



Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt

Untersuchungen zur Funktion der MicroRNAs miR-199a/b-3p und miR-223 im kardiovaskulären System

Simon Johannes Leierseder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael W. Pfaffl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Bernhard Küster
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt

Die Dissertation wurde am 18. Februar 2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27. Mai 2014 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

3' UTR	3' untranslatierte Region
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
<i>Actb</i>	β-Aktin
ADP	Adenosindiphosphat
AMCF	adulte kardiale Mausfibroblasten (engl. <i>adult mouse cardiac fibroblasts</i>)
AMCM	adulte Mauskardiomyozyten (engl. <i>adult mouse cardiac myocytes</i>)
APC	Allophycocyanin
ARCF	adulte kardiale Rattenfibroblasten (engl. <i>adult rat cardiac fibroblasts</i>)
ARCM	adulte Rattenkardiomyozyten (engl. <i>adult rat cardiac myocytes</i>)
AUC	engl. <i>area under the curve</i>
BFU-MK	engl. <i>burst-forming unit megakaryocyte</i>
bp	Basenpaare
BS	vorhergesagte MicroRNA-Bindestelle
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CF	engl. <i>cardiac fibroblast</i>
CFU-MK	engl. <i>colony-forming unit megakaryocyte</i>
ctrl	Kontrolle (engl. <i>control</i>)
d	Tage (engl. <i>days</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
<i>Dnm3os</i>	engl. <i>dynamin 3 opposite strand</i>
dNTP	Desoxyribonukleotide
ECM	Extrazellulärmatrix
eGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>
engl.	englisch
FASP	engl. <i>filter-aided sample preparation</i>
FASP	engl. <i>filter-aided sample preparation</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FS	engl. <i>fractional shortening</i>
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HCD	engl. <i>higher energy collisional dissociation</i>
HCD	engl. <i>higher energy collisional dissociation</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
HW	Herzgewicht

kDa	Kilodalton
KO	miR-223-defizient (engl. <i>knockout</i>)
LAD	linke absteigende Koronararterie (engl. <i>left anterior descending coronary artery</i>)
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (engl. <i>liquid chromatography - tandem mass spectrometry</i>)
LV	linker Herzventrikel
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer (engl. <i>megakaryocyte-erythroid progenitor</i>)
min	Minuten
miR-199-3p	miR-199a-3p/miR-199b-3p (identische Basensequenz)
MK	Megakaryozyt
mm-Antagomir	Kontroll-Antagomir (engl. <i>mismatch</i>)
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
<i>Myh6</i>	engl. <i>α-myosin heavy chain</i>
<i>Nppa</i>	Natriuretisches Peptid A
<i>Nppb</i>	Natriuretisches Peptid B
NRCF	Neonatale kardiale Rattenfibroblasten (engl. <i>neonatal rat cardiac fibroblasts</i>)
NRCM	Neonatale Rattenkardiomyozyten (engl. <i>neonatal rat cardiac myocytes</i>)
P/S	Penicillin/Streptomycin
<i>P2ry12</i>	P2Y ₁₂ ADP Rezeptor
<i>P4hb</i>	Gensymbol: Prolyl-4-hydroxylase β
PBS	Phosphate-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phenylephrin
PhE	Phycoerythrin
Pre-miRNA	Vorläufer-MicroRNA (engl. <i>precursor microRNA</i>)
Pri-miRNA	primäres MicroRNA-Transkripte (engl. <i>primary microRNA transcript</i>)
PRP	Plättchenreiches Plasma
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie (engl. <i>Percutaneous transluminal coronary angioplasty</i>)
<i>Purb</i>	engl. <i>purine-rich element binding protein B</i>
qPCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
<i>Rhob</i>	engl. <i>ras homolog family member B</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rotations per minute</i>)
RT	Zimmertemperatur (engl. <i>room temperature</i>)
SAX	engl. <i>strong anion exchange chromatography</i>
SDF-1	engl. <i>stromal-derived factor 1</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamid-Gradientengel Elektrophorese
sek	Sekunden
SEM	engl. <i>standard error of mean</i>
SILAC	engl. <i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>

siRNA	engl. <i>short interfering RNA</i>
SV40 polyA	Simian virus 40 Polyadenylierungsstelle
TAC	Transversale Aortenkonstriktion (engl. <i>transverse aortic constriction</i>)
TL	Tibiallänge
TPO	Thrombopoietin
vs.	versus
WT	Wildtyp
<i>Ywhae</i>	engl. <i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide</i>
z.B.	zum Beispiel
α -SMA	engl. <i>α-smooth muscle actin</i>

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Kontrolle der Genexpression durch MicroRNAs	1
1.2	Die Bedeutung von MicroRNAs im kardiovaskulären System	4
1.3	Die therapeutische Anwendung von MicroRNAs	13
1.4	Ziele der Arbeit	14
2	MATERIALIEN	15
2.1	Antikörper	15
2.2	Oligonukleotide	16
2.3	Chemikalien	18
2.4	Enzyme	20
2.5	Kits	21
2.6	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	21
3	METHODEN	29
3.1	Allgemeine Kultivierung und Passagierung von Zellen	29
3.2	Experimente mit kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten	29
3.3	Untersuchungen an isolierten Megakaryozyten	34
3.4	Untersuchungen an isolierten Blutplättchen	35
3.5	Methoden zur DNA- und RNA-Analyse	37
3.6	<i>Western Blot</i>	45
3.7	Mikroskopische Untersuchung von Zellen und Gewebeschnitten	47
3.8	SILAC-basierte Proteomanalyse	50
3.9	Tierexperimente	52
3.10	Statistische Auswertung	55
4	ERGEBNISSE	56
4.1	Die Identifikation von zelltypspezifischen MicroRNAs im Herz	56
4.2	Der Einfluss von miR-199-3p auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten	61
4.3	Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps von miR-223-defizienten Mäusen	72
5	DISKUSSION	83
5.1	MicroRNA-Expressionsprofile von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten	83
5.2	MiR-199-3p - eine in kardialen Fibroblasten angereicherte MicroRNA	85
5.3	MiR-223 und seine Funktion im kardiovaskulären System	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	102

7	SUMMARY	103
8	ANHANG	104
9	REFERENZEN.....	106
10	DANKSAGUNG.....	124
11	PUBLIKATIONEN	125
12	LEBENS LAUF.....	127

1 EINLEITUNG

1.1 Die Kontrolle der Genexpression durch MicroRNAs

MicroRNAs sind nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von ca. 21 Nukleotiden, die durch die Regulation der Genexpression eine wichtige Kontrolle von physiologischen und pathologischen Prozessen ausüben. Ihr Vorkommen in verschiedensten Organismen wie Säugern, Fliegen, Würmern, höheren Pflanzen und Grünalgen¹ lässt darauf schließen, dass es sich um eine phylogenetisch sehr alte Klasse von RNA-Molekülen handelt, deren regulatorische Funktion wahrscheinlich unverzichtbar für komplexe Lebewesen ist. Dementsprechend überrascht es nicht, dass eine genetische Deletion eines Schlüsselenzyms der MicroRNA-Prozessierung zum Tod von Mäusen schon während der Embryonalentwicklung führt.^{2,3} Die Deletion von MicroRNAs hat dagegen gezeigt, dass wenige Entwicklungsprozesse von einer einzigen MicroRNA abhängig sind.⁴ Vielmehr scheint hier eine deutliche Redundanz zwischen verschiedenen MicroRNAs und zwischen MicroRNAs und Transkriptionsfaktoren zu bestehen.⁴

Reife MicroRNAs werden in einem mehrstufigen Prozess generiert (**Abbildung 1**).^{5,6} Zuerst entstehen primäre MicroRNA-Transkripte (Pri-miRNA) durch Transkription mittels RNA-Polymerase II oder III. Diese enthalten eine oder mehrere Haarnadel-Strukturen (engl. *stem loop*), die durch den aus den Untereinheiten DROSHA und DGCR8 bestehenden „Mikroprozessor-Komplex“ co-transkriptional weiterprozessiert werden. Hierbei schneidet die Endonuklease DROSHA den doppelsträngigen „Stamm“ der Haarnadelstruktur ca. 11 Basen entfernt vom Übergang zum einzelsträngigen Bereich und erzeugt so die Vorläufer-MicroRNA (Pre-miRNA), die anschließend von Exportin 5 (XPO5) aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. Dort schneidet ein Komplex aus Dicer (DICER1) und TRBP (TARBP2) die Schleife der Pre-miRNA ab und erzeugt damit einen MicroRNA-Duplex, bestehend aus einem 5p- und einem 3p-Strang. Einer der beiden Stränge, der sogenannte *guide strand*, bildet die reife MicroRNA und wird Teil des *RNA-induced silencing complex* (RISC), der die regulatorische Aktivität der MicroRNA vermittelt. Der komplementäre Strang (*passenger strand*) wird dagegen abgebaut. Allerdings ist inzwischen eine Vielzahl von Ausnahmen von dem hier dargestellten kanonischen MicroRNA-Biosyntheseweg bekannt, die oft nur für einzelne MicroRNAs gelten.⁵ So kann beispielsweise der DROSHA-vermittelte Prozessierungsschritt in bestimmten Fällen umgangen werden.⁵ Insbesondere wird auch zunehmend klarer, dass in vielen Fällen beide Stränge des MicroRNA-Duplex funktionell aktiv sein können und nicht zwangsläufig einer von beiden abgebaut wird. So wurde die in der vorliegenden Arbeit untersuchte miR-199a-3p ursprünglich als miR-199a* (d.h. als

passenger strand) bezeichnet (www.mirbase.org), obwohl sie in manchen Zelltypen höher exprimiert zu sein scheint als der 5p-Strang des gemeinsamen MicroRNA-Vorläufers.⁷

Den wichtigsten Bestandteil von RISC bilden die Proteine der Argonaut-Familie, von denen es in Säugern vier verschiedene Isoformen (AGO1-4) gibt.⁵ Einerseits stabilisieren sie MicroRNAs,⁸ andererseits sind sie die Effektorproteine des RISC.⁶ Als Bestandteil dieses Komplexes können MicroRNAs auf verschiedene Art und Weise ihre mRNA-Zielmoleküle (engl. *targets*) regulieren. Bei sehr hoher Komplementarität zwischen MicroRNA und mRNA kann die mRNA AGO2-abhängig gespalten werden, während eine niedrigere Komplementarität die Inhibition ihrer Translation und/oder eine Deadenylierung und damit einen beschleunigten Zerfall zur Folge hat.^{1,6} Eine jüngere Studie berichtete dazu, dass RNA-Abbau den weit überwiegenden Anteil an der Reduktion der Proteinproduktion durch MicroRNAs ausmacht.⁹

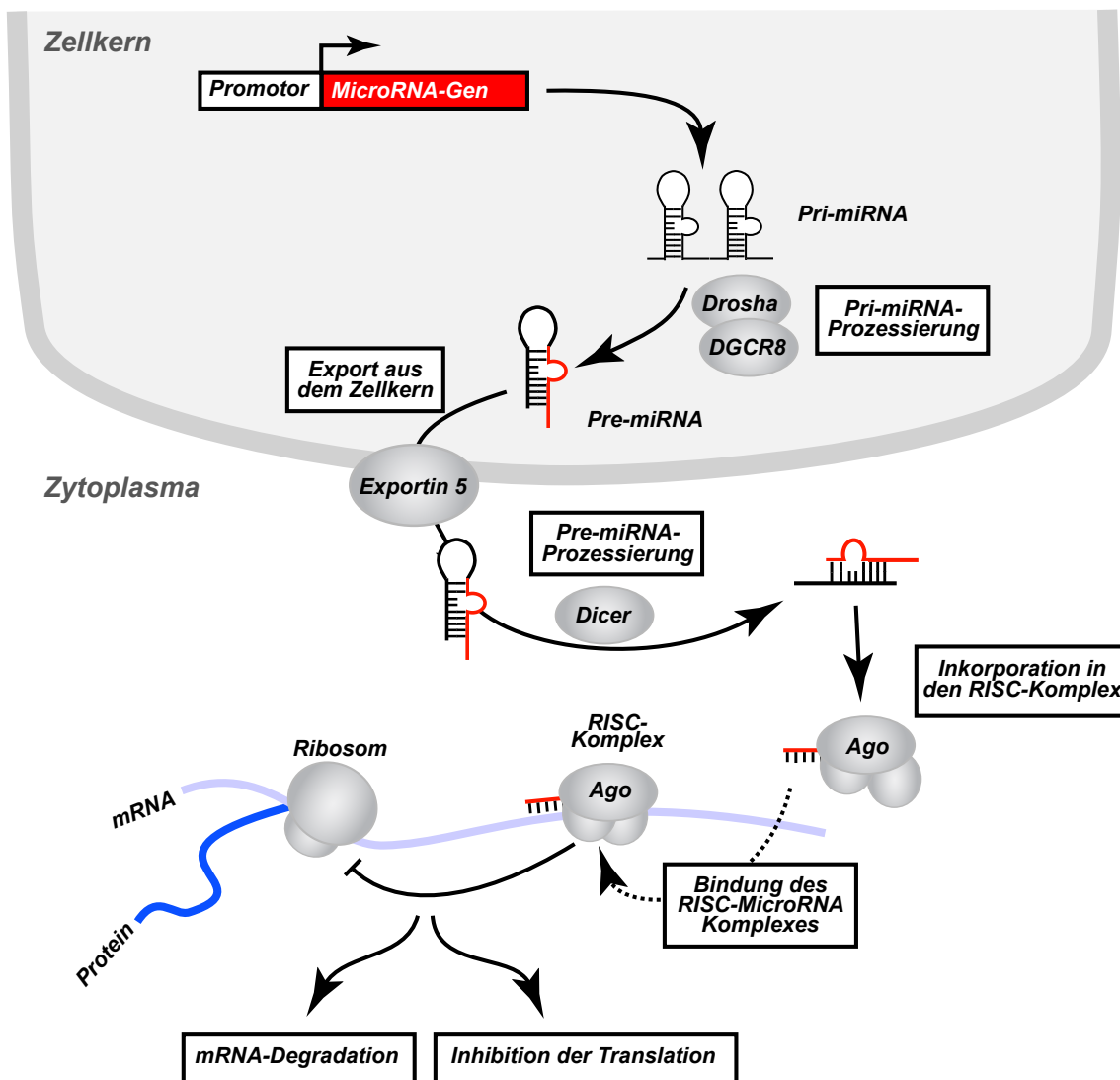


Abbildung 1. Biogenese und Funktion von MicroRNAs. Zu Details siehe Text. Adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt und Dr. Stanislas Werfel.

Die genaue Vorhersage von MicroRNA-Targets ist allerdings nach wie vor schwierig. Konsens besteht darüber, dass Komplementarität der MicroRNA-Basen 2-7 (der sogenannte *seed*) zu einem Abschnitt in der 3' UTR (engl. *untranslated region*) von mRNAs die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion stark erhöht, insbesondere, wenn diese Region evolutionär konserviert ist.¹ Allerdings sind für eine effektive Repression meist zusätzliche Basenpaarungen nötig.¹ Neben diesen „kanonischen“ Interaktionen wurde aber auch eine große Anzahl an Ausnahmen von den genannten Regeln berichtet (z.B. das Vorkommen von Bindestellen in 5' UTR bzw. kodierender Sequenz oder 3'-kompensatorische Basenpaarungen),^{1,10} und nicht-kanonische Seed-Interaktionen überwiegen möglicherweise sogar,¹⁰ Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die MicroRNA-Target-Regulation vom zellulären Kontext abhängen könnte,¹¹ Aus dieser Vielzahl von möglichen Interaktionen ergibt sich, dass eine MicroRNA die Expression von vielen (möglicherweise hunderten) Targets beeinflussen sollte,¹² Obwohl dies experimentell in Transkriptom- und Proteomanalysen bestätigt wurde,¹³⁻¹⁵ ist die durch MicroRNAs verursachte Repression der einzelnen Targets typischerweise relativ mild.¹³ Andererseits kann eine MicroRNA entweder durch die Unterdrückung mehrerer Targets im selben Signalweg eine additive Wirkung entwickeln (wie es auch von unserer Gruppe gezeigt wurde¹⁶) oder eine physiologische „Pufferfunktion“ übernehmen, indem sie zugleich Aktivatoren und Inhibitoren eines biologischen Prozesses reguliert.⁴

Neben der Interaktion mit mRNA Targets gibt es bemerkenswerterweise auch Berichte, dass MicroRNAs, obwohl ihre Prozessierung im Zytoplasma endet, durch Bindung an homologe DNA Sequenzen in Promotor-Regionen die Gentranskription inhibieren können.¹⁷⁻²⁰

Zunehmend deuten Forschungsergebnisse auch darauf hin, dass MicroRNAs, z.B. über Mikrovesikel, von Zelle zu Zelle übertragen werden können und so die Genexpression von Zielzellen beeinflussen können.²¹ Möglicherweise spielen solche Mechanismen sogar im Herz²²⁻²⁴ oder in Blutplättchen^{25,26} eine Rolle. Der Nachweis, dass der MicroRNA-Transfer *in vivo* tatsächlich eine physiologisch relevante Funktion hat, ist allerdings schwierig zu führen.

Zusammengenommen bleibt die Erkenntnis, dass MicroRNAs die Genexpression auf vielfältige Weise beeinflussen können, teilweise durch Mechanismen die noch im Detail aufzuklären sind.

1.2 Die Bedeutung von MicroRNAs im kardiovaskulären System

1.2.1 Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt

Kardiovaskuläre Krankheiten stellen mit einem Gesamtanteil von etwa 30% die häufigste Todesursache weltweit dar.²⁷ Darunter sind atherosklerotische Veränderungen von Blutgefäßen im Herz (Verursacher u.a. von Herzinfarkt und ischämischer Herzkrankheit) und Gehirn (u.a. Schlaganfall) für die meisten Todesfälle verantwortlich.²⁷ Neben der Schädigung der Herzkranzgefäße (Koronare Herzkrankheit / Ischämische Herzkrankheit) können aber auch eine Reihe weiterer Erkrankungen zu einer Unfähigkeit des Herzens führen, den Körper mit ausreichend Blut zu versorgen (Herzinsuffizienz), z.B. Hypertonie, Herzklappendefekte oder angeborene Mutationen von sarkomerischen Proteinen. Charakteristisch für die chronische Herzinsuffizienz, die im Gegensatz zur akuten Form allmählich fortschreitet, sind dabei Kompensationsprozesse (Verdickung des Herzmuskels, schnellerer Herzschlag, Vasokonstriktion), die anfänglich die verminderte Pumpleistung des Herzens ausgleichen können, aber letztlich zur Progression der Erkrankung sogar beitragen.²⁸ Die mit der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz (z.B. nach einem Herzinfarkt) einhergehenden strukturellen und molekularen Veränderungen werden als kardiales Remodeling bezeichnet.²⁸ Auf genetischer Ebene sind pathologische Herzerkrankungen eng verflochten mit der Reaktivierung von fötalen Genprogrammen, einschließlich der Reexpression fötaler MicroRNAs.^{4,29,30}

1.2.2 Die Rolle von kardialen Fibroblasten im gesunden und erkrankten Herz

Fibroblasten kommen in praktisch allen Organen vor und erfüllen als interstitielle Zellen vielfältige Funktionen. Im Herz von Menschen und Ratten stellen sie die zahlenmäßig größte Zellpopulation dar (über 60% aller Zellen), während sie im Mausherz einen geringeren Anteil (ca. 26%) ausmachen.^{31,32} Da kardiale Fibroblasten die Hauptproduzenten von Kollagen im Herz sind, lassen sich diese artspezifischen Unterschiede möglicherweise mit dem Laplace-Gesetz begründen, laut welchem bei gleichbleibendem Innendruck ein linearer Zusammenhang zwischen der Wandspannung und dem Durchmesser eines elastischen Gefäßes besteht.³³ Der größere Herzdurchmesser von Menschen und Ratten im Vergleich zu Mäusen erfordert demnach möglicherweise relativ mehr Fibroblasten, um den erhöhten Kollagenbedarf zur Stabilisierung des Myokards abzudecken.³²

Die Aufgaben von kardialen Fibroblasten gehen jedoch über die Erhaltung der Extrazellulärmatrix (ECM)-Homöostase deutlich hinaus. Beispielsweise scheint insbesondere mit Kardiomyozyten eine lebhafte Kommunikation zu bestehen.^{34,35} So kontrollieren kardiale

Fibroblasten durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, durch die Ablagerung bestimmter ECM-Faktoren und wahrscheinlich auch durch Konnexin-vermittelte elektrische Kopplung und den Austausch von intrazellulärem Material, die Zellgröße und das Überleben von Kardiomyozyten, ihre Proliferation während der Organentwicklung und vermutlich ihre elektrische Erregung.^{34–37} Auch eine Kontrolle der Angiogenese³⁵ und von Entzündungsreaktionen^{38–40} durch diesen Zelltyp erscheint wahrscheinlich, ist aber bisher noch unzureichend erforscht.

Sowohl die ECM-Produktion als auch die anderen genannten Funktionen kardialer Fibroblasten scheinen extrem dynamisch in Abhängigkeit von chemischen, mechanischen und elektrischen Signalen reguliert zu sein.⁴¹ Beispielsweise wurde berichtet, dass kardiale Fibroblasten für die Sekretion von *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) bei exzessiver Belastung zwingend notwendig sind, um die Funktionsfähigkeit von Kardiomyozyten zu erhalten, während sie bei moderater mechanischer Belastung eher einen überschießenden Umbau des Myokards verursachen.³⁶ Nach einem Myokardinfarkt dagegen müssen kardiale Fibroblasten innerhalb kurzer Zeit eine stabile Narbe bilden, um eine Ruptur der Herzwand zu verhindern.⁴² Umgekehrt ist eine überschießende Bildung von Bindegewebe durch Fibroblasten (Fibrose) neben der Kardiomyozytenhypertrophie und -apoptose auch ein wesentlicher Aspekt des kardialen Remodelings²⁸ und tritt bei praktisch jeder Herzkrankheit auf.^{34,42} Zugleich spielt Fibrose auch bei Erkrankungen anderer Organe einschließlich der Leber, Lunge und Niere eine schädliche Rolle.⁴³ Während die vermehrte Ablagerung von ECM anfänglich vermutlich die Zugspannung im druck- oder volumenüberlasteten Herz vermindert und Infarktareale stabilisiert, führt eine dauerhafte Fibrosierung des Myokards zu einer Versteifung des Herzmuskels und ist damit wahrscheinlich mitverantwortlich für die diastolischen Funktionsstörungen im hypertrophierten Herzen.²⁸ Darüber hinaus behindert die ECM wahrscheinlich die elektrische Kopplung von Kardiomyozyten und ihre Versorgung mit Sauerstoff.⁴⁴ Antifibrotische Strategien werden daher für die Behandlung vieler Herzkrankheiten dringend benötigt und wurden in Einzelfällen auch bereits in Tiermodellen erfolgreich eingesetzt.^{45–48}

Mit der Entwicklung der Fibrose geht auch die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten und eine Zunahme der Fibroblastenzahl im Herz einher.^{42,49} Myofibroblasten sind gekennzeichnet durch eine andauernde Kontraktion und das Vorhandensein von Stressfasern, meistens in Assoziation mit *α -smooth muscle actin* (α -SMA).⁵⁰ Dieser Zelltyp kommt mit Ausnahme der Herzklappen nur im erkrankten Herz vor⁴¹ und trägt wesentlich zur Infarkt Narbenstabilisierung, aber auch zur pathologischen Herzfibrose bei.^{42,50} Üblicherweise wird die Zunahme von (Myo)fibroblasten auf die Vermehrung von ortsständigen kardialen Fibroblasten zurückgeführt^{49,51} und eine vermehrte Fibroblasten-Proliferation wurde auch

experimentell an Mausmodellen für Myokardinfarkt und Drucküberlastung bestätigt.^{52,53} Allerdings gibt es Hinweise, dass kardiale Myofibroblasten auch aus verschiedenen anderen Zelltypen hervorgehen können, z.B. epikardialen Epithelzellen, Endothelzellen, im Blut zirkulierenden Knochenmarkszellen, glatten Muskelzellen, Perizyten und CD44-positiven mesenchymalen Stammzellen.^{48,49,54–58} Die Zusammensetzung der Quellen hängt dabei möglicherweise stark von den Fibrose-auslösenden Stimuli und Schäden ab.⁵⁶

1.2.3 Thrombozyten und ihr Einfluss auf kardiovaskuläre Krankheiten

1.2.3.1 Die Bedeutung von Thrombozyten für die Hämostase und darüber hinaus

Blutplättchen bilden zusammen mit dem plasmatischen Gerinnungssystem die Kernkomponenten der physiologischen Blutungsstillung (Hämostase) und pathologischer Gerinnselbildung (Thrombose).^{59,60} Bei Gefäßverletzungen werden Blutplättchen durch den Kontakt mit adhäsiven Proteinen (u.a. Kollagen, von Willebrand-Faktor) aktiviert und zur Adhäsion angeregt.^{61,62} Zusätzlich sorgen ausgeschüttete Plättchenagonisten wie Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin und Thromboxan A₂ in einer positiven Rückkopplung für eine massive Verstärkung der initialen Aktivierungssignale und führen durch die Aggregation weiterer Blutplättchen und die Aktivierung plasmatischer Gerinnungsfaktoren zur Bildung eines stabilen Thrombus.^{60,61} Während diese Plättchenaktivierungsmechanismen die Beendigung der Blutung und die Wundheilung ermöglichen, sind sehr ähnliche Vorgänge auch verantwortlich für die Bildung von Thrombosen in verschiedenen Krankheiten, unter anderem im Rahmen der Atherosklerose.⁵⁹

Studien der letzten Jahre haben neben der bekannten Rolle von Blutplättchen in der Hämostase unerwartete Funktionen in anderen Prozessen enthüllt, z.B. in Entzündungsreaktionen, angeborener Immunität, Tumormetastasierung und Neoangiogenese.⁶³ Besonders ihre Beteiligung an Immunreaktionen hat viel Aufmerksamkeit erfahren. Sie ist aber schon deswegen naheliegend, weil Plättchen in Säugern aus denselben Vorläuferzellen wie Granulozyten und Makrophagen hervorgehen (siehe **Abschnitt 1.2.3.2**). Im Pfeilschwanzkrebs, einem sogenannten „lebenden Fossil“, erfüllt sogar ein einziger Blutzelltyp gleichzeitig die Aufgaben der Hämostase und des angeborenen Immunsystems.⁶⁴ Blutplättchen sind zur Freisetzung von verschiedenen immunmodulatorischen Zytokinen, Chemokinen und anderen Mediatoren in der Lage und exprimieren *pattern recognition*-Rezeptoren, die spezifische Strukturen auf Mikroben identifizieren können.⁶⁵ Bei Detektion eines Pathogens können sie direkt die Funktion von

Neutrophilen, Endothel und Lymphozyten modulieren und auch selbst an der Sequestration von Krankheitserregern teilnehmen.⁶⁵

Aber auch bei sterilen Entzündungsprozessen, die bei Herzerkrankungen vorherrschen, sind Blutplättchen wichtig. Bei Myokardinfarkten spielen Plättchen beispielsweise gleich mehrere Rollen: Erstens scheint die Adhäsion von Blutplättchen an intaktes Endothel unmittelbar an der Entstehung von atherosklerotischen Plaques beteiligt zu sein. Wahrscheinlich sorgen sie hier sowohl für die inflammatorische Aktivierung von Endothelzellen als auch für die Anlockung von Leukozyten.^{66,67} Zweitens verursachen Blutplättchen nach der Ruptur oder Erosion von atherosklerotischen Plaques durch Thrombusbildung den Verschluss der Koronararterie.⁶² Drittens scheint die Interaktion von Plättchen mit Neutrophilen den Entzündungsschaden in verschiedenen Organen zu verstärken.^{68,69} Dementsprechend verringert die Depletion von Blutplättchen oder Neutrophilen in Mäusen den kardialen Ischämie-Reperfusion-Schaden erheblich.⁷⁰

1.2.3.2 Die Bildung von Thrombozyten durch Megakaryozyten

Pro Tag entstehen in jedem Menschen ca. 1×10^{11} neue Blutplättchen aus Fragmenten ihrer Vorläuferzellen, den Megakaryozyten (MKs).⁶³ Um diese enorme Anzahl zuverlässig herzustellen, ist ein sorgfältig regulierter Produktionsprozess (**Abbildung 2**) erforderlich, der beim erwachsenen Menschen im Knochenmark (bei Mäusen auch in der Milz) stattfindet. Megakaryozyten gehören wie Granulozyten und Monozyten der myeloischen Reihe an und entwickeln sich dort aus Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufern (MEPs, engl. *megakaryocyte erythroid progenitors*).⁷¹ Nach der Entscheidung für die megakaryozytäre Linie setzt die Differenzierung und rapide Proliferation der primitiven MK-Vorläufer, den *burst-forming unit-megakaryocytes* (BFU-MKs) und der etwas reiferen Stadien (*colony-forming unit-megakaryocytes* (CFU-MKs)) ein.⁷¹ Beim Heranwachsen zu reifen MKs werden die Zellen durch mehrfache Endomitose polyploid und vergrößern ihr Zellvolumen enorm.⁷² Anschließend bildet sich im Zytoplasma ein dichtes Netz von Zellmembranen, das sogenannte Demarkationsmembransystem aus, das wahrscheinlich als Membranreservoir für die Plättchenbildung dient.⁷² Während der MK-Differenzierung findet auch eine Wanderung von der osteoblastischen Region zu perivaskulären Stellen statt.⁷³ Allerdings ist nicht klar, inwieweit es sich bei beiden Regionen um klar getrennte Nischen handelt.⁷³ Reife Blutplättchen entstehen schließlich in den Knochenmarkssinusoiden durch Abscherung aus transendothelialen MK-Ausläufern (Proplättchen), ein Vorgang, der als Thrombopoese bezeichnet wird.⁷⁴ Nach einer Zirkulationszeit im Blut von wenigen Tagen werden die Blutplättchen in der Niere und Leber abgebaut.⁶²

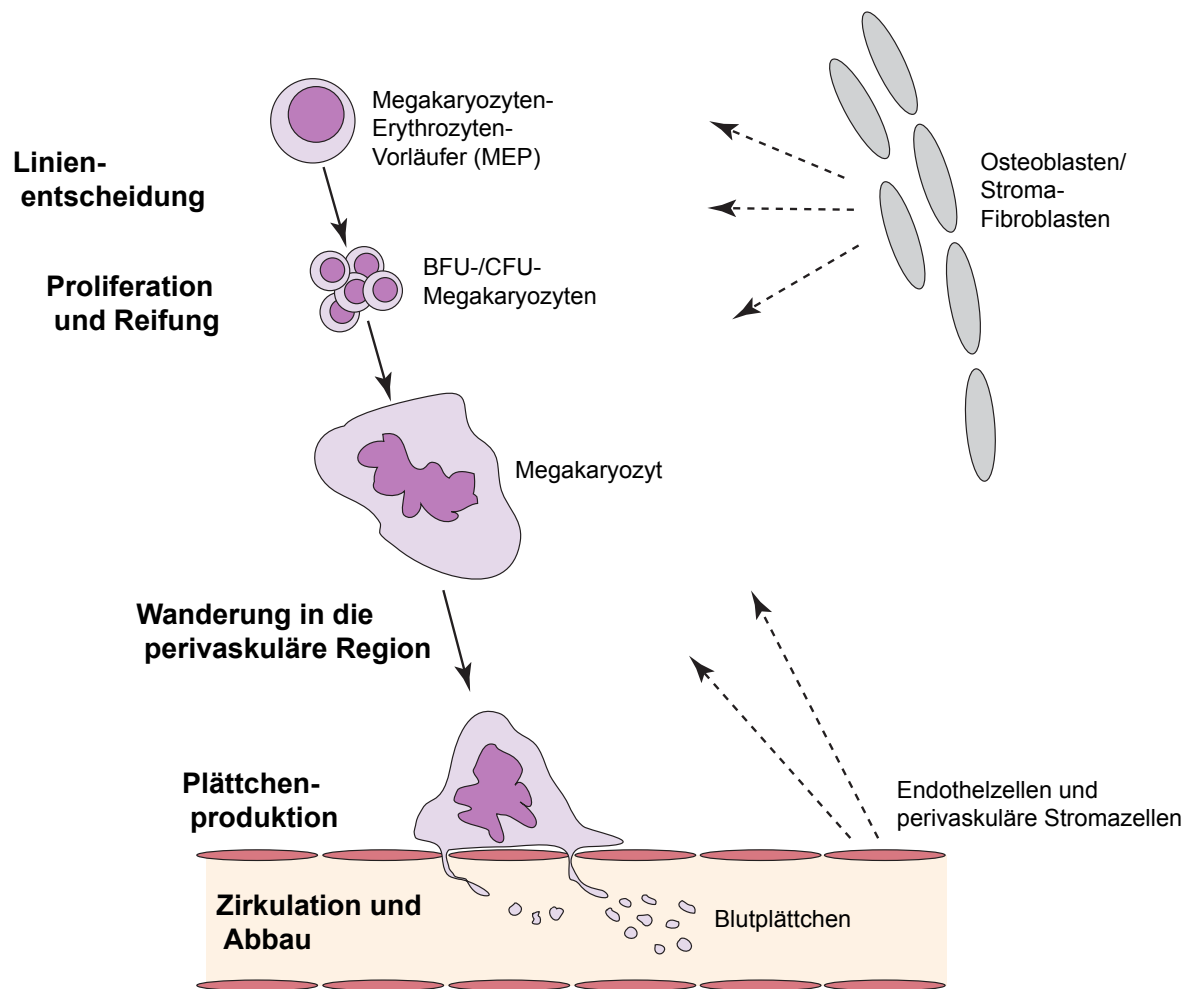


Abbildung 2. Schematische Darstellung von Megakaryopoese und Thrombopoese. Basierend auf Referenzen^{63,72,73}. Zu Details siehe Text.

Megakaryopoese und Thrombopoese werden durch verschiedene Faktoren reguliert.⁶³ Der für die Plättchenproduktion wichtigste Wachstumsfaktor ist Thrombopoetin (TPO), ein Zytokin, das in der Leber und Niere, aber auch von Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarks gebildet wird.^{72,73} Osteoblasten und Osteoklasten produzieren jedoch auch Botenstoffe, die für die Erhaltung und Aktivierung von hämatopoetischen Stammzellen entscheidend sind, während die relative Hypoxie und das vorherrschende Kollagen Typ I die Proplättchenbildung in der osteoblastischen Nische unterdrücken.⁷³ Für die Migration von MKs zum Endothel, ihre Differenzierung und die Proplättchenbildung sind stattdessen besonders parakrine Faktoren (z.B. *stromal-derived factor 1* (SDF-1)), ECM-Komponenten (z.B. Kollagen Typ III und IV, Fibronectin) aus der vaskulären Nische und der direkte Kontakt mit Endothelzellen entscheidend.^{63,73}

1.2.4 Bekannte Funktionen von MicroRNAs im kardiovaskulären System

1.2.4.1 MicroRNAs im Herz

Die kardiomyozytenspezifische Deletion essentieller Faktoren der MicroRNA-Biogenese in Mäusen hat gezeigt, dass MicroRNAs sowohl für die Herzentwicklung als auch für die Funktion von postnatalen Kardiomyozyten unabdingbar sind.⁷⁵⁻⁷⁸ Die Zahl der MicroRNAs, deren Rolle in Kardiomyozyten untersucht wurde, ist mittlerweile fast unüberschaubar geworden. Gezeigt wurden unter anderem Funktionen in der Entwicklung von physiologischer und pathologischer Hypertrophie (u.a. miR-378, miR-23a, miR-133, miR-208, miR-27b)^{16,79-83}, in der Apoptose-Empfindlichkeit im alternden Herz (miR-34a)⁸⁴ und unter kardialen Stress (u.a. miR-320, miR-15, miR-199b-5p, miR-214, miR-24, miR-494, miR-499, miR-34-Familie)⁸⁵⁻⁹³, in der Weiterleitung von elektrischen Reizen (miR-1, miR-208)^{75,94,95} und in der Kardiomyozytenentwicklung und -differenzierung (u.a. miR-1, miR-133, miR-15, miR-23, let-7c and miR-99a)⁹⁶⁻¹⁰³. Ferner scheinen MicroRNAs den Kardiomyozytenmetabolismus (miR-378, miR-214, miR-199a-5p),^{104,105} die systemische Energiehomöostase (miR-208, miR-378)^{104,106} und die Expression fötaler bzw. adulter Myosintypen zu kontrollieren (miR-208).^{107,108} In kardialen Stressmodellen sorgt eine Korrektur der Kardiomyozytendysfunktion durch MicroRNA-Modulation dabei oft auch für eine verringerte Fibroseentwicklung,^{16,82,84,88,107} was wahrscheinlich einem indirekten Effekt auf die Fibroblastenaktivierung zuzuschreiben ist. Ermöglicht wurden diese Studien hauptsächlich durch die Verwendung von genetischen Mausmodellen, die Verfügbarkeit von spezifischen, systemisch applizierbaren MicroRNA-Inhibitoren und die virale MicroRNA-Überexpression oder -Inhibition. Häufig wurde dabei beobachtet, dass die Modulation der MicroRNA-Konzentration nur in Mausmodellen von physiologischem oder pathologischem Stress eine sichtbare Wirkung hervorruft.⁴ Unter diesen Bedingungen scheinen MicroRNAs also eine besondere Rolle zu spielen.

Im Vergleich zu Kardiomyozyten wissen wir sehr wenig über die Rolle von MicroRNAs in kardialen Fibroblasten. Dies liegt neben der offensichtlicheren und klarer definierten Funktion von Kardiomyozyten im Herz wahrscheinlich hauptsächlich am Fehlen von Methoden, die *in vivo* spezifisch an kardialen Fibroblasten angreifen. Im Gegensatz zu Kardiomyozyten sind bislang beispielsweise keine transgenen Mauslinien verfügbar, die Cre-Rekombinase verlässlich nur in diesem Zelltyp exprimieren und ebenso wenig Viren mit einem hierfür spezifischen Tropismus. Trotzdem gibt es mehrere Publikationen, die für eine essentielle Funktion von MicroRNAs in kardialen Fibroblasten sprechen. Beispielsweise hat unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Inhibition von miR-21, einer in diesem Zelltyp angereicherten MicroRNA, in einem Mausmodell für kardiale Drucküberlastung die Fibroseentwicklung verhindern und zugleich die Herzfunktion verbessern kann.⁴⁵ MiR-29, zu dessen Targets

mehrere fibroseassoziierte Gene zählen, soll die ECM-Produktion im Herz dagegen unterdrücken.^{81,109–112} Der in zwei kardialen Stressmodellen beobachtete Rückgang der miR-26(a)-Expression soll dagegen zur Fibroblastenproliferation, der Umwandlung in Myofibroblasten¹¹³ und zur erhöhten Expression von *connective tissue growth factor* (CTGF) und Kollagen Typ I beitragen.¹¹⁴ Auch miR-30c soll die CTGF-Produktion in kardialen Fibroblasten steuern,^{109,115} während miR-145 möglicherweise die Myofibroblastendifferenzierung dieser Zellen im Bereich von Myokardinfarkten kontrolliert.¹¹⁶ Die altersbedingte Hochregulation von miR-22 in Mausherzen wurde dagegen mit der Aktivierung und Seneszenz von kardialen Fibroblasten in Zusammenhang gebracht.¹¹⁷ In weiteren Publikationen wird berichtet, dass die virale Überexpression von miR-101 bzw. miR-24 in einem Myokardinfarktmodell die Fibrosierung verringert und die Herzleistung steigert, was möglicherweise auf eine Unterdrückung der Aktivierung und Kollagenproduktion von kardialen Fibroblasten zurückgeht.^{118,119} Leider fehlt in den genannten Studien der zweifelsfreie Nachweis, dass die untersuchte MicroRNA *in vivo* wirklich fibroblastenabhängig wirkt, was sicher auch durch die zuvor erwähnten Limitationen bei der Untersuchung von kardialen Fibroblasten bedingt ist. Zusätzlich verliefen sich mehrere Studien auch auf bloße Überexpression, was die Aussagekraft hinsichtlich der endogen produzierten MicroRNA ebenfalls einschränkt.

Interessanterweise kann die ektope Expression von MicroRNAs (ähnlich wie die von Transkriptionsfaktoren^{120,121}) auch genutzt werden, um kardiale Fibroblasten in einem Mausherz in Kardiomyozyten umzuwandeln.¹²² Dies könnte für die therapeutische Regeneration von Myokardgewebe noch wichtig werden.

Neben Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten sind MicroRNAs auch in anderen Zelltypen im Herz relevant. Neben vaskulären MicroRNAs (siehe **folgendes Kapitel**) wurde hier die Rolle von MicroRNAs in Leukozyten untersucht, die im Rahmen von Entzündungsvorgängen ins Herz einwandern. Sehr gut beschrieben ist hier der Einfluss von miR-155. Ihre genetische Deletion oder pharmakologische Inhibition vermindert in einem Mausmodell für kardiale Drucküberlastung Entzündungsparameter, Kardiomyozytenhypertrophie und verbessert die Herzfunktion.¹²³ Durch Knochenmarkstransplantation und weitere Experimente wurde gezeigt, dass hämatopoetische Zellen (sehr wahrscheinlich Makrophagen) die beobachteten Effekte über parakrine Mechanismen verursachen.¹²³ In ähnlicher Weise reduziert die Inhibition von miR-155 auch den Myokardschaden in einem Mausmodell für Myokarditis.¹²⁴ Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass die Expression von miR-125b in Makrophagen in einem kardialen Ischämie-Reperusionsmodell einen protektiven Einfluss haben könnte.¹²⁵

1.2.4.2 Vaskuläre MicroRNAs

Jede Herzmuskelzelle steht im Kontakt mit Kapillaren, die die nötige Blutversorgung gewährleisten. Ist die Blutzufuhr gestört, z.B. durch eine atherosklerotische Verengung der Koronararterien oder einen Myokardinfarkt, hat das dramatische Folgen für die Herzfunktion. Ähnlich wie für Kardiomyozyten gibt es eine große Anzahl von Studien, die sich mit vaskulären MicroRNAs befasst haben.^{126,127} Die für die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) und Atherosklerose wichtigsten Zelltypen sind Endothelzellen, die die Gefäßwände auskleiden, und glatte Muskelzellen, die in der Media lokalisiert sind und durch ihre Kontraktion den Vasotonus bestimmen.

In Endothelzellen besonders gut untersucht ist die Funktion von miR-126, einer in diesem Zelltyp stark angereicherten MicroRNA. Neben ihrer zentralen Rolle für die Embryonalentwicklung^{128,129} und ischämieinduzierte¹³⁰ Angiogenese wirkt sie offensichtlich auch protektiv gegen Entstehung von Atherosklerose.^{24,131} MiR-92a¹³² und miR-223¹³³ unterdrücken dagegen die Angiogenese. Insbesondere wurde an kardialen Ischämie modellen gezeigt, dass die genetische Deletion bzw. Inhibition von miR-92a in Mäusen und Schweinen die Infarktgröße verringert und die Herzfunktion verbessert.^{132,134} Zusätzlich vermindert die Inhibition von miR-92a in Mäusen die Größe von atherosklerotischen Plaques und erhöht ihre Stabilität.¹³⁵ Im Zusammenhang mit Myokardinfarkten wurde auch gezeigt, dass eine Blockade der Hochregulation von miR-24 die Angiogenese und die Überlebensrate von Endothelzellen erhöht, und damit sowohl die Infarktgröße verringert als auch die Herzfunktion in Mausmodellen verbessert.¹³⁶ Eine ähnlich positive Wirkung auf Gefäßneubildung und Herzleistung wurde für die Überexpression der hypoxieinduzierbaren miR-210 berichtet.¹³⁷ Bei den beobachteten Effekten der Modulation von miR-92a und miR-210 in Myokardinfarktemodellen ist allerdings zu beachten, dass zumindest ein Teil der positiven Effekte wahrscheinlich auf Kardiomyozyten zurückgeht.^{134,137} Dagegen widerspricht die berichtete Wirkung der Inhibition von miR-24 bei Myokardinfarkten¹³⁶ anderen Publikationen, die eine protektive Wirkung einer Überexpression im gleichen Tiermodell berichten und das auf Kardiomyozyten⁹⁰ bzw. kardiale Fibroblasten¹¹⁹ zurückführen.

In glatten Muskelzellen ist dagegen die Funktion des miR-143/145-Clusters besonders gut charakterisiert, der die Balance zwischen dem proliferativen und kontraktilem Phänotyp steuert.¹³⁸⁻¹⁴¹ Wird das Absinken von miR-145 (z.B. nach einer Gefäßverletzung oder nach Ischämie) verhindert, kann dies Atherosklerose und Restenosierung vorbeugen^{139,140,142} und die Bildung von koronaren Kollateralgefäßen stimulieren.¹⁴³ Ebenso verringert die Inhibition von miR-21¹⁴⁴, miR-221^{145,146} oder miR-222¹⁴⁵ die Neointimabildung.

1.2.4.3 MicroRNAs in Thrombozyten und Megakaryozyten

MicroRNAs spielen eine zentrale Rolle im Knochenmark und hämatopoetischen Zellen¹⁴⁷ und sind offenbar auch für die Megakaryopoese relevant. Am überzeugendsten ist hierbei gezeigt worden, dass die Balance zwischen megakaryozytärer und erythroider Differenzierung von miR-150 in Richtung der ersteren¹⁴⁸ bzw. von miR-145 und miR-146a in Richtung der letzteren^{149,150} verschoben werden kann. Des Weiteren existieren Berichte, dass auch miR-34a¹⁵¹, miR-28¹⁵², miR-155¹⁵³ und miR-10a¹⁵⁴ diese Balance beeinflussen, wobei hier der Nachweis einer Relevanz *in vivo* fehlt.

Im Gegensatz zur Rolle von MicroRNAs in der Megakaryopoese ist kaum etwas über ihre Funktion in der Plättchenproduktion und in reifen Blutplättchen bekannt. Zumindest sind Blutplättchen trotz des fehlenden Zellkerns zur mRNA-Translation in der Lage.¹⁵⁵ Darüber hinaus besitzen sie laut Landry *et al.*¹⁵⁶ einen funktionellen MicroRNA-Prozessierungsweg sowie einen relativen hohen Anteil an MicroRNA gemessen an der Gesamt-RNA. Diese Studie schlug auch den für die Plättchenaktivierung wichtigen ADP-Rezeptor P2Y₁₂ als Target von miR-223 in humanen Blutplättchen vor.¹⁵⁶ Allerdings fehlte hier der Nachweis, dass miR-223 wirklich dieses mögliche Target unterdrückt. Überzeugender wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass miR-376c sehr wahrscheinlich Einfluss auf die Aggregationsantwort von Blutplättchen nimmt, indem es in Megakaryozyten Phosphatidylcholin-Transfer-Protein reguliert, was sich mindestens bis zum Proplättchenstadium auf dessen mRNA-Konzentration auswirkt.¹⁵⁷ Daneben wurden miR-96¹⁵⁸ und miR-200b/miR-495/miR-107¹⁵⁹ basierend auf Korrelationen mit der Plättchenreaktivität als mögliche Regulatoren der Plättchenaktivierung diskutiert. Es bleibt nach diesen Studien allerdings unklar, ob MicroRNAs wirklich die Plättchenfunktion regulieren können.

Neben einer möglichen regulatorischen Funktion in Blutplättchen selbst, wurde auch der Transport zweier MicroRNAs (miR-320b, miR-223) aus aktivierten Blutplättchen über Mikrovesikel in Endothelzellen beschrieben, wo sie ebenfalls die Genexpression kontrollieren könnten.^{25,26,160} Dank ihrer hohen Zahl enthalten Blutplättchen bezogen auf dasselbe Blutvolumen trotz ihres geringen Zellvolumens deutlich mehr MicroRNA als beispielsweise Neutrophile und Monozyten und könnten damit möglicherweise auch im Körper eine relevante MicroRNA-Mengen transportieren.¹⁶⁰

1.3 Die therapeutische Anwendung von MicroRNAs

Die Entwicklung neuer Therapiestrategien für verschiedenste Krankheiten ist nach wie vor dringend notwendig. Beispielsweise lässt sich die chronische Herzinsuffizienz bisher nicht kausal behandeln und führt in mehr als der Hälfte der diagnostizierten Fälle innerhalb von fünf Jahren zum Tod.¹⁶¹ Bisher konzentrierten sich pharmakologische Eingriffe hauptsächlich auf Proteine, die oft isoliert in einem bestimmten Signalweg wirken. MicroRNAs könnten dazu eine interessante Alternative darstellen, da sie entweder Kompensationsmechanismen umgehen können, wenn sie mehrere Targets innerhalb desselben Signalwegs steuern,¹⁶ oder durch Modulation ganzer Genprogramme eine Feinjustierung anstatt einer kompletten Blockade erzielen.¹⁶² Darüber hinaus eignen sich MicroRNAs trotz ihrer intrazellulären Lokalisation vermutlich gut als therapeutische Targets, da sie durch komplementäre Inhibitoren auf Basis von chemisch modifizierten RNA- oder DNA-Nukleotiden erreichbar sind und inhibiert werden können. Die Verabreichung von MicroRNA-Mimetika gestaltet sich allerdings schwieriger, da sie auf Grund ihrer komplexeren, doppelsträngigen Struktur in Vehikel (z.B. Liposomen) verpackt werden müssen.¹⁶² Festzuhalten ist, dass prinzipiell alle MicroRNAs, deren Modulation in Experimenten mit Mäusen positive Effekte auf kardiovaskuläre Krankheiten ohne deutliche Nebenwirkungen erzielte (siehe **Abschnitte 1.2.4.1 und 1.2.4.2**), prinzipiell für eine therapeutische Anwendung beim Menschen interessant sind.

Der klinische Fortschritt bei therapeutischen MicroRNAs ist trotzdem unerwartet langsam, mit bisher einer Substanz in Phase II¹⁶³ und einer weiteren am Beginn von Phase I^{162,164}, allerdings keiner davon im kardiovaskulären Feld. Die erfolgreiche Anwendung eines miR-92a-Inhibitors in einem Herzinfarktmodell in Schweinen¹³⁴ sowie weitere Stoffe in der fortgeschrittenen präklinischen Phase¹⁶² geben aber Grund zur Hoffnung, dass es auch zu kardiovaskulären Krankheiten bald klinische Studien geben wird.

1.4 Ziele der Arbeit

Ausgehend von der Vermutung, dass selektiv in einem Zelltyp exprimierte MicroRNAs wesentlich die Eigenschaften dieser Zellart formen, wurden zwei Studien in Ratten und Mäusen konzipiert, in denen die MicroRNA-Expressionsprofile von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten miteinander verglichen wurden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, fibroblastenspezifische MicroRNAs im Herz zu identifizieren und deren zelluläre Funktion aufzuklären. Die Auswirkungen von Überexpression und Inhibition weniger ausgewählter MicroRNAs auf kardiale Fibroblasten sollte hierzu in Zellkulturexperimenten untersucht werden, wobei der Fokus der Zellproliferation galt. Im Weiteren sollten durch die Identifikation regulierter MicroRNA-Targets Rückschlüsse auf die beteiligten Signalwege gezogen werden. Da eine der ausgewählten MicroRNAs keinen regulatorischen Effekt auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten zeigte, aber dafür Mäuse mit genetischer Deletion dieser MicroRNA zur Verfügung standen, sollte der Phänotyp dieser Mauslinie im Rahmen von kardialen Stressmodellen untersucht werden. Da letztere MicroRNA darüber hinaus in Blutplättchen und MKs hochabundant ist, sollte eine mögliche Rolle auch in diesen Zelltypen untersucht werden.

2 MATERIALIEN

2.1 Antikörper

Antikörper	Klon (falls monoklonal)	Hergestellt in / Isotyp	Verdünnung bzw. finale Konzentration	Hersteller
<i>Thrombozytendepletion</i>				
GPIb α (CD42b) (für Thrombozytopenie)	Mischung mehrerer monoklonaler Antikörper	Ratte IgG	2 mg/kg für Plättchendepletion	Emfret, Würzburg, D
<i>Durchflusszytometrie</i>				
FITC-GPIb α (CD42b)	Xia.B2	Ratte IgG2a	1 : 100	Emfret, Würzburg, D
Phycoerythrin (PhE)-Integrin β 1 (CD29)	HM β 1-1	Armenischer Hamster IgG1	1 : 100	BioLegend, San Diego, USA
FITC-GPIX (CD42a)	Xia.B4	Ratte IgG1	1 : 100	Emfret, Würzburg, D
FITC-P-Selectin (CD62P)	Wug.E9	Ratte IgG1	1 : 100	Emfret, Würzburg, D
FITC-Integrin α IIb (CD41)	MWReg30	Ratte IgG1	1 : 100	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
APC-Integrin α IIb (CD41)	MWReg30	Ratte IgG1	1 : 100	eBioscience, Wembley, UK
PhE-Aktives Integrin α IIb β III	JON/A	Ratte IgG1	1 : 100	Emfret, Würzburg, D
FITC-CD45.1	A20	Maus IgG2a	1 : 100	eBioscience, Wembley, UK
PhE-CD45.2	104	Maus IgG2a	1 : 100	eBioscience, Wembley, UK
Isotypkontrolle PhE-Armenischer Hamster IgG	HTK888	Armenischer Hamster IgG	1 : 100	BioLegend, San Diego, USA
Isotypkontrolle FITC-Ratte IgG1	eBRG1	Ratte IgG1	1 : 100	eBioscience, Wembley, UK
Isotypkontrolle PhE-Ratte IgG1	R3-34	Ratte IgG1	1 : 100	BD Pharmingen
Isotypkontrolle FITC-Ratte IgG2a	eBR2a	Ratte IgG2a	1 : 100	eBioscience, Wembley, UK
<i>Mikroskopie</i>				
α -Aktinin (ACTN2)	EA-53	Maus IgG1	1 : 1000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
α -smooth muscle actin (ACTA2)	1A4	Maus IgG2a	1 : 1000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Integrin α IIb (CD41)	MWReg30	Ratte IgG1	1 : 500	eBioscience, Wembley, UK

Alexa 488 anti-Maus IgG H+L	-	Ziege	1 : 200	Life Technologies, Carlsbad, USA
Alexa 594 anti-Ratte	-	Esel	1 : 200	Life Technologies, Carlsbad, USA
<i>Western Blot</i>				
YWHAE (14-3-3ε)	-	Kaninchen	1 : 1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	6C5	Maus	1 : 5000	Merck Millipore, Billerica, USA
HRP (engl. <i>horseradish peroxidase</i>) anti-Kaninchen	-	Ziege	1 : 10000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
HRP anti-Maus	-	Ziege	1 : 10000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

2.2 Oligonukleotide

2.2.1 Oligodesoxynukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotid-Primer wurden von den Firmen MWG Biotech (Martinsried, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D) und Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen.

Zielgen (Spezies) oder Anwendung	Name	Sequenz (5'→3')	Länge des PCR-Produkts
cDNA-Synthese	Oligo(dT)	TTTTTTTTTTTTTTTT	
Genotypisierung von miR-223-defizienten Mäusen	mir223rev	TTCTGCTATTCTGGCTGCAA	Wildtyp: ca. 400 Basenpaare (bp), Knockout: ca. 500 bp
	mir223fwd	CAGTGTCACGCTCCGTGTAT	
	Neofwd	CTTCCTCGTGCTTTACGGTATCG	
<i>Fbxw7</i> (mmu)	<i>Fbxw7_f</i>	ATCTGTCCAACCACCCACAG	90 bp
	<i>Fbxw7_r</i>	AGCTCATCTAAAGCCAGCAAC	
<i>Sp3</i> (mmu)	<i>Sp3_f</i>	GTCAGTTGCCAAATCTACAGACA	127 bp
	<i>Sp3_r</i>	TCAGGGTCAGGTTCTCTTC	
<i>Purb</i> (mmu)	<i>Purb_f</i>	CACCTCCATCACCGTGGAC	103 bp
	<i>Purb_r</i>	ATTGCGGTAGGACGGCTTC	
<i>Rhob</i> (mmu)	<i>RhoB_f</i>	GATGGCCAAGTCCAGTTCAT	115 bp
	<i>RhoN_r</i>	CGGAGGCAGAATGGTATTGT	
<i>P2ry12</i> (mmu)	<i>P2ry12_f</i>	TCCCGGAGACACTCATATCC	85 bp
	<i>P2ry12_r</i>	GTGGTATTGGCTGAGGTGGT	

<i>P4hb</i> (mmu)	P4HB_f	GTTTTGCCACCGCTTCTTAG	103 bp
	P4HB_r	CGCCCCAACCAGTACTTTTA	
<i>Myh6</i> (mmu)	MYH6_f	GCCCAGTACCTCCGAAAGTC	110 bp
	MYH6_r	GCCTTAACATACTCCTCCTTGTC	
<i>Gapdh</i> (mmu)	m_GAPDH(new)_f	GTGAAGGTCGGTGTGAACG	96 bp
	m_GAPDH(new)_r	TCGTTGATGGCAACAATCTC	
<i>Actb</i> (mmu)	m_b-actin_f	GCAGCTCCTTCGTTGCCGGT	132 bp
	m_b-actin_r	TACAGCCCGGGGAGCATCGT	
Klonierung des miR-199-3p-Fluoreszenz-reporters in den Gateway <i>Entry</i> -Vektor	New3-F	GACCGACAATTGCATGAAGA	4686 bp (falls die Promoterregionen mitamplifiziert würden)
	New4-R	GGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGG	

2.2.1 Antagomirs

Antagomirs wurden von Fidelity Systems (Gaithersburg, USA) synthetisiert prinzipiell wie andernorts beschrieben.¹⁶⁵ Es handelt sich um vollständig 2'-O-methyl-modifizierte RNA-Nukleotide, die am 3'-Ende einen Cholesterinrest (Chol) tragen und bei denen einzelne Basen durch Phosphorothioat-Bindungen (*) verknüpft sind. Antagomir-199-3p ist zur vollen Sequenz von miR-199a/b-3p komplementär, während für die Negativkontrolle die zum MicroRNA-Seed komplementären sowie zwei weitere Basen mutiert wurden.

Name	Sequenz (5' → 3')
Antagomir-199-3p	U*A*ACCAAUGUGCAGACUAC*U*G*U*-Chol*-T
<i>mismatch</i> (mm)-Antagomir	U*A*ACGAAUGCGCAGAAGUG*C*A*U*-Chol*-T

2.2.2 Antimirs

Antimirs wurden von Exiqon (Vedbaek, DK) bezogen. Es handelt sich um Oligodesoxynukleotide, bei denen einzelne Nukleotide *locked-nucleic acid* (LNA)-modifiziert sind. Zusätzlich sind die ersten und letzten vier Basen durch Phosphorothioat-Bindungen verknüpft. AntimiR-199-3p ist zu den Basen 2-21 von miR-199a/b-3p komplementär. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um eine Sequenz ohne Homologie zu bekannten MicroRNA- oder mRNA-Sequenzen in Maus, Ratte oder Mensch.

Name	Sequenz (5' → 3')
Antimir-199-3p	AACCAATGTGCAGACTACTG
Antimir-ctrl (Negative Control A)	GTGTAACACGTCTATACGCCCA

2.3 Chemikalien

Chemikalie

1,4-Dithiothreitol (DTT) (Massenspektrometrie)
³H-Thymidin (1 mCi/ml, 25 Ci/mmol)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)
Acetonitril

Acetylthiocholiniodid
Ameisensäure
Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Ampicillin
Bluing Reagent
Bouin's Lösung
Bovine serum albumin (BSA)
Bromdesoxyuridin (BrdU)
Bromphenolblau
Calciumchlorid (CaCl₂)
Clarifier 2
Complete Mini, Proteinaseinhibitoren
Convulxin
Cotrimoxazol
Cryomatrix
Dekalzifizierungslösung Usedecalc
Depex
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)
Direct Red 80
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Eisessig
Eosin Y Lösung, wässrig
Eosin Y, wässrige Lösung
Ethanol
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)
Fast Green FCF
Fibrinogen
Fibronectin
Fötale Kälberserum (FCS)
Glucose
Glycerin
Glycin
GoTaq Green Master Mix
Hämatoxylin 2
Hefeextrakt

Hersteller

Carl Roth, Karlsruhe, D
Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Rathburn Chemicals, Walkerburn, Schottland
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Merck Chemicals, Darmstadt, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Carl Roth, Karlsruhe, D
Thermo Scientific, Waltham, USA
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
AppliChem, Darmstadt, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Merck Chemicals, Darmstadt, D
Carl Roth, Karlsruhe, D
Thermo Scientific, Waltham, USA
Roche, Basel, CH
Alexis Biochemicals, San Diego, USA
Ratiopharm, Ulm, D
Thermo Scientific, Waltham, USA
Meditate, Burgdorf, D
Serva, Amstetten, A
Life Technologies, Carlsbad, USA
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Gibco, Karlsruhe, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Carl Roth, Karlsruhe, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
AppliChem, Darmstadt, D
Carl Roth, Karlsruhe, D
AppliChem, Darmstadt, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
PAN, Aidenbach, D
Merck Chemicals, Darmstadt, D
Merck Chemicals, Darmstadt, D
AppliChem, Darmstadt, D
Promega, Mannheim, D
Thermo Scientific, Waltham, USA
AppliChem, Darmstadt, D

Heparin-Natrium (5000 U/ml)	Ratiopharm, Ulm, D
HEPES	AppliChem, Darmstadt, D
Hirudin (röhrchen) (Multiplate)	Roche, Basel, S
Horm-Kollagen	Nycomed, München, D
Interleukin-3, rekombinantes Maus- (rm IL-3)	Immunotools, Friesoythe, D
Iodacetamid, kristallin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM)	StemCell Technologies, Vancouver, Canada
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, D
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
ITS-Lösung 100x (Mischung aus 1 mg/ml Insulin, 0,55 mg/ml Transferrin, 0,5 µg/ml Natriumselenit)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	AppliChem, Darmstadt, D
Kaliumhexacyanoferrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Kanamycin	Fluka, Selze, D
Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen, gelöst in 0,1% Essigsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe, D
M199-Medium	Gibco, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	AppliChem, Darmstadt, D
<i>Minimum Essential Eagle Medium</i> (MEM)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
N-Hydroxysuccinimid-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Natriumazid (NaN ₃)	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung 0,9%	Braun, Melsungen, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) * 7 H ₂ O	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
NP40	AppliChem, Darmstadt, D
OptiMEM I	Gibco, Karlsruhe, D
Paraffin (Parablast)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, D
Pepton	AppliChem, Darmstadt, D
Phenylephrin (PE)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Phenylephrin (PE)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS) (steril)	Gibco, Karlsruhe, D

PhE-Streptavidin	eBioscience, Wembley, UK
Pikrinsäurelösung 1,3%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Propidiumiodid	Invitrogen, Karlsruhe, D
Rhodamin 6G-Chlorid	Life Technologies, Carlsbad, USA
<i>RNAse Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor</i>	Invitrogen, Karlsruhe, D
Roti-Histol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1 Acrylamid-Bisacrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure (HCl) 37%	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Thrombin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Thrombopoietin, rekombinantes humanes (rh TPO)	Immunotools, Friesoythe, D
Thrombopoietin, rekombinantes Maus- (rm TPO)	Immunotools, Friesoythe, D
Toluol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt, D
TriFast	Peqlab, Erlangen, D
Trinatriumcitrat	AppliChem, Darmstadt, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Trypanblau	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, D
Vectashield-DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vitamin B12	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Zitronensäure (Anhydrat)	AppliChem, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D

2.4 Enzyme

Enzym

AccuPrime Pfx DNA Polymerase (AccuPrime Pfx SuperMix)
Antarctic Phosphatase
GoTaq Green Master Mix
Kollagenase Typ II (280 U/mg)
Liberase Blendzyme 1
NotI-HF Restriktionsendonuklease
PacI-HF Restriktionsendonuklease
Proteinase K
RNase A
SpeI Restriktionsendonuklease
SuperScript II Reverse Transcriptase
T4 DNA Ligase
Trypsin (Verdau für die Massenspektrometrie)

Hersteller

Invitrogen, Karlsruhe, D
New England BioLabs, Ipswich, USA
Promega, Mannheim, D
Worthington, Lakewood, USA
Roche, Basel, CH
New England BioLabs, Ipswich, USA
New England BioLabs, Ipswich, USA
Fermentas, St. Leon-Rot, D
Invitrogen, Karlsruhe, D
New England BioLabs, Ipswich, USA
Invitrogen, Karlsruhe, D
New England BioLabs, Ipswich, USA
Promega, Mannheim, D

Trypsin solution 2,5% (Verdau von adulten
Mausherzen)

Trypsin-EDTA (0,05%)

Xcml Restriktionsendonuklease

Invitrogen, Karlsruhe, D

GIBCO, Karlsruhe, D

New England BioLabs, Ipswich, USA

2.5 Kits

Kit

Adeno-X Rapid Titer Kit

BCA Kit

ECL

ECL Plus

EndoFree Plasmid Maxi Kit (endotoxinfrei)

Fast Start Universal SYBR Green Mastermix (ROX)

MegaCult-C Collagen and Medium without
Cytokines Kit

miRNeasy Mini Kit

miRNome microRNA Profilers QuantiMir Kits

miRVana miRNA Isolation Kit

QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

SILAC-Lys4-Arg6 Kit

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit

Hersteller

ClonTech, Mountain View, USA

Thermo Scientific, Waltham, USA

Thermo Scientific, Waltham, USA

GE Healthcare, Freiburg, D

Qiagen, Hilden, D

Roche, Basel, CH

StemCell Technologies, Vancouver,
Canada

Qiagen, Hilden, D

System Biosciences, Mountainview,
USA

Ambion, Austin, USA

Qiagen, Hilden, D

Qiagen, Hilden, D

Silantes, München, D

Applied Biosystems

2.6 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

2.6.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

BSA-Blockpuffer

Tris (1 M; pH 7,5)

50 ml

NaCl

8,7 g

BSA

20 g

NP40

2 ml

NaN₃

300 mg

ddH₂O

ad 1 l

BSA-Waschpuffer

Tris (1 M; pH 7,5)	50 ml
NaCl	8,7 g
BSA	5 g
NP40	2 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Citrat-Triton-X-Puffer

Zitronensäure (Anhydrat)	1,9 g
Triton X-100	0,5 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

CFU-MK-Färbepuffer

Natriumphosphat	750 mM
Acetylthiocholiniodid	1,73 mM
Trinatriumcitrat	5 mM
Kupfersulfat	3 mM
Kaliumhexacyanoferrat	0,5 mM

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau (ca. 500bp) bzw. Xylencyanol (ca. 2500bp)	10 mg
EDTA (0,5 M)	1,4 ml
Glycerin	3,6 ml
ddH ₂ O	ad 12 ml

Eosin-Lösung (0,1%)

Eosin Y Lösung, wässrig	20 ml
ddH ₂ O	80 ml
Essigsäure (100%)	3 Tropfen

Fast Green – Lösung (0,1%)

Fast Green FCF	500 mg
ddH ₂ O	ad 500 ml

Laemmli-Puffer (6x)

SDS	1,2 g
Bromphenolblau	6 mg
Tris (1 M, pH 6,8)	0,6 ml
β -Mercaptoethanol	0,6 ml
ddH ₂ O	3,1 ml

Laufpuffer für *Western Blots* (10x)

Tris-HCl	30 g
Glycin	144 g
SDS	15 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Lysepuffer für Genotypisierung

Tris	12,1 g/l (100mM)
EDTA	1,87 g/l (5mM)
NaCl	11,7 g/l (200mM)
SDS 10% (w/v)	20 ml (0.2% (w/v))
ddH ₂ O	ad 1 l

Lysepuffer für Proteinlysate

Tris (pH 6,7)	50 mM
SDS	2%
Na ₃ VO ₄	1 mM
Complete Mini, Proteinaseinhibitoren	1 Tablette/10 ml Puffer

Natriumchloridlösung, gesättigte

NaCl	35,4g (6 M)
ddH ₂ O	ad 100 ml

Paraformaldehydlösung (4%)

Paraformaldehyd	20 g
PBS (1x)	480 ml
Lösung auf 60°C erhitzen	
NaOH (1 M) bis pH 7,2	
PBS (1x)	ad 500 ml
Lagerung bei -20°C	

PBS (Phosphate-buffered saline) (10x)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
ddH ₂ O	ad 1 l

PBST

PBS (10x)	100 ml
Tween 20	1 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Protein-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,001% (m/v)
Glycerin	50%
ddH ₂ O	50%

Puffer für Sammelgel (4x)

Tris	61 g
SDS-Lösung (10%)	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
HCl (37%) bis pH 6,7	

Puffer für Trenngel (4x)

Tris	182 g
SDS-Lösung (10%)	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
HCl (37%) bis pH 8,8	

Sirius Rot – Lösung (0,01 %)

Direct Red 80	50 mg
ddH ₂ O	15 ml
→ Filtration durch Rotilabo Rundfilter (Roth)	
Pikrinsäurelösung 1,3 %	485 ml

Stripping-Puffer

Glycin	200 mM
SDS	0,1% (w/v)
HCl (37%) bis pH 2	

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (50x)

Tris	0,2 M
Essigsäure	5,7%
EDTA (0,5M)	10%
ddH ₂ O	ad 1 l

TBS (Tris-buffered saline)-Puffer (10x)

Tris	61 g
NaCl	90 g
ddH ₂ O	ad 1 l
HCl (37%)	bis pH to 8,4

Transferpuffer

Tris (1M pH 8,3)	25 ml
Glycin	11,26 g
Methanol	100 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Zellzyklus-Färbepuffer

Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O	13,4 g
Propidiumiodid	0,01 mg/ml
RNase A (für 5 min bei 99°C hitzebehandelt, um kontaminierende DNasen zu inaktivieren)	0,1 mg/ml

2.6.2 Medien, Puffer und Lösungen für die Zellisolation und Zellkultur

Falls die Ausgangsstoffe nicht ohnehin steril waren, wurden alle Lösungen durch Filtration (0,22 µm Porengröße; Corning, Corning, USA) entkeimt.

AMCM-Medium

BSA	500 µl
P/S	5 ml
BDM-Lösung	10 ml
ITS	50 µl
Glucose-Lösung	5 ml
M199	ad 500 ml

BDM-Lösung

2,3-Butandionmonoxim (BDM)	500 mM
----------------------------	--------

BrdU (Bromdesoxyuridin)-Lösung

BrdU	230 mg
ddH ₂ O	74,8 ml

Calciumchloridlösungen (10 mM, 100 mM)

CaCl ₂	10 mM bzw. 100 mM
-------------------	-------------------

CBFHH (Calcium- and bicarbonate-free Hanks with Hepes)-Puffer

NaCl	137 mM
KCl	5,36 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,81 mM
Glucose	5,55 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0,34 mM
NaOH bis pH 7,3	

Citratpuffer

Trinatriumcitrat	3,13% (m/v) (106,4 mM)
------------------	------------------------

Erythrozytenlysepuffer

NH ₄ Cl	150 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	1 mM
pH 7,2-7,4	

FLC-Medium (Kulturmedium für fötale Leberzellen)

FCS (10% finale Konzentration)	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
rh TPO	50 ng/ml
DMEM	ad 500 ml

Glucose-Lösung (5%)

D-Glucose	5% (m/v)
-----------	----------

LB-Medium

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
NaOH (1 N)	1 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

LB-Agar

Agarose	15 g
LB-Medium	ad 1 l

NRCM-Basismedium

MEM	10,8 g
Vitamin B ₁₂	1 ml
NaHCO ₃	350 mg
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 7,3	

NRCM-Kulturmedium

FCS (0,1% oder 5% finale Konzentration)	0,5 ml oder 25 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
BrdU	5 ml
NRCM Basismedium	ad 500 ml

NRCF/ARCF-Kulturmedium

FCS (0,1%, 1% oder 10% finale Konzentration)	0,5 ml, 5 ml oder 50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
NRCM Basismedium	ad 500 ml

NRCM-Trypsin-Lösung

Trypsin (BD)	200 mg
DNase (10 ml / 5 ml 0,15 M NaCl)	2 ml
Penicillin/Streptomycin	2 ml
CBFHH	ad 200 ml

Perfusionspuffer-Vorlösung

NaCl	113 mM
KCl	4,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄	0,6 mM
MgSO ₄ x7H ₂ O	1,2 mM
NaHCO ₃	12 mM
KHCO ₃	10 mM
Phenol red	0,032 mM
Taurine	30 mM
HEPES buffer	1 mM

Perfusionspuffer

Perfusionspuffer-Vorlösung	288 ml
BDM-Lösung	6 ml

Puffer P1

Perfusionspuffer-Vorlösung	9 ml
FCS	1 ml
CaCl ₂ solution 10 mM	12,5 µl

Puffer P2

Perfusionspuffer-Vorlösung	47,5 ml
FCS	2,5 ml
CaCl ₂ solution 10 mM	62,5 µl

Verdauungspuffer (adulte Rattenherzen)

Perfusionspuffer-Vorlösung	20 ml
Calciumchloridlösung 100 mM	6 µl
Kollagenase Typ II (280 U/mg)	70 mg

SILAC-Medium

DMEM (aus SILAC-Lys4-Arg6-Kit)	
Dialysiertes FCS (aus SILAC-Lys4-Arg6-Kit)	10% bzw. 1%
L-Glutamin (aus SILAC-Lys4-Arg6-Kit)	2 mM
Lys-4 bzw. Lys-0 (aus SILAC-Lys4-Arg6-Kit)	0,798 mM
Arg-6 bzw. Arg-0 (aus SILAC-Lys4-Arg6-Kit)	0,398 mM
L-Prolin	200 mg/l
Penicillin/Streptomycin	1/100 (v/v)

Tyrode's Puffer

NaCl	137 mM
KCl	2,8 mM
NaHCO ₃	12 mM
Glucose	5,5 mM
HEPES	10 mM
HCl bis pH 6,5 bzw. pH 7,4	

3 METHODEN

3.1 Allgemeine Kultivierung und Passagierung von Zellen

Primäre Zellen und Zelllinien wurden in Zellkulturgefäßen (falls nicht anders angegeben Nunclon-beschichtet, Thermo Scientific, Bonn, D) in befeuchteten Inkubatoren bei 37°C kultiviert. Die CO₂-Konzentration wurde dabei passend zum jeweiligen Zellmedium gewählt. Zur Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA inkubiert. Wenn die Zellen begannen sich abzulösen, wurde Zellmedium zugegeben und die Zellen resuspendiert. Nach Zentrifugation (5 min, 200 x g) wurde das Zellpellet im jeweiligen Zellmedium resuspendiert, gegebenenfalls die Lebendzellzahl mittels Trypanblaufärbung (Countess Cell Counter, Invitrogen, Karlsruhe, D) bestimmt und die Zellen ausgesät. Im Fall von SILAC-gelabelten Zellen (**Abschnitt 3.8.1**) wurden die Zellen vor dem Aussäen mit PBS gewaschen.

3.2 Experimente mit kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten

3.2.1 Isolation von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten

Neonatale Rattenkardiomyozyten und kardiale Fibroblasten (engl. NRCM bzw. NRCF) wurden aus 1-2 Tage alten Sprague Dawley-Ratten durch enzymatischen Verdau gewonnen. Alle Vorgänge wurden in einer sterilen Umgebung durchgeführt. Nach der Entnahme wurden die Herzen in eine 10 cm Zellkulturschale mit CBFHH-Puffer überführt, die für die nächsten Schritte auf Eis gestellt wurde. Nach der Entfernung der Vorhöfe wurden die Herzen in kleine Teile geschnitten und mit 15 ml Trypsinlösung für 20 min bei Zimmertemperatur (RT) auf einem Magnetrührer inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und das Gewebe für weitere 10 min unter Rühren in 10 ml frischer Enzymlösung verdaut. Die Suspension wurde vorsichtig 10x auf- und abpipettiert und der Überstand in ein mit 7,5 ml FCS gefülltes Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C im Wasserbad gelagert. Dieser Vorgang wurde mit frischer Trypsinlösung so oft wiederholt, bis die Herzen fast komplett verdaut waren. Die isolierten Zellen in dem Röhrchen wurden pelletiert (800 x g, 10 min, RT) und in 40 ml NRCM Pre-Plating-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension filtriert (40 µm Porengröße; BD, Heidelberg, D), je 10 ml des Filtrats in eine 10 cm Zellkulturschale transferiert und in einem befeuchteten Inkubator inkubiert (1 h, 1% CO₂, 37°C). Fibroblasten adhärieren während dieses Schritts am Boden der Zellkulturschale, während Kardiomyozyten im Überstand verbleiben. Der kardiomyozytenhaltige Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die Lebendzellzahl mit Trypanblaufärbung

ermittelt (Countess Cell Counter). Die Kardiomyozytensuspension wurde mit 1% FCS NRCM-Kulturmedium auf die gewünschte finale Zellmenge verdünnt, in 96-Well-Platten ausgesät und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37°C/1% CO₂ inkubiert.

Die Zellkulturschalen mit den adhärennten Fibroblasten wurden dagegen mit 12 ml PBS gefüllt und 5 min bei 37°C und 150 Umdrehungen pro Minute (rpm) geschüttelt. Die dabei abgelösten Zellen wurden in 3 Waschschrritten mit jeweils 6 ml PBS entfernt und die adhärennten Fibroblasten in NRCF/ARCF-Kulturmedium mit 10% FCS (RNA-/Proteinpräparation und Myofibroblastenumwandlung) oder 1% FCS (alle anderen Experimente) bei 37°C/1% CO₂ inkubiert.

3.2.2 Isolation von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten aus adulten Ratten

Adulte Rattenkardiomyozyten und kardiale Fibroblasten (engl. ARCM bzw. ARCF) wurden aus Sprague Dawley-Ratten durch Perfusion des isolierten Herzens mit einer Verdauungslösung gewonnen. Die ganze Prozedur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Puffer vor Benutzung auf 39°C erwärmt.

Zuerst wurden die Tiere mit Isofluran (4%) und einer intraperitonealen Injektion von Xylazin (80 mg/kg) und Ketamin (12 mg/kg) betäubt und die Herzen entnommen. Anschließend wurde die Aorta kanüliert und die Koronararterien retrograd 3 min mit Perfusionspuffer gefolgt von weiteren 28 min mit Verdauungspuffer bei einer Flussrate von 2,5 ml/min perfundiert. Anschließend wurden Atrien und große Blutgefäße entfernt, die Ventrikel kleingeschnitten, 15 ml Puffer P1 zugegeben und die Gewebestücke durch Auf- und Abbewegen mit einer Spritze für 3 min weiter dissoziiert. Die Zellsuspension wurde filtriert (100 µm Porengröße; BD, Heidelberg, D) und für 10 min bei 37°C inkubiert, damit sich die Kardiomyozyten absetzen konnten. Um die restlichen Herzmuskelzellen nicht zu verlieren, wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert (1 min, 55 x g) und das Pellet mit dem Sediment im Puffer P2 vereinigt. Die folgende Ca²⁺ (CaCl₂)-Rekonstitution erfolgte schrittweise (2x 50 µl 10 mM, 100 µl 10 mM, 30 µl 100 mM, 50 µl 100 mM; nach jeder Zugabe 4 min Inkubation), um eine finale Ca²⁺-Konzentration von 100 µM zu erreichen. Nach erneuter Sedimentation (10 min, 37°C) und anschließender Pelletierung des Überstands (1 min, 55 x g) wurden die Zellen in Pre-Plating-Medium 1-2 h bei 37°C und 1% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Kardiomyozyten pelletiert (1 min, 55 x g). Für eine anschließende RNA-Isolierung wurden sie direkt in TriFast resuspendiert.

Nach dem ersten Zentrifugationsschritt zum Sammeln der ARCM wurde der Überstand 5 min bei 250 x g zentrifugiert, um die ARCF zu pelletieren. Das Pellet wurde in 10% FCS

NRCF/ARCF-Kulturmedium resuspendiert, je 10 ml davon in eine 10 cm Zellkulturschale transferiert und 2 h bei 37°C/1% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Platten vorsichtig zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, um kontaminierende Zellen zu entfernen. Die adhärennten Fibroblasten wurden entweder sofort in TriFast resuspendiert oder in NRCF/ARCF-Kulturmedium mit 10% FCS bei 37°C/1% CO₂ kultiviert.

3.2.3 Isolation von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten aus adulten Mäusen

Adulte Mauskardiomyozyten und kardiale Fibroblasten (engl. AMCM bzw. AMCF) wurden aus C57BL/6N-Mäusen durch Perfusion des isolierten Herzens mit einer Verdauungslösung gewonnen. Die Prozedur erfolgte analog zur Isolation aus adulten Ratten (**Abschnitt 3.2.2**) mit den folgenden Änderungen: 5 min vor der Entnahme der Herzen wurde den Mäusen intraperitoneal ein Gemisch aus 50 µl Heparinlösung und 250 µl 0,9%iger NaCl-Lösung verabreicht. Der verwendete Verdauungspuffer enthielt Liberase Blendzyme 1 (60 µg/ml) und Trypsin solution (5,56 µl/ml) anstatt Kollagenase und die Perfusion dauerte lediglich 9 min.

3.2.4 Modulation der MicroRNA-Konzentration und Transfektion mit siRNA

Vor Beginn der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Transfektion von 25 nM MicroRNA-Mimics (Pre-miRTM miR-199a-3p bzw. Negative Control #1; Applied Biosystems, New Jersey, USA), 100 nM Antimirs oder 25 nM siRNA (Rn_Ywhae_3 FlexiTube siRNA bzw. Allstars negative Control siRNA; Qiagen, Hilden, D) erfolgte mit Lipofectamine 2000 gemäß den Herstellerangaben. Der finale Transfektionsansatz bestand hierbei aus gleichen Teilen von normalem Zellmedium (ohne P/S) und OptiMEM I sowie einer finalen FCS-Konzentration von 1%. Die einzige Ausnahme bildete hier das SILAC-Experiment (**Abschnitt 3.8.1**), bei dem SILAC-DMEM statt OptiMEM I eingesetzt wurde, um eine Kontamination mit unmarkierten Aminosäuren zu vermeiden. 6 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsgemisch durch das jeweils angegebene Zellmedium ersetzt. Die MicroRNA-Inhibition durch Antagomirs (500 nM Endkonzentration) erfolgte durch Zugabe ins Medium.

3.2.5 Messung der ³H-Thymidininkorporation

Einen Tag (NRCF) bzw. mindestens 3 Tage (ARCF) nach Isolation wurden die Zellen in 48-Well-Zellkulturplatten in einer Konzentration von 12.000 (NRCF) bzw. 10.000 (ARCF) Zellen pro Well in NRCF/ARCF-Kulturmedium mit 1% FCS ausgesät. Analog wurden NIH 3T3-

Fibroblasten in einer Dichte von 2.500 Zellen pro Well ausgesät. Die Modulation der MicroRNA-Konzentration bzw. die Transfektion mit siRNA wurde am Folgetag durchgeführt wie im **Abschnitt 3.2.4** beschrieben und die Zellen danach in Medium mit 10% FCS (3T3: 1% FCS) kultiviert. 48 h nach Beginn der Behandlung wurde das Zellmedium durch neues Medium ersetzt, das zusätzlich 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin enthielt. Nach weiteren 24 h in Kultur wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann in eiskalter 5% (w/v) Trichloressigsäure für mindestens 1 h bei 4°C inkubiert, um die genomische DNA zu präzipitieren. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS wurden die Zellen in 0,2 M Natronlauge 30 min bei 37°C unter em Schütteln lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe, D) gemischt und die radioaktive Strahlung in einem β -Zähler (TriCarb 2100 TR, PerkinElmer, Rodgau, D) bestimmt.

3.2.6 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Unmittelbar nach Isolation wurden NRCF trypsinisiert und in 6-Well-Zellkulturplatten in NRCF/ARCF-Kulturmedium mit 1% FCS ausgesät (150.000-200.000 Zellen/Well). Die Transfektion mit MicroRNA-Mimics wurde am Folgetag durchgeführt wie in **Abschnitt 3.2.4** beschrieben und die Zellen danach in Medium mit 1% FCS gehalten. 42 h nach Transfektion wurde das Zellmedium durch Medium ersetzt, das entweder 1% oder 10% FCS enthielt, um den Zellzyklus unterschiedlich stark zu stimulieren. 72 h nach Transfektion, d.h. 30 h nach Beginn der Stimulation, wurden die Zellen trypsinisiert, 5 min bei 300 x *g* zentrifugiert und das Pellet in Citrat-Triton-X-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von -20°C kaltem Ethanol in einer finalen Konzentration von 70% und anschließendes Vortexen für circa 2 sek wurden die Zellen fixiert und konnten anschließend bei Bedarf mehrere Wochen lang gelagert werden. Für die Färbung wurden die Zellen erneut 5 min bei 300 x *g* zentrifugiert und in einem sehr kleinen Volumen (40 μl) Citrat-Triton-X-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension mit der sechsfachen Menge Zellzyklus-Färbepuffer gemischt und 15 min bei RT im Dunklen inkubiert. Die Messung der Propidiumiodidfluoreszenz erfolgte mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). Die Zuordnung der Ereignisse zu den Zellzyklusphasen und die Entfernung von Zellaggregaten erfolgte über die Analyse der Signalfäche (FL2-A, engl. *area*) und -breite (FL2-W, engl. *width*) in Weasel, Version 3.0¹⁶⁶).

3.2.7 Umwandlung in Myofibroblasten

24 h nach Isolation wurden NRCF in NRCF/ARCF-Kulturmedium mit 10% FCS in mikroskopietauglichen 96-Well-Platten ausgesät (20.000 Zellen/Well). 24 h später erfolgte

die MicroRNA-Modulation wie in **Abschnitt 3.2.4** beschrieben. Bis 48 h nach der Behandlung wurden die Zellen in Medium mit 10% FCS kultiviert und anschließend mit PFA fixiert und mit einem Antikörper gegen α -smooth muscle actin sowie DAPI gefärbt (siehe **Abschnitt 3.7.1**). Die Bildaufnahme erfolgte mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop und einem 20x-Objektiv.

3.2.8 Myozytenhypertrophie bei Behandlung mit Fibroblasten-konditioniertem Medium

4 bis 6 Tage nach Isolation wurden ARCF in 6-Well-Zellkulturplatten in NRCF/ARCF-Kulturmedium mit 10% FCS ausgesät (120.000 Zellen/Well). 24 h später erfolgte die MicroRNA-Modulation wie in **Abschnitt 3.2.4** beschrieben. Bis 48 h nach Behandlung wurden die Zellen in Medium mit 1% FCS kultiviert, anschließend mit PBS gewaschen und frisches Medium mit 0,1% FCS zugegeben. Parallel dazu wurde Medium, das später als Kontrolle dienen sollte, in leeren Zellkulturschalen im Inkubator gelagert. 24 h später wurde das konditionierte Medium gesammelt und bei 4°C für kurze Zeit gelagert oder frisch weiterverwendet.

Für die Untersuchung der Myozytenhypertrophie wurden frisch isolierte NRCM in 5% FCS NRCM-Kulturmedium in mikroskopietauglichen 96-Well-Platten ausgesät (20.000 Zellen/Well). Am folgenden Morgen wurde das Medium durch solches mit 0,1% FCS ersetzt. 8 h später wurden die Zellen für einen Zeitraum von 48 h mit fibroblastenkonditioniertem Medium, unkonditioniertem Medium oder unkonditioniertem Medium mit 50 μ M Phenylephrin behandelt. Die PFA-Fixierung und die Färbung mit einem Antikörper gegen α -Aktinin und DAPI erfolgte wie in **Abschnitt 3.8.1** beschrieben.

Die Zellgrößenanalyse erfolgte nach einem von uns bereits beschriebenen vollautomatisierten Verfahren.⁸³ Zusammengefasst wurden hier mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop (Zeiss, Jena, D) und MetaMorph Software (Molecular Devices, Downingtown, USA) an vier vordefinierten Positionen pro Well Aufnahmen mit einem 10x-Objektiv gemacht. α -Aktinin-positive Zellen werden von der Software erkannt und die durchschnittliche Zellgröße in jeder Bedingung analysiert.

3.2.9 Behandlung von Zellen für die Analyse der *Ywhae*-Expression

Für die Messung der *Ywhae*-Expression auf mRNA- und Proteinebene wurden NRCF nach der Isolation 4 bis 7 Tage in NRCF/ARCF-Kulturmedium mit 10% FCS gehalten. Für *Real Time* PCR-Analysen wurden die Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten in 10% FCS NRCF/ARCF-

Kulturmedium ausgesät (100.000 Zellen/Well), am folgenden Tag transfiziert wie in **Abschnitt 3.2.4** beschrieben und anschließend in Medium mit 10% FCS gehalten. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und daraus Proben für die *Real Time* PCR hergestellt (siehe **Abschnitte 3.5.7 und 3.5.8**). Für *Western Blot*-Analysen wurden die Zellen stattdessen in Zellkulturschalen mit 6 cm Durchmesser in 10% FCS NRCF/ARCF-Kulturmedium ausgesät (200.000 Zellen/Well) ausgesät und anschließend transfiziert und gehalten wie zuvor beschrieben. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und daraus Proben für die *Western Blot*-Analyse hergestellt (siehe **Abschnitt 3.6**).

3.3 Untersuchungen an isolierten Megakaryozyten

3.3.1 Isolation von adulten Knochenmarkszellen

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten soweit möglich unter Sterilbedingungen. Oberschenkelknochen von 12 Wochen alten Mäusen wurden explantiert, gereinigt und kurz in 80%igen Ethanol getaucht. Anschließend wurden die Enden abgeschnitten und das Knochenmark mit eiskaltem PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA ausgespült. Nach einer Filtration (70 µm Porengröße; BD, Heidelberg, D) wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C) und das Pellet in Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Lyse durch Zugabe von PBS mit 2% FCS beendet und erneut zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C). Nach zwei Waschschritten mit PBS und jeweils anschließender Zentrifugation wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Lebendzellzahl mit Trypanblau-Färbung ermittelt (Countess Cell Counter) bestimmt.

3.3.2 Bildung von CFU-MK-Kolonien

Knochenmarkszellen wurden isoliert wie in **Abschnitt 3.3.1** beschrieben. Die Anzahl von *colony-forming unit* –Megakaryozyten (CFU-MK) wurde mit dem Megacult-C-Kit gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Zusammengefasst wurden pro Tier 1×10^5 Knochenmarkszellen pro Well einer 6-Well-Platte in Duplikaten ausgesät. Das (später fest werdende) Medium bestand dabei aus Megacult-C-Medium mit Kollagenlösung, 50 ng/ml rm TPO und 10 ng/ml rm IL-3. Nach 7 Tagen in einem Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen 5 min mit eiskaltem Aceton fixiert und anschließend mit CFU-MK-Färbepuffer im Dunklen 4 h bei RT inkubiert. Kolonien, die aus mindestens drei braun gefärbten Zellen bestanden, wurden als CFU-MK-Kolonien gewertet.

3.3.3 Proplättchenbildung

Fötale Leberzellen wurden am Tag 14,5-15,5 der Embryonalentwicklung von Mäusen isoliert. Hierzu wurde die Leber aus dem Fötus entnommen, mit einer 22 Gauge-Nadel in 2 ml FLC-Medium dispergiert und durch einen Filter gestrichen (70 µm Porengröße; BD, Heidelberg, D). Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 6-Well-Platte für Suspensionszellkultur überführt und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen resuspendiert und 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem FLC-Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (Countess Cell Counter) und auf 2 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. 400 µl Zellsuspension wurden in Triplikaten pro Well einer 24-Well-Platte für Suspensionszellkultur ausgesät und erneut bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 5 Tage nach Isolation wurden Proplättchen-bildende MKs in einem Hellfeldmikroskop ausgezählt.

3.3.4 Ausbreitung auf Extrazellulärmatrix

Fötale Leberzellen wurden isoliert wie in **Abschnitt 3.3.3** beschrieben, wobei am Tag nach der Isolation 2 ml Zellsuspension in einer 6-Well-Platte für Suspensionszellkultur ausgesät wurden. 5 bis 6 Tage nach der Isolation wurden die Zellen resuspendiert und auf einen BSA-Gradienten (2 ml 3% BSA in PBS + 2 ml 1,5% BSA in PBS + 2 ml PBS in 15 ml-Röhrchen) geladen. Nach 30 min Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die sedimentierten Zellen (angereicherte MKs) in PBS resuspendiert, um das BSA zu entfernen, und 4 min bei 100 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einem kleinen Volumen DMEM mit 10% FCS und P/S aufgenommen und in mikroskopietauglichen 96-Well-Platten (Ibidi) ausgesät, die zuvor mit Fibronectin (20 µg/ml), Fibrinogen (100 µg/ml), Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen (25 µg/ml) oder 1,5 % BSA beschichtet worden waren. Nach 3 h (Kollagen) bzw. 5 h (Fibronectin, Fibrinogen) Kultur bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen durch Zugabe eines gleichen Volumens Paraformaldehydlösung fixiert. Hellfeldbilder wurden mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop und einem 20x-Objektiv aufgenommen.

3.4 Untersuchungen an isolierten Blutplättchen

3.4.1 Bestimmung der peripheren Blutplättchenanzahl

Die Konzentration und das Zellvolumen von Blutplättchen wurde mit einem Hämozytometer (Sysmex, Norderstedt, D) bestimmt.

3.4.2 Präparation von Blutplättchen

Mäuse wurden mit Isofluran anästhesiert und Blut entweder aus dem retroorbitalen Venenplexus oder intrakardial entnommen. Für RNA-Extraktion, Flusskammer- und Thrombusretraktionsversuche wurde Blut im Verhältnis 1:9 mit Citratpuffer versetzt. Für alle anderen Experimente erfolgte die Antikoagulation durch Heparin in 20 U/ml finaler Konzentration. Das Blut wurde danach entweder zweimal in einer Tischzentrifuge 5 min und 10 min bei 50 x g oder einmalig in einer größeren Zentrifuge 20 min bei 68 x g jeweils bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert, um plättchenreiches Plasma (PRP) aus dem oberen und mittleren Abschnitt des *Buffy coats* über der Erythrozytenphase zu gewinnen. Anschließend wurde das PRP mit dem etwa doppelten Volumen Tyrode's Puffer (pH 6,5) vermengt und in einer Tischzentrifuge 5 min bei 1000 x g mit Bremse zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Tyrode's Puffer (pH 6,5) wurden die Plättchen erneut im gleichen Puffer resuspendiert, um gewaschene Blutplättchen zu erhalten. Falls nötig, wurde die Plättchenzahl hämozytometrisch bestimmt.

3.4.3 Lichttransmissionsaggregometrie

Gewaschene Blutplättchen wurden mit dem doppelten Volumen Tyrode's Puffer (pH 7,4) und je 1 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} versetzt, um eine finale Plättchenkonzentration von 1×10^8 /ml zu erhalten. Anschließend wurden die Blutplättchen mit Horm-Kollagen, Thrombin oder Convulxin stimuliert und die Lichttransmission in einem Zweikanalaggregometer (Chrono-Log, Havertown, USA) über einen Zeitraum von 10 min aufgenommen.

3.4.4 Impedanzbasierte Aggregometrie

Impedanzbasierte Aggregometrie wurde mit Hirudin-behandeltem Blut in einem Multiplate Analyser (Dynabyte Medical, München, D) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Stimulation erfolgte in diesem Fall mit den zugehörigen Reagenzien von Roche. Für die Auswertung der Aggregationsantwort wurde die *Area under the curve* (AUC) verwendet.

3.4.5 Thrombusretraktion

Plättchenreiches Plasma wurde mit dem dreifachen Volumen Tyrode's Puffer (pH 7,4) gemischt und wenige μl rote Blutzellen zugegeben, um den Kontrast des Thrombus zu erhöhen. Anschließend wurden die Proben mit 0,75 U/ml Thrombin und 4 mM CaCl_2 unter leichtem Schütteln aktiviert und in Aggregometrieröhrchen (Chrono-Log, Havertown, USA) ohne Rühren bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Fotografien

aufgenommen und mit Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA) die Thrombusfläche relativ zur Gesamtfläche der Probe ermittelt.

3.4.6 Flusskammerversuch

Flusskammern (μ -slide VI^{0.1}; Ibidi) wurden mit 250 $\mu\text{g/ml}$ Horm-Kollagen 1,5 h bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurde überschüssiges Kollagen mit PBS abgewaschen. Blut wurde im Verhältnis 1:9 mit Citrat antikoaguliert und mit 1/20 Volumen Rhodamin 6G-Chlorid 15 min bei 37°C gefärbt. Nach der Zugabe von Ca^{2+} in 1 mM Endkonzentration wurde das Blut 3 min bei einer Scherrate von 1000 sek^{-1} durch die Flusskammer perfundiert. Nach einen 3-minütigen Waschvorgang mit PBS wurden Fluoreszenzbilder mit einem AxioObserver.Z1 Mikroskop und einem 10x Objektiv aufgenommen und die von Blutplättchen bedeckte Fläche mit Image J quantifiziert.

3.4.7 Durchflusszytometrische Messung von Plättchenrezeptoren und Aktivierungsmarkern

Gewaschene Blutplättchen wurden mit den jeweils angegebenen fluorophorgekoppelten Antikörpern und gegebenenfalls Thrombin bzw. Convulxin in Tyrode's Puffer (pH 7,4) 20 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte an einem FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Biosciences).

3.5 Methoden zur DNA- und RNA-Analyse

3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Ethidiumbromid, das sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, diente zur Visualisierung des resultierenden Bandenmusters unter UV-Licht (312 nm).

Für die Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose in der gewünschten Endkonzentration in 100 ml 1x TAE-Puffer bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Wenn sich die Lösung bis auf Handwärme abgekühlt hatte, wurde Ethidiumbromid (1 mg/ml, 10 μl) zugegeben und die Lösung in Gelschlitten mit entsprechenden Taschenformern (Peqlab, Erlangen, D) gegossen. Nach dem Aushärten der Gele wurden mit DNA-Ladepuffer versetzte Proben zusammen mit einem Größenstandard (New England BioLabs) aufgetragen und die Elektrophorese bei ca. 130 V in Laufkammern mit 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die

Visualisierung erfolgte in einem UV-Geldokumentationsgerät (Decon Science Tec, Hohengandern, D). Die DNA-Extraktion aus ausgeschnittenen Gelstücken erfolgte nach den Herstellerangaben mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit.

3.5.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* Zellen und Plasmidpräparation

Plasmid-DNA bzw. Ligationsprodukte (max. 100 ng) wurden zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot von elektrokompentenen DH10B-Zellen (50 µl) gegeben und die Zellsuspension in eine Glasküvette (Gene Pulser 0,1 cm Küvette; BIO-RAD, München, D) überführt. Die Bakterien wurden einem kurzen elektrischen Puls (1,8 kV; Gene Pulser, BIO-RAD) ausgesetzt und unmittelbar danach mit 400 µl warmem LB-Medium versetzt. Während der folgenden Stunde wurde die Zellsuspension bei 37°C und 400 rpm geschüttelt und anschließend das gewünschte Volumen auf einer LB-Agar-Platte mit dem passenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin; 33 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Die Platte wurde danach über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurde ein Bakterienklon von der Agarplatte zum Animpfen von 4 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin; 33 µg/ml Kanamycin) verwendet und die Suspension bei 37°C und 100 rpm über Nacht geschüttelt. Für größere Ansätze wurden 3 ml dieser Vorkultur in 100 ml antibiotikumhaltiges Medium überführt und erneut über Nacht inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte im Anschluss mit QIAGEN Plasmid Midi bzw. Maxi Kits gemäß den Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde an einem Nanodrop Spektrophotometer ND 1000 (Peqlab, Erlangen, D) bestimmt.

3.5.3 Restriktionsverdau und DNA-Ligation

Die gewünschte DNA-Menge wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (ca. 10 U pro µg DNA) und dem mitgelieferten Reaktionspuffer ca. 1,5 h bei 37°C inkubiert. Die Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt, unter UV-Licht kontrolliert und gegebenenfalls gewünschte Fragmente aus Gelstücken eluiert (siehe **Abschnitt 3.5.1**).

DNA-Ligationen wurden mit T4 DNA-Ligase im zugehörigen Puffer durchgeführt. Hierfür wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl etwa 50 ng eines verdauten Vektors und die 3- bis 10-fache Menge an verdautem *Insert* eingesetzt und der Gesamtansatz entweder 2 h bei 25°C oder 16 h bei 16°C inkubiert. Ligationsprodukte wurden in der Regel zur Transformation von Bakterien verwendet und die Identität von Klonen durch Antibiotikaresistenz, Restriktionsverdau oder Sequenzierung überprüft. Falls nur ein

Restriktionsenzym eingesetzt wurde, wurde der verdauter Vektor vor der Ligation mit *Antarctic Phosphatase* und entsprechendem Puffer inkubiert (30 min bei 37°C, 30 min bei 50°C und anschließend 5 min bei 65°C), um ihn zu dephosphorylieren und damit eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern.

3.5.4 DNA-Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von MWG Biotech durchgeführt. Hierfür wurden DNA-Proben in einer Konzentration von ca. 1000 ng/µl an die Firma geschickt und mit passenden Primern sequenziert. Der Abgleich der Ergebnisse mit den gewünschten Sequenzen fand in MacVector (Cary, USA) statt.

3.5.5 Herstellung von MicroRNA-Fluoreszenzreporterkonstrukten

Ein freundlicherweise von Prof. Dr. Markus Stoffel (ETH Zürich) zur Verfügung gestellter Vektor diente als Ausgangsplasmid für die Herstellung des miR-199-3p-Reporters (siehe **Abbildung 7A**). Um die darin vorhandenen miR-22-Bindestellen durch miR-199-3p-Bindestellen zu ersetzen, wurde eine 247 bp lange DNA-Sequenz synthetisiert (GeneArt, Regensburg, D), die zwei komplementäre miR-199-3p-Bindestellen enthielt und ansonsten homolog zu einem Bereich des Ausgangsvektors war. Durch den Verdau mit den Restriktionsenzymen SpeI und XcmI, deren Erkennungssequenzen sich am Rand der synthetisierten Sequenz und im Vektor befanden, und anschließende Ligation wurde die gewünschte Sequenz in den Vektor eingebracht und endotoxin-freie Plasmid-DNA hergestellt.

Adenovirale Vektoren wurden mit dem ViraPower Adenoviral Expression System (Invitrogen) hergestellt. Hierfür wird erst ein relativ kleiner *Entry*-Vektor hergestellt, und die gewünschte Sequenz dann in einen Destinationsvektor überführt, der zusätzliche Sequenzen für die Virusproduktion enthält. Beide Vektoren wurden mit der Gateway-Technologie hergestellt, bei der sogenannte att-Stellen spezifisch miteinander reagieren (BP- bzw. LR-Rekombination). Es wurde zuerst versucht, den gesamten relevanten Bereich (Promotoren, fluorophorkodierende Sequenzen, MicroRNA-Bindestellen und Polyadenylierungsstellen) durch eine PCR mit AccuPrime Pfx DNA Polymerase und Primern mit att-Stellen zu amplifizieren und das Produkt mittels BP-Reaktion in ein pDONR221-Plasmid (Invitrogen) zu überführen, der damit zum *Entry*-Vektor würde. Dabei gingen allerdings bei allen Versuchen die Promotorbereiche verloren. Es ist daher zu vermuten, dass die beiden identischen Promotorregionen eine Sekundärstruktur bilden, die von der Polymerase übersprungen wird. Um den fehlenden Bereich zu ersetzen, wurde mittels Restriktionsverdau und Ligation ein

von NotI-Schnittstellen begrenztes Fragment, das die kompletten Promotorregionen enthielt, aus dem originalen miR-199-3p-Reporter-Plasmid in den unvollständigen *Entry*-Vektor kloniert. Mittels einer LR-Reaktion wurde die gewünschte Region aus diesem (korrekten) Vektor dann in den pAd-PL-DEST Destinationsvektor (Invitrogen) überführt. Die Virusproduktion geschah gemäß den Empfehlungen zum ViraPower Adenoviral Expression System. Zuerst wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym PacI verdaut, um die *inverted terminal repeats* freizulegen, die für die Virusreplikation und –verpackung wichtig sind. Das Produkt wurde mit Lipofectamine 2000 in HEK293-Zellen transfiziert und der Virus über drei Passagen amplifiziert. Der Virustiter im Überstand der dritten Passage wurde mit dem Adeno-X Rapid Titer Kit in HEK293-Zellen bestimmt.

3.5.6 Genotypisierung von miR-223-defizienten Mäusen

Für die Genotypisierung wurde adulten Mäusen oder Föten eine circa 2 mm große Gewebebiopsie entnommen und in 500 µl Lysispuffer bei 55°C und 900 rpm geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Proben mit 250 µl gesättigter Natriumchloridlösung versetzt, kurz geschüttelt und 10 min aus Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (2 min, 20.000 x g, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, 650 µl Isopropanol zugegeben und die Proben invertiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 20.000 x g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die präzipitierte genomische DNA durch Zugabe von 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert (5 min, 20.000 x g, 4°C), der Überstand verworfen und die DNA in 500 µl Wasser aufgelöst.

Für die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) wurde ein gemeinsamer Reaktionsansatz für Männchen (nur ein X-Chromosom, d.h. nur ein *Mir223*-Allel) bzw. zwei Ansätze für Weibchen hergestellt:

Ansatz für Männchen:

Substanz	Volumen
Primer mir223rev (10 µM)	1 µl
Primer mir223fwd (10 µM)	1 µl
Primer Neofwd (10 µM)	1 µl
GoTaq Green Master Mix	10 µl
Aqua dest.	5 µl

Ansätze für Weibchen:

Substanz	Volumen
Primer mir223rev (10 µM)	1 µl
Primer mir223fwd (10 µM) bzw. Primer Neofwd (10 µM)	1 µl
GoTaq Green Master Mix	10 µl
Aqua dest.	6 µl

In einem Thermocycler (Mastercycler Pro, Eppendorf, Hamburg, D) wurde die anschließende Amplifikationsreaktion nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Vordenaturierung	95°C	2 min	35x
Denaturierung	95°C	30 sek	
Hybridisierung	53,5°C	30 sek	
Elongation	72°C	40 sek	
End-Elongation	72°C	5 min	

Die PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch auf 1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt und in einem UV-Geldokumentationsgerät analysiert, um Wildtypen und miR-223-defiziente Tiere zu unterscheiden.

3.5.7 RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde aus Zellen oder Geweben mit dem miRVana miRNA Isolation Kit, dem miRNeasy Mini Kit oder TriFast gemäß den Herstellerangaben gewonnen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

3.5.8 Quantitative *Real-Time*-PCR

3.5.8.1 Quantifizierung von MicroRNAs

Die Expression einzelner MicroRNAs und von U6 snRNA wurden mit TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) gemäß den Herstellerangaben gemessen. Der

Reaktionsansatz (Komponenten aus *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit*) für die Reverse Transkription lautete hierbei:

Substanz	Volumen
10x Puffer	1,5 µl
5x RT-Primer	3 µl
dNTPs (10 mM)	0,15 µl
RNase Inhibitor	0,19 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
RNA (2 ng/µl)	5 µl
ddH ₂ O	4,16 µl

Temperaturprogramm für die Reverse Transkription (Mastercycler Pro):

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

Für die TaqMan-basierte quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR) wurde folgender Ansatz hergestellt:

Substanz	Volumen
2x TaqMan Universal PCR Master Mix II, no UNG	10 µl
20x TaqMan RNA Assay	1 µl
RT-Reaktion	1,33 µl
ddH ₂ O	7,67 µl

Temperaturprogramm (StepOne Plus; Applied Biosystems, New Jersey, USA):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Vorinkubation	50°C	2 min	40x
Enzymaktivierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sek	
Hybridisierung/ Elongation	60°C	60 sek	

Globale MicroRNA-Profile von ARCF und ARCM (500 ng RNA pro Probe) wurden mit Hilfe des miRNome microRNA Profilers QuantiMir Kits (Rat, Version 14) erstellt. Die Analyse wurde mit qPCR im 384 Well-Format gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die relative Abundanz von Transkripten wurde mit Hilfe der *Cycle thresholds* (Ct) nach der $\Delta\Delta C_t$ - Methode ($=2^{-(\Delta C_t(\text{Gruppe X})-\Delta C_t(\text{Kontrollgruppe}))}$) bestimmt.

3.5.8.2 Quantifizierung von mRNAs

Für die Synthese von *complementary DNA* (cDNA) für die Quantifizierung von protein-kodierenden mRNAs wurde das SuperScript II Reverse Transcriptase Kit benutzt. Oligo(dT)-Primer, die an das polyadenylierte 3'-Ende der Transkripte binden, dienten hierbei als Startpunkt für die Reverse Transkription. Der hierfür verwendete Reaktionsansatz lautete:

Substanz	Masse / Volumen
RNA	1000 ng
Oligo(dT) Primer (10 mM)	2 μ l
RNase-freies Wasser	ad 11,9 μ l
Inkubation für 10 min bei 70°C	
5x First Strand Puffer	4 μ l
DTT (0,1 M)	2 μ l
dNTPs (1 mM)	1 μ l
RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor	0,1 μ l
Reverse Transkriptase	1 μ l

Der obige Ansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert und danach hitzeinaktiviert (10 min, 70°C). Anschließend wurde cDNA auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l verdünnt. Falls die RNA-Konzentration einer Probe in einem Experiment nicht ausreichte, um 1000 ng in obigem Ansatz zu erreichen, wurde die eingesetzte Konzentration in allen zu vergleichenden Proben entsprechend reduziert.

Für die folgende qPCR wurde cDNA auf 2,5 ng/ μ l weiter verdünnt. Der Reaktionsansatz lautete:

Substanz	Volumen
Fast Start Universal SYBR Green Mastermix (ROX)	6,25 μ l
5' Primer (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
3' Primer (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
cDNA (2,5 ng/ μ l)	2,50 μ l
ddH ₂ O	3,25 μ l

Temperaturprogramm (StepOne Plus; Applied Biosystems, New Jersey, USA):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Vordenaturierung	95°C	10 min	40x
Denaturierung	95°C	15 sek	
Hybridisierung/ Elongation	60°C	60 sek	
Haltestufe	65°C	90 sek	
Schmelzkurven- analyse	95°C	15 sek	
	60°C	1 min	
	60-95°C in 0,3°C- Schritten	15 sek	

Anhand des Schmelztemperaturprofils wurde die korrekte Größe des PCR-Produkt überprüft. Die relative Abundanz von Transkripten wurde wie bei der Quantifizierung von MicroRNAs mit Hilfe der *Cycle Thresholds* (Ct) nach der $\Delta\Delta Ct$ - Methode bestimmt.

3.5.9 Microarrays

Für die Erstellung der Micro-RNA-Profile von adulten kardialen Mausfibroblasten und Mauskardiomyozyten mittels Microarrays wurden jeweils gleiche Mengen RNA aus den jeweiligen Zellfraktionen von drei Mäusen gepoolt. Zusätzlich wurden gleiche Mengen RNA aus 5 neonatalen und adulten Mausherzen gemischt, um eine universelle Referenzprobe herzustellen, die zur Normalisierung der Signale zwischen den einzelnen Microarrays dient. Die Prozessierung der Proben und Microarray-Analyse wurde von Exiqon durchgeführt. Hierfür wurden mit dem passenden Kit 250 ng jeder gepoolten Probe mit dem Fluorophor Hy3 und dieselbe Menge der universellen Referenz mit Hy5 markiert. Die markierten Proben wurden jeweils gemischt und auf miRCURY LNA arrays (Exiqon) hybridisiert. Die verwendete Version (Version 10.0) enthielt Sonden zur Detektion aller MicroRNAs aus Mensch, Maus und Ratte der miRBase Version 11.0 (www.mirbase.org). Die Hybridisierung erfolgte in einer HS4800 Hybridisation Station (Tecan, Grödig, A) gemäß den Angaben des Microarray-Herstellers. Anschließend wurden die Microarrays in ozonfreier Umgebung gelagert, um eine Bleichung der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, und mit einem G2505B Microarray Scanner System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gescannt. Die Bildanalyse erfolgte mit ImaGene 7.0 (BioDiscovery, El Segundo, USA). Die maximalen Signale des lokalen Hintergrunds und der Negativkontrollen wurden vom Vordergrundsignal abgezogen, um das Rohsignal für jede Sonde zu erhalten. Die weitere Prozessierung der Daten umfasste die Entfernung von Regionen niedriger Qualität und die Normalisierung mit dem globalen Lowess (engl. *LOcally WEighted Scatterplot Smoothing*) Regressionsalgorithmus

(Exiqon). Für den Vergleich der MicroRNA-Expression von Fibroblasten und Kardiomyozyten wurden die Signale der Hy3-markierten Proben nach Normalisierung auf die jeweiligen Werte der universellen Referenz (Hy5) benutzt. Für die Analyse der relativen Abundanz der verschiedenen MicroRNAs in einem Zelltyp wurde dagegen allein mit den Hy3-Signalen gearbeitet.

3.6 Western Blot

3.6.1 Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Kultivierte Zellen wurden mit einem kleinen Volumen Lysepuffer (max. 400 µl bedeckt, das Lysat mit einem Zellschaber (Sarstedt) gesammelt und in ein 1,5 ml Röhrchen überführt. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine Zersetzung der Proben zu verhindern. Die Proben wurden mit einem Sonopuls Ultraschallhomogenisator (Bandelin, Berlin, D) behandelt, um die Zellen vollständig aufzuschließen und genomische DNA zu zerkleinern. Nicht gelöste Bestandteile wurden in einem Zentrifugationsschritt (5 min, 14.000 x g) entfernt.

Die Proteinkonzentration wurde mit einer einer kolorimetrischen Methode, dem *Bicinchoninic Acid* (BCA) Assay, gemessen. Diese Methode beruht auf dem linearen Anstieg der Absorption in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. 10 µl Proteinlysate wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:10 (abhängig von der erwarteten Proteinkonzentration) mit ddH₂O verdünnt. Außerdem wurden die im Kit enthaltenen Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 gemischt. Jetzt wurden jeweils 20 µl von verdünnten Proben, Standards mit bekannter Proteinkonzentration und eine Leerprobe in Triplikaten auf eine transparente 96-Well-Platte (Thermo Scientific) aufgetragen und je 200 µl der A/B-Mischung zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption bei 562 nm (Infinite M200, Tecan, Männedorf, CH).

Anschließend wurde die Lysate mit Lysepuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und mit 1/6-Volumen Laemmli-Puffer gemischt. Die Lagerung erfolgte entweder kurzfristig bei -20°C oder langfristig bei -80°C.

3.6.2 Herstellung von Polyacrylamidgelen und Gelelektrophorese

Für *Western Blot*-Analysen wurden 12%ige Polyacrylamidgele verwendet, die aus den folgenden Ansätzen für Sammel- und Trenngel bestanden:

Sammelgel	Substanz	Menge
	Rotiphorese Gel 30	0,50 ml
	Puffer für Sammelgel	1,25 ml
	ddH ₂ O	3,20 ml
	TEMED	6,00 µl
	APS (10%)	48,00 µl
Trenngel	Rotiphorese Gel 30	7,50 ml
	Puffer für Trenngel	5,70 ml
	Glycerol	3,75 ml
	ddH ₂ O	5,55 ml
	TEMED	18,00 µl
	APS (10%)	108,00 µl

Für jedes Gel wurden zwei Glasplatten in einer Gelgießstation (Mini-Protean Tetra System, BIO-RAD, München, D) fixiert. Sobald die Radikalreaktion, die zur Polymerisierung führt, durch Zugabe von APS und TEMED gestartet worden war, wurde das Gemisch für das Trenngel zwischen beide Glasplatten bis auf $\frac{3}{4}$ der Gesamthöhe gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten wurde das Isopropanol entfernt, das Gemisch für das Sammelgel zugegeben und umgehend der gewünschte Taschenformer (BIO-RAD) eingesetzt. Fertig polymerisierte Gele wurden entweder sofort verwendet oder über Nacht bei 4°C gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurde Proteinlysate mit 20 bis 50 µg Proteingehalt 10 min bei 90°C denaturiert. Die Lysate wurden dann neben einem Proteingrößenmarker (5 µl pro Tasche; Fermentas) in die Taschen des Gels übertragen, das sich in einer mit Laufpuffer gefüllten Kammer befand, und die Elektrophorese gestartet (30 mA pro Gel, 45-75 min).

3.6.3 Membrantransfer, Stripping und Detektion von Proteinen

Mit *Wet Blotting* wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-FL, Millipore, Schwalbach, D) übertragen. Hierfür wurde die Membran erst durch Methanol 2 min bei RT aktiviert und anschließend zusammen mit sechs Blättern Gel-Blotting-Papier (195 g/m², Hartenstein, Würzburg, D) für drei bis fünf Minuten in Transferpuffer getaucht. Für den Blot wurden dann die Membran und das Acrylamidgel zusammen zwischen jeweils drei Lagen Gel-Blotting-Papier gepackt und der Proteintransfer in einer mit Transferpuffer und einer Eispackung gefüllten Mini-Protean-Kammer für 1,5-2 h bei 370 mA durchgeführt. Anschließend wurden die Membran in Blockpuffer entweder 2 h

bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt und alle weiteren Inkubationen mit Antikörpern und Waschlösungen wurden auf einem Taumelschüttler bei 40 rpm durchgeführt. Als Nächstes erfolgte eine Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünnten YWHAE-Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Primärantikörperlösung zur mehrmaligen Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Membran wurde sechsmal je 5 min mit Waschpuffer behandelt und dann mit dem in Waschpuffer verdünnten Sekundärantikörper (HRP anti-Kaninchen) entweder 1,5 – 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen erfolgte die Lumineszenzdetektion mit ECL Plus gemäß den Herstellerangaben. Für die Visualisierung und Quantifizierung von Proteinbanden wurde ein digitales Imaging-System (LAS 4000 Mini, Fujifilm, Düsseldorf, D) und die dazugehörige Software (MultiGauge) verwendet. Da die verwendete endogene Kontrolle GAPDH auf Gelen mit einem apparenten Molekulargewicht von 36 kDa fast auf der selben Höhe wie YWHAE (28 kDa) läuft, wurden beide Proteine nacheinander detektiert, d.h. vor der GAPDH-Detektion wurden sämtliche gebundenen Antikörper von der Membran entfernt (engl. *stripping*). Hierfür wurde die Membran mit 50°C heißem Stripping-Puffer bedeckt und 10 min auf einem Taumelschüttler inkubiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und die Membran anschließend sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Die folgenden Schritte (Inkubation mit Blockpuffer, Primär- und Sekundärantikörper, Detektion) erfolgten wie für YWHAE, außer dass hier als Sekundärantikörper HRP anti-Maus verwendet wurde und mit ECL detektiert wurde.

3.7 Mikroskopische Untersuchung von Zellen und Gewebeschnitten

3.7.1 Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Zellen

Kultivierte Zellen wurden mit Paraformaldehydlösung fixiert (5 min, RT) und danach drei Mal mit PBS gewaschen. Fixierte Zellen wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch Inkubation mit 0,2% Triton-X (verdünnt in PBS) für 5 min bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit Erstantikörper bzw. einer Mischung aus Zweitantikörper und DAPI (20 mg/ml, 1:200, alle verdünnt in PBS) für jeweils 30-60 min im Dunklen bei RT, wobei ungebundenes Reagenz jeweils anschließend durch drei Waschschrte mit PBS entfernt wurde. Abschließend wurden die Zellen mit 50% Glycerin überschichtet und bis zur Untersuchung bei 4°C gelagert. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop und einem 20x-Objektiv.

3.7.2 Histologie

3.7.2.1 Herstellung und Färbung von Paraffinschnitten

Mausherzen wurden in Paraformaldehydlösung 24 h bei 4°C auf einem Rollschüttler fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. In einem automatisierten Spin Tissue Processor (STP 120, Thermo Scientific) wurden sie anschließend in einer ansteigenden Ethanolreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2x 100%; je 2 h) dehydriert, dann in Roti-Histol (2 x 2 h) und schließlich in flüssiges Paraffinwachs (2 x 2 h) überführt. Danach wurden die Herzen in Paraffinblöcke gegossen. Es wurden 8 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt (Mikrotom HM 335 E, Microm, Walldorf, DH), die auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 42°C getrocknet wurden.

Vor den Färbungen wurden die Schnitte in Toluol entparaffiniert (2x 10 min) und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100%: 2 x 5 min, 90%: 5 min, 70%: 5 min, 50%: 5 min, ddH₂O: 5 min).

Interstitielles Bindegewebe wurde mit Sirius Rot angefärbt, einem Farbstoff, der spezifisch in Kollagenfasern interkaliert und mit *Fast Green* gegengefärbt. Hierzu wurden entparaffinierte, rehydrierte Gewebeschnitte in vorgewärmter Bouin's Lösung für 1 h bei 58°C inkubiert und anschließend 10 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Danach wurde mit 0,1% *Fast Green*-Lösung (30 min), 1% Essigsäure (1 min) und Leitungswasser (5 min) behandelt, gefolgt von einem Färbeschritt mit 0,01% Sirius Rot-Lösung (30 min, alle bei RT). Nach einer erneuten Dehydrierung in einer aufsteigender Ethanolreihe (70%: 10 sek, 100%: 1 min) und Toluol (3 min) wurden die Schnitte mit Depex eingedeckt und über Nacht bei RT getrocknet.

Färbungen mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) dienen zur morphologischen Untersuchung von Gewebeschnitten. Das Zytoplasma erscheint dabei rosa, während Zellkerne blau gefärbt sind. Entparaffinierte, rehydrierte Gewebeschnitte wurden 2 min mit Hämatoxylin 2-Lösung behandelt und anschließend nacheinander in 3 Bäder mit Leitungswasser getaucht (wenige sek, 30 sek, 2 min). Anschließend wurden sie 10 sek mit Clarifier 2 inkubiert und 60 sek in Leitungswasser getaucht. Als Nächstes erfolgte eine Behandlung mit Bluing Reagent (30-60 sek) und erneut 60 sek Inkubation im Wasserbad. Nach dem folgenden Färbeschritt mit Eosin-Lösung (1 min) wurden die Schnitte erneut 10 sek in Leitungswasser getaucht und anschließend in einer aufsteigender Ethanolreihe (80%: 10-30 sek, 100%: 1 min) und Toluol (3 min) dehydriert. Die Eindeckung mit Depex erfolgte wie oben beschrieben.

Für die Auswertung der Färbungen wurden Hellfeld-Aufnahmen mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop und einem 10x-Objektiv gemacht und mit der MetaMorph Software zu einer Übersichtsaufnahme des ganzen Herzens zusammengesetzt. Rot gefärbte Bereiche (Sirius

Rot/Fast Green) bzw. von Leukozyten infiltrierte Bereiche (H&E) wurden im Verhältnis zur Fläche des linken Ventrikels quantifiziert.

3.7.2.1 Herstellung und Färbung von Kryoschnitten

Die Femora von adulten Mäusen wurden von Gewebearhängseln befreit und mindestens 24 h bei 17°C und 500 rpm in Dekalzifizierungslösung inkubiert. Anschließend wurden die nun weichen Knochen in Cryomatrix eingegossen und bei -80°C gelagert. Danach wurden an einem Kryotom (CM 1900; Leica, Wetzlar, D) 5 µm dicke Kryoschnitte hergestellt und diese ca. 20 min bei RT getrocknet, bevor sie bei -80°C gelagert wurden.

Vor der Anfärbung wurden die Kryoschnitte in Paraformaldehydlösung 15 min bei RT fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Als Nächstes erfolgten die Unterdrückung unspezifischer Fluoreszenz durch 2% Glycin-Lösung (5 min, RT), die Permeabilisierung mit 0,25% Triton-X (5 min, RT, beide verdünnt in PBS), jeweils unterbrochen von einem Waschschrift in PBS. Nach der Blockade unspezifischer Bindungsstellen durch 3% BSA (1 h, RT, verdünnt in PBS) erfolgte die Inkubation mit den Erst- und Zweitantikörpern (verdünnt in PBS mit 3% BSA, jeweils 1 h, RT). Ungebundene Antikörper wurden jeweils durch dreimaliges Waschen mit TBS entfernt. Abschließend wurden die Schnitte mit Vectashield-DAPI eingedeckt und bei 4°C bis zur Auswertung gelagert.

Pro Tier wurden mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop und einem 20x-Objektiv jeweils mindestens vier Aufnahmen gemacht und CD41-positive Zellen mittels MetaMorph Software in einer automatisierten Routine ausgewertet.

3.7.3 MicroRNA-Fluoreszenzreporter

Ein bis vier Tage nach Isolation wurden NRCF in NRCF/ARCF-Kulturmedium mit 10% FCS in mikroskopietauglichen 96-Well-Platten ausgesät (20.000 – 30.000 Zellen/Well). 24 h später erfolgte die MicroRNA-Modulation wie in **Abschnitt 3.2.4** beschrieben und weitere Kultivierung unter 10% FCS. 48 h nach dieser Behandlung wurden die Zellen mit dem adenoviralen miR-199-3p-Reporterkonstrukt (**Abschnitt 3.5.5**) in einer *multiplicity of infection* von 1000 infiziert, wobei der Antagomir in den entsprechenden Bedingungen ersetzt wurde. Weitere 24 h später wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Fluoreszenzaufnahmen mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop und einem 10x-Objektiv angefertigt.

NIH 3T3-Zellen wurden transfiziert oder mit Antagomir behandelt wie in **Abschnitt 3.8.1** beschrieben. Um die Bedingungen vergleichbar zum SILAC-Experiment zu halten, wurde die MicroRNA-Modulation in großen Zellkulturschalen (6 cm oder 10 cm Durchmesser)

durchgeführt. 24 h später wurden die Zellen allerdings mit Trypsin abgelöst und in mikroskopietauglichen 96-Well-Platten in DMEM mit 10% FCS ausgesät. Die Transfektion mit dem miR-199-3p-Fluoreszenzreporter-Plasmid in einer Konzentration von 0,2 µg/Well erfolgte 6 h später mit Lipofectamin 2000 gemäß den Empfehlungen des Herstellers. 48-50 h nach Beginn der MicroRNA-Modulation wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop und einem 10x-Objektiv angefertigt. Die Quantifizierung erfolgte in Metamorph, wobei ein unterer Grenzwert für den grünen Kanal definiert wurde, so dass nur fluoreszierende Zellen erfasst wurden.

3.8 SILAC-basierte Proteomanalyse

Um einen möglichst umfassenden Datensatz der Proteinregulation durch miR-199-3p zu erhalten, wurden NIH 3T3-Fibroblasten in einer SILAC-basierenden Proteomanalyse untersucht. Der Einfluss sowohl der Überexpression als auch der Inhibition von miR-199-3p im Vergleich zu jeweiligen Kontrollen wurde dabei in je zwei biologischen Replikaten gemessen.

3.8.1 SILAC-Markierung und miR-199-3p-Modulation von NIH 3T3-Fibroblasten

NIH 3T3-Fibroblasten wurden in der Anwesenheit von 10% FCS und L-Prolin im Überschuss in SILAC-Medium kultiviert, das entweder schweres L-Lysin (Lys-4 = $^2\text{H}_4$ -markiert) und L-Arginin (Arg-6 = $^{13}\text{C}_6$ -markiert) oder ihre unmarkierten, leichten Gegenstücke (Lys-0, Arg-0) enthielt, bis in der schweren Bedingung mindestens $\geq 95\%$ der Peptide markiert waren. Arginin und Lysin wurden gewählt, weil das beim späteren Proteinverdau verwendete Trypsin nach diesen Aminosäuren spaltet und dadurch Peptide entstehen, die jeweils genau eine dieser Aminosäuren enthalten und anhand ihres spezifischen Massenunterschieds der leichten oder schweren Fraktion zugeordnet werden können.

Für die Herstellung der Proben für die Massenspektrometrie wurde miR-199-3p in zwei getrennten Vergleichen entweder durch Transfektion mit miR-199-3p-Mimics überexprimiert oder durch Zugabe von Antagomir-199a-3p inhibiert wie in **Abschnitt 3.2.4** beschrieben. Die Überexpression/Inhibition erfolgte dabei jeweils in leichten Zellen mit leichtem Medium, während für die jeweiligen Negativkontrollen (miR-ctrl-Mimics bzw. unbehandelte Zellen) die schweren Pendanten benutzt wurden. Für die Dauer des Experiments wurde FCS in 1% finaler Konzentration verwendet, um eine Beeinflussung der Zellproliferation durch zu hohe Konfluenz auszuschließen.

48 h nach Beginn der Behandlung wurden Proteinlysate hergestellt und die Proteinkonzentration im BCA-Assay gemessen wie in **Abschnitt 3.6.1** beschrieben. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Parallel zur Herstellung von Proben für Proteinlysate wurde ein Teil der behandelten Zellen für die Überprüfung der miR-199-3p-Modulation in einem Fluoreszenzreporterassay verwendet (**Abschnitt 3.7.3**).

3.8.2 Proteinverdau

Leichte und zugehörige schwere Proteinlysate wurden in gleichem Proteinmassenverhältnis gemischt, für 1 h bei 20°C und 52.000 x g ultrazentrifugiert und die Proteine im Überstand mit 10 mM DTT and 55 mM Iodacetamid reduziert und alkyliert.

Jeweils 200 µg Proteinextrakt wurden durch Zugabe von 2 µg Trypsin mit Hilfe von *filter-aided sample preparation* (FASP) verdaut wie zuvor beschrieben¹⁶⁷ und lyophilisiert (Univapo 150 ECH, UniEquip, Planegg, D). Um die Probenkomplexität zu verringern, wurden die Peptide auf Säulen mittels Starker Anionenaustauschchromatographie (engl. *strong anion exchange chromatography* (SAX)) in sechs Fraktionen (pH 11, pH 8, pH 6, pH 5, pH 4 und pH 3) aufgetrennt¹⁶⁸ und mit Hilfe von C18-Stage-Pipettenspitzen¹⁶⁹ entsalzt und erneut lyophilisiert.

3.8.3 LC-MS/MS

Eine Nanoflow LC-MS/MS (Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (engl. *liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) wurde durch Kopplung eines nanoLC-Ultra 1D+ HPLC-Geräts (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*; Eksigent, Dublin, USA) an ein Orbitrap Velos Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bremen, D) durchgeführt. Die getrockneten tryptischen Peptide wurden hierfür in 20 µl 0,1% Ameisensäure aufgelöst und auf eine Reprisil PUR AQ Vorsäule (75 µm x 2 cm, gefüllt mit 5 µm C18-Harz, Dr. Maisch, Ammerbuch, D) bei einer Flussrate von 5 µl/min in 100% Puffer A (0,1% Ameisensäure in Wasser in HPLC-Qualität) geladen. Nach 10 Minuten Lade- und Waschvorgang wurden die Peptide in eine Reprisil PUR 120 GOLD Analysensäule (75 µm x 40 cm, gefüllt mit 3 µm C18-Harz, Dr. Maisch, Ammerbuch, D) transferiert und über einen 225-Minuten-Lösungsmittelgradient von 7% bis 35% Puffer B (0,1% Ameisensäure in Acetonitril) bei einer Flussrate von 300 nl/min aufgetrennt und mittels Elektrospray eingesprüht. Die Orbitrap Velos wurde im datenabhängigen Modus (DDA) mit automatischer Umschaltung zwischen MS und MS2 und einer Auflösung von 30000

betrieben. Für die 10 intensivsten Peptide in jedem MS-Durchlauf wurden nach *higher energy collisional dissociation* (HCD)-Fragmentierung bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 40% MS2-Spektren bei einer Auflösung von 7500 aufgenommen.

Die Identifizierung und Quantifizierung von Peptiden erfolgte mit MaxQuant (Version 1.2.3.3)¹⁷⁰ anhand der Proteinsequenz-Datenbank IPI (ipi.MOUSE.v3.68), wobei Carbamidomethylcystein als feste Modifikation und Oxidation von Methionin sowie Acetylierung des Protein-N-terminus als variable Modifikationen verwendet wurden. Trypsin wurde als proteolytisches Enzym angegeben und maximal zwei nicht verdaute Schnittstellen zugelassen. Die Peptidtoleranz wurde auf 5 ppm für das Vorläuferion und auf 0,2 Da für MS/MS eingestellt. Proteinidentifikationen wurden mit einer *peptide and protein false discovery rate* von 0,01% gefiltert. Zur Datenauswertung wurden die MaxQuantdaten dann in Perseus (Version 1.2.3.3) geladen und auf reverse Identifikationen (Falsch-Positive) und Kontaminanten gefiltert.

3.8.4 Zuordnung zu Target-Vorhersagealgorithmen und zu den GO und DAVID-Datenbanken

Über Ensembl Biomart (www.ensembl.org/biomart) wurden die Proteingruppen anhand ihrer IPI-Identifikationsnummern den zugehörigen Genen zugeordnet. Die 3' UTR (engl. *untranslated region*) der entsprechenden mRNA-Transkripte wurde mit dem bioinformatischen Vorhersagealgorithmus TargetScanMOUSE (version 6.2, www.targetscan.org) auf die Anwesenheit einer möglichen Bindestelle für miR-199-3p überprüft. Zusätzlich wurde für die gefundenen Gene in den Datenbanken der Gene Ontology (GO) (www.informatics.jax.org/searches/GO_form.shtml) und der Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (david.abcc.ncifcrf.gov) nach einer Assoziation mit den Kategorien „*proliferation*“ (Proliferation), „*cell cycle*“ (Zellzyklus), „*cell death*“ (Zelltod) oder „*apoptosis*“ (Apoptose) gesucht.

3.9 Tierexperimente

3.9.1 Mäuse und Ratten

Für die Isolation von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten wurden Sprague Dawley Ratten bzw. C57BL/6N Mäuse verwendet.

MiR-223-defiziente Mäuse¹⁷¹ wurden freundlicherweise von Dr. Camargo (MIT, Boston, USA) bereitgestellt und wurden, da sie ursprünglich einen CD45.1- C57BL/6N-Hintergrund hatten, über mehrere Generationen auf CD45.2-C57BL/6N rückgekreuzt. Für alle Experimente

außer der Untersuchung von 10 Monate alten miR-223-defizienten Mäusen (**Abbildungen 13A und B**) dienten Wildtyp-Geschwister als Kontrollen. Bei der genannten Ausnahme handelte es sich um getrennt gehaltene Wildtyp-Kontrollen, die zusammen mit den miR-223-defizienten Mäusen direkt von Dr. Camargo bezogen wurden.

Die ausschließliche Anwesenheit von CD45.2-Allelen wurde bei Mäusen, die als Knochenmarkspender dienten, durchflusszytometrisch verifiziert (Daten nicht gezeigt). Hierzu und zur Kontrolle des Chimärismus von knochenmarkstransplantierten Tieren wurde Blut abgenommen und 5 min auf Eis in Erythrozytenlysepuffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und in Tyrode's Puffer (pH 6,5) resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die Zellen in Tyrode's Puffer (pH 7,4) aufgenommen. Nach Zugabe von Antikörpern gegen CD45.1 und CD45.2 wurden die Zellen 20 min bei RT inkubiert und die Fluoreszenzintensität an einem FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Biosciences) gemessen.

3.9.2 Erzeugung von Knochenmarkschimären

Knochenmarkszellen wurden aus männlichen, 11 Wochen alten miR-223-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert und Erythrozyten lysiert wie in **Abschnitt 3.3.1** beschrieben. $3,5 \times 10^6$ Zellen wurden per Schwanzvene in 8 Wochen alte CD45.1-Mäuse injiziert, die zweimal im Abstand von 5 h mit einer letalen Dosis (jeweils 7 Gray) bestrahlt worden waren. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Trinkwasser der Mäuse mit Cotrimoxazol versetzt, um Infektionen zu verhindern. 6 Wochen nach Transplantation erfolgte die Plättchendepletion wie in **Abschnitt 3.9.6** beschrieben. 10 Wochen nach Transplantation wurde die kardiale Ischämie-Reperfusion (**Abschnitt 3.9.4**) durchgeführt. Der Transplantationserfolg wurde auf doppelte Weise kontrolliert: 6 Wochen nach der Transplantation wurden mittels Durchflusszytometrie in Vollblut die relativen Anteile von CD45.1- und CD45.2-positiven Zellen gemessen (**Abschnitt 3.9.1**). 8 Wochen nach Transplantation wurde der miR-223-Gehalt in Blutplättchen mittels qPCR bestimmt.

3.9.3 Transverse Aortenkonstriktion

Die Konstriktion der thorakalen Aorta erfolgte wie zuvor beschrieben.¹⁷² Männliche, im Mittel 8 Wochen alte Mäuse wurden nach Intubation mittels Inhalationsnarkose (Mischung aus 2% Isofluran und 98% Sauerstoff) anästhesiert und auf einer Wärmeplatte fixiert (40°C). Nach Eröffnung des Thorax wurde der Aortenbogen zwischen den beiden Karotidarterien mit einem 7-0 Nylonfaden um eine 27 Gauge Kanüle ligiert. Bei Sham-Operationen wurde dagegen nur der Brustkorb geöffnet. 4 Wochen nach der Operation wurde die Herzfunktion

mit Echokardiographie (Visual Sonics, Vevo 770 High-Resolution Imaging System) bestimmt und das Herz für weitere Untersuchungen entnommen.

3.9.4 Ischämie-Reperfusion (I-R)-Modell

Die reversible Ligation der LAD-Arterie erfolgte wie zuvor beschrieben.¹⁷³ Männliche, 14 bis 17 Wochen alte (im Fall der Knochenmarkschimären 18,5 Wochen alte) Mäuse wurden mit einer Mischung aus Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht), Midazolam (5 mg/kg) und Fentanyl (0,05 mg/kg) anästhesiert, auf einer Wärmeplatte fixiert. Die Körpertemperatur wurde mittels einer Rektalsonde kontrolliert und auf 37°C eingestellt. Nach Tracheotomie wurden die Mäuse intubiert und für die Dauer der Prozedur mit 100% Sauerstoff beatmet. Nach Eröffnung des Thorax und der Perikardhöhle wurde die LAD-Arterie mit einem 8-0 Seidenfaden unter Zuhilfenahme eines Polyethylen-Schlauchs für 30 min abgebunden. Sowohl die Ischämie als auch die Reperfusion des Ischämieareals wurden dabei optisch kontrolliert. Bei Sham-Operationen wurde hingegen nur eine Thorakotomie durchgeführt.

Zu jeweils angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Reperfusion wurde heparinisiertes Blut aus dem submandibulären Venenplexus oder der Nierenvene abgenommen und 7 min bei 700 U/min zentrifugiert. Um ein ausreichendes Messvolumen zu erreichen, wurden 50 µl des entstehenden Überstands (Mausplasma) mit 150 µl menschlichem Plasma gemischt, das zuvor negativ auf Troponin T getestet wurde. Die High-Sensitivity-Troponin T-Messung wurde anschließend im Zentrallabor des Universitätsklinikums Innsbruck durchgeführt.

Nach der angegebenen Reperfusionsdauer wurden die Herzen für weitere Untersuchungen entnommen.

3.9.5 Bestimmung der Blutungszeit

Zur Bestimmung der Blutungszeit wurden Mäuse per Inhalationsnarkose (Mischung aus 2% Isofluran und 98% Sauerstoff) anästhesiert. Sofort nach Entfernung eines ungefähr 8 mm langen Segments der Schwanzspitze wurde der Schwanz in 37°C warmes PBS getaucht und die Zeit bis zur Beendigung der Blutung gemessen. Das Experiment wurde nach 10 min beendet, falls die Blutung bis dahin nicht zum Stillstand gekommen war.

3.9.6 Experimentell induzierte Thrombozytopenie

Um eine vorübergehende Plättchendepletion zu erzielen, wurde 10 bis 13 Wochen alten Mäusen intravenös ein Antikörper gegen GPIIb/IIIa (2 mg/kg) gespritzt. Plättchen-

konzentrationen im Blut wurden 24, 48, 72, 120 und 192 h nach Injektion gemessen. Ein Teil der Tiere wurde bereits nach 72 h getötet und für die Knochenmarksfärbung von Megakaryozyten verwendet.

3.9.7 Bestimmung der Lebensdauer von Blutplättchen

Die Bestimmung der Plättchenlebensdauer erfolgte wie zuvor beschrieben.¹⁷⁴ N-Hydroxysuccinimid-Biotin (30 mg/kg) wurde Mäusen per Schwanzveneninjektion verabreicht. 24, 27, 120 und 168 h nach Injektion wurden 20 µl Blut abgenommen, in Tyrode's Puffer (pH 7,4) mit PhE-konjugiertem Streptavidin und FITC-Integrin αIIb (CD41) doppelgefärbt und durchflusszytometrisch (FACSCalibur, BD Biosciences) analysiert. Der relative Anteil biotinylierter Blutplättchen zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde dabei auf den am Tag 1 gemessenen Anteil normalisiert.

3.10 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders angegeben sind alle Daten als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Statistische Analysen und Kurvenanpassung wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde bei Stichprobengrößen ab acht mit dem D'Agostino-Pearson-Omnibus-Test bzw. bei Stichprobengrößen zwischen fünf und sieben mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Das Vorhandensein gleicher Varianzen wurden mit dem F-Test geprüft. Gegebenenfalls wurde eine Box-Cox-Transformation der Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung und gleiche Varianzen zu erzielen. Statistische Signifikanz wurde danach mit t-Test bzw. mit Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Bonferronis Post-hoc-Test ermittelt. Falls die Voraussetzungen für parametrische Tests durch Transformation nicht erzielt werden konnten oder die Stichprobengröße für den Nachweis nicht ausreichte, wurden entsprechende nicht-parametrische Tests durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ und * $P < 0,05$ war.

4 ERGEBNISSE

4.1 Die Identifikation von zelltypspezifischen MicroRNAs im Herz

4.1.1 In Fibroblasten angereicherte MicroRNAs

Um fibroblastenspezifische MicroRNAs im Herz zu identifizieren, wurden zwei Studien konzipiert. In beiden Analysen wurden die Expressionsprofile aller bis zu diesem Zeitpunkt bekannten MicroRNAs in kardialen Fibroblasten und Herzmuskelzellen verglichen, jedoch unter Verwendung zweier verschiedener Detektionsplattformen und Tierarten.

In der ersten Studie wurde mittels quantitativer *Real Time*-PCR (qPCR) die MicroRNA-Expression in Zellisolaten aus den Herzen von adulten Ratten erfasst.* Die 15 gemäß diesen Daten am stärksten in adulten kardialen Fibroblasten gegenüber Kardiomyozyten angereicherten MicroRNAs sind in **Abbildung 3A** gezeigt. Entscheidend für die Wirksamkeit einer MicroRNA ist natürlich auch ihre Abundanz, unabhängig von einem Vergleich mit anderen Zelltypen, d.h. hochkonzentrierte MicroRNAs sollten ihre mRNA-Targets stärker unterdrücken als in wenigen Kopien vorhandene. In **Abbildung 3B** sind daher die in derselben Studie ermittelten 30 am höchsten exprimierten MicroRNAs in kardialen Rattenfibroblasten abgebildet.

* Die qPCR-Messungen an den RNA-Isolaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Thomas Thum (Hannover Medical School, Hannover, D) durchgeführt. Die kardiomyozytenbezogenen Daten aus dieser Studie wurden auch zur Erstellung einer Liste der höchstexprimierten MicroRNAs in diesem Zelltyp verwendet.⁸³

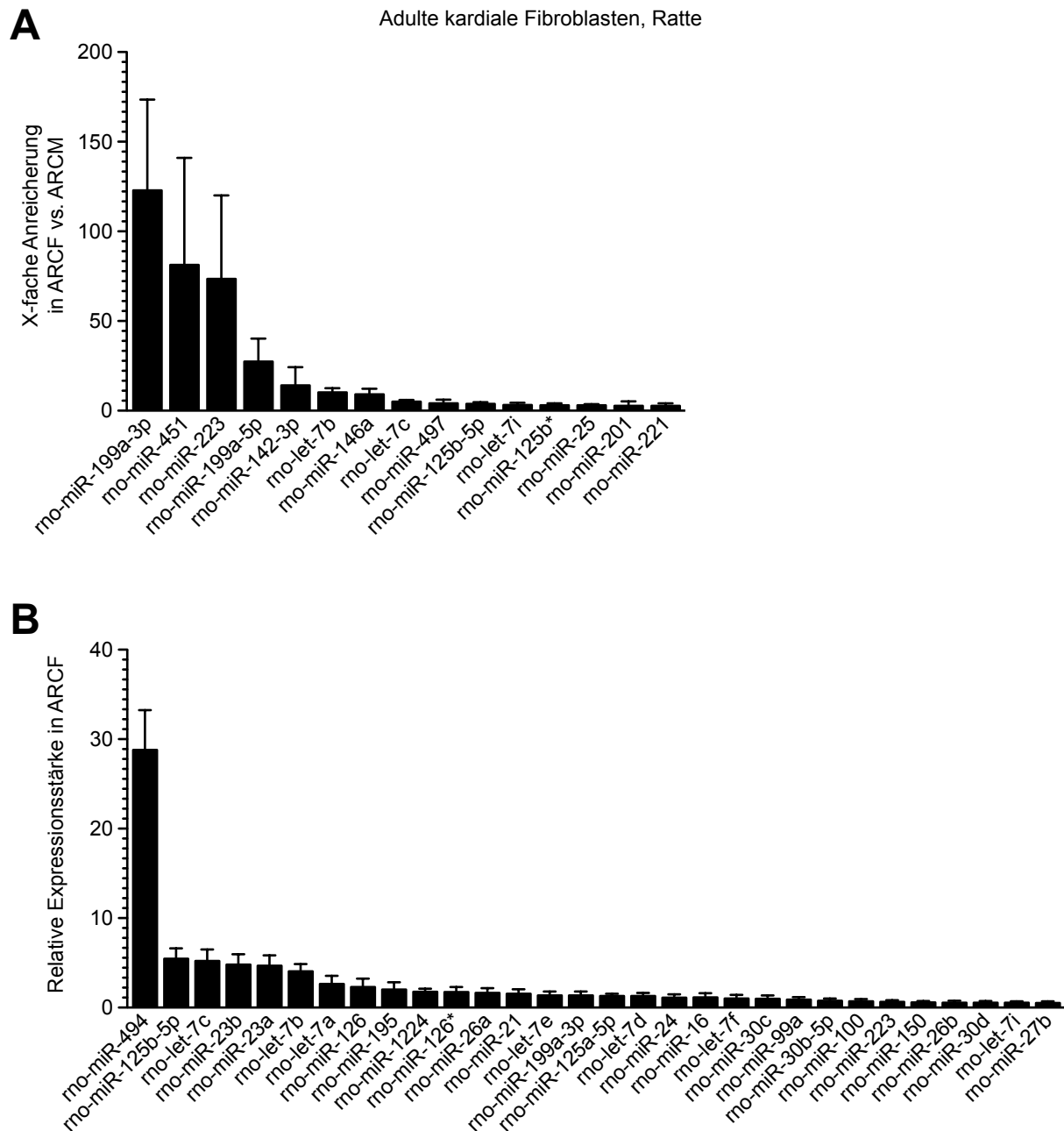


Abbildung 3. Analyse des MicroRNA-Expressionsprofils von adulten kardialen Rattenfibroblasten mittels quantitativer *Real Time*-PCR (qPCR). (A) Die 15 am stärksten in adulten Rattenfibroblasten (ARCF) gegenüber Kardiomyozyten (ARCM) angereicherten MicroRNAs. Nur MicroRNAs, die zu den 100 höchst-exprimierten in ARCF gehören, wurden berücksichtigt. (B) Die 30 höchst-exprimierten MicroRNAs in ARCF. Zellfraktionen aus n=4 Ratten.

Um die gewonnenen Daten unabhängig zu überprüfen, wurde eine zweite Studie* durchgeführt in der erneut die MicroRNA-Expression von Fibroblasten und Kardiomyozyten verglichen wurde. Hierbei stammten die Zellen jedoch aus den Herzen adulter Mäuse und die Messungen erfolgten auf Microarrays. Die Reinheit der verwendeten Zellpräparationen wurde anhand der Expression von zelltypspezifischen Marker-Genen mittels Immunfluoreszenz (siehe dazu meine Master-Thesis¹⁷⁵) und quantitativer *Real Time*-PCR (**Abbildung 4**) bestätigt. Trotz des zweifachen Wechsels von Spezies und Plattform für die MicroRNA-Messungen zeigte sich in diesem Experiment eine erhebliche Übereinstimmung mit den qPCR-Daten aus adulten Ratten bei den 15 am stärksten in Fibroblasten angereicherten MicroRNAs (miR-199a/b-3p, miR-223, miR-199a-5p, let-7b, miR-146a) (**Abbildung 3A und 5A**). Deutliche Unterschiede zwischen beiden Studien wurden dagegen bei der Rangfolge der höchstexprimierten MicroRNAs beobachtet (**Abbildungen 3B und 5B**). Auf Grund ihrer hohen Anreicherung in der Fibroblastenfraction wurden miR-199-3p (Rang 1 in beiden Studien) und miR-223 (Rang 2 bzw. 3) für weiterführende Experimente ausgewählt (siehe **Abschnitte 4.2 und 4.3**).

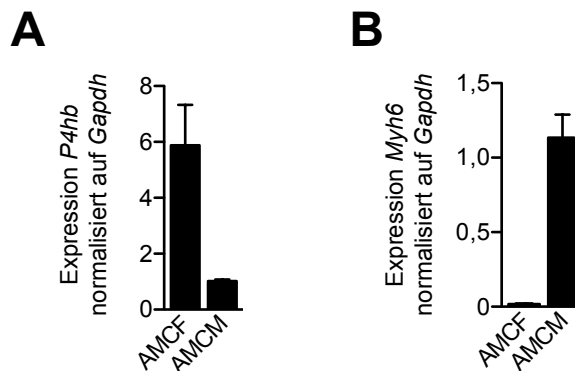


Abbildung 4. Reinheit der für die Microarray-Analyse verwendeten Zellfraktionen aus adulten Mäusen. Die relative Expression des Fibroblastenmarkers *P4hb* (**A**) und des Kardiomyozytenmarkers *Myh6* (**B**) in aufgereinigten adulten Maus-Fibroblasten (AMCF) und -Kardiomyozyten (AMCM) wurde mittels quantitativer *Real Time*-PCR bestimmt. *P4hb* = *prolyl-4-hydroxylase β*, *Myh6* = *α-myosin heavy chain*. Zellfraktionen aus n=6 Mäusen.

* Ergebnisse der Microarraystudie wurden bereits in Teilen in meiner Master-Thesis¹⁷⁵ veröffentlicht.

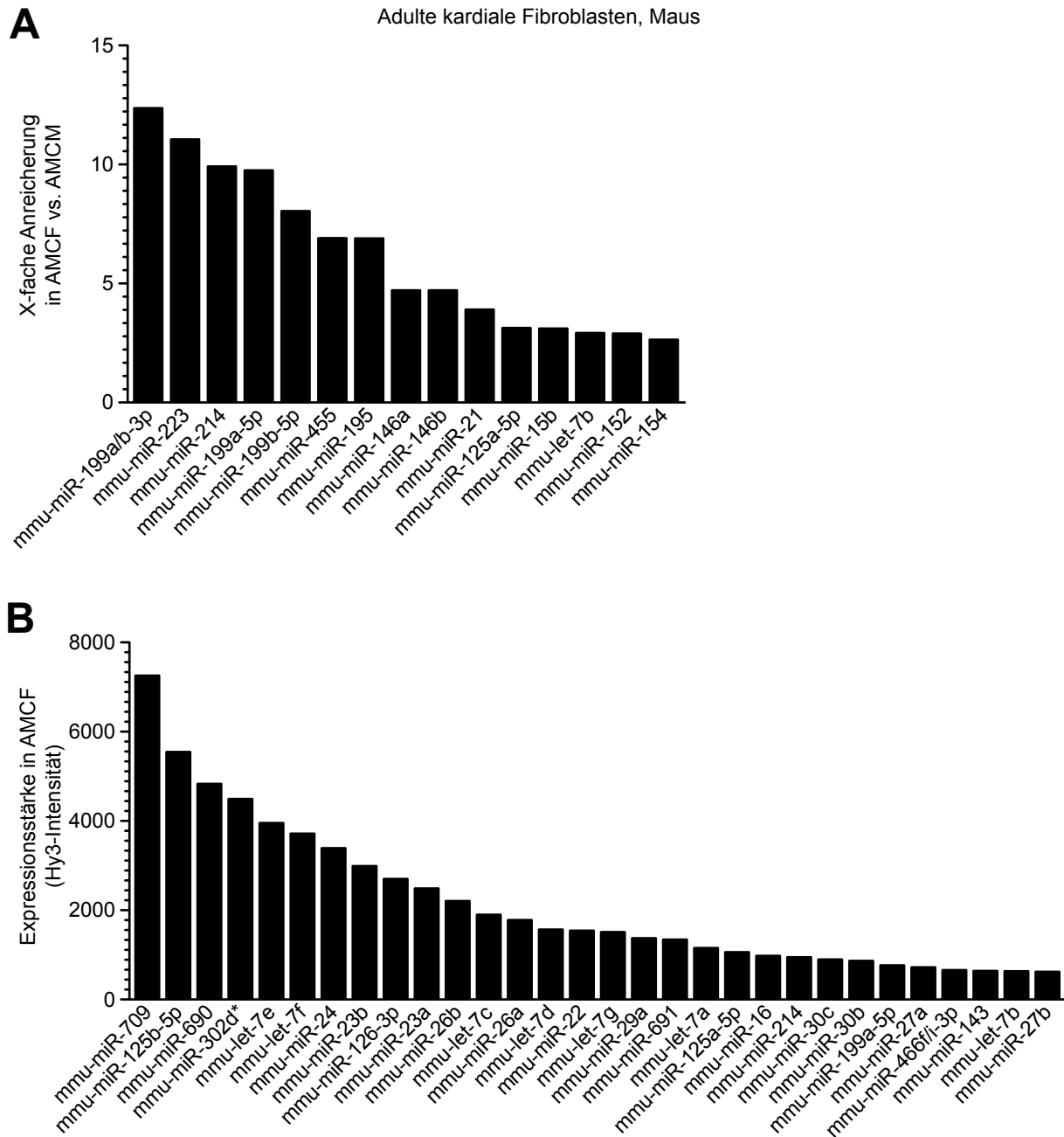


Abbildung 5. Analyse des MicroRNA-Expressionsprofils von adulten kardialen Mausfibroblasten mittels Microarray-Detektion. (A) Die 15 am stärksten in adulten Maus-Fibroblasten (AMCF) gegenüber Kardiomyozyten (AMCM) angereicherten MicroRNAs. Nur MicroRNAs, die zu den 100 höchst-exprimierten in AMCF gehören, wurden berücksichtigt. **(B)** Die 30 höchst-exprimierten MicroRNAs in AMCF. Messung von gepoolter RNA aus Zellfraktionen von n=3 Mäusen.

4.1.2 In Kardiomyozyten angereicherte MicroRNAs

Die beiden vorhergehenden Expressionsstudien erlauben auch eine Identifikation kardiomyozytenspezifischer MicroRNAs (**Abbildung 6**). Wie für die in Fibroblasten angereicherten MicroRNAs wurde hier eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Mäusen (qPCR) und Ratten (Microarray) gefunden. Allerdings wurden ebenso wie bei den in

Fibroblasten angereicherten MicroRNAs (**Abbildungen 3A und 5A**) generell höhere relative Expressionsunterschiede in der ersten verglichen mit der zweiten Studie gemessen. Bemerkenswerterweise waren sowohl der Grad der relativen Anreicherung als auch die Zahl der im entsprechenden Zelltyp präferentiell exprimierten MicroRNAs für Herzmuskelzellen deutlich höher als für Fibroblasten (**Abbildungen 3A, 5A, 6**).

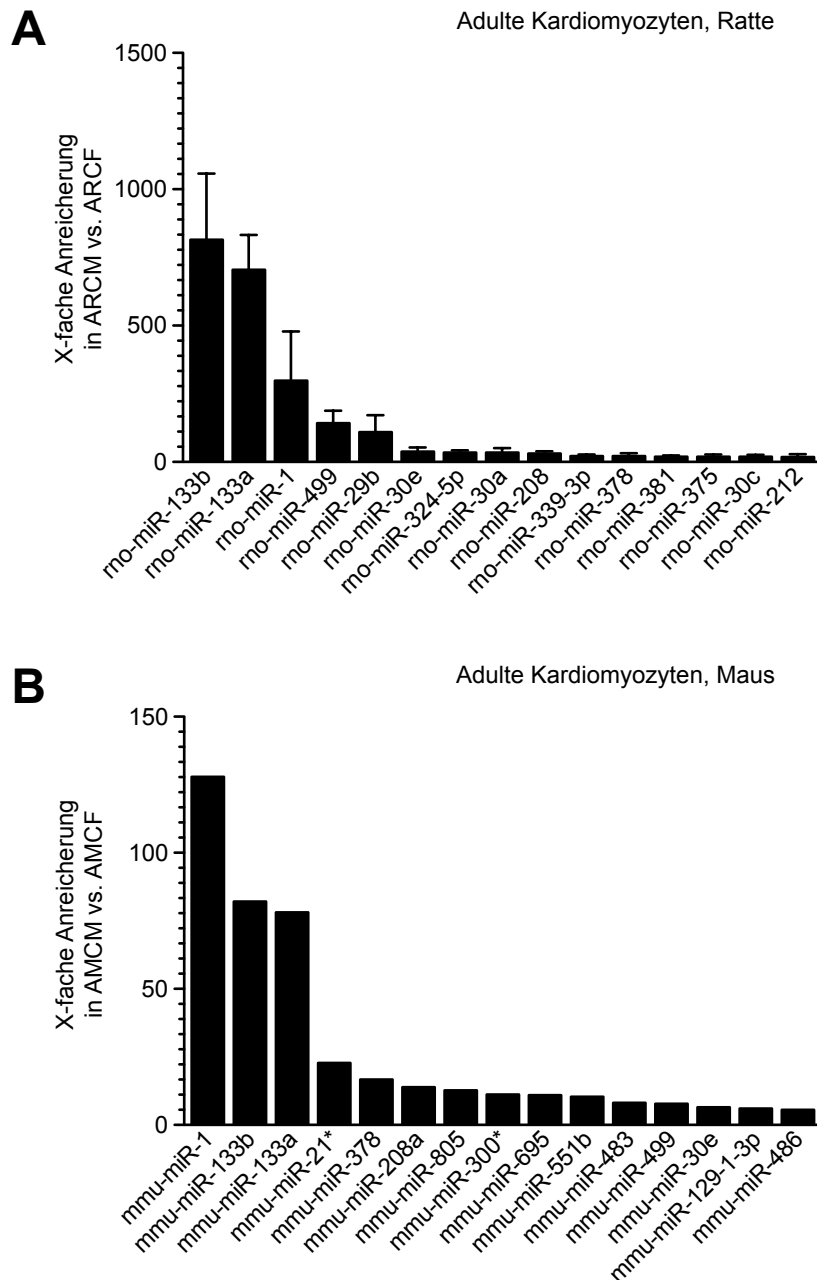


Abbildung 6. Analyse der MicroRNA-Expressionsprofile von Kardiomyozyten aus adulten Mäusen und Ratten. (A) Die 15 am stärksten in adulten Ratten-Kardiomyozyten (ARCM) verglichen mit adulten kardialen Ratten-Fibroblasten (ARCF) angereicherten MicroRNAs gemessen mit qPCR. Zellfraktionen aus n=4 Ratten. **(B)** Die 15 am stärksten in adulten Maus-Kardiomyozyten (AMCM) verglichen mit adulten kardialen Maus-Fibroblasten (AMCF) angereicherten MicroRNAs, ermittelt durch Microarray-Analyse. Messung von gepoolter RNA aus Zellfraktionen von n=3 Mäusen. Es wurden jeweils nur MicroRNAs berücksichtigt, die zu den 100 höchst-exprimierten in ARCM bzw. AMCM gehören.

4.2 Der Einfluss von miR-199-3p auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten

4.2.1 Funktionelle Konsequenzen der Überexpression und Inhibition von miR-199-3p in kardialen Fibroblasten

In der Zusammenschau der MicroRNA-Expressions-Studien in kardialen Zellen wurde miR-199a/b-3p als am höchsten in Fibroblasten im Vergleich zu Herzmuskelzellen angereicherte MicroRNA gefunden (siehe **Abschnitt 4.1, Abbildungen 3A, 5A**). Gleichzeitig schien das absolute Expressionsniveau relativ hoch (Platz 15 unter den am höchsten exprimierten MicroRNAs in adulten kardialen Rattenfibroblasten bzw. Platz 32 in adulten kardialen Mausfibroblasten (**Abbildungen 3B** und nicht gezeigte Daten)), weswegen der Einfluss dieser MicroRNA auf die Funktion von kardialen Fibroblasten im Folgenden genauer untersucht wurde. Während in der Ratte bislang nur miR-199a-3p identifiziert wurde, gibt es in der Maus und im Mensch formal zwei MicroRNAs identischer Basensequenz (miR-199a-3p und miR-199b-3p), die sich vom 3'-Ende der Pre-miRNAs pre-miR-199a und pre-miR-199b ableiten (siehe auch **Diskussion, Abschnitt 5.2**). Da die Isoformen a und b in allen drei Spezies dieselbe Basensequenz aufweisen, werden sie im Weiteren als miR-199-3p bezeichnet. In den folgenden Experimenten wurde miR-199-3p in neonatalen oder adulten kardialen Fibroblasten durch Transfektion eines MicroRNA-„*Mimics*“, einer doppelsträngigen synthetischen RNA, überexprimiert. Um zu überprüfen, dass diese Behandlung prinzipiell erfolgreich war, wurden die Zellen mit einem adenoviralen Reporterkonstrukt infiziert, dessen mCherry-Expression durch miR-199-3p über zwei komplementäre Bindestellen in der 3' UTR der mCherry-mRNA unterdrückt wird. Die Fluoreszenz eines zusätzlich exprimierten eGFP (engl. *enhanced green fluorescent protein*)-Gens, das unter der Kontrolle der „*Housekeeping*“-MicroRNA miR-16 stand, wurde zur Normalisierung verwendet (**Abbildung 7A**). Die Transfektion mit einem miR-199-3p-Mimic führte zu einem signifikanten Rückgang des mCherry/eGFP-Verhältnisses (**Abbildungen 7B und C**), was eine erfolgreiche Überexpression der MicroRNA anzeigt. Als Nächstes wurde der Effekt von miR-199-3p auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten untersucht, da die Vermehrung der Fibroblastenpopulation als wichtiger Faktor für die Fibrosierung des Herzens, z.B. nach einem Infarkt oder in Folge andauernder mechanischer Überlastung, gilt (siehe **Abschnitt 1.2.2**). Hierzu wurde die Inkorporation von Tritium-markiertem Thymidin als Maß für die Aktivität der DNA-Synthese gemessen. Sowohl in neonatalen als auch in adulten kardialen Fibroblasten rief die Überexpression von miR-199-3p einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle hervor (**Abbildung 7D**). Da eine erhöhte Thymidininkorporation neben einer vermehrten Proliferation auch durch ein verringertes Absterben von Zellen in Kultur ausgelöst werden könnte, wurde in neuen Experimenten die

Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus gemessen. Nach miR-199-3p-Überexpression befanden sich signifikant mehr Fibroblasten in der S- oder G₂/M-Phase als in der Kontrollgruppe, was auf eine Erhöhung der Zellzyklusaktivität, d.h. einen direkten Effekt auf die Proliferation schließen lässt (**Abbildung 7E**).

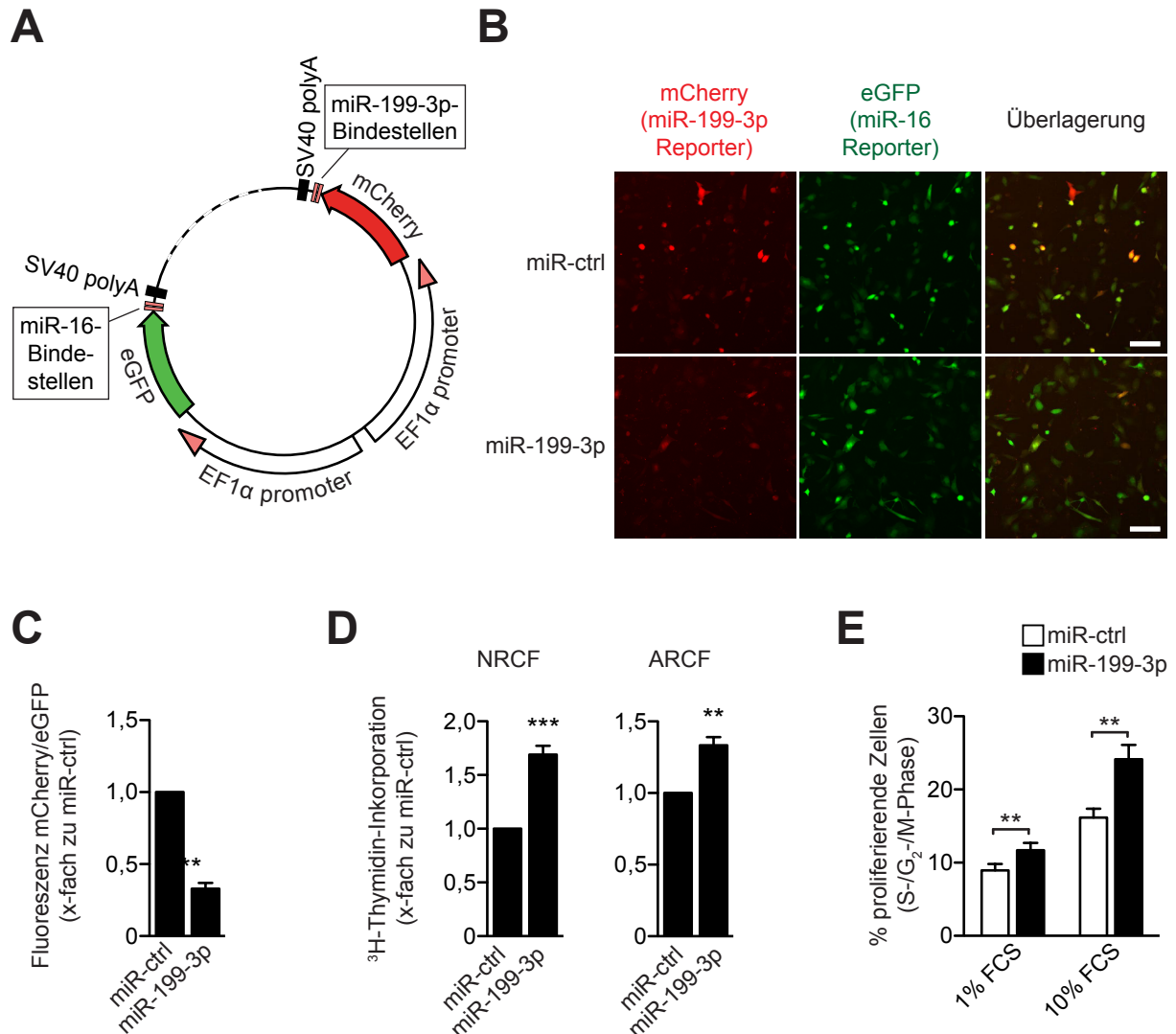


Abbildung 7. Überexpression von miR-199-3p erhöht die Proliferation von kardialen Fibroblasten. (A) Schematischer Aufbau des miR-199-3p-Fluoreszenzreporters. Die Expression des mCherry-Transkripts wird von zwei komplementären miR-199-3p-Bindestellen in dessen 3' UTR reprimiert und dient so als Reporter für die miR-199-3p-Aktivität. eGFP (unter der Kontrolle der „Housekeeping“-MicroRNA miR-16) dient zur Normalisierung. Der gestrichelt dargestellte Bereich enthält zusätzliche Sequenzen (je nach Typ plasmidisch oder adenoviral; dieser Abschnitt ist nicht maßstabsgetreu dargestellt), die für die Funktion des Konstruktes relevant sind. (B,C) Detektion des adenoviralen miR-199-3p-Fluoreszenzreporters 48 h nach Transfektion von neonatalen kardialen Rattenfibroblasten (NRCF) mit MicroRNA-Mimics. Repräsentative Aufnahmen (B) und Quantifizierung (C) von n=5 unabhängigen Experimenten. (D) ³H-Thymidininkorporation nach Transfektion mit MicroRNA-Mimics. n=15 unabhängige Experimente mit NRCF, n=7 unabhängige Experimente mit ARCF. (E) Analyse der Zellzyklusphasen in NRCF nach Transfektion mit MicroRNA-Mimics. n=7 unabhängige Experimente. miR-ctrl = Kontroll-MicroRNA, NRCF = neonatale kardiale Rattenfibroblasten, ARCF = adulte kardiale Rattenfibroblasten, FCS = fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum), SV40 polyA = Simian virus 40 Polyadenylierungsstelle. Skalierungsbalken, 100 μ m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbedingung.

Da eine Erhöhung des miR-199-3p-Gehalts eine erhöhte DNA-Synthese hervorruft (**Abbildung 7D**), wäre das Gegenteil bei einer Absenkung desselben zu erwarten. Um eine Inhibition der MicroRNA zu erzielen, wurden deshalb kardiale Fibroblasten entweder mit einem Cholesterol-konjugierten „Antagomir“ behandelt oder mit einem LNA (engl. *locked nucleic acid*)-modifizierten „Antimir“ transfiziert. Beide Strategien führten zu einem deutlichen Anstieg des mCherry/eGFP-Signals des adenoviralen Reporterkonstrukts in NRCF (Zunahme im Vergleich zu mismatch-Antagomir bzw. Antimir-Kontrolle; **Abbildung 8A**), was auf einen erfolgreichen *Knockdown* von miR-199-3p schließen lässt. Die Inhibition von miR-199-3p führte jedoch nicht zu dem erwarteten Rückgang der Thymidin-Inkorporation (**Abbildungen 8B und C**). Dies könnte bedeuten, dass die in kardialen Fibroblasten basal vorhandene miR-199-3p-Konzentration - zumindest in Zellkultur - zu schwach ist, um die Proliferation zu beeinflussen. Auffällig war allerdings, dass die Zugabe eines Antagomirs anscheinend *per se*, d.h. unabhängig von der Basensequenz, zu einer reduzierten Thymidin-Inkorporation führt (**Abbildung 8B**).

Neben der Vermehrung kardialer Fibroblasten spielt auch deren Umwandlung in Myofibroblasten und die Sekretion parakriner Botenstoffe eine wesentliche Rolle für die kardiale Antwort auf Drucküberlastung oder Infarzierung (siehe **Abschnitt 1.2.2**). Die Modulation der miR-199-3p-Aktivität scheint jedoch die Umdifferenzierung in Myofibroblasten (angezeigt durch den Marker *α -smooth muscle actin* (α -SMA)) nicht zu beeinflussen (**Abbildung 9A**). Allerdings ist die Aussagekraft dieses Versuchs beschränkt, da die Zellen während dieses Versuchs auf einer harten Unterlage (Zellkulturgefäß) kultiviert wurden. Dies führt dazu, dass schon unter Kontrollbedingungen viele Zellen α -SMA in gewissem Ausmaß exprimieren^{176,177}. Darüber hinaus wurde getestet, ob miR-199-3p einen Effekt auf die Ausschüttung von Substanzen hat, über die Fibroblasten auf parakrinem Weg die Hypertrophierung von Kardiomyozyten regulieren. Dazu wurden neonatale Herzmuskelzellen mit Fibroblasten-konditioniertem Medium stimuliert und die Größenzunahme gemessen. Während konditioniertes verglichen mit normalem Zellmedium ein deutliches Wachstum verursachte, wurde kein signifikanter Unterschied bei zusätzlicher Modulation von miR-199-3p in Fibroblasten vor Herstellung des konditionierten Mediums festgestellt (**Abbildung 9B**).

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass miR-199-3p-Überexpression selektiv die Proliferation von kardialen Fibroblasten beschleunigt, wohingegen die in kultivierten Zellen vorhandene Konzentration keine wesentliche Kontrolle auf ihre Vermehrung ausübt.

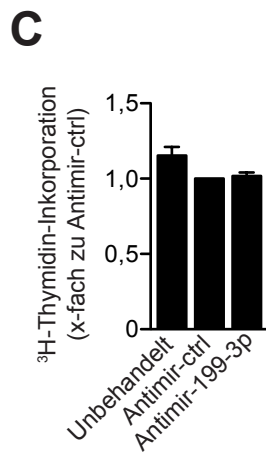
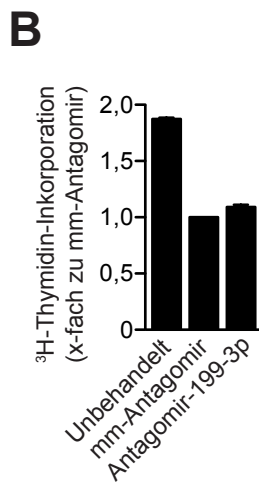
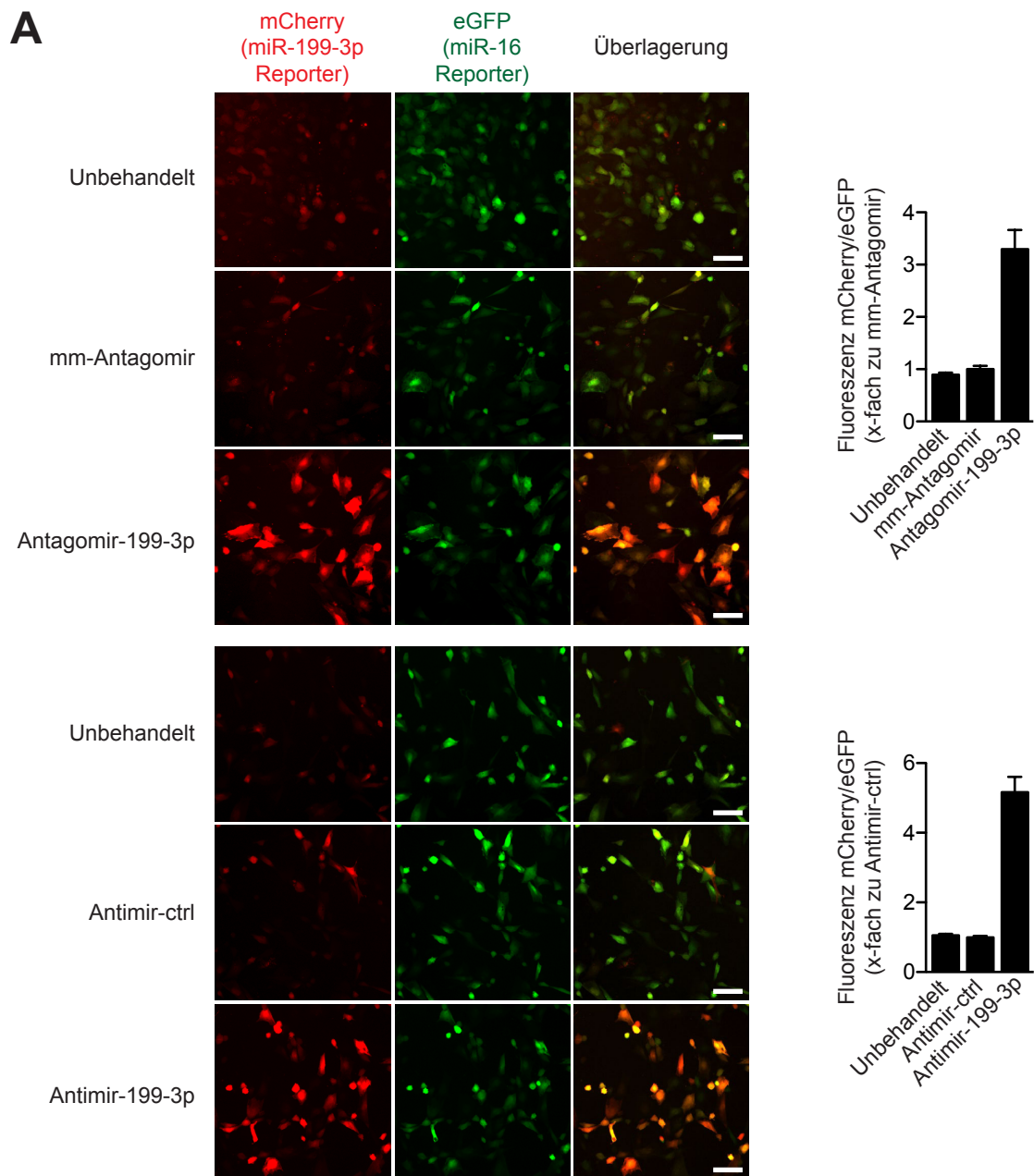


Abbildung 8. Inhibition von miR-199-3p hat keinen antiproliferativen Effekt in kardialen Fibroblasten. (A) Detektion des adenoviralen miR-199-3p-Fluoreszenzreporters (siehe Abbildung 6A) 48 h nach Zugabe eines Antagomirs oder nach Transfektion eines Antimirs in NRCF. Repräsentative Aufnahmen (links) und Quantifizierung der Daten je eines in Triplikaten ausgeführten Experiments. Fehlerbalken zeigen hier Standardabweichung. (B,C) ³H-Thymidininkorporation in NRCF nach Zugabe eines Antagomirs (B) oder nach Transfektion eines Antimirs (C). Daten aus je n=2 unabhängigen Experimenten. mm-Antagomir = Kontroll-Antagomir, Antimir-ctrl = Kontroll-Antimir, NRCF = neonatale kardiale Rattenfibroblasten. Skalierungsbalken, 100 µm

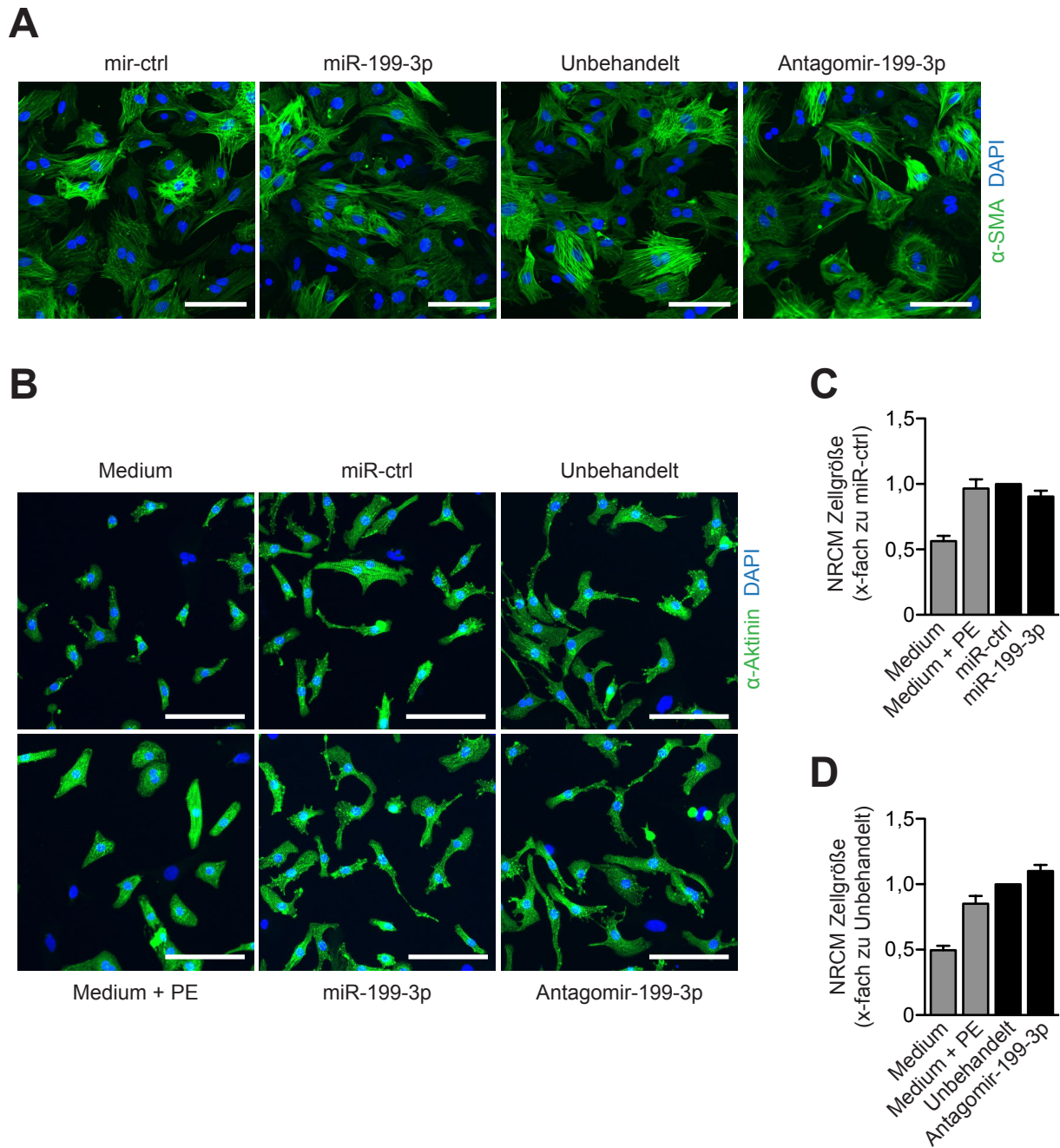


Abbildung 9. Die Modulation des miR-199-3p-Gehalts in kardialen Fibroblasten beeinflusst weder die Umwandlung in Myofibroblasten noch die Sekretion prohypertropher Faktoren. (A) Detektion des Myofibroblasten-Markers α -SMA (grün) in NRCF nach Transfektion mit MicroRNA-Mimics oder nach Behandlung mit einem Antagomir. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Repräsentative Bilder aus einem in Triplikaten durchgeführten Experiment. **(B-D)** NRCM wurden mit purem Zellmedium, Zellmedium + Phenylephrin oder fibroblastenkonditioniertem Medium inkubiert, das aus dem Überstand von ARCF hergestellt wurde, die zuvor mit MicroRNA-Mimics transfiziert oder mit Antagomir behandelt worden waren. (B) Repräsentative Aufnahmen von NRCM. Kardiomyozytenmarker α -Aktinin grün und DAPI blau dargestellt. (C,D) Automatisierte Quantifizierung der Größe von α -Aktinin-positiven Myozyten. Die grau dargestellten Balken beziehen sich auf dieselben Daten, normalisiert auf die jeweilige Kontrollbedingung. n=5 unabhängige Experimente. α -SMA = α -smooth muscle actin, PE = Phenylephrin, NRCF = neonatale kardiale Rattenfibroblasten, ARCF = adulte kardiale Rattenfibroblasten, NRCM, neonatale Ratten-Kardiomyozyten, Skalierungsbalken, 100 μ m.

4.2.2 Massenspektrometrische Untersuchung der durch miR-199-3p regulierten Proteine

Um mehr über die Zielproteine zu erfahren, durch deren Repression der pro-proliferative Effekt von miR-199-3p verursacht wird, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Küster (Technische Universität München, D) eine SILAC (engl. *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*)-basierte Proteomanalyse durchgeführt. SILAC funktioniert über die Markierung bestimmter Aminosäuren mit einem schweren Isotop (hier: $^2\text{H}_4$ im Fall von Lysin und $^{13}\text{C}_6$ im Fall von Arginin) bzw. ihrem üblicherweise vorkommenden, leichten Gegenstück (^1H bzw. ^{12}C). Diese sind massenspektrometrisch unterscheidbar, auch wenn sie in Polypeptide inkorporiert sind, verhalten sich aber physiologisch identisch. Zuerst werden hierbei Zellen über mehrere Passagen hinweg parallel mit den leichten beziehungsweise schweren Aminosäuren behandelt, bis mindestens 95% der Proteine entsprechend markiert sind. Im eigentlichen Experiment werden dann die Zellfraktionen je einer von zwei Bedingungen ausgesetzt, die miteinander verglichen werden sollen, und Konzentrationsänderungen für individuelle Proteine als Verhältnis von leichten zu schweren Peptiden im Lysat mittels Massenspektrometrie detektiert (siehe Schema in **Abbildung 11A**). Durch die gemeinsame Aufarbeitung der beiden Fraktionen nach dem Lysieren können Verzerrungen durch unterschiedliches Handling weitgehend vermieden werden. Da primäre kardiale Fibroblasten sich in Zellkultur nur sehr langsam vermehren und deshalb eine ausreichende Markierung wahrscheinlich nicht zu erreichen wäre, wurde die SILAC-Studie ersatzweise mit sich schneller teilenden NIH-3T3-Fibroblasten durchgeführt. Vorab wurde bestätigt, dass die Modulation der MicroRNA-Aktivität auch in diesem Zelltyp funktioniert (die gezeigten Daten enthalten auch die parallel mit den beiden SILAC-Replikaten durchgeführten Reporter-Messungen) und dass die Überexpression von miR-199-3p ebenso wie in primären kardialen Fibroblasten die Proliferation beschleunigt (**Abbildung 10**).

In der folgenden SILAC-Studie wurde in zwei getrennten Vergleichen die Auswirkungen von miR-199-3p-Überexpression (miR-199-3p versus miR-ctrl) und -Inhibition (Antagomir-199-3p versus Unbehandelt) untersucht. Jedes Experiment wurde in zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Da zu dem Zeitpunkt, als diese Studie durchgeführt wurde, der mismatch-Antagomir nicht zur Verfügung stand, dienten unbehandelte Zellen als Negativkontrolle für Antagomir-199-3p. In die Auswertung der Proteinregulation wurden nur solche Proteingruppen mit einbezogen, die in beiden Replikaten nachweisbar waren (Überexpressions-experiment: 2581 Proteingruppen, Inhibitionsexperiment: 3038 Proteingruppen). Der bioinformatische Vorhersagealgorithmus TargetScan (www.targetscan.org) wurde verwendet, um die zu den Proteingruppen gehörigen Gene bzw. deren mRNA-Transkripte auf die

Anwesenheit einer möglichen Bindestelle für miR-199-3p zu überprüfen. Wie aus **Abbildung 11B** ersichtlich ist, führte die Überexpression von miR-199-3p wie erwartet zu einer globalen Repression von Proteingruppen, deren zugehörige mRNAs mindestens eine evolutionär konservierte, vorhergesagte miR-199-3p-Bindestelle besitzen (sogenannte vorhergesagte, konservierte Targets). Solche mit ausschließlich nicht-konservierten Bindestellen wurden dagegen kaum in ihrer Expression gehemmt. Die Inhibition von miR-199-3p hatte im Gegensatz zu ihrer Überexpression nur eine sehr schwache Disinhibition von Proteinen mit zugeordneten konservierten Bindestellen und keine messbaren globalen Auswirkungen auf solche mit nicht-konservierten Bindestellen zur Folge (**Abbildung 11C**). Für alle vorhergesagten konservierten miR-199-3p-Targets wurden darüber hinaus die Änderungen bei miR-199-3p-Überexpression und -Inhibition gegeneinander aufgetragen (**Abbildung 11D**). Die erwartete Verschiebung in Richtung der linken oberen Ecke des Diagramms (Reduktion der Proteinkonzentration bei Überexpression und Erhöhung bei Inhibition der miRNA) war zwar zu beobachten, jedoch fiel auch hier auf, dass viele durch Überexpression reprimierte Proteine kaum die vorhergesagte Disinhibition bei miRNA-*Knockdown* zeigen. Zusammengefasst zeigen die globalen Analysen der SILAC-Daten, dass die Methodik gut funktioniert hat, aber wie in primären kardialen Fibroblasten (**Abbildung 8**) die Inhibition von miR-199-3p nur geringe Auswirkungen hat.

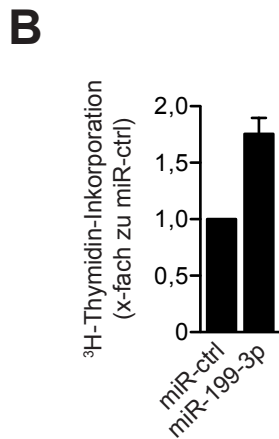
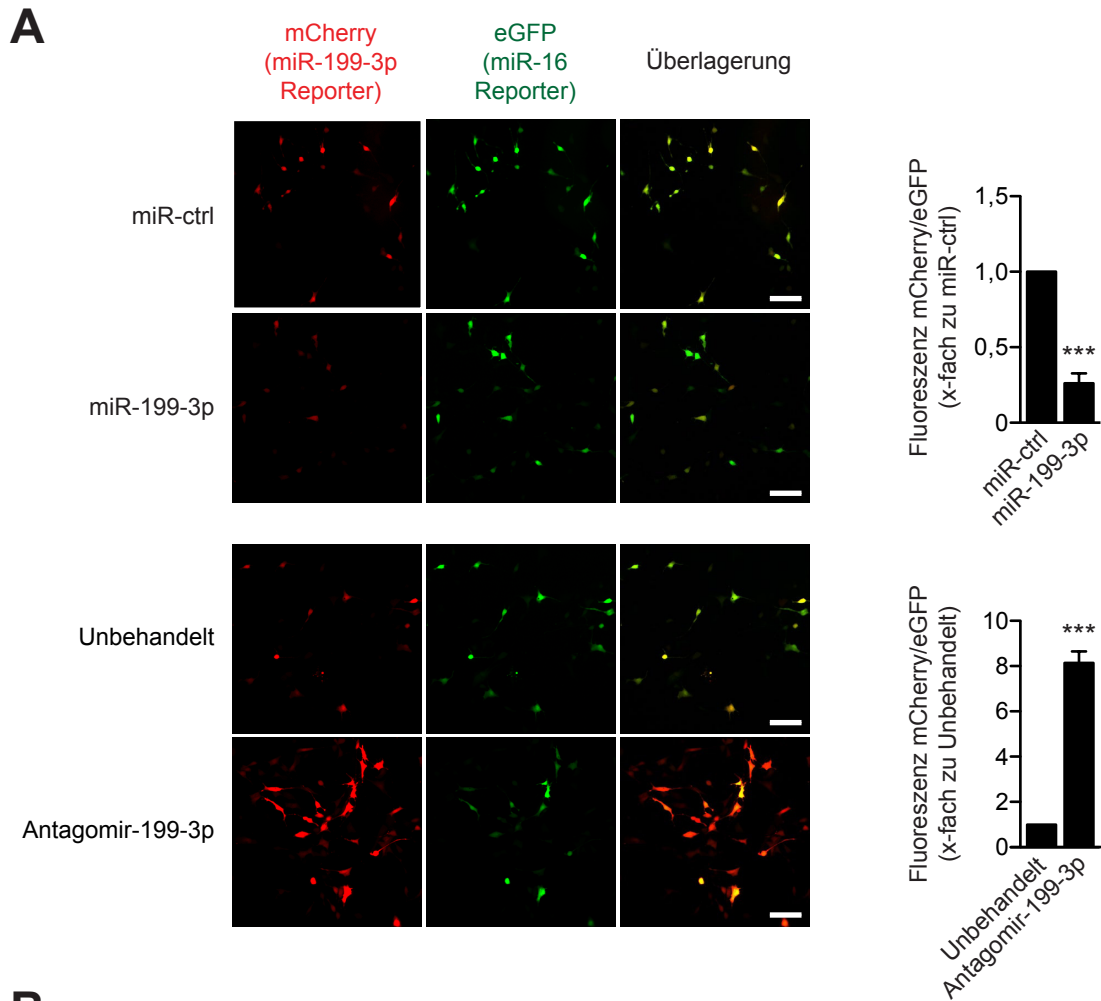


Abbildung 10. Nachweis der erfolgreichen Überexpression und Inhibition von miR-199-3p in NIH 3T3-Fibroblasten. (A) Detektion eines plasmidischen miR-199-3p-Fluoreszenzreporters (siehe Abbildung 6A) 48h nach Transfektion von MicroRNA-Mimics oder nach Zugabe eines Antagomirs. n=7 unabhängige Experimente. **(B)** ³H-Thymidininkorporation nach Transfektion mit MicroRNA-Mimics. n=3 unabhängige Experimente. miR-ctrl = Kontroll-MicroRNA. Skalierungsbalken, 100 µm. ***P<0,001 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbedingung.

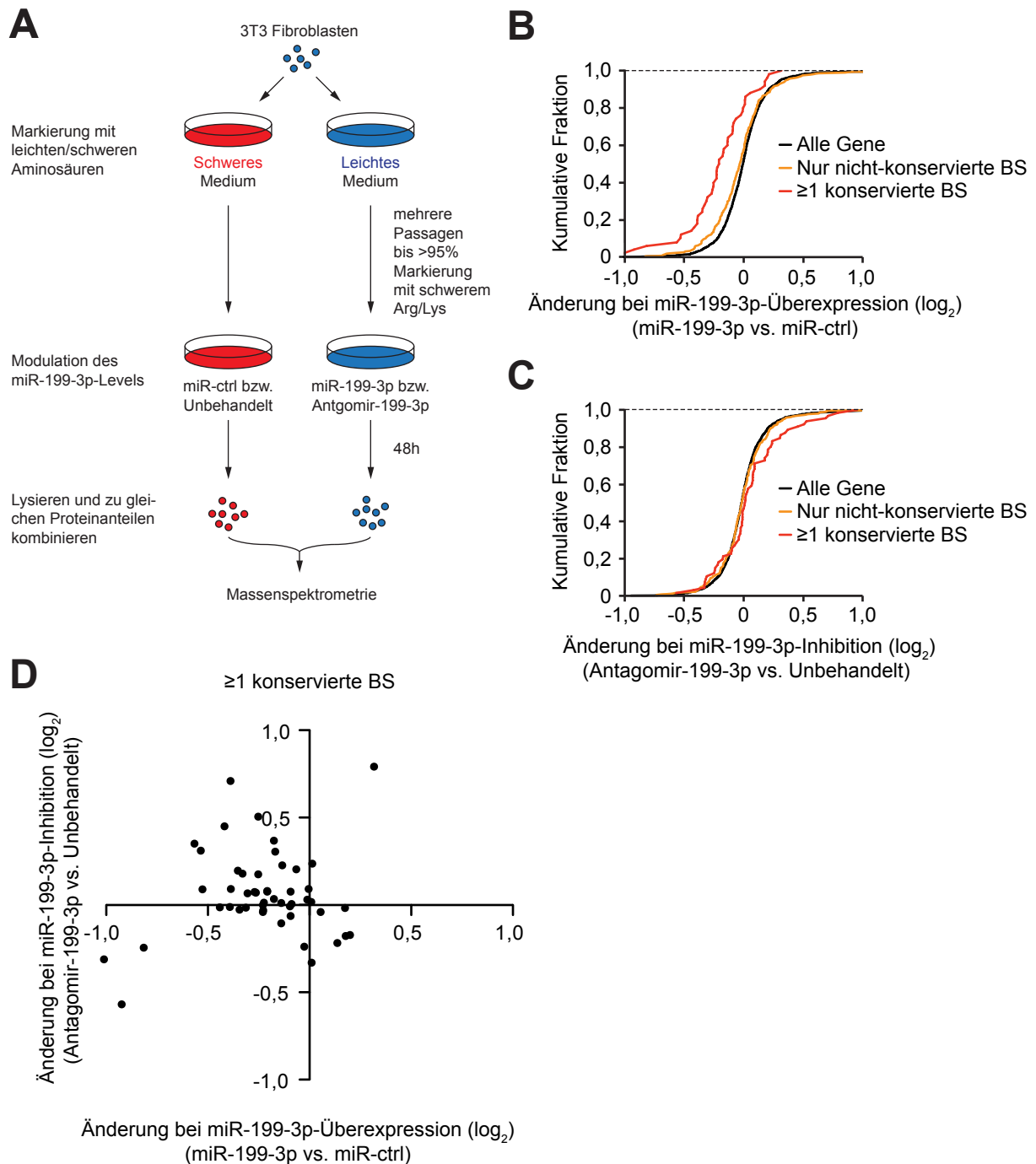


Abbildung 11. Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinregulation bei Modulation des miR-199-3p-Aktivität. (A) Schematischer Überblick über die miR-199-3p-Modulation in SILAC-markierten NIH 3T3-Fibroblasten. (B,C) Antwort von Proteinen auf miR-199-3p-Überexpression (B) oder -Inhibition (C) in Abhängigkeit von der Anwesenheit von vorhergesagten miR-199-3p Bindestellen in der zugehörigen mRNA. Dargestellt ist der Anteil an Proteinen, die mindestens zum dem auf der x-Achse angegebenen Grad reguliert sind. Eine Linksverschiebung der Kurve gegenüber „Alle Gene“ zeigt eine Repression, eine Rechtsverschiebung eine Disinhibition der Proteinsynthese an. Nur Proteine, die jeweils in beiden Replikaten von entweder Überexpression oder Inhibition detektiert wurden, sind dargestellt. (D) Regulation von Proteinen mit mindestens einer vorhergesagten miR-199-3p Bindestelle in der zugehörigen mRNA in Abhängigkeit von miR-199-3p-Überexpression oder -Inhibition. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten. Nur Proteine, die in beiden Replikaten sowohl bei Überexpression als auch bei Inhibition detektiert wurden, sind dargestellt. Die Vorhersage von miR-199-3p-Bindestellen erfolgte mit TargetScan Mouse 6.2. BS = vorhergesagte miR-199-3p-Bindestellen, vs. = versus.

4.2.1 Charakterisierung von *Ywhae* als möglichem Target von miR-199-3p

Um einzugrenzen, welches der von miR-199-3p regulierten Proteine für den pro-proliferativen Effekt dieser miRNA verantwortlich sein könnte, wurde unter den vorhergesagten Targets, die am stärksten nach miR-199-3p-Modulation reguliert waren, nach möglichen Kandidaten gesucht (siehe **Tabellen S1 und S2** im Anhang). Die MicroRNA-Bindestelle sollte neben der Maus auch für den Menschen vorhergesagt sein. Bei der Auswahl von Kandidaten lag der Fokus auf Proteinen, die bei miR-199-3p-Überexpression reprimiert waren, da hierfür konsistentere globale Effekte beobachtet wurden als bei Inhibition (**Abbildungen 11B und C**). Zusätzlich sollte ein bekannter Zusammenhang der Genfunktion mit Proliferation, Zellzyklus, Zelltod oder Apoptose bestehen, wofür ein Abgleich mit den Datenbanken von *Gene Ontology* (GO) (www.geneontology.org) und DAVID (engl. *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (david.abcc.ncifcrf.gov) durchgeführt wurde.

Die beschriebenen Schritte führten uns zur Identifikation von *Ywhae* (engl. *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide*, auch 14-3-3 ϵ genannt) als möglichem, für die Proliferation relevanten miR-199-3p-Target. *Ywhae* besitzt ein evolutionär konserviertes Bindemotiv für miR-199-3p, das nicht nur in Mensch, Maus und Ratte, sondern sogar in Krallenfröschen (*Xenopus tropicalis*) vorhanden ist (**Abbildung 12A**). Wie für andere potentielle miR-199-3p-Targets beobachtet (**Abbildungen 11A-C**), reagierte das YWHAE-Protein gemäß den Ergebnissen der SILAC-Studie deutlich stärker auf miR-199-3p-Überexpression als auf deren Blockade (**Abbildung 12B**). Die Quantifizierung ist dabei als sehr zuverlässig anzusehen, da pro Replikat jeweils mindestens 115 Peptide in die Analyse miteinbezogen wurden (**Tabelle S1** im Anhang). Gleichzeitig spricht die hohe Zahl von gemessenen Peptiden für einen relativ hohe Abundanz in NIH-3T3-Fibroblasten. Auch in NRCF ist *Ywhae* auf mRNA- und Proteinebene gut detektierbar (**Abbildungen 12C-F**). Zunächst wurde die Regulation von *Ywhae* durch miR-199-3p mittels qPCR und *Western Blot* bestätigt (**Abbildungen 12C und D**). Auf Proteinebene (**Abbildung 12D**) wurde hierbei eine wesentlich stärkere Repression beobachtet als auf mRNA-Ebene (**Abbildung 12C**). Als Nächstes wurde der Einfluss von *Ywhae* auf die Proliferation von NCRF untersucht. Der dazu verwendete Knockdown mittels siRNA war erfolgreich (**Abbildungen 12E und F**) und führte zu einer deutlichen Erhöhung der ³H-Thymidin-Inkorporation (**Abbildung 12G**) im Vergleich zur Negativkontrolle, was die erwartete anti-proliferative Funktion von *Ywhae* in kardialen Fibroblasten bestätigt. Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass mit *Ywhae* ein wahrscheinliches miR-199-3p-Target identifiziert wurde, das den pro-proliferativen Effekt von miR-199-3p in kardialen Fibroblasten mindestens teilweise erklären könnte.

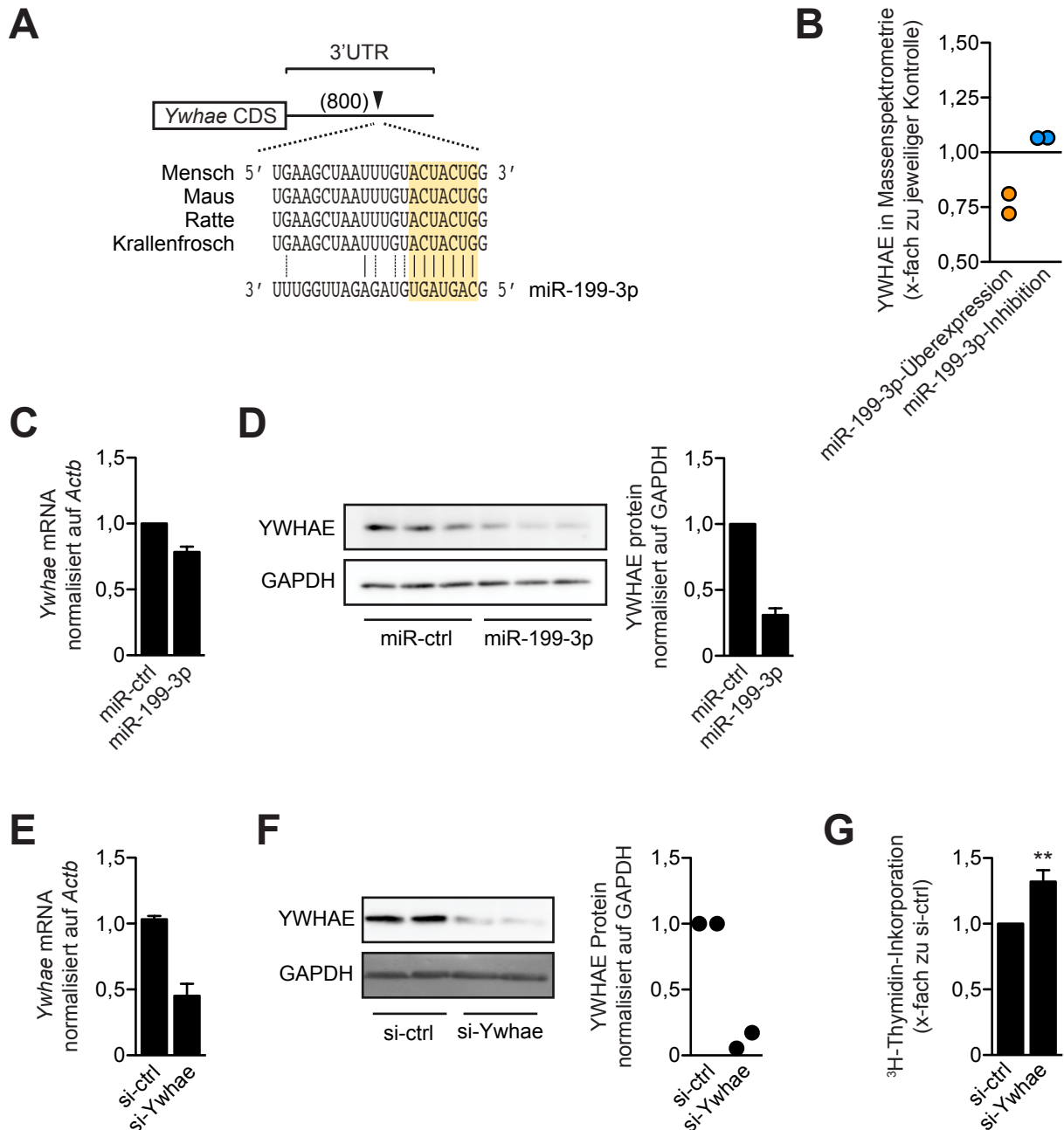


Abbildung 12. YWHAE (14-3-3ε) wird durch miR-199-3p reguliert und seine Inhibition erhöht die Proliferation von kardialen Fibroblasten. (A) Lokalisation der Bindestelle für miR-199-3p in der 3' UTR der *Ywhae* mRNA und ihre evolutionäre Konservierung. Der miR-199-3p-Seed und der dazu komplementäre Bereich sind gelb unterlegt. (B) Massenspektrometrische Messung der Regulation von YWHAE in NIH 3T3-Fibroblasten bei miR-199-3p-Überexpression und -Inhibition. (C,D) Bestätigung der Regulation von *Ywhae* durch miR-199-3p in NRCF auf mRNA-Ebene (C) und auf Proteinebene (D). Jeweils n=3 unabhängige Experimente. (E-G) *Ywhae* wurde in NRCF mittels RNA-Interferenz inhibiert. Überprüfung des *Knockdowns* auf mRNA-Ebene (E, n=3 unabhängige Experimente) und auf Proteinebene (D, n=2 unabhängige Experimente). (E) Einfluss des *Knockdowns* von *Ywhae* auf die Inkorporation von ³H-Thymidin. n=7 unabhängige Experimente. NRCF = neonatale kardinale Rattenfibroblasten, si-ctrl = Kontroll-siRNA, si-Ywhae = siRNA gegen *Ywhae*, miR-ctrl = Kontroll-MicroRNA, CDS = engl. *coding DNA sequence*, UTR = engl. *untranslated region*. **P<0,01 im Vergleich zur Kontrollbedingung.

* Der Autor dankt Johanna Donhauser, die während ihres Praktikums in unserer Arbeitsgruppe qPCR-Messungen zum siRNA-vermittelten *Knockdown* von *Ywhae* durchführte.

4.3 Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps von miR-223-defizienten Mäusen

4.3.1 Linksventrikuläre Drucküberlastung durch Aortenkonstriktion

MiR-223(-3p) wurde ähnlich wie miR-199-3p in den MicroRNA-Expressionsstudien an Zellfraktionen aus adulten Ratten- und Mäuseherzen als eine stark in kardialen Fibroblasten im Vergleich zu Herzmuskelzellen angereicherte MicroRNA identifiziert (siehe **Abschnitt 4.1, Abbildungen 3A, 5A**). Im Gegensatz zu miR-199-3p gibt es Mäuse mit einer globalen genetischen Deletion des miR-223-Gens, deren kardiovaskulärer Phänotyp hier genauer untersucht wurde. Zunächst wurden relativ alte Mäuse (10 Monate) analysiert, da manche Herzerkrankungen erst mit fortgeschrittener Lebensdauer manifest werden. Jedoch waren die Expression der Hypertrophiemarker Natriuretisches Peptid A (*Nppa*) und B (*Nppb*) sowie des fibroserelevanten Kollagens Typ I $\alpha 2$ (*Col1a2*) und das Herzgewicht in miR-223-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unverändert (**Abbildungen 13A und B**). Als Nächstes erzeugten wir operativ eine Transverse Aortenkonstriktion (TAC), die zu einer chronischen Drucküberlastung des Herzens einhergehend mit Hypertrophierung und/oder Untergang von Herzmuskelzellen und Fibrosierung des Myokards führt. Auch unter diesen Stressbedingungen unterschieden sich miR-223-defiziente Mäuse nicht von ihren nicht-transgenen Geschwistern hinsichtlich ihrer Herzfunktion und der Entwicklung von Hypertrophie und Fibrose (**Abbildungen 13C-E**).

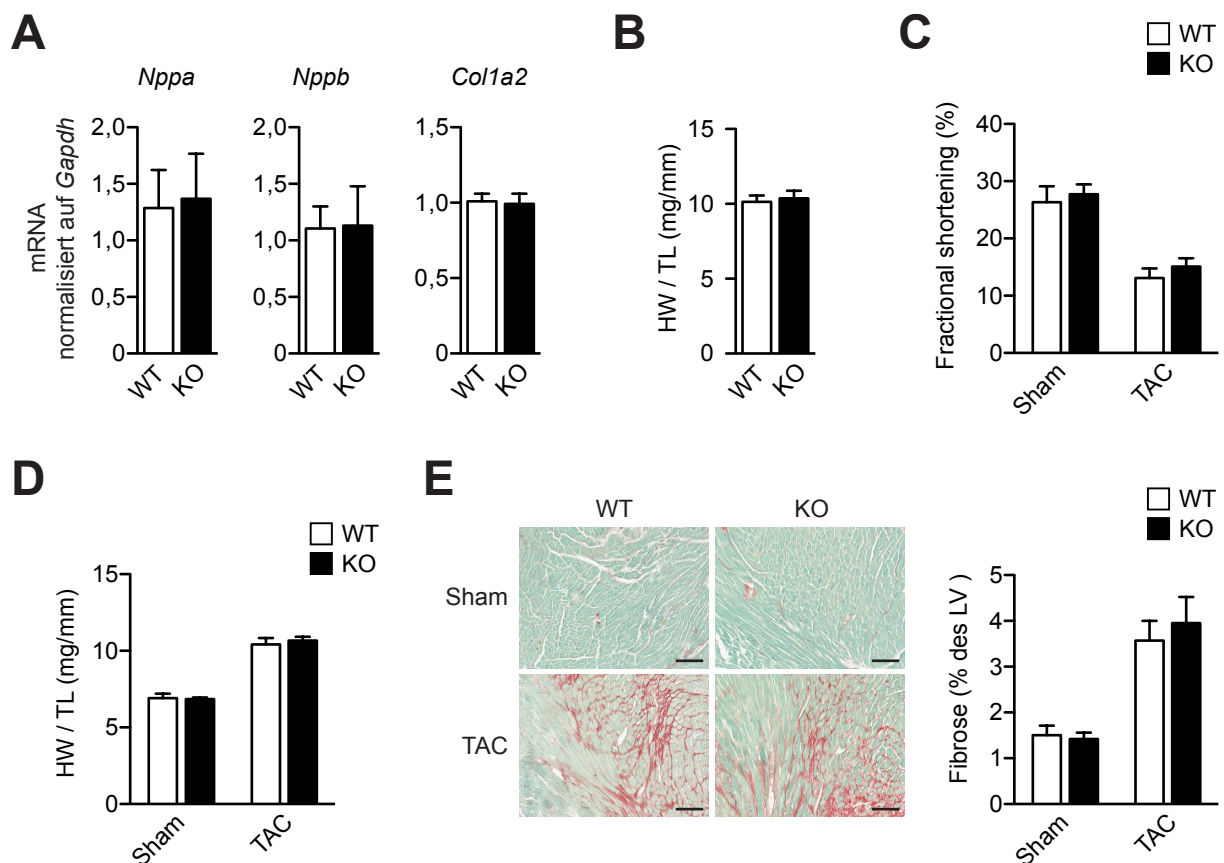


Abbildung 13. Deletion von miR-223 in Mäusen verändert nicht die Herzfunktion unter Basalbedingungen und nach transverser Aortenkonstriktion. (A) Bestimmung der Expression der Hypertrophiemarker Natriuretisches Peptid A (*Nppa*) und B (*Nppb*) sowie von Kollagen Typ I $\alpha 2$ (*Col1a2*) im Myokard von 10 Monate alten Mäusen mittels qPCR. $n=7$ Wildtyp (WT) und $n=6$ miR-223-defiziente (KO) Mäuse. **(B)** Verhältnis von Herzgewicht (HW) zu Tibialänge (TL) in 10 Monate alten Mäusen. $n=7-11$ Mäuse pro Genotyp. **(C-F)** Untersuchung von Mäusen vier Wochen nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC, führt zu chronischer Drucküberlastung) oder Scheinoperation (engl. *sham*). **(C)** Echokardiographische Analyse der linksventrikulären Kontraktilität (engl. *fractional shortening*) von $n=6$ (Sham) bzw. $n=11-14$ (TAC) Tieren. **(D)** Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge in $n=6$ (*Sham*) bzw. $n=20-21$ (TAC) Tieren. **(E)** Sirius Rot/*Fast Green*-Färbung von Herzschnitten (links) und Quantifizierung der Sirius Rot-Färbung (rechts) in $n=6$ (*Sham*) bzw. $n=20-21$ (TAC) Tieren. LV = Linker Ventrikel, Skalierungs balken, 100 μm .

4.3.2 Kardiale Ischämie-Reperfusion

Da eine regulatorische Funktion von miR-223 in mehreren myeloischen Immunzelltypen (u.a. Granulozyten und Makrophagen; siehe **Abschnitt 5.3.1**) beschrieben ist, untersuchten wir miR-223-defiziente Mäuse in einem kardialen Ischämie-Reperfusions-Stress-Modell, bei dem Entzündungsreaktionen eine wichtigere Rolle spielen als bei TAC. Bei diesem in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Metzler (Universitätsklinikum Innsbruck, D) durchgeführten Verfahren wird eine Koronararterie (engl. *LAD = left anterior descending coronary artery*) für einen gewissen Zeitraum (hier 30 min) abgebunden und danach wieder perfundiert (siehe **Abbildung 14A**), analog zu einem Patienten mit Myokardinfarkt, dessen

betroffenes Koronargefäß nach Ankunft in der Klinik mittels Perkutaner Transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) und/oder Thrombolyse wiedereröffnet wird. Zunächst wurde die Blutplasma-Konzentration von kardialem Troponin T untersucht, einem Protein, das aus geschädigten Herzmuskelzellen freigesetzt wird und das Ausmaß des Infarktschadens widerspiegelt. Sowohl nach 3 h als auch nach 48 h Reperfusion war dessen Konzentration in miR-223-defizienten Mäusen etwa doppelt so hoch wie im Wildtyp (**Abbildung 14B**). Damit übereinstimmend wurde sowohl nach 48 h als auch nach einer Woche Reperfusion eine signifikant erhöhte Infarktgröße (Bereiche in denen Immunzellen eingewandert waren) in H&E-gefärbten Herzschnitten von miR-223-defizienten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (**Abbildungen 14C und D**). Ebenso erschien die Größe der Infarktnarbe tendenziell erhöht (**Abbildung 14E**). Da das Ausmaß der Narbenbildung individuell jedoch sehr unterschiedlich ausfiel und mehrere Tiere in beiden Gruppen keine sichtbare Fibrosierung entwickelten, wurde hier kein signifikantes Ergebnis erreicht.

Um zu untersuchen, ob Immunzellen für den erhöhten Infarktschaden bei globaler miR-223-Deletion entscheidend sind, generierten wir Knochenmarkschimären durch Transplantation von miR-223-defizientem Knochenmark in letal bestrahlte Mäuse (zur Bestätigung des Chimärismus siehe auch **Abbildungen 19A und B**). Im Gegensatz zum globalen miR-223-Knockout wurde nach 48 h Reperfusion zwischen Mäusen, die miR-223-defizientes Knochenmark, und solchen, die Wildtyp-Knochenmark erhalten hatten, kein Unterschied bei der Troponin T-Konzentration beobachtet (**Abbildung 14F**). Dies spricht dafür, dass die Ursache für die erhöhte Myokardschädigung im Ischämie-Reperfusion-Modell bei globaler Deletion von miR-223 weder in Immunzellen noch in einem anderen hämatopoetischen Zelltyp zu suchen ist.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass miR-223-defiziente Mäuse deutlich empfindlicher auf kardiale Ischämie mit folgender Reperfusion reagieren als Wildtyp-Tiere.

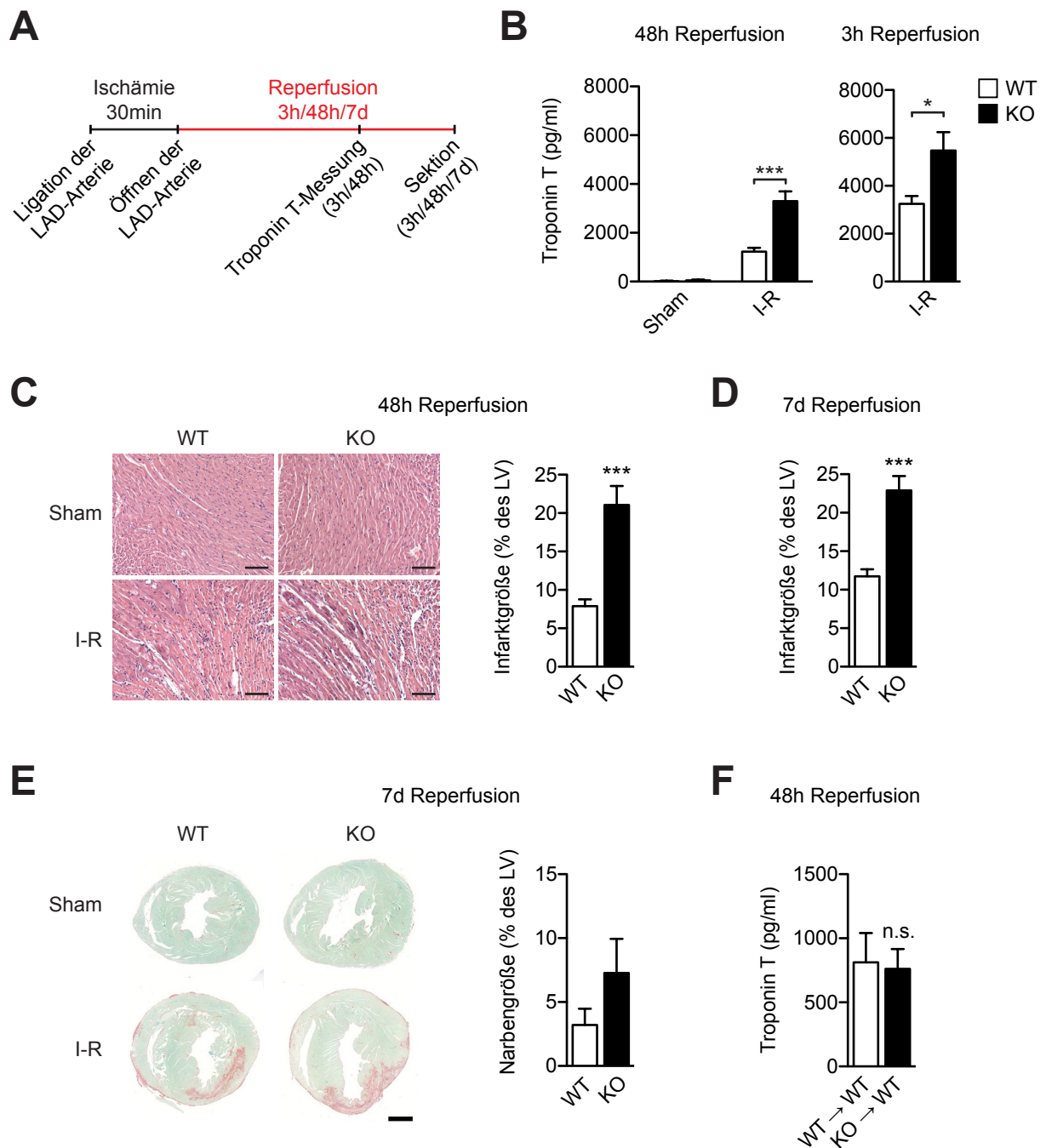


Abbildung 14. Deletion von miR-223 in Mäusen erhöht den Infarktschaden im kardialen Ischämie-Reperfusionmodell. (A) Schematischer Überblick über die Ischämie-Reperfusion (I-R)-Experimente. (B) Messung von kardialem Troponin T im Blutplasma von miR-223-defizienten (KO) und Wildtyp- (WT) Mäusen 3 h und 48 h nach Beginn der Reperfusion. n=4 scheinoperierte und n=15 ischämische Mäuse pro Genotyp für 48 h Reperfusion bzw. n=9 ischämische Mäuse pro Genotyp für 3 h Reperfusion. (C) H&E-Färbung von Herzschnitten (links) nach 48 h Reperfusion und Quantifizierung inflammatorischer Areale (rechts) als Maß für die Infarktgröße. n=9 ischämische Mäuse pro Genotyp. (D) Quantifizierung inflammatorischer Areale (Infarktgröße) wie in (C) nach 7 Tagen (d; engl. day) Reperfusion. n=7-9 Mäuse pro Genotyp. (E) Sirius-Rot/Fast Green-Färbung von Herzschnitten (links) und Quantifizierung der Sirius Rot-gefärbten Narbenaereale (rechts). n=7-9 Mäuse pro Genotyp. (F) Knochenmark von miR-223-defizienten oder WT-Mäusen wurde in WT-Mäuse transplantiert und die Empfänger einer I-R-Operation unterzogen. Messung von kardialem Troponin T im Blutplasma der Empfängertiere nach 48 h Reperfusion. n=5-7 Tiere pro Bedingung. Sham (engl.) = Scheinoperation, LAD Arterie = linke absteigende Koronararterie (engl. left anterior descending coronary artery), LV = Linker Ventrikel, n.s. = nicht signifikant. Skalierungsbalken, 100 µm in (C) und 1 mm in (E). *P<0,05, ***P<0,001 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbedingung.

4.3.3 Charakterisierung der Thrombozyten- und Megakaryozytenfunktion von miR-223-defizienten-Mäusen*

Auf Grund mehrerer Berichte, die besagen, dass miR-223 eine der höchstexprimierten MicroRNAs in Blutplättchen^{178,179} und Megakaryozyten^{156,159,180–186} ist, beschlossen wir, die Funktion dieser beiden Zelltypen in miR-223-defizienten Mäusen zu untersuchen. Die hämozytometrische Blutuntersuchung ergab keine Unterschiede hinsichtlich von Plättchenzahl und –volumen zwischen miR-223-defizienten Mäusen und Wildtyp-Geschwistern (**Abbildungen 15A und B**). Ebenso unverändert waren die Lebensdauer zirkulierender Plättchen (ermittelt durch Durchflusszytometrie nach *in vivo*-Markierung mit Biotin) sowie das Aussehen und Gewicht der Milz als dem vorwiegenden Organ des Plättchenabbaus (**Abbildungen 15C und D**). Als Nächstes untersuchten wir die Oberflächenexpression der Integrine α IIb und β 1 sowie der Glykoproteine Iba und IX mittels Durchflusszytometrie. Alle diese Plättchenrezeptoren waren unverändert, bemerkenswerterweise auch Integrin β 1, dessen mRNA laut dem Vorhersagealgorithmus TargetScan (Version 6.2) eine putative miR-223-Bindestelle enthält (**Abbildung 15E**). Als Maß für die Aktivierbarkeit von Blutplättchen bestimmten wir durchflusszytometrisch die Menge von aktiviertem Integrin α IIb β 3 sowie von P-Selektin, einem Bestandteil der α -Granula, der bei Aktivierung auf der Plättchenoberfläche exponiert wird. Bei beiden Parametern war in Abwesenheit von miR-223 eine normale Antwort auf die Stimulation mit Thrombin bzw. Convulxin zu beobachten (**Abbildung 16A**). Auch Aggregometrieversuche mit Vollblut und gewaschenen Plättchen ergaben keine Hinweise auf eine veränderte Aggregation von miR-223-defizienten Plättchen bei Stimulation mit ADP, Kollagen oder Thrombin (**Abbildungen 16B und C**). Ebenso beeinträchtigte die genetische Deletion von miR-223 weder die Thrombusretraktion, noch die Plättchenadhäsion an kollagenbeschichtete Flusskammern oder die Blutungszeiten (**Abbildungen 16D-F**). Diese Ergebnisse sprechen für eine im Wesentlichen unveränderte Plättchenfunktion in der Abwesenheit von miR-223.

* Dieser Abschnitt (inklusive Abbildungen) wurde in leicht veränderter Fassung in Leierseder *et al.*²⁷⁴ in der Fachzeitschrift *Thrombosis and Haemostasis* veröffentlicht.

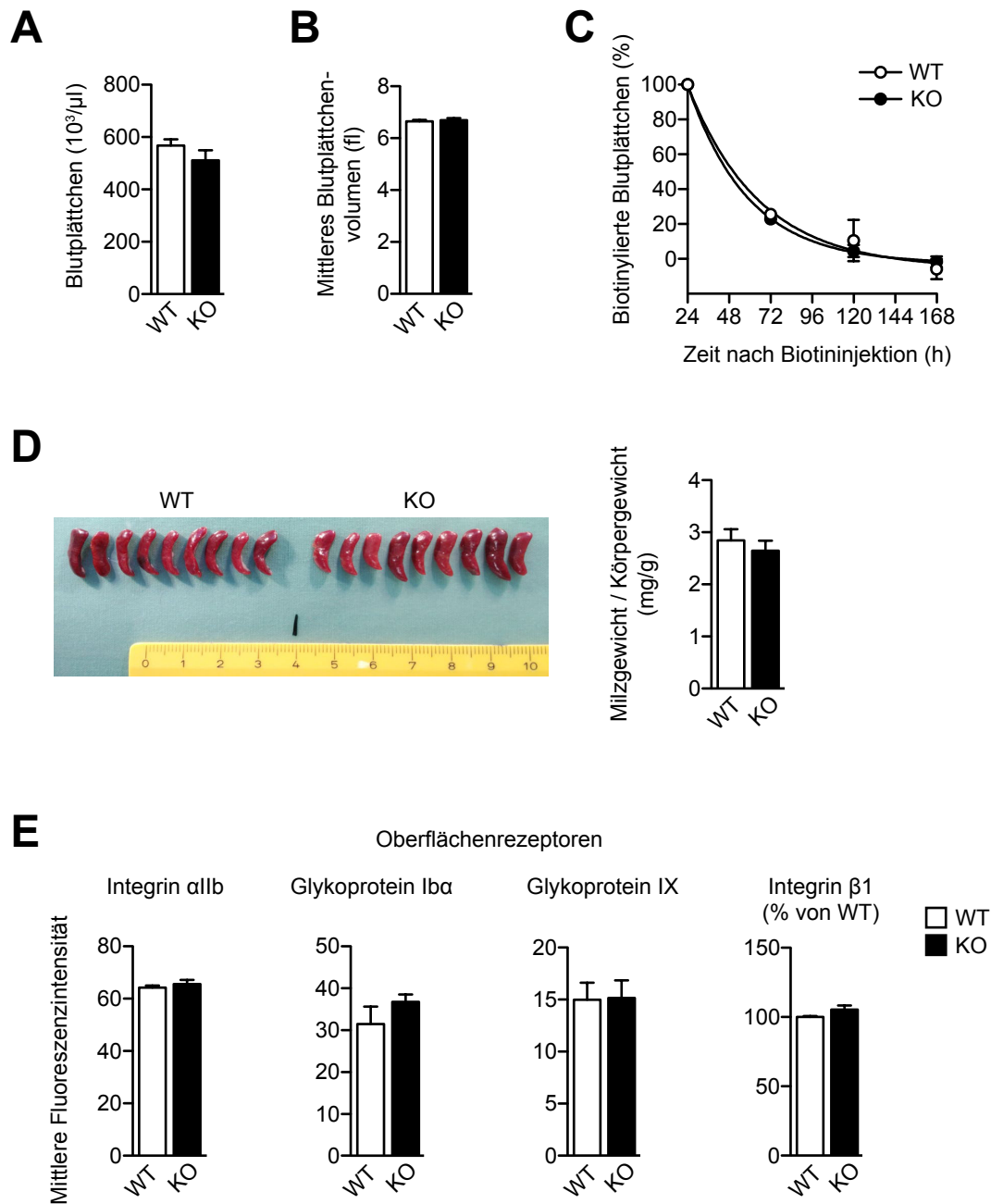


Abbildung 15. Blutplättchen von miR-223-defizienten Mäusen erscheinen normal unter Basalbedingungen. (A-B) Anzahl (A) und mittleres Zellvolumen (B) zirkulierender Blutplättchen in miR-223-defizienten (KO) und Wildtyp- (WT) Mäusen. n=6 Mäuse pro Genotyp. (C) Überlebenskurven von Blutplättchen. Biotin wurde intravenös zum Zeitpunkt 0 injiziert und mittels Durchflusszytometrie der Anteil markierter Zellen über mehrere Tage hinweg bestimmt. n=3-4 Mäuse pro Genotyp. Die Kurvenanpassung wurde mit der Least-Squares-Methode unter der Annahme eines einphasischen Zerfalls durchgeführt. (D) Morphologie und Gewicht der Milz. n=9 Mäuse pro Genotyp. Skala in cm. (E) Durchflusszytometrische Messung der Expression der Integrine αIIb (CD41) und β1 sowie der Glykoproteine Iba und IX auf der Oberfläche von Blutplättchen. n=7-8 Mäuse pro Genotyp für Integrin β1 und n=5 Mäuse pro Genotyp für alle anderen getesteten Proteine. Fehlerbalken sind nicht gezeigt, wenn sie kleiner als die Symbole sind (C).

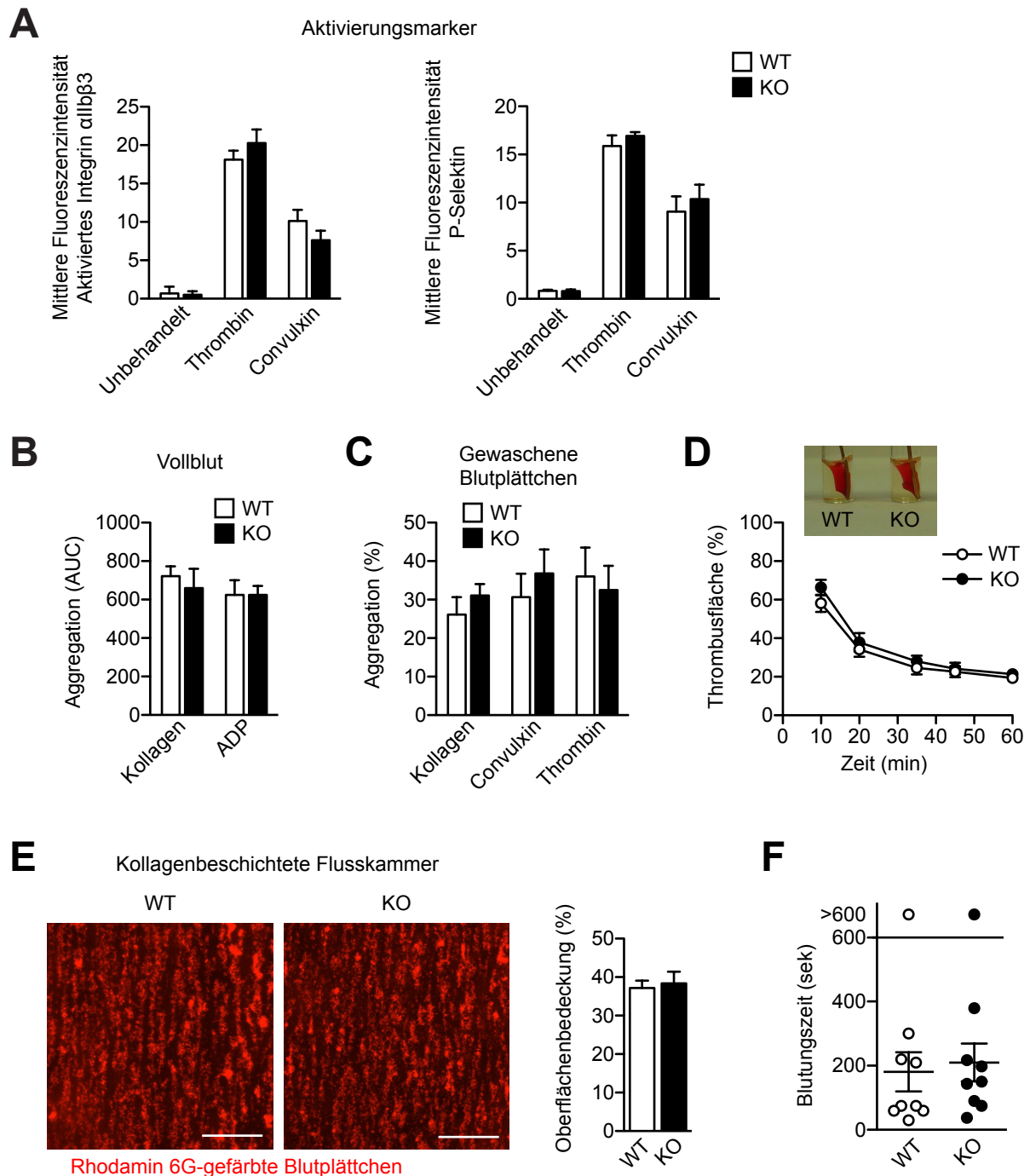


Abbildung 16. Intakte Plättchenfunktion in miR-223-defizienten Mäusen. (A) Blutplättchen aus miR-223-defizienten und Wildtyp-Mäusen wurden mit Thrombin (1 U/ml) oder Convulxin (50 ng/ml) stimuliert und die Aktivierung von Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ sowie die Oberflächenexpression von P-Selektin durchflusszytometrisch bestimmt. n=5 Mäuse pro Genotyp. (B) Messung der Aggregation von Blutplättchen in Vollblut mittels impedanzbasierter Aggregometrie. Die Stimulation erfolgte mit ADP (6,5 μM) bzw. mit Kollagen (3,2 $\mu\text{g/ml}$). n=3 Mäuse pro Genotyp für ADP und n=6 Mäuse pro Genotyp für Kollagen. (C) Messung der Aggregation von gewaschenen Blutplättchen mittels Lichttransmissions-Aggregometrie. Die Stimulation erfolgte mit Kollagen (5 $\mu\text{g/ml}$), Convulxin (50 ng/ml) bzw. Thrombin (1 U/ml). n=4-9 Mäuse pro Gruppe. (D) Thrombusretraktion durch Blutplättchen bei Stimulation mit 0,75 U/ml Thrombin und 4 mM CaCl_2 . Das Bild zeigt repräsentative Thromben nach 20 min Inkubation. n=7-9 Mäuse pro Genotyp. (E) Plättchenadhäsion in kollagenbeschichteten Flusskammern unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 1000 sek^{-1}). Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von Rhodamin 6G-gefärbten Thromben (links) und Quantifizierung der thrombenbedeckten Fläche relativ zur Gesamtfläche nach 3 min Laufzeit (rechts). n=4 Mäuse pro Genotyp. (F) Blutungszeit nach Entfernung der Schwanzspitze. Fehlerbalken sind nicht gezeigt, wenn sie kleiner als die Symbole sind (D). Skalierungsbalken, 100 μm . AUC = area under the curve.

Auf Grund der offensichtlichen Diskrepanz zwischen der hohen Abundanz von miR-223 in Blutplättchen und seiner scheinbaren Vernachlässigbarkeit für die Plättchenfunktion, stellte sich die Frage, ob überhaupt vorhergesagte Targets von miR-223 in miR-223-defizienten Plättchen de-reprimiert sind. Hierzu wählten wir aus den zehn putativen miR-223-Targets mit dem höchsten Rang in TargetScan Human (Version 6.2) all jene, die ebenso eine konservierte Bindestelle in Mäusen haben und in Blutplättchen nachweisbar waren. Die qPCR-Analyse zeigte eine signifikant erhöhte Expression in miR-223-defizienten im Vergleich zu Wildtypplättchen für zwei der vier ausgewählten mRNAs, nämlich *Fbxw7* und *Sp3* (**Abbildung 17A**). Aus diesen Daten folgt, dass miR-223 in Blutplättchen (bzw. in MK als ihren kernhaltigen Vorläufern) funktionell aktiv ist, da es die Expression seiner Targets reguliert. Dies wirkt sich aber offensichtlich nicht auf die Plättchenfunktion aus.

Eine frühere Studie schlug den ADP-Rezeptor P2Y₁₂ als Target von miR-223 in humanen Plättchen vor,¹⁵⁶ weswegen wir auch die Expression dieses Gens untersuchten. Bioinformatische Analysen zeigten jedoch, dass, im Gegensatz zur Situation im Menschen, die *P2ry12* 3' UTR der Maus keine vorhergesagte Bindestelle für miR-223 enthält. Dementsprechend fanden wir keinen veränderten Gehalt an *P2ry12* mRNA in miR-223-defizienten Plättchen (**Abbildung 17B**). Dieser Befund stimmt mit der unveränderten Antwort auf die Stimulation mit ADP überein (**Abbildung 16B**).

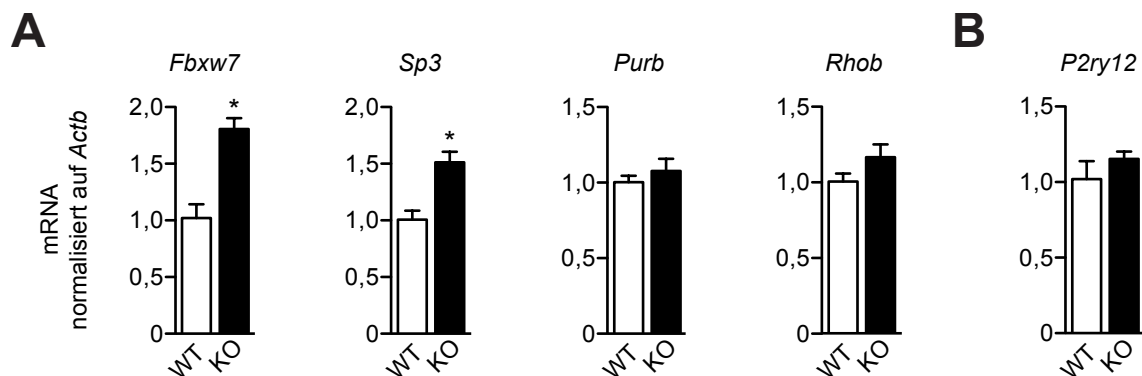


Abbildung 17. Expression vorhergesagter miR-223 Targets in Blutplättchen. (A) QPCR-Analyse der mRNAs für die E3-Ubiquitin-Proteinligase *Fbxw7*, den Transkriptionsfaktor *Sp3*, den Transkriptionsaktivator Pur- β (*Purb*) und das kleine G-Protein *Rhob* in Blutplättchen aus miR-223-defizienten und Wildtyp-Mäusen. (B) Bestimmung der mRNA-Expression wie in (A) für den ADP-Rezeptor P2Y₁₂ (*P2ry12*), dessen mRNA im Mensch, jedoch nicht in der Maus eine vorhergesagte miR-223-Bindestelle enthält. n=3-4 Mäuse pro Genotyp. * P<0.05 im Vergleich zum Wildtyp.

Darüber hinaus untersuchten wir die Plättchenproduktion in miR-223-defizienten Mäusen, da miR-223 auch in myeloischen Vorläuferzellen einschließlich der plättchenproduzierenden MKs hochabundant ist.^{178,179} Da die Plättchenzahl in unbehandelten Mäusen normal war (**Abbildung 15A**), wäre es denkbar, dass milde Defekte der Thrombopoese unter *Steady*

State-Bedingungen kompensiert werden. Folglich setzten wir die Plättchenproduktion in Mäusen durch die Injektion eines plättchendepletierenden Antikörpers unter Druck. Die Erholung der Plättchenzahlen, die auf die experimentell induzierte Thrombozytopenie folgt, wies bei miR-223-defizienten Mäusen eine milde und vorübergehende Verzögerung im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern auf (**Abbildung 18A**). Um festzustellen, ob die leicht verringerte Plättchenzahl von miR-223-defizienten Mäusen 72 h nach Antikörperinjektion einen zellautonomen Ursprung hat, erzeugten wir Knochenmarkschimären durch Transplantation von miR-223-defizientem Knochenmark in letal bestrahlte Empfängermäuse. Der Erfolg der Transplantation wurde dabei auf zwei Arten bestätigt: Erstens wurden CD45.1-exprimierende Mäuse als Empfänger verwendet, was uns erlaubte, den relativen Anteil der aus den Spenderknochenmark abgeleiteten CD45.2-tragenden Zellen an allen CD45-positiven Zellen im Blut der Empfänger abzuschätzen. Dieser lag zwischen 77% und 93% CD45.2-positiven Zellen und war in beiden transplantierten Gruppen sehr ähnlich (**Abbildung 19A**). Zweitens war in der *Real Time*-PCR fast kein miR-223 in Blutzellen von Mäusen nachweisbar, die miR-223-defizientes Knochenmark erhalten hatten (**Abbildung 19B**). Jedoch lag das Expressionsniveau immer noch über dem von Mäusen mit globaler miR-223-Deletion (**Abbildung 19C**), was bestätigt, dass einzelne Zellen nicht durch die Transplantation ausgetauscht wurden. 72 h nach der Injektion des plättchendepletierenden Antikörpers war die Plättchenzahl in Empfängern von miR-223-defizientem Knochenmark ähnlich wie die in Wildtyp-transplantierten Mäusen (**Abbildung 18B**). Dies deutet darauf hin, dass die verzögerte Erholung der Plättchenzahl in Mäusen mit globaler miR-223-Deletion nicht von miR-223 in MKs abhängt und folglich kein zellautonomer Effekt ist.

Um diese Vermutung weiter zu untermauern, wurden zusätzliche Versuche zur Charakterisierung und Funktion miR-223-defizienter MKs durchgeführt (**Abbildung 20**). Da die Interaktion mit Extrazellulärmatrix sowohl für die Wanderung von MKs in die vaskuläre Nische als auch für die Plättchenfreisetzung essentiell ist,¹⁸⁷ untersuchten wir die Ausbreitung von MKs auf Fibronectin, Fibrinogen und Kollagen und beobachteten keine Änderung beim Fehlen von miR-223 (**Abbildung 20A**). Ebenfalls ungestört war die Bildung von Proplättchen durch miR-223-defiziente MKs *in vitro* (**Abbildung 20B**). Darüber hinaus scheint die Reifung von MKs nicht behindert zu sein, da miR-223-defiziente *colony-forming unit* (CFU)-MKs die Fähigkeit behielten, zu Kolonien heranzuwachsen (**Abbildung 20C**). Zuletzt untersuchten wir die MK-Zahlen im Knochenmark 72 h nach der Induktion der Thrombozytopenie und fanden auch hier keine Änderung in miR-223-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (**Abbildung 20D**). Außer der (anscheinend nicht zellautonomen) Verzögerung der Plättchenproduktion nach Depletion bieten unsere Daten also keinen Anhaltspunkt für eine gestörte Funktion von miR-223-defizienten MKs.

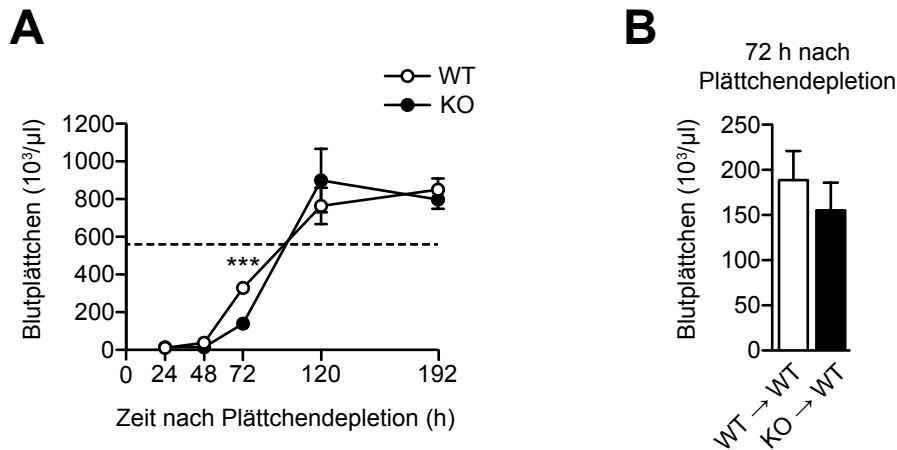


Abbildung 18. Leichte Verzögerung der depletionsinduzierten Plättchenneubildung in miR-223-defizienten Mäusen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle. (A) Zeitverlauf der Anzahl zirkulierender Blutplättchen in miR-223-defizienten und Wildtyp-Mäusen nach antikörperinduzierter Plättchendepletion. Die gestrichelte Linie zeigt die mittlere Plättchenzahl un behandelter Wildtypmäuse (aus Abbildung 14A). n=14-15 Mäuse pro Gruppe bei 72 h und n=3-5 Mäuse bei allen anderen Zeitpunkten. **(B)** Knochenmark von miR-223-defizienten oder Wildtyp-Mäusen wurde in Wildtyp-Mäuse transplantiert und die Anzahl zirkulierender Blutplättchen in Empfängertieren 72 h nach Plättchendepletion gemessen. n=4-6 Mäuse pro Gruppe. ***P<0,001 im Vergleich zum Wildtyp 72 h nach Plättchendepletion.

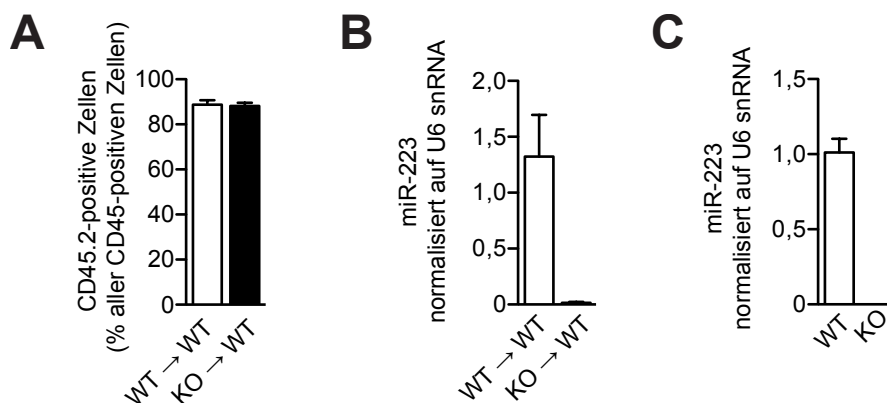


Abbildung 19. Abschätzung des Chimerismus von knochenmarkstransplantierten Mäusen. (A) Durchflusszytometrische Messung von CD45.1- und CD45.2-tragenden Zellen im Blut. Quantifizierung des Anteils von CD45.2-positiven (d.h. vom Spender stammenden) Zellen im Blut von CD45.1-Empfängertieren, in die Knochenmark aus miR-223-defizienten oder Wildtyp-Mäusen (beide CD45.2) transplantiert wurde. n=7-8 Tiere pro Transplantationsbedingung. **(B)** Bestimmung des miR-223-Gehalts in zirkulierenden Zellen aus knochenmarkstransplantierten Tieren mittels qPCR. n=4-5 Mäuse pro Gruppe. **(C)** Bestimmung des miR-223-Gehalts in zirkulierenden Blutplättchen von Tieren mit globaler miR-223-Deletion bzw. Wildtyp-Kontrollen mittels qPCR. n=3-4 Mäuse pro Genotyp.

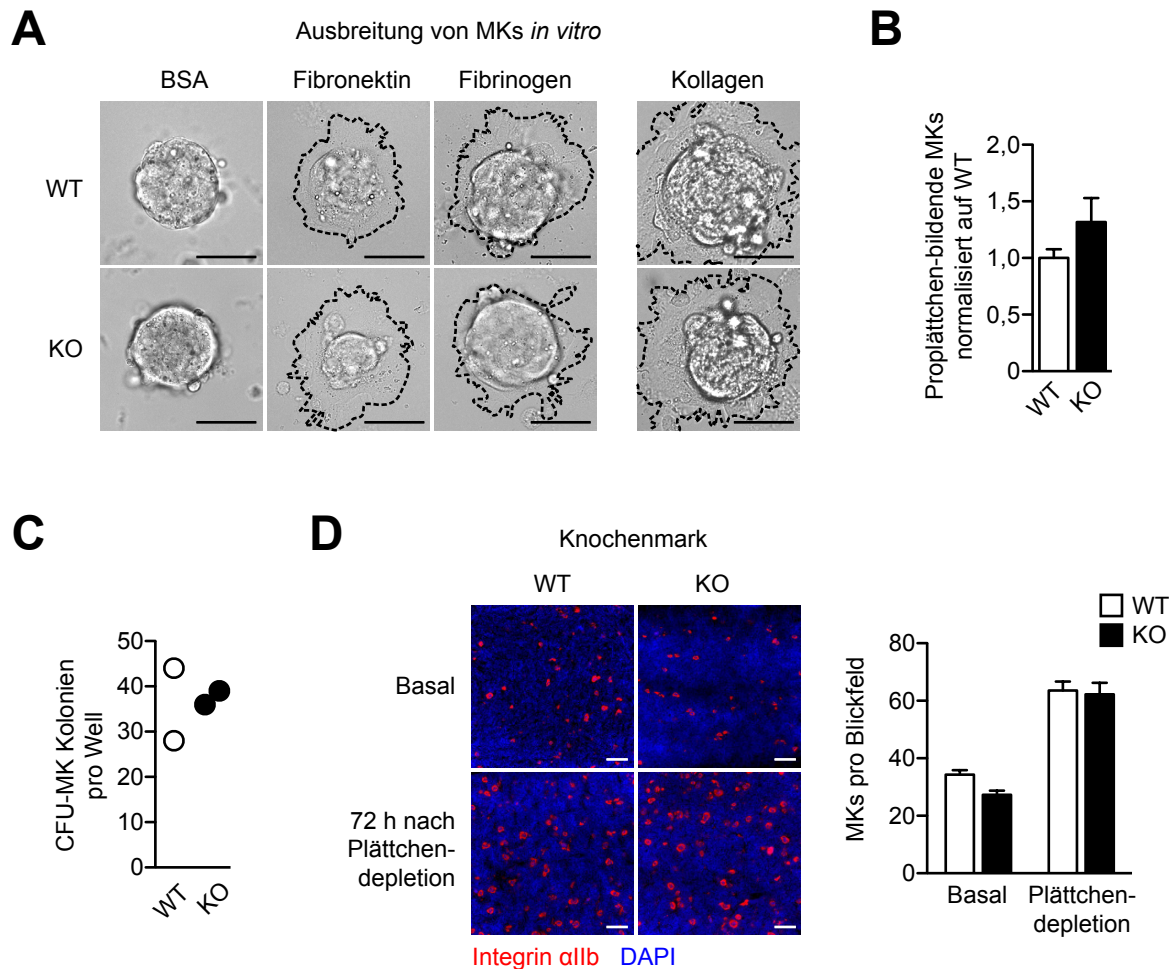


Abbildung 20. Normale Megakaryozytenzahl und -funktion in miR-223-defizienten Mäusen. (A) Megakaryozyten (MKs) aus fötalen Leberzellen von miR-223-defizienten Mäusen besitzen eine unveränderte Fähigkeit zur Ausbreitung auf verschiedenen beschichteten Oberflächen. BSA (engl. *bovine serum albumin*) diente als Negativkontrolle. Wegen unterschiedlicher Ausbreitungsgeschwindigkeiten wurden repräsentative Bilder entweder 5 h (Fibronektin, Fibrinogen, BSA) oder 3 h (Kollagen) nach Aussäen aufgenommen. Die Zellumrisse sind mit gestrichelten Linien hervorgehoben. Zellen von n=3-4 Föten pro Genotyp wurden untersucht. **(B)** Proplättchen-Bildung durch MKs aus fötalen Leberzellen. Gezeigt ist die Zahl der MKs, die nach 5 Tagen Kultur in der Anwesenheit von 50 ng/ml Thrombopoetin Proplättchen gebildet hatten. Zellen von n=6-7 Föten pro Genotyp. **(C)** Anzahl gebildeter *colony-forming unit* (CFU)-MK-Kolonien aus adulten Knochenmarkszellen nach 7 Tagen Kultur. n=2 Mäuse pro Genotyp. **(D)** Mikroskopische Analyse der MK-Zahlen im Knochenmark 72 h nach Plättchendepletion bzw. ohne Behandlung. Integrin αIIb (CD41) (rot) wurde als Marker für MKs verwendet und Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Mindestens vier 200x-Blickfelder pro Tier wurden für die Quantifizierung ausgewertet. n=7-10 Mäuse pro Gruppe. Skalierungsbalken, 50 µm in (A) und 100 µm in (E).

5 DISKUSSION

5.1 MicroRNA-Expressionsprofile von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten

Die essentielle Rolle diverser MicroRNAs in Herzmuskelzellen ist mittlerweile breit akzeptiert und in vielen Publikationen beschrieben,⁴ während MicroRNAs in kardialen Fibroblasten bisher kaum untersucht sind. Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese Lücke ein Stück weit zu schließen. Unseren MicroRNA-Expressionstudien lag die Vermutung zu Grunde, dass MicroRNAs, die selektiv nur in kardialen Fibroblasten exprimiert oder zumindest stark in diesen Zellen gegenüber Kardiomyozyten angereichert sind, wahrscheinlich zelltyp-spezifische Funktionen erfüllen und deshalb besonders interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen darstellen. Meines Wissens wurden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal die Expressionsprofile beider Zelltypen systematisch verglichen. Ein zusätzlicher Vergleich mit den anderen zwei in nennenswerter Zahl im Herz vorkommenden Zelltypen, Endothelzellen und glattmuskulären Zellen, war leider nicht möglich, da hierfür in unserem Labor keine etablierten Isolationsprozeduren zur Verfügung stehen. Die Reinheit der verwendeten Zellpräparationen von kardialen Fibroblasten und Myozyten war hingegen schon im Rahmen meiner Masterarbeit¹⁷⁵ durch Immunfluoreszenzanalysen im Detail charakterisiert worden und wurde hier mittels qPCR für Kulturen aus adulten Mäusen bestätigt (**Abbildung 4**). Die vergleichsweise schwache, circa sechsfache Anreicherung des Fibroblastenmarkers *P4hb* in Fibroblastenkulturen (**Abbildung 4A**) verglichen mit der mehr als 50-fachen Anreicherung des Kardiomyozytenmarkers *Myh6* in Kardiomyozyten (**Abbildung 4B**) ist wahrscheinlich durch die nicht vollkommene Spezifität des Fibroblastenmarkers *P4hb* zu erklären, der zumindest in Immunfluoreszenzfärbungen auch eine Restexpression in Herzmuskelzellen aufzuweisen scheint (eigene, nicht gezeigte Beobachtungen).

Der Vergleich der MicroRNA-Expressionsprofile von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten in der vorliegenden Studie wurde einerseits mittels qPCR an Präparationen aus adulten Ratten (**Abbildungen 3 und 6A**), andererseits mittels Microarrays an Isolaten aus adulten Mäusen (**Abbildungen 5 und 6B**) durchgeführt. Sowohl bei den am stärksten in Fibroblasten angereicherten MicroRNAs (**Abbildungen 3A und 5A**) als auch bei den präferentiell in Kardiomyozyten exprimierten MicroRNAs (**Abbildungen 6A und B**) wurde eine erhebliche Übereinstimmung zwischen beiden Detektionsplattformen und Spezies gefunden (übereinstimmend angereichert in Fibroblasten: miR-199a/b-3p, miR-223, miR-199a-5p, let-7b, miR-146a; in Kardiomyozyten: miR-1, miR-133a/b, miR-378, miR-208(a), miR-499). Der tatsächliche Grad an Übereinstimmung ist eventuell noch höher,

da in manchen Fällen verschiedene Mitglieder derselben MicroRNA-Familie bei den beiden unterschiedlichen Studien gefunden wurden (miR-125b-5p, let-7b, let-7c, let-7i angereichert in ARCF versus miR-125a-5p und let-7b in AMCF; **Abbildungen 3A und 5A**), was möglicherweise mit einer unvollständigen Spezifität der Detektionssysteme für die verschiedenen MicroRNA-Isoformen zu erklären ist. Einen deutlichen Hinweis auf die prinzipielle Zuverlässigkeit der vorliegenden Daten liefert überdies die Tatsache, dass alle erwähnten übereinstimmend in Kardiomyozyten angereicherten MicroRNAs (miR-1, miR-133a/b, miR-208(a), miR-378, miR-499) bereits in früheren Publikationen als muskel- bzw. kardiomyozytenspezifisch beschrieben wurden und bekannte Funktionen in diesem Zelltyp ausüben.^{16,96,97,107,188} Bei unseren beiden MicroRNA-Expressionsstudien mit Zellen aus adulten Mäusen und Ratten fiel auf, dass insgesamt mehr bevorzugt in Kardiomyozyten exprimierte MicroRNAs zu beobachten waren und diese auch relativ stärker gegenüber dem anderen Zelltyp angereichert waren als dies umgekehrt für Fibroblasten der Fall war. Dies könnte einerseits als Ausdruck des höheren Differenzierungsgrades von Muskelzellen aufgefasst werden, andererseits aber auch durch die relativ etwas geringere Reinheit der Kardiomyozyten- verglichen mit den Fibroblastenpräparationen bedingt sein.

Im Gegensatz zur Rangfolge der in jedem Zelltyp angereicherten MicroRNAs gab es deutliche Unterschiede zwischen beiden MicroRNA-Expressionsstudien hinsichtlich der gemessenen relativen Expressionsstärke der verschiedenen MicroRNAs zueinander (**Abbildungen 3B und 5B**) und bezüglich der relativen Anreicherung der MicroRNAs im jeweiligen Zelltyp (generell niedrigere Anreicherung der MicroRNAs bei Detektion mit Microarray als mit qPCR, **Abbildungen 3A und 5A bzw. 6A und B**). Dies ist wahrscheinlich eher auf plattformabhängige (Messung der Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung der RNA an DNA-Sonden im Microarray vs. Amplifikation mit Stem-Loop-Primern in der qPCR) als auf spezie-abhängige Unterschiede zurückzuführen. Bezüglich der verwendeten Stem-Loop-Primer berichteten Petriv *et al.*¹⁷⁹ bei einem auf Microfluidics basierendem System Amplifikationseffizienzen, die meist zwischen 70% und 130% lagen, während Lu *et al.*¹⁸⁹ bei drei gezeigten Primern sehr stabile Primer-Effizienzen zwischen 105% und 109% maßen.

Insgesamt scheinen unsere Daten zur Fibroblastenspezifität von MicroRNAs also hinreichend verlässlich, um darauf basierend funktionelle Studien in kardialen Fibroblasten zu konzipieren.

5.2 MiR-199-3p - eine in kardialen Fibroblasten angereicherte MicroRNA

5.2.1 Expressionsmuster und bekannte Funktionen von miR-199 und verwandten MicroRNAs

Die MicroRNAs miR-199a-3p und miR-199b-3p (wie erwähnt mit identischer Basenfolge, siehe **Abschnitt 4.2**) entstehen aus dem nahe dem 3'-Ende gelegenen Teil der Pre-miRNAs pre-miR-199a und pre-miR-199b und sind in ihrer Sequenz fast völlig konserviert von Säugern bis hin zum Zebrafisch (www.mirbase.org). Insgesamt liegen in den Spezies Mensch und Maus drei potentielle Loci für die Produktion von MicroRNAs der miR-199-Familie vor, nämlich miR-199a-1 und miR-199a-2 sowie miR-199b, die alle auf dem Gegenstrang eines Dynamin-Gens (*DNM2*, *DNM3*, *DNM1*) liegen (**Abbildung 21**). Der miR-199a-2-Locus befindet sich zudem in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem miR-214-Locus und wird zusammen mit diesem im nicht-kodierenden Gen *DNM3OS* (engl. *Dynamin 3 opposite strand*) transkribiert.^{190,191} Im generell weniger gut annotierten Genom der Ratte ist bisher nur ein miR-199a-Gen (ebenfalls im Cluster mit miR-214), d.h. analog zu miR-199a-2, und kein miR-199b-Gen identifiziert worden (www.mirbase.org und www.ensembl.org).

Bemerkenswerterweise scheinen alle beteiligten Gene, d.h. miR-199-3p, miR-199a-5p, miR-199b-5p und miR-214 (miR-214* war kaum nachweisbar) im Herz präferentiell in Fibroblasten gegenüber Kardiomyozyten exprimiert zu sein (**Abbildungen 3A und 5A**). Darunter wies miR-199-3p jedoch sowohl die scheinbar stärkste Anreicherung als auch die höchste Abundanz auf (**Abbildungen 3 und 5**), weswegen der Einfluss dieser MicroRNA auf die Funktion von kardialen Fibroblasten genauer untersucht wurde.

Mehrere Veröffentlichungen bestätigen die Anreicherung von MicroRNAs aus der miR-199/miR-214-Gruppe in mesenchymalen Zellen. Sie deuten aber auch darauf hin, dass miR-199-3p nicht nur im Herz vorhanden ist: *DNM3OS* scheint pränatal spätestens ab dem Tag E9,5 der Embryonalentwicklung von Mäusen vor allem in mesenchymalen Zellen exprimiert zu sein.^{190,191} Hierbei erfährt die globale Expression sowohl von *DNM3OS* als auch von miR-199a-3p/-5p/miR-214 einen Höhepunkt um den Tag E12,5 und sinkt danach wieder ab.^{190,192} Das Gewebeexpressionsmuster der einzelnen MicroRNAs zu diesem Zeitpunkt unterscheidet sich dabei allerdings möglicherweise deutlich, da *in situ*-Hybridisierungen für miR-199a-3p das stärkste Signal im Hinterhirn zeigten, während miR-199-a-5p und miR-214 in den Extremitäten hochexprimiert waren.¹⁹² Die prä- und postnatale Expression von *DNM3OS* ist jedoch auch im Herz ausgeprägt.¹⁹⁰ Innerhalb des Herzens beobachteten Schneider *et al.* eine klar begrenzte Expression von miR-199a-5p in Bindegewebszellen (Herzklappen, Nicht-Myozyten des Epi- und Endokards, und α -SMA-negative Zellen der

Gefäßwände).¹⁹³ Ebenso belegen *Deep Sequencing*-Daten eine Anreicherung von der pre-miR-199a-1 und pre-miR-199b in Bindegewebe,¹⁹⁴ sowie innerhalb des Herzens eine Anreicherung von miR-199-3p in den bindegewebsreichen Herzklappen.⁷ Interessanterweise ergab auch ein Vergleich verschiedener Zelllinien eine ausschließliche Expression von miR-199a-5p und miR-199-3p in Fibroblasten.¹⁹⁵

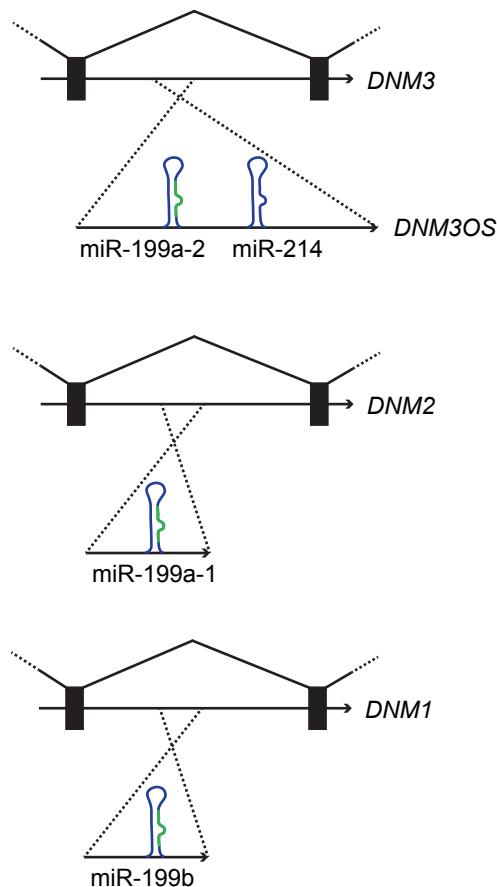


Abbildung 21. Genetische Lokalisation von miR-199-3p-kodierenden Loci. MicroRNA-*Stem Loop*-Strukturen sind blau und miR-199-3p grün dargestellt. Zu Details siehe Text.

Trotz dieser relativ eindeutigen Datenlage bezüglich der zelltypspezifischen Expression von MicroRNAs der miR-199-/miR-214-Gruppe im Herz war ihre Rolle in Kardiomyozyten Gegenstand mehrerer Studien. Die Funktion von miR-199-3p wurde bisher allerdings nicht gesondert untersucht. In vielen Fällen wurde eine Hochregulation von miR-199a-5p,^{89,105,196–198} miR-199b-5p^{85,198,199} oder miR-214^{81,89,92,105,196,198,200} im Myokard von Mäusen, Schweinen und Menschen unter kardialen Stress berichtet. Mehrere globale MicroRNA-Expressionsstudien deuten auch auf einen myokardialen Anstieg von miR-199-3p in

Tiermodellen mehrere Tage nach TAC,¹⁹⁸ Ischämie-Reperfusion²⁰⁰ und Myokardinfarkt hin,^{81,89} während wenige Stunden nach Beginn einer Ischämie ein Rückgang berichtet wurde.²⁰¹ Die Zunahme von miR-199a-5p und miR-214 sowie ihres Vorläufertranskripts *DNM3OS* soll durch Hypoxie über eine Aktivierung von HIF1 α und Twist1 induzierbar zu sein,^{105,192} wobei es auch einen Bericht über schnellen Abfall der miR-199a-5p-Expression unter Sauerstoffmangel und in kardialer Ischämie gibt.²⁰² Unter den zuvor erwähnten Publikationen zeigten zwei Arbeiten aus dem Labor von De Windt, dass eine Antagomir-basierte Inhibition entweder von miR-199b-5p allein oder von miR-199a-5p und miR-214 in Kombination zu einer Verbesserung der Herzfunktion und verringerten Fibrose in Mäusen nach TAC führt, was einer Blockade des NFAT-Signalweges bzw. einer verstärkten Fettsäurenmetabolismus in Kardiomyozyten zugeschrieben wurde.^{85,105} Umgekehrt führt eine kardiomyozytenspezifische Überexpression von miR-199a-5p gemäß Haghikia *et al.*¹⁹⁹ zu einer gestörten Sarkomerstruktur durch eine Behinderung des Ubiquitin-Proteasom-Systems sowie über parakrine Mechanismen zu einer verschlechterten Endothelfunktion. Dagegen berichteten Aurora *et al.*,⁹² dass die globale genetische Deletion von miR-214 in Mäusen zu einer erhöhten Empfindlichkeit in einem I-R-Modell führt. Vermutet wurde hier eine kardioprotektive Rolle von miR-214 durch Kontrolle der Calcium-Homöostase in Kardiomyozyten.⁹² Eine weitere Studie berichtet, dass Überexpression von miR-199a-5p in isolierten Kardiomyozyten zu einer Elongation führt,¹⁰⁷ während in Analysen unserer Gruppe die Überexpression von MicroRNAs der miR-199/214-Gruppe die Kardiomyozytenzellgröße nicht beeinflusste (Referenz⁸³ und weitere nicht publizierte Daten). Es muss allerdings betont werden, dass die genannten *in vivo*-Experimente die Expression der endogen vorhandenen MicroRNA nicht myozytenspezifisch adressierten. Die Effekte der MicroRNA-Inhibition auf isolierte Kardiomyozyten^{85,92,105,199} sprechen aber für eine tatsächlich bestehende Rolle von MicroRNAs der miR-199-/miR-214-Gruppe in Kardiomyozyten, trotz ihrer höheren Expression in Fibroblasten. Hinzugefügt werden sollte allerdings auch noch, dass der Anstieg der zuvor genannten MicroRNAs unter kardialen Stress prinzipiell ebenso durch eine Zunahme der Fibroblastenzahl im Rahmen der Fibrosierung erklärt werden könnte. Dies erscheint insbesondere plausibel, da der myokardiale Anstieg im Mausherz circa eine bis drei Wochen nach Beginn des kardialen Stress am prominentesten zu sein scheint^{197,198,200} und nach 24 h Ischämie oder TAC noch nicht nachweisbar ist.^{86,198}

5.2.2 Beobachtete funktionelle Effekte von miR-199-3p in kardialen Fibroblasten

Um Rückschlüsse auf die Funktion von miR-199-3p in kardialen Fibroblasten treffen zu können, wurde diese MicroRNA in kultivierten Zellen überexprimiert bzw. inhibiert. Die

Modulation von miR-199-3p in NRCF und NIH 3T3-Fibroblasten mittels MicroRNA-Mimic, Antagomir und Antimir war dabei prinzipiell erfolgreich, wie Versuche mit einem Fluoreszenz-Reporter-Konstrukt zeigen (**Abbildungen 7A-C, 8A, 10A**).

Die Überexpression von miR-199-3p führte in NRCF und ARCF zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Synthese (**Abbildung 7D**), der in der Zellzyklusanalyse mit einer Zunahme von Zellen in der S- oder G₂/M-Phase korreliert (**Abbildung 7E**). MiR-199-3p scheint daher einen unmittelbar pro-proliferativen Einfluss auf kardiale Fibroblasten auszuüben, obwohl ein zusätzlicher inhibitorischer Einfluss auf die Apoptose nicht ausgeschlossen werden kann. Dagegen führte die Inhibition von miR-199-3p durch einen Antagomir oder Antimir unerwarteterweise nicht zu einem Rückgang der Fibroblastenproliferation (**Abbildungen 8B und C**). Die in kultivierten kardialen Fibroblasten vorhandene miR-199-3p-Konzentration ist demnach hoch genug, um den Fluoreszenzreporter zu unterdrücken, jedoch nicht ausreichend, um die Proliferation zu beeinflussen. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise damit erklären, dass die vollständig komplementären miR-199-3p-Bindestellen des Reporters sehr empfindlich schon auf geringe MicroRNA-Konzentrationen reagieren, während natürlicherweise vorkommende MicroRNA-Targets üblicherweise nur teilweise komplementär sind und deshalb erst durch höhere Konzentrationen reprimiert werden. Nichtsdestoweniger wurden zur MicroRNA perfekt komplementäre Luciferasereporter bereits zuvor zum Nachweis einer MicroRNA-Inhibition verwendet.²⁰³

Kann die beobachtete pro-proliferative Wirkung von miR-199-3p trotz des fehlenden *in vitro*-Effekts der Inhibition relevant für die Situation im Herz sein? Diese Frage sollte aus mehreren Gründen mit „ja“ beantwortet werden: Erstens ist nicht auszuschließen, dass kardiale Fibroblasten in Zellkultur miR-199-3p verlieren, denn die Situation isolierter Zellen ähnelt nur wenig der im Myokard, wo Fibroblasten allseitig von Extrazellulärmatrix und benachbarten Zellen umschlossen sind. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Kultivierung von kardialen Fibroblasten auf harten Oberflächen die Umwandlung in Myofibroblasten begünstigt,^{176,177} was die Genexpression sicher wesentlich beeinflusst. Zweitens stammten die verwendeten NRCF und ARCF aus gesunden Herzen, d.h. sie befanden sich in einem weitgehend quieszenten Zustand. Möglicherweise würden aktivierte Fibroblasten aus fibrotischen Herzen hier besser die natürliche Proliferation abbilden. Drittens ist es möglich, dass die Hauptfunktion von miR-199-3p in der Embryonalentwicklung liegt, da ihre Ganzkörper-Expression in dieser Phase wesentlich höher ist als postnatal.¹⁹² In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die genetische Deletion von *Dnm3os* (welches die Loci für miR-199a-2 und miR-214 beherbergt) in Mäusen zu Skelett-Defekten, vermindertem Wachstum und Tod innerhalb eines Monats nach Geburt führt.¹⁹¹ Die beobachteten Defekte in der Entwicklung sind allerdings auch gut kompatibel mit einer Funktion von miR-199-3p

und -5p außer in Fibroblasten in anderen mesenchymalen Zelltypen (z.B. Chondrozyten und osteogenen Zellen).^{204–206}

Einen weiteren Hinweis auf eine pro-proliferative Rolle von miR-199-3p lieferte eine Studie von Eulalio *et al.*²⁰⁷ Hier wurde miR-199-3p bei der Untersuchung einer MicroRNA-Bibliothek als eine der MicroRNAs identifiziert, die am stärksten die Proliferation von neonatalen Kardiomyozyten und sogar den Zellzyklus von quieszenten postnatalen Kardiomyozyten reaktivieren können. Jedoch wurde in dieser Arbeit - allerdings unter Verwendung eines anderen Assays als den in dieser Dissertation gezeigten - kein Einfluss auf die Fibroblastenproliferation festgestellt.²⁰⁷ In Krebszellen scheint miR-199-3p sowohl pro- als auch anti-proliferative Funktionen übernehmen zu können, wahrscheinlich abhängig vom jeweiligen Zelltyp (siehe Übersicht in Referenz²⁰⁸). Eventuell relevant bezüglich einer möglichen Funktion dieser MicroRNA für die Fibroseentwicklung ist auch die Beobachtung, dass miR-199-3p (und auch miR-199a-5p) in einem Mausmodell für Leberfibrose stark hochreguliert ist, was einer Induktion von pro-fibrotischen Genen in Ito-Zellen zugeschrieben wird.²⁰⁹

Außer dem Einfluss auf die Proliferation wurde in dieser Dissertation auch eine mögliche Rolle von miR-199-3p bei der Fibroblasten-zu-Myofibroblasten-Differenzierung und der Ausschüttung pro-hypertropher parakriner Botenstoffe untersucht. Die Ergebnisse zeigten allerdings, dass diese MicroRNA anscheinend bei der Expression des Myofibroblastenmarkers α -SMA sowie der Erzeugung von Myozytenhypertrophie durch fibroblastenkonditioniertes Medium keine besondere Rolle spielt (**Abbildung 9**). Wir konzentrierten uns folglich auf die mechanistische Aufklärung der pro-proliferativen Wirkung von miR-199-3p.

5.2.3 Massenspektrometrische Identifikation von miR-199-3p-Targets

MiR-199-3p erzeugt seine positive Wirkung auf die Fibroblastenproliferation sehr wahrscheinlich durch Repression anti-proliferativer Proteine. Um solche Targets zu finden, entschieden wir uns für eine Proteom-Analyse mit der SILAC-Methode. Dieser massenspektrometrische Ansatz bietet mehrere Vorteile: Erstens ist eine Analyse auf Proteinebene einer mRNA-Studie überlegen, da die Regulation von Proteinen der letztlich für die MicroRNA-Funktion entscheidende Faktor ist und manche MicroRNA-Targets überwiegend auf Proteinebene, d.h. durch translationale Inhibition reguliert werden. Zweitens erlaubt eine Proteomanalyse eine Untersuchung von sehr vielen Proteinen ohne Vorauswahl. (Ein Microarray- oder RNA-Sequencing-Ansatz würde allerdings in dieser Hinsicht eine noch höhere Abdeckung erreichen.) Mehrere Gruppen haben in der Vergangenheit Proteomanalysen nach MicroRNA-Modulation durchgeführt, um entweder

Aussagen über die globale Regulation von Proteinen durch MicroRNAs zu treffen^{13,14} oder spezifisch unbekannte Targets für ausgewählte MicroRNAs zu finden^{105,109,133,141,210–214}. Die Quantifizierung mit dem SILAC-Verfahren erlaubt zusätzlich eine sehr zuverlässige Quantifizierung selbst von relativ kleinen Änderungen der Konzentration von Proteinen, wie sie bei der Regulation durch MicroRNAs zu erwarten ist. Der für die Durchführung des SILAC-Verfahrens nötige Wechsel auf eine Fibroblasten-Zelllinie (NIH 3T3) erscheint akzeptabel, da die Modulation der MicroRNA-Aktivität auch hier funktionierte und die Überexpression von miR-199-3p ebenso wie in kardialen Fibroblasten die DNA-Synthese erhöhte (**Abbildung 10**). Die Auswertung der in je zwei Replikaten durchgeführten Massenspektrometrie zeigte für die miR-199-3p-Überexpression eine klare Repression von Proteinen, deren mRNAs konservierte, vorhergesagte Bindestellen für diese MicroRNA aufwiesen (**Abbildung 11B und D**), obwohl die relative Änderung der Proteinkonzentration in den meisten Fällen im Vergleich zu anderen Publikationen relativ gering ausfiel. Nicht-konservierte Bindestellen führten dagegen zu einem kaum nachweisbaren Rückgang der zugehörigen Proteine (**Abbildung 11B**), was den Befund einer anderen Proteomstudie bestätigt, dass die Berücksichtigung evolutionärer Konservierung die Zuverlässigkeit von Algorithmen zur Targetvorhersage deutlich verbessert.¹³ Dagegen hatte die Inhibition von miR-199-3p nur eine minimale Derepression von vorhergesagten Targets zur Folge (**Abbildung 11C**). Auch dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da in anderen MicroRNA-Proteomstudien schwächere¹³ oder fast keine¹⁰⁹ globalen Effekte der MicroRNA-Inhibition im Vergleich zur Überexpression beobachtet wurden und in den mir bekannten weiteren Analysen in Zellkultur ausschließlich MicroRNA-Überexpression zum Einsatz kam^{14,133,210,212–215} (soweit nicht mit genetischer Deletion gearbeitet wurde¹⁴). Andererseits könnte die ausbleibende Derepression von vorhergesagten Targets bei Inhibition von miR-199-3p (**Abbildung 11C**) auch auf eine niedrige Aktivität dieser MicroRNA in kultivierten Fibroblasten hinweisen und somit den fehlenden Rückgang der Proliferation bestätigen (**Abbildungen 8B und C**). Die Derepression des Fluoreszenzreporters ist hier kein Maßstab, da dieser wegen seiner perfekt zur MicroRNA komplementären Bindestellen vermutlich sehr sensitiv auf kleine MicroRNA-Konzentrationen reagiert (siehe **Abschnitt 5.2.1**).

5.2.4 YWHAE (14-3-3ε) – ein multifunktionelles Adapterprotein und sein Einfluss auf den Zellzyklus

Ein Protein, das basierend auf den Massenspektrometriedaten für Folgeversuche ausgewählt wurde, ist YWHAE (14-3-3ε). Die in der Proteomstudie beobachtete Reduktion seiner Proteinexpression in NIH 3T3-Fibroblasten bei Überexpression von miR-199-3p (**Abbildung 12B**) ist hierbei als sehr zuverlässig zu betrachten, da in jedem Replikat eine

sehr hohe Anzahl (zwischen 116 und 134) an tryptischen Peptiden quantifiziert wurde. Darüber hinaus wurde der Rückgang von YWHAE mittels *Western Blots* in neonatalen kardialen Rattenfibroblasten bestätigt (**Abbildung 12D**). Auf mRNA-Ebene wurde eine ebenfalls signifikante, jedoch wesentlich schwächere Repression beobachtet (**Abbildung 12C**), was für einen kombinierten Effekt der MicroRNA auf mRNA-Stabilität und Translationseffizienz spricht. Eine siRNA-vermittelte Inhibition von *Ywhae* (**Abbildungen 12E-G**) führte schließlich zu einem Anstieg der Proliferation von kardialen Fibroblasten, der allerdings nicht so stark ausfiel wie bei der Überexpression von miR-199-3p (**Abbildung 7D**). Dies spricht dafür, dass *Ywhae* eines, wenn auch wahrscheinlich nicht das einzige der Targets ist, die den pro-proliferativen Effekt von miR-199-3p vermitteln. Für den Nachweis einer direkten Interaktion von *Ywhae* mit miR-199-3p wäre ein Reportersystem notwendig, bei dem die vermutete Bindestelle in der 3' UTR von *Ywhae* hinter die kodierende Sequenz des Reporter-Gens kloniert ist. Vorläufige Studien mit einem Luciferase-Konstrukt (nicht gezeigt) ergaben die für eine direkte Interaktion erwartete Repression der Lumineszenz bei Überexpression von miR-199-3p. Da aber die endogene Kontrolle (Renilla-Luciferase) hierbei nicht stabil war, würde sich eine Wiederholung des Experiments in einem Fluoreszenzreporter-System empfehlen.

YWHAE/14-3-3 ϵ ist ein Mitglied der 14-3-3-Proteinfamilie, die noch aus sechs weiteren Mitgliedern, nämlich 14-3-3 β (YWHAB), γ (YWHAG), ζ (YWHAZ), τ (YWHAQ), η (YWHAH) und σ (SFN) besteht, die alle bis auf letzteres in unseren Proteomstudien detektiert wurden. Interessanterweise, besitzt neben *Ywhae* noch ein weiteres der zugehörigen Transkripte, nämlich *Ywhag*, eine vorhergesagte konservierte miR-199-3p-Bindestelle und ist auch als einziges aus dieser Gruppe bei Überexpression von miR-199-3p nennenswert herunterreguliert, allerdings mit einer Repression von im Mittel 16,3% schwächer als *Ywhae* (23,4%). Bei miR-199-3p-Inhibition hingegen war keines der 14-3-3-Proteine um mehr als 10% hochreguliert. 14-3-3-Proteine binden spezifisch an Phosphothreonin- und Phosphoserinmotive sowie bestimmte unphosphorylierte Motive und bilden (mit der Ausnahme von 14-3-3 σ) Homo- bzw. Heterodimere, wobei jede Untereinheit eine eigene Bindestelle besitzt.²¹⁶ Dadurch kann die Bindung eines 14-3-3-Dimers auf vielfältige Weise Proteinfunktionen regulieren, z.B. durch Induktion einer Konformationsänderung im Zielprotein, die Vermittlung oder Blockade von Proteininteraktionen, das Maskieren von Lokisationsmotiven oder durch die Inhibition der Zugänglichkeit für Kinasen, Phosphatasen oder Proteasen.²¹⁷ Ähnlich breit sind daher auch die biologischen Funktionen, mit denen 14-3-3-Proteine in Zusammenhang gebracht werden, unter anderem die Regulation von Zellzyklus, Proliferation, Metabolismus und Apoptose.²¹⁷

Besonders zwei beschriebene Funktionen von 14-3-3-Proteinen kommen in Frage, um die beobachteten Effekte von miR-199-3p in kardialen Fibroblasten (Zunahme der DNA-Synthese und des relativen Anteils an Zellen in S/G₂/M-Phase, **Abbildungen 7D und E**) zu erklären, die negative Regulation der Zyklinaktivität sowie die Vermittlung der anti-proliferativen Wirkung des Hippo-Signalweges (siehe dazu auch **Abbildung 22**):

Die Aktivität der Zykline A, B, D und E bestimmt wesentlich den Ablauf des Zellzyklus.²¹⁸ 14-3-3-Proteine greifen hier an mehreren Stellen ins Geschehen ein. Zum einen inhibieren sie die Funktion von cdc25-Phosphatasen, die durch Aktivierung von zyklinabhängigen Kinasen den Eintritt in den Zellzyklus und das Durchlaufen verschiedener Zellzyklusphasen steuern. Sehr gut beschrieben ist hierbei die phosphorylierungsabhängige Translokation von cdc25-Phosphatasen durch 14-3-3-Proteine ins Zytoplasma am G₂/M-Checkpoint. 14-3-3ε ist hierbei der vorwiegende Bindungspartner von cdc25C im Krallenfrosch²¹⁹ und ist auch in Zellen von Säugetieren essentiell für Interaktion mit cdc25C und die Inhibition des Zellzyklus vor dem Übergang von der G₂- zur S-Phase.²²⁰ Zum anderen inhibieren 14-3-3-Proteine im Krallenfrosch und in humanen Zellen den Übergang in die Mitose durch Aktivierung der Wee1-Kinase, eines Inhibitors des G₂/M-Übergangs und direkten Gegenspielers von cdc25 bei der Aktivierung von Cdk1 (cdc2).^{221,222} Da bei Überexpression von miR-199-3p in kardialen Fibroblasten aber eine relative Zunahme von Zellen in S- bzw. G₂/M-Phase gemessen wurde, ist hier möglicherweise die Interaktion von 14-3-3-Proteinen mit cdc25A wichtiger, da diese Phosphatase vor allem für ihre essentielle Funktion beim Eintritt in die S-Phase bekannt ist.^{223–227} Bisher gezeigt ist allerdings nur, dass 14-3-3ε ein direkter Bindungspartner von cdc25A ist und dass eine Mutation der Bindestelle zum vorzeitigen Eintritt in die Mitose führt.²²⁸

Der zweite Signalweg, über den 14-3-3-Proteine die Proliferation von kardialen Fibroblasten unterdrücken könnten, ist der Hippo-Signalweg, der in Drosophila und in Wirbeltieren das Wachstum von Organen reguliert.²²⁹ In Reaktion auf mechanische Signale und die Anwesenheit benachbarter Zellen werden in Vertebraten die Kinasen MST1/2 (Drosophila-Homolog: Hippo-Kinase) aktiviert, die ihrerseits über die Aktivierung der Kinasen LATS1/2 zur Phosphorylierung von YAP und TAZ führen.²³⁰ Nicht-phosphoryliertes YAP bzw. TAZ beschleunigen die Zellproliferation und unterdrücken Apoptose durch Assoziation mit Transkriptionsfaktoren im Kern.^{230,231} Dagegen binden 14-3-3-Proteine spezifisch an phosphoryliertes YAP und führen zu seiner Inhibition durch Translokation ins Zytoplasma.^{232,233} In Keratinozyten wurde überdies eine 14-3-3-abhängige Kontrolle von YAP durch *α-catenin* entdeckt, die anscheinend nicht die kanonischen Kinasekomponenten des Hippo-Signalweges erfordert.²³⁴

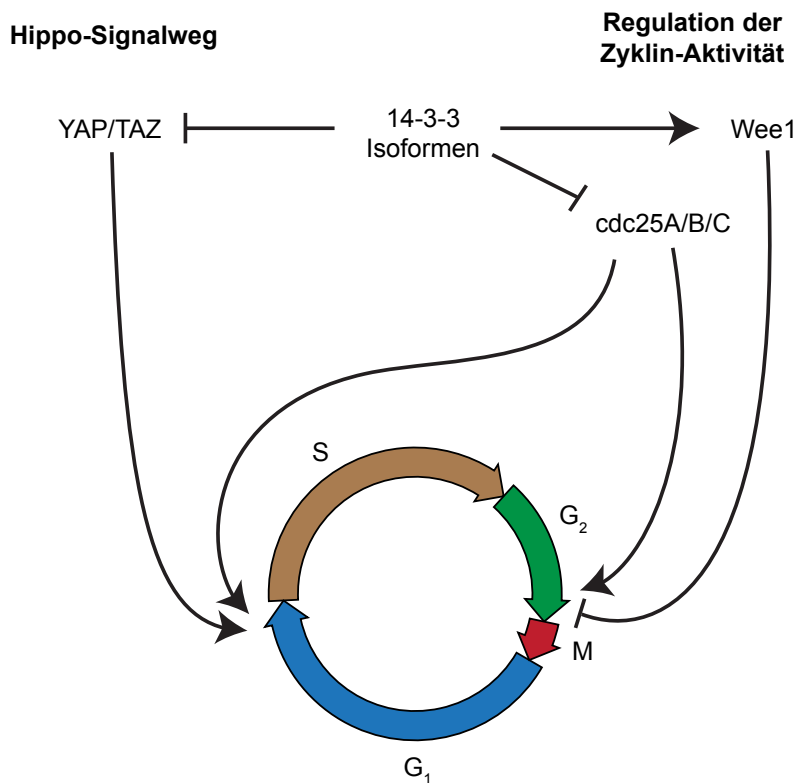


Abbildung 22. Anti-proliferative Funktionen von 14-3-3 Proteinen. Zu Details siehe Text.

Es soll allerdings nicht übergangen werden, dass 14-3-3-Proteinen auch pro-proliferative und anti-apoptotische Funktionen zugeschrieben werden, beispielsweise in Rezeptor-Tyrosin-Kinasen-Signalwegen²¹⁷ oder bei der Inhibition von anti-apoptotischen Proteinen.²³⁵ Es ist anzunehmen, dass die Wirkung von 14-3-3-Proteinen vom zelltypspezifischen Vorhandensein von 14-3-3-Isoformen und -Bindungspartnern sowie der Voraktivierung von Signalwegen abhängt. Während 14-3-3ε wichtig für das Fortschreiten des Zellzyklus in Kardiomyozyten und manchen Zelllinien zu sein scheint,^{236,237} deuten die hier gezeigten Ergebnisse auf eine anti-proliferative Funktion in kardialen Fibroblasten hin (**Abbildung 12G**). In Übereinstimmung damit wurde in zwei Publikationen berichtet, dass isoform-unabhängige 14-3-3-Inhibition die durch Serum bzw. IGF1 induzierte Proliferation von kardialen Fibroblasten erhöht.^{238,239}

5.2.5 Ausblick auf eine mögliche Fortführung des miR-199-3p-Projekts

Der Rolle von miR-199-3p im Herz sollte möglichst im nächsten Schritt in einem Tiermodell überprüft werden, insbesondere, da in Zellkultur die Blockade von miR-199-3p im Gegensatz zur Überexpression die Proliferation von kardialen Fibroblasten nicht beeinflusste. Hier

bieten sich vor allem Mausmodelle für kardialen Stress an, die eine starke Fibroseentwicklung hervorrufen, z.B. TAC. Die ebenfalls in Frage kommenden Myokardinfarkt- und I-R-Modelle hätten dagegen den Nachteil, das sich hier gegensätzliche Wirkungen der Fibroblastenaktivierung überlappen (positiv: Stabilisierung der Infarktzone; negativ: Fibrotisches Remodelling nicht-infarzierter Bereiche), was Schlussfolgerungen erschweren könnte. Da die genetische Deletion aller drei miR-199-3p-Loci sehr aufwändig erscheint und überdies die Expression benachbarter MicroRNAs beeinflusst werden könnte, wäre vermutlich eine virale oder pharmakologische Inhibition von miR-199-3p angezeigt. Die virale oder genetische Überexpression von miR-199-3p könnte dagegen auf Grund des gemeinsamen *Stem Loops* nur in Kombination mit miR-199a-5p bzw. miR-199b-5p erfolgen, denen aber auch Rollen in Kardiomyozyten zugeschrieben werden.^{85,105,199} Angesichts der beschriebenen Funktionen der 5p-Isoformen in Kardiomyozyten wäre zusätzlich eine spezifische *in vivo*-Modulation von miR-199-3p in kardialen Fibroblasten wünschenswert, z.B. mittels viraler Vektoren. Allerdings sind bisher für die Maus nur Viren mit einem kardiomyozytenspezifischen Tropismus (Adeno-assoziiertes Virus (AAV) 9) etabliert. Wenn die beschriebenen Experimente zeigen, dass die Inhibition von miR-199-3p wie erwartet die kardiale Fibroblastenproliferation und Fibrosierung vermindert, sollte die Regulation von *Ywhae* und anderer möglicher Targets untersucht und ihre Rolle in Folgeexperimenten weiter definiert werden.

Interessant wäre außerdem die Untersuchung eines möglichen Einflusses von miR-199-3p auf die Fibroblastenmigration, da 14-3-3-Proteine, zu denen *Ywhae* gehört, neben der Proliferation auch diese Zellfunktion regulieren.²¹⁷ Weitere Studien erfordert zudem die Frage, ob die Expression von miR-199-3p in kardialen Fibroblasten durch Hypoxie induziert werden kann, wie es für miR-199a-5p in Kardiomyozyten gezeigt wurde.¹⁰⁵

5.3 MiR-223 und seine Funktion im kardiovaskulären System

5.3.1 Allgemeine Charakterisierung von miR-223

Ebenso wie miR-199-3p ist miR-223(-3p) in kardialen Fibroblasten wesentlich stärker als in Kardiomyozyten exprimiert (**Abbildungen 3A und 5A**). Da im Gegensatz zur ersteren aber kein eindeutiger Effekt der Überexpression auf die Proliferation von kultivierten kardialen Fibroblasten festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), konzentrierten sich die weiteren Experimente auf den kardiovaskulären Phänotyp von miR-223-defizienten Mäusen.

Das miR-223-Gen ist intergenisch auf dem X-Chromosom von Mensch, Maus und Ratte lokalisiert und evolutionär hochkonserviert, wobei am 3'-terminalen Ende in manchen Spezies eine zusätzliche Base annotiert ist (www.mirbase.org sowie Referenz²⁴⁰). Nicht

abschließend geklärt ist, ob miR-223 aus einem oder mehreren Transkripten entsteht, ob diese durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren reguliert werden können und ob möglicherweise Maus und Mensch sich in dieser Hinsicht unterscheiden.^{17,241-244} Die aus demselben *Stem Loop* generierte MicroRNA miR-223-5p (ehemals als miR-223* bezeichnet) ist gemäß unserer Microarray-Studie (nicht gezeigte Daten) nicht detektierbar und erscheint auch in vielen anderen Studien viel schwächer exprimiert als miR-223,^{159,180,185} könnte aber in manchen Zelltypen trotzdem eine Rolle spielen.²⁴⁵

Die Expression von miR-223 ist im Körper im Knochenmark am höchsten^{147,246} und dort weitgehend auf die myeloische Zellreihe beschränkt.^{147,171,246} Daher überrascht es nicht, dass es eine Fülle von Publikationen zur Rolle dieser MicroRNA in der myeloischen Differenzierung gibt. Hierbei steigt die miR-223-Konzentration während der Differenzierung in Granulozyten sehr stark an,^{171,242,244,247} weniger stark bei der Differenzierung in Monozyten²⁴⁴ und bleibt bei der Differenzierung in erythroide Zellen niedrig²⁴⁴ oder fällt sogar ab.²⁴⁷⁻²⁴⁹ Uneinigkeit besteht allerdings hinsichtlich der Rolle von miR-223 in der Granulopoese: Die Deletion von miR-223 bzw. die Transplantation von miR-223-supprimiertem Knochenmark in Mäusen führen zu einer Zunahme von heranwachsenden und reifen Granulozyten sowie zu einer übersteigerten Granulozyten-Differenzierung.^{171,250} Darüber hinaus sind miR-223-defiziente Granulozyten und auch Makrophagen überaktiv, was zu verstärkten Entzündungen z.B. in der Lunge^{171,250,251} und bei fettreicher Ernährung auch im Fettgewebe führt.²⁴⁶ Während die zuvor genannten Befunde für eine inhibitorische Rolle von miR-223 in der Granulozyten-Differenzierung sprechen, beschreiben diverse *in vitro*-Studien miR-223 als positiven Regulator dieses Prozesses.^{17,242,244,252} Ebenfalls nur in Zellkultur durchgeführte Experimente sprechen dafür, dass der Rückgang von miR-223 während der erythroiden Differenzierung Voraussetzung für die Expression erythroider Transkriptionsfaktoren ist.²⁴⁷ Bei der Differenzierung in Megakaryozyten (die ebenfalls zur myeloischen Linie gehören) steigt die Expression von miR-223 ebenfalls deutlich an.^{247,249} Die mögliche Rolle in diesem Zelltyp wird in **Abschnitt 5.3.3** besprochen.

5.3.2 Erhöhte Schädigung von miR-223-defizienten Mäusen im kardialen Ischämie-Reperusionsmodell

Obwohl miR-223, wie im **vorhergehenden Kapitel** beschrieben, am höchsten im Knochenmark exprimiert ist, gibt es doch auch eine nennenswerte Konzentration im Myokard.^{246,253} Wir untersuchten daher die Herzfunktion von miR-223-defizienten Mäusen unter Basalbedingungen und in zwei kardialen Stressmodellen, TAC und I-R. MiR-223-defiziente Mäuse fortgeschrittenen Alters unter Basalbedingungen und jüngere nach TAC unterschieden sich nicht von ihren jeweiligen Wildtypgeschwistern hinsichtlich ihres

Herzgewichts und der Expression von Fibrose- und Hypertrophiemarkern (**Abbildungen 13A und B**) bzw. hinsichtlich der Entwicklung von Herzversagen, Hypertrophie und Fibrose (**Abbildungen 13C-E**). Im I-R-Modell dagegen zeigten miR-223-defiziente Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren einen deutlich erhöhten Infarktschaden, sowohl hinsichtlich der Plasmakonzentration von kardialem Troponin T als auch hinsichtlich der Größe des (von Leukozyten infiltrierten) Infarktareals (**Abbildungen 14B-D**). Ebenso wurde eine tendenzielle Erhöhung der Narbengröße beobachtet (**Abbildung 14E**).

Mehr als bei TAC spielen im I-R-Modell Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle. Die miR-223-Konzentration im Myokard steigt in den ischämischen Mausmodellen von I-R²⁰⁰ und Myokardinfarkt^{81,201} nach kurzer Zeit stark an und ist auch im humanen Myokardinfarkt erhöht⁸¹ (möglicherweise durch einwandernde Immunzellen), während bei TAC nur in wenigen Fällen ein vorübergehende Erhöhung beobachtet wurde.^{198,254} Das Regulationsmuster von miR-223 unterscheidet sich damit sehr von der miR-199/214-Gruppe, deren Expression zeitlich verzögert nach kardialem Stress ansteigt (siehe **Abschnitt 5.2.1**). Da außerdem Granulozyten und Makrophagen aus miR-223-defizienten Mäusen hyperaktiv sind (siehe **Abschnitt 5.3.1**), schien uns der Einfluss dieser Zelltypen die wahrscheinlichste Erklärung für die erhöhte Infarktschädigung von miR-223-defizienten Mäusen zu liefern. Überraschenderweise zeigte im I-R-Modell jedoch kein erhöhter Infarktschaden in Mäusen, in die miR-223-defizientes Knochenmark transplantiert wurde im Vergleich zu solchen, die Wildtypknochenmark erhalten hatten (**Abbildung 14F**). Dies spricht gegen eine ursächliche Rolle von miR-223 in Leukozyten und anderen hämatopoetischen Zellen bei der erhöhten Anfälligkeit von miR-223-defizienten Mäusen im I-R-Modell.

In welchen anderen Zelltypen könnte das Fehlen von miR-223 einen erhöhten I-R-Schaden verursachen? In Frage kommen hauptsächlich strahlenresistente, ortsständige Zellen des Herzens, also Kardiomyozyten, kardiale Fibroblasten, Endothelzellen und glattmuskuläre Zellen. In Kardiomyozyten soll miR-223 über eine positive Regulation des Glucose-Transporters 4 (GLUT4) die Glucoseaufnahme fördern,¹⁸⁹ obwohl miR-223 in diesen Zellen gemäß unseren Daten in vernachlässigbarer Konzentration vorhanden ist (Rang 329 bzw. Rang 187 in Kardiomyozyten aus adulter Maus und Ratte laut unserer Microarray- bzw. qPCR-Ergebnisse). Allerdings belegen die gezeigten Experimente nicht zweifelsfrei eine Funktion von miR-223 Kardiomyozyten und der dort berichtete Anstieg von miR-223 im Herz von Patienten mit Typ II-Diabetes mellitus¹⁸⁹ wurde anderorts, zumindest bei zusätzlichem Vorliegen von Herzversagen, nicht beobachtet.²⁵⁵ Ebenfalls beim Infarktschaden eine Rolle spielen könnten kardiale Fibroblasten, die offenbar eine viel höhere miR-223-Konzentration enthalten als Kardiomyozyten (**Abbildungen 3A und 5A**) und vielfältige Signale mit letzteren austauschen.³⁴ Insbesondere könnte die Inflammation in miR-223-defizienten

kardialen Fibroblasten verändert sein und so die Immunzelleinwanderung und –aktivierung beeinflussen. In einer kürzlich erschienene Studie wurde berichtet, dass miR-223 überdies auch in Endothelzellen eine Rolle spielt, indem es die Angiogenese inhibiert.¹³³ MiR-223-defiziente Mäuse zeigen demnach im Vergleich zu Wildtypen eine deutlich erhöhte Neuvaskularisierung,¹³³ die allerdings nicht den von uns beobachteten Phänotyp im I-R-Modell erklären kann, da eine relative Erhöhung von kardialem Troponin T im Blut schon nach 3 h Reperfusion auftrat (**Abbildung 14B**). Möglicherweise hat miR-223 aber zusätzliche Funktionen in Endothelzellen, z.B. in der Anlockung und Diapedese von Leukozyten, die sich unmittelbar auf den Infarktschaden auswirken könnten. Auch mit dem letzten erwähnten Zelltyp, glattmuskulären Zellen, wurde miR-223 in Zusammenhang gebracht. So soll es dort die Migration und Proliferation beeinflussen.²⁵⁶ Inwieweit sich diese Zellkulturstudien auf die Situation *in vivo* übertragen lassen, ist allerdings nicht bekannt. Eine interessante weitere Möglichkeit zur Erklärung des I-R-Phänotyps von miR-223-defizienten Mäusen bieten Gewebemakrophagen. Diese Zellen wandern schon im Embryonalstadium aus dem Dottersack in die Organe ein, benötigen für ihre Existenz keine hämatopoetischen Stammzellen und werden dadurch im Gegensatz zu anderen Leukozyten durch Knochenmarkstransplantation kaum ausgetauscht.²⁵⁷ Es ist gut vorstellbar, dass die Deletion von miR-223 in Gewebemakrophagen, ebenso wie bei klassischen Makrophagen,²⁴⁶ die Aktivierbarkeit beeinflusst. Über eine spezifische Rolle dieses Zelltyps bei der Entstehung des I-R-Schadens scheint zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nichts bekannt zu sein.

Angesichts unserer Ergebnisse ist es sehr interessant, dass in einer großen, prospektiven Patientenstudie von Zampetaki *et al.*¹⁸⁶ eine inverse Korrelation zwischen der miR-223-Konzentration im Blutplasma und dem Risiko eines Myokardinfarkts gefunden wurde. Die Autoren schlugen daher vor, dass miR-223 in Kombination mit anderen zirkulierenden MicroRNAs als Biomarker für die Einschätzung des Infarkttrisikos dienen könnte. Hingegen wurden in einer Studie an chinesischen Patienten mit koronarer Herzkrankheit, nach PTCA und unter Anti-Plättchen-Therapie, miR-223 nicht als unabhängiger Risikofaktor für den Zeitraum bis zum Eintreten von kardiovaskulären Zwischenfällen gefunden.²⁵⁸ Bemerkenswerterweise zeigte eine weitere Studie eine ca. 50%ige Reduktion der Plasma-miR-223-Konzentration bei Patienten während eines akuten Herzinfarkts im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei allerdings keine Korrelation mit der Troponin T-Konzentration gefunden wurde.²⁵⁹

5.3.3 Mögliche Folgestudien zur Rolle von miR-223 bei Herzinfarkten

Der relative Anstieg der Troponin T-Konzentration und der Infarktgröße in miR-223-defizienten Mäusen (**Abbildungen 14B-D**) gibt einen deutlichen Hinweis, dass diese Tiere

empfindlicher als Wildtypen auf kardiale Ischämie-Reperfusion reagieren. Trotzdem steht ein definitiver Beweis aus, dass dies auch zu einer verschlechterten Herzfunktion gegenüber der Kontrollgruppe führt. Es wurde versucht, diesen Nachweis mit Ultraschallmessungen zu erbringen, die aber wegen der großen Hautnarbe nicht erfolgreich durchgeführt werden konnten. Zusätzlich sollten die Einwanderung von Immunzellen und die Expression von inflammatorischen Zytokinen in RNA aus Herzbiopsien und an histologischen Schnitten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Leider erlaubte die hohe Varianz der qPCR-Ergebnisse jedoch keine zuverlässigen Schlussfolgerungen, während die Immunfluoreszenzfärbungen nicht im Zusammenspiel mit der gewählten Einbettung in Paraffin funktionierten. Es wäre daher sinnvoll, miR-223-defiziente Mäuse erneut in einem Ischämie-Modell zu untersuchen, und dabei im Interesse der Ultraschallmessungen einen kleineren Hautschnitt durchzuführen sowie Kryo- statt Paraffinschnitten herzustellen. Möglich wäre das voraussichtlich mit dem mittlerweile in unserem eigenen Labor etablierten permanenten LAD-Verschluss (Myokardinfarkt). Zusätzlich könnte in diesem Modell die Mortalität von miR-223-defizienten Mäusen, z.B. bei Ruptur der Ventrikelwand, untersucht werden. Im Folgenden würde es sich anbieten, erneut Knochenmarkschimären zu generieren, wobei diesmal Knochenmark auch in miR-223-defiziente Mäuse transplantiert werden sollte, um die Ursache des erhöhten Infarktschadens eindeutig dem Knochenmark oder anderen Zellen zuordnen zu können. Bei einer Bestätigung der bisherigen Befunde, die auf extra-hämatopoetische Zellen hinweisen, sollten Folgeuntersuchungen sich gezielt den in **Abschnitt 5.3.2** besprochenen, verschiedenen ortsständigen Zelltypen des Herzens widmen.

Zusätzlich wäre bei der Aufstellung mechanistischer Hypothesen zu bedenken, ob möglicherweise nicht miR-223, sondern eine gestörte Funktion der nicht-kodierenden RNA (siehe **Abschnitt 5.3.1**), die den miR-223-Locus überspannt, für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein könnte. Da bei miR-223-defizienten Mäusen aber nur ein extrem kleiner Teil dieser MicroRNA gelöscht ist,¹⁷¹ erscheint dies eher unwahrscheinlich.

5.3.4 Intakte Blutplättchenfunktion und -produktion in miR-223-defizienten Mäusen

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass miR-223 eine der höchstabundanten MicroRNAs in MKs^{178,179} und Blutplättchen^{156,159,160,180–186} ist und damit wahrscheinlich auch wesentlich höher exprimiert ist als in adulten kardialen Fibroblasten (Rang 58 bzw. Rang 25 laut unseren Microarray- bzw. qPCR-Ergebnissen). Es gibt allerdings auch abweichende Berichte, die miR-223 in Kardiomyozyten nur unter den 40 stärksten MicroRNAs¹⁴⁸ bzw. in Blutplättchen nur auf Rang 10²⁶⁰ oder sogar nahe der Nachweisgrenze in Blutplättchen²⁵

sehen. Wir vermuten, dass diese Unterschiede durch die verwendeten Detektionssysteme bedingt sind. So wurde in der anderslautenden Veröffentlichung über MKs¹⁴⁸ eine ziemlich ungewöhnliche und seitdem kaum benutzte durchflusszytometrische Methode eingesetzt, während sich die beiden erwähnten Plättchenstudien^{25,260} auf die Sequenzier-Plattform eines einzigen Herstellers (Illumina) stützen. Demgegenüber kamen die zuvor zitierten Studien^{156,159,160,178–186} mit vielen verschiedenen Nachweismethoden (verschiedene Microarray- und qPCR-Plattformen, Microfluidics, SOLiD-Sequenzierung) alle zu sehr ähnlichen Ergebnissen (Rang 1 bis 4 unter allen untersuchten MicroRNAs), was diese Daten zuverlässiger erscheinen lässt. Dies passt auch zu der hohen Expression von miR-223 in Granulozyten und Monozyten^{160,179}, die ebenso wie MKs und Blutplättchen zur myeloischen Zellreihe gehören (siehe **Abschnitt 1.2.3.2**).

Mehrere zusätzliche Befunde ließen eine Rolle von miR-223 in Megakaryozyten oder Blutplättchen wahrscheinlich erscheinen: MiR-223 steigt bei der Differenzierung in Megakaryozyten an, während es bei der erythroiden Differenzierung abfällt (siehe **Abschnitt 5.3.1**). Zusätzlich unterdrückt seine Überexpression die erythroide Differenzierung von isolierten hämatopoetischen Vorläuferzellen und in der myeloischen Leukämie-Zelllinie K562^{247,249} und fördert im Gegenzug, zumindest bei K562-Zellen, die MK-Differenzierung.²⁴⁹ Allerdings basierten letztere Experimente hauptsächlich auf MicroRNA-Überexpression ohne die endogene miR-223 zu manipulieren. Trotzdem sprachen diese Daten sehr für eine Funktion von miR-223 in der Megakaryopoese, z.B. bei der Entscheidung von MEPs für die erythroide oder megakaryozytäre Linie (siehe **Abschnitt 1.2.3.2, Abbildung 2**). Bemerkenswerterweise wurde auch eine inverse Korrelation der Plättchenreaktivität mit der miR-223-Konzentration in Blutplättchen an Patienten unter Clopidogrel-Behandlung berichtet.^{261,262} Im Gegensatz dazu wurde in einer weiteren Publikation allerdings keine signifikante Assoziation mit der Plättchenaktivierbarkeit bei gesunden Probanden gefunden.¹⁵⁹ Die Analyse von Plasma-MicroRNA-Profilen (die denen von Blutplättchen stark ähneln sollen¹⁸⁴) zeigte außerdem eine inverse Assoziation von miR-223 mit dem Risiko für Typ II Diabetes mellitus²⁶³ und Myokardinfarkt^{186,264} sowie einen Rückgang von Plasma-miR-223 durch pharmakologische Plättcheninhibition.¹⁸⁴ Allerdings wurde in Blutplättchen selbst in einer jüngeren Studie keine wesentliche Änderung des MicroRNA-Profiles bei Typ II Diabetes mellitus im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet.²⁶⁵

Dass miR-223 in Blutplättchen und/oder ihren Vorläufern, MKs, prinzipiell aktiv ist, wurde in unseren eigenen Studien anhand der Disinhibition von mit besonders hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagten miR-223-Targets (*Fbxw7* und *Sp3*) in miR-223-defizienten Blutplättchen gezeigt (**Abbildung 17A**). Während für *Fbxw7* keine Funktion in der Hämatopoese beschrieben ist, behindert die Deletion des Transkriptionsfaktors *Sp3* die

Erythropoese,^{266,267} möglicherweise durch mangelnde Aktivierung des *Gata1*-Promoters.²⁶⁸ Da unsere weiter unten diskutierten Ergebnisse aber eine unveränderte Funktion von Megakaryozyten und Blutplättchen aus miR-223-defizienten Mäusen zeigen, beeinträchtigt eine 1,5- bis 2-fache Konzentrationsänderung von *Sp3* (wie auch von *Fbxw7*) offenbar nicht die Megakaryopoese oder Thrombopoese. *Fbxw7*²⁶⁹⁻²⁷¹ und auch das hier auf mRNA-Ebene nicht regulierte *Rhob* wurden bereits als miR-223-Targets in anderen Zelltypen beschrieben.^{133,272,273} Zusätzlich untersuchte ich die Expression eines weiteren potentiellen Targets, des ADP-Rezeptors P2Y₁₂, dessen 3' UTR in einer humanen Megakaryozytenzelllinie mit miR-223 interagieren kann.¹⁵⁶ Dabei wurde allerdings keine Disinhibition in miR-223-defizienten Blutplättchen beobachtet (**Abbildung 17B**). Dies bestätigte die bioinformatische Analyse, die ergab, dass die *P2ry12* 3' UTR der Maus, im Gegensatz zur Situation im Menschen, keine vorhergesagte Bindestelle für miR-223 enthält.

Trotz der hohen Expression von miR-223 und seiner prinzipiellen Funktionalität in Blutplättchen und MKs ergaben die hier gezeigten Experimente an miR-223-defizienten Mäusen überraschenderweise keinerlei Hinweise auf eine gestörte Plättchenfunktion (**Abbildungen 15 und 16**). So waren die Plättchenzahl, ihre Lebensdauer und die Expression von wichtigen Oberflächenrezeptoren (**Abbildung 15**) ebenso unverändert wie ihre Aktivierbarkeit, Aggregation, Adhäsion und Fähigkeit zur Thrombusretraktion (**Abbildung 16A-E**). Darüber hinaus war die Blutungszeit von miR-223-defizienten Mäusen vergleichbar mit der von Wildtyp-Geschwistern (**Abbildung 16F**).

Die in miR-223-defizienten Mäusen beobachtete leicht verzögerte Plättchenneubildung nach antikörperinduzierter Thrombozytopenie (**Abbildung 18A**) wurde nicht in Wildtyp-Mäusen beobachtet, in die miR-223-defizientes Knochenmark transplantiert wurde (**Abbildung 18B**), was gegen eine zellautonome Rolle von miR-223 in der Thrombopoese spricht. Vielmehr ist der beobachtete Phänotyp bei globaler miR-223-Deletion vermutlich auf einen Defekt im Zusammenspiel zwischen MKs und strahlenresistenten, nicht-hämatopoetischen Zellen zurückzuführen, die die Thrombopoese im Knochenmark kontrollieren (siehe **Abschnitt 1.2.3.2** und Referenz⁶³). Man kann in diesem Zusammenhang ausschließen, dass miR-223-defiziente Blutplättchen oder Vorläuferzellen miR-223 durch Transfer aus nicht-hämatopoetischen Zellen aufgenommen haben (**Abbildung 19B**). Die folgenden Versuche an Megakaryozyten orientierten sich an den wesentlichen Schritten der Megakaryopoese und Thrombopoese (siehe **Abschnitt 1.2.3.2, Abbildung 2**). Da hier ebenfalls kein Unterschied zwischen miR-223-defizienten und Wildtyp-Zellen festgestellt wurde (**Abbildung 20**), bestätigten sie die aus dem Chimärenexperiment abgeleitete Vermutung, dass kein zellautonomer Defekt in diesem Zelltyp vorliegt. So behindert das Fehlen von miR-223 weder die Bildung von Megakaryozyten-Vorläufern (**Abbildung 20C**) noch ihre Reifung (nicht

gezeigte Ploidie-Daten), Migrationsfähigkeit (**Abbildung 20A**) oder die Bildung von Proplättchen (**Abbildung 20B**). Auch die Megakaryozytenzahl im Knochenmark unterschied sich nicht zwischen beiden Genotypen (**Abbildung 20D**). Weitere Versuche (z.B. Co-Kultur von MKs und Stromazellen) wären also nötig, um die genaue Ursache der leicht verzögerten Plättchenneubildung in miR-223-defizienten gegenüber Wildtypmäusen herauszufinden.

Zusammengenommen zeigen unsere Experimente eine unerwartet schwache Rolle von miR-223 in der Plättchenproduktion in Mäusen, während die Plättchenfunktion scheinbar überhaupt nicht auf miR-223 angewiesen ist. Es muss allerdings betont werden, dass kompensatorische Mechanismen in unserem Mausmodell nicht ausgeschlossen sind. Die Erzeugung einer induzierbaren und vorzugsweise zelltypspezifischen *Knockout*-Mauslinie wäre hier sehr sinnvoll. Darüber hinaus lassen sich Ergebnisse aus dem Mausmodell nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen (siehe z.B. die zuvor erwähnten möglichen Unterschiede bei der Regulation des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ durch miR-223 und der Expression von pri-miR-223-Varianten). Definitiv stellt eine mangelnde funktionelle Relevanz von miR-223 in Blutplättchen und Megakaryozyten nicht seine mögliche Nutzung von miR-223 als Biomarker^{184,263} in Frage. Da unsere Daten trotz ihrer hohen Expression keine wesentliche Rolle von miR-223 in der Biologie von Blutplättchen unterstützen, bleibt zu vermuten, dass ihre wichtigere Funktion in Zielzellen nach ihrem Transfer aus Blutplättchen liegt.^{26,160}

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die zentrale Rolle von kleinen, nicht-kodierenden RNAs (MicroRNAs) bei der Entstehung und Progression von Herzkrankheiten ist durch eine große Zahl von Publikationen belegt. Erstaunlich wenige davon widmeten sich allerdings kardialen Fibroblasten (CFs), obwohl sie als Produzenten von Extrazellulärmatrix, Zytokinen und Wachstumsfaktoren essentiell für die normale Herzfunktion, aber auch pathologische Prozesse sind. Insbesondere sind CFs für die überschießende Akkumulation von Extrazellulärmatrix (Fibrose) verantwortlich, die bei praktisch allen Herzkrankheiten auftritt und die Herzfunktion wesentlich behindert.

Basierend auf der Vermutung, dass selektiv in einem Zelltyp exprimierte MicroRNAs wesentlich die Eigenschaften dieser Zellart formen, wurden zwei parallele Studien durchgeführt, um fibroblastenspezifische MicroRNAs im Herz zu entdecken. Unter Verwendung zweier verschiedener Tierarten (Ratte/Maus) und Detektionssysteme (PCR/Microarray) wurden miR-199a/b-3p und miR-223 als hochgradig in CFs gegenüber Kardiomyozyten angereicherte MicroRNAs identifiziert und für weitere Studien ausgewählt.

Experimente mit kultivierten CFs zeigten, dass Überexpression von miR-199a/b-3p die Proliferation durch eine Erhöhung der Zellzyklusaktivität verstärkt. Die Inhibition dieser MicroRNA hatte unerwarteterweise keine entgegengesetzte Wirkung auf die Proliferation, was möglicherweise durch einen Rückgang der endogenen MicroRNA-Expression in isolierten Zellen erklärbar ist. Mittels einer Proteomanalyse und weiterer Experimente wurde *Ywhae* (14-3-3 ϵ) als Zielmolekül von miR-199a/b-3p identifiziert, das wahrscheinlich mindestens einen Teil von deren positiven Wirkung auf Zellzyklus und Proliferation vermittelt.

Da der zweiten ausgewählten MicroRNA, miR-223, in Studien an kultivierten CFs keine Funktion zugewiesen werden konnte, wurde sie in Mausmodellen für kardialen Stress untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass die genetische Deletion von miR-223 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegen Ischämie-Reperfusionsschäden führt, während sie die Reaktion auf kardiale Drucküberlastung nicht beeinflusst.

Da miR-223 darüber hinaus eine der höchstabundanten MicroRNAs in Megakaryozyten und Blutplättchen ist, wurde auch untersucht, wie sich das Fehlen dieser MicroRNA auf die Funktion dieser beiden Zelltypen *in vivo* und *in vitro* auswirkt. Die Daten zeigen, dass miR-223 unerwarteterweise in diesem Kontext weitgehend verzichtbar ist.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf eine bisher unbekannte Rolle von miR-199a/b-3p und miR-223 im Herz hin, deren Relevanz für Krankheitsgeschehen weiter untersucht werden sollte. Die Untersuchungen von miR-223 in Megakaryozyten und Blutplättchen zeigen dagegen, dass eine hohe Expression einer MicroRNA in einem Zelltyp nicht zwangsläufig eine essentielle Funktion anzeigt.

7 SUMMARY

The crucial role of small, non-coding RNAs (microRNAs) in the onset and progression of heart diseases has been demonstrated by a vast number of publications. However, surprisingly few of them have addressed the function of cardiac fibroblasts (CFs), which, by producing extracellular matrix, cytokines and growth factors, exert an essential control of cardiac performance but also of pathological processes. In particular, CFs are involved in the excessive accumulation of extracellular matrix (fibrosis), which occurs in virtually all forms of heart disease and substantially impedes cardiac performance.

Based on the assumption that microRNAs that are selectively expressed in one cell type confer substantial features of this cell type we designed two parallel studies in order to discover fibroblast-specific microRNAs in the heart. Using two different species (rat/mouse) and detection systems (PCR/microarray) miR-199a/b-3p and miR-223 were identified as highly enriched in CFs compared to cardiac myocytes and thus selected for further investigations.

In experiments using cultivated CFs it was demonstrated that overexpression of miR-199a/b-3p promotes cell proliferation through an increase of cell cycle activity. Unexpectedly, the inhibition of this microRNA did not inversely affect proliferation, which might be attributed to a potential reduction of endogenous microRNA levels upon cell isolation. In a follow-up proteomic study and further experiments we identified *Ywhae* (14-3-3ε) as a target of miR-199a/b-3p, which likely mediates at least a part of its positive effect on cell cycle and proliferation.

As the second selected microRNA, miR-223, was not found to affect CF proliferation *in vitro*, we investigated the function of this microRNA in mouse models of cardiac stress. These studies showed that genetic deletion of miR-223 sensitized mice against ischemia-reperfusion damage, whereas the response to cardiac pressure overload was unaltered.

Since miR-223 is also one of the most abundant microRNAs in megakaryocytes and platelets, it was also analyzed, how absence of this microRNA impacts on the function of these cell types *in vivo* and *in vitro*. Surprisingly, our data showed that miR-223 is dispensable in this context.

Taken together, these results point to a hitherto unrecognized role of miR-199a/b-3p and miR-223, whose relevance for illnesses awaits further investigation. In contrast, the studies of miR-223 in megakaryocytes and platelets demonstrate that high expression of a microRNA does not necessarily indicate an essential function.

8 ANHANG

Table S1: Die 50 am stärksten bei miR-199-3p-Überexpression herunterregulierten, vorhergesagten miR-199-3p-Targets (Ergebnisse der Proteomanalyse)

Gennamen	Genbeschreibung	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Überexpression (Replik 1)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Überexpression (Replik 2)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Überexpression (Mittelwert)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Inhibition (Replik 1)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Inhibition (Replik 2)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Inhibition (Mittelwert)	Quantifizierte Peptide miR-199-3p-Überexpression (Replik 1)	Quantifizierte Peptide miR-199-3p-Überexpression (Replik 2)	Quantifizierte Peptide miR-199-3p-Inhibition (Replik 1)	Quantifizierte Peptide miR-199-3p-Inhibition (Replik 2)	Gennamen für vorhergesagte miR-199-3p-Targets (TargetScan-MOUSE)	Anzahl konservierte miR-199-3p-Bindestellen	Anzahl nicht-konservierte miR-199-3p-Bindestellen	DAVID/GO: Verknüpfung mit Proliferation, Zellzyklus, Zelltod oder Apoptose
Pdgfra/Kdr/Fit1/Fil4/Kiit/MAPK15/Nik	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	0,420	0,587	0,503	0,879	0,740	0,810	1	6	2	13	Pdgfra/Fit1/Nik	1	0	Ja
Lox	lysyl oxidase	0,478	0,581	0,530	0,654	0,695	0,675	13	15	18	19	Lox	1	0	
Cell2	CUGBP, Elav-like family member 2	0,521	0,620	0,571	0,774	0,922	0,848	1	2	5	3	Cell2	1	0	
Ndrgr1	N-myc downstream regulated gene 1	0,452	0,703	0,577	1,142	1,046	1,094	1	10	8	17	Ndrgr1	0	1	Ja
6430527G18Rik	RIKEN cDNA 6430527G18 gene	0,507	0,759	0,633	NaN	1,152		1	2	0	3	6430527G18Rik	0	1	
Lrrfp1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	0,470	0,830	0,650	NaN	1,166		2	2	0	3	Lrrfp1	0	1	
Anxa8	annexin A8	0,525	0,778	0,651	0,796	0,992	0,894	11	24	18	23	Anxa8	0	1	
Cd2ap	CD2-associated protein	0,646	0,707	0,677	1,267	1,284	1,276	2	12	6	14	Cd2ap	1	0	Ja
Golgb1	golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin 1	0,579	0,775	0,677	0,983	0,999	0,991	2	16	3	19	Golgb1	0	2	
Ano6	anoctamin 6	0,433	0,923	0,678	1,066	0,892	0,979	1	9	2	5	Ano6	0	1	
Ktn1	kineclin 1	0,702	0,679	0,691	1,222	1,258	1,240	2	25	9	24	Ktn1	1	0	
Nedd4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	0,642	0,752	0,697	1,050	1,080	1,065	52	46	66	69	Nedd4	1	0	
Epb4.1i2	erythrocyte protein band 4.1-like 2	0,711	0,712	0,711	0,752	0,791	0,771	8	38	22	36	Epb4.1i2	0	1	
Mpr1p	myosin phosphatase Rho interacting protein	0,617	0,811	0,714	0,782	0,812	0,797	1	9	6	14	Mpr1p	0	1	
Snap29	synaptosomal-associated protein 29	0,641	0,839	0,740	0,991	0,877	0,934	1	5	4	9	Snap29	0	1	
Sh3glb1	SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin)	0,649	0,836	0,743	1,000	0,982	0,991	6	9	7	13	Sh3glb1	3	0	Ja
Kdelc2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2	0,723	0,771	0,747	0,788	0,793	0,790	1	5	4	5	Kdelc2	0	2	
2900064A13Rik	RIKEN cDNA 2900064A13 gene	0,723	0,776	0,749	1,593	1,172	1,383	1	5	2	8	2900064A13Rik	1	0	
Pea15a	phosphoprotein enriched in astrocytes 15A	0,765	0,739	0,752	0,814	0,833	0,823	2	5	3	3	Pea15a	0	1	Ja
Plod1	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	0,795	0,711	0,753	0,954	0,791	0,872	3	11	8	11	Plod1	0	1	
PKI	phosphofruktokinase, liver, B-type	0,674	0,839	0,756	1,327	1,113	1,220	4	12	13	18	PKI	0	2	
Zfp326	zinc finger protein 326	0,671	0,851	0,761	0,832	0,906	0,869	10	9	6	16	Zfp326	0	1	Ja
Dscr3	Down syndrome critical region gene 3	0,557	0,970	0,764	0,904	0,869	0,887	1	4	5	5	Dscr3	0	1	
Scd2/1/3/4	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	0,711	0,820	0,766	1,839	1,453	1,646	3	14	14	19	Scd1/2/4	1	0	
Ywhae	tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, epsilon polypeptide	0,721	0,811	0,766	1,066	1,066	1,066	116	126	115	134	Ywhae	1	0	Ja
Vps26b	vacuolar protein sorting 26 homolog B (yeast)	0,947	0,590	0,768	0,845	0,484	0,664	5	1	4	1	Vps26b	0	1	
Dnajc3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	0,741	0,797	0,769	0,969	0,837	0,903	2	15	7	17	Dnajc3	0	1	
Farp1	FERM, RhoGEF (Arhgef) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)	0,765	0,776	0,771	0,966	0,847	0,906	1	3	3	5	Farp1	0	1	
Xpo7	exportin 7	0,618	0,941	0,779	0,921	1,067	0,994	1	2	4	3	Xpo7	1	1	
Slc25a13	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 13	0,758	0,805	0,781	1,118	1,198	1,158	1	2	4	4	Slc25a13	0	1	
Adamts1	thrombospondin type 1 motif, 1	0,814	0,749	0,782	NaN	0,713		1	2	0	3	Adamts1	0	1	
C230096C10Rik	RIKEN cDNA C230096C10 gene	0,816	0,756	0,786	0,982	1,079	1,030	2	6	7	7	C230096C10Rik	0	2	
Cd44	CD44 antigen	0,703	0,874	0,788	1,125	1,166	1,146	8	11	10	12	Cd44	1	0	Ja
Csrp2	cysteine and glycine-rich protein 2	0,815	0,782	0,788	1,011	0,953	0,982	3	14	4	25	Csrp2	1	0	
Dap3	death associated protein 3	0,665	0,914	0,790	0,887	1,127	1,007	6	5	6	2	Dap3	0	1	Ja
Prpf3	PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast)	0,730	0,857	0,793	0,875	0,950	0,912	1	12	5	13	Prpf3	0	1	
Arhgap10	Rho GTPase activating protein 10	0,650	0,937	0,794	1,232	1,069	1,150	1	1	2	4	Arhgap10	0	1	Ja
Pten	phosphatase and tensin homolog	0,644	0,948	0,796	NaN	0,853		1	3	0	4	Pten	0	1	Ja
Gnao1	guanine nucleotide binding protein, alpha O	0,753	0,842	0,797	0,880	0,853	0,867	14	18	16	22	Gnao1	0	1	
Calu	calumenin	0,699	0,905	0,802	1,305	0,982	1,144	1	5	6	9	Calu	1	0	
Ii6st	interleukin 6 signal transducer	0,859	0,748	0,804	0,721	0,793	0,757	1	1	2	3	Ii6st	0	1	Ja
Actr10	ARP10 actin-related protein 10 homolog (S. cerevisiae)	0,834	0,777	0,805	0,948	0,945	0,946	2	4	3	4	Actr10	0	2	Ja
Calu	calumenin	0,766	0,846	0,806	0,996	0,984	0,990	57	51	49	58	Calu	1	0	
Abcf1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	0,793	0,831	0,812	0,948	0,951	0,950	5	27	16	32	Abcf1	0	1	
Lin7c/Rilp	lin-7 homolog C (C. elegans)	0,734	0,894	0,814	0,939	1,169	1,054	1	3	3	6	Lin7c	1	0	
Upf2	UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)	0,657	0,980	0,819	1,036	0,969	1,003	2	3	2	1	Upf2	0	1	
Erc1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	0,700	0,942	0,821	0,851	0,848	0,850	3	18	8	20	Erc1	0	2	
Aldh3a2/Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2	0,791	0,863	0,827	1,256	1,023	1,139	4	7	4	9	Aldh3a2	0	1	
Mrp12	mitochondrial ribosomal protein L12	0,798	0,865	0,831	NaN	1,034		3	1	0	1	Mrp12	0	1	
Ppp1r7	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7	0,896	0,767	0,831	0,940	0,948	0,944	7	3	3	5	Ppp1r7	0	1	Ja

Tabelle S2: Die 50 am stärksten bei miR-199-3p-Inhibition hochregulierten, vorhergesagten miR-199-3p-Targets (Ergebnisse der Proteomanalyse)

Gennamen	Genbeschreibung	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Überexpression (Replik 1)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Überexpression (Replik 2)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Überexpression (Mittelwert)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Inhibition (Replik 1)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Inhibition (Replik 2)	X-fache Änderung bei miR-199-3p-Inhibition (Mittelwert)	Quantifizierte Peptide miR-199-3p-Überexpression (Replik 1)	Quantifizierte Peptide miR-199-3p-Überexpression (Replik 2)	Quantifizierte Peptide miR-199-3p-Inhibition (Replik 1)	Quantifizierte Peptide miR-199-3p-Inhibition (Replik 2)	Gennamen für vorhergesagte miR-199-3p-Targets (TargetScan-MOUSE)	Anzahl konservierte miR-199-3p-Bindestellen	Anzahl nicht-konservierte miR-199-3p-Bindestellen	DAVID/GO: Verknüpfung mit Proliferation, Zellzyklus, Zelltod oder Apoptose
Thada	thyroid adenoma associated	NaN	0,939		6,774	1,014	3,894	0	2	1	4	Thada	0	1	
Cd151	CD151 antigen	NaN	NaN		3,281	3,063	3,172	0	0	1	2	Cd151	0	4	Ja
Pon2	paraoxonase 2	0,510	NaN		2,634	1,422	2,028	1	0	1	1	Pon2	1	0	
Adrbk2/Adrbk1	adrenergic receptor kinase, beta 2	NaN	1,153		0,739	3,270	2,004	0	2	1	1	Adrbk2	0	1	
Fn1	fibronectin 1	1,664	0,934	1,299	2,080	1,441	1,760	203	258	255	286	Fn1	1	0	Ja
Parva	parvin, alpha	1,354	1,373	1,364	1,088	2,401	1,745	1	1	3	2	Parva	0	1	
Brcc3	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3	1,362	NaN		2,103	1,249	1,676	1	0	2	1	Brcc3	0	1	Ja
Ctsl	cathepsin L	1,189	1,355	1,272	1,680	1,638	1,659	5	9	10	8	Ctsl	0	1	
Scd2/11/3/4	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	0,711	0,820	0,766	1,839	1,453	1,646	3	14	14	19	Scd1/2/4	1	0	
Fn1	fibronectin 1	NaN	0,974		1,913	1,365	1,639	0	10	6	14	Fn1	1	0	Ja
Fosl2	fos-like antigen 2	NaN	1,180		1,824	1,338	1,581	0	3	1	5	Fosl2	0	2	Ja
Rap2a/Rap2c	RAS related protein 2a	0,800	0,882	0,841	0,885	2,275	1,580	1	2	1	1	Rap2a	1	0	
Ank	progressive ankylosis	NaN	NaN		1,579	1,519	1,549	0	0	2	1	Ank	0	1	
Rin1	Ras and Rab interactor 1	NaN	0,972		1,413	1,500	1,457	0	5	4	4	Rin1	0	1	
Ddr2	discoidin domain receptor family, member 2	NaN	0,843		1,539	1,354	1,447	0	1	6	6	Ddr2	1	1	Ja
Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	NaN	NaN		1,440	1,434	1,437	0	0	1	1	Pdk1	0	1	
Vps41	vacuolar protein sorting 41 (yeast)	NaN	0,970		0,758	2,078	1,418	0	3	1	1	Vps41	0	1	
Dfna5	deafness, autosomal dominant 5 (human)	NaN	0,966		1,427	1,365	1,396	0	1	1	3	Dfna5	0	1	Ja
2900064A13Rik	RIKEN cDNA 2900064A13 gene	0,723	0,776	0,749	1,593	1,172	1,383	1	5	2	8	2900064A13Rik	1	0	
Hectd3	HECT domain containing 3	NaN	0,375		1,234	1,493	1,363	0	1	1	2	Hectd3	0	2	Ja
Sh3pxd2a	SH3 and PX domains 2A	NaN	0,868		1,663	1,041	1,352	0	1	2	3	Sh3pxd2a	0	1	
Ero1l	ERO1-like (S. cerevisiae)	1,244	1,350	1,297	1,289	1,372	1,331	11	16	15	17	Ero1l	0	1	
Prmt3	protein arginine N-methyltransferase 3	0,845	0,904	0,874	1,504	1,090	1,297	1	3	2	2	Prmt3	0	1	
Cf12	cofilin 2, muscle	0,797	0,985	0,891	1,300	1,281	1,291	2	3	6	3	Cf12	1	0	
Tmem33	transmembrane protein 33	1,000	NaN		1,110	1,465	1,287	2	0	3	1	Tmem33	0	2	
Cd2ap	CD2-associated protein	0,646	0,707	0,677	1,267	1,284	1,276	2	12	6	14	Cd2ap	1	0	Ja
Tmem106b	transmembrane protein 106B	NaN	NaN		1,363	1,186	1,274	0	0	4	3	Tmem106b	0	2	
Gpatch8	G patch domain containing 8	NaN	1,471		1,445	1,092	1,268	0	1	1	1	Gpatch8	0	1	
Lrrfp1	leucine rich repeat (in FHLI) interacting protein 1	0,894	1,028	0,961	1,251	1,254	1,252	2	14	4	15	Lrrfp1	0	1	
Map2k1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	0,822	0,861	0,842	1,390	1,101	1,246	3	11	10	8	Map2k1	0	1	Ja
Ale1	arginyltransferase 1	NaN	1,032		1,497	0,994	1,245	0	4	1	7	Ale1	0	1	
Pip4k2c	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, gamma	1,439	NaN		1,330	1,157	1,243	1	0	2	1	Pip4k2c	0	1	
Kln1	kinectin 1	0,702	0,679	0,691	1,222	1,258	1,240	2	25	9	24	Kln1	1	0	
Atad3a	ATPase family, AAA domain containing 3A	1,038	1,101	1,069	1,456	1,015	1,235	6	8	6	9	Atad3a	0	1	Ja
G3bp2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	0,847	0,935	0,891	1,231	1,239	1,235	5	11	12	11	G3bp2	1	0	
Cbx6	chromobox homolog 6	NaN	0,998		1,110	1,337	1,223	0	4	1	3	Cbx6	0	1	
Pfk1	phosphofruktokinase, liver, B-type	0,674	0,839	0,756	1,327	1,113	1,220	4	12	13	18	Pfk1	0	2	
Cars	cysteinyl-tRNA synthetase	0,959	1,059	1,009	1,255	1,185	1,220	14	28	19	29	Cars	0	1	
Epm2aip1	EPM2A (laforin) interacting protein 1	1,024	1,101	1,062	1,082	1,323	1,202	2	7	4	4	Epm2aip1	0	1	
Dhx33	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33	NaN	NaN		1,043	1,343	1,193	0	0	1	1	Dhx33	0	1	
Txndc9	thioredoxin domain containing 9	1,353	1,041	1,197	1,112	1,272	1,192	5	3	1	2	Txndc9	0	1	Ja
Soat1	sterol O-acetyltransferase 1	0,982	0,993	0,988	1,190	1,187	1,189	5	6	4	8	Soat1	0	1	
Mbni1	muscleblind-like 1 (Drosophila)	1,076	0,948	1,012	1,329	1,045	1,187	1	3	3	4	Mbni1	1	1	
Cox15	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	1,065	1,358	1,211	1,083	1,289	1,186	1	2	6	1	Cox15	0	1	
Abcb8	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8	NaN	0,887		1,378	0,993	1,185	0	1	1	1	Abcb8	0	1	
Vamp3	vesicle-associated membrane protein 3	NaN	0,760		1,189	1,171	1,180	0	7	4	9	Vamp3	2	0	
Cpsf3	cleavage and polyadenylation specificity factor 3	NaN	1,021		1,339	1,021	1,180	0	3	2	5	Cpsf3	0	1	
Ppp2r2a	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	0,867	0,957	0,912	1,217	1,125	1,171	3	6	11	7	Ppp2r2a	1	0	
Ugt2b36/Ugt1a7c	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B36	0,807	1,084	0,945	0,998	1,339	1,169	6	5	9	3	Ugt2b36	0	1	
Mllt4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	1,171	0,897	1,034	1,307	1,026	1,167	3	13	5	12	Mllt4	0	1	

9 REFERENZEN

1. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215–33.
2. 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;280:9330–5.
3. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson K V, Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003;35:215–7.
4. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*. 2011;469:336–42.
5. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11:228–34.
6. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9:102–14.
7. Vacchi-Suzzi C, Hahne F, Scheubel P, Marcellin M, Dubost V, Westphal M, Boeglen C, Büchmann-Møller S, Cheung MS, Cordier A, De Benedetto C, Deurinck M, Frei M, Moulin P, Oakeley E, Grenet O, Grevot A, Stull R, Theil D, Moggs JG, Marrer E, Couttet P. Heart structure-specific transcriptomic atlas reveals conserved microRNA-mRNA interactions. *PLoS One*. 2013;8:e52442.
8. Winter J, Diederichs S. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biol*. 2011;8:1149–57.
9. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466:835–40.
10. Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell*. 2013;153:654–65.
11. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175–205.
12. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11:597–610.
13. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455:58–63.
14. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008;455:64–71.
15. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433:769–73.
16. Ganesan J, Ramanujam D, Sassi Y, Ahles A, Jentzsch C, Werfel S, Leierseder S, Loyer X, Giacca M, Zentilin L, Thum T, Lagerbauer B, Engelhardt S. MiR-378 Controls Cardiac Hypertrophy by Combined Repression of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Factors. *Circulation*. 2013;127:2097–106.
17. Zardo G, Ciolfi A, Vian L, Starnes LM, Billi M, Racanicchi S, Maresca C, Fazi F, Travaglini L, Noguera N, Mancini M, Nanni M, Cimino G, Lo-Coco F, Grignani F, Nervi C. Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression. *Blood*. 2012;119:4034–46.

18. Kim DH, Saetrom P, Snøve O, Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:16230–5.
19. Benhamed M, Herbig U, Ye T, Dejean A, Bischof O. Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Cell Biol*. 2012;14:266–75.
20. Younger ST, Corey DR. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:5682–91.
21. Xu L, Yang B-F, Ai J. MicroRNA transport: a new way in cell communication. *J Cell Physiol*. 2013;228:1713–9.
22. Halkein J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, Haghikia A, Nguyen N-Q-N, Scherr M, Castermans K, Malvaux L, Lambert V, Thiry M, Sliwa K, Noel A, Martial JA, Hilfiker-Kleiner D, Struman I. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2013;123:2143–54.
23. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJG, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2012;14:249–56.
24. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2:ra81.
25. Gidlöf O, van der Brug M, Ohman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, Erlinge D. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*. 2013;121:3908–17.
26. Laffont B, Corduan A, Plé H, Duchez A-C, Cloutier N, Boilard E, Provost P. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2:miRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*. 2013;122:253–61.
27. Mendis S, Puska P, Norrving B, (Editors). Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. Genf: 2011.
28. Weil J, Schunkert H. Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. *Clin Res Cardiol*. 2006;95 Suppl 4:1–15; quiz 16–7.
29. Dirx E, Gladka MM, Philippen LE, Armand A-S, Kinet V, Leptidis S, El Azzouzi H, Salic K, Bourajaj M, da Silva GJJ, Olieslagers S, van der Nagel R, de Weger R, Bitsch N, Kisters N, Seyen S, Morikawa Y, Chanoine C, Heymans S, Volders PGA, Thum T, Dimmeler S, Cserjesi P, Eschenhagen T, da Costa Martins PA, De Windt LJ. Nfat and miR-25 cooperate to reactivate the transcription factor Hand2 in heart failure. *Nat Cell Biol*. 2013;15:1282–93.
30. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans P a, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116:258–67.
31. Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, Eulerink F. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J*. 1991;12:488–94.
32. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1883–91.

33. Basford JR. The Law of Laplace and its relevance to contemporary medicine and rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil.* 2002;83:1165–1170.
34. Kakkar R, Lee RT. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ Res.* 2010;106:47–57.
35. Howard CM, Baudino TA. Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;
36. Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway SJ, Nagai R. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest.* 2010;120:254–65.
37. Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong T-T, Shaw RM, Srivastava D. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell.* 2009;16:233–44.
38. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2011;123:594–604.
39. Long CS. The role of interleukin-1 in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2001;6:81–94.
40. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol.* 1997;151:317–22.
41. Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res.* 2009;105:1164–76.
42. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833:945–53.
43. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18:1028–40.
44. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:657–87.
45. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008;456:980–4.
46. Wakisaka O, Takahashi N, Shinohara T, Ooie T, Nakagawa M, Yonemochi H, Hara M, Shimada T, Saikawa T, Yoshimatsu H. Hyperthermia treatment prevents angiotensin II-mediated atrial fibrosis and fibrillation via induction of heat-shock protein 72. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:616–26.
47. Ju H, Zhao S, Jassal DS, Dixon IM. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1997;35:223–32.
48. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007;13:952–61.
49. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol.* 2010;225:631–7.

50. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012;180:1340–55.
51. Yano T, Miura T, Ikeda Y, Matsuda E, Saito K, Miki T, Kobayashi H, Nishino Y, Ohtani S, Shimamoto K. Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14:241–6.
52. Virag JI, Murry CE. Myofibroblast and Endothelial Cell Proliferation during Murine Myocardial Infarct Repair. *Am J Pathol.* 2003;163:2433–2440.
53. Martin TP, Lawan A, Robinson E, Grieve DJ, Plevin R, Paul A, Currie S. Adult cardiac fibroblast proliferation is modulated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in normal and hypertrophied hearts. *Pflugers Arch.* 2013;
54. Cieslik KA, Trial J, Entman ML. Defective myofibroblast formation from mesenchymal stem cells in the aging murine heart rescue by activation of the AMPK pathway. *Am J Pathol.* 2011;179:1792–806.
55. Carlson S, Trial J, Soeller C, Entman ML. Cardiac mesenchymal stem cells contribute to scar formation after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2011;91:99–107.
56. Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013;6:5.
57. Van Amerongen MJ, Bou-Gharios G, Popa E, van Ark J, Petersen AH, van Dam GM, van Luyn MJA, Harmsen MC. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction. *J Pathol.* 2008;214:377–86.
58. Zhou B, Honor LB, He H, Ma Q, Oh J, Butterfield C, Lin R, Melero-Martin JM, Dolmatova E, Duffy HS, Gise A Von, Zhou P, Hu YW, Wang G, Zhang B, Wang L, Hall JL, Moses MA, McGowan FX, Pu WT. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest.* 2011;121:1894–904.
59. Rumbaut R, Thiagarajan P. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
60. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1687–93.
61. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2341–9.
62. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:403–12.
63. Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N, Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:227–34.
64. Delvaeye M, Conway EM. Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood.* 2009;114:2367–74.
65. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol.* 2013;35:254–61.
66. Lindemann S, Krämer B, Seizer P, Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:203–11.
67. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. *J Exp Med.* 2002;196:887–896.

68. Weissmüller T, Campbell EL, Rosenberger P, Scully M, Beck PL, Furuta GT, Colgan SP. PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-NTPDases. *J Clin Invest*. 2008;118:3682–92.
69. Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest*. 2006;116:3211–9.
70. Köhler D, Straub A, Weissmüller T, Faigle M, Bender S, Lehmann R, Wendel H-P, Kurz J, Walter U, Zacharowski K, Rosenberger P. Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein prevents platelet-neutrophil complex formation and dampens myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123:2579–90.
71. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*. 2008;111:981–6.
72. Geddis AE. Megakaryopoiesis. *Semin Hematol*. 2010;47:212–9.
73. Psaila B, Lyden D, Roberts I. Megakaryocytes, malignancy and bone marrow vascular niches. *J Thromb Haemost*. 2012;10:177–88.
74. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Shivdasani RA, von Andrian UH. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317:1767–70.
75. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007;129:303–17.
76. Chen J-F, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, Rojas M, Hammond SM, Schneider MD, Selzman CH, Meissner G, Patterson C, Hannon GJ, Wang D-Z. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:2111–6.
77. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, Lodish HF, Blüthgen R. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2009;105:585–94.
78. Da Costa Martins PA, Bourajaj M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, Molkentin JD, De Windt LJ. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*. 2008;118:1567–76.
79. Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Li P-F. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:12103–8.
80. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang M-L, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MVG, Høydal M, Autore C, Russo M a, Dorn GW, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2007;13:613–8.
81. Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:13027–32.
82. Wang J, Song Y, Zhang Y, Xiao H, Sun Q, Hou N, Guo S, Wang Y, Fan K, Zhan D, Zha L, Cao Y, Li Z, Cheng X, Zhang Y, Yang X. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. *Cell Res*. 2012;22:516–27.

83. Jentsch C, Leierseder S, Loyer X, Flohrschütz I, Sassi Y, Hartmann D, Thum T, Lagerbauer B, Engelhardt S. A phenotypic screen to identify hypertrophy-modulating microRNAs in primary cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:13–20.
84. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Tréguer K, Carmona G, Bonauer A, Horrevoets AJG, Didier N, Girmatsion Z, Biliczki P, Ehrlich JR, Katus HA, Müller OJ, Potente M, Zeiher AM, Hermeking H, Dimmeler S. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature.* 2013;495:107–10.
85. Da Costa Martins PA, Salic K, Gladka MM, Armand A-S, Leptidis S, el Azzouzi H, Hansen A, Coenen-de Roo CJ, Bierhuizen MF, van der Nagel R, van Kuik J, de Weger R, de Bruin A, Condorelli G, Arbones ML, Eschenhagen T, De Windt LJ. MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat Cell Biol.* 2010;12:1220–7.
86. Ren X-P, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan G-C. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation.* 2009;119:2357–66.
87. Iekushi K, Seeger F, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Regulation of cardiac microRNAs by bone marrow mononuclear cell therapy in myocardial infarction. *Circulation.* 2012;125:1765–73, S1–7.
88. Bernardo BC, Gao X-M, Winbanks CE, Boey EJH, Tham YK, Kiriazis H, Gregorevic P, Obad S, Kauppinen S, Du X-J, Lin RCY, McMullen JR. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:17615–20.
89. Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, Dalby CM, Robinson K, Stack C, Latimer PA, Hare JM, Olson EN, van Rooij E. Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res.* 2012;110:71–81.
90. Qian L, Van Laake LW, Huang Y, Liu S, Wendland MF, Srivastava D. miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *J Exp Med.* 2011;208:549–60.
91. Wang X, Zhang X, Ren X-P, Chen J, Liu H, Yang J, Medvedovic M, Hu Z, Fan G-C. MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation.* 2010;122:1308–18.
92. Aurora AB, Mahmoud AI, Luo X, Johnson BA, van Rooij E, Matsuzaki S, Humphries KM, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA, Olson EN. MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca²⁺ overload and cell death. *J Clin Invest.* 2012;122:1222–32.
93. Wang J-X, Jiao J-Q, Li Q, Long B, Wang K, Liu J-P, Li Y-R, Li P-F. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med.* 2011;17:71–8.
94. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med.* 2007;13:486–91.
95. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang R, Tatsuguchi M, Huang Z, Chen J, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang D. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:2772–86.
96. Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang D-Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006;38:228–33.
97. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature.* 2005;436:214–20.

98. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 2008;22:3242–54.
99. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, Mammen PP, Rothermel BA, Olson EN, Sadek HA. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:187–92.
100. Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam Y-J, Matkovich SJ, Dorn GW, van Rooij E, Olson EN. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2011;109:670–9.
101. Kalsotra A, Wang K, Li P-F, Cooper TA. MicroRNAs coordinate an alternative splicing network during mouse postnatal heart development. *Genes Dev.* 2010;24:653–8.
102. Heidersbach A, Saxby C, Carver-Moore K, Huang Y, Ang Y-S, de Jong PJ, Ivey KN, Srivastava D. microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *Elife.* 2013;2:1–22.
103. Coppola A, Romito A, Borel C, Gehrig C, Gagnebin M, Falconnet E, Izzo A, Altucci L, Banfi S, Antonarakis SE, Minchiotti G, Cobellis G. Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. *Stem Cell Res.* 2013;12:323–337.
104. Carrer M, Liu N, Grueter CE, Williams AH, Frisard MI, Hulver MW, Bassel-Duby R, Olson EN. Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:15330–5.
105. El Azzouzi H, Leptidis S, Dirkx E, Hoeks J, van Bree B, Brand K, McClellan EA, Poels E, Sluimer JC, van den Hoogenhof MMG, Armand A-S, Yin X, Langley S, Bourajaj M, Olieslagers S, Krishnan J, Vooijs M, Kurihara H, Stubbs A, Pinto YM, Krek W, Mayr M, da Costa Martins PA, Schrauwen P, De Windt LJ. The Hypoxia-Inducible MicroRNA Cluster miR-199a~214 Targets Myocardial PPAR δ and Impairs Mitochondrial Fatty Acid Oxidation. *Cell Metab.* 2013;18:341–54.
106. Grueter CE, van Rooij E, Johnson BA, DeLeon SM, Sutherland LB, Qi X, Gautron L, Elmquist JK, Bassel-Duby R, Olson EN. A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13. *Cell.* 2012;149:671–83.
107. 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;316:575–9.
108. Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation.* 2011;124:1537–47.
109. Abonnenc MM, Nabeebaccus AA, Mayr U, Barallobre-Barreiro J, Dong X, Cuello F, Sur S, Drozdov I, Langley SR, Lu R, Stathopoulou K, Didangelos A, Yin X, Zimmermann W-HH, Shah AM, Zampetaki A, Mayr M. Extracellular Matrix Secretion by Cardiac Fibroblasts: Role of microRNA-29b and microRNA-30c. *Circ Res.* 2013;113:1138–47.
110. Dawson K, Wakili R, Ordög B, Clauss S, Chen Y, Iwasaki Y, Voigt N, Qi XY, Sinner MF, Dobrev D, Käüb S, Nattel S. MicroRNA29: a mechanistic contributor and potential biomarker in atrial fibrillation. *Circulation.* 2013;127:1466–75, 1475e1–28.
111. Huang W, Dai B, Wen Z, Millard RW, Yu X-Y, Luther K, Xu M, Zhao TC, Yang H-T, Qi Z, Lasance K, Ashraf M, Wang Y. Molecular strategy to reduce in vivo collagen barrier promotes entry of NCX1 positive inducible pluripotent stem cells (iPSC(NCX1⁺)) into ischemic (or injured) myocardium. *PLoS One.* 2013;8:e70023.

112. Zhu J-N, Chen R, Fu Y-H, Lin Q-X, Huang S, Guo L-L, Zhang M-Z, Deng C-Y, Zou X, Zhong S-L, Yang M, Zhuang J, Yu X-Y, Shan Z-X. Smad3 Inactivation and MiR-29b Upregulation Mediate the Effect of Carvedilol on Attenuating the Acute Myocardium Infarction-Induced Myocardial Fibrosis in Rat. *PLoS One*. 2013;8:e75557.
113. Harada M, Luo X, Qi XY, Tadevosyan A, Maguy A, Ordog B, Ledoux J, Kato T, Naud P, Voigt N, Shi Y, Kamiya K, Murohara T, Kodama I, Tardif J-C, Schotten U, Van Wagoner DR, Dobrev D, Nattel S. Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation. *Circulation*. 2012;126:2051–64.
114. Wei C, Kim I-K, Kumar S, Jayasinghe S, Hong N, Castoldi G, Catalucci D, Jones WK, Gupta S. NF- κ B mediated miR-26a regulation in cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*. 2013;228:1433–42.
115. Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM, Creemers EE. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res*. 2009;104:170–8.
116. Wang Y-S, Li S-H, Guo J, Mihic A, Wu J, Sun L, Davis K, Weisel RD, Li R-K. Role of miR-145 in cardiac myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;
117. Jazbutyte V, Fiedler J, Kneitz S, Galuppo P, Just A, Holzmann A, Bauersachs J, Thum T. MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart. *Age (Dordr)*. 2013;35:747–62.
118. Pan Z, Sun X, Shan H, Wang N, Wang J, Ren J, Feng S, Xie L, Lu C, Yuan Y, Zhang Y, Wang Y, Lu Y, Yang B. MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor- β 1 pathway. *Circulation*. 2012;126:840–50.
119. Wang J, Huang W, Xu R, Nie Y, Cao X, Meng J, Xu X, Hu S, Zheng Z. MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2012;16:2150–60.
120. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu J, Srivastava D. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012;485:593–8.
121. Song K, Nam Y-J, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, Acharya A, Smith CL, Tallquist MD, Neilson EG, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*. 2012;485:599–604.
122. Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch E a, Zhang L, Payne JA, Pandya K, Zhang Z, Rosenberg P, Mirotsov M, Dzau VJ. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*. 2012;110:1465–73.
123. Heymans S, Corsten MF, Verhesen W, Carai P, van Leeuwen REW, Custers K, Peters T, Hazebroek M, Stöger L, Wijnands E, Janssen BJ, Creemers EE, Pinto YM, Grimm D, Schürmann N, Vigorito E, Thum T, Stassen F, Yin X, Mayr M, de Windt LJ, Lutgens E, Wouters K, de Winther MPJ, Zacchigna S, Giacca M, van Bilsen M, Papageorgiou A-P, Schroen B. Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure. *Circulation*. 2013;128:1420–32.
124. Corsten MF, Papageorgiou A, Verhesen W, Carai P, Lindow M, Obad S, Summer G, Coort SLM, Hazebroek M, van Leeuwen R, Gijbels MJJ, Wijnands E, Biessen EAL, De Winther MPJ, Stassen FRM, Carmeliet P, Kauppinen S, Schroen B, Heymans S. MicroRNA profiling identifies microRNA-155 as an adverse mediator of cardiac injury and dysfunction during acute viral myocarditis. *Circ Res*. 2012;111:415–25.

125. Ren D, Wang X, Ha T, Liu L, Kalbfleisch J, Gao X, Williams D, Li C. SR-A deficiency reduces myocardial ischemia/reperfusion injury; involvement of increased microRNA-125b expression in macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832:336–46.
126. Wang S, Olson EN. Angiomirs - key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19:205–11.
127. Chen L-J, Lim SH, Yeh Y-T, Lien S-C, Chiu J-J. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Biomed Sci*. 2012;19:79.
128. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15:261–71.
129. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen C-Z, Kuo CJ. Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Development*. 2008;135:3989–93.
130. Van Solingen C, Seghers L, Bijkerk R, Duijs JMGJ, Roeten MK, van Oeveren-Rietdijk AM, Baelde HJ, Monge M, Vos JB, de Boer HC, Quax PHA, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1577–85.
131. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:1516–21.
132. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009;324:1710–3.
133. Shi L, Fisslthaler B, Zippel N, Frömel T, Hu J, Elgheznawy A, Heide H, Popp R, Fleming I, Fromel T. MicroRNA-223 Antagonises Angiogenesis by Targeting $\beta 1$ Integrin and Preventing Growth Factor Signaling in Endothelial Cells. *Circ Res*. 2013;
134. Hinkel R, Penzkofer D, Zühlke S, Fischer A, Husada W, Xu Q-F, Baloch E, van Rooij E, Zeiher AM, Kupatt C, Dimmeler S. Inhibition of MicroRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation*. 2013;128:1066–75.
135. Loyer X, Potteaux S, Vion A-C, Guerin CL, Boulkroun S, Rautou P-E, Ramkhalawon B, Esposito B, Dalloz M, Paul J-L, Julia PL, Maccario J, Boulanger CM, Mallat Z, Tedgui A. Inhibition of microRNA-92a Prevents Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis in Mice. *Circ Res*. 2013;
136. Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, Gupta SK, Lorenzen J, Hartmann D, Galuppo P, Kneitz S, Pena JTG, Sohn-Lee C, Loyer X, Soutschek J, Brand T, Tuschl T, Heineke J, Martin U, Schulte-Merker S, Ertl G, Engelhardt S, Bauersachs J, Thum T. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*. 2011;124:720–30.
137. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F, Robbins RC, Wu JC. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation*. 2010;122:S124–31.
138. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee T-H, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460:705–10.
139. Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu D-Z, Lu Q, Deitch EA, Huo Y, Delphin ES, Zhang C. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2009;105:158–66.

140. Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MVG, Peterson KL, Indolfi C, Catalucci D, Chen J, Courtneidge SA, Condorelli G. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ*. 2009;16:1590–8.
141. Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Krüger M, Hein L, Braun T. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest*. 2009;119:2634–47.
142. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta N, Steer BM, Ingram AJ, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Marsden P a, Verma S. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis. *Circulation*. 2012;126:S81–90.
143. Hutcheson R, Terry R, Chaplin J, Smith E, Musiyenko A, Russell JC, Lincoln T, Rocic P. MicroRNA-145 restores contractile vascular smooth muscle phenotype and coronary collateral growth in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:727–36.
144. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2007;100:1579–88.
145. Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res*. 2009;104:476–87.
146. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J Biol Chem*. 2009;284:3728–38.
147. Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004;303:83–6.
148. Lu J, Guo S, Ebert BL, Zhang H, Peng X, Bosco J, Pretz J, Schlanger R, Wang JY, Mak RH, Dombkowski DM, Preffer FI, Scadden DT, Golub TR. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell*. 2008;14:843–53.
149. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, Hirst M, Hogge D, Marra M, Wells RA, Buckstein R, Lam W, Humphries RK, Karsan A. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010;16:49–58.
150. Kumar MS, Narla A, Nonami A, Mullally A, Dimitrova N, Ball B, McAuley JR, Poveromo L, Kutok JL, Galili N, Raza A, Attar E, Gilliland DG, Jacks T, Ebert BL. Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q-syndrome. *Blood*. 2011;118:4666–73.
151. Navarro F, Gutman D, Meire E, Cáceres M, Rigoutsos I, Bentwich Z, Lieberman J. miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. *Blood*. 2009;114:2181–92.
152. Girardot M, Pecquet C, Boukour S, Knoops L, Ferrant A, Vainchenker W, Giraudier S, Constantinescu SN. miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. *Blood*. 2010;116:437–45.
153. Romania P, Lulli V, Pelosi E, Biffoni M, Peschle C, Marziali G. MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors. *Br J Haematol*. 2008;143:570–80.
154. Zarif MN, Soleimani M, Abolghasemi H, Amirizade N, Arefian E, Rahimian A. Megakaryocytic differentiation of CD133+ hematopoietic stem cells by down-regulation of microRNA-10a. *Hematology*. 2013;18:93–100.

155. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost.* 2009;7:241–6.
156. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16:961–966.
157. Edelstein LC, Simon LM, Montoya RT, Holinstat M, Chen ES, Bergeron A, Kong X, Nagalla S, Mohandas N, Cohen DE, Dong J, Shaw C, Bray PF. Racial differences in human platelet PAR4 reactivity reflect expression of PCTP and miR-376c. *Nat Med.* 2013;19.
158. Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, Nagalla S, Liu DJ, Jin Y, Dong JF, Ren Q, Whiteheart SW, Shaw C, Bray PF. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost.* 2010;8:369–78.
159. Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar AA, Edelstein LC, Ma L, Chen J, McKnight GS, Lopez JA, Yang L, Jin Y, Bray MS, Leal SM, Dong JF, Bray PF. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood.* 2011;117:5189–5197.
160. Pan Y, Liang H, Liu H, Li D, Chen X, Li L, Zhang C-Y, Zen K. Platelet-Secreted MicroRNA-223 Promotes Endothelial Cell Apoptosis Induced by Advanced Glycation End Products via Targeting the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor. *J Immunol.* 2013;
161. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2006;355:251–9.
162. Hydbring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs. *F1000Research.* 2013;2:1–16.
163. Santaris Pharma A/S. Miravirsin in Combination With Telaprevir and Ribavirin in Null Responder to Pegylated-Interferon Alpha Plus Ribavirin Subjects With Chronic Hepatitis C Virus Infection [Internet; Seite besucht am 27. Nov 2013]. URL: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01872936>
164. Mirna Therapeutics Inc. A Multicenter Phase I Study of MRX34, MicroRNA miR-RX34 Liposome Injectable Suspension [Internet; Seite besucht am 27. Nov 2013]. URL: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01829971>
165. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs”. *Nature.* 2005;438:685–9.
166. The Walter and Eliza Hall Institute of Medical research. Weasel Software. [Internet; Seite besucht am 2. Sept 2010]; URL: http://www.wehi.edu.au/other_domains/cytometry/WeaselDownload.html
167. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6:359–62.
168. Wiśniewski JR, Zougman A, Mann M. Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *J Proteome Res.* 2009;8:5674–8.
169. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem.* 2003;75:663–70.
170. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008;26:1367–72.

171. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 2008;451:1125–1129.
172. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8277–81.
173. Metzler B, Mair J, Lercher A, Schaber C, Hintringer F, Pachinger O, Xu Q. Mouse model of myocardial remodelling after ischemia: role of intercellular adhesion molecule-1. *Cardiovasc Res*. 2001;49:399–407.
174. Robinson M, MacHin S, Mackie I, Harrison P. In vivo biotinylation studies: specificity of labelling of reticulated platelets by thiazole orange and mepacrine. *Br J Haematol*. 2000;108:859–64.
175. Leierseder S. Role of microRNAs in different cell types of the mammalian heart. 2008;
176. Wang J, Chen H, Seth A, McCulloch CA. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1871–81.
177. Teunissen BEJ, Smeets PJH, Willemsen PHM, De Windt LJ, Van der Vusse GJ, Van Bilsen M. Activation of PPARdelta inhibits cardiac fibroblast proliferation and the transdifferentiation into myofibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2007;75:519–29.
178. Hussein K, Theophile K, Dralle W, Wiese B, Kreipe H, Bock O. MicroRNA expression profiling of megakaryocytes in primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Platelets*. 2009;20:391–400.
179. Petriv OI, Kuchenbauer F, Delaney AD, Lecault V, White A, Kent D, Marmolejo L, Heuser M, Berg T, Copley M, Ruschmann J, Sekulovic S, Benz C, Kuroda E, Ho V, Antignano F, Halim T, Giambra V, Krystal G, Takei CJF, Weng AP, Piret J, Eaves C, Marra MA, Humphries RK, Hansen CL. Comprehensive microRNA expression profiling of the hematopoietic hierarchy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:15443–8.
180. Bray PF, McKenzie SE, Edelstein LC, Nagalla S, Delgrosso K, Ertel A, Kupper J, Jing Y, Londin E, Loher P, Chen H-W, Fortina P, Rigoutsos I. The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC Genomics*. 2013;14:1.
181. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee M-LT, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008;3:e3694.
182. Osman A, Fälker K. Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets*. 2011;22:433–41.
183. Wang K, Yuan Y, Cho J-H, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*. 2012;7:e41561.
184. Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, Kaudewitz D, King A, Kirkby NS, Crosby-Nwaobi R, Prokopi M, Drozdov I, Langley SR, Sivaprasad S, Markus HS, Mitchell JA, Warner TD, Kiechl S, Mayr M. Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers for Platelet Activation. *Circ Res*. 2013;112:595–600.
185. Xu X, Gnatenko D V, Ju J, Hitchcock IS, Martin DW, Zhu W, Bahou WF. Systematic analysis of microRNA fingerprints in thrombocytic platelets using integrated platforms. *Blood*. 2012;120:3575–85.

186. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard J-M, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, Boulanger CM, Willeit J, Chowienczyk PJ, Kiechl S, Mayr M. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:290–9.
187. Mazharian A, Thomas SG, Dhanjal TS, Buckley CD, Watson SP. Critical role of Src-Syk-PLC γ 2 signaling in megakaryocyte migration and thrombopoiesis. *Blood*. 2010;116:793–800.
188. Van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ, Olson EN. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*. 2009;17:662–73.
189. Lu H, Buchan RJ, Cook SA. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovasc Res*. 2010;86:410–20.
190. Loebel DAF, Tsoi B, Wong N, Tam PPL. A conserved noncoding intronic transcript at the mouse Dnm3 locus. *Genomics*. 2005;85:782–9.
191. Watanabe T, Sato T, Amano T, Kawamura Y, Kawamura N, Kawaguchi H, Yamashita N, Kurihara H, Nakaoka T. Dnm3os, a non-coding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice. *Dev Dyn*. 2008;237:3738–48.
192. Lee Y-B, Bantounas I, Lee D-Y, Phylactou L, Caldwell M a, Uney JB. Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:123–8.
193. Schneider M, Andersen DC, Silahatoglu A, Lyngbæk S, Kauppinen S, Hansen JL, Sheikh SP. Cell-specific detection of microRNA expression during cardiomyogenesis by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Mol Histol*. 2011;42:289–99.
194. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller R-U, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter H-I, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007;129:1401–14.
195. Kim S, Lee UJ, Kim MN, Lee E-J, Kim JY, Lee MY, Choung S, Kim YJ, Choi Y-C. MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem*. 2008;283:18158–66.
196. Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18255–60.
197. Rane S, He M, Sayed D, Yan L, Vatner D, Abdellatif M. An antagonism between the AKT and beta-adrenergic signaling pathways mediated through their reciprocal effects on miR-199a-5p. *Cell Signal*. 2010;22:1054–62.
198. Sayed D, Hong C, Chen I-Y, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2007;100:416–24.
199. Haghikia A, Missol-Kolka E, Tsikas D, Venturini L, Brundiers S, Castoldi M, Muckenthaler MU, Eder M, Stapel B, Thum T, Haghikia A, Petrasch-Parwez E, Drexler H, Hilfiker-Kleiner D, Scherr M. Signal transducer and activator of transcription 3-mediated regulation of miR-199a-5p links cardiomyocyte and endothelial cell function in the heart: a key role for ubiquitin-conjugating enzymes. *Eur Heart J*. 2011;32:1287–97.

200. Roy S, Khanna S, Hussain S-R a, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloproteinase-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res.* 2009;82:21–9.
201. Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, Wang D, Krall TJ, Delphin ES, Zhang C. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem.* 2009;284:29514–25.
202. Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2009;104:879–86.
203. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol.* 2008;28:5369–80.
204. Oskowitz AZ, Lu J, Penforinis P, Ylostalo J, McBride J, Flemington EK, Prockop DJ, Pochampally R. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:18372–7.
205. Akhtar N, Haqqi TM. MicroRNA-199a* regulates the expression of cyclooxygenase-2 in human chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1073–80.
206. Lin EA, Kong L, Bai X-H, Luan Y, Liu C-J. miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J Biol Chem.* 2009;284:11326–35.
207. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature.* 2012;492:376–81.
208. Gu S, Chan W-Y. Flexible and Versatile as a Chameleon-Sophisticated Functions of microRNA-199a. *Int J Mol Sci.* 2012;13:8449–66.
209. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One.* 2011;6:e16081.
210. Yang Y, Chaerkady R, Kandasamy K, Huang T-C, Selvan LDN, Dwivedi SB, Kent O a, Mendell JT, Pandey A. Identifying targets of miR-143 using a SILAC-based proteomic approach. *Mol Biosyst.* 2010;6:1873–82.
211. Jovanovic M, Reiter L, Picotti P, Lange V, Bogan E, Hirschler BA, Blenkiron C, Lehrbach NJ, Ding XC, Weiss M, Schrimpf SP, Miska EA, Grosshans H, Aebersold R, Hengartner MO. A quantitative targeted proteomics approach to validate predicted microRNA targets in *C. elegans*. *Nat Methods.* 2010;7:837–42.
212. Diao S, Zhang J, Wang H, He M, Lin MC, Chen Y, Kung H. Proteomic identification of microRNA-122a target proteins in hepatocellular carcinoma. *Proteomics.* 2010;10:3723–31.
213. Lössner C, Meier J, Warnken U, Rogers MA, Lichter P, Pscherer A, Schnölzer M. Quantitative proteomics identify novel miR-155 target proteins. *PLoS One.* 2011;6:e22146.
214. Kaller M, Liffers S-T, Oeljeklaus S, Kuhlmann K, Röh S, Hoffmann R, Warscheid B, Hermeking H. Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10:M1111.010462.

215. Mallat Y, Tritsch E, Ladouce R, Winter DL, Friguet B, Li Z, Mericskay M. Proteome modulation in H9c2 cardiac cells by miR-378 and miR-378. *Mol Cell Proteomics*. 2013;:1–39.
216. Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22:663–72.
217. Freeman AK, Morrison DK. 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22:681–7.
218. Lodish H, Berk A, Zipursky SL et al. *Molecular Cell Biology*. 4. Edition. New York: W. H. Freeman; 2000.
219. Kumagai A, Yakowec PS, Dunphy WG. 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell*. 1998;9:345–54.
220. Telles E, Hosing AS, Kundu ST, Venkatraman P, Dalal SN. A novel pocket in 14-3-3epsilon is required to mediate specific complex formation with cdc25C and to inhibit cell cycle progression upon activation of checkpoint pathways. *Exp Cell Res*. 2009;315:1448–57.
221. Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol Biol Cell*. 2001;12:551–63.
222. Rothblum-Oviatt CJ, Ryan CE, Piwnica-Worms H. 14-3-3 binding regulates catalytic activity of human Wee1 kinase. *Cell Growth Differ*. 2001;12:581–9.
223. Vigo E, Müller H, Prosperini E, Hateboer G, Cartwright P, Moroni MC, Helin K. CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*. 1999;19:6379–95.
224. Sexl V, Diehl JA, Sherr CJ, Ashmun R, Beach D, Roussel MF. A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2. *Oncogene*. 1999;18:573–82.
225. Blomberg I, Hoffmann I. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. 1999;19:6183–94.
226. Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J*. 1994;13:4302–10.
227. Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J*. 1994;13:1549–56.
228. Chen M, Ryan CE, Piwnica-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol*. 2003;23:7488–97.
229. Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*. 2011;138:9–22.
230. Schroeder MC, Halder G. Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23:803–11.
231. Chan SW, Lim CJ, Chen L, Chong YF, Huang C, Song H, Hong W. The Hippo pathway in biological control and cancer development. *J Cell Physiol*. 2011;226:928–39.
232. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai Z-C, Guan K-L. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*. 2007;21:2747–61.

233. Habbig S, Bartram MP, Müller RU, Schwarz R, Andriopoulos N, Chen S, Sägmüller JG, Hoehne M, Burst V, Liebau MC, Reinhardt HC, Benzing T, Schermer B. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J Cell Biol.* 2011;193:633–42.
234. Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszek J, Rodriguez JR, Zhou D, Kreger BT, Vasioukhin V, Avruch J, Brummelkamp TR, Camargo FD. Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell.* 2011;144:782–95.
235. Gardino AK, Yaffe MB. 14-3-3 Proteins As Signaling Integration Points for Cell Cycle Control and Apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22:688–95.
236. Kosaka Y, Cieslik KA, Li L, Lezin G, Maguire CT, Saijoh Y, Toyo-oka K, Gambello MJ, Vatta M, Wynshaw-Boris A, Baldini A, Yost HJ, Brunelli L. 14-3-3E Plays a Role in Cardiac Ventricular Compaction By Regulating the Cardiomyocyte Cell Cycle. *Mol Cell Biol.* 2012;32:5089–102.
237. Milton AH, Khaire N, Ingram L, O'Donnell AJ, La Thangue NB. 14-3-3 proteins integrate E2F activity with the DNA damage response. *EMBO J.* 2006;25:1046–57.
238. Du J, Liao W, Wang Y, Han C, Zhang Y. Inhibitory effect of 14-3-3 proteins on serum-induced proliferation of cardiac fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 2005;84:843–52.
239. Qi J-Y, Xu M, Lu Z-Z, Zhang Y-Y. 14-3-3 inhibits insulin-like growth factor-I-induced proliferation of cardiac fibroblasts via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37:296–302.
240. Rangrez AY, Kumari M, Frey N. An emerging role of microRNA miR-223 in cardiovascular pathophysiology. *microRNAs Cardiovasc Res.* 2013;1:28–32.
241. Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L, Diverio D, Ammatuna E, Cimino G, Lo-Coco F, Grignani F, Nervi C. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell.* 2007;12:457–66.
242. Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis. *Cell.* 2005;123:819–31.
243. Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, Sharif J, Hino K, Enomoto Y, Kawamura A, Nakamura K, Takeuchi T, Tanabe M. An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell.* 2007;129:617–31.
244. Vian L, Di Carlo M, Pelosi E, Fazi F, Santoro S, Cerio AM, Boe A, Rotilio V, Billi M, Racanicchi S, Testa U, Grignani F, Nervi C. Transcriptional fine-tuning of microRNA-223 levels directs lineage choice of human hematopoietic progenitors. *Cell Death Differ.* 2013;:1–2.
245. Kuchenbauer F, Mah SM, Heuser M, McPherson A, Rüschemann J, Rouhi A, Berg T, Bullinger L, Argiropoulos B, Morin RD, Lai D, Staszynski DT, Karsan A, Eaves CJ, Watahiki A, Wang Y, Aparicio SA, Ganser A, Krauter J, Döhner H, Döhner K, Marra M a, Camargo FD, Palmqvist L, Buske C, Humphries RK. Comprehensive analysis of mammalian miRNA* species and their role in myeloid cells. *Blood.* 2011;118:3350–8.
246. Zhuang G, Meng C, Guo X, Cheruku PS, Shi L, Xu H, Li H, Wang G, Evans AR, Safe S, Wu C, Zhou B. A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation.* 2012;125:2892–903.
247. Felli N, Pedini F, Romania P, Biffoni M, Morsilli O, Castelli G, Santoro S, Chicarella S, Sorrentino A, Peschle C, Marzali G. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica.* 2009;94:479–486.

248. Masaki S, Ohtsuka R, Abe Y, Muta K, Umemura T. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;364:509–14.
249. Yuan J-Y, Wang F, Yu J, Yang G-H, Liu X-L, Zhang J-W. MicroRNA-223 reversibly regulates erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Cell Mol Med.* 2009;13:4551–9.
250. Gentner B, Schira G, Giustacchini A, Amendola M, Brown BD, Ponzoni M, Naldini L. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods.* 2009;6:63–6.
251. Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, Faé KC, Schreiber J, Moura-Alves P, Nouailles G, Mollenkopf H-J, Oberbeck-Müller D, Jörg S, Heinemann E, Hahnke K, Löwe D, Del Nonno F, Goletti D, Capparelli R, Kaufmann SHE. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J Clin Invest.* 2013;:1–13.
252. Pulikkan JA, Dengler V, Peramangalam PS, Peer Zada AA, Müller-Tidow C, Bohlander SK, Tenen DG, Behre G. Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010;115:1768–78.
253. Sun L, Xie H, Mori MA, Alexander R, Yuan B, Hattangadi SM, Liu Q, Kahn CR, Lodish HF. Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol.* 2011;13:958–65.
254. Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol.* 2007;170:1831–40.
255. Greco S, Fasanaro P, Castelvechio S, D'Alessandra Y, Arcelli D, Di Donato M, Malavazos A, Capogrossi MC, Menicanti L, Martelli F. MicroRNA dysregulation in diabetic ischemic heart failure patients. *Diabetes.* 2012;61:1633–41.
256. Rangrez AY, M'Baya-Moutoula E, Metzinger-Le Meuth V, Hénaut L, Djelouat MSEI, Benchitrit J, Massy Z a, Metzinger L. Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. *PLoS One.* 2012;7:e47807.
257. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SEW, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012;336:86–90.
258. Yu X-Y, Chen J-Y, Zheng Z-W, Wu H, Li L-W, Zhang Z-W, Chen Z-H, Lin Q-X, Han Y-L, Zhong S-L. Plasma miR-126 as a potential marker predicting major adverse cardiac events in dual antiplatelet-treated patients after percutaneous coronary intervention. *EuroIntervention.* 2013;9:546–54.
259. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen J a, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:499–506.
260. Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS One.* 2012;7:e50746.
261. Shi R, Ge L, Zhou X, Ji W-J, Lu R-Y, Zhang Y-Y, Zeng S, Liu X, Zhao J-H, Zhang W-C, Jiang T-M, Li Y-M. Decreased platelet miR-223 expression is associated with high on-clopidogrel platelet reactivity. *Thromb Res.* 2013;131:508–13.

262. Zhang Y-Y, Zhou X, Ji W-J, Shi R, Lu R-Y, Li J-L, Yang G-H, Luo T, Zhang J-Q, Zhao J-H, Jiang T-M, Li Y-M. Decreased circulating microRNA-223 level predicts high on-treatment platelet reactivity in patients with troponin-negative non-ST elevation acute coronary syndrome. *J Thromb Thrombolysis*. 2013;Online-Vor.
263. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107:810–7.
264. Engelhardt S. Small RNA biomarkers come of age. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:300–3.
265. Stratz C, Nührenberg TG, Binder H, Valina CM, Trenk D, Hochholzer W, Neumann FJ, Fiebich BL. Micro-array profiling exhibits remarkable intra-individual stability of human platelet micro-RNA. *Thromb Haemost*. 2012;107:634–41.
266. Van Loo PF, Bouwman P, Ling K-W, Middendorp S, Suske G, Grosveld F, Dzierzak E, Philipsen S, Hendriks RW. Impaired hematopoiesis in mice lacking the transcription factor Sp3. *Blood*. 2003;102:858–66.
267. Krüger I, Vollmer M, Simmons DG, Simmons D, Elsässer H-P, Philipsen S, Suske G. Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: impaired erythropoiesis and severe placental defects. *Dev Dyn*. 2007;236:2235–44.
268. Hou CH, Huang J, He QY, Zhang CN, Zhang XJ, Qian RL. Involvement of Sp1/Sp3 in the activation of the GATA-1 erythroid promoter in K562 cells. *Cell Res*. 2008;18:302–10.
269. Xu Y, Sengupta T, Kukreja L, Minella AC. MicroRNA-223 regulates cyclin E activity by modulating expression of F-box and WD-40 domain protein 7. *J Biol Chem*. 2010;285:34439–46.
270. Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Kamohara H, Baba Y, Mimori K, Baba H. Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2012;106:182–8.
271. Li J, Guo Y, Liang X, Sun M, Wang G, De W, Wu W. MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138:763–74.
272. Sun G, Li H, Rossi JJ. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:239–52.
273. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13:423–33.
274. Leierseder S, Petzold T, Zhang L, Loyer X, Massberg S, Engelhardt S. MiR-223 is dispensable for platelet production and function in mice. *Thromb Haemost*. 2013;110:1–8.

10 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt möchte für die Möglichkeit danken, in seinem Institut meine Doktorarbeit anzufertigen. In unserer mehrjährigen Zusammenarbeit hat er mich immer wieder mit seinem unerschütterlichen Optimismus beeindruckt und mir dadurch über manchen Tiefpunkt hinweggeholfen. Außerdem bin ich ihm sehr dankbar dafür, dass er meine Teilnahme an Kongressen und Symposien immer aktiv unterstützt hat und mir so die Vernetzung mit anderen Forschern ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Küster danke ich sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und für die Zusammenarbeit bei Proteomanalysen, die mein Projekt entscheidend vorangebracht haben. Insbesondere möchte ich in diesem Zusammenhang auch Dr. Zhixiang Wu und Susan Kläger für die Prozessierung und massenspektrometrische Messung meiner Proben sowie ihre Hilfe bei der Auswertung der Daten danken.

Herrn Prof. Dr. Michael W. Pfaffl möchte dafür danken, dass er den Vorsitz der Prüfungskommission übernommen hat.

Ganz besonders will ich mich auch bei den heutigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe bedanken. Die Arbeitsatmosphäre in unserem Labor ist von außergewöhnlicher Hilfsbereitschaft, gegenseitiger Unterstützung und viel Spaß geprägt – und das ist erstaunlicherweise über die Jahre so geblieben, obwohl viele Kollegen dazugekommen sind oder uns verlassen haben. Dr. Xavier Loyer, mit dem ich in meiner Anfangszeit in dieser Arbeitsgruppe zusammengearbeitet habe, und den von mir betreuten Studenten Johanna Donhauser und Mikolaj Matloka danke ich ebenso wie unseren technischen Assistentinnen sehr herzlich für ihren wertvollen Beitrag zu meinen Projekten. Bei Michael Regn möchte ich mich für das Korrekturlesen des Methodenteils bedanken – sicher eine ziemlich trockene Aufgabe. Zuletzt danke ich Jayavarshni Ganesan für die Einrichtung eines Datenbanksystems zur Analyse von MicroRNA-Expressionsprofilen.

Für die gelungene Zusammenarbeit bei Blutplättchenuntersuchungen möchte ich mich vor allem bei Dr. Tobias Petzold und Prof. Dr. Steffen Massberg bedanken. Auch Dr. Lin Zhang, Manuela Thienel, Sue Chandraratn und Dr. Christian Schulz sei für wertvolle Diskussionen und technische Unterstützung gedankt. Zusätzlich bedanke ich mich bei Prof. Dirk H. Busch und Martin Skerhut für die Bestrahlung von Mäusen.

Die Durchführung der Ischämie-Reperfusionstudien wäre ohne das Labor von Univ.-Doz. Dr. Bernhard Metzler nicht möglich gewesen. Für die angenehme Kooperation bedanke ich mich auch ganz besonders bei Dr. Katrin Streil und Dr. Kerstin Bader.

Bei Prof. Dr. Dr. Thomas Thum und Dorothee Hartmann möchte ich mich für die Bestimmung von MicroRNA-Expressionsprofilen bedanken. Besondere Erwähnung verdienen hier auch Dr. Claudia Jentsch und Dr. Yassine Sassi, die an der Herstellung der Proben beteiligt waren.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Autoren von Spiegel-Online dafür, dass sie, wann immer es nötig war, für wohlverdiente Ablenkung gesorgt haben. Auch mein Volleyballverein hat eine wesentliche Rolle für die Erhaltung meiner Work-Life-Balance gespielt (allerdings weniger für die Erhaltung meiner Bandscheiben). Außerdem danke ich beiden Mensa-Bedienungen für meist akzeptable Verpflegung und der Schwabinger Fliegerbombe dafür, dass sie unser Institut stehen lassen hat.

Zuletzt will ich auch nicht vergessen, warum ich heute der bin, der ich bin, und hier meine Dissertation einreichen kann: Meine Eltern haben mich immer bedingungslos unterstützt und mir freie Wahl bei Entscheidungen über meine Zukunft gelassen. Auch meinen Freunden danke ich für die rege Anteilnahme an den Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit. Ganz besonders bedanke ich mich auch bei Verena, die immer da war, wenn ich sie gebraucht habe und mir im rechten Moment gezeigt hat, wann es an der Zeit war, einen Gang zurückzuschalten. Danke!

11 PUBLIKATIONEN

Publikationen

- Gentner B, Rouhi A, Hunger N, Boccalatte F, Plati T, Berg T, Sun S, Mah SM, Mirkovic-Hösle M, Ruschmann J, Muranyi A, **Leierseder S**, Argiropoulos B, Starczynowski DT, Karsan A, Heuser M, Hogge D, Camargo FD, Engelhardt S, Döhner H, Buske C, Jongen-Lavrencic M, Naldini L, Humphries RK, Kuchenbauer F. MicroRNA-223 promotes human myeloid differentiation and possesses rheostat-like function in acute myeloid leukemia. *Manuscript submitted*.
- Engelhardt S, **Leierseder S**. Coinciding functions for miR-145 in vascular smooth muscle and cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;65:105–7.
- **Leierseder S**, Petzold T, Zhang L, Loyer X, Massberg S, Engelhardt S. MiR-223 is dispensable for platelet production and function in mice. *Thromb Haemost*. 2013;110:1–8.
- Ganesan J, Ramanujam D, Sassi Y, Ahles A, Jentzsch C, Werfel S, **Leierseder S**, Loyer X, Giacca M, Zentilin L, Thum T, Laggerbauer B, Engelhardt S. MiR-378 Controls Cardiac Hypertrophy by Combined Repression of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Factors. *Circulation*. 2013;127:2097–106.
- Jentzsch C, **Leierseder S**, Loyer X, Floherschütz I, Sassi Y, Hartmann D, Thum T, Laggerbauer B, Engelhardt S. A phenotypic screen to identify hypertrophy-modulating microRNAs in primary cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:13–20.

Konferenzen

- Munich Heart Alliance (MHA) Summer Meeting. München, Deutschland, Juli 2013.
- 4th Meeting of the Transatlantic Network of Excellence on MicroRNAs as therapeutic targets in heart failure, Fondation Leducq. **Leierseder S**, Engelhardt S. miR-223 in the cardiovascular system (Vortrag). Amsterdam, Niederlande, September 2012.
- 2011 - Herbsttagung und Jahrestagung der Arbeitsgruppe Rhythmologie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. **Leierseder S**, Jentzsch C, Matloka M, Engelhardt S. High-throughput microscopical analysis of cardiomyocyte hypertrophy (Poster). Düsseldorf, Deutschland, Oktober 2011.
- 3rd Meeting of the Transatlantic Network of Excellence on MicroRNAs as therapeutic targets in heart failure, Fondation Leducq. **Leierseder S**, Engelhardt S. Cell type-specific expression of microRNAs in the heart (Vortrag). München, Deutschland, Juni 2012.
- Minisymposium on microRNAs in Cardiovascular Disease. Jentzsch C, **Leierseder S**, Loyer X, Hartmann D, Thum T, Laggerbauer B, Engelhardt S. Identification of pro-hypertrophic miRNAs in primary cardiomyocytes by phenotypic screening (Poster). Maastricht, Niederlande, Juni 2011.

- 2nd Meeting of the Transatlantic Network of Excellence on MicroRNAs as therapeutic targets in heart failure, Fondation Leducq. **Leierseder S**, Loyer X, Engelhardt S. Analysis of cell type specificity of cardiac miRNAs and their regulation in disease / Identification of miRNAs involved in cardiomyocyte growth control (Vortrag). Zürich, Schweiz, Oktober 2010.
- 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT). **Leierseder S**, Loyer X, Ganesan J, Ahles A, Jentsch C, & Engelhardt S. Dysregulation of cardiac fibroblast microRNAs in the failing heart (Poster). Mainz, Deutschland, März 2010.
- Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Translational Winter Research Meeting on Heart Failure. **Leierseder S**, Loyer X, Ganesan J, Ahles A, Jentsch C, & Engelhardt S. Dysregulation of cardiac fibroblast microRNAs in the failing heart (Poster). Les Diablerets, Schweiz, Januar 2010.

12 LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name Simon Johannes Leierseder
Adresse Grimmeisenstraße 19, 81927 München
Geburtsdatum und -ort 21. Mai 1983 in Bobingen

Ausbildung und berufliche Tätigkeiten

- 04/2009 – 02/2014 **Promotion** in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt
Technische Universität München, Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Thema: „Untersuchungen zur Funktion der MicroRNAs miR-199a/b-3p und miR-223 im kardiovaskulären System“
- 12/2008 – 01/2009 **Studentische Hilfskraft**
Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 09/2006 – 12/2008 **Master of Science in Biomedizin**
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Titel der Abschlussarbeit: „Role of microRNAs in different cell types of the mammalian heart“
- 09/2006 – 06/2007 **Auslandsstudium (im Rahmen des Erasmus-Programms)**
University of Leeds, Großbritannien
Projekt 1: „Live cell imaging of endothelial cells“
Projekt 2: „Investigation of cyanobacterial gliding motility“
- 10/2003 – 12/2006 **Bachelor of Science in Biomedizin**
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Titel der Abschlussarbeit: „Verification of specific proteins and mRNAs in platelet preparations – nitric oxide synthase isoenzymes“
- 06/2002 **Abitur**
Gymnasium bei St. Anna, Augsburg

Praktische Erfahrungen während des Studiums

- 08/2007 – 09/2007 **Praktikum**
Synlab (Medizinische Labordienstleistungen), Augsburg
Bakteriologische und mykologische Analyse klinischer Proben
- 02/2005 – 03/2005 **Praktikum**
Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Untersuchung eines Panels von Antikörpern gegen den Thrombozyten-Kollagenrezeptor GPVI

Zivildienst

- 08/2002 – 05/2003 Kath.-evang. Sozialstation Augsburg-Göggingen
Ambulante Hilfe für alte und erkrankte Menschen