriptionsfaktoren für miRNAs agieren. MiRNAs, bei denen eine ER-Bindestelle in der regulatorischen Region identifiziert wurde, sind miR-21, -27a/b und -23a¹⁵⁰. MiRNAs, die in Introns von E2-regulierten Genen kodiert vorliegen, sind let-7c/g, miR-30c und -9¹⁵⁰. PR-Bindestellen in Promotoren von P4-regulierten miRNAs wurden bis jetzt noch nicht beschrieben.

Eine umfassendere Modulation der miRNA-Expression ist durch die Steroidregulation von Komponenten innerhalb der Biogenese der miRNAs gegeben. Zu den Komponenten zählen die prozessierenden Enzyme Dicer, Drosha und Dgcr-8, sowie Komponenten des RISC-Komplexes Argonaut-2, Exportin-5 etc. Das einzige dieser Gene mit einer ER-Bindestelle im Promoter ist Dicer-1¹⁵⁰. Im Uterus steigern E2 und P4 die Expression von Exportin-5 und eine Steigerung von Dicer-1 durch P4 wurde gezeigt¹⁵¹. Argonaut-2 ist in MCF-7-Zellen nach E2-Behandlung und durch die Behandlung mit einem ER α -Agonisten verstärkt exprimiert¹⁵². Eine weitere Studie konnte zeigen, dass E2-aktivierter ER α durch indirekte Bindung mit Drosha zur Inhibition der Prozessierung von pri-miRNAs führt und somit die absolute Menge reifer miRNAs reduziert¹⁵³. Alle diese möglichen posttranslationalen Regulationen erklären beobachtete Modulationen größerer Gruppen von reifen miRNAs nach Steroidbehandlung.

Eine Zusammenfassung publizierter Regulationen von miRNAs durch E2 oder P4 ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Publierte Regulation von miRNAs durch E2 oder MPA

	E2-induziert			E2-inhibiert			Zellen	Stimulation	Referenz
a)	let-7a let-7b let-7c let-7d let-7e let-7f let-7g let-7i	let-7i miR-103 miR-107 miR-17-5p miR-200a miR-200b miR-200c miR-203	miR-21 miR-23a miR-30b miR-30c miR-424 miR-98	miR-143 miR-27a miR-27b miR-302b* miR-506 miR-524* miR-9			MCF-7	E2 (10 nM) 4 h	Bhat-Nakshatri et al. (2009)
b)				let-7a let-7c let-7f let-7g miR-181a miR-181b miR-181d miR-193a	miR-193b miR-200a miR-200c miR-203 miR-21 miR-23a miR-23b miR-24	miR-26a miR-26b miR-27a miR-27b miR-499 miR-520d* miR-98	MCF-7	E2 (10 nM) 48 h	Maillot et al. (2009)
c)				miR-16 miR-143 miR-203			MCF-7	E2 (10 nM) 48 h	Yu et al. (2012)
d)	let-7c let-7d let-7g let-7i miR-106b miR-151 miR-15a miR-15b miR-16 miR-182	miR-183 miR-195 miR-200a miR-200b miR-203 miR-20a miR-23a miR-23b miR-25 miR-26a	miR-26b miR-27a miR-27b miR-30b miR-365 miR-489 miR-7 miR-92 miR-98	let-7a let-7f miR-149 miR-200c miR-21 miR-320 miR-328 miR-342 miR-423			MCF-7	E2 (10 nM) 6 h	Klinge et al. (2009)
e)	miR-26a			miR-21 miR-26a			hMSMC hLSMC	E2 (10 nM) 24 h	Pan et al. (2008)
f)	miR-26a			miR-20a miR-21			hESC/hGSC	E2 (10 nM) 24 h	Pan et al. (2007)
g)	miR-17-5p miR-542-3p miR-17-5p miR-23b			miR-23a/b miR-542-3p miR-23a			hESC hGEC	E2 (10 nM) 6 h	Toloubeydokhti et al. (2008)
h)				miR-21			MCF-7	E2 (10 nM) 48 h	Wickramasinghe et al. (2009)
	MPA-induziert			MPA-inhibiert			Zellen	Stimulation	Referenz
i)	miR-27b* miR-30c-1* miR-412 miR-483-5p miR-513a-5p miR-513b miR-634 miR-921			miR-101 miR-1229 miR-130a miR-141 miR-19b miR-20a miR-212 miR-220b	miR-29b miR-29c miR-301a miR-30b miR-30e miR-32 miR-324-5p miR-370	miR-371-5p miR-374a miR-487b miR-525-5p	T47D	MPA (10 nM) 6 h	Cochrane et al. (2012)
j)	miR-20 miR-26a			miR-20 miR-21 miR-26a miR-21			hESCs hGECs	MPA (10 nM) 24 h	Pan et al. (2007)
k)	miR-26a miR-21			miR-26a			hMSMC hLSMC	MPA (10 nM) 24 h	Pan et al. (2008)
l)	miR-452-3p miR-17-5p miR-17-5p miR-23a/b			miR-23a miR-452-3p			hESC hGEC	MPA (10 nM) 6 h	Toloubeydokhti et al. (2008)

a) ¹⁵⁰, b) ¹⁵⁴, c) ¹⁵⁵, d) ¹²⁰, e) ¹⁵⁶, f) ¹⁰⁹, g) ¹⁵⁷, h) ¹⁰⁸, i) ¹⁵⁸, j) ¹⁰⁹, k) ¹⁵⁶, l) ¹⁵⁷.

1.3.2 Östrogen-regulierte miRNAs

Eine Zusammenfassung aller bekannten Regulationen von miRNAs durch E2 wurde vor kurzem in einem Review veröffentlicht¹⁵⁹. Die wichtigsten Ergebnisse wurden in die Tabelle 1 eingefügt.

Cohen et al.¹⁶⁰ waren die ersten, die eine Regulation von miRNAs durch E2 *in vivo* beschrieben. Sie zeigten, dass eine E2-Behandlung von männlichen Zebrafischen zu einer Regulation von 38 miRNAs führt, wobei die Regulation gewebeabhängig unterschiedlich war¹⁶⁰. Die stärksten Regulationen wurden bei miR-196b, -122, -130c, -101a und let-7h beobachtet. In einem Modell von E2-induzierter Karzinogenese bei ACI-Ratten wurde eine Herabregulation von 15 miRNAs (u. a. miR-99a, -106a, -499) und eine Heraufregulation von 19 miRNAs (u. a. miR-17-5p, -20a, -21, -106a) im Brustgewebe detektiert¹⁶¹. Eine weitere Studie beschreibt die Unterdrückung von Interferon- γ in Lymphozyten durch E2-regulierte miRNAs¹⁶². In humanen MCF-7-Brustkrebszellen konnte die Inhibition von miR-21 durch E2 über ER α und ER β beschrieben werden¹⁰⁸. Ebenfalls inhibiert wurde die Expression von miR-21 durch E2 in Zellen der glatten Muskulatur des Myometriums (MSMC) und des Leiomyoms (LSMC)¹⁰⁹. Eine zellspezifische Expression konnte hier für miR-26a nachgewiesen werden; reduzierte Expression in LSMCs und induzierte in MSMCs nach E2-Stimulation. In Leberzellen wurde eine indirekt durch E2 gesteigerte Expression von miR-29a/b gezeigt, welche weibliche Mäuse vor Ccl4-induzierter Leberfibrose schützt¹⁶³. Die Induktion von miR-29a/b erfolgte in diesen Zellen durch eine Unterdrückung des NF- κ B-Signalweges durch E2. Umfangreichere miRNA-Regulationen nach E2-Behandlung wurden in mehreren Studien in MCF7-Zellen identifiziert^{120 150 153-155} und sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bhat-Nakshatri et al.¹⁵⁰ erfassten 21 herauf- und 7 herabregulierte miRNAs; Klinge et al.¹²⁰ fanden 29 herauf- und 9 herabregulierte miRNAs; Maillot et al.¹⁵⁴ identifizierten nur inhibierte Expressionen von 23 miRNAs. Yu et al.¹⁵⁵ zeigte ebenfalls nur inhibierte Expressionen von miR-16, -143 und -203. Während bei kurzen E2-Stimulationen jeweils mehr Heraufregulationen detektiert wurden, wurden bei längeren Stimulationszeiten nur herabregulierte miRNAs gefunden (Tabelle 1). Dies könnte bedeuten, dass kurzfristige hormonelle Veränderungen andere Regulationen von miRNAs hervorrufen als längerfristige Änderungen des Hormonstatus.

1.3.3 Progesteron-regulierte miRNAs

Eine Liste aller bisher bekannten P4- bzw. Progestin-regulierten miRNAs wurde in einem kürzlich veröffentlichtem Review¹⁶⁴ zusammengefasst. Die wichtigsten Ergebnisse

sind ebenfalls in Tabelle 1 zu sehen. In allen Studien wurde Medroxyprogesteronacetat (MPA), ein synthetisches Progesteron, benutzt.

In vielen Studien wurde eine zellspezifische Regulation durch Progestine beobachtet. Pan et al.¹⁰⁹ zeigten, dass die Expression von miR-21 und miR-26a in endometrialen Stromazellen (ESCs) durch MPA reduziert wird, in den benachbarten endometrialen Drüsenzellen (GECs) jedoch zu einer gesteigerten Expression der gleichen miRNAs führt. Umgekehrt zeigte Toloubeydokhti et al.¹⁵⁷ eine gesteigerte Expression von miR-452-3p in ESCs und eine Reduktion in GECs nach MPA-Stimulation. Ebenso wurde die Expression von miR-26a durch MPA in MSMCs gesteigert, in LSMCs aber gehemmt¹⁵⁶. In endometrialen Krebszellen wurden nach MPA-Behandlung mehrere regulierte miRNAs detektiert; u. a. miR-625*, -21, -142-5p, und 146b-5p herauf, miR-633, -29c, -29*, und -193b herab. Alle diese Progestineffekte wurden in Zellen des reproduktiven Traktes gemessen. Während viele Studien die Rolle von E2 auf die miRNA-Expression in Brustkrebszellen untersuchten, gibt es bislang erst eine, die die Auswirkungen von P4 beschreibt¹⁵⁸. In dieser Untersuchung waren in T47D-Zellen sechs Stunden nach MPA-Stimulation 20 miRNAs herunter- und 8 miRNAs heraufreguliert. Effekte von P4 auf miRNAs in kardialen Zellen sind noch nicht bekannt.

1.3.4 Regulation der Expression des Progesteronrezeptors durch miRNAs

Die PR mRNA besitzt eine sehr lange 3'UTR, in der sich viele vorhergesagte miRNA-Bindestelle befinden. Bisher wurde die Regulation von PR durch miRNAs lediglich in fünf Studien nachgewiesen^{154 158 165-167}. Anhand eines Luciferase-Assays sowie mit Hilfe von Antagomirs und Mimics wurde gezeigt, dass miR-26a und -181a die Proteinexpression von PR in MCF-7-Zellen inhibieren¹⁵⁴. Für miR-126-3p konnte eine direkte Regulation der Translation des PRs in Brustepithelzellen von Mäusen nachgewiesen werden¹⁶⁶. Cochrane et al.¹⁵⁸ zeigten, dass miR-513a-5p, deren Expression durch MPA induziert wird, PR-Proteinlevel in Brustkrebszellen reduziert. MiR-513a-3p, welche von der gleichen pre-miRNA entstammt, hatte in diesen Zellen keinen regulativen Effekt auf PR, obwohl sechs Bindestellen in der 3'UTR vorhergesagt werden. Anhand einer miRNA-Mimic-Studie wurde weiterhin miR-193b als PR-inhibierend identifiziert¹⁶⁵. Darüber hinaus wurde eine transkriptionelle Inhibition der PR-Expression durch miR-423-5p-Bindung im Promoterbereich und folgender Behinderung der RNA-Polymerase II-Bindung nachgewiesen¹⁶⁷.

1.4 Therapeutische und diagnostische Anwendungen von miRNAs

Die Identifizierung der Funktionen von miRNAs im Herzen wird neue Erkenntnisse in der Entwicklung von Herzkrankheiten und ihren molekularen Ursachen bringen. Mediziner versprechen sich neben dem erweiterten Verständnis der Krankheiten u. a. zwei weitere Nutzen der miRNA-Biologie.

Einerseits können miRNAs therapeutisch als neue Zielmoleküle für Medikamente genutzt werden¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Regulationen spezifischer miRNAs durch systemisch oder lokal angewendete miRNA-Inhibitoren oder *-Mimics*, könnten ganze Gennetzwerke in den entsprechenden Organen beeinflussen⁹⁴. Diverse *in vivo*-Behandlungen wurden bereits in Tiermodellen durchgeführt^{72 172}. Durch miR-21-Inhibition bei Mäusen wurde z. B. die Entwicklung von Fibrose in kardialer Hypertrophie vermindert⁹⁷.

Weiterhin können miRNAs als Biomarker diagnostisch zum frühzeitigen Erkennen von Krankheiten und für Messungen eines Therapieerfolges genutzt werden^{173 174}. Bei vielen Krankheiten sind nicht nur veränderte miRNA-Level in den jeweiligen Geweben messbar, sondern auch extrazellulär in Körperflüssigkeiten. So wurden bereits erhöhte Level von miR-1 und -499 im Plasma von Patienten mit akutem Myokardinfarkt¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ detektiert, im Tiermodell wurde miR-208 als Biomarker für Beschädigungen des Myokards identifiziert¹⁷⁷ und eine Vielzahl weiterer miRNAs wurde im Plasma von Patienten mit koronaren Herzerkrankungen identifiziert¹⁷⁸.

1.5 Ziele und Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Geschlechterunterschiede und Regulationen von miRNAs im Frühstadium von LVH, sowie den Einfluss von E2 und P4 auf die Transkription von miRNAs im Herzen zu untersuchen. Zugrunde gelegt wurde die Hypothese, dass miRNAs eine Rolle in der geschlechtsspezifischen Ausprägung von MH spielen. Dies kann auf eine geschlechterabhängige Expression von miRNAs im linken Ventrikel zurückzuführen sein, verursacht z. B. durch Steroidhormone wie E2 und P4. Während MH regulierte miRNAs können durch Translationshemmung von Zielgenen zu Geschlechterunterschieden führen. Interessante Zielgene sind hierbei z. B. Rezeptoren von Geschlechtshormonen wie ER und PR, sowie relevante Gene für die kardiale Funktion oder für die Entwicklung von Fibrose.

Daher sollten Expressionsstudien von miRNAs in einem Tiermodell mit LVH durchgeführt werden. Speziell wurde die Expression von miRNAs im frühen Stadium der LVH, zwei Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC), analysiert. Auf diese Weise

sollten molekulare Ursachen von Geschlechterunterschieden während der Entstehung und Entwicklung von MH näher identifiziert werden. Weiterhin wurde der Einfluss von E2 und P4 auf die Expression von miRNAs im linken Ventrikel und in Kardiomyozyten von Mäusen analysiert.

Folgende Unterpunkte wurden untersucht:

1. Identifizierung von miRNAs, die im LV exprimiert werden, sowie ihre Regulation bei LVH
2. Identifizierung geschlechtsspezifisch exprimierter miRNAs; im basalen Zustand (Sham) sowie bei Anfangsstadien der LVH (2 Wochen nach TAC)
3. Einfluss von weiblichen Geschlechtshormonen auf die Expression von miRNAs im gesamten LV und in isolierten Kardiomyozyten
4. Einfluss spezifischer miRNAs auf die Expression geschlechtsspezifisch relevanter Proteine (z. B. Hormonrezeptoren) und Proteine der kardialen Funktion

Über die Rolle von miRNAs bei MH, insbesondere bei den Geschlechterunterschieden der Krankheit, ist noch wenig bekannt. Auch in Hinblick auf die diskutierte Nutzung von miRNAs als pharmakologisches Ziel, sowie als Biomarker für Krankheiten (wie z. B. bei Herzkrankheiten) ist die Kenntnis endogener, geschlechtsspezifischer Expressionen von miRNAs grundlegend.

2 Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Tiere

Mäusestamm: C57BL/6 Wildtyp

2.1.2 Zelllinien

Für alle Experimente in der Zellkultur wurde die murine Kardiomyozytenzelllinie HL-1 benutzt¹⁷⁹. Die Zellen entstammen einem atrialen Kardiomyozytentumor einer weiblichen Maus und sind imstande in Kultur zu kontrahieren. Die HL-1-Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. William C. Claycomb zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Bakterienstämme

E. coli DH5 α

OneShot[®] Topo 10 Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.4 Plasmide

psiCHECK[™]-2-Vektor Promega, Madison, USA

pCR[™] 4-TOPO[®] TA-Vektor Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.5 Enzyme

GenTherm Taq-DNA-Polymerase Rapidozym, Berlin, Deutschland

2.1.5.1 Restriktionsenzyme

NotI Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

XhoI Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

PmeI Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5.2 Ligationsenzyme

T4-DNA-Ligase

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Actin (I-19)-R (sc-1616-R) Santa Cruz, Santa Cruz, USA

PR (C-20) sc-539 Santa Cruz, Santa Cruz, USA

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Donkey-anti-rabbit Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden selbstständig designt und bei Thermo Scientific (Deutschland) synthetisiert.

2.1.7.1 Primer für qRT-PCR

miRNA	Primersequenz
Mmu-let-7a	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
Mmu-let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGT
Mmu-let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
Mmu-let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT
Mmu-let-7f	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
Mmu-let-7g	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT
Mmu-let-7i	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
Mmu-miR-1	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT
Mmu-miR-100	ACCCGTAGATCCGAAGTT
Mmu-miR-103	GCAGCATTGTACAGGGC
Mmu-miR-106a	AAGTGCTAACAGTGCAGGTAG
Mmu-miR-106b	TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT
Mmu-miR-107	GCAGCATTGTACAGGGC
Mmu-miR-126-3p	TCGTACCGTGAGTAATAATGC
Mmu-miR-130a	AGTGCAATGTTAAAAGGGC
Mmu-miR-133a	CCCCTTCAACCAGCTG
Mmu-miR-133a*	GCTGGTAAAATGGAACCAA
Mmu-miR-133b	GTCCCCTTCAACCAGCTA
Mmu-miR-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC
Mmu-miR-145	GTCCAGTTTTCCAGGAAT
Mmu-miR-16	TAGCAGCACGTAAATATTGG
Mmu-miR-195	GCAGCACAGAAATATTGGC
Mmu-miR-199a-5p	CCCAGTGTTCCAGACTACCTG
Mmu-miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAA
Mmu-miR-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA

Mmu-miR-22	AAGCTGCCAGTTGAAGAA
Mmu-miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGG
Mmu-miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGG
Mmu-miR-23a	TCACATTGCCAGGGATTT
Mmu-miR-23b	ATCACATTGCCAGGGATTAC
Mmu-miR-24	GGCTCAGTTCAGCAGG
Mmu-miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT
Mmu-miR-27a	CACAGTGGCTAAGTTCCG
Mmu-miR-27b	TCACAGTGGCTAAGTTCTGC
Mmu-miR-290-5p	CAAACATGCGGGCACTT
Mmu-miR-29a	TAGCACCATCTGAAATCGG
Mmu-miR-29b	TAGCACCATTTGAAATCAGTG
Mmu-miR-301a	CAGTGCAATAGTATTGTCAAAG
Mmu-miR-30a	GTAAACATCCTCGACTGGAAG
Mmu-miR-30b	TGTAAACATCCTACACTCAGCT
Mmu-miR-30c	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC
Mmu-miR-30d	ACATCCCCGACTGGAAG
Mmu-miR-30e	TGTAAACATCCTTGACTGGAAG
Mmu-miR-378	ACTGGACTTGGAGTCAGAAG
Mmu-miR-497	CAGCAGCACACTGTGGTTT
Mmu-miR-99a	ACCCGTAGATCCGATCTTG

Primer Referenzgene	
HS_RNU1A-1 (miScript PCR controls)	Qiagen
HS_RNU6B-2 (miScript PCR controls)	Qiagen

Genname	Primersequenz
mm-Timp3	FW: CTTGGGCTTGTCTGCTC RV: CTTCTTTCCCACTTTTGG
mm-Pten	FW: CCACAAACAGAACAAGATGCTC RV: CCATTTTCCACTTTTTCTGAGG
mm-Pdcd4	FW: GGTGGATGTGAAAGATCCAAA RV: CATCCAGGGGCAAACTACA
mm-Spry1	FW: TAGGTCAGATCGGGTCATCC RV: GTGGGGTCCTTTTCAAGG
mm-Reck	FW: ATAGGCTGCAAACCCATCAT RV: CCGTAACATCCCAGCACATA
mm-Hprt	FW: GCTTTCCCTGGTTAAGCAGTACA RV: AACTTCGAGAGGTCTTTTTAC

2.1.7.2 Oligos für Klonierungen

Name	Sequenz
XhoIPGR-long	CTCGAGCCCAGGAGTTGTACAA
NotIRPG-long	GCGGCCGCCTAACTAAACATGCCAT

2.1.7.3 PNAs miRNA-Inhibitoren (Panagene)

Katalog No.	miRNA Name	Familie	miRNA Sequenz
PI-1067	hsa-miR-26a	miR-26	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
PI-1087	hsa-miR-30a	miR-30	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
PN-1001	Negativ Kontrolle		

Panagene, Daejeon, Südkorea

2.1.8 Längenmarker für DNA und Proteine

1kb DNA Ladder, Invitrogen

100 bp DNA Ladder, Invitrogen

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific

2.2 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

2.2.1 Puffer und Medien

Claycomb Medium mit Phenolrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Claycomb Medium ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca & Mg	PAA

2.2.2 Chemikalien

6x DNA Loading dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agarose	Biozym
APS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CoCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Complete, Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
DEPC-behandeltes H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Endothelin-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure 100% Rotipuran®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Estradiol, wasserlöslich	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Ethanol (rein)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (vergällt)	Herbeta Arzneimittel
FBS-CS	Life Technologies, Carlsbad, USA
Fugene HD Transfection Reagent	Promega, Madison, USA
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
GenTherm DNA-Polymerase	Rapidozym
Glycerin Rotipuran 99,5% pa	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamine with Penicillin/Strep	PAA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Milchpulver, Blotting Grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na ₃ VO ₆	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid min. 99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Norepinephrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA
PhosSTOP	Roche, Mannheim, Deutschland
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Power Sybr Green PCR Master Mix	Life Technologies, Carlsbad, USA
Progesteron, wasserlöslich	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNA-Bee, RNA Isolation Reagent	Tel-Test
Rnase Out	Life Technologies, Carlsbad, USA
RotiLoad reduzierend, 4x konz.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 37 % (rauchend) Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SYBR® Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq Polymerase	PeqLab
TEMED 99% pa	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS PUFFERAN®, min. 99,9 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser für Molekularbiologie	Millipore

2.2.3 Kits

Agilent RNA 6000 Nano Ladder	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Reagent	GE Healthcare Life Sciences, UK
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dual Glo Luciferase System	Promega, Madison, USA
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript I RT Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies, Carlsbad, USA
PureLink™ HiPure Plasmid Purification Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
TOPO® TA Cloning® Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits	Zymo Research, Irvine, USA

2.3 Geräte

7300 Real-Time PCR System	Life Technologies, Carlsbad, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien
Benchmark Plus Microplate Reader	Bio-Rad, Hercules, USA
Eppendorf Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feinwaage ALT 220-5DAM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Gelkammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Hettich Mikro 22R	Tuttlingen, Deutschland
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Schüttelinkubator 3033	GFL, Burgwedel, Deutschland

Transferkammer	Labtech
VICTOR ³ Multilabel Reader	PerkinElmer, Waltham, USA

2.4 Software/Datenbanken

GraphPad Prism, La Jolla, USA

IBM SPSS Statistics 19

ABI Prism Taqman (Applied Biosystems)

ImageJ, Image Processing and Analysis in Java, Open-Source-Software

Photoshop

CorelDRAW X3

EndNote

<http://cpdb.molgen.mpg.de/>, Überrepräsentationsanalyse von Zielgenen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, Literatursuche

<http://www.targetscan.org/>, Suchprogramm für putative Zielgene von miRNAs

<http://www.mirbase.org/>, miRNA-Datenbank

<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>, Datenbank validierter Zielgene von miRNAs

2.5 Sonstiges

Combitips Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen	BD Biosciences, NJ, USA
Fuji Super RX Film, Medical X-Ray Films	Fujifilm, Tokio, Japan
Hybond ECL Nitrocellulose Membran	GE Healthcare Life Sciences, UK
Lysing Matrix D	MP Biomedicals, Santa Ana, California
MicroAmp Fast Optical 96-well	Life Technologies, Carlsbad, USA
Optical Adhesive Covers	Life Technologies, Carlsbad, USA
Rotilabo-Mikrotest-Platten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Zellkulturplatten und -flaschen

Biochrom, Berlin, Deutschland

3 Methoden

3.1 MiRNA-Microarray

Für die Erfassung des genomweiten Expressionsmusters von miRNAs im LV von Tieren mit myokardialer Hypertrophie wurde der miRXplore Microarray von Miltenyi Biotec gewählt. Der miRXplore Microarray bietet ein System zur semiquantitativen Analyse von differentieller miRNA Expression. Die Probenspots auf dem miRXplore MicroArray sind DNA-Oligonukleotide, deren Sequenzen revers-komplementär zu den entsprechenden reife miRNAs sind. Insgesamt befanden sich Proben von 1194 verschiedenen miRNAs und 72 Kontrollen in je vierfacher Ausführung auf dem Array. Die Proben umfassten alle zum damaligen Zeitpunkt (August 2007) bekannten miRNAs von Mensch, Maus und Ratte, sowie alle bekannten viralen miRNAs.

Für den Microarray wurde die miRNA-Fraktion aus dem LV der Sham-/TAC-operierten Mäuse von der mRNA-Fraktion getrennt isoliert (siehe Abschnitt 3.2.3.1). Je vier Proben von männlichen und weiblichen, TAC- und Sham-operierten Mäusen wurden mit dieser Methode untersucht. Die Proben wurden mit dem Fluoreszenzstoff Cy3 markiert. Eine Probe einer weiblichen Sham-Maus wurde mit Cy5 markiert und diente als Kontrollreferenz der Hybridisierungseffizienz auf allen Arrays. Jede einzelne Probe wurde mit der Cy5-Referenzprobe vermischt und zur Bindung der miRNAs an die Probenspots auf einen einzelnen Array hybridisiert. Anhand der Zweifarben-Hybridisierung kann die Farbsignalkalibrierung durch das Verhältnis der beiden Signalintensitäten für jede miRNA erfolgen und macht die verschiedenen Arrays miteinander vergleichbar. Die kalibrierten Signalintensitäten jeder miRNA jeder Probe müssen daraufhin noch mittels einer internen Referenz normalisiert werden.

Die Bearbeitung des Microarrays wurde von dem *Labor für Funktionelle Genomforschung Charité Core Facility* durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Cy5 und Cy3 und die Hybridisierungen wurden von Frau Dr. Ute Ungethüm nach Angaben des *miRXplore microarray hybridization*-Protokolls realisiert. Die Farbsignalkalibrierung der Arrays und Rohdatenerfassung der Signalintensitäten jeder Probe wurden von Herrn Dr. Ralf-Jürgen Kuban durchgeführt. Die interne Normalisierung der Proben und Datenauswertung wurde von der Autorin dieser Arbeit ausgeführt.

3.1.1 Auswertung des Microarrays

Um experimentelle und technische Fehler der RNA-Isolation zwischen den verschiedenen Proben auszugleichen, müssen nach der Farbsignalkalibrierung der verschiedenen Arrays untereinander die kalibrierten Signalintensitäten aller miRNAs aller Proben

mit einer internen Kontrolle normalisiert werden. Für diese Kontrolle wurde der Mittelwert der Signalintensitäten von 51 detektierten miRNAs der jeweiligen Probe des jeweiligen Arrays gewählt. Der normalisierte Wert ist somit der Quotient aus der kalibrierten Signalintensität einer miRNA mit dem Mittelwert der kalibrierten Signalintensitäten von 51 miRNAs der jeweiligen Probe. Signalintensitäten mit einem Schwellenwert > 50 wurden in die Auswertung aufgenommen.

Für die Expressionsanalyse wurde der Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) der vier Proben einer Gruppe erstellt. Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse berechnet. Um das Ausmaß der TAC-Operation auf die miRNA-Expression zu analysieren, wurde zusätzlich das Verhältnis (Ratio) des Mittelwerts der operierten Gruppe zur nicht-operierten Gruppe eines Geschlechts erstellt.

3.1.2 Überrepräsentationsanalyse der Zielgene regulierter miRNAs mit CPDB

Die funktionelle Anreicherungsanalyse wurde mit Hilfe des Programms ConsensusPathDB (CPDB)¹⁸⁰⁻¹⁸² erarbeitet. Mögliche Zielgene der einzelnen miRNAs wurden mit Hilfe des Programms Targetscan identifiziert. Jeder miRNA werden hier durchschnittlich ca. 500 mögliche Zielgene zugeordnet. Die Zielgene wurden in drei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe umfasste alle vorhergesagten Zielgene der herabregulierten miRNAs, eine die der heraufregulierten miRNAs und die dritte umfasste alle vorhergesagten Zielgene von im Microarray nicht regulierten miRNAs. Die jeweiligen Zielgenlisten wurden daraufhin separat voneinander bei CPDB eingelesen und es wurde eine Analyse der überrepräsentierten Signalwege durchgeführt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation in Bakterien

Bei der Transformation von *E. coli* nehmen die Bakterien nach entsprechender Behandlung (Hitzeschock, Elektroschock oder chemische Poration machen die Zellmembran durchlässig) freie DNA auf. Dazu wurden 40 μ l kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 α , die bei -80 °C aufbewahrt werden, aufgetaut und mit 1 μ l des Ligationsansatzes vermischt. Die Zellen wurden 5 ms einem Elektroschock von 2500 V ausgesetzt und anschließend wurde 800 μ l frisches antibiotikafreies LB-Medium hinzugefügt. Die Suspension wurde zur Regeneration der Bakterienzellwand und zur Expression des Antibiotikaresistenzgens für 30 min in einem 37 °C warmen Schüttler inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Medium resuspendiert, auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

sind in Abschnitt 2.1.7.2 aufgelistet. In einem typischen Reaktionsansatz von 25 µl wurden 10-100 ng DNA-Template, je 10 pmol der Primer, 250 µM des dNTP-Mixes (Rapidozym), 2 mM MgCl₂, 1 U Taq-DNA-Polymerase (Rapidozym) und 2,5 µl des entsprechenden 10x Puffers in einem PCR-Reaktionsgefäß vermengt. Der Ansatz wurde in der PCR-Maschine dem folgenden Programm ausgesetzt:

Tabelle 2: PCR Programm

Funktion	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	35 sek	} 35
Annealing	55°C	30 sek	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	10 min	1
Reaktionsstopp	4°C	unbegrenzt	

3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Anhand der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente innerhalb eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach getrennt. Abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden 0,8 %ige (für Fragmente > 3000 bp)-2 %ige (für Fragmente < 500 bp) Agarosegelele angesetzt. Die Agarose wurde mit der entsprechenden Menge TAE-Puffer versetzt und durch Aufkochen vollständig gelöst. Der Flüssigkeit wurde DNA-Färbelösung (GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain, Biotium) im Verhältnis 1:10000 beigefügt und in eine horizontale Kastenform gegossen. Nach der Aushärtung wurde das Gel in eine mit TAE-Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gegeben und die mit 6x DNA-Ladepuffer vermischten DNA-Proben sowie ein DNA-Marker wurden in die Geltaschen eingefüllt. Die DNA wurde daraufhin im Gel bei 90 V 1-2 Stunden (Std.) elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht detektiert.

TAE-Puffer (1 l 50x Stock):

242 g Tris-Base
 57,1 ml 100 %ige Essigsäure
 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
 mit H₂O auf Endvolumen auffüllen

3.2.2.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte anhand des ZymocleanTM Gel DNA Recovery-Kits nach Angaben des Herstellerprotokolls.

3.2.2.5 Ligation

Bei der Ligation wird ein DNA-Fragment in einen linearisierten DNA-Vektor eingefügt. Ligationsansätze wurden auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl (1 µl linearisierter Vektor, 1 µl DNA-Fragment, 0,5 µl T4-DNA-Ligase, 1 µl des nach Herstellerangaben enzyspezifischen 10x Ligasepuffers) zusammengestellt, gut vermischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Subklonierungen in den *TOPO*[®] *TA*-Vektor erfolgten ohne Ligase anhand des Herstellerprotokolls.

Anschließend wurden die DNA-Plasmide zur Selektion in *E. coli*-Bakterien transformiert.

3.2.2.6 Restriktionsverdau von Plasmiden

Zur Linearisierung des psiCHECK[™]-2-Vektors wurde 10 µg Plasmid, 0,5 µl XhoI und 1 µl NotI-Restriktionsenzym sowie der den Angaben des Herstellers entsprechende Enzympuffer in einem Reaktionsvolumen von 50 µl vermengt. Der Verdau wurde für 2 Std. bei 37 °C durchgeführt.

Zur Beseitigung von nicht linearisierten und damit nicht erfolgreich klonierten Vektoren wurde nach der Ligation des psiCHECK[™]-2-Vektors ein PmeI-Verdau durchgeführt. Zwischen den ursprünglichen NotI- und XhoI-Seiten liegt eine PmeI-Schnittstelle. Alle Vektoren, die beim XhoI/NotI-Verdau nicht erfolgreich geschnitten wurden und daher nicht das richtige Insert besitzen, können durch den PmeI-Verdau linearisiert und für die folgende Transformation in *E. coli* untauglich gemacht werden. Dazu wurde 1 µl PmeI-Enzym mit 1 µl des entsprechenden 10x-Puffers und 3 µl des Ligationsansatzes auf 10 µl Reaktionsvolumen für 20 min bei 65 °C inkubiert.

3.2.2.7 Klonierung von 3'UTRs potentieller miRNA-Zielgene in den psiCHECK[™]-2-Vektor

Um zu überprüfen, ob ein Gen von miRNAs reguliert wird bzw. eine vorhergesagte miRNA-Bindestelle funktionell ist, wird die gesamte oder die Bindestelle umfassenden Teilstücke der entsprechenden 3'UTR in den psiCHECK[™]-2-Vektor hinter die *Renilla*-Sequenz kloniert und anschließend wird ein Luciferase-Assay (siehe 3.4.3) durchgeführt. Wenn eine Bindestelle funktionell ist, binden die von der Zelle exprimierten, spezifischen miRNAs an die UTR und die Translation von *Renilla* wird reduziert.

Die Klonierung erfolgte in drei Schritten: 1. PCR, 2. Subklonierung in den TOPO-TA-Vektor mit nachfolgender Sequenzierung, 3. Klonierung in den psiCHECK[™]-2-Vektor.

1. Die gesuchte 3'UTR wurde mit den entsprechend designten Primern inklusive angehängter XhoI oder NotI-Sequenz (siehe 2.1.7.2) mittels PCR und einem cDNA-Template aus dem LV der Maus amplifiziert. Die Größe des Amplifikats wurde in einem Agarosegel kontrolliert und passende Inserts nachfolgend aus dem Gel extrahiert.
2. Das ausgewählte Insert wurde in einem Ligationsschritt in den TOPO-TA-Vektor subkloniert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde der Insertbereich ausgewählter Klone sequenziert. Die Sequenzierungen der Plasmid-DNA wurden von den *SMB Services in Molecular Biology* durchgeführt. In einem XhoI/NotI-Verdau wurde das Fragment wieder aus dem TOPO-Vektor isoliert.
3. Im letzten Schritt wurde das XhoI/NotI-Fragment in den vorher XhoI/NotI-geschnittenen psiCHECKTM-2-Vektor ligiert. Anhand eines Nachverdaus mit PmeI wurde der Hintergrund der leeren (falsch-positiven) Vektoren reduziert.

3.2.3 Methoden mit RNA/miRNA

3.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgewebe und Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen erfolgte anhand einer Phenol-Chloroform-Extraktion.

Herzgewebstücke (10-30 mg) wurden in 400 µl RNA-Bee in *FastPrepTM Lysing Matrix D*-Gefäßen (MP Biomedicals) im Fast Prep-Gerät (FP 120, Thermo Savant) zweimal 20 Sekunden auf Stufe 4 homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend mit weiteren 600 µl RNA-Bee versetzt und 20 min bei 4 °C lysieren gelassen. Bei adherent-wachsenden Zellen wurde das RNA-Bee direkt auf das Well (1 ml/6-well) gegeben, die Zellen abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Dem Phenollysate wurde ein Fünftel des Gesamtvolumens an Chloroform hinzugefügt, das Gemisch 2 min heftig geschüttelt und für 5 min auf Eis belassen. Daraufhin wurde der Ansatz durch 10-minütige Zentrifugation mit 20800 x g bei 4 °C in zwei Phasen aufgetrennt. Die obere, wässrige Phase, in der die RNA gelöst ist, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, möglichst ohne DNA-Verunreinigungen aus dem Phasenübergang zu übertragen. Im neuen Gefäß wurde der RNA-Lösung ein gleiches Volumen an Isopropanol hinzugefügt, das neue Gemisch nochmals heftig geschüttelt und die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Daraufhin wurde die gefällte RNA über 30 min bei 4 °C und 20800 x g abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Zwei Waschschrte mit 80 % EtOH und je zwei 10-minütige Zentrifugationsschritte bei 20800 x g folgten. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Nach dem letzten Waschschrte wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet.

Abschließend wurde die RNA in DEPC-gereinigtem H₂O gelöst und die RNA-Konzentration wurde, wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben, gemessen.

3.2.3.2 Fraktionierte Isolierung von mRNA und miRNA

Für den Microarray wurden miRNA und mRNA-Fractionen aus dem linken Ventrikel getrennt isoliert. Dafür wurden die Gewebestücke im Lysispuffer des miRNeasy Mini Kits in *FastPrep™ Lysing Matrix D*-Gefäßen (MP Biomedicals) im Fast Prep-Gerät (FP 120, Thermo Savant) zweimal 20 Sekunden auf Stufe 4 homogenisiert. Aus den aufgeschlossenen Proben wurden die miRNA- und mRNA-Fractionen getrennt voneinander mittels des miRNeasy Mini Kits von Qiagen anhand des Herstellerprotokolls isoliert.

3.2.3.3 Qualitative und quantitative Konzentrationsmessung von mRNA/miRNA/DNA

Die quantitative Konzentrationsmessung von RNA und DNA erfolgte mit dem Nano-Drop ND-1000 Gerät und dem Programm (ND-1000 V3.3.0). Sollte gleichzeitig eine qualitative Überprüfung der RNA bzw. miRNA-Fractionen erfolgen, wurde eine Messung am Bioanalyzer nach Herstellerangaben mit RNA Nano Chips (Agilent Technologies) durchgeführt.

3.2.3.4 Reverse Transkription (RT) von mRNA und miRNA

Die Umschreibung der miRNAs in cDNA erfolgte mittels des miScript I RT Kit von Qiagen anhand des Herstellerprotokolls.

MiRNAs, die keinen poly-A-Anhang besitzen, werden hierbei zunächst durch eine im Puffer enthaltene Poly(A)-Polymerase polyadenyliert. Ein ebenfalls im Puffer enthaltener Oligo-dT-Primer mit einem Anhang geheimer Sequenz (Universal tag) kann daraufhin an den Poly-A-Schwanz binden und mit Hilfe der auch im Puffer enthaltenen Reversen Transkriptase kann die miRNA-Sequenz in die komplementäre cDNA umgeschrieben werden.

In folgenden Messungen mit qRT-PCR werden 5'-Primer mit Sequenzen der zu messenden miRNA eingesetzt. Als 3-Primer wird der miScript Universal Primer mit der Sequenz des *Universal tags* eingesetzt. Diese geheime Sequenz wurde in der vorliegenden Arbeit durch Klonierung und nachfolgender Sequenzierung einer miRNA-cDNA ausfindig gemacht (siehe 3.2.3.5).

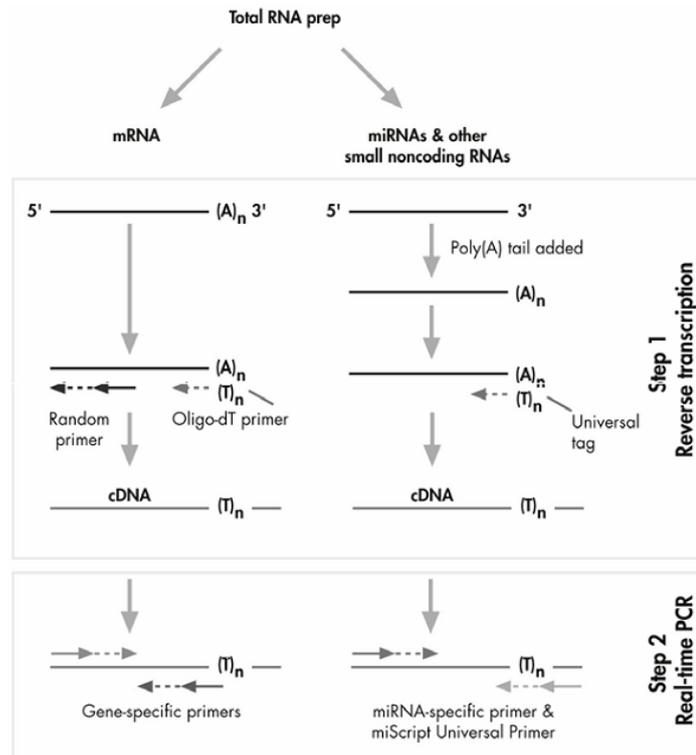


Abbildung 2: Reverse Transkription von miRNAs in cDNA mit miScript I RT Kit (Qiagen)

Im gleichen Ansatz der Reversen Transkription wurden auch die in der Probe enthaltenen mRNAs in cDNAs umgeschrieben.

3.2.3.5 Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)

Anhand der quantitativen Realtime-PCR kann die relative Menge einer mRNA/miRNA spezifischer Gene innerhalb verschiedener Proben quantifiziert und miteinander verglichen werden. Dazu wird die Anhäufung der PCR-Amplifikate während jedem Zyklus mittels eines Fluoreszenzsignals gemessen. Hierzu wird Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) mit der cDNA der jeweiligen Probe vermengt. Das *SYBR Green* bindet während jedem PCR-Schritt an die doppelsträngigen Amplifikate und emittiert daraufhin ein starkes Fluoreszenzsignal relativ zur Menge der Amplifikate. Bei der folgenden Denaturierung der beiden DNA-Stränge wird das *SYBR Green* wieder freigelassen.

Für die Quantifizierung von miRNAs wurde die cDNA der Proben auf je 0,05 ng/μl verdünnt, für mRNA-Messungen eines bestimmten Gens wurde die cDNA auf 0,5 ng/μl verdünnt. Pro Probe wurden Duplikate mit folgendem Reaktionsansatz in ein Loch einer 96-well-Platte pipettiert:

RT-PCR Ansatz:	10 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix
	0,8 µl 5'Primer (5 pmol/µl)
	0,8 µl 3'Primer (5 pmol/µl)
	4 µl cDNA
	4,4 µl H ₂ O

Das Programm der PCR-Maschine entsprach folgendem Schema:

Tabelle 3: Programm qRT-PCR-Maschine

Funktion	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 sek	} 35
Annealing	60°C	60 sek	
Elongation			
Dissoziationskurve	95°C	15 sek	1
	60°C	1 min	
	95°C	15 sek	

Die Sequenzen der benutzten Primer sind in Abschnitt 2.1.7.1 aufgelistet. mRNA-Primer wurden mittels des Programms Primer3 in der Regel intronüberspannend entworfen.

Die 5'-Primer für miRNAs entsprechen der gesamten *mature* miRNA-Sequenz oder sind um 1-2 Nukleotide kleiner, so dass sie idealerweise einer Schmelztemperatur von 60 °C entsprechen. Der 3'-Primer entspricht einer geheimen Sequenz, die während der Reversen Transkription mit dem miscript RT Kit (Qiagen) an die entstehende cDNA angehängt wird. Die quantitative RT-PCR von miRNAs wäre somit nur mit dem miScript PCR Kit (Qiagen) und dem darin enthaltenen *miScript Universal Primer* mit der geheimen Sequenz möglich. Aus Kostengründen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Amplifikat, welches in einer qRT-PCR mit dem miScript PCR Kit und dem *miScript Universal Primer* vervielfacht wurde, in den TOPO-TA-Vektor kloniert und sequenziert. Dadurch konnte die geheime 3'UTR-Sequenz identifiziert und ein selbsterstellter *Universal Primer* bestellt werden. Hiermit wurde die Messung von miRNAs mit dem Power SYBR® Green Master Mix (ABI) und damit Messungen von vielen verschiedenen miRNAs im großen Umfang erst möglich.

Zur Auswertung der gemessenen Gene wurde die Methode der relativen Quantifizierung mittels Standardkurve gewählt. Dazu wurde für alle gemessenen Gene eine Standardkurve anhand eines Pools aller Proben pipettiert und die Menge der einzelnen Proben darauf normalisiert. Die Effizienz der PCR-Amplifikation wird anhand

der Neigung der Standardkurve gemessen, die im Idealfall dem Wert -3.3 entspricht. Alle normalisierten Proben werden weiterhin mit einem Referenzgen innerhalb der jeweiligen Probe kalibriert, welches in allen Proben nicht reguliert vorliegen sollte. Dazu wird der Quotient der normalisierten Werte von Zielgen zu Referenzgen gebildet.

Für Messung der mRNA-Expression wurde *Hprt* als Referenzgen genutzt. Für die Bestimmung der miRNA-Expression wurde als Kalibrationswert der Mittelwert der Referenzgene *Rnu1a* und *Rnu6b* (*miScript PCR Controls*, Qiagen) gewählt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Isolierung von Proteinen aus Herzgewebe und Zellen

Herzgewebstücke (10-30 mg) wurden mit 400 µl supplementiertem RIPA-Puffer in *FastPrep™ Lysing Matrix D*-Gefäßen (MP Biomedicals) im Fast Prep-Gerät (FP 120, Thermo Savant) zweimal 20 Sekunden auf Stufe 4 homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend mit 0,5 % SDS Endkonzentration versetzt und 20 min bei 4 °C lysieren gelassen.

Bei Zellen wurde der RIPA-Puffer direkt auf das Well (300 µl/6-well) gegeben, die Zellen abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden ebenfalls für 20 min bei 4 °C lysieren gelassen.

Nach der Lyse erfolgte eine Zentrifugation bei 20800 x g über 10 min bei 4 °C, woraufhin der wässrige Überstand in neue Eppendorfröhrchen überführt und nach der Proteinkonzentrationsbestimmung bei -80 °C weggefroren wurde.

RIPA-Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 7,5	Suppl. RIPA-Puffer:	RIPA-Puffer
	150 mM NaCl		1x PhosSTOP
	1 % NP-40		1x Mini Complete
	1 mM EDTA		1 mM Na ₃ VO ₆
	0,25 % Na-Deoxycholate		10 mM NaF

3.3.2 Photometrische Konzentrationsmessung von Proteinen nach Bradford¹⁸³

Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Determination der Proteinkonzentrationen wurde eine Albumin (BSA)-Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen er-

stellt, anhand derer die unbekannt Konzentrationen der zu messenden Proben erschlossen werden können.

Die photometrische Messung wurde am BIORAD *Benchmark Plus Microplate Reader* durchgeführt.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der denaturierenden SDS-PAGE nach Laemmli (1970)¹⁸⁴ werden Proteine innerhalb eines elektrischen Feldes nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine wurden 8 %ige (Proteine > 70 kDa), 10 %ige (30–70 kDa Proteine) oder 12 %ige (Proteine < 30 kDa) Polyacrylamidgele angesetzt. Über die Trenngele wurde 5 %iges Sammelgel gegeben, in dem die Probe aufgetragen wird und als eine definierte Bande zusammenläuft. Die Zusammensetzung der Gele ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 4x Roti-Load (reduzierend) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) verwendet. Die Proteine wurden in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem im Elektrophoresepuffer bei 120 V ca. 3 Std. elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Trenngele (SDS-PAGE)

Gesamtvolumen 20 ml	8 % SDS-PAGE (Angaben in ml)	10 % SDS-PAGE (Angaben in ml)	12 % SDS-PAGE (Angaben in ml)
H₂O	9,3	7,9	6,6
30 % PAA	5,3	6,7	8
10 % SDS	0,2	0,2	0,2
10 % APS	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,012	0,008	0,008

Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels (SDS-PAGE)

Gesamtvolumen 5 ml	Sammelgel (Angaben in ml)
H₂O	3,4
30 % PAA	0,830
1 M Tris, pH 6,8	0,630
10 % SDS	0,050
10 % APS	0,050
TEMED	0,005

Elektrophorese-Puffer (5l 5x Stock): 75,5 g Tris Base
 470 g Glycin
 4 l H₂O
 250 ml 10 % SDS
 mit H₂O auf Endvolumen auffüllen

3.3.4 Western Blot

Bei dem Western-Blot werden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der sie mittels Antikörperhybridisierung detektiert werden. Die Nitrozellulosemembran sowie das Polyacrylamidgel wurden für 10 min im Transferpuffer äquilibriert. Beide wurden dann zwischen zwei, in Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatmanpaper) und Schwämme gelegt, in die Apparatur eingespannt und vertikal in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer (Biorad) gesteckt. Wichtig ist, dass die Membran zwischen dem Gel und dem Pluspol der Kammer lokalisiert ist. Der Transfer wurde entweder über Nacht bei 100 mA oder für 1,5 Std. bei 400 mA in der Kältekammer durchgeführt. Der Erfolg des Transfers wurde mittels Ponceaufärbung, die die Proteine auf der Membran rot anfärbt, überprüft. Dafür wurde die Membran eine Minute in Ponceau gebadet und daraufhin wurde durch 3maliges Waschen der Membran mit Wasser überschüssiges Ponceau abgewaschen.

Nach dem (überprüft) erfolgreichen Proteintransfer wurde die Membran 1 Std. mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T geblockt. Zur Detektion spezifischer Proteine auf der Membran wurde diese mit den entsprechenden Primärantikörpern wiederum in 5 % Magermilchpulver in TBS-T in der jeweiligen Verdünnung für mind. 3 Std. inkubiert.

Nach drei 10 minütigen Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 1 Std. inkubiert und nachfolgend wieder gewaschen. Im Anschluss wurden die Banden nach Inkubation der Membran für 5 Minuten in ECL-Lösung (GE Healthcare) durch Lichtdetektion aufgrund der Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

Die quantitative Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ.

Tris buffered saline (TBS):	10x Stock (2 l)	Tris buffered saline + Tween (TBS-T):	1x Stock (1 l)
Tris Base	48,8 g	10x TBS Stock	100 ml
NaCl	160 g	H ₂ O	900 ml
H₂O	2 l	Tween-20	1 ml
	mit H ₂ O auf Endvolumen auffüllen und auf pH 7,6 einstellen		

Transferpuffer (5 l 4x Stock):	Transferpuffer (5 l 1x Stock):
72,73 g Tris Base	1 l 4x Transferpuffer
345,95 g Glycin	1 l Ethanol
mit H ₂ O auf Endvolumen auffüllen	3 l H ₂ O

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Zellkultivierung

Die HL-1-Zellen wurden in supplementiertem Claycomb-Medium mit 10 % *Fetal bovine serum* (FBS) nach Anleitung des Protokolls von Prof. Claycomb kultiviert¹⁷⁹. Vor der Passage der Zellen auf neue Flaschen wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin und unter Klopfen an der Schale gelöst. In supplementiertem Claycomb-Medium wurden die Zellen verdünnt und auf mit Gelatin/Fibronectin-beschichtete Flaschen oder Platten verteilt. Die Zellen wurden in einem 37 °C-Inkubator mit 5 % CO₂ wachsen gelassen.

Alle Behandlungen der Zellen erfolgten bei einer 50-70 %igen Konfluenz.

Supplementiertes Claycomb Medium:	100 ml	Endkonzentration
Claycomb Medium	87 ml	
HL-1 FBS	10 ml	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 ml	100 U/ml : 100 µg/ml
Norepinephrin	1 ml	0,1 mM
L-Glutamin	1 ml	2 mM

3.4.1.1 Behandlung der Zellen mit E2, P4 und Endothelin-1

Für die Induktion von Hypertrophie wurden die HL-1 Zellen mit 50 nM Endothelin-1 (Et-1) stimuliert. Zeitgleich wurden die Zellen mit 100 nM P4, 10 nM E2 oder der entsprechenden Dextrin- bzw. Ethanol-Kontrolle behandelt. Die Zellen wurden 24 Std. vor der Behandlung mit einem supplementierten Medium mit 2,5 % FCS bedeckt. Die Stimulation erfolgte über 48 Std. ebenfalls in 2,5 %-FCS-Medium. Für alle Experimente wurde Claycomb-Medium ohne Phenolrot benutzt, da dieses östrogenähnliche Eigenschaften besitzt. Ebenso wurde in jeder Hormonbehandlung nur Aktivkohle-behandeltes FCS benutzt, wodurch die im FCS enthaltenden Steroidhormone weitestgehend eliminiert wurden.

3.4.1.2 Behandlung der Zellen mit miR-Inhibitoren, P4 und CoCl₂

Für die Untersuchung des Einflusses von miR-26a und miR-30a auf die Zellviabilität wurden HL-1-Zellen bei einer ca. 50 %igen Konfluenz mit 200 nM miR-Inhibitoren (Panagene) transfiziert. Sechs Stunden nach der Inhibition der miRNAs wurden die Zellen im gleichen Medium zusätzlich mit 100 nM P4 bzw. ihrer Dextrinkontrolle stimuliert. 24 Std. danach wurde Apoptose induziert, indem CoCl₂ mit einer Endkonzentration von 200 µM in das vorhandene Medium gegeben wurde. Nach weiteren 12 Std. wurden 0,4 µg/µl MTT hinzugegeben und wiederum nach drei Std. erfolgte der Assay gemäß 3.4.4.

3.4.2 Transiente Transfektion der Zellen

3.4.2.1 Transiente Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA

Transiente Transfektion der Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektiosagens Fugene HD. Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen auf Antibiotika-freies Medium gewechselt. Für die Transfektion wurde 100 µl Claycomb-Medium pro 12-well mit 3 µl Fugene HD und 1 µg Plasmid-DNA vermengt und für 15 min bei RT inkubiert.

Daraufhin wurde die Mischung auf die Zellen gegeben und diese für 24-48 Std. inkubiert.

3.4.2.2 Transfektion der Zellen mit miRNA-Inhibitoren

Die Zellen wurden bei 50-60 %iger Konfluenz auf Antibiotika-freies, supplementiertes Claycomb-Medium gewechselt. Die Inhibitoren wurden mit 3 µl Fugene-HD in 150 µl nicht-supplementiertem Claycomb-Medium verdünnt, 15 min inkubiert und auf den Zellen verteilt, so dass eine Endkonzentration von 200 nM erreicht wurde. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren für 48 Std. bei 37 °C bei 5 % CO₂. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und RNA sowie Proteine isoliert (siehe 3.2.3.1 und 3.3.1). Eine Transfektion der Zellen mit den PNA-miRNA-Inhibitoren (Panagene) ist ohne Transfektionsagent möglich, wurde in allen Experimenten jedoch mit HD-Fugene-Transfektionsagent durchgeführt.

3.4.3 Luciferase-Reporter-Assay

Für die Messung des Luciferase-Signals des psiCHECK™-2-Vektors wurde der *Dual-Glo-Luciferase-Assay* von Promega genutzt. Hierzu wurden die mit dem Vektor transfizierten Zellen 24 Std. nach der Transfektion mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde 50 µl PBS pro Well einer 48-Wellplatte auf die Zellen gegeben und zum Aufbruch der Zellen die gesamte Platte bei -80 °C eingefroren. Nach schnellem Auftauen im Wasserbad wurde das Zelllysate der Proben in eine 96-Wellplatte überführt. Für die Transfektionsnormalisierung wurde zunächst die *Firefly-Luciferase-Aktivität* gemessen, indem 50 µl *Dual-Glo Luciferase Reagenz* pro 96-Well zu den Zelllysaten hinzugefügt wurde. Die Platte wurde im Luminometer *Victor 3 Plate Reader* (PerkinElmer) 10 Sekunden geschüttelt und nach 10 minütiger Inkubation wurde die Lumineszenz jeder Probe bei 550 nm bestimmt. Zum Stoppen der *Firefly-Luciferase-Aktivität* und zur Messung der *Renilla-Luciferase-Aktivität* wurde danach 50 µl *Dual-Glo Stop&Glo Reagenz* pro Probe hinzugefügt. Die Platte wurde wiederum im Luminometer für 10 sec geschüttelt und nach 10 Minuten wurde die *Renilla-Luciferase-Aktivität* gemessen. Anhand des *Renilla/Firefly*-Quotienten kann der Einfluss der klonierten 3'UTR auf die Translation des *Renilla*-Proteins gemessen werden. Eine Verringerung der *Renilla*-Aktivität spricht für eine funktionelle miRNA-Bindung an die 3'UTR und für eine folgende Inhibition der Translation des entsprechenden Proteins durch miRNAs.

3.4.4 MTT-Test

Der MTT-Test dient der Analyse der Vitalität von Zellen, sowie der Zytotoxizität oder protektiven Funktion von Substanzen auf Zellen oder Gewebe. Die Vitalität der Zellen

wird anhand ihrer metabolischen Umsetzung von MTT zu farbigem Formazan gemessen, dessen Gehalt photometrisch bestimmt wird.

Für den Test wurden die Zellen in 48-well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden 48 Std. vor der Messung mit 200 nM miRNA-Inhibitoren transfiziert. Sechs Stunden danach wurden die Zellen zusätzlich mit 100 nM P4 oder ihrer Dextrinkontrolle stimuliert. Zur Induktion von Apoptose wurden die Zellen 12 Std. vor der MTT-Messung mit 200 µM Kobaltchlorid (CoCl₂) versetzt. CoCl₂ imitiert Hypoxie und induziert somit Apoptose. Am nächsten Tag wurde in jedes Well 0,4 µg/µl MTT gegeben und die Zellen für 3 Std. hiermit inkubiert. Während dieser Zeit wird ausreichend Formazan gebildet. Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und in je 200 µl DMSO ly-siert. Das gelöste Formazan wurde photometrisch bei 550 nm gemessen. Je niedriger die Absorption, desto weniger Formazan wurde von den Zellen gebildet und desto niedriger war die Vitalität.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Tiere und Tierhaltung

Es wurden neun Wochen (TAC) bzw. elf Wochen (Hormonbehandlung) alte, wildtypische C57BL/6-Mäuse aus dem Tierzuchtlabor der Harlan Winkelmann GmbH bezogen. Die Tiere wurden im institutseigenen Tierstall unter Tierschutzaufgaben gehalten. Wasser und Futter stand ihnen unbegrenzt zur Verfügung. Für die TAC-OP musste ein Mindestkörpergewicht zwischen 18-25 g erreicht sein. Alle Tierversuche waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt.

3.5.2 Transverse Aortenstenose (TAC)

Die transverse Aortenstenose dient als Modell der operativ-induzierten LVH. Es führt primär zu einer chronischen Nachlastserhöhung und nachfolgend zu einer kompensierenden LVH, die schlussendlich zu einer Herzinsuffizienz führt.

Die TAC-Operationen der Tiere für diese Arbeit wurden von Frau Dr. D. Fliegner und Frau Dr. C. Westphal durchgeführt und erfolgten nach bereits publiziertem Protokoll³⁷. Kurz: Mittels eines Längsschnitts entlang des Sternums (Sternotomie) wurde der Brustkorb geöffnet und der Zugang zum Herz und zur Aorta freigelegt. Für die Konstriktion der Aorta wurde der Durchmesser des Aortenbogens im Bereich zwischen dem ersten und zweiten Ast (*Truncus brachiocephalicus* und *A. carotis communis sinistra*) mit einem Seidenfaden verengt. Zur normierten Verengungsgröße diente als Platzhalter eine Kanüle (26 Gauge) mit einem Durchmesser von 0,45 mm, welches zu einer

80 %igen Verengung der Ausgangsgröße der Aorta führt. Bei Sham-Tieren (scheinoperierte Kontrolltiere) wurde ebenfalls die Sternotomie durchgeführt; die Ligation der Aorta und somit eine Induktion von LVH erfolgte hingegen nicht. Echokardiographische Messungen der Herzfunktion wurden einen Tag vor der Organentnahme von Dr. C. Westphal und S. Niehage durchgeführt. 14 Tage nach der OP wurden die Tiere getötet und die Herzen entnommen.

Die Studie lief unter der Tierversuchsnummer G 0200/09 und wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt.

3.5.3 Ovariectomie

Die Messungen von miR-21 im LV von ovariectomierten Mäusen sind aus RNA-Proben der Doktorarbeit *„Einfluss von Östrogen und Östrogenrezeptoragonisten/-modulatoren auf kardiale Umbauprozesse bei drucklastinduzierter Hypertrophie“* von Frau Dr. C. Westphal. Alle Details zu den Tieren und der Ovariectomie sind der Arbeit zu entnehmen. Kurz: Sieben Wochen alten, weiblichen C57BL/6J-Mäusen wurden durch einen Schnitt in der Flanke die Ovarien freigelegt. Am Übergang zu den Uteri wurden die Ovarien abgebunden und anschließend abgetrennt. Bei nicht ovariectomierten Tieren (SOVX) erfolgte die gleiche Prozedur ohne die Ligation der Eileiter und die Entfernung der Ovarien. Die Organentnahme erfolgte elf Wochen nach der Ovariectomie.

3.5.4 In vivo-Behandlung mit E2 und P4

Elf Wochen alten Tieren wurde 0,2 mg in Wasser gelöstes E2, 0,23 mg P4 bzw. als Kontrolle die entsprechende Menge gelöstes Dextrin pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal in die Bauchhöhle injiziert. Fünf Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Herzen entnommen. Die Injektionen und Tötungen wurden von Vanessa Riese durchgeführt. Die Herzentnahme und nachfolgende Messungen/Auswertungen wurden von der Autorin dieser Arbeit vorgenommen.

Die Studie lief unter der Tierversuchsnummer G 0001/11 und wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt.

3.5.5 In vivo-Behandlung mit E2 und nachfolgende Isolierung kardialer Myozyten

Die Messungen von miRNAs in isolierten Kardiomyozyten aus Mäusen nach fünfstündiger E2-Behandlung erfolgte in RNA-Proben, die in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden waren. Die Behandlung der Mäuse und Aufbereitungen der Proben wurden von Dr. Georgios Kararigas in der Universität Leuven durchgeführt und wurden bereits ver-

öffentlich¹⁸⁵. Kurz: 11- bis 14-Monate alten C57BL/6J-Mäusen wurde 0,2 mg/kg E2 bzw. Dextrin als Kontrolle injiziert und fünf Std. später wurden die Versuchstiere getötet. Die Kardiomyozyten wurden isoliert und die RNA-Fractionen aufgereinigt. Die Experimente wurden genehmigt von der Ethikkommission der Universität Leuven.

3.6 Statistische Analyse

Statistische Analysen und grafische Darstellung der Messungen wurden mit Hilfe der Programme GraphPad Prism oder IBM SPSS Statistics 19 durchgeführt.

Für Experimente mit vier Gruppen und zwei Faktoren (Geschlecht, Behandlung/Operation) wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (2-way ANOVA) durchgeführt. Mit dem anschließenden Bonferroni Posthoc Test wurden die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen erhoben. Experimente mit nur einem Faktor (z. B. Behandlung von Zellen) wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (1-way ANOVA) und anschließendem Bonferroni Posthoc Test statistisch untersucht. Für zwei einzelne Stichproben wurde der Zweistichproben-t-Test angewandt. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. In den grafischen Darstellungen sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) der einzelnen Gruppen angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Ausprägung linksventrikulärer Hypertrophie zwei Wochen nach Aortenstenose

Die Entwicklung und das Ausmaß der LVH lässt sich anhand verschiedener physiologischer, funktioneller und molekularer Parameter bestimmen. Physiologische Parameter sind z. B. das Verhältnis von Herzgewicht zum Körpergewicht. Gesteigerte Werte indizieren eine Vergrößerung des linken Ventrikels und somit eine fortschreitende Entwicklung von kardialer Hypertrophie. Anhand von echokardiographischen Messungen können Funktionen wie die Ejektionsfraktion (Auswurfraction) des Herzens untersucht werden. Im Laufe der Entwicklung der LVH entsteht ein Umbau des Herzmuskels, welcher mit abnehmender Pumpfunktion und verringerten Ejektionsfraktionen einhergeht. Diese Verschlechterung der Herzfunktion führt im Endstadium zu Herzversagen. Als molekularer Marker wird u. a. die gesteigerte Expression von Nppa genutzt.

Für die vorliegende Arbeit wurde bei neun Wochen alten C57BL/6-Mäusen eine Aortenstenose durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) erzeugt, die zu Bluthochdruck und LVH führt. MiRNA-, mRNA- oder Proteinexpressionen im LV wurden von männlichen und weiblichen Sham- oder TAC-operierten Mäusen untersucht und miteinander verglichen. Zwei Wochen nach der Aortenkonstriktion wurden daher die Herzen entnommen und RNA- oder Proteinfractionen isoliert. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das Herz in Anfangsstadien der LVH, wobei die maladaptive Form der Hypertrophieentwicklung noch nicht eingetreten ist.

In Abbildung 3 ist das Ausmaß der LVH zwei Wochen nach der Operation anhand verschiedener Parameter zu sehen. Das Herzgewicht war im Verhältnis zum Körpergewicht bei beiden Geschlechtern signifikant gestiegen (Abbildung 3A). Die Pumpfunktion des Herzens war noch nicht signifikant reduziert, wobei jedoch tendenziell bereits eine stärkere Verschlechterung bei den Männchen aufgetreten war (Abbildung 3B). Bei den Weibchen sank die Ejektionsfraktion nach zwei Wochen lediglich um 2 %, während bei den Männchen bereits ein mittlerer Unterschied von 19 % auszumachen war. Nppa, ein molekularer Marker für kardiale Hypertrophie, war in beiden Geschlechtern signifikant erhöht (Abbildung 3C). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass bei den TAC-operierten Mäusen eine Ausbildung von LVH begonnen hatte.

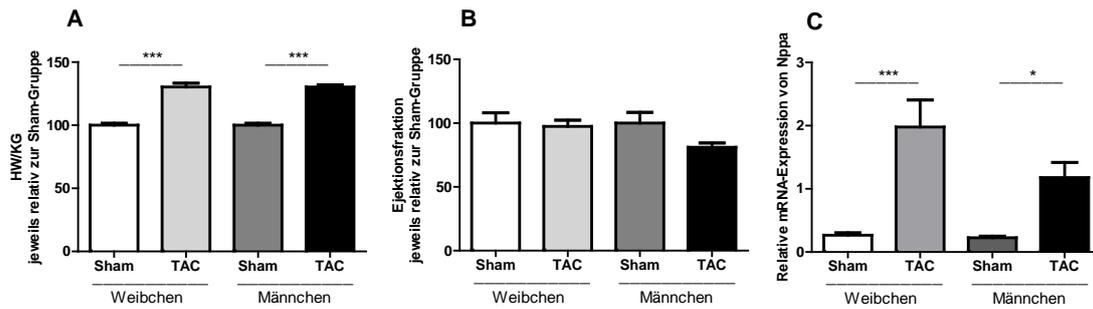


Abbildung 3: **Darstellung verschiedener Parameter zur Messung der LVH zwei Wochen nach TAC-Operation.** A) Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht (KG). B) Ejektionsfraktion des linken Ventrikels. C) Anstieg des molekularen Markers Nppa. (n = 10-14), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test

4.2 Microarray

Zur Erfassung der im linken Ventrikel (LV) von Mäusen exprimierten miRNAs und zur Regulationsanalyse von miRNAs während LVH wurde ein genomweiter miRNA-Microarray durchgeführt. Hiermit konnte einerseits ein Überblick gewonnen werden, welche miRNAs im LV exprimiert werden. Weiterhin konnten die Regulationen von miRNAs während der Entwicklung von LVH, sowie Unterschiede zwischen den Geschlechtern analysiert werden. Vier Gruppen wurden miteinander verglichen: Männliche Sham (MS)-, männliche TAC (MT)-, weibliche Sham (WS)- und weibliche TAC (WT)-Tiere. Aus jeder Gruppe wurde die miRNA-Expression von vier biologischen Replikaten mit dem Array gemessen.

4.2.1 81 miRNAs wurden im linken Ventrikel detektiert

Es wurden 81 miRNAs detektiert, die im murinen LV exprimiert waren (Tabelle 6).

Tabelle 6: 81 im LV der Maus detektierte miRNAs.

Systematischer Name				
let-7a	miR-126-3p	miR-199a-5p	miR-296-5p	miR-378
let-7b	miR-130a	miR-199b	miR-29a	miR-378*
let-7c	miR-133a	miR-199b-5p	miR-29b	miR-451
let-7d	miR-133a*	miR-19b	miR-29c	miR-486-5p
let-7e	miR-133b	miR-203	miR-301a	miR-487b
let-7f	miR-140-3p	miR-208b	miR-30a	miR-497
let-7g	miR-143	miR-20a	miR-30a*	miR-499-5p
let-7l	miR-145	miR-21	miR-30b	miR-500-3p
miR-1	miR-151-5p	miR-22	miR-30c	miR-503
miR-100	miR-152	miR-221	miR-30d	miR-690
miR-103	miR-15a	miR-23a	miR-30e	miR-720
miR-106a	miR-15b	miR-23b	miR-30e*	miR-878-3p
miR-106b	miR-16	miR-24	miR-31	miR-99a
miR-107	miR-185	miR-26a	miR-335-3p	
miR-125a-3p	miR-193a-3p	miR-27a	miR-345-5p	
miR-125b	miR-193b	miR-27b	miR-34a	
miR-125b-3p	miR-195	miR-290-5p	miR-350	

Mittels miRNA-Microarray detektierte miRNAs im murinen LV, deren kalibrierte Signalintensitäten in mindestens drei Proben einer Gruppe größer als 100 waren.

Die 25 miRNAs mit der stärksten Signalintensität auf dem Array sind in der Tabelle 7 aufgelistet. Auffällig ist, dass sich vielfach mehrere Mitglieder einer miRNA-Familie (z. B. miR-133, -30, -27, let-7) unter den im LV stark angereicherten miRNAs befinden.

Tabelle 7: Die im LV am stärksten exprimierten miRNAs.

Ranking	miRNA
1	miR-133b
2	miR-133a
3	miR-126-3p
4	miR-24
5	miR-22
6	miR-143
7	miR-26a
8	miR-378
9	miR-23a
10	miR-27a
11	let-7a
12	miR-29a
13	miR-23b
14	miR-30c
15	miR-30d
16	miR-30a
17	miR-16
18	miR-30b
19	miR-145
20	let-7c
21	miR-27b
22	miR-1
23	let-7d
24	miR-30e
25	let-7f

Aufgelistet nach absteigender Signalintensität im Microarray.

4.2.2 Regulation von miRNAs durch hypertrophen Stress und Geschlecht

Alle mittels Microarray identifizierten, regulierten miRNAs zwei Wochen nach Aortenstenose sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Es wurden neun miRNAs identifiziert, deren Expression nach TAC zugenommen hatte (miR-199a-5p, -497, -23b, -24, 107, -19b, -27a/b und let-7i) (Tabelle 8). Drei von ihnen, miR-24 und miR-27a/b, befinden sich auch unter den 25 im LV am stärksten exprimierten miRNAs.

Sieben miRNAs waren nach Aortenstenose herunterreguliert (Tabelle 8). Dies sind Mitglieder der Familie der miRNA-30 und -133, sowie miR-26a und miR-145. Alle diese miRNAs befinden sich unter den 25 im LV am stärksten exprimierten miRNAs.

Ein Unterschied zwischen den Geschlechtern wurde bei miR-103 identifiziert. Die zweifaktorielle Varianzanalyse wies hier eine signifikante Interaktion zwischen TAC-Operation und Geschlecht auf; grenzwertige Signifikanzen der Interaktion wurden bei miR-497 und -130a gemessen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Regulierte miRNAs nach Aortenstenose (TAC)

Hochreguliert nach TAC	Herabreguliert nach TAC	Interaktion (Geschlecht * TAC)
miR-199a-5p ***	miR-30c **	miR-103 *
miR-497 ***	miR-30d **	miR-497 (*)
let-7i **	miR-133a *	miR-130a (*)
miR-23b **	miR-133b *	
miR-24 **	miR-145 *	
miR-107 *	miR-26a *	
miR-19b *	miR-30b *	
miR-27a *		
miR-27b *		
miR-195 (*)		

Relative Expression der miRNA-Expression analysiert mittels miRNA-Microarray, (n = 3-4). (*) $p < 0,075$ (grenzwertige Signifikanz), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, 2-faktorielle Varianzanalyse.

Insgesamt konnten anhand des Microarrays zwei Wochen nach TAC neun hoch- und sieben herabregulierte miRNAs identifiziert werden. Zusätzlich wurde ein Geschlechterunterschied bei miR-103 ausgemacht. Um die Microarray-Daten zu verifizieren, wurde die Expression ausgewählter miRNAs mittels quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR) überprüft (siehe Abschnitt 4.4).

4.3 Überrepräsentation von Zielgenen regulierter miRNAs in herz-assoziierten Signalwegen

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Regulation der miRNAs auf die Entwicklung der LVH haben könnte, wurde eine Überrepräsentationsanalyse der Zielgene der

regulierten miRNAs durchgeführt. Für die Untersuchung überrepräsentierter Signalwege wurde das Programm CPDB (siehe Abschnitt 3.1.2) gewählt; angereicherte Signalwege mit einem $p < 0,01$ wurden analysiert. Zur Identifizierung möglicher Zielgene der miRNAs wurde die Datenbank Targetscan genutzt. Eine miRNA besitzt hier durchschnittlich ca. 500 vorhergesagte Zielgene.

Die anhand des Microarrays identifizierten, regulierten miRNAs wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Gruppe der herunterregulierten miRNAs umfasste miR-133, -30, -1, -26 und -145. In der Gruppe der hochregulierten miRNAs befanden sich miR-199-5p, -27, -107, -19, -497/195, -23 und -24. Let-7i wurde ausgespart, weil alle anderen let-7-Mitglieder nicht signifikant reguliert waren und die vorhergesagten Zielgene aufgrund derselben ‚seed‘ gleich sind. In einer Kontrollgruppe wurden die Zielgene von nicht-regulierten, im Herzen jedoch stark exprimierten miRNAs (miR-22, -99, -100 und let-7) zusammengefasst.

Aufgrund der großen Menge an Zielgenen pro Gruppe waren sehr viele Signalwege angereichert. Die 15 Signalwege mit dem kleinsten p-Wert pro Gruppe sind in Tabelle 9 aufgelistet. Weiterhin waren in der Analyse viele Signalwege aus Prozessen im Herzen überrepräsentiert (herz-assoziierte Signalwege). Sie sind in derselben Tabelle aufgeführt. Bei allen Gruppen war der in Wikipathways annotierte Signalweg ‚Muskelzelle‘ (*Muscle Cell*) jeweils der am zweitstärksten angereicherte Signalweg (Tabelle 9). Die mit dem Microarray detektierten miRNAs waren im Herzen stark angereicherte miRNAs. Dass auch ihre vorhergesagten Zielgene in Muskelzellen angereichert vorliegen, bekräftigt die funktionelle Bedeutung von miRNAs in Muskelzellen (bzw. in Kardiomyozyten) und bestätigt die Effizienz der Zielgen-Suchprogramme.

Viele Zielgene der regulierten miRNAs waren in herzspezifischen Signalwegen und bei Signalwegen in pathologischen Prozessen des Herzens angereichert (herz-assoziierte Signalwege). Bei der Kontrollgruppe der nicht-regulierten miRNAs war dies nicht der Fall. Die Zielgene der herunterregulierten miRNAs sind bei kardialer Hypertrophie, bei Prozessen der Muskelkontraktion und bei arrhythmogenen Kardiomyopathien überrepräsentiert (Tabelle 9). Die Anreicherung der Zielgene der heraufregulierten miRNAs umfasst die Signalwege Hypertrophie, Muskelkontraktion, Herzentwicklung und spezielle Signalwege wie ‚Stickstoffmonoxid-Aktionen im Herzen‘. Der Signalweg ‚Kalziumregulation in kardialen Zellen‘ ist in allen Gruppen überrepräsentiert; dieser Signalweg ist als einziger herz-assoziiertes Prozess auch in der Kontrollgruppe angereichert. Da in der vorliegenden Arbeit die Rolle von miRNAs in der Entwicklung von LVH untersucht wird, wurden alle Zielgene aus den herz-assoziierten Signalwegen in einer Liste zusammengefasst (Tabelle 10). Für weitere Studien zur Rolle von miRNAs in LVH könnte damit die Menge potentieller, relevanter Zielkandidaten im Herzen reduziert werden.

Unter den Zielgenen von herabregulierten miRNAs finden sich auffallend viele Gene kodierend für strukturelle und kontraktile Proteine wie Integrine (ITG), Tropomyosine (Tpm), Actine (ACT), Actinine (ACTN), sowie Gene von Calciumkanälen (CACN) und Calcineurin (PPP3) (siehe Tabelle 10). Weiterhin sind Transkriptionsfaktoren wie GATA4, HAND2 und HDAC9 Zielgene von herabregulierten miRNAs. Unter den Zielgenen der heraufregulierten miRNAs finden sich übermäßig viele MAP-Kinase-Gene, sowie NFATC- und VEGF-Gene (siehe Tabelle 10). Zielgene, die in beiden Gruppen zu finden sind, besitzen sowohl vorausgesagte Bindestellen von herab- sowie heraufregulierten miRNAs. Für viele der identifizierten Zielgene ist bereits bekannt, dass sie während LVH die entgegengesetzte Regulation aufweisen als die beobachtete Regulation der entsprechenden miRNAs (z. B. GATA4, HAND2, Integrine, Tropomyosine). Dies verstärkt die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Rolle von miRNAs bei der Regulation dieser Gene. Für einige vorhergesagte Zielgene sind bereits Geschlechterunterschiede im Herzen identifiziert; auch hierbei könnten miRNAs eine Rolle spielen und ihr Einfluss müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

Tabelle 9: Überrepräsentierte Signalwege von Zielgenen LVH-regulierter miRNAs

Überrepräsentierte Signalwege (Datenbank/Quelle)			
Rang	Zielgene hochregulierter miRNAs	Zielgene herabregulierter miRNAs	Zielgene nicht-regulierter miRNAs
1	EGFR1 (NetPath)	Lymphocyte TarBase (Wikipathways)	MAPK signaling pathway (Wikipathways)
2	Muscle cell TarBase (Wikipathways)	Muscle cell TarBase (Wikipathways)	Muscle cell TarBase (Wikipathways)
3	Lymphocyte TarBase (Wikipathways)	Epithelium TarBase (Wikipathways)	MAPK signaling pathway (KEGG)
4	VEGF (INOH)	Squamous cell TarBase (Wikipathways)	Lymphocyte TarBase (Wikipathways)
5	IL-7 signaling (INOH)	Axon guidance (Reactome)	Signalling by NGF (Reactome)
6	EPO signaling (INOH)	Developmental Biology (Reactome)	mapkinase signaling pathway (BioCarta)
7	Axon guidance (KEGG)	EGFR1 (NetPath)	EGF-Core (Signalink)
8	Insulin signaling pathway (Wikipathways)	Axon guidance (KEGG)	Insulin Signaling (Wikipathways)
9	Pathways in cancer (KEGG)	Signalling by NGF (Reactome)	Pathways in cancer (KEGG)
10	EGF-EGFR Signaling Pathway (Wikipathways)	Insulin Signaling (Wikipathways)	ATF-2 transcription factor network (PID)
11	MAPK signaling pathway (KEGG)	EGF-Core (Signalink)	ErbB1 downstream signaling (PID)
12	EGF-Core (Signalink)	Wnt signaling pathway (KEGG)	NGF signalling via TRKA from the plasma membrane (Reactome)
13	Signaling by EGFR in Cancer (Reactome)	Pathways in cancer (KEGG)	Post-transcriptional Silencing By Small RNAs (Reactome)
14	Signaling by EGFR (Reactome)	Leukocyte TarBase (Wikipathways)	AP-1 transcription factor network (PID)
15	Developmental Biology (Reactome)	MAPK signaling pathway (Wikipathways)	Signaling by PDGF (Reactome)

Überrepräsentierte, herz-assoziierte Signalwege (Datenbank/Quelle)

<p>MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy (Wikipathways)</p> <p>Calcium Regulation in the Cardiac Cell (Wikipathways)</p> <p>Vascular smooth muscle contraction (KEGG)</p> <p>nfat and hypertrophy of the heart (BioCarta)</p> <p>Physiological and Pathological Hypertrophy of the Heart (Wikipathways)</p> <p>role of egf receptor transactivation by gpcrs in cardiac hypertrophy (BioCarta)</p> <p>actions of nitric oxide in the heart (BioCarta)</p> <p>Heart Development (Wikipathways)</p>	<p>Physiological and Pathological Hypertrophy of the Heart (Wikipathways)</p> <p>Calcium Regulation in the Cardiac Cell (Wikipathways)</p> <p>Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) (KEGG)</p> <p>Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (Wikipathways)</p> <p>nfat and hypertrophy of the heart (BioCarta)</p> <p>Vascular smooth muscle contraction (KEGG)</p> <p>MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy (Wikipathways)</p> <p>Dilated cardiomyopathy (KEGG)</p> <p>Smooth Muscle Contraction (Reactome)</p> <p>Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) (KEGG)</p> <p>Muscle contraction (Wikipathways)</p>	<p>Calcium Regulation in the Cardiac Cell (Wikipathways)</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------

Tabelle 10: Zielgene von LVH-regulierten miRNAs in herz-assoziierten Signalwegen

Zielgene herabregulierter miRNAs				Zielgene heraufregulierter miRNAs			
ACTB	DMD	KCNMB2	PRKAG2	ACTA2	CHRM1	MAP2K1	PLA2G6
ACTC1	DSC2	LIF	PRKCB	ADAM12	CHUK	MAP2K3	PPP1CB
ACTG1	EDN1	LIFR	PRKCD	ADCY1	EDNRA	MAP2K4	PPP1CC
ACTN1	EDNRA	LRP6	PRKCE	ADCY3	EDNRB	MAP2K7	PPP1R12A
ACTN4	FZD2	MAPK3	PRKCC	ADCY6	EGFR	MAP3K14	PRKAR2A
ADCY5	GATA4	MAPK8	PXN	ADCY7	FGF10	MAPK1	PRKCA
ADCY6	GJA1	MEF2C	ROCK1	ADORA2A	FOXC2	MAPK14	PRKCB
ADRA1D	GNA13	MRV11	ROCK2	ADORA2B	GNA12	MAPK3	PRKCD
ADRB1	GNAQ	MYH11	SGCB	ADSS	GNA13	MAPK7	PRKCE
ARHGEF12	GSK3B	MYL12B	SLC8A1	ARAF	GNAQ	MAPK8	PRKG1
ATP2A2	HAND2	MYLK	SORBS3	ARHGEF12	GSK3B	MEF2C	RAF1
BRAF	HDAC9	PIK3CD	SOS1	BMPR1A	HBEGF	MYEF2	ROCK1
CACNA1C	IGF1	PIK3R2	TCF7	BMPR2	HSP90AA1	MYLK	ROCK2
CACNA1D	IGF1R	PIK3R3	TCF7L2	BRAF	IGF1	NFATC1	RPS6KB1
CACNB4	IL6ST	PLA2G4A	TGFB2	CACNA1C	IGF1R	NFATC2	SLC7A1
CALM1	ITGA5	PLCB1	TPM3	CALCRL	IKBKB	NFATC3	SOS1
CALM2	ITGA8	PPP1R12A	TPM4	CALD1	IL6ST	PDE3A	TBX20
CAMK2D	ITGA9	PPP3CA	WNT5A	CALM1	IRX4	PDE3B	TBX5
CAMKK2	ITGB3	PPP3CB		CALM3	ISL1	PDPK1	TNF
CDH2	ITPR1	PRKAA2		CAMK2B	LIF	PIK3CA	VEGFA
CDK9	JUP	PRKACB		CAMK2D	LIFR	PIK3R1	VEGFC
				CAMKK1	LRP5	PIK3R3	WNT3A
				CAV1	LRP6	PLA2G10	YWHAH

4.4 Validierung des Microarrays mittels qRT-PCR

Zur Validierung des Microarrays wurde das Expressionsmuster ausgewählter miRNAs mittels qRT-PCR analysiert. Die 27 ausgewählten miRNAs umfassten im Microarray detektierte, nach TAC regulierte miRNAs wie miR-133a, -145, -24, -26a, -27a/b, -30a, sowie die (tendenziell) geschlechtsspezifisch regulierten miRNAs miR-103, -497 und -130a. Weiterhin wurden miRNAs untersucht, die im Array zu schwach detektiert wurden, aber bereits als im Herzen funktionell relevant bekannt waren (miR-21, miR-221/222). Zusätzlich wurden miRNAs, die in einem 9-Wochen-TAC-Modell innerhalb der Arbeitsgruppe als geschlechtsspezifisch exprimiert detektiert wurden (miR-106a/b, miR-290-5p; noch nicht publizierte Daten) auch im 2-Wochen-TAC-Modell gemessen.

MiR-21 war als einzige der 27 gemessenen miRNAs nach TAC hochreguliert. MiR-27b und -221, bei denen im Microarray eine Zunahme der Expression detektiert wurde, erreichten Quotienten (Ratios) größer als 1,1, erlangten jedoch keine statistische Signifikanz (Tabelle 12).

11 der 27 gemessenen miRNAs zeigten eine signifikante Abnahme der Expression nach TAC. Dies sind miR-145, -26a, -30a, -133a, -106b sowie miR-29a/b und Mitglieder der let-7-Familie (siehe Tabelle 11). Damit konnten alle mittels Microarray identifizierten und überprüften Herabregulationen bestätigt werden. Darüber hinaus erreichten viele Expressionsreduktionen mit qRT-PCR statistische Signifikanz, die im Microarray nur solche Tendenzen aufwiesen (miR-29a/b, -30a, let-7b/g). Die geschlechtsspezifische Expression von miR-103 aus dem Microarray konnte nicht bestätigt werden. Ebenso wenig konnten Geschlechterunterschiede bei der Expression von miR-497 und-130a ausgemacht werden, die im Microarray eine solche Tendenz aufwiesen. Unterschiede zwischen Microarray und qRT-PCR sind auf Messungenauigkeiten, unterschiedliche Aufreinigung der miRNAs und verschiedene Normalisierung der Werte in beiden Methoden zurückzuführen (siehe Diskussion 5.2).

Geschlechterunterschiede wurden mittels qRT-PCR bei der Expression von miR-29b nachgewiesen (siehe Tabelle 11); diese miRNA war bei Weibchen stärker exprimiert als bei Männchen. Auch im Microarray wies miR-29b eine geschlechtsspezifische Tendenz auf (Abbildung 18B); ebenfalls mit tendenziell stärkerer Expression bei den Weibchen. MiR-29b reguliert Kollagene und Fibrose (Abschnitt 1.2.6) und ist damit in Prozesse involviert, bei denen bereits Geschlechterunterschiede nachgewiesen wurden.

Tabelle 11: Regulierte miRNAs nach Aortenstenose (TAC)

Hochreguliert nach TAC	Herabreguliert nach TAC	Geschlechtsspezifisch reguliert
miR-21 **	miR-145 ***	miR-29b **
	miR-26a ***	
	miR-29a ***	
	miR-30a ***	
	let-7g ***	
	let-7b **	
	let-7i **	
	miR-29b **	
	miR-133a *	
	miR-106b *	
	let-7c *	

Relative Expression der miRNA-Expression analysiert mittels qRT-PCR, (n = 8-14). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, 2-faktorielle Varianzanalyse.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse des Microarrays mit den qRT-PCR-Messungen ist in der Tabelle 12 aufgeführt. In dieser Tabelle sind ebenfalls die relativen Regulationsstärken anhand der TAC/Sham-Verhältnisse jeweils in Männchen und Weibchen angegeben.

Anhand des Microarrays wurden miR-199a-5p und -497 als die am stärksten heraufregulierten miRNAs ausgemacht. Am stärksten herabreguliert waren miR-133a/b bei den

Weibchen und miR-29b bei den Männchen. Mittels qRT-PCR wurde miR-21 die stärkste Hochregulation nachgewiesen und miR-29a/b, -26a und -145 waren hier die relativ am stärksten herabregulierten miRNAs. Mitglieder der let-7-Familie waren sowohl im Microarray als auch mittels qRT-PCR bei den Weibchen stärker herabreguliert als bei den Männchen (Tabelle 12). Obwohl hier weder beim Geschlecht noch bei der Interaktion eine statistische Signifikanz erreicht wurde, könnte es biologische Relevanz haben und sollte bei weiteren Untersuchungen von Geschlechterunterschieden im Augenmerk behalten werden (siehe Diskussion 5.2).

Tabelle 12: Regulation von miRNAs im LV nach TAC-Operation gemessen mittels Microarray und qRT-PCR

Rang	miRNA	MicroArray (n=4)					qRT-PCR (n=8-14)				
		Regulation		Statistische Signifikanz nach ANOVA			Regulation		Statistische Signifikanz nach ANOVA		
		WT/WS	MT/MS	Geschlecht	Operation	Interaktion	WT/WS	MT/MS	Geschlecht	Operation	Interaktion
11	let-7a	0,81	0,97	ns	ns	ns					
	let-7b	0,61	1,04	ns	ns	ns	0,69	0,87	ns	**	ns
20	let-7c	0,77	1,14	ns	ns	ns	0,70	0,89	ns	ns	ns
23	let-7d	0,66	0,97	ns	ns	ns	0,74	0,98	ns	ns	ns
25	let-7f	0,69	0,69	ns	ns	ns					
	let-7g	0,62	1,09	ns	ns	ns	0,63	0,72	ns	**	ns
	let-7i	1,52	1,14	ns	**	ns	0,74	0,91	ns	*	ns
22	miR-1	0,70	0,67	ns	ns	ns					
	miR-100	1,30	0,90	ns	ns	ns					
	miR-103	2,99	0,63	ns	ns	*	0,84	1,00	ns	ns	ns
	miR-106a ²						0,97	1,02	ns	ns	ns
	miR-106b ²						0,86	0,88	ns	*	ns
	miR-107	1,78	1,28	ns	*	ns					
3	miR-126-3p	1,08	0,85	ns	ns	ns					
	miR-130a	2,10	0,97	ns	ns	(*)	0,80	0,91	ns	ns	ns
2	miR-133a	0,55	0,86	ns	*	ns	0,78	0,82	ns	*	ns
	miR-133a ⁺	1,15	0,79	ns	ns	ns					
1	miR-133b	0,58	0,87	ns	*	ns					
6	miR-143	0,87	0,73	ns	ns	ns	0,81	0,95	ns	ns	ns
19	miR-145	0,83	0,70	ns	*	ns	0,72	0,70	ns	***	ns
17	miR-16	1,28	1,04	ns	ns	ns	0,85	1,06	ns	ns	ns
	miR-195	1,54	1,42	ns	(*)	ns					
	miR-199a-5p	2,92	3,70	ns	***	ns					
	miR-19b	1,63	1,12	ns	*	ns					
	miR-21 ²						2,17	1,97	ns	**	ns
5	miR-22	0,79	1,18	ns	ns	ns					
	miR-221 ²						1,09	1,14	ns	ns	ns
	miR-222 ²						0,92	0,98	ns	ns	ns
9	miR-23a	1,19	1,15	ns	ns	ns					
13	miR-23b	1,49	1,34	ns	**	ns					
4	miR-24	1,88	1,32	ns	**	ns	0,82	1,04	ns	ns	ns
7	miR-26a	0,69	0,76	ns	*	ns	0,71	0,72	ns	***	ns
10	miR-27a	1,45	1,30	ns	*	ns	0,95	1,17	ns	ns	ns
21	miR-27b	1,45	1,46	ns	*	ns	1,11	1,37	ns	ns	ns
	miR-290-5p ²						0,73	0,90	ns	ns	ns
12	miR-29a	0,73	0,76	ns	ns	ns	0,69	0,58	ns	***	ns
	miR-29b ³	1,50	0,60	ns	ns	ns	0,74	0,71	**	*	ns
	miR-301a ²						0,84	0,95	ns	ns	ns
16	miR-30a	0,90	0,81	ns	ns	ns	0,78	0,73	ns	***	ns
18	miR-30b	0,79	0,81	ns	*	ns					
14	miR-30c	0,67	0,75	ns	**	ns					
15	miR-30d	0,73	0,71	ns	**	ns					
24	miR-30E	0,72	0,76	ns	ns	ns					
8	miR-378	1,80	0,70	ns	ns	ns	0,86	0,78	ns	ns	ns
	miR-497 ³	3,84	1,42	ns	***	(*)	1,17	0,99	ns	ns	ns
	miR-99a	0,86	1,04	ns	ns	ns					

(*) p<0,075 (grenzwertige Signifik.)

* p < 0,05
** p < 0,01
*** p < 0,001

² Rohwerte zu schwach im Array

³ Weiblich Sham n=2

ns = nicht signifikant

Hochreguliert Ratio < 1,25

Herabreguliert Ratio > 0,75

4.5 Regulation von miRNAs in Kardiomyozyten nach E2-Behandlung *in vivo*

Es wird angenommen, dass Geschlechterunterschiede bei LVH zum Teil auf Regulationen durch weibliche Hormone zurückzuführen sind. Eine dieser Arbeit zugrunde gelegte Hypothese war, dass eine geschlechtsspezifische Expression von miRNAs im LV, verursacht durch Sexualhormone wie E2, für Geschlechterunterschiede bei LVH verantwortlich ist. Es ist möglich, dass Geschlechterunterschiede in der miRNA-Expression bei Untersuchungen des gesamten LVs nicht detektiert wurden, obwohl sie existieren, weil zellspezifische Regulationen die Messungen beeinflussen. Daher sollte der direkte Effekt von E2 auf die Expression von miRNAs in Kardiomyozyten untersucht werden. Die Expression spezifischer miRNAs in Kardiomyozyten von weiblichen und männlichen Mäusen, denen intraperitoneal E2 oder die entsprechende Dextrinkontrolle injiziert wurde, wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die gemessenen miRNAs wurden ausgewählt, weil sie im frühen oder chronischen (unpublizierte Daten der Gruppe) Hypertrophiemodell geschlechtsspezifisch exprimiert waren oder weil sie potentielle Bindestellen in mRNAs von Steroidrezeptoren oder Mylip, einem in diesen Zellen identifizierten, geschlechtsspezifisch regulierten Gen, haben.

Ein umfangreicher, geschlechtsspezifischer Effekt von E2 auf die Expression von miRNAs in Kardiomyozyten nach fünf Stunden Steroidbehandlung konnte nachgewiesen werden. Von 21 untersuchten miRNAs war die Expression bei 11 miRNAs in den Kardiomyozyten der weiblichen Tiere durch E2 inhibiert (Tabelle 13). Keine der untersuchten miRNAs war nach der Behandlung induziert. Die am stärksten herabregulierten miRNAs waren miR-21, -126-3p, -106a/b, -29a/b, -26a, -20a und let-7c. Bei einer weiteren miRNA, miR-27a, war nach E2-Behandlung ein Geschlechterunterschied auszumachen, da die E2-Behandlung bei den weiblichen Zellen zu einer tendenziellen Herabregulation und bei den männlichen Zellen zu einer tendenziellen Heraufregulation führte. MiR-106a wies unter Kontrollbedingungen eine geschlechtsspezifische Expression mit höheren Werten in den weiblichen Kardiomyozyten auf.

Bei den Männchen war keine signifikant veränderte Expression nach E2-Behandlung nachzuweisen.

Tabelle 13: miRNA-Expression in isolierten Kardiomyozyten nach E2- oder Dextrinbehandlung *in vivo*.

	Weiblich E2/Dex	Männlich E2/Dex	Kontrolle W/M	E2 W/M
miR-21	0,65 *	1,13	1,10	0,64 *
miR-126-3p	0,66 *	1,03	1,01	0,64
miR-106b	0,66 *	0,76	1,11	0,97
miR-29b	0,67 *	0,78	1,08	0,92
miR-29a	0,67 ***	0,87	1,00	0,77
miR-26a	0,70 **	1,16	1,12	0,68 **
miR-106a	0,71 *	1,16	1,31 *	0,81
let-7c	0,72 **	0,81	0,93	0,83
miR-222	0,72	0,79	1,11	1,01
miR-20a	0,73 **	0,93	1,14	0,91
miR-30a	0,74 *	1,06	1,09	0,76 *
miR-24	0,81	0,96	1,11	0,94
miR-27b	0,81 *	0,95	0,96	0,82 *
miR-221	0,83	1,05	1,14	0,90
miR-23a	0,83	0,94	0,97	0,86
miR-145	0,89	0,97	1,03	0,95
miR-27a	0,90	1,19	0,98	0,74 **
miR-206	0,90	1,01	1,17	1,05
miR-19b	0,92	1,23	1,21	0,90
miR-133a	0,99	0,96	0,96	1,00
miR-378	1,09	0,92	0,94	1,11

Relative Expression von miRNAs in isolierten Kardiomyozyten von weiblichen (W) und männlichen (M) Mäusen nach E2- oder Dextrinbehandlung *in vivo* (n=4-7). Dargestellt sind die E2/Dextrin-Expressionsverhältnisse von Männchen und Weibchen, sowie das Expressionsverhältnis zwischen den Geschlechtern (W/M) nach Kontroll- und E2-Behandlung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Unpaired *t*-test.

Die miRNAs mit dem größten Geschlechterunterschied nach E2-Behandlung umfassen miR-21, -26a, -27b, -30a und -126-3p (Abbildung 4A). Andere miRNAs waren bei den Weibchen nach E2-Behandlung herabreguliert und wiesen bei den Männchen ebenfalls eine solche Tendenz auf, erreichten hier jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 4B). Diese waren miR-106b, -29a/b und let-7c.

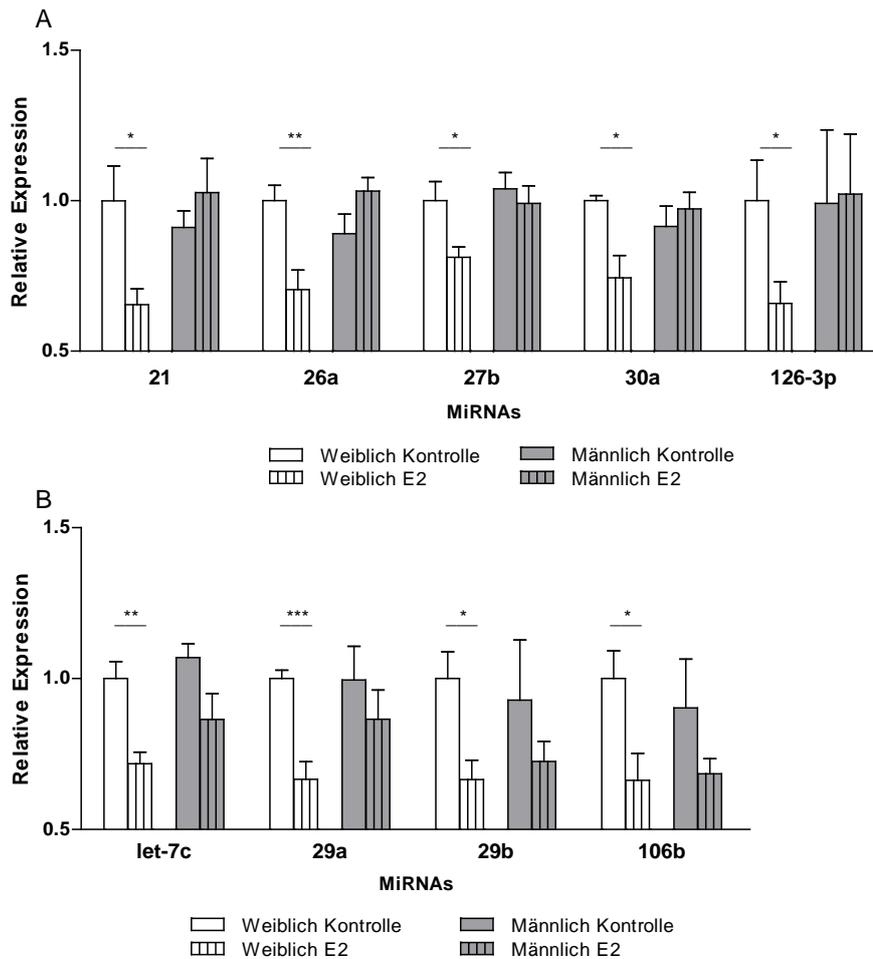


Abbildung 4: **MiRNA-Expression in Kardiomyozyten nach E2-Behandlung.** Dargestellt ist die relative Expression von miRNAs nach E2-Behandlung oder der entsprechenden Dextrin-Kontrollbehandlung in weiblichen und männlichen Kardiomyozyten. A) miRNAs mit geschlechtsspezifischer Inhibition nach E2-Behandlung nur in den weiblichen Kardiomyozyten. B) miRNAs mit signifikanter Inhibition nach E2-Behandlung bei den Weibchen und tendenzieller Herabregulation bei den Männchen. ($n = 4-7$) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Unpaired t-test.

Es wurde ein geschlechtsspezifischer Effekt von E2 mit einer Inhibition von 11 miRNAs in den Kardiomyozyten der Weibchen nachgewiesen. Darüber hinaus wiesen miR-106a unter Kontrollbedingungen und miR-27a nach E2-Behandlung einen Geschlechterunterschied auf.

4.6 Regulation von miRNAs im LV nach E2- und P4-Behandlung *in vivo*

Auffällig war, dass viele der E2-regulierten miRNAs in anderen Zellen auch bereits als P4-regulierte miRNAs bekannt waren (miR-21, -26, -27, -29b, -30, let-7) (siehe Tabelle 1). Die Hypothese, dass geschlechtsspezifische Expressionen von miRNAs im LV für Geschlechterunterschiede bei LVH verantwortlich sind, umfasste Regulationen durch P4 ebenso wie E2. Um somit auch die Effekte von P4 auf miRNAs im Herzen zu über-

prüfen und um zu testen, ob E2 die beobachteten Regulationen nur in den Kardiomyozyten verursacht oder im gesamten LV gleichermaßen wirkt, wurde eine 5-stündige Behandlung *in vivo* mit E2, P4 oder der Dextrin-Kontrolle durchgeführt. Die miRNAs wurden daraufhin aus dem gesamten LV isoliert. Die Expression von ausgewählten, in den Kardiomyozyten durch E2 regulierten miRNAs wurde anhand von qRT-PCR analysiert.

Die P4-Behandlung hatte im Vergleich mit E2 im LV eine stärkere Wirkung auf die miRNA-Regulation (Tabelle 14). Der regulierende Effekt durch P4 war (wie schon bei E2 in den Kardiomyozyten) limitiert auf das weibliche Geschlecht. 10 der 13 gemessenen miRNAs wurden durch P4 geschlechtsspezifisch inhibiert. In vielen Fällen war die Expression durch P4 bei den Weibchen im Vergleich zu den Männchen bis zu 40 % reduziert (miR-21, -30, -24, -27a, -106b). Im Gegensatz zu den Kardiomyozyten hatte E2 im gesamten LV bei den gemessenen miRNAs keinen signifikanten Effekt. Die Expression von miR-27a/b, -29a/b, -26a wurde zwar wie in den Kardiomyozyten im LV der Weibchen durch E2 tendenziell gehemmt, erlangte hier jedoch keine statistische Signifikanz. Einzige Ausnahme bildete miR-21. Die Expression von miR-21 war im LV bereits initial bei den weiblichen Kontrolltieren geringer als bei den männlichen (Dex W/M = 0,79, siehe Tabelle 14). Nach E2-Behandlung war miR-21 zudem geschlechtsspezifisch reguliert, mit einer doppelt so starken Expression bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen (E2 W/M = 0,51). Sowohl in den Kardiomyozyten als auch im gesamten LV war miR-21 die am stärksten durch E2 herabregulierte miRNA.

Bei den Männchen hatte weder P4 noch E2 einen signifikanten Effekt auf die miRNA-Expression.

Tabelle 14: miRNA-Expression im gesamten LV nach E2-, P4- oder Dextrinbehandlung in vivo.

	W E2/Dex	W P4/Dex	M E2/Dex	M P4/Dex	E2 W/M	P4 W/M	Dex W/M
mir-21	0,77	0,69	1,19	0,89	0,51 *	0,61 **	0,79
mir-27a	0,83	0,55 *	0,82	1,01	1,13	0,61 *	1,10
mir-29b	0,85	0,60 *	1,02	0,90	0,97	0,77	1,16
mir-24	0,86	0,58 **	0,86	0,98	1,04	0,62 **	1,03
mir-30a	0,87	0,52 **	1,07	1,17	1,06	0,58 **	1,31
mir-29a	0,87	0,56 **	0,91	0,96	1,05	0,64 **	1,09
mir-26a	0,88	0,68 *	0,99	1,06	0,98	0,71 **	1,11
mir-27b	0,89	0,63 *	0,90	1,02	1,08	0,67 *	1,08
mir-126-3p	1,00	0,75	1,04	0,88	0,84	0,74 *	0,87
mir-106b	1,08	0,64 *	0,87	1,05	1,34	0,67 *	1,08
mir-106a	1,19	0,74	0,96	0,93	1,20	0,77	0,96
let-7c	1,24	0,73	1,06	0,98	1,28	0,81	1,09
mir-222	1,28	0,79	0,84	0,91	1,51	0,86	0,99

Relative Expression von miRNAs im LV von weiblichen (W) und männlichen (M) Mäusen nach E2-, P4- und Dextrinbehandlung in vivo (n = 5). Dargestellt sind die E2/Dextrin- bzw. P4/Dextrin-Expressionsverhältnisse von Männchen und Weibchen, sowie das Expressionsverhältnis zwischen den Geschlechtern (W/M) nach Kontroll-, E2- oder P4-Behandlung. * p < 0,05, ** p < 0,01, Unpaired t-test.

4.6.1 Zellspezifische Regulation von miRNAs durch E2

Die Regulation der miRNAs durch E2 in den Kardiomyozyten und im LV lassen sich direkt miteinander vergleichen, da die Experimente in der gleichen Weise durchgeführt wurden. In beiden Fällen wurde C57BL/6-Mäusen intraperitoneal 0,2 mg/kg E2 bzw. Dextrin als Kontrolle injiziert und nach fünf Stunden wurde das Herz entnommen. Für die Kardiomyozytenmessungen wurden die Kardiomyozyten daraufhin aus dem LV isoliert und danach wurde die Gesamt-RNA aus diesen Zellen aufgereinigt. Bei Messungen des gesamten LVs wurde die Gesamt-RNA direkt aus dem LV isoliert. Da E2 sowohl im LV als auch in den Kardiomyozyten nur bei den Weibchen eine Modifizierung der miRNA-Expression verursachte, werden in diesem Abschnitt nur die Expressionen in diesem Geschlecht miteinander verglichen.

Auffällig war, dass E2 in den Kardiomyozyten die Expression vieler miRNAs inhibierte, im LV hingegen kaum einen signifikanten Effekt erzielte. Dennoch wurde auch im LV bei vielen miRNAs eine tendenzielle Inhibition bei den Weibchen beobachtet (miR-21, -26a, -27b, -29a/b, -30a; Abbildung 5A). Bei anderen miRNAs hingegen wurde in den Kardiomyozyten eine Herabregulation, im LV tendenziell eher die entgegengesetzte Regulation durch E2 beobachtet (let-7c, miR-106a/b, -126-3p; Abbildung 5B). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass E2 neben den geschlechtsspezifischen Effekten ebenso einen zellspezifischen Einfluss auf die Regulation der miRNAs mit einer stärkeren Wirkung in Kardiomyozyten als im gesamten LV hat.

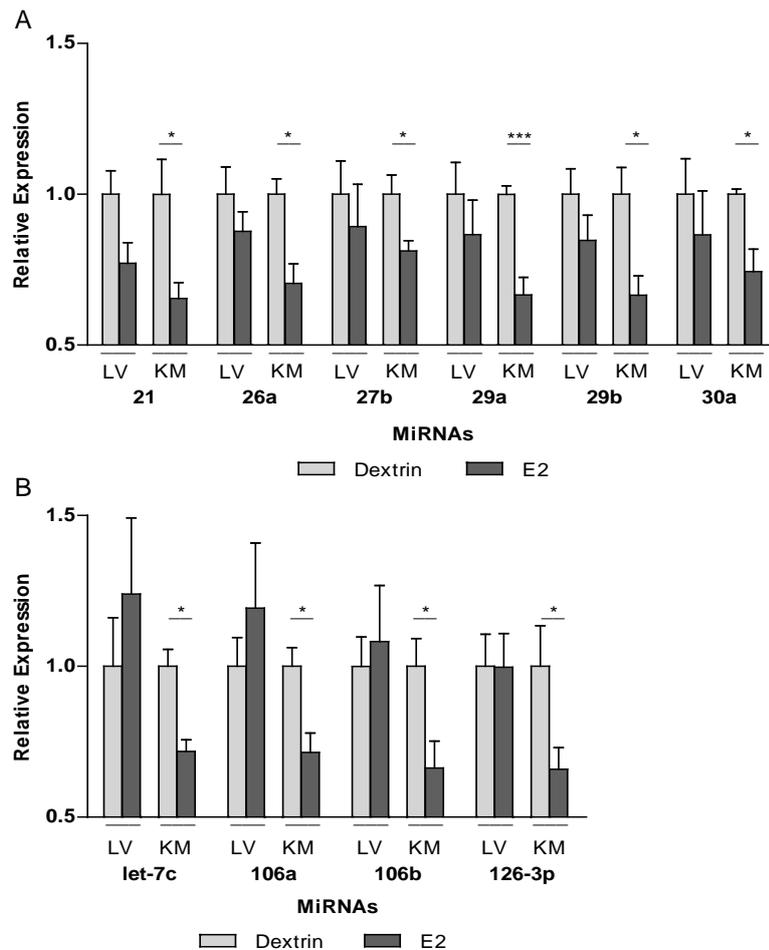


Abbildung 5: Zellspezifische Regulation von miRNAs durch E2 im Herzen von weiblichen Mäusen. Relative Expression von miRNAs nach E2-Behandlung im Vergleich zur Dextrinkontrolle im linken Ventrikel (LV) und in Kardiomyozyten (KM) in weiblichen Mäusen. A) miRNAs mit herabregulierter Expression in KMs und tendenzieller Herabregulation im LV. B) miRNAs mit zellspezifischer Expression nach E2-Behandlung.. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Unpaired t-test.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das Augenmerk auf folgende drei miRNAs gelegt: miR-21, miR-26a und miR-29b. Ihre Regulationen bei LVH und durch E2 und P4 wurden separat betrachtet und mit weiteren Experimenten näher untersucht.

4.7 MiRNA-21

4.7.1 Stärkere Expression von miR-21 im linken Ventrikel von Männchen

MiRNA-21 ist eine der im LV am stärksten hochregulierten miRNAs nach Aortenstenose⁹³. Die induzierte Expression nach TAC erfolgt bei Männchen und Weibchen gleichermaßen. Unter basalen Bedingungen konnte eine stärkere Expression von miR-21 im LV der Männchen beobachtet werden (W/M Sham = 0,67, Abbildung 6). Dieses Expressionsmuster wurde ebenso im 9-Wochen-TAC-Modell unserer Arbeitsgruppe

nachgewiesen. Hier erreichte der Unterschied zwischen den Geschlechtern im basalen Zustand statistische Signifikanz (unpublizierte Daten). Überdies wurde bereits in Brustkrebszellen und im Endometrium nachgewiesen, dass die Expression von miR-21 durch E2 und P4 reguliert werden kann. Daher wurde beschlossen, die Regulation von miR-21 in weiteren Experimenten näher zu untersuchen.

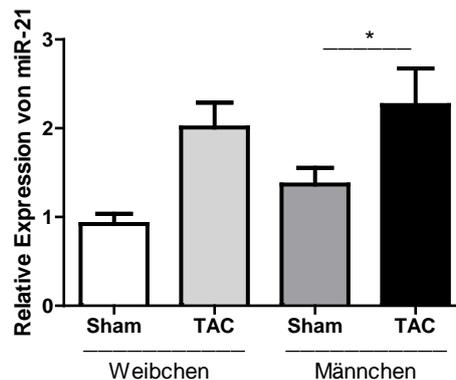


Abbildung 6: **Expression von miRNA-21 im LV nach induzierter Aortenstenose.** Isolierte miRNAs aus dem LV von Mäusen zwei Wochen nach Sham- oder TAC-Operation gemessen mittels qRT-PCR ($n = 11-14$). * $p < 0,05$ 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

4.7.2 Ovariectomie induziert die Expression von miR-21 im LV

Die Eierstöcke sind der wichtigste Produktionsort der weiblichen Sexualhormone E2 und P4, deren Level im Blut nach Ovariectomie drastisch sinkt. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die verminderte Expression von miR-21 in weiblichen Herzen auf eine Inhibition durch weibliche Hormone zurückzuführen ist, wurde zunächst der Effekt des Entzugs der Hormone durch Ovariectomie untersucht. RNA-Proben aus dem LV von weiblichen, ovariectomierten Mäusen waren in der Arbeitsgruppe vorhanden und miR-21 konnte mittels qRT-PCR gemessen werden.

Der Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass die Expression von miR-21 im LV nach Ovariectomie signifikant anstieg. Die Zunahme entspricht einem 1,5-fachen Anstieg des ursprünglichen Expressionslevels. Dieser Unterschied ist in genau diesem Ausmaß bei den Sham-Tieren zwischen Männchen und Weibchen zu beobachten (siehe Abbildung 6).

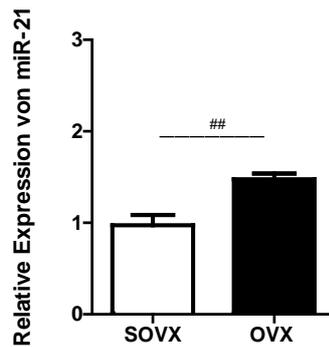


Abbildung 7: **Die Expression von miR-21 im LV steigt nach Ovarektomie.** Isolierte miRNAs aus dem LV von Mäusen neun Wochen nach Ovarektomie (Ovx) bzw. Sham-Ovarektomie (SOVX). ($n = 5$), ## $p < 0,01$, Unpaired T-Test

4.7.3 E2- und P4-Behandlung *in vivo* inhibiert miR-21 im LV von Weibchen

Es konnte eine Induktion von miR-21 im LV von weiblichen Mäusen nach Ovarektomie gemessen werden. Es sollte nun näher untersucht werden, welches der weiblichen Hormone die Expression von miR-21 im Herzen inhibiert und ob dieser Effekt bei beiden Geschlechtern auftritt. Um dies zu testen, wurde weiblichen und männlichen Tieren intraperitoneal jeweils 0,2 mg/kg E2, P4 oder Dextrin (Kontrolle) injiziert und ihr Effekt auf die miRNA-Expression nach fünf Stunden wurde mittels qRT-PCR untersucht.

Sowohl die E2 als auch die P4-Behandlung führte zu einer geschlechtsspezifischen Regulation der Expression von miR-21 (Abbildung 8). Bereits initial waren miR-21-Level bei den Weibchen geringer als bei den Männchen (Kontrolle W/M = 0,79, Tabelle 14). Fünf Stunden nach der E2-Injektion war miR-21 bei den Weibchen halb so stark exprimiert wie bei den Männchen (W/M = 0,51 Tabelle 14, Abbildung 8A). Ebenso wurde miR-21 durch P4 reguliert. Die P4-Behandlung führte zu einem Geschlechterunterschied durch eine Inhibition von miR-21 bei den Weibchen (W/M = 0,61 Tabelle 14, Abbildung 8B). Bei den Männchen hatte weder E2 noch P4 einen signifikanten Effekt auf die miR-21-Expression.

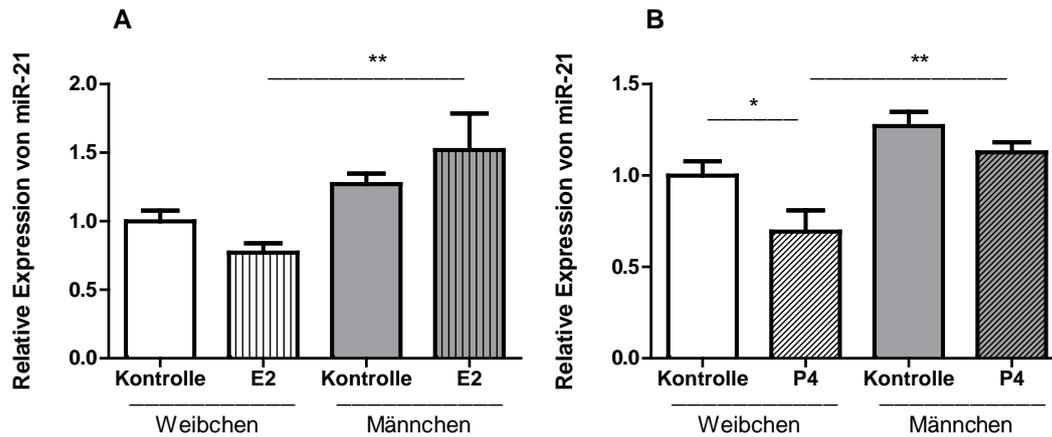


Abbildung 8: **Geschlechtsspezifische Expression von miR-21 im LV nach E2- und P4-Behandlung in vivo.** Isolierte miRNAs aus dem LV von Mäusen A) 5 Stunden nach intraperitonealer E2-Injektion ($n = 5$) und B) 5 Stunden nach intraperitonealer P4-Injektion. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

E2 und P4 führen zu einer geschlechtsspezifischen Expression von miR-21 im LV mit inhibierender Wirkung ausschließlich bei den Weibchen.

4.7.4 E2-Behandlung *in vivo* inhibiert miR-21 in weiblichen Kardiomyozyten

Der linke Ventrikel besteht überwiegend aus Myozyten und Fibroblasten. MiR-21 wird in beiden Zellen exprimiert. Die Konzentration von miR-21 in Kardiomyozyten ist jedoch wesentlich geringer als in Fibroblasten. Um zu untersuchen, ob die beobachtete geschlechtsspezifische Expression von miR-21 nach E2-Behandlung im LV auf eine zellspezifische Regulation in den Fibroblasten zurückzuführen ist oder ebenfalls in Kardiomyozyten stattfindet, wurde miR-21 in isolierten Kardiomyozyten nach E2-Stimulation gemessen.

Auch in den Kardiomyozyten führte die E2-Behandlung zu einer geschlechtsspezifischen Expression von miR-21 aufgrund einer inhibierenden Wirkung von E2 nur bei den Weibchen. MiR-21 wurde bei den Weibchen durch E2 um 40 % reduziert (Abbildung 9). Bei den Männchen hatte die E2-Behandlung keinen Effekt. Im basalen Zustand konnte in diesen Zellen keine geringere Expression bei den Weibchen beobachtet werden.

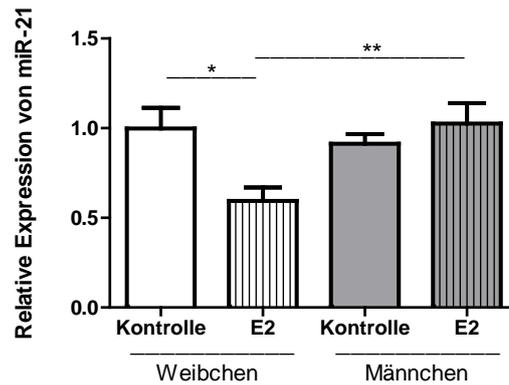


Abbildung 9: **Geschlechtsspezifische Inhibition von miR-21 in isolierten Kardiomyozyten nach E2-Behandlung in vivo.** Isolierte miRNAs aus murinen Kardiomyozyten fünf Stunden nach intraperitonealer E2- oder Dextrininjektion ($n = 4-7$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

4.7.5 E2 und P4 inhibieren die miR-21-Induktion bei Hypertrophie

Um zu überprüfen, ob P4 und E2 ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Induktion von miR-21 bei Hypertrophie haben und somit Einfluss auf die geschlechtsspezifische Entwicklung der LVH nehmen können, wurde in einer Kardiomyozytenzelllinie Hypertrophie induziert und eine Hormonbehandlung durchgeführt.

HL-1-Zellen sind immortalisierte Zellen aus einem atrialen Kardiomyozytentumor einer adulten, weiblichen C57BL/6J-Maus¹⁷⁹. Die Zellen kontrahieren bei ausreichender Konfluenz in Kultur und exprimieren Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptoren (PR). Die Induktion von Hypertrophie in den HL-1-Zellen erfolgte durch Stimulation mit 50 nM des Peptidhormons Endothelin-1 (Et-1). Gleichzeitig wurden die Zellen mit 10 nM E2, 100 nM P4 bzw. mit E2 plus P4 behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit der gleichen Hormonbehandlung ohne Hypertrophieinduktion mitgeführt. 48 Stunden nach der Stimulation erfolgte die RNA-Isolierung.

Im Gegensatz zu den primären Kardiomyozyten führte E2 bei den HL-1-Zellen (immortalisierte Kardiomyozyten) zu einer Induktion von miR-21 (Abbildung 10A). Die Zunahme von miR-21 durch E2 in diesen Zellen könnte auf den Krebsursprung der Zellen oder auf die Proliferationsinduktion von E2 auf Kulturzellen zurückgeführt werden. Diese Regulation wurde allerdings durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit P4 inhibiert. Alleinige P4-Stimulation hatte keinen Effekt auf miR-21.

Hypertrophieinduktion durch Et-1 führte wie erwartet und wie im LVH-Tiermodell (Abbildung 10B) zu einer gesteigerten Expression von miR-21. Diese Zunahme konnte durch separate P4- oder E2-Beigabe nicht signifikant verringert werden. Durch ge-

meinsame Behandlung mit E2 und P4 wurde jedoch ein synergistischer Effekt erzielt; die durch Et-1 induzierte miR-21-Expression wurde komplett inhibiert (Abbildung 10B).

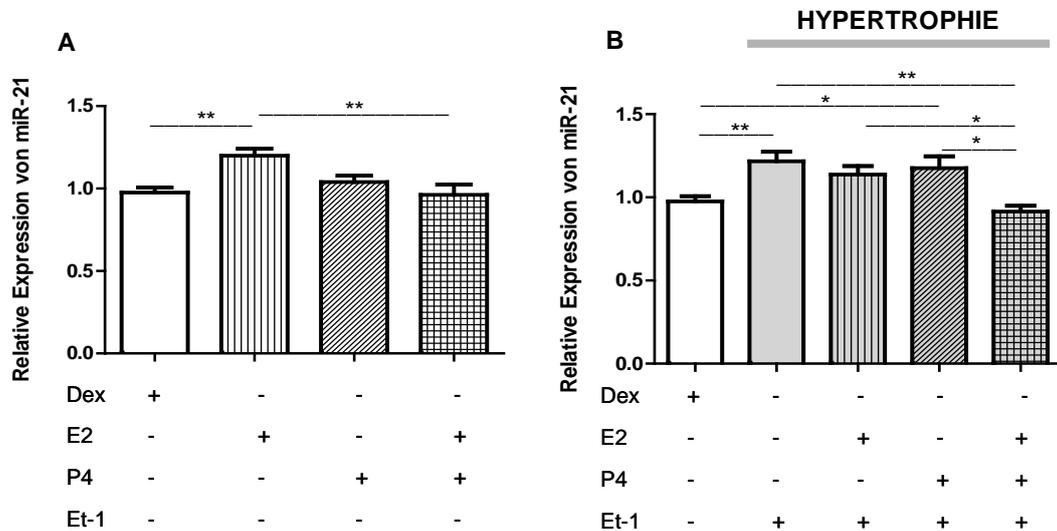


Abbildung 10: **Synergistische Inhibition der Et-1-induzierten Heraufregulation von miR-21 durch E2 und P4.** qRT-PCR-Quantifizierung der Expression von miR-21 in HL-1-Zellen 48 Std. nach Hormonbehandlung A) unter Kontrollbedingungen, und B) 48 Std. nach Hypertrophieinduktion durch Et-1-Stimulation ($n = 9$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, 1-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

Gleichzeitige Behandlung mit P4 und E2 konnte den Anstieg von miR-21 bei Kardio-myozytenhypertrophie vollständig verhindern; somit konnte ein synergistischer Effekt von P4 und E2 auf miR-21 nachgewiesen werden.

4.7.6 Zielgene von miR-21 werden geschlechtsspezifisch reguliert

Es wurde gezeigt, dass miR-21 bei Männchen im LV stärker exprimiert wird als bei Weibchen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von miR-21 durch P4 und E2 bei Weibchen vermindert wird. Es stellte sich die Frage, welche Rolle miR-21 in der geschlechtsspezifischen Ausprägung von LVH spielt. Identifizierte Funktionen von miR-21 im Herzen sind profibrotische und anti-apoptotische Wirkungen. Fünf validierte Zielgene von miR-21, die in geschlechtsspezifisch regulierten Prozessen involviert sind, wurden daher in den TAC-operierten Tieren auf mRNA-Ebene untersucht. Die Zielgene umfassten bei apoptotischen Prozessen mitwirkende Gene (Pdc4 und Pten) und Gene, die in Fibrose involviert sind (Spry1, Timp3 und Reck) (Abbildung 11).

Bei den Genen aus apoptotischen Signalwegen wurde keine Regulation nach TAC oder zwischen den Geschlechtern gemessen (Abbildung 11A). Zwei der drei unter-

suchten Fibrose regulierenden Gene wiesen jedoch eine geschlechtsspezifische Regulation auf (Abbildung 11B). So hatte bei *Spry1* und *Reck* nach zweifaktorieller Varianzanalyse sowohl die TAC-Operation als auch das Geschlecht signifikanten Einfluss auf die Expression (Abbildung 11C). Beide Gene sind in Remodeling-Prozessen wie Fibrose und Umwandlung der extrazellulären Matrix involviert, in deren Entwicklung bereits mehrfach Geschlechterunterschiede nachgewiesen werden konnten. In beiden Fällen war eine Induktion der mRNA-Expression bei LVH zu beobachten. Auch die Expression von miR-21 ist bei LVH induziert und sollte daher zu einer Inhibition ihrer Zielgene führen. MiRNAs regulieren allerdings die Translation ihrer Zielgene und führen nur in einigen Fällen zum Abbau der mRNA. Die beobachtete Induktion der mRNA könnte ein positiver Feedback auf eine inhibierte Proteinregulation sein. Für *Spry1* wurde bereits gezeigt, dass die Proteinexpression durch miR-21 inhibiert wird, ihre mRNA jedoch nicht degradiert wird⁹⁷. In einer Korrelationsanalyse wurde weiterhin gezeigt, dass die Expression von *Spry1* und *Reck* signifikant mit miR-21 korrelierten (Tabelle 15).

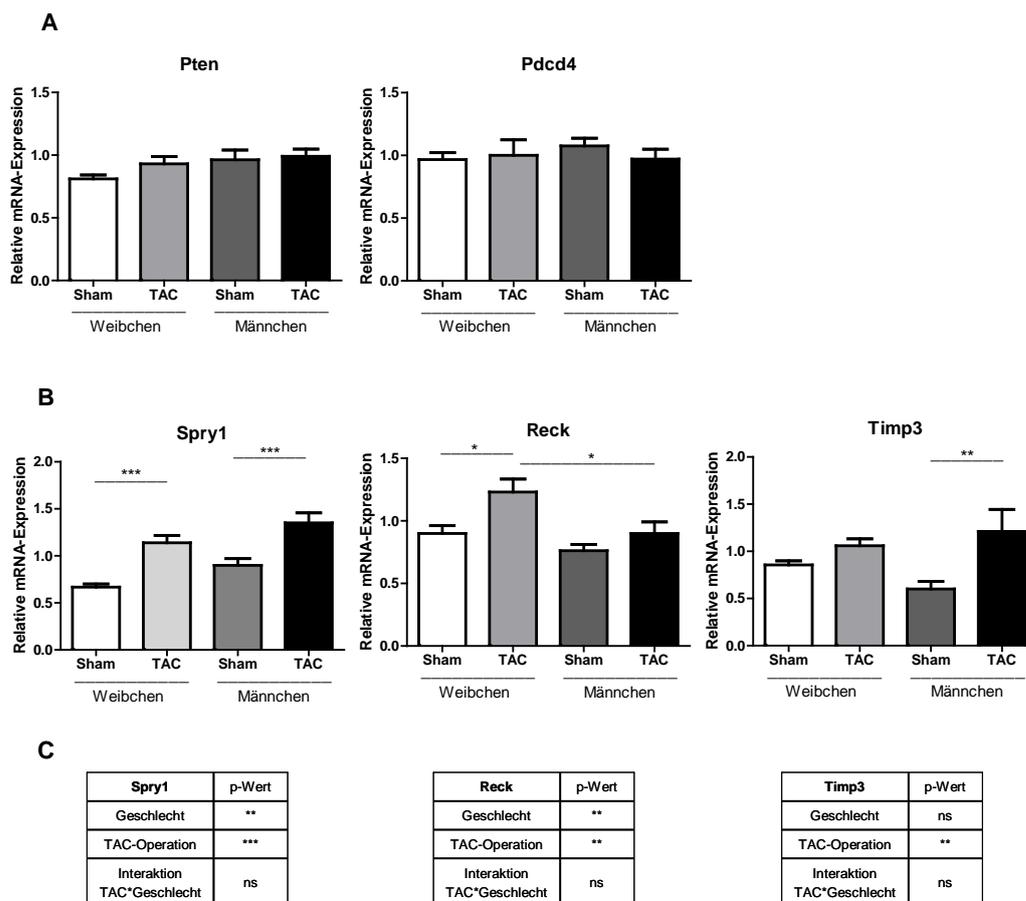


Abbildung 11: mRNA-Expression von Zielgenen von miR-21 im LV bei kardialer Hypertrophie. A) Zielgene in apoptotischen Prozessen und B) Zielgene innerhalb von Fibrose. C) Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse der Expression der fibrotischen Zielgene. ($n = 8-10$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

Tabelle 15: Korrelation der Expression von miR-21 zur mRNA-Expression der Zielgene

		Korrelationen					
		mir-21	Spry1	Timp3	Reck	Pten	Pdcd4
mir-21	Korrelation nach Pearson	1	,508**	-,090	,348*	,192	,251
	Signifikanz (2-seitig)		,002	,607	,040	,269	,146
	N	35	35	35	35	35	35
Spry1	Korrelation nach Pearson	,508**	1	,359*	,345*	,265	,072
	Signifikanz (2-seitig)	,002		,029	,037	,114	,670
	N	35	37	37	37	37	37
Timp3	Korrelation nach Pearson	-,090	,359*	1	,475**	,353*	,036
	Signifikanz (2-seitig)	,607	,029		,003	,032	,831
	N	35	37	37	37	37	37
Reck	Korrelation nach Pearson	,348*	,345*	,475**	1	,380*	,275
	Signifikanz (2-seitig)	,040	,037	,003		,020	,099
	N	35	37	37	37	37	37
Pten	Korrelation nach Pearson	,192	,265	,353*	,380*	1	,577**
	Signifikanz (2-seitig)	,269	,114	,032	,020		,000
	N	35	37	37	37	37	37
Pdcd4	Korrelation nach Pearson	,251	,072	,036	,275	,577**	1
	Signifikanz (2-seitig)	,146	,670	,831	,099	,000	
	N	35	37	37	37	37	37

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Zwei Zielgene von miR-21, Spry1 und Reck, waren in Sham/TAC-Tieren geschlechtsspezifisch reguliert. Beide Zielgene sind an der Entwicklung von Fibrose und extrazellulärem Remodeling des Herzens beteiligt.

4.8 MiRNA-26a

MiRNA-26a und -30a/b/c/d/e befinden sich unter den 25 am stärksten im linken Ventrikel angereicherten miRNAs (Tabelle 7). Anhand einer Zielgensuche mit Hilfe des Programms Targetscan wurde herausgefunden, dass der Progesteronrezeptor (PR) als mögliches Zielgen sowohl für miR-26a/b als auch für miR-30a/b/c/d/e vorhergesagt wurde. Sämtliche Mitglieder der Familien miR-26 und miR-30 wurden zwei Wochen nach Aortenstenose mittels Microarray-Analyse als herunterreguliert detektiert (Tabelle 8); die Herabregulation von miR-26a und -30a wurde mit qRT-PCR bestätigt (Abbildung 12). Eine Regulation von PR durch miR-26 oder -30 könnte somit eine Heraufregulation von PR nach Aortenstenose zur Folge haben, welche nachfolgend eine geschlechtsspezifische Ausprägung der LVH nach sich ziehen könnte.

Die Hypothese, dass PR durch miRNAs, speziell durch miR-26a und -30a, reguliert wird, sollte daher untersucht werden.

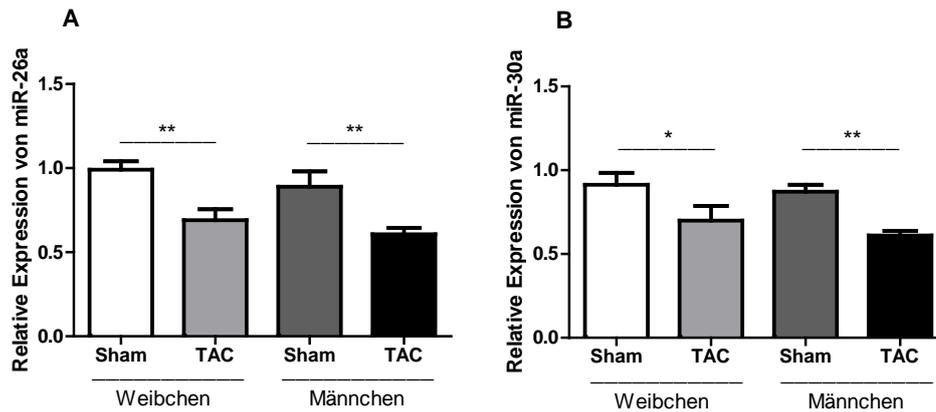


Abbildung 12: **Regulation von miR-26a und miR-30a im LV nach Aortenstenose.** Expression gemessen mittels qRT-PCR von A) miR-26a und B) miR-30a zwei Wochen nach TAC im LV von Mäusen ($n = 10-14$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

4.8.1 Der Progesteronrezeptor wird durch miRNAs reguliert

Um zu überprüfen, ob die Translation von PR durch miRNAs reguliert wird, wurden 1 kb von insgesamt 3,4 kb der murinen 3'UTR des PRs aus dem Herzen amplifiziert und in einen Dual-Luciferase-Vektor kloniert (Abbildung 13A). Wenn im Luciferase-Assay eine Herabregulation von *Renilla* festgestellt wird, besteht eine Inhibition der Translation von *Renilla* durch miRNA-Bindung an die klonierte 3'UTR-Sequenz. Dadurch kann die Regulation des untersuchten Gens durch miRNAs bestätigt werden (siehe auch 3.2.2.7 und 3.4.3).

Im Luciferase-Assay zeigte der Vektor mit der klonierten PR-UTR im Vergleich zur Negativkontrolle (Vektor ohne jegliche klonierte 3'UTR) eine ca. 50 %ige Reduktion der *Renilla*-Aktivität (Abbildung 13B). Dieses Ergebnis bestätigte, dass miRNAs an die klonierte 3'UTR binden und daraus kann geschlossen werden, dass die Translation von PR durch miRNAs reguliert wird.

In der klonierten PR-UTR befanden sich mehrere vorhergesagte miRNA-Bindestellen (Abbildung 13A). Darunter eine konservierte (dickgedruckt) und eine nicht-konservierte Bindestelle für miR-26, sowie eine nicht-konservierte Bindestelle für miR-30. Diese beiden miRNAs waren von besonderem Interesse, weil sie im Herzen stark exprimiert und bei LVH herabreguliert waren. Ob eine dieser beiden miRNAs an der beobachteten Regulierung von PR beteiligt ist, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. MiR-200 und -223, weitere miRNAs mit vorhergesagten Bindestellen in der klonierten PR-UTR, wurden im LV anhand des Microarrays nicht detektiert und daher nicht weiter untersucht.

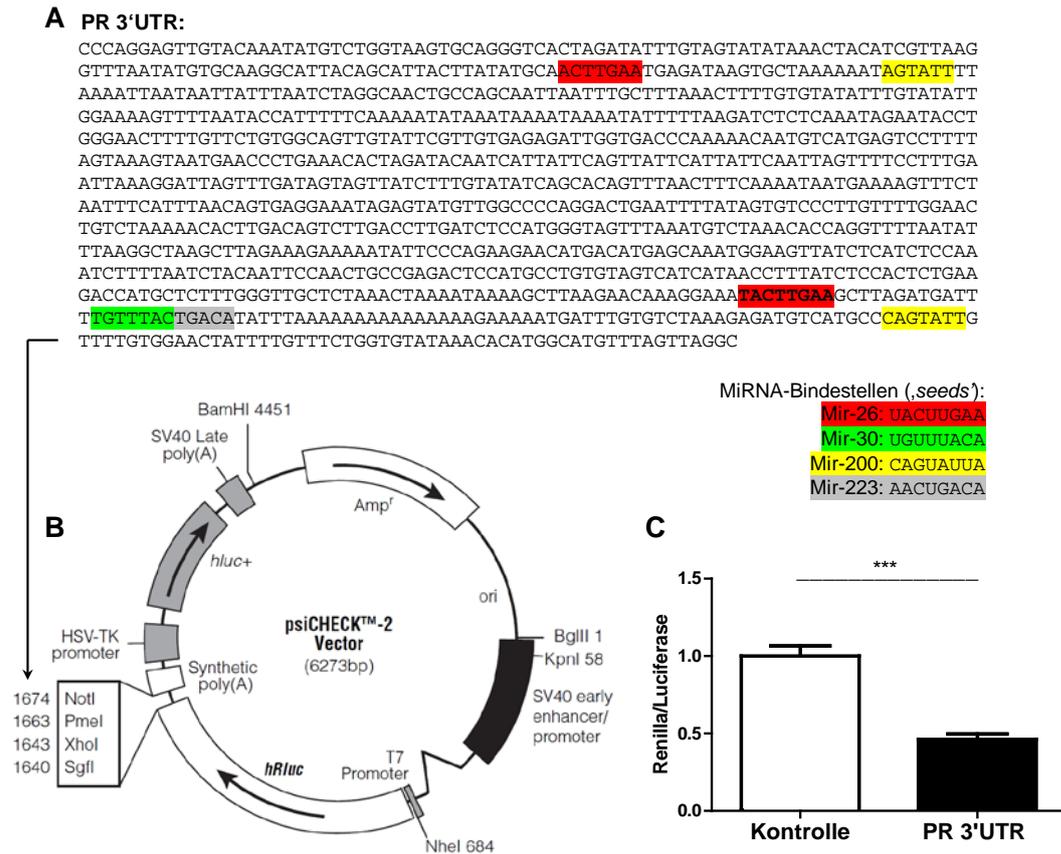


Abbildung 13: **Inhibition der Renillaexpression durch Klonierung der PR-3'UTR.** A) 1 kb der PR-3'UTR wurde aus einem murinen LV amplifiziert. B) Klonierung der amplifizierten PR-3'UTR in die multiple Klonierungsseite des psiCHECK™-2-Vektors. C) Renilla-Reporterassay weist eine Inhibition der Renillaexpression durch PR-3'UTR auf ($n = 9$), $*** p < 0,001$, Unpaired t-test.

4.8.2 MiRNA-26a inhibiert die Expression von PR

Es konnte gezeigt werden, dass die Translation des PRs durch miRNAs reguliert werden kann. Um zu untersuchen, ob miR-26a und/oder miR-30a die Expression von PR regulieren können, wurden sie in HL-1-Zellen inhibiert. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen Antagomirs gegen miR-26a bzw. miR-30a transfiziert und nach 48 Std. wurden die Proteine isoliert.

Mittels Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von miR-26a zu einer verstärkten Expression sowohl von PR-A als auch -B führt (Abbildung 14). Die Proteinlevel waren 48 Stunden nach Inhibitorbehandlung bis um das 1,5-fache gestiegen. Gleiche Behandlung der Zellen mit dem miR-30a-Inhibitor hatte keinen Einfluss auf PR (Abbildung 14C).

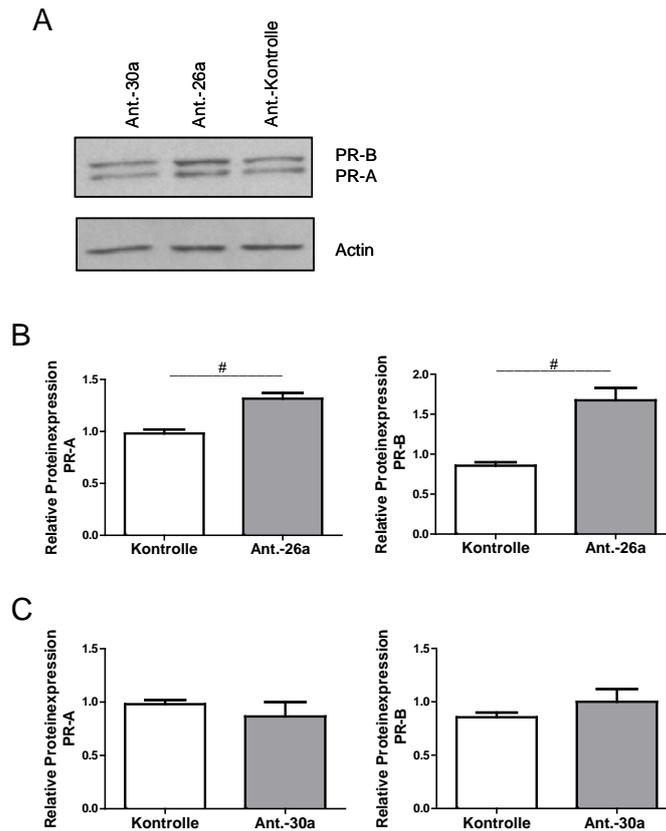


Abbildung 14: **Inhibition von miR-26a führt zur verstärkten Expression des Progesteronrezeptors (PR).** A) Western Blot von PR 48 Std. nach Transfektion von AntagomiR-30a, -26a und einer Negativkontrolle in HL-1-Zellen. Quantifizierung der Proteinexpression der PR-A und -B-Isoformen nach B) miR-26a- und C) miR-30a-Inhibition im Vergleich zur Negativkontrolle ($n = 2$). # $p < 0,05$, Unpaired t -test.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass miR-26a in der Lage ist, die Proteinexpression des PRs zu inhibieren.

4.8.3 PR-Expression wird während kardialer Hypertrophie induziert

Da miR-26a zwei Wochen nach TAC im LV herabreguliert ist und gezeigt werden konnte, dass miR-26a die Expression von PR inhibiert, wurde die Proteinexpression von PR in den Sham/TAC-Tieren mittels quantitativem Western Blot untersucht.

Sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen war eine Heraufregulation des PRs in den TAC-Tieren zu detektieren (Abbildung 15). Die Proteinlevel beider PR-Isoformen waren zwei Wochen nach Aortenstenose um das Doppelte gestiegen. Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass die Herabregulation von miR-26a im frühen Stadium der LVH zu einer verstärkten Expression von PR führt.

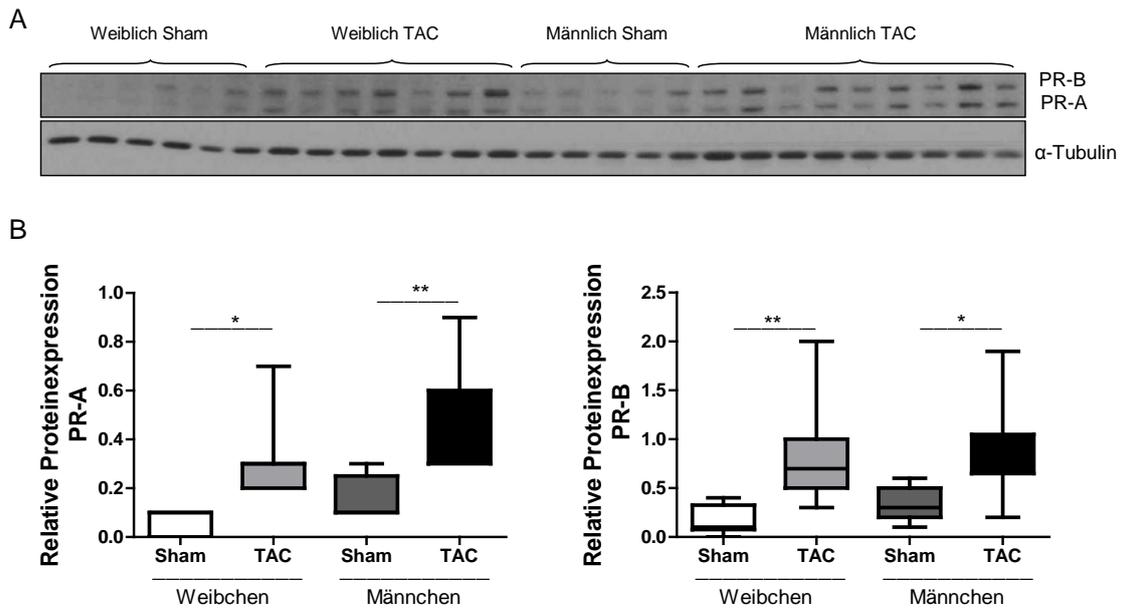


Abbildung 15: **Der Progesteronrezeptor wird im frühen Stadium von LVH verstärkt exprimiert.** A) Western Blot von PR im LV von Mäusen zwei Wochen nach Sham-/TAC-Operation. B) Quantifizierung der Proteinexpression der PR-A- sowie der PR-B-Isoform. (n = 5-9), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

4.8.4 MiR-26a-Inhibition und gleichzeitige P4-Stimulation schützt Myozyten vor CoCl_2 -induzierter Apoptose

Es wurde gezeigt, dass miR-26a während der Entwicklung von LVH herabreguliert wird, miR-26a die Expression von PR reguliert und dass PR-Proteinlevel während LVH verstärkt exprimiert werden. Daraufhin stellte sich die Frage, welche funktionellen Auswirkungen dies auf die Ausprägung von pathologischer Hypertrophie haben kann. MiR-26a wurden pro-apoptotische Funktionen nachgewiesen^{111 113} und für P4 wurde gezeigt, dass es vor Apoptose schützend auf Myozyten wirkt¹⁴⁹. Daher wurde die Hypothese erstellt, dass die reduzierte Expression von miR-26a während LVH zu einer verstärkten Expression von PR führt und mittels P4 die Myozyten vor Apoptose schützt.

Um diese Hypothese zu testen, wurde miR-26a in HL-1-Zellen inhibiert und die Zellen gleichzeitig mit P4 stimuliert. Antagomir-30a und eine Negativkontrolle des Herstellers dienten als Transfektionskontrolle, sowie Dextrin als Kontrolle für die P4-Stimulation. Nach 24 Std. wurde in den Zellen durch Zugabe von CoCl_2 Apoptose induziert und nach weiteren 12 Std. wurde die Zellviabilität mittels MTT-Assay überprüft. Es wurden ebenfalls Zellen mit der gleichen Behandlung ohne induzierte Apoptose mitgeführt. Beim MTT-Assay wird dem Medium lebender Zellen MTT beigefügt, woraufhin dieses von den Zellen in einem Reduktionsvorgang durch intakte Mitochondrien in Formazan-

kristalle umgewandelt wird. Diese werden gelöst, ihr Gehalt photometrisch bestimmt und dadurch können Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen gezogen werden. Je weniger Formazan gebildet wurde, desto niedriger war die Vitalität.

Die 12-stündige Behandlung der HL-1-Zellen mit 200 μM CoCl_2 führte zu einer ca. 20 % geringeren Produktion von Formazan und somit zu einem 20 %igem Verlust der Vitalität der Zellen (Abbildung 16A-C). Die Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren oder mit P4 hatte unter Kontrollbedingungen weder einen positiven noch negativen Effekt auf die Zellviabilität (Abbildung 16 D). Eine verbesserte Vitalität der Zellen nach Inhibition von miR-26a und gleichzeitiger P4-Stimulation konnte aber nach induzierter Apoptose beobachtet werden (Abbildung 16E). Die miR-26a-Inhibition und P4-Behandlung schützte die Zellen um ca. 15 % vor der induzierten Apoptose im Vergleich zu den Kontrollbehandlungen. Die Zellen mit miR-26a-Inhibition ohne P4-Stimulation wiesen ebenfalls eine leicht verbesserte Viabilität nach CoCl_2 -induzierter Apoptose auf; diese erlangte jedoch keine statistische Signifikanz.

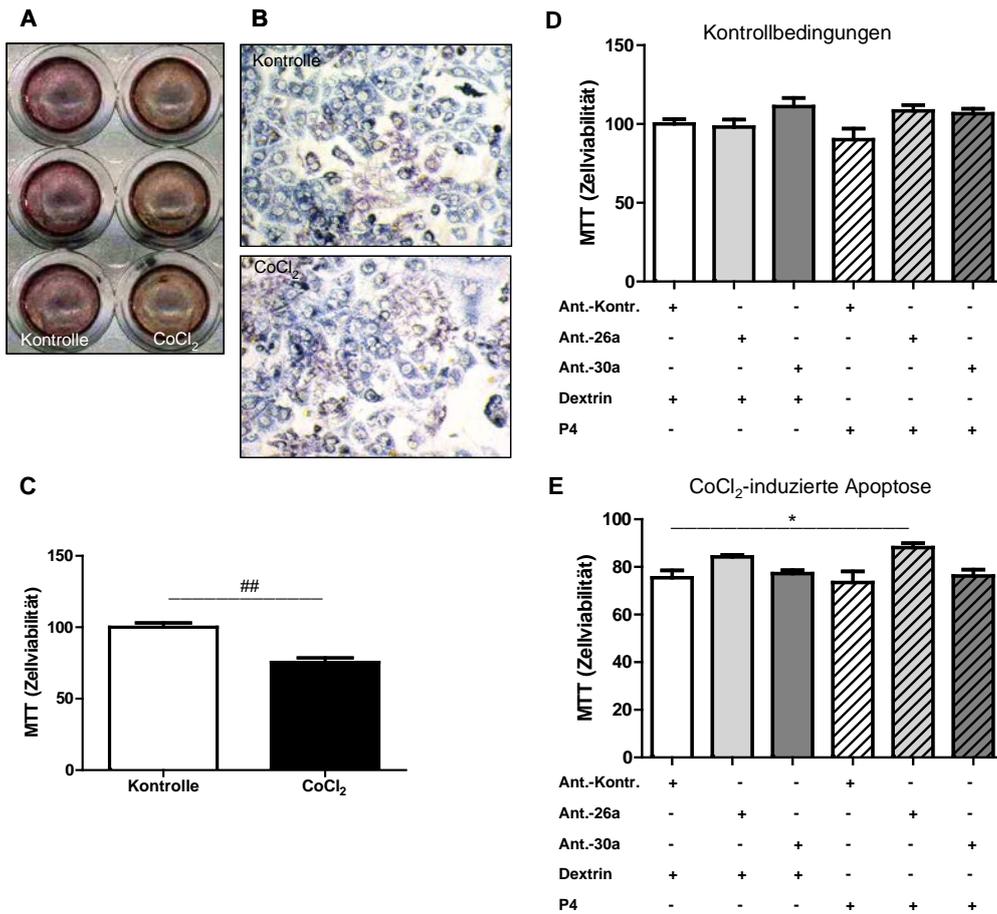


Abbildung 16: **Inhibition von miR-26a und Stimulation mit P4 schützt Zellen vor CoCl₂-induzierter Apoptose.** MTT-Zellviabilitätsassay: A) Ausschnitt aus 48-well-Platte zeigt Formazanbildung 24 Std. nach Kontroll- und CoCl₂-Behandlung. B) 20-fache-Vergrößerung zeigt Formazan-Bildung innerhalb der HL-1-Zellen. C) Quantifizierung der Formazanproduktion nach CoCl₂-Behandlung. ## p < 0,01, Unpaired T-test. Einfluss der Antagomir- und P4-Behandlung auf die Zellviabilität D) unter Kontrollbedingungen und E) bei CoCl₂-induzierter Apoptose (n = 3). * p < 0,05, 1-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von miR-26a und gleichzeitige P4-Stimulation einen protektiven Effekt auf die Zellen hat. Dies führt zu der Hypothese, dass die Herabregulation von miR-26a bei LVH, eine daraufhin gesteigerte Expression von PR sowie ausreichende Mengen von P4 kardiale Zellen vor Apoptose schützen.

4.8.5 Geschlechterabhängige Inhibition von miR-26a durch P4 und E2

Es wurde nachgewiesen, dass miR-26a die Expression von PR reguliert und eine Inhibition von miR-26a mit gleichzeitiger P4-Behandlung protektiv gegen Apoptose wirkt. Es ist weiterhin bekannt, dass PR in menschlichem Herzgewebe nach E2-Behandlung geschlechtsspezifisch exprimiert wird¹⁸³. Es sollte die Möglichkeit überprüft werden, dass miR-26a durch E2 geschlechtsspezifisch reguliert wird und somit für die beobachtete geschlechtsspezifische Expression von PR mitverantwortlich sein könnte. Daher

wurde miR-26a in den Kardiomyozyten der E2-behandelten Tiere gemessen. Weiterhin wurde die Expression von miR-26a auch in den Proben des LVs von E2-/P4-behandelten Tieren untersucht.

E2 hatte im gesamten LV bei beiden Geschlechtern keinen Einfluss auf die Expression von miR-26a (Abbildung 17A). P4 hingegen führte zu einer ca. 40 %igen Herabregulation von miR-26a nur in den weiblichen Tieren (Abbildung 17B). Bei den Männchen hatte die P4-Behandlung keinen Effekt. In den isolierten Kardiomyozyten konnte im Gegensatz zum LV durch E2 ebenfalls eine geschlechtsspezifische Inhibierung von miR-26a bei den Weibchen beobachtet werden, während bei den Männchen wiederum keine Regulation gemessen werden konnte (Abbildung 17C). Dies spricht für einen myozytenspezifischen Effekt von E2 auf miR-26a. Die Herabregulation von miR-26a durch P4 konnte ebenfalls in der weiblichen Kardiomyozytenzelllinie HL-1 bestätigt werden (Abbildung 17D). Interessant ist, dass in E2-behandeltem Herzgewebe bereits eine geschlechtsspezifische Regulation des PRs mit einer Heraufregulation nur im weiblichen Myokardgewebe bekannt ist¹⁸³. Diese Regulation korreliert mit der beobachteten entgegengesetzten Regulation von miR-26a durch E2 in den Myozyten. Dies bekräftigt die Hypothese, dass miR-26a im Herzen die Expression von PR reguliert und lässt vermuten, dass die geschlechtsspezifische Regulation von PR durch E2 via miR-26a geschieht.

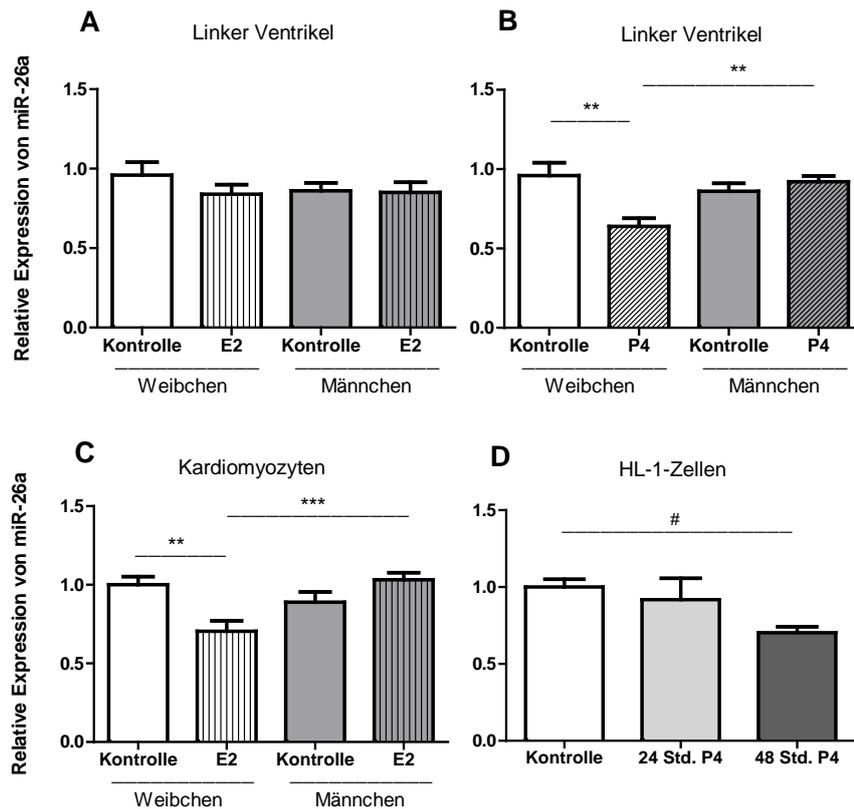


Abbildung 17: Einfluss von E2- oder P4-Behandlung auf die Expression von miR-26a im Herzen. Mittels qRT-PCR gemessene Expression von miR-26a A) im LV 5 Stunden nach E2- oder B) P4-Injektion ($n = 5$), C) in isolierten Kardiomyozyten 5 Std. nach E2-Injektion ($n = 4-7$) und D) in HL-1-Zellen 24 und 48 Std. nach P4-Stimulation ($n = 9$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test, # $p < 0,05$, 1-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

Es konnte gezeigt werden, dass miR-26a die Expression von PR reguliert und dass eine Herabregulation von miR-26a mit einer Heraufregulation von PR zwei Wochen nach Aortenstenose korreliert. Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass E2 und P4 miR-26a geschlechtsspezifisch im weiblichen Herzen inhibieren können. Höhere Level von P4 und E2 bei Weibchen und geschlechtsspezifische Inhibitionen von miR-26a durch diese Hormone, sowie die beobachtete protektive Wirkung einer Inhibition von miR-26a plus P4 in einer Kardiomyozytenzelllinie lassen vermuten, dass P4, E2 und miR-26a über die Aktivierung von PR an der geringeren Apoptose kardialer Myozyten bei Frauen beteiligt sind.

4.9 MiRNA-29b

MiR-29b war die einzige miRNA, bei der ein signifikanter Geschlechterunterschied in den Sham/TAC-Tieren detektiert wurde. Die Expression von miR-29b war im LV der Männchen geringer als bei den Weibchen (Abbildung 18A). Die TAC-Operation führte

zu einer Herabregulation von miR-29b in beiden Geschlechtern (2-faktorielle ANOVA: ** $p < 0,01$), die allerdings in den einzelnen Gruppen anhand des Bonferroni-Posthoc-Tests keine statistische Signifikanz erreichte. In der Microarray-Analyse wies miR-29b in den Weibchen ebenfalls eine höhere Expression auf als bei den Männchen (Abbildung 18B). Die Werte erreichten jedoch aufgrund der kleinen Probenanzahl und der stark schwankenden Werte innerhalb der Gruppen keine statistische Signifikanz.

Für miR-29b wurde mehrfach nachgewiesen, dass es die Expression fibrotischer Gene hemmt (siehe 1.2.6). Übereinstimmend mit der höheren Expression von miR-29b bei Weibchen ist daher die beobachtete, stärkere Fibroseentwicklung bei Männchen³⁷. Dies legt die Vermutung nahe, dass miR-29b eine Rolle in der geschlechterspezifischen Ausprägung von Fibrose spielt.

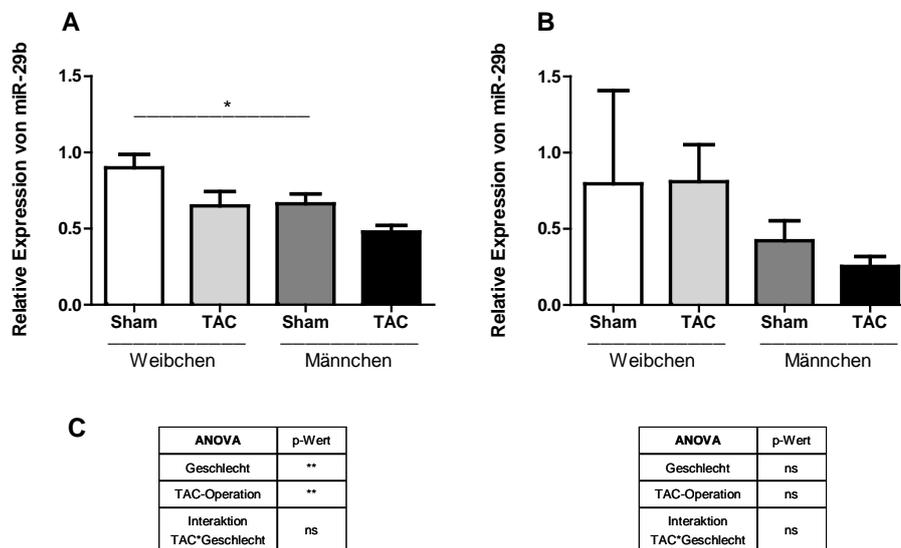


Abbildung 18: **Regulation von miR-29b zwei Wochen nach Aortenstenose.** A) Messung der miR-29b-Expression mit qRT-PCR ($n = 10-14$). B) Messung der miR-29b-Expression mittels Microarray ($n = 2-4$). C) Ergebnisse der 2-faktoriellen Varianzanalyse der jeweiligen Messungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

Um zu überprüfen, ob die geschlechtsspezifische Expression von miR-29b durch weibliche Hormone reguliert wird, wurde diese miRNA daher ebenfalls in den hormonbehandelten Tieren untersucht. Im gesamten LV hatte E2 keinen Effekt auf die Expression von miR-29b (Abbildung 19A). P4 hingegen führte hier zu einer geschlechtsspezifischen Inhibition von miR-29b nur bei den Weibchen (Abbildung 19B). In den isolierten Kardiomyozyten führte die E2-Behandlung zu einer Herabregulation von miR-29b in beiden Geschlechtern (ANOVA: * $p < 0,05$); der Effekt war jedoch zu schwach, um in der nachfolgenden Bonferroni-Analyse statistische Signifikanzen in den einzelnen Gruppen zu ergeben (Abbildung 19C). Bemerkenswert ist, dass auch

hier im LV unter Kontrollbedingungen tendenziell höhere miR-29b-Werte bei den Weibchen nachzuweisen waren (Dex W/M = 1,16; Abbildung 19A, B).

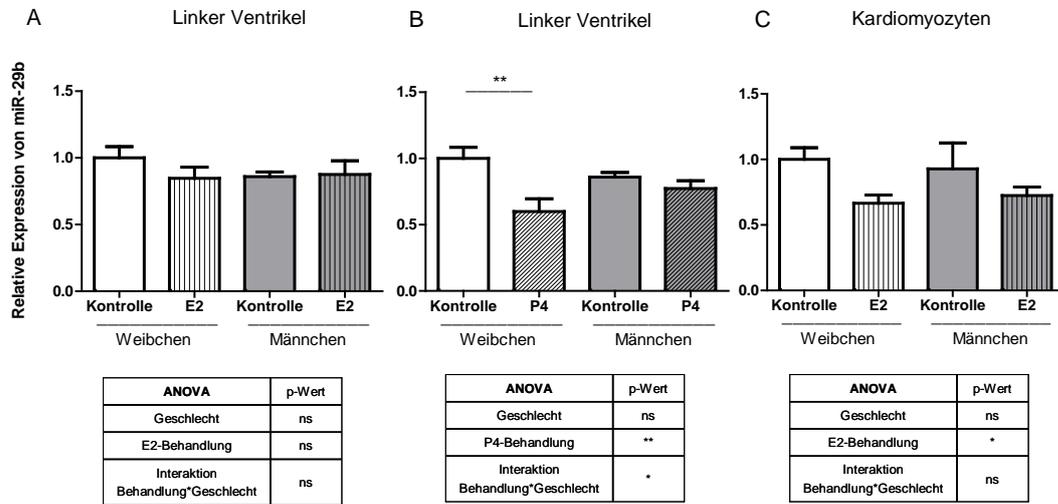


Abbildung 19: Einfluss von E2- oder P4-Behandlung auf die Expression von miR-29b im Herzen. Mittels qRT-PCR gemessene Expression von miR-29b A) im LV 5 Stunden nach E2- oder B) P4-Injektion (n = 5), C) in isolierten Kardiomyozyten 5 Std. nach E2-Injektion (n = 4-7). ** p < 0,01, 2-faktorielle Varianzanalyse mit folgendem Bonferroni Posthoc Test.

Es wurde eine geschlechtsspezifische Expression von miR-29b im LV von Sham/TAC-Tieren mit einer stärkeren Expression in den Weibchen nachgewiesen. Weiterhin wurde eine geschlechtsspezifische Inhibition von miR-29b durch P4 im LV von Weibchen detektiert. Diese Regulation stimmt nicht mit der beobachteten stärkeren Expression von miR-29b in Weibchen der Sham/TAC-Tiere überein. Die geschlechtsspezifische Expression von miR-29b muss daher einen anderen Ursprung haben (siehe Diskussion 5.6).

5 Diskussion

Erstmals wurde in dieser Arbeit eine geschlechter- und hormonabhängige Regulation von miRNAs im Herzen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass E2 und P4 *in vivo* umfangreiche geschlechtsspezifische Effekte auf die Expression von kardialen miRNAs haben. Eine Steroidbehandlung führte dabei sowohl bei E2 als auch bei P4 nur im weiblichen Geschlecht zur Inhibition von verschiedenen miRNAs. Neu und auffällig war auch, dass E2 und P4 auf viele miRNAs dieselbe geschlechtsspezifisch inhibierende Wirkung im Herzen hatten.

Im Folgenden wird die beobachtete Regulation von miRNAs bei LVH sowie durch die Steroidhormone detaillierter diskutiert. Darüber hinaus wird der Einfluss der geschlechtsspezifischen und steroidhormonabhängigen Regulation von miR-21, miR-26a und miR-29b auf Fibrose und Apoptose explizit erörtert.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, wie wichtig es ist, bei Untersuchungen zur kardiovaskulären Funktion das Geschlecht sowie den Hormonstatus zu berücksichtigen.

5.1 Frühstadium der linksventrikulären Hypertrophie

Zweiwöchige TAC-Mäuse dienen als Modell für das Frühstadium von LVH. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das Herz in der Umbau- und Anpassungsphase, der adaptiven Phase. Das Herzgewicht war in beiden Geschlechtern zwei Wochen nach der OP schon signifikant gestiegen (Abbildung 3A); eine konzentrische Form der Hypertrophie bildet sich aus. Der molekulare Marker für LVH Nppa war ebenfalls in beiden Geschlechtern verstärkt exprimiert (Abbildung 3C). Die Ejektionsfraktion sank bei den Weibchen nach zwei Wochen lediglich um 2 %, während bei den Männchen schon ein mittlerer Unterschied von 19 % auszumachen war. Bei Menschen ist ähnliches zu beobachten. Männer mit Aortenstenose sind im Vergleich mit Frauen häufig durch schlechtere Pumpfunktion und stärkere linksventrikuläre Dilatation charakterisiert²⁷. Signifikante Geschlechterunterschiede manifestieren sich im Tiermodell allerdings erst in späteren Stadien beim Einsetzen von chronischer LVH³².

Für die medizinische Forschung ist das zweiwöchige TAC-Modell besonders interessant, weil es den Beginn der LVH widerspiegelt¹⁸⁶. Der Einfluss pharmakologischer Behandlungen auf die Entwicklung der krankhaften Umwandlung des Herzens kann getestet werden¹⁸⁶ und der Übergang zur maladaptiven Form der Hypertrophie kann verzögert oder verhindert werden. Bei Untersuchungen der Geschlechterunterschiede ist dieses Modell von besonderem Interesse, weil molekulare Ursachen gefunden wer-

den können, die die späteren phänotypischen Geschlechterunterschiede begründen. Weiterhin ist das TAC-Modell im Gegensatz zu anderen Hypertrophie-Modellen besonders realitätsnah, weil es die Verengung der Aorta bei Aortenstenose und den darauffolgenden Bluthochdruck imitiert ohne weitere Veränderungen im Tier zu verursachen.

5.2 Regulation von miRNAs während linksventrikulärer Hypertrophie

Das Interesse an miRNAs und ihren Funktionen ist in sehr kurzer Zeit stark gestiegen. Nachdem im Jahre 2000 die ersten miRNAs beim Menschen identifiziert wurden und 2006 die ersten Publikationen eine Rolle von miRNAs bei Herzkrankheiten beschrieben⁹³, vermehrten sich die Studien an miRNAs in Herzkrankheiten^{88 94-95} und entsprechende Reviews^{70 92 187-190} explosionsartig. Bei Studienbeginn war das Wissen über die Regulation von miRNAs bei LVH noch sehr limitiert und die Ergebnisse vorhandener Publikationen nicht immer homogen. Es wurde daher eine Methode gesucht, mit der die genomweite miRNA-Expression im LV untersucht werden konnte und gleichzeitig die Expressionsregulation zwischen Sham- und TAC-Tieren, sowie zwischen beiden Geschlechtern detektiert werden konnte. Der miRXplore-MicroArray bot ein System, mit dem alle bekannten miRNAs aus Mensch, Maus, Ratte und Viren erkannt werden und die Expression verschiedener Proben miteinander verglichen werden konnten.

81 miRNAs wurden detektiert, die im LV exprimiert werden. Die 25 am stärksten exprimierten miRNAs sind in Tabelle 7 aufgelistet und identifizieren miR-133a und -b als die am stärksten angereicherten miRNAs. Diese Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen anderer Gruppen überein⁸⁷. Die relativ geringe Menge an detektierten miRNAs im Microarray ist auf die Aufreinigung der miRNA-Fractionen mittels Säulen zurückzuführen; schwächer exprimierte miRNAs wie miR-21 erreichten häufig nicht in allen Gruppen den gesetzten Schwellenwert der Signalintensitäten.

Es wurden 15 miRNAs identifiziert (7 anhand des Microarrays und 8 weitere mittels qRT-PCR), deren Expression bei LVH abnahm. 10 nach Aortenstenose heraufregulierte miRNAs wurden mittels Microarray detektiert. Während mit der qRT-PCR alle im Microarray gemessenen Herabregulationen nach TAC bestätigt werden konnten und sogar beobachtete Tendenzen mit dieser Methode Signifikanz erlangten, wurde mit qRT-PCR nur miR-21 als hochreguliert detektiert. Die im Microarray gemessenen Hochregulation von z. B. miR-24 oder miR-27, konnten mit qRT-PCR nicht bestätigt werden, stimmen jedoch mit Ergebnissen anderer Studien überein⁹³. Ursachen für die Unterschiede in der Detektion von regulierten miRNAs zwischen den beiden Methoden, Microarray und qRT-PCR, liegen in der limitierten Messgenauigkeit und in der unterschiedlichen Normalisierung der Werte. Generell wird der qRT-PCR bessere Messgenauigkeit bescheinigt; hier wurde auch eine größere Anzahl an Tieren untersucht.

Auffällig war, dass alle herunterregulierten miRNAs zu den im LV am stärksten exprimierten miRNAs gehörten. Eine Reduktion der translationshemmenden miRNAs bei LVH korreliert mit der Steigerung der Proteinsynthese bei LVH. Dies könnte bedeuten, dass miRNAs für die Zelle ökonomisch günstige Inhibitoren darstellen, die übermäßige Translationen kontrollieren. Die beobachtete relativ lange Stabilität von miRNAs bekräftigen diese Theorie¹⁹¹⁻¹⁹².

Limitationen ergeben sich durch Messungen des gesamten Gewebes. Ein LV besteht aus Myozyten, Fibroblasten, Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs). Eine stärkere Wirkung von E2 auf die miRNA-Expression in Kardiomyozyten im Vergleich zur Messung im gesamten LV war auffällig (Abbildung 5). Die Messungen in den Sham-/TAC-Tieren erfolgten an miRNA-Fractionen aus dem gesamten LV. Zellspezifische Geschlechterunterschiede konnten daher hier nicht ausgemacht werden, können jedoch die Gesamtwerte beeinflussen. Zusätzlich erschwerend wirken die zyklusabhängigen Hormonschwankungen und das operationsabhängige Ausmaß der LVH. Da alle diese Faktoren Einfluss auf die miRNA-Expression haben, schwanken die gemessenen Werte häufig sehr stark. In vielen Fällen waren geschlechtsspezifische Tendenzen auszumachen (siehe miR-21), jedoch variierten die Werte innerhalb einer Gruppe stark, so dass keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Um in diesen frühen Stadien genauer mögliche Geschlechterunterschiede detektieren zu können, müsste die Tierzahl pro Gruppe erhöht und/oder zellspezifische Untersuchungen durchgeführt werden. Dennoch ist es wichtig, auffällige Tendenzen, die sich in mehreren Experimenten wiederholen, näher zu untersuchen. Mitglieder der let-7-Familie beispielsweise zeigten tendenziell stärkere Herabregulationen nach Aortenstenose bei Weibchen (Tabelle 12), erreichten jedoch keine statistische Signifikanz im Faktor Geschlecht. In Kardiomyozyten war die E2-Behandlung auf let-7c inhibierend und auch in vielen publizierten Studien mit E2 war let-7 reguliert (Tabelle 1). Let-7 sollte daher bei weiteren Studien an Geschlechterunterschieden im Augenmerk behalten werden.

5.3 Weitreichende Inhibition von miRNAs durch weibliche Hormone im Herzen

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass E2 und P4 *in vivo* umfangreiche, geschlechtsspezifische Effekte auf die miRNA-Expression im Herzen haben. Geschlechterabhängige Effekte von Steroidhormonen auf die Expression von mRNAs und Proteinen sind bekannt^{185 34}, auf miRNA-Ebene im Herzen ist dies neu.

Sowohl der Effekt von E2 auf die miRNAs in den Kardiomyozyten als auch die Wirkung von P4 auf die miRNAs im gesamten LV war limitiert auf Inhibitionen ausschließlich bei

den Weibchen. In beiden Behandlungen war eine erhebliche Anzahl der miRNAs reguliert; 11 miRNAs in den Kardiomyozyten nach E2-Behandlung und 8 miRNAs im LV durch P4 waren jeweils bei den Weibchen herabreguliert. Die Inhibition von miRNAs scheint eine Methode der Zelle zu sein, schnell und mit geringem Aufwand auf Steroidstimulationen reagieren und große Veränderungen in Proteinmengen herbeiführen zu können.

Die Regulation von miRNAs könnte einerseits aufgrund von direkter, transkriptioneller Inhibition durch ER- oder PR-Bindung an die Promotoren der spezifischen miRNAs erfolgen. Weiterhin ist eine Hemmung der miRNA-Biogenese z. B. durch eine Inaktivierung der Prozessierungsenzyme oder eine Induktion der Degradation von miRNAs durch Steroide möglich. Der schnelle Effekt der Steroide, miRNA-Level innerhalb von fünf Stunden fast bis auf die Hälfte zu verringern, spricht für eine nicht-genomische Regulierung und daher für einen Eingriff in die Biogenese oder auf die miRNA-Stabilität. Yamagata et al.¹⁵³ zeigten, dass die Prozessierung von spezifischen pri-miRNAs zu pre-miRNAs durch Drosha mittels E2-aktiviertem ER α inhibiert werden kann. Diese hormonelle Reprimierung erfolgt durch Interaktion von ER α mit RNA-Bindeproteinen des Drosha-Komplexes, p72 und p68, die pri-miRNAs im Nukleus rekrutieren und zur Weiterprozessierung zu Drosha führen¹⁵³. Durch die Interaktion dieser Komplexkomponenten mit ER α wird die Prozessierungseffizienz und somit die Menge reifer miRNAs vermindert¹⁵³. Unterschiedlich starke Regulationen der miRNAs könnten durch verschiedene Turnover-Raten der jeweiligen miRNA-Expressionen zu erklären sein. Über die relativen Expressionsaktivitäten der einzelnen miRNAs ist nichts bekannt. Es wurde mehrfach jedoch gezeigt, dass die Halbwertszeit von miRNAs relativ lang ist ($t_{1/2}$ = 24-210 Std.), wobei sich die Stabilitäten verschiedener miRNAs sehr stark voneinander unterscheiden¹⁹¹⁻¹⁹². In einigen der regulierten miRNAs wurden bereits ER-Bindestellen identifiziert (siehe 1.3.1), die zusätzlich für eine direkte, transkriptionelle Inhibition durch die aktivierten Steroidrezeptoren sprechen würden. Eine Kombination beider Regulationsmechanismen ist möglich.

5.3.1 Geschlechtsspezifische und zellspezifische Regulation von miRNAs durch weibliche Hormone

Durch den Vergleich des Einflusses von E2 auf die Expression von miRNAs in Kardiomyozyten und im LV konnte bei einigen miRNAs eine zellspezifische Regulation festgestellt werden (Abbildung 5B). Nur eine von den in Myozyten durch E2 regulierten miRNAs, miR-21, wies auch im gesamten LV eine durch E2 geschlechtsspezifisch inhibierte Expression nur bei den Weibchen auf (Tabelle 14). Auf die Expression der anderen miRNAs hatte E2 im gesamten Ventrikel keinen signifikanten Effekt. Dies deutet daraufhin, dass eine zellspezifische Regulation von miRNAs durch E2 mit einem stär-

keren, inhibierenden Effekt in den Kardiomyozyten im Vergleich zu den anderen Zellen im Herzen (Fibroblasten, Endothel- und VSMC-Zellen) vorliegt. Diese zellspezifischen Effekte von E2 könnten zu Detektionsschwierigkeiten von Geschlechterunterschieden bei miRNA-Messungen im gesamten LV führen (siehe 5.2). Der zellspezifische Effekt auf die miRNA-Expression kann durch eine unterschiedliche Aktivierung der Rezeptoren oder durch eine zellspezifische Rekrutierung von Kofaktoren erklärt werden.

Die Steroidbehandlung führte sowohl bei E2 als auch bei P4 nur im weiblichen Geschlecht zur modifizierten Expression von miRNAs. Geschlechtsspezifische Regulationen lassen sich ebenfalls wie zellspezifische Wirkungen auf eine geschlechterabhängige Aktivierung der Rezeptoren oder Rekrutierung von Kofaktoren erklären. Weiterhin ist es möglich, dass sich die Mengen der vorhandenen Rezeptoren und das relative Verhältnis der Rezeptorisoformen in den Geschlechtern unterscheiden und somit Geschlechterunterschiede hervorrufen. Cochrane et al.¹⁶⁴ weisen daraufhin, dass die miRNA-Regulation einen neuen Mechanismus für zell- und gewebespezifische Regulation von Genen durch Steroidhormonrezeptoren darstellt. Dies lässt sich nun auch auf eine geschlechtsspezifische Regulation ausweiten. Für die meisten miRNAs war die Steroidregulation in den Kardiomyozyten eindeutig geschlechtsspezifisch (Abbildung 4A). Bei einigen miRNAs schien E2 jedoch auch einen tendenziell herabregulierenden Effekt bei den Männchen zu haben (let-7c, miR-106b, -29a/b, Abbildung 4B). Der stärkere Einfluss der E2-Behandlung auf diese miRNAs bei den Weibchen kann auf die bereits höheren Basislevel von E2 im Blut der weiblichen Tiere zurückzuführen sein.

Nicht nur bei Herzkrankheiten sind die beobachteten starken und auf Weibchen limitierten Effekte von E2 und P4 auf miRNAs von Interesse, sondern bei allen Prozessen, bei denen Steroide und entsprechende miRNAs eine Rolle spielen wie z. B. bei Brustkrebs oder im Endometrium. Auch für Forschung an pre- oder postmenopausalen Hormonbehandlungen ist die identifizierte Regulation von großer Bedeutung.

5.3.2 Regulation von miRNAs durch Estradiol

Die durchgeführte Behandlung von Mäusen mit E2 führt innerhalb von 2 Std. zu einem 2,5-fachen Anstieg von E2 im Blut¹⁹³. Bei Frauen steigen die E2-Werte während des Zyklus um das 10 - 20-fache, weiterhin haben geschlechtsreife Frauen einen 10 - 20-mal so hohen E2-Spiegel im Blut wie Männer.

11 von den 21 untersuchten miRNAs wurden in Kardiomyozyten von Weibchen durch E2 inhibiert, keine Expression der miRNAs wurde bei den Männchen durch E2 verändert. Im LV war nur miR-21 nach E2-Behandlung geschlechtsspezifisch reguliert.

In Genen von fünf der elf regulierten miRNAs sind E2-Bindestellen in ihren regulativen Regionen identifiziert worden (miR-21, -27a/b) bzw. sind die miRNA-Gene innerhalb von Genen mit bekannten EREs (let-7c, miR-30) kodiert¹⁵⁰. Dies spricht für die Möglichkeit einer zielgerichteten, transkriptionellen Inhibition dieser miRNAs durch E2. Andererseits deutet der beobachtete, weitreichende Einfluss (die Hälfte aller untersuchten miRNAs war bei den Weibchen reguliert) von E2 in den Myozyten eher auf eine regulierende Wirkung innerhalb der Biogenese von miRNAs speziell in diesen Zellen hin. Eine Reprimierung der Drosha-vermittelten Prozessierung von miRNAs durch E2-aktivierten ER α wurde schon nachgewiesen¹⁵³ (siehe auch 5.3). Für die am stärksten durch E2 regulierte miRNA, miR-21, ist eine Kombination der möglichen Regulierungen wahrscheinlich.

5.3.3 Regulation von miRNAs durch Progesteron

Bei dem Vergleich der Effekte von P4 und E2 im gesamten LV hatte P4 einen stärkeren Effekt auf die Expression der untersuchten miRNAs als E2. Fast alle gemessenen miRNAs waren durch P4 geschlechtsspezifisch reguliert.

Ebenso wie bei E2 in den Kardiomyozyten ist die Wirkung von P4 im LV ausschließlich inhibierend; keine miRNA wurde induziert. Ursache hierfür können wiederum Inhibitionen der miRNA-Prozessierungsenzyme, Transkriptioneninhibitionen oder miRNA-Abbau sein (siehe 5.3). Heraufregulationen von Dicer und Exportin-5 durch P4 konnten im Uterus nachgewiesen werden¹⁵¹, diese würden aber nicht die beobachtete Inhibition erklären. Über eine Interaktion von PR mit dem Drosha-Komplex und folgenden Reduktionen reifer miRNAs, wie bei ER α gezeigt¹⁵³, ist noch nichts bekannt. Auch PREs in Promotoren von miRNAs wurden noch nicht identifiziert. Da aber innerhalb der kurzen, nur fünf Stunden andauernden Behandlungszeit bei vielen miRNAs eine fast 50 %ige Reduktion erreicht wurde, erscheint eine nicht-genomische Aktion von Progesteron wahrscheinlich. Es wurde gezeigt, dass P4 zu einer Steigerung der Proteinsynthese im Herzen¹⁴⁸ und in Myozyten⁸ führt. Eine Reduktion von miRNAs durch P4 und damit verhinderte Translationsinhibitionen könnten eine Ursache hierfür bilden.

Auffällig ist, dass E2 und P4 im Herzen auf viele miRNAs dieselben Effekte haben. MiR-21, -126-3p, -106b, -26a, -29a/b und -27a wurden in den Kardiomyozyten durch E2 und im gesamten LV durch P4 geschlechtsspezifisch nur bei Weibchen inhibiert. Es ist anzunehmen, dass die beiden weiblichen Hormone *in vivo* kompensatorische, aber auch potenzierende Effekte haben können. Damit übereinstimmend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Myozytenhypertrophie E2 und P4 synergistisch einen inhibierenden Effekt auf miR-21 haben.

Die in dieser Arbeit detektierte Regulation von miRNAs durch P4 im Herzen sowie die detektierte Regulation des PRs durch miRNAs, sprechen für die Notwendigkeit vermehrter Studien der Rolle von P4 bei kardiovaskulären Erkrankungen. Analysen über die Wirkung von P4 im Herzen sind im Vergleich zu E2 stark unterrepräsentiert. Auch über eine synergistische Funktion von P4 und E2 ist wenig bekannt. Für neue Ansätze in der umstrittenen Hormonersatztherapie und für das Verständnis der Geschlechterunterschiede bei Herzkrankheiten sind weitere Studien notwendig. Angesichts der Tatsache, dass P4 bei Schwangeren stark ansteigt, und parallel dazu physiologische Herzhypertrophie entsteht, kann hypothetisiert werden, dass P4 zu einer eher physiologischen Form der MH bei Frauen beiträgt. Dass weibliche Hormone an der Schwangerschaftshypertrophie teilhaben können, wurde bereits am Beispiel von E2 demonstriert¹⁹⁴. Es ist daher denkbar, dass höhere Level von P4 und E2 bei Frauen auch bei der pathologischen Form von Hypertrophie Einfluss haben und die Ausbildung des exzentrischen Phänotyps verzögern.

5.4 MiRNA-21

MiR-21 war nach E2- und P4-Behandlung die am stärksten regulierte miRNA und ihre Expression war nach nur fünf Stunden bei den Weibchen bis zu 50 % reduziert. Darüber hinaus konnte eine gesteigerte Expression von miR-21 im LV von ovariectomierten Mäusen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die Induktion von miR-21 bei Zellhypertrophie durch E2 und P4 unterdrückt. MiR-21 ist in Myozyten in wesentlich geringerer Menge vorhanden als in Fibroblasten^{70 97}, wird hier aber ebenfalls wie im gesamten Herzen durch E2 inhibiert. Die Ergebnisse werfen die Frage auf, welche funktionelle Wirkung die relative Anzahl einer miRNA in einer Zelle hat. Es könnte vor allem einen funktionellen Einfluss auf die zellspezifische Zielgenregulation haben. So wäre denkbar, dass in Zellen mit geringerer Konzentration von miR-21 (z. B. Myozyten) nur Zielgene effektiv reguliert werden, deren Transkripte auch in geringer Menge vorhanden sind. Dem entgegengesetzt würde eine größere Menge der gleichen miRNA in anderen Zellen (z. B. Fibroblasten) auch Zielgene funktionell regulieren, die in stärkerem Maß exprimiert vorliegen. Auch die geschlechtsspezifische Inhibition von miR-21 durch E2 und P4 im Herzen könnte so zu nachfolgenden geschlechtsspezifischen Regulationen führen, weil in Weibchen einige Zielgene nicht mehr effektiv gehemmt werden. MiRNAs bilden somit weitere Faktoren, die zur Entwicklung von geschlechts- und zellspezifischen Regulationen beitragen.

Die Regulation von miR-21 durch E2 und P4 kann auf verschiedene Weise erfolgen. Einerseits wurde bereits eine ER-Bindestelle im Promoter von miR-21 identifiziert. E2-

aktivierter ER kann also direkt als Transkriptionsrepressor wirken. Auch AP-1-Bindestellen wurden im Promoter von miR-21 gefunden¹⁹⁵; ER α interagiert direkt mit AP-1 und reguliert dadurch die Transkription von Zielgenen¹⁹⁶. Somit wäre eine direkte, transkriptionelle Regulation von miR-21 durch E2 möglich. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Transkription von miR-21 durch Il6/Stat3 induziert und von BMP6 gehemmt werden kann¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ und dass TGF β und BMP4 über SMAD-Proteine zur Induktion der Drosha-Prozessierung und folgender Hochregulation von miR-21 führen²⁰⁰. Steroidregulationen von Il6, Stat3, TGF β und BMP6 sind bekannt²⁰¹⁻²⁰⁴ und bieten somit indirekte Angriffspunkte für E2 und P4 zur Regulation von miR-21. Eine Regulation der miRNA-Biogenese durch E2 und P4 ist ebenfalls möglich und wurde bereits in Abschnitt 5.3 diskutiert.

In fast allen Studien in Tiermodellen von MH sowie bei Patienten mit Aortenstenose oder Herzinsuffizienz gehörte miR-21 zu den am stärksten hochregulierten miRNAs. Für miR-21 sind profibrotische^{97 102 205} und anti-apoptotische^{107 206-208} Wirkungen im Herzen nachgewiesen worden. Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der höheren Expression von miR-21 bei Männchen wurden Expressionen von Zielgenen aus beiden dieser Prozesse gemessen. Es wurde gezeigt, dass *Spry1* und *Reck*, beides Regulatoren von Fibrose und Zielgene von miR-21, bei LVH geschlechtsspezifisch exprimiert sind. Für eine nähere Identifikation der Rolle von miR-21 bei Geschlechterunterschieden während LVH und Fibrose muss zukünftig die Proteinexpression dieser Zielgene untersucht werden. In Fibroblasten wurde bereits gezeigt, dass miR-21 die Proteinexpression von *Spry1* inhibiert, jedoch keinen Einfluss auf die mRNA-Expression hat⁹⁷. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass *Spry1*-Proteinexpression bei Menschen mit Herzinsuffizienz abnahm, korrelierend mit gesteigerter miR-21-Expression⁹⁷.

5.5 MiRNA-26a

MiRNA-26a ist eine der im LV am stärksten exprimierten miRNAs und ihre Expression ist im frühen Stadium der LVH stark reduziert (Abbildung 12A). Dennoch gibt es bislang wenige Publikationen über die Rolle von miR-26a im Herzen und noch gar keine über ihre Rolle bei MH. Eine der zentralen Herausforderungen der miRNA-Forschung liegt in der Identifizierung von Zielgenen einzelner miRNAs. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass miR-26a die Expression von PR in Kardiomyozyten inhibiert. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Expression von PR während LVH induziert wird und somit mit der Herabregulation von miR-26a korreliert. Darüber hinaus wurden Kardiomyozyten durch die Herabregulation von miR-26a und gleichzeitiger P4-Behandlung vor Apoptose geschützt. Geschlechtsspezifische Inhibitionen von miR-26a

bei Weibchen wurden in Kardiomyozyten nach E2-Stimulation und im LV durch P4 auffindig gemacht.

Cochrane et al.¹⁶⁴ stellten die These auf, dass P4-aktivierte PRs die Expression mehrerer ihrer Zielgene sowohl durch 5' als auch durch 3'-Regulation kontrollieren. Aktivierter PR wirkt danach als direkter Transkriptionsfaktor eines Zielgens und reguliert gleichzeitig spezifische miRNAs, die wiederum inhibierend auf die Zielgenexpression wirken.

Die in dieser Arbeit identifizierten Regulationen von PR und miR-26a lassen ein noch dichteres Netz der Hormonregulationen und eine Selbstregulation von PR vermuten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass miR-26a die PR-Expression inhibiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass P4 und E2 miR-26a bei Weibchen inhibieren. Anhand dieser Daten wurde ein hypothetisches Modell erstellt (Abbildung 20). Aktivierter ER α führt zu verstärkter Expression von PR²⁰⁹⁻²¹⁰. Zusätzlich reduzieren weibliche Hormone die Level von miR-26a im LV, wodurch die Inhibition von PR verringert und eine verstärkte Expression ermöglicht wird. Dadurch könnte miR-26a wiederum stärker gehemmt werden (positiver Feedback). Anhand dieses Modells ließe sich die publizierte geschlechtsspezifische Expression von PR im Herzen nach E2-Behandlung erklären¹⁸³. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine miR-26a-Inhibition plus P4-Stimulation Kardiomyozyten vor Apoptose schützen. Eine vorherige Publikation zeigte, dass P4 durch die Induktion von Bcl-xl die Kardiomyozytenapoptose verringert wird¹⁴⁹. Die neuen Ergebnisse erlauben die Hypothese, dass die Inhibition von miR-26a zur erhöhten PR-Expression und mit nachfolgender P4-Stimulation zu der beobachteten geringeren Apoptose führte. Höhere endogene E2- und P4-Werte sowie geschlechtsspezifische Inhibitionen von miR-26a durch P4 und E2 bei Weibchen können somit Ursache der geringeren Apoptose und des geringeren Verlusts von Myozyten bei Frauen sein^{26 35-36}. Die Herabregulation von miR-26a und die nachgewiesene gesteigerte Expression von PR bei LVH könnte gemeinsam mit höheren E2- und P4-Werten bei Frauen zu Geschlechterunterschieden in Apoptose und zu geschlechtsspezifischen, transkriptionellen Regulationen führen.

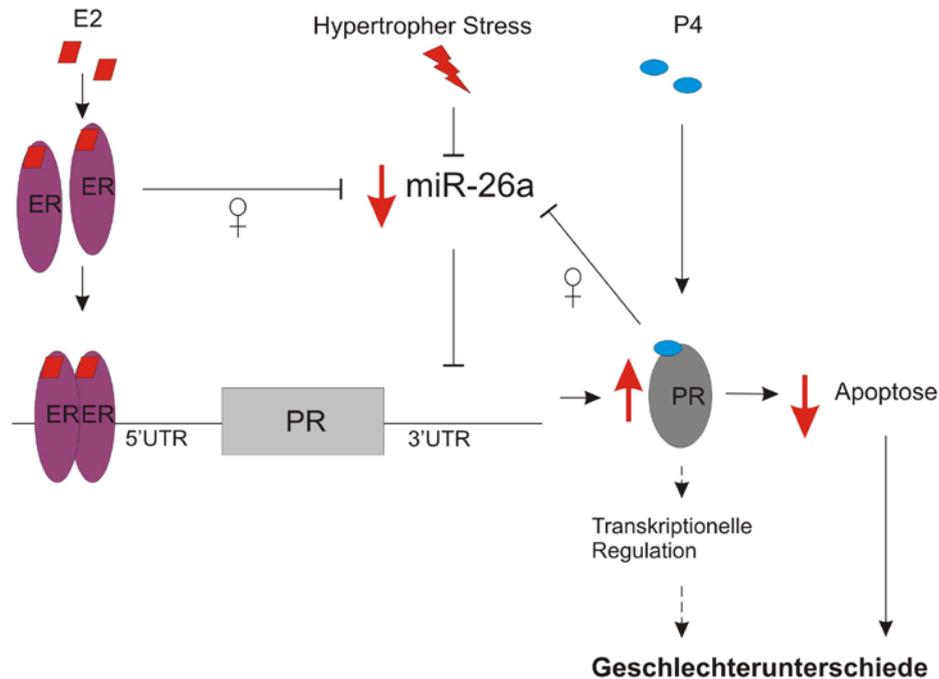


Abbildung 20: **Schematische Darstellung möglicher Regulationen von PR via miR-26a im Herzen vermittelt durch P4, E2 oder hypertrophen Stress.** Hypertropher Stress führt zur Herabregulation von miR-26a. Weiterhin wird miR-26a durch E2 und P4 geschlechtsspezifisch nur bei Weibchen gehemmt. Eine Abnahme von miR-26a hat eine verstärkte Expression von PR zur Folge. Eine geschlechterabhängige Regulation von miR-26a durch E2 und P4, sowie höhere Level von P4 bei Weibchen zur Aktivierung des PRs können zu Geschlechterunterschiede bei Apoptose und Herzkrankheiten beitragen.

Bei Patienten mit Aortenstenose konnte bereits gezeigt werden, dass miR-26b herabreguliert ist⁹⁸. MiR-26a und miR-26b unterscheiden sich in einer Base, wobei die ‚seed‘ dieselbe ist und somit die vorhergesagten Zielgene gleich sind. Über eine Regulation von PR bei Aortenstenose bei Menschen ist bis jetzt nichts bekannt.

5.6 MiRNA-29b

In dieser Arbeit wurde für miR-29b eine geschlechtsspezifische Expression bei LVH mit höherer Expression bei den Weibchen nachgewiesen. MiR-29b liegt im Herzen angereichert in den Fibroblasten vor und hemmt die Expression von Kollagenen und anderen Genen der extrazellulären Matrix¹¹⁴. Die nachgewiesenen höheren Werte von miR-29b in Weibchen sind insofern besonders interessant, weil sie mit der geringeren Expression von Kollagenen und der geringeren Ausbildung von Fibrose bei Weibchen korrelieren³⁷. Mit miR-29b wurde somit ein neuer Faktor identifiziert, der in der initialen Phase der LVH mit einer stärkeren Hemmung der fibrotischen Gene bei Weibchen zu der stärkeren Ausprägung von Fibrose und damit schlechteren klinischen Prognose bei

Männchen beitragen kann. Weitere identifizierte Zielgene von miR-29b sind die Methyltransferasen DNMT3A/B und DNMT1, durch deren Hemmung sie zur Reexpression von ER α beitragen¹¹⁷. Höhere Werte von miR-29b können somit auch indirekt durch die Regulierung von ER α zu Geschlechterunterschieden führen.

Um die Ursache der geschlechtsspezifischen Regulation von miR-29b auszumachen, wurde die miRNA in den hormonbehandelten Tieren gemessen. In einer anderen Studie wurde miR-29b durch P4 reguliert detektiert¹⁵⁸. Im LV hatte lediglich P4 einen Effekt; es inhibierte miR-29b geschlechtsspezifisch bei den Weibchen. In den Kardiomyozyten allerdings konnte auch E2 die Expression hemmen, ebenfalls nur in den Weibchen. Diese Inhibitionen erklären allerdings nicht die beobachtete, höhere Expression von miR-29b bei den Sham-Weibchen. Möglich ist eher, dass keine direkte Hormonregulierung verantwortlich für die stärkere Expression von miR-29b bei den Weibchen ist. In Leberzellen wurde bereits gezeigt, dass die E2-Regulierung des NF-kB-Signalweges zu einer verstärkten Expression von miR-29 führt¹⁶³. Interessanterweise konnte eine andere Studie ebenfalls eine geschlechterabhängige Expression von Mitgliedern der miR-29-Familie im Gehirn infolge einer Röntgenbestrahlung feststellen²¹¹ und eine weitere Studie wies höhere miR-29-Werte in der Leber von weiblichen im Vergleich mit männlichen Ratten nach²¹². Weitere Untersuchungen über die geschlechtsspezifische Expression von miR-29b und ihre Regulierung müssen folgen.

5.7 Ausblick und medizinische Relevanz

Obwohl das Geschlecht seit langem als signifikanter Faktor bei der Inzidenz, dem Verlauf und der Mortalität vieler Krankheiten bekannt ist, wurde die Erforschung geschlechtsspezifischer Mechanismen und der Einfluss von Geschlechtshormonen erheblich unterschätzt. Bis heute werden viele Krankheiten und Medikamente lediglich an Männchen erforscht und mögliche Geschlechterunterschiede völlig ignoriert. Dabei bietet der weibliche Organismus, zumindest bei Herzkrankheiten, einen natürlichen Schutz. Das Wissen über geschlechtsspezifische Wirkungen und deren Erforschung wird mittlerweile jedoch von vielen Medizinern und Naturwissenschaftlern als Notwendigkeit angesehen und die Geschlechtermedizin erlangt immer mehr Aufmerksamkeit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einmal mehr, wie gravierend die Effekte von weiblichen Hormonen sein können. Darüber hinaus konnte eine starke geschlechtsspezifische Wirkung der Hormone auf die Expression von miRNAs nachgewiesen werden. Eine Verdopplung der physiologischen Werte von E2 und P4 zog eine weitreichende Inhibition der miRNAs im Herzen nach sich, war jedoch limitiert auf das weibliche Geschlecht. Premenopausale Frauen unterliegen solchen und stärkeren hormonellen

Schwankungen monatlich. Darüber hinaus ist der Grundspiegel von E2 und P4 bei Frauen doppelt so hoch wie bei Männern. Dass diese Hormonunterschiede und deren geschlechtsspezifische Wirkung auf die Regulation der miRNAs zu weiterführenden Geschlechterunterschieden bei Krankheiten führen, ist sehr wahrscheinlich.

Die geschlechtsspezifische Inhibition von miRNA-21 durch E2 und P4 wurde in dieser Arbeit speziell näher untersucht, weil es sich um eine der bei MH am stärksten untersuchten miRNAs handelt. Ihr wird eine Fibrose-verursachende Rolle zugesprochen und sie zählt zu den miRNAs von therapeutischem Interesse für Behandlungen von Herzkrankheiten^{171 213}. Dabei wird die pharmakologische Inhibierung von miR-21 zur Behandlung von MH und Fibrose in Betracht gezogen. Zwei Studien konnten bereits einen heilsamen Effekt von miR-21-Inhibitor-Therapien auf Herzfunktion und Fibroseentwicklung bei LVH im Tiermodell nachweisen^{97 102}; bei einer dritten Studie blieb ein positiver Effekt aus¹⁰⁰. Die Tatsache, dass geringere endogene Level von miR-21 im Herzen bei den weiblichen Tieren in dieser Arbeit nachgewiesen wurden und somit mit der positiven Prävalenz der weiblichen Tiere bei MH und Fibrose korrelieren, spricht für den klinischen Vorteil niedriger miR-21-Werte im Herzen. MiRNA-21 steht nicht nur für therapeutische Funktionen zur Diskussion, sondern ist auch als möglicher diagnostischer Biomarker bei kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes und Krebs im Gespräch^{178 199 214-216}. Es wurde auch bereits ein Patent für miR-21 in Herzkrankheiten angemeldet¹⁷³. Die in dieser Arbeit beschriebene geschlechtsspezifische, regulierende Wirkung der weiblichen Hormone auf miR-21 lässt jedoch vermuten, dass diese Regulation (besonders bei premenopausalen Frauen) zu stark schwankenden Werten führt und somit für die Nutzung als Biomarker keine optimalen Voraussetzungen gegeben sind.

Die Identifizierung der Regulation des Progesteronrezeptors durch miR-26a im Herzen und der dadurch resultierende Schutz vor Apoptose eröffnet neue Therapieansätze. Infusionen mit miR-26a-Inhibitoren und P4 im Akutfall bei Herzinfarkten zur Verringerung der Infarktgröße wären denkbar. Myozytensterben ist ebenfalls ein ausschlaggebender Faktor beim Übergang von der kompensatorischen MH zum Endstadium der Herzinsuffizienz¹². Neue anti-apoptotische Therapien werden gesucht, um diesem Wechsel vorzubeugen¹². Mit miR-26a wurde in dieser Arbeit ein mögliches neues Zielmolekül identifiziert. Darüber hinaus unterstreichen die erzielten Ergebnisse den Bedarf verstärkter Erforschung der Rolle von P4 und seiner Rezeptoren bei Herzkrankheiten. Bei Hormonersatztherapien wurden bis jetzt größtenteils synthetisierte Progesterone, sogenannte Progestine, eingesetzt. Mehrere Studien deuten daraufhin, dass unterschiedliche Effekte durch synthetische Progestine und natürlichem Progesteron (P4) hervorgerufen werden können, u. a. bei Bluthochdruck⁴⁹ und bei der Entwicklung von Thrombosen bei HRTs^{48 50}. Auch die identifizierte, stärkere Wirkung von P4 im Ver-

gleich zu E2 auf miRNAs im gesamten LV macht eine stärkere Fokussierung auf die Rolle von P4 im Herzen in Zukunft erforderlich.

6 Literaturverzeichnis

1. Keren A, Syrris P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008;5(3):158-68.
2. Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(4):655-70.
3. Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 2000;101(3):336-44.
4. Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 2008;358(13):1370-80.
5. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 2000;102(4):470-9.
6. Dorn GW, 2nd, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 2003;92(11):1171-5.
7. Dorn GW, 2nd. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2007;49(5):962-70.
8. Chung E, Heimiller J, Leinwand LA. Distinct cardiac transcriptional profiles defining pregnancy and exercise. *PLoS One* 2012;7(7):e42297.
9. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 2010;128(1):191-227.
10. Haunstetter A, Izumo S. Toward antiapoptosis as a new treatment modality. *Circ Res* 2000;86(4):371-6.
11. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Balkus SA, Kannel WB, Castelli WP. Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study. *Am J Cardiol* 1987;60(7):560-5.
12. Diwan A, Dorn GW, 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:56-64.
13. Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(1):133-40.
14. Peterson MB, Lesch M. Protein synthesis and amino acid transport in the isolated rabbit right ventricular papillary muscle. Effect of isometric tension development. *Circ Res* 1972;31(3):317-27.
15. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 1992;54:227-41.
16. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, et al. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1996;271(6):3221-8.
17. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003;65:45-79.
18. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1992;19(7):1550-8.
19. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975;56(1):56-64.
20. Du XJ, Fang L, Kiriazis H. Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 2006;111(2):434-75.
21. Barrett-Connor E, Ferrara A. Isolated postchallenge hyperglycemia and the risk of fatal cardiovascular disease in older women and men. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1998;21(8):1236-9.
22. Lowel H, Meisinger C, Heier M, Hormann A, Kuch B, Gostomzyk J, et al. [Sex specific trends of sudden cardiac death and acute myocardial infarction: results of the population-based KORA/MONICA-Augsburg register 1985 to 1998]. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127(44):2311-6.
23. Hayes SN, Taler SJ. Hypertension in women: current understanding of gender differences. *Mayo Clin Proc* 1998;73(2):157-65.
24. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *Jama* 1996;275(20):1557-62.

25. Albert CM, McGovern BA, Newell JB, Ruskin JN. Sex differences in cardiac arrest survivors. *Circulation* 1996;93(6):1170-6.
26. Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, et al. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res* 1999;85(9):856-66.
27. Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, Ward DM, Lang RM, McGaughey D, et al. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation* 1992;86(4):1099-107.
28. Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, et al. The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J* 2003;24(5):442-63.
29. Weinberg EO, Thienelt CD, Katz SE, Bartunek J, Tajima M, Rohrbach S, et al. Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(1):264-73.
30. Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, Chen MH, Bishop SP, Lorell BH. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(4):1118-25.
31. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Demianenko T, Mao L, et al. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(2):H469-76.
32. Witt H, Schubert C, Jaekel J, Fliegner D, Penkalla A, Tiemann K, et al. Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med (Berl)* 2008;86(9):1013-24.
33. Aurigemma GP, Gaasch WH. Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle. *Cardiology* 1995;86(4):310-7.
34. Petrov G, Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Krabatsch T, Dunkel A, Dandel M, et al. Regression of myocardial hypertrophy after aortic valve replacement: faster in women? *Circulation* 2010;122(11 Suppl):S23-8.
35. Patten RD, Karas RH. Estrogen replacement and cardiomyocyte protection. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16(3):69-75.
36. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995;26(4):1068-79.
37. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E, et al. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298(6):R1597-606.
38. Garavaglia GE, Messerli FH, Schmieder RE, Nunez BD, Oren S. Sex differences in cardiac adaptation to essential hypertension. *Eur Heart J* 1989;10(12):1110-4.
39. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340(23):1801-11.
40. Luczak ED, Leinwand LA. Sex-based cardiac physiology. *Annu Rev Physiol* 2009;71:1-18.
41. van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2001;104(12):1419-23.
42. Malhotra A, Buttrick P, Scheuer J. Effects of sex hormones on development of physiological and pathological cardiac hypertrophy in male and female rats. *Am J Physiol* 1990;259(3 Pt 2):H866-71.
43. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998;280(7):605-13.
44. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288(3):321-33.
45. Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2003;349(6):523-34.
46. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002;288(1):49-57.
47. Grady D, Yaffe K, Kristof M, Lin F, Richards C, Barrett-Connor E. Effect of postmenopausal hormone therapy on cognitive function: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Am J Med* 2002;113(7):543-8.

-
48. Simon JA. What's new in hormone replacement therapy: focus on transdermal estradiol and micronized progesterone. *Climacteric* 2012;15 Suppl 1:3-10.
 49. Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK. Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res* 2002;53(3):688-708.
 50. Canonico M, Oger E, Plu-Bureau G, Conard J, Meyer G, Levesque H, et al. Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study. *Circulation* 2007;115(7):840-5.
 51. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005;308(5728):1583-7.
 52. Aleman LM, Doench J, Sharp PA. Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *Rna* 2007;13(3):385-95.
 53. Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, et al. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 2007;21(20):2558-70.
 54. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008;132(1):9-14.
 55. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23(20):4051-60.
 56. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004;18(24):3016-27.
 57. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17(24):3011-6.
 58. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409(6818):363-6.
 59. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005;436(7051):740-4.
 60. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 2005;7(7):719-23.
 61. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):522-31.
 62. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 2005;280(10):9330-5.
 63. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003;35(3):215-7.
 64. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(23):8721-6.
 65. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006;38(2):228-33.
 66. Niu Z, Li A, Zhang SX, Schwartz RJ. Serum response factor micromanaging cardiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19(6):618-27.
 67. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005;436(7048):214-20.
 68. Bauersachs J, Thum T. Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs. *Circ Res* 2011;109(3):334-47.
 69. Zhang X, Azhar G, Helms SA, Wei JY. Regulation of cardiac microRNAs by serum response factor. *J Biomed Sci*;18:15.
 70. Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* 2008;79(4):562-70.
 71. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433(7027):769-73.
 72. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438(7068):685-9.
-

-
73. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007;27(1):91-105.
 74. Saetrom P, Heale BS, Snove O, Jr., Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res* 2007;35(7):2333-42.
 75. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120(1):15-20.
 76. Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 2005;310(5755):1817-21.
 77. Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 2005;123(6):1133-46.
 78. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005;3(3):e85.
 79. Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008;455(7209):58-63.
 80. Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13(9):849-51.
 81. Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 2009;15(1):21-32.
 82. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(23):9667-72.
 83. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007;129(2):303-17.
 84. da Costa Martins PA, Bourajjaj M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, et al. Conditional Dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* 2008;118(15):1567-76.
 85. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, et al. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2009;105(6):585-94.
 86. Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(6):2111-6.
 87. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002;12(9):735-9.
 88. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007;100(3):416-24.
 89. Luo X LH, Pan Z, Xiao J, Zhang Y, Lu Y, Yang B, Wang Z. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem*. 2008:20045-52
 90. Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007;13(5):613-8.
 91. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;316(5824):575-9.
 92. Wang Z, Luo X, Lu Y, Yang B. miRNAs at the heart of the matter. *J Mol Med (Berl)* 2008;86(7):771-83.
 93. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(48):18255-60.
 94. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;116(3):258-67.
 95. Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42(6):1137-41.
 96. Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol* 2007;170(6):1831-40.
-

-
97. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;456(7224):980-4.
 98. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 2007;31(3):367-73.
 99. Matkovich SJ, Wang W, Tu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Condorelli G, et al. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. *Circ Res* 2010;106(1):166-75.
 100. Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, Obad S, Kauppinen S, Hill JA, et al. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest* 2010;120(11):3912-6.
 101. Thum T, Chau N, Bhat B, Gupta SK, Linsley PS, Bauersachs J, et al. Comparison of different miR-21 inhibitor chemistries in a cardiac disease model. *J Clin Invest* 2011;121(2):461-2; author reply 62-3.
 102. Adam O, Lohfelme B, Thum T, Gupta SK, Puhl SL, Schafers HJ, et al. Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Res Cardiol* 2012;107(5):278.
 103. Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A, Liu G. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;301(4):F793-801.
 104. Zhong X, Chung AC, Chen HY, Meng XM, Lan HY. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(9):1668-81.
 105. Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, Linn G, et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med* 2012;4(121):121ra18.
 106. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 2010;207(8):1589-97.
 107. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, et al. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res* 2010;87(3):431-9.
 108. Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009;37(8):2584-95.
 109. Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, Chegini N. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod* 2007;13(11):797-806.
 110. Wong CF, Tellam RL. MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. *J Biol Chem* 2008;283(15):9836-43.
 111. Zhang B, Liu XX, He JR, Zhou CX, Guo M, He M, et al. Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer. *Carcinogenesis* 2011;32(1):2-9.
 112. Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Chun HJ, Azuma J, Maegdefessel L, et al. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J Cell Physiol*;226(4):1035-43.
 113. Suh JH, Choi E, Cha MJ, Song BW, Ham O, Lee SY, et al. Up-regulation of miR-26a promotes apoptosis of hypoxic rat neonatal cardiomyocytes by repressing GSK-3beta protein expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;423(2):404-10.
 114. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(35):13027-32.
 115. Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF-beta1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2012;23(2):252-65.
 116. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 2012;44(4):237-44.
 117. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 2009;113(25):6411-8.
 118. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanasi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(40):15805-10.
-

-
119. Metivier R, Stark A, Flouriot G, Hubner MR, Brand H, Penot G, et al. A dynamic structural model for estrogen receptor-alpha activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol Cell* 2002;10(5):1019-32.
 120. Klinge CM. Estrogen Regulation of MicroRNA Expression. *Curr Genomics* 2009;10(3):169-83.
 121. Tamrazi A, Carlson KE, Daniels JR, Hurth KM, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. *Mol Endocrinol* 2002;16(12):2706-19.
 122. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 2000;65(5):227-51.
 123. Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2007;274(1-2):1-7.
 124. Mifsud W, Bateman A. Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol* 2002;3(12):RESEARCH0068.
 125. Kuiper GG, Gustafsson JA. The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 1997;410(1):87-90.
 126. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 1997;11(10):1486-96.
 127. Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, et al. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 2003;17(2):203-8.
 128. Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Strom A, Gustafsson JA. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 2008;27(7):1019-32.
 129. Gurgen D, Hegner B, Kusch A, Catar R, Chaykovska L, Hoff U, et al. Estrogen receptor-beta signals left ventricular hypertrophy sex differences in normotensive deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Hypertension* 2011;57(3):648-54.
 130. Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol* 2010;24(11):2152-65.
 131. Thompson LP, Pinkas G, Weiner CP. Chronic 17beta-estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation* 2000;102(4):445-51.
 132. Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 1997;95(7):1768-72.
 133. Guetta V, Cannon RO, 3rd. Cardiovascular effects of estrogen and lipid-lowering therapies in postmenopausal women. *Circulation* 1996;93(10):1928-37.
 134. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990;9(5):1603-14.
 135. Samalecos A, Gellersen B. Systematic expression analysis and antibody screening do not support the existence of naturally occurring progesterone receptor (PR)-C, PR-M, or other truncated PR isoforms. *Endocrinology* 2008;149(11):5872-87.
 136. Scarpin KM, Graham JD, Mote PA, Clarke CL. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal* 2009;7:e009.
 137. Jacobsen BM, Richer JK, Schittone SA, Horwitz KB. New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *J Biol Chem* 2002;277(31):27793-800.
 138. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277(7):5209-18.
 139. Giangrande PH, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 1999;54:291-313; discussion 13-4.
 140. Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 1997;272(52):32889-900.
-

-
141. Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, Mesiano S. Progesterone receptor- α and - β have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*;97(5):E719-30.
 142. Lin AL, McGill HC, Jr., Shain SA. Hormone receptors of the baboon cardiovascular system. Biochemical characterization of aortic and myocardial cytoplasmic progesterone receptors. *Circ Res* 1982;50(5):610-6.
 143. Ingegno MD, Money SR, Thelmo W, Greene GL, Davidian M, Jaffe BM, et al. Progesterone receptors in the human heart and great vessels. *Lab Invest* 1988;59(3):353-6.
 144. Kuebler JF, Jarrar D, Bland KI, Rue L, 3rd, Wang P, Chaudry IH. Progesterone administration after trauma and hemorrhagic shock improves cardiovascular responses. *Crit Care Med* 2003;31(6):1786-93.
 145. Roesch DM, Keller-Wood M. Progesterone rapidly reduces arterial pressure in ewes. *Am J Physiol* 1997;272(1 Pt 2):H386-91.
 146. Pecins-Thompson M, Keller-Wood M. Effects of progesterone on blood pressure, plasma volume, and responses to hypotension. *Am J Physiol* 1997;272(1 Pt 2):R377-85.
 147. Minshall RD, Pavcnik D, Browne DL, Hermsmeyer K. Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. *J Appl Physiol* 2002;92(2):701-8.
 148. Goldstein J, Sites CK, Toth MJ. Progesterone stimulates cardiac muscle protein synthesis via receptor-dependent pathway. *Fertil Steril* 2004;82(2):430-6.
 149. Morrissy S, Xu B, Aguilar D, Zhang J, Chen QM. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. *Aging Cell* 2010;9(5):799-809.
 150. Bhat-Nakshatri P, Wang G, Collins NR, Thomson MJ, Geistlinger TR, Carroll JS, et al. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009;37(14):4850-61.
 151. Nothnick WB. The role of micro-RNAs in the female reproductive tract. *Reproduction* 2012;143(5):559-76.
 152. Adams BD, Cowee DM, White BA. The role of miR-206 in the epidermal growth factor (EGF) induced repression of estrogen receptor- α (ER α) signaling and a luminal phenotype in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2009;23(8):1215-30.
 153. Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M, et al. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol Cell* 2009;36(2):340-7.
 154. Maillot G, Lacroix-Triki M, Pierredon S, Gratadou L, Schmidt S, Benes V, et al. Widespread estrogen-dependent repression of microRNAs involved in breast tumor cell growth. *Cancer Res* 2009;69(21):8332-40.
 155. Yu X, Zhang X, Dhakal IB, Beggs M, Kadlubar S, Luo D. Induction of cell proliferation and survival genes by estradiol-repressed microRNAs in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012;12:29.
 156. Pan Q, Luo X, Chegini N. Differential expression of microRNAs in myometrium and leiomyomas and regulation by ovarian steroids. *J Cell Mol Med* 2008;12(1):227-40.
 157. Toloubeydokhti T, Pan Q, Luo X, Bukulmez O, Chegini N. The expression and ovarian steroid regulation of endometrial micro-RNAs. *Reprod Sci* 2008;15(10):993-1001.
 158. Cochrane DR, Jacobsen BM, Connaghan KD, Howe EN, Bain DL, Richer JK. Progestin regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2012;355(1):15-24.
 159. Klinge CM. miRNAs and estrogen action. *Trends Endocrinol Metab* 2012.
 160. Cohen A, Shmoish M, Levi L, Cheruti U, Levavi-Sivan B, Lubzens E. Alterations in micro-ribonucleic acid expression profiles reveal a novel pathway for estrogen regulation. *Endocrinology* 2008;149(4):1687-96.
 161. Kovalchuk O, Tryndyak VP, Montgomery B, Boyko A, Kutanzi K, Zemp F, et al. Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications and aberrant microRNA expression. *Cell Cycle* 2007;6(16):2010-8.
 162. Dai R, Phillips RA, Zhang Y, Khan D, Crasta O, Ahmed SA. Suppression of LPS-induced IFN γ and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated miRNA: A novel mechanism of immune modulation. *Blood* 2008.
 163. Zhang Y, Wu L, Wang Y, Zhang M, Li L, Zhu D, et al. Protective role of estrogen-induced miRNA-29 expression in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *J Biol Chem* 2012;287(18):14851-62.
-

164. Cochrane DR, Spoelstra NS, Richer JK. The role of miRNAs in progesterone action. *Mol Cell Endocrinol* 2011.
165. Younger ST, Corey DR. Transcriptional regulation by miRNA mimics that target sequences downstream of gene termini. *Mol Biosyst* 2011;7(8):2383-8.
166. Cui W, Li Q, Feng L, Ding W. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Mol Cell Biochem* 2011;355(1-2):17-25.
167. Younger ST, Corey DR. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res* 2011;39(13):5682-91.
168. Tili E, Michaille JJ, Gandhi V, Plunkett W, Sampath D, Calin GA. miRNAs and their potential for use against cancer and other diseases. *Future Oncol* 2007;3(5):521-37.
169. Stenvang J, Lindow M, Kauppinen S. Targeting of microRNAs for therapeutics. *Biochem Soc Trans* 2008;36(Pt 6):1197-200.
170. Stenvang J, Silahatoglu AN, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S. The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Semin Cancer Biol* 2008;18(2):89-102.
171. Thum T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Mol Med* 2012;4(1):3-14.
172. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010;327(5962):198-201.
173. Thum T, Bauersachs J. 2008.
174. Kartha RV, Subramanian S. MicroRNAs in cardiovascular diseases: biology and potential clinical applications. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;3(3):256-70.
175. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):73-7.
176. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51(5):872-5.
177. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009;55(11):1944-9.
178. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010;107(5):677-84.
179. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):2979-84.
180. Regitz-Zagrosek V. Sex and gender differences in health. Science & Society Series on Sex and Science. *EMBO Rep* 2012;13(7):596-603.
181. Kamburov A, Wierling C, Lehrach H, Herwig R. ConsensusPathDB--a database for integrating human functional interaction networks. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Database issue):D623-8.
182. Kamburov A, Pentchev K, Galicka H, Wierling C, Lehrach H, Herwig R. ConsensusPathDB: toward a more complete picture of cell biology. *Nucleic Acids Res*;39(Database issue):D712-7.
183. Kararigas G, Becher E, Mahmoodzadeh S, Knosalla C, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific modification of progesterone receptor expression by 17beta-oestradiol in human cardiac tissues. *Biol Sex Differ* 2010;1(1):2.
184. Morrissey EE. The magic and mystery of miR-21. *J Clin Invest* 2010;120(11):3817-9.
185. Kararigas G, Bito V, Tinel H, Becher E, Baczko I, Knosalla C, et al. Transcriptome characterization of estrogen-treated human myocardium identifies Myosin regulatory light chain interacting protein as a sex-specific element influencing contractile function. *J Am Coll Cardiol* 2012;59(4):410-7.
186. Patten RD, Hall-Porter MR. Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ Heart Fail* 2009;2(2):138-44.
187. Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 2010;121(8):1022-32.
188. Callis TE, Wang DZ. Taking microRNAs to heart. *Trends Mol Med* 2008;14(6):254-60.
189. van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet* 2008;24(4):159-66.
190. van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res* 2011;108(2):219-34.

-
191. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res* 2011;39(13):5692-703.
 192. Bail S, Swerdel M, Liu H, Jiao X, Goff LA, Hart RP, et al. Differential regulation of microRNA stability. *RNA* 2010;16(5):1032-9.
 193. Gresack JE, Frick KM. Effects of continuous and intermittent estrogen treatments on memory in aging female mice. *Brain Res* 2006;1115(1):135-47.
 194. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005;96(11):1208-16.
 195. Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K, et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol* 2008;378(3):492-504.
 196. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997;277(5331):1508-10.
 197. Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J, Kretzschmar AK, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 2007;110(4):1330-3.
 198. Du J, Yang S, An D, Hu F, Yuan W, Zhai C, et al. BMP-6 inhibits microRNA-21 expression in breast cancer through repressing deltaEF1 and AP-1. *Cell Res* 2009;19(4):487-96.
 199. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol* 2011;8(5).
 200. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008;454(7200):56-61.
 201. Chakhtoura N, Zhang Y, Candiotti K, Medina CA, Takacs P. Estrogen inhibits vaginal tropoelastin and TGF-beta1 production. *Int Urogynecol J* 2012.
 202. Telleria CM, Ou J, Sugino N, Ferguson S, Gibori G. The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid. *Endocrinology* 1998;139(8):3597-605.
 203. Canellada A, Alvarez I, Berod L, Gentile T. Estrogen and progesterone regulate the IL-6 signal transduction pathway in antibody secreting cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;111(3-5):255-61.
 204. Ong DB, Colley SM, Norman MR, Kitazawa S, Tobias JH. Transcriptional regulation of a BMP-6 promoter by estrogen receptor alpha. *J Bone Miner Res* 2004;19(3):447-54.
 205. Bauersachs J. miR-21: a central regulator of fibrosis not only in the broken heart. *Cardiovasc Res* 2012.
 206. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem* 2010;285(26):20281-90.
 207. Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H(2)O(2)-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47(1):5-14.
 208. Haider KH, Idris NM, Kim HW, Ahmed RP, Shujia J, Ashraf M. MicroRNA-21 is a key determinant in IL-11/Stat3 anti-apoptotic signalling pathway in preconditioning of skeletal myoblasts. *Cardiovasc Res* 2010;88(1):168-78.
 209. Nardulli AM, Greene GL, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology* 1988;122(3):935-44.
 210. Lee YJ, Gorski J. Estrogen-induced transcription of the progesterone receptor gene does not parallel estrogen receptor occupancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(26):15180-4.
 211. Koturbash I, Zemp F, Kolb B, Kovalchuk O. Sex-specific radiation-induced microRNAome responses in the hippocampus, cerebellum and frontal cortex in a mouse model. *Mutat Res* 2011;722(2):114-8.
 212. Cheung L, Gustavsson C, Norstedt G, Tollet-Egnell P. Sex-different and growth hormone-regulated expression of microRNA in rat liver. *BMC Mol Biol* 2009;10:13.
 213. Fiedler J, Gupta SK, Thum T. MicroRNA-based therapeutic approaches in the cardiovascular system. *Cardiovasc Ther* 2012;30(1):e9-e15.
-

214. Stammet P, Goretti E, Vausort M, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y. Circulating microRNAs after cardiac arrest. *Crit Care Med* 2012.
215. Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res* 2012;93(4):555-62.
216. Villar AV, Garcia R, Merino D, Llano M, Cobo M, Montalvo C, et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. *Int J Cardiol* 2012.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>MiRNA-Synthese und translationelle Inhibition durch miRNAs.</i>	4
Abbildung 2: <i>Reverse Transkription von miRNAs in cDNA mit miScript I RT Kit (Qiagen)</i>	32
Abbildung 3: <i>Darstellung verschiedener Parameter zur Messung der LVH zwei Wochen nach TAC-Operation.</i>	44
Abbildung 4: <i>MiRNA-Expression in Kardiomyozyten nach E2-Behandlung.</i>	55
Abbildung 5: <i>Zellspezifische Regulation von miRNAs durch E2 im Herzen von weiblichen Mäusen.</i> ..	58
Abbildung 6: <i>Expression von miRNA-21 im LV nach induzierter Aortenstenose.</i>	59
Abbildung 7: <i>Die Expression von miR-21 im LV steigt nach Ovariectomie.</i>	60
Abbildung 8: <i>Geschlechtsspezifische Expression von miR-21 im LV nach E2- und P4-Behandlung in vivo.</i>	61
Abbildung 9: <i>Geschlechtsspezifische Inhibition von miR-21 in isolierten Kardiomyozyten nach E2-Behandlung in vivo.</i>	62
Abbildung 10: <i>Synergistische Inhibition der Et-1-induzierten Heraufregulation von miR-21 durch E2 und P4.</i>	63
Abbildung 11: <i>mRNA-Expression von Zielgenen von miR-21 im LV bei kardialer Hypertrophie.</i>	64
Abbildung 12: <i>Regulation von miR-26a und miR-30a im LV nach Aortenstenose.</i>	66
Abbildung 13: <i>Inhibition der Renillaexpression durch Klonierung der PR-3'UTR.</i>	67
Abbildung 14: <i>Inhibition von miR-26a führt zur verstärkten Expression des Progesteronrezeptors (PR).</i>	68
Abbildung 15: <i>Der Progesteronrezeptor wird im frühen Stadium von LVH verstärkt exprimiert.</i>	69
Abbildung 16: <i>Inhibition von miR-26a und Stimulation mit P4 schützt Zellen vor CoCl₂-induzierter Apoptose.</i>	71
Abbildung 17: <i>Einfluss von E2- oder P4-Behandlung auf die Expression von miR-26a im Herzen.</i> ...	73
Abbildung 18: <i>Regulation von miR-29b zwei Wochen nach Aortenstenose.</i>	74
Abbildung 19: <i>Einfluss von E2- oder P4-Behandlung auf die Expression von miR-29b im Herzen.</i> ...	75
Abbildung 20: <i>Schematische Darstellung möglicher Regulationen von PR via miR-26a im Herzen vermittelt durch P4, E2 oder hypertrophen Stress.</i>	86

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Publierte Regulation von miRNAs durch E2 oder MPA</i>	12
<i>Tabelle 2: PCR Programm</i>	28
<i>Tabelle 3: Programm qRT-PCR-Maschine</i>	33
<i>Tabelle 4: Zusammensetzung der Trenngele (SDS-PAGE)</i>	35
<i>Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels (SDS-PAGE)</i>	36
<i>Tabelle 6: 81 im LV der Maus detektierte miRNAs</i>	45
<i>Tabelle 7: Die im LV am stärksten exprimierten miRNAs</i>	45
<i>Tabelle 8: Regulierte miRNAs nach Aortenstenose (TAC)</i>	46
<i>Tabelle 9: Überrepräsentierte Signalwege von Zielgenen LVH-regulierter miRNAs</i>	49
<i>Tabelle 10: Zielgene von LVH-regulierten miRNAs in herz-assoziierten Signalwegen</i>	50
<i>Tabelle 11: Regulierte miRNAs nach Aortenstenose (TAC)</i>	51
<i>Tabelle 12: Regulation von miRNAs im LV nach TAC-Operation gemessen mittels Microarray und qRT-PCR</i>	52
<i>Tabelle 13: miRNA-Expression in isolierten Kardiomyozyten nach E2- oder Dextrinbehandlung in vivo</i>	54
<i>Tabelle 14: miRNA-Expression im gesamten LV nach E2-, P4- oder Dextrinbehandlung in vivo</i>	57
<i>Tabelle 15: Korrelation der Expression von miR-21 zur mRNA-Expression der Zielgene</i>	65

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Bei Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek bedanke ich mich für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe über dieses spannende und hochaktuelle Thema promovieren zu dürfen und mich somit wissenschaftlich weiterentwickeln zu können. Ich danke ihr für alle konstruktiven Kritiken sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinem Betreuer Dr. Hugo Sanchez Ruderisch für das in mich gesetzte Vertrauen, für die stete Unterstützung, für sein umfassendes Wissen bei praktischen und theoretischen Fragen und für zahlreiche Diskussionen danken. Ohne ihn wäre die Arbeit in dieser Form und diesem Umfang nicht möglich gewesen.

Vielen Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für das Stipendium sowie für alle über das Graduiertenkolleg vermittelten Weiterbildungen. Ein sehr herzlicher Dank gebührt weiterhin Prof. Dr. Lehrach und Dr. Alexander Kühn für die ermöglichte Kollaborationsarbeit mit dem MPIMG. Außerdem danke ich Prof. Dr. Schmülling und Prof. Dr. Schuster für die Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten.

Bei Ana Queirós, meiner Mitstreiterin an der „miRNA-Front“, möchte ich mich für die gemeinsame Zeit und alle gemeinsam erreichten Ziele bedanken.

Allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG danke ich vielmals für die Zusammenarbeit im Labor, für jegliche Hilfe bei praktischen Problemen und für fachliche Diskussionen. Besonders hervorheben möchte ich hierbei einige Personen, deren Vor- bzw. Mitarbeit für diese Arbeit grundlegend war: ich danke Daniela Fliegner für alle durchgeführten TAC-Operationen, Christina Westphal für die TAC-Operationen, für echokardiographische Messungen und für die Bereitstellung von RNA-Proben ovariectomierter Tiere, Sylke Niehage für die Echokardiographien, Georgios Kararigas für die Bereitstellung von RNA-Proben der Kardiomyozyten sowie für die Hilfe bei statistischen Fragen und Vanessa Riese für die Hilfe bei den Hormonbehandlungen.

Bei Mareike Weimann möchte ich mich für alle hilfreichen Gespräche und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken. Zudem danke ich meinen Geschwistern und Freunden, die in den letzten Jahren immer wieder ein offenes Ohr hatten und motivierende Worte fanden.

Ein ganz besonderer Dank gilt zu guter Letzt meinen Eltern, die durch jegliche Form der Unterstützung und durch ihre liebevolle Art großen Anteil an der Vollendung dieser Arbeit haben.

Publikationen

Ana Queiros*, **Claudia Eschen***, Daniela Fliegner, Georgios Kararigas, Elke Dworatzek, Christina Westphal, Hugo Sanchez Ruderisch, Vera Regitz-Zagrosek

Sex- and oestrogen-dependent regulation of miRNAs targeting fibrosis-related genes.

(Manuskript in Arbeit)

Claudia Eschen*, Ana Queiros*, Daniela Fliegner, Georgios Kararigas, Christina Westphal, Hugo Sanchez Ruderisch, Vera Regitz-Zagrosek

Sex specific regulation of miRNAs in the left ventricle of mice after hormonal treatment with estradiol and progesterone

(Manuskript in Arbeit)

Kongressbeiträge:

Claudia Eschen, Hugo Sanchez Ruderisch, Daniela Fliegner, Christina Westphal, Vera Regitz-Zagrosek

Geschlechtsspezifische Expression von microRNAs im murinen linken Ventrikel und ihre Rolle in der Entwicklung kardialer Hypertrophie.

Vortrag, 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, April 2010, Mannheim.

Claudia Eschen, Hugo Sanchez Ruderisch, Daniela Fliegner, Christina Westphal, Vera Regitz-Zagrosek

Sex specific differences in the expression of miRNAs and their role in the evolution of myocardial hypertrophy.

Posterpräsentation, 4th Congress, International Society of Gender Medicine (IGM), Sex and Gender in Medicine, November 2009, Berlin.

Claudia Eschen, Hugo Sanchez Ruderisch, Daniela Fliegner, Christina Westphal, Vera Regitz-Zagrosek

Sex specific differences in the expression of miRNAs in the left ventricle of mice and their role in the evolution of myocardial hypertrophy.

Posterpräsentation, 4th EUGeneHeart General Assembly Meeting, November 2009, Utrecht.

Claudia Eschen, Hugo Sanchez Ruderisch, Daniela Fliegner, Christina Westphal, Vera Regitz-Zagrosek

Sex specific differences in the expression of miRNAs in the left ventricle of mice and their role in the evolution of myocardial hypertrophy.

Posterpräsentation, Day of Science, Dezember 2008, Berlin.

Teilnahme, Symposium Gender and Myocardial Hypertrophy, November 2010, Berlin.

Teilnahme, RNAi World Congress, Mai 2009, Boston.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Claudia Eschen, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

07. Oktober 2012

Claudia Eschen