

**Untersuchung des Zellzyklus und der
Zellzyklusvariationen von Herzmuskelzellen mit Hilfe
des doppelt transgenen Mausmodells CAG-eGFP-
Anillin/ α MHC-H2B-mCherry**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Nadine Voeltz

aus Bonn

2020

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Fleischmann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.02.2020

Aus dem Institut für Physiologie I
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Fleischmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Pathologien des Herzens	9
1.1.1 Therapieansätze der Myokardregeneration	10
1.2 Herzentwicklung und Herzwachstum	12
1.2.1 Zellzyklus und Zellzyklusvariationen	12
1.2.2 Embryonales Herzwachstum und seine Regulation	13
1.2.3 Postnatales Herzwachstum und Zellzyklusvariationen von KM	15
1.2.4 Analyse der Zellzyklusaktivität	17
1.3 Die transgenen Mausmodelle CAG-eGFP-Anillin und α MHC-H2B-mCherry	18
1.3.1 Die Mauslinie CAG-eGFP-Anillin	18
1.3.2 Die transgene Mauslinie α MHC-H2B-mCherry	19
1.4 Zellkultur von KM	21
1.5 Induktion von Zellzyklusaktivität	21
1.5.1 Degradierung von eGFP-Anillin durch das Fizzy-related Protein	21
1.5.2 Aktivierung des Zellzyklus in KM durch miR-199	22
1.5.3 Hemmung des Zellzyklus von KM durch die Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27	22
1.5.4 Hemmung der KM-Zellzyklusaktivität durch Meis1	22
1.5.5 Hemmung des Zellzyklus von KM durch Geminin	23
1.6 RNA Interferenz	23
1.7 Zielsetzung	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Software	27
2.2 Chemikalien	27
2.3 Puffer und Lösungen	28
2.4 Reagenziensätze und Verbrauchsmaterialien	28
2.5 Geräte	29
2.6 Molekularbiologische Materialien	30
2.7 Zellkulturmedien	31
2.7.1 Zusammensetzung der Zellkulturmedien	31

2.7.2	Verwendete Mauslinien	32
2.8	Immunzytochemische Materialien	32
2.8.1	Verwendete Antikörper	32
2.9	Molekularbiologische Methoden	33
2.9.1	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.9.2	Synthese von cDNA	34
2.9.3	Quantitative Echtzeit-PCR	35
2.9.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten	36
2.9.5	Isolation von mRNA aus Zellen	37
2.9.6	Überprüfung der RNA Qualität	37
2.10	Biochemische Methoden	37
2.10.1	Isolation von Protein aus Zellen	37
2.10.2	SDS-PAGE	38
2.10.3	SemiDry-Blot und Immundetektion	39
2.11	Zellbiologische Methoden	40
2.11.1	Transiente Lipofektion	40
2.11.2	Langzeitbeobachtung von Zellkulturen	41
2.11.3	Isolation und Dissoziation von postnatalen Kardiomyozyten	41
2.12	Tierexperimente	41
2.12.1	Präparation postnataler Mäuse	41
2.13	Immunzytochemische Methoden	42
2.13.1	Fixierung von Zellen	42
2.13.2	Immunhistochemische Färbungen	42
2.14	Schematische Darstellung des experimentellen Prozedere	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Optimierung der Bedingungen zur Kultur postnataler KM	44
3.2	Knockdown des Fizzy-related Protein (Fzr-1)	45
3.3	Transfektion von KM mit der miR-199	46
3.4	Knockdown von p21 in KM	52
3.5	Knockdown von p27 in KM	56
3.6	Knockdown von Meis1 in KM	58
3.7.	Knockdown von Geminin in KM	59

3.8	Untersuchung des Hippo-, Notch- und mTor-Signalweges in postnatalen KM	60
3.8.1.	Analyse der Beeinflussung des Hippo-Signalwegs in KM durch Transfektion mit miR-199, oder Knockdown von p21 und p27	60
3.8.2.	Analyse der Beeinflussung des Notch-Signalwegs in KM durch Transfektion mit miR-199, oder Knockdown von p21 und p27	61
3.8.3	Analyse der Beeinflussung des mTor-Signalwegs in KM durch Transfektion mit miR-199, oder Knockdown von p21 und p27	62
4.	Diskussion	65
4.1	Aktivierung des Zellzyklus in postnatalen KM	65
4.2	Die Rolle des Hippo-, Notch- und mTor-Signalweges in postnatalen KM	69
4.3	Die Rolle von Zellzyklusvariationen in KM	72
4.4	Screening proliferationsinduzierender Faktoren mithilfe postnataler KM von CAG-eGFP-Anillin/H2B-mCherry Mäusen	73
5.	Zusammenfassung	77
6.	Abbildungsverzeichnis	79
7.	Tabellenverzeichnis	81
8.	Literaturverzeichnis	82
9.	Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>Anaphase promoting complex</i> , Anaphase einleitender Komplex
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAG	Beta-Aktin Promotor des Huhns mit Cytomegalie-Virus Verstärker
CdK	<i>Cyclin dependant Kinase</i> , Zyklin abhängige Kinase
CdKI	<i>Cyclin dependant kinase inhibitor</i> , Zyklin abhängige Kinase Inhibitor
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C	Celsius
CT	<i>Cycle threshold</i> , Zyklus Schwellenwert
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DIC	Differenzialinterferenzkontrast
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyriboneukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	Ethynyl-desoxyuridin
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ESCs	<i>Embryonic stem cells</i> , embryonale Stammzellen
FAM	Carboxy-Fluorescein
Fc	Konstanter Teil der schweren Kette
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Fzr-1	<i>Fizzy-related Protein 1</i>
Gb	Gigabyte
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
G-Phase	<i>Gap-Phase</i> , Zwischenphase
H2B	Histon H2B
IgG	IgG Immunglobulin G
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i> , induzierte

IRES	pluripotente Stammzellen
KD	Intratribosomale-Eintrittsstelle
KM	<i>Knockdown</i>
KO	Kardiomyozyten
MEM	<i>Knockout</i>
MI	nicht essentielle Aminosäuren
miRNA	Myokardinfarkt
	<i>Micro ribonucleic acid</i> , Mikro-
	Ribonukleinsäure
m-Phase	Mitose-Phase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-
	Ribonukleinsäure
mTor	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> , Ziel
	des Rapamycins im Säugetier
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NK	Negativkontrolle
p	Signifikanzniveau
P	Postnataler Tag
p21	Zyclin-abhängiger Kinase Inhibitor p21
p27	Zyclin-abhängiger Kinase Inhibitor p27
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ,
	phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase-chain-reaction</i> ,
	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pHH3	Phospho-Histon H3
RISC	<i>RNA-induced-silencing-complex</i> , RNA
	induzierter dämpfender Komplex
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
Rt-PCR	<i>Realtime polymerase chain reaction</i> ,
	Echtzeit Polymerasekettenreaktion
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ,
	Natriumdodecylphosphat

Sek.	Sekunden
SEM	<i>Standard error of the mean,</i> Standardfehler
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
S-Phase	Synthese-Phase
Std.	Stunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Vgl.	Vergleiche
α MHC	<i>Alpha-myosin heavy chain</i>

1. Einleitung

1.1 Pathologien des Herzens

Im Zuge der alternden Gesellschaft gehen annähernd 40 % der Todesfälle in Deutschland und der westlichen Welt auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurück. Die häufigste Todesursache stellte 2016 in Deutschland laut statistischem Bundesamt die ischämische Herzerkrankung mit ca. 13,2 % aller Todesfälle dar (Myokardinfarkt: 5,3 %; chronisch ischämische Herzerkrankung: 7,9 %).

Im Falle des Myokardinfarktes kommt es infolge eines thromboembolischen Verschlusses im Bereich einer vorbestehenden Stenose der Koronararterien zu einer Ischämie des Myokards, welche, sofern der Gefäßverschluss nicht zeitnah wiedereröffnet wird, zu einer Myokardnekrose führt.

Aufgrund der mangelnden Regenerationsfähigkeit von Kardiomyozyten (KM) entsteht im Bereich der Myokardnekrose nach einem mehrstufigen Umbauprozess eine bindegewebige Narbe. Diese Narbe ist nicht in der Lage zu kontrahieren, sodass es zu einer Verschlechterung der Pumpfunktion mit daraus resultierender Herzinsuffizienz kommen kann. Des Weiteren begünstigt Narbengewebe die Ausbildung sogenannter kreisender Erregungen, welche zu lebensgefährlicher Rhythmusstörungen (ventrikuläre Tachykardien, Kammerflimmern) führen können (Stevenson, 2009).

Zwar gibt es Hinweise auf eine geringe Erneuerung von KM im adulten Herzen, welche um das 25. Lebensjahr bei ca. 1 % und um das 75. Lebensjahr bei ca. 0,45 % liegt (Bergmann et al., 2009). Dies reicht jedoch bei weitem nicht aus, um eine tatsächliche Regeneration zugrunde gegangenen Myokards zu bewirken.

Die Therapiemöglichkeiten für betroffene Patienten sind auch nach heutigem Stand der Forschung limitiert. Herzinsuffizienz und Rhythmusstörungen können zwar medikamentös behandelt werden, hierbei handelt es sich aber lediglich um symptomatische Therapien. Eine kausale Therapie der terminalen Herzinsuffizienz stellt die Herztransplantation dar. Die Herztransplantation ist durch die geringe Verfügbarkeit von Spenderherzen jedoch keine Therapieoption, die einer ausreichenden Menge an Patienten zur Verfügung steht.

Eine weitere Möglichkeit stellen sogenannte Herzunterstützungssysteme (LVAD) dar. Diese wurden ursprünglich nur zur Überbrückung der Zeit bis zur Transplantation

genutzt, mittlerweile werden jedoch ~50 % der LVAD als terminale Versorgung bei Patienten implantiert, die für eine Transplantation nicht in Frage kommen (Kirklin et al., 2017). Aufgrund zahlreicher Komplikationen (Thromboembolien, Infektionen u.a.) ist die Überlebensdauer dieser Patienten jedoch limitiert (Ontario health technology assessment series, 2016).

1.1.1 Therapieansätze der Myokardregeneration

Die limitierten Behandlungsoptionen begründen das große wissenschaftliche Interesse eine Therapie zu finden, welche die Regeneration kontraktiven Myokards ermöglicht. Im Folgenden werden die Konzepte der Zellersatztherapie und der Reaktivierung des endogenen Regenerationspotenzials des Herzens vorgestellt.

Die Transplantation von Skelettmuskelzellen in infarzierte Herzen zeigte in tierexperimentellen sowie klinischen Studien zunächst eine Verbesserung der Pumpfunktion (Suzuki et al., 2001; Steendijk et al., 2006). Hingegen konnte eine weitere klinische Studie zwar Verbesserungen in der NYHA-Klassifikation, jedoch keine eindeutige Verbesserung der linksventrikulären Funktion, sowie ein vermehrtes Auftreten tachyarrhythmischer Ereignisse nachweisen (Duckers et al., 2011). Die transplantierten Zellen behalten ihre Identität bei und fusionieren lediglich mit den vorhandenen KM. Hierbei entwickeln sie nur eine unzureichende elektromechanische Kopplung, welche auch das Auftreten tachyarrhythmischer Ereignisse erklären könnte (Reinecke et al., 2004).

Außerdem wurden aus dem Knochenmark gewonnene hämatopoetische Zellen transplantiert, welche zu einem kleinen Teil auch hämatopoetische Stammzellen beinhalten. In frühen klinischen Studien kam es nach Transplantation von Knochenmarkszellen zu einer Verbesserung der regionalen Kontraktilität des Infarktgebietes (Assmus et al., 2002; Wollert et al., 2004), neuere klinische Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen (Gyöngyösi et al., 2015; Traverse et al., 2012). Untersuchungen im Mausmodell ergaben, dass auch hier keine Transdifferenzierung zu KM stattfindet (Nygren et al., 2004).

Es wird diskutiert, dass die in einigen Studien beobachtete verbesserte Kontraktilität auf parakrine Effekte zurückzuführen ist, welche eine verbesserte Vaskularisierung bedingen (Mirotsov et al., 2011). Neben der Effektivität ist auch die Anwendungssicherheit hämatopoetischer Zellen kontrovers, da im Tierversuch unter

anderem intrakardiale Kalzifizierung der transplantierten Zellen als mögliche Komplikation nachgewiesen werden konnte (Breitbach et al., 2007).

Während Skelettmuskelzellen und Knochenmarkszellen nicht in der Lage sind zu KM zu differenzieren und somit keinen geeigneten Zellersatz für KM darstellen, sind embryonale Stammzellen (ESCs) (Thomson et al., 1998) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) (Takahashi und Yamanaka, 2006) in der Lage in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Das macht sie grundsätzlich zu einem geeigneten Zellersatz für KM im Rahmen struktureller Herzkrankheiten. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sowohl murine als auch humane ESCs in infarzierten Herzen von Säugetieren (Schafe, Meerschweinchen) anwachsen und teilweise zu reifen KM differenzieren (Ménard et al., 2005; Shiba et al., 2012), jedoch konnten die Untersuchungen keine eindeutige Verbesserung der Ejektionsfraktion zeigen (Fernandes et al., 2010). Ein weiteres Problem stellt die Bildung von Teratomen dar, welche wahrscheinlich durch die mangelhafte Elimination undifferenzierter Stammzellen bedingt ist (Kolossoff et al., 2005). Chong et al. (2014) ist es gelungen aus humanen ESCs abgeleitete KM in infarzierte Makakenherzen zu injizieren, welche im Myokard anwachsen und sich auch elektromechanisch mit den KM des Empfängers synchronisierten. Jedoch blieb auch hier eine eindeutige Verbesserung der Ejektionsfraktion aus und es traten verstärkt Arrhythmien auf, sodass der mögliche therapeutisch Einsatz von humanen ESCs kontrovers diskutiert wird (Anderson et al., 2014; Chong et al., 2014). Des Weiteren ist umstritten, ob die transplantierten Zellen langfristig in das Empfängermyokard einwachsen (Zhu et al., 2018). Nach Injektion von iPSCs, welche aus Makakenzellen gewonnen wurden, in Makakenherzen konnte eine elektromechanische Kopplung sowie eine leichtgradige Verbesserung der Ejektionsfraktion nachgewiesen werden, jedoch kam es auch hier gehäuft zu ventrikulären Tachykardien (Shiba et al., 2016).

Dem Konzept der Zelltransplantation steht die Aktivierung des endogenen Regenerationspotentials des Myokards gegenüber. Seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass Amphibien in der Lage sind Myokard nach mechanischer Verletzung des Ventrikels zu regenerieren (Rumyantsev, 1973). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass adulte Zebrafische in der Lage sind nach partieller Myokardresektion durch KM-Proliferation neues Myokard zu bilden (Poss et al., 2002). Die Quelle der neu entstehenden KM sind

hierbei präexistierende KM (Kikuchi et al., 2010). Im Vergleich dazu zeigen ähnliche Experimente an neonatalen Mäusen, dass es nach Resektion des Apex ebenfalls zur Regeneration von Myokard kommt, jedoch geht die Regenerationsfähigkeit innerhalb der ersten Lebenswoche verloren (Porrello et al., 2011). In adulten Mäusen zeigte sich nach Infarzierung des Myokards zwar ein Anstieg der DNA-Synthese, eine vollständige Zellteilung war aber nicht nachweisbar (Hesse et al., 2012). Wenngleich sich viele Arbeitsgruppen mit der Induktion des Zellzyklus in KM beschäftigen sind nach aktuellem Stand der Forschung therapeutische Konzepte, welche in residenten KM Zellteilung induzieren, in den nächsten Jahren nicht zu erwarten. Ein tiefgehendes Verständnis des Zellzyklus von KM, seiner Variationen und seiner Regulation ist für die Entwicklung regenerativer Therapien essentiell.

1.2 Herzentwicklung und Herzwachstum

1.2.1 Zellzyklus und Zellzyklusvariationen

Als Zellzyklus bezeichnet man die Prozesse, welche zur Teilung eukaryotischer Zellen führen. Der Zellzyklus gliedert sich in die M-Phase, die eigentliche Zellteilung, und die Interphase (Alberts, 2008). Die Interphase des Zellzyklus beginnt mit der G1-Phase (G=gap), welche der Synthese von Zellorganellen, Proteinen und Enzymen für die anschließende DNA-Replikation dient. Von der G1-Phase können Zellen in die G0-Phase übergehen, einem Zustand, in dem keine weitere Zellzyklusaktivität stattfindet. Weiterhin ist es möglich, dass Zellen aus der G0-Phase wieder in den Zellzyklus eintreten. Die Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CdkI) p21 und p27 sind an der Zellzykluskontrolle am Übergang von der G1- zur S-Phase beteiligt (Alberts, 2008). Das Fortschreiten des Zellzyklus in die S-Phase wird durch die Zyklin-abhängige-Kinasen-Zyklin-Komplexe, CDK4/6-Zyklin D und CDK2-Zyklin E, kontrolliert. Diese phosphorylieren und inaktivieren das Retinoblastom-Protein (RB), das in unphosphoryliertem Zustand in der G1-Phase einen Transkriptionskomplex (bestehend u.a. aus HDAC und E2F) und somit den Übergang zur S-Phase inhibiert. Die CdkIs p21 und p27 können den Übergang zur S-Phase durch Hemmung der CDK2/4/6 blockieren und werden unter anderem aktiviert, wenn Kontrollsysteme DNA-Schäden in der Zelle entdecken (Besson et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine

Herunterregulation von p21 und p27 zu vermehrtem Auftreten von Malignomen (u.a. Hauttumore und Kolonkarzinome) führt (Philipp et al., 1999; Poole et al., 2004).

In der S-Phase erfolgt die DNA Replikation, in der darauffolgenden G2-Phase hauptsächlich die Vorbereitung der Mitose durch Produktion der dafür benötigten Proteine. Die eigentliche Zellteilung lässt sich in Mitose und Zytokinese unterteilen. Die Mitose beginnt mit der Kondensation der Chromosomen (Prophase) und der Ausbildung des Spindelapparats, gefolgt von der abrupten Auflösung der Kernmembran (Prometaphase). Durch das Kinetochor binden die Chromosomen an die Mikrotubuli des Spindelapparates (Metaphase), und anschließend werden die Schwesterchromatiden zu den unterschiedlichen Polen des Spindelapparates gezogen (Anaphase). Nach Erreichen des Spindelpoles dekondensieren die Chromosomen und es bildet sich eine neue Kernmembran aus (Telophase). Diese Prozesse werden zusammenfassend als Karyokinese (Kernteilung) bezeichnet. In der anschließenden Zytokinese werden durch Bildung und Einschnürung eines kontraktiven Ringes aus F-Aktin und Myosin-2 die Tochterzellen voneinander abgeschnürt (vgl. Abb. 3A). Die endgültige Trennung der Tochterzellen wird als Abszission bezeichnet.

1.2.2 Embryonales Herzwachstum und seine Regulation

Kurz nach der Gastrulation bilden sich aus dem Seitenplattenmesoderm beidseits der Primitivrinne kardiale Progenitorzellen, welche sich zu einer halbmondförmigen Spange (cardiac crescent) verbinden. Hier lassen sich zwei Zonen - das primäre und sekundäre Herzfeld - unterscheiden. Aus Zellen des primären Herzfeldes entsteht der linke Ventrikel, aus dem sekundären bildet sich der rechte Ventrikel sowie der Ausflusstrakt. Die Atrien werden aus Zellen beider Herzfelder gebildet (Buckingham et al., 2005).

Die Enden der cardiac crescent fusionieren zum sogenannten Herzschauch (Abb. 1), welcher bereits rhythmisch kontrahiert. Der Herzschauch ist in ein paariges Atrium, Ventrikel und den Conus Arteriosus gegliedert, aus welchem sich später die Taschenklappen entwickeln. Aus dem Herzschauch bildet sich durch Faltung die S-förmige Herzschleife. Die Verbindung zwischen Atrium und Ventrikel wird durch Bildung des Atrioventrikularkanal, aus dem sich später die Segelklappen entwickeln, eingengt. Linkes und rechtes Atrium, sowie linker und rechter Ventrikel, werden jeweils durch das Einwachsen myokardialer Septen separiert. An der Ausbildung des Septums sind außerdem ektodermale Zellen der kardialen Neuralleiste beteiligt (Jiang et al., 2000).

Das humane vierkammerige Herz hat sich zum Ende der achten Schwangerschaftswoche ausgebildet. Die Entwicklung des Mausherzens ist mit der des menschlichen Herzen vergleichbar und das Herz der Maus ist ab dem 14. Entwicklungstag komplett angelegt (Krishnan et al., 2014).

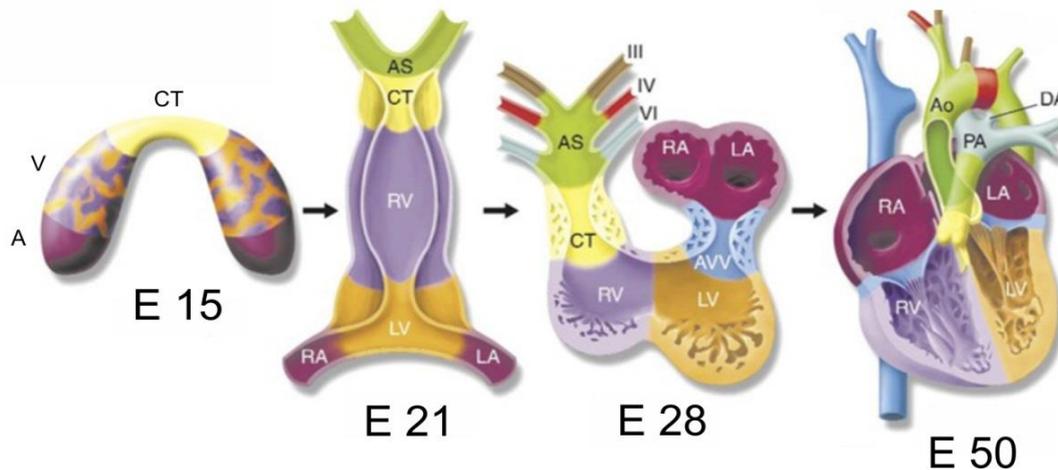


Abb. 1: Stadien der Herzentwicklung (Mensch): Aus der *cardiac crescent* entsteht zunächst der Herzschlauch. Durch unterschiedlich schnelles Wachstum der einzelnen Abschnitte entwickelt sich in der 4.-5. Woche die Herz-Schleife. In der 7. Woche werden die Ventrikel endgültig separiert. Abkürzungen: A: Atrium; V: Ventrikel; CT: Conus arteriosus; AS: Saccus aorticus RV: rechter Ventrikel; LV: linker Ventrikel; RA: rechtes Atrium; LA: linkes Atrium; AVV: Atriventrikularklappen; PA: Pulmonalarterie; Ao: Aorta; DA: Ductus Arteriosus. (Lindsey et al., 2014)

Die Ausbildung der Herzfelder wird unter anderem durch den BMP/Wnt-Signalweg gesteuert (Andersen et al., 2018), während die weitere Differenzierung der kardialen Progenitorzellen der Herzfelder durch die Transkriptionsfaktoren MESP-1, *grpp1* sowie *evx1* induziert wird (Cunningham et al., 2017).

An der Regulation der Herzentwicklung im weiteren Verlauf ist unter anderem der Notch-Signalweg, der generell die Zelldifferenzierung eukaryotischer Organismen reguliert, beteiligt (Alberts, 2008). Der zytoplasmatische Anteil des Transmembranproteins Notch kann nach proteolytischer Spaltung in der Zelle als Transkriptionsfaktor wirken. Notch ist an der Bildung der Herzkammern, Herzklappen, des kardialen Ausflusstraktes und der Koronarien beteiligt (La Pompa und Epstein, 2012). Im postnatalen Herz ist der Signalweg für die Differenzierung und physiologische Hypertrophie von KM bedeutsam (Urbanek et al., 2010).

Der „mechanistic Target of Rapamycin“ (mTor) Signalweg ist ebenfalls am Herzwachstum beteiligt. mTor ist eine Serin/Threoninkinase, die mit spezifischen Proteinen zwei verschiedene Multiprotein-Komplexe, mTorC1 mit der Effektor kinase S6 und mTorC2 mit der Effektor kinase AKT, bildet und durch verschiedene vorgeschaltete Signalwege reguliert wird (z.B. Insulin, Insulin-like Growth factor 1 und 2) (Alberts, 2008). mTorC1 reguliert unter anderem Proteinsynthese und Zellwachstum, mTorC2 scheint zusätzlich das Zellüberleben zu beeinflussen und eine Rolle in der Entstehung von Krebs zu spielen (Sciarretta et al., 2014).

Die Rolle von mTor in der Herzentwicklung wurde durch muskelspezifische Ausschaltung von mTor in der Maus untersucht (Zhang et al., 2014). Nach unauffälliger embryonaler und postnataler Periode entwickelten die Knockout-Mäuse 3 Wochen nach der Geburt eine dilatative Kardiomyopathie, die auf eine geringere Anzahl von KM als im Wildtyp zurückging, und starben innerhalb von fünf Wochen nach Geburt.

Bei der Kontrolle der Herzgröße spielt unter anderem der Hippo-Signalweg eine wichtige Rolle (Zhou et al., 2015). Dieser Signalweg führt über verschiedene Zwischenschritte zur Inaktivierung des Transkriptions-Koaktivators Yap/Taz. Im aktivierten Zustand stimuliert Yap/Taz die Transkription von Zellproliferations- und anti-apoptotischen Genen (Zhao et al., 2007). Durch Inhibition von Komponenten des Signalwegs und damit Aktivierung von Yap/Taz nahm die Herzgröße in embryonalen Mäusen durch Proliferation der Kardiomyozyten um das 2,5-fache zu und führte postnatal zum Tod. Über den Hippo-Signalweg wird außerdem der proliferationsinduzierende Wnt-Signalweg inhibiert, was ebenfalls zur Kontrolle der Organgröße beiträgt (Heallen et al., 2011).

1.2.3 Postnatales Herzwachstum und Zellzyklusvariationen von KM

Die hyperplastische Wachstumsphase des Herzens, die auf Zellteilung von KM beruht, erlischt bei Säugern kurz nach der Geburt und die hypertrophe Wachstumsphase, die durch Zunahme der Zellgröße und Zellzyklusvariationen der KM geprägt ist, beginnt (Abb. 2). 90 % der KM von Mäusen werden innerhalb von zehn Tagen nach Geburt durch unvollständige Mitose zweikernig (Soonpaa et al., 1996). Dies entspricht dem Anteil zweikerniger KM in adulten Mäusen und Ratten (Kellerman et al., 1992; Soonpaa et al., 1996). Auch beim Menschen kommt es zur Ausbildung binukleärer KM, jedoch

wird hier mit 25-63 % ein geringerer Anteil diskutiert (Brodsky et al., 1991; Olivetti et al., 1996).

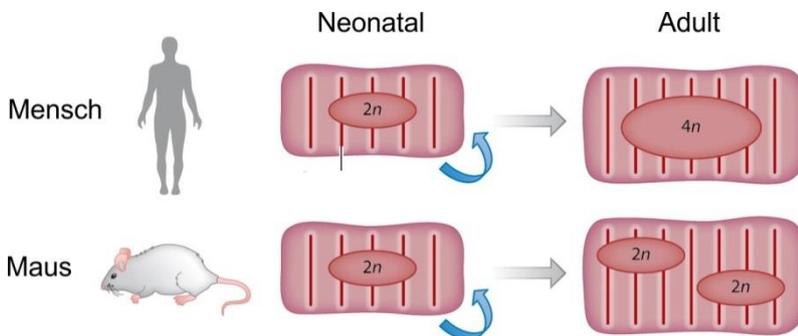


Abb. 2: Das postnatale Herzwachstum im Menschen und in der Maus. Neonatale KM sind mononukleär, weisen einen DNA-Inhalt von $2n$ auf und sind in der Lage sich zu teilen. Adulte KM verlieren die Fähigkeit zur Zellteilung und werden präferenziell polyploid (Mensch) oder binukleär (Maus) (Kikuchi et al., 2012).

Diesem Phänomen liegt die azytokinetische Mitose zugrunde. Hierbei kommt es zwar zur Karyokinese, jedoch bleibt die anschließende Zytokinese aus, wodurch eine zweikernige Zelle entsteht (Abb. 3C). Diese Zellzyklusvariation wurde bereits in KM beobachtet und geht mit der unilateralen Konstriktion des kontraktiven Ringes und einem in der Folge asymmetrischen Mittelkörper einher (Engel et al., 2006).

Zusätzlich kommt es zur Ausbildung von mononukleären KM mit gesteigertem DNA-Gehalt. Diese Variante des Zellzyklus ist im menschlichen Herz mit 66 % polyploiden KM die häufigste (Bergmann et al., 2009).

Hierbei schließt sich der G2-Phase keine Mitose an und es findet weder Karyokinese noch Zytokinese statt. G1- und G2-Phase verbinden sich zu einer Endo-G-Phase, auf welche die Endo-S-Phase folgt, sodass die Zelle mit jeder Endoreplikation ausschließlich ihren DNA-Gehalt verdoppelt (Abb. 3B). Dieses Phänomen ist aus verschiedenen Zelltypen von Tieren, Pflanzen und Pilzen bekannt und dient unter anderem dem Organwachstum (Lee et al., 2009).

Die Phänomene Endoreplikation und azytokinetische Mitose sind ebenfalls aus Hepatozyten bekannt. Annähernd 70 % der murinen (Seglen, 1997) und 40 % der humanen Hepatozyten weisen tetraploide Chromosomensätze auf, wobei

gleichermaßen binukleäre Zellen ($2 \times 2n$) sowie mononukleäre Zellen ($4n$) vorkommen (Toyoda et al., 2005).

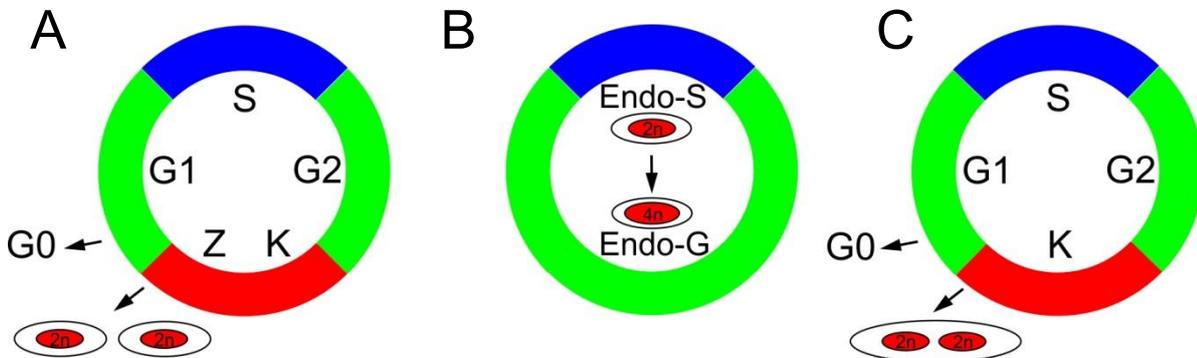


Abb. 3: Zellzyklusvariationen. (A) Zellteilung. (B) Endoreplikation. (C) azytokinetische Mitose. K: Karyokinese. Z: Zytokinese.

Im adulten Myokard der Maus konnte Zellzyklusaktivität von KM nur noch stark vereinzelt (0,0005 %) nachgewiesen werden (Soonpaa et al., 1996). Im menschlichen Herz sind bereits in der Altersgruppe der 10-20 jährigen weniger als 0,01 % Zellzyklusaktive KM detektierbar (Mollova et al., 2013). Nach Infarzierung des Myokards in der Maus konnte eine dreifache Zunahme von KM, die DNA-Synthese betreiben, in den Randzonen des Infarktareales beobachtet werden. Dies ist jedoch in erster Linie auf Endoreplikation und azytokinetische Mitose mit daraus resultierender Hypertrophie der KM, und nicht auf Zellteilung zurückzuführen (Hesse et al., 2012; Senyo et al., 2013). Auch im adulten menschlichen Herz ist eine gesteigerte Zellzyklusaktivität in den Randzonen von Infarktarealen, die auf eine gesteigerte Endoreplikation zurückgeht, nachweisbar (Meckert et al., 2005).

1.2.4 Analyse der Zellzyklusaktivität

Die genannten Variationen des Zellzyklus stellen für die Quantifizierung der Zellteilung in KM ein Problem dar, da diese häufig durch den Einsatz von kernständigen Proliferationsmarkern (Thymidin-Analoga, Ki-67, pHH3) untersucht wird. Thymidin-Analoga werden während der S-Phase als Nukleotide in die replizierende DNA eingebaut und weisen daher nur DNA-Synthese nach. Da dieser Schritt ebenfalls bei Endoreplikation und azytokinetischer Mitose stattfindet, erlaubt ihr Einsatz keine Differenzierung zwischen Zellteilung und den genannten Varianten. Eine weitere häufig

genutzte Methode der Analyse der Zellzyklusaktivität ist die Färbung des Antigens Ki-67. Das Protein Ki-67 ist während der Interphase im Zellkern, während der M-Phase auf der Oberfläche der Chromosomen lokalisiert und wird in der G₀-Phase nicht exprimiert (Li et al., 2015). Mithilfe der Färbung gegen Ki-67 lässt sich die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation ermitteln, was insbesondere in der Tumorbilogie von Bedeutung ist. Für die Analyse des Wachstumsverhaltens von KM liefert diese Färbung jedoch aufgrund der Zellzyklusvariationen keine zuverlässigen Ergebnisse.

Die immunhistochemische Färbung gegen pHH3 (phosphoryliertes Histon H3) detektiert Zellen in der M-Phase, da das Histon H3 in dieser deutlich stärker phosphoryliert ist als in der Interphase. Da es bei der Endoreplikation nicht zur M-Phase kommt, lässt sich diese durch Färbung gegen pHH3 ausschließen. Jedoch ermöglicht pHH3 keine Aussage über Erreichen und Vollendung der Zytokinese, sodass zwischen azytokinetischer Mitose und vollständiger Zellteilung nicht unterschieden werden kann.

Durch immunhistochemische Färbung der Aurora B-Kinase, eines Bestandteils des kontraktilen Rings, lässt sich eine Progression des Zellzyklus bis zur Zytokinese nachweisen, jedoch nicht ob diese vollständig durchlaufen wird. Zusätzlich sind immunhistochemische Färbungen nur an fixierten Zellen durchführbar, technisch aufwändig und bergen das Risiko von Färbeartefakten (Ang et al., 2010).

1.3 Die transgenen Mausmodelle CAG-eGFP-Anillin und α MHC-H2B-mCherry

1.3.1 Die Mauslinie CAG-eGFP-Anillin

Am physiologischen Institut I der Universität Bonn wurde zur detaillierten Analyse und *in vivo* Visualisierung von Zellzyklusaktivität (insbesondere in KM) das transgene Mausmodell CAG-eGFP-Anillin entwickelt (Hesse et al., 2012). Anillin ist ein im Tierreich konserviertes Protein, das zunächst in Drosophila-Embryonen entdeckt wurde (Miller et al., 1989). In der S- und G₂-Phase akkumuliert Anillin im Zellkern. Nach Auflösung der Kernmembran zum Ende der Prophase der Mitose ist Anillin im Zytoplasma lokalisiert. In der Anaphase trägt es durch Bindung von Aktinfilamenten im kontraktilen Ring zu dessen Stabilisierung (Field und Alberts, 1995) sowie zur Stabilisierung des Mittelkörpers in der späteren Zytokinese bei (Echard et al., 2004). In der G₁-Phase wird es durch den APC^{Cdh1}-Komplex ubiquitiniert und abgebaut (Zhao und Fang, 2005). Zellen, die den Zellzyklus verlassen haben, weisen kein Anillin-Protein mehr auf (Field

und Alberts, 1995). Beim transgenen Mausmodell CAG-eGFP-Anillin wird unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CAG Promotors ein Fusionsprotein aus eGFP (enhanced green fluorescent protein) und Anillin exprimiert. Dies ermöglicht sowohl die Expression von CAG-eGFP-Anillin im Embryonalstadium als auch in verschiedenen Gewebetypen. Die Visualisierung von CAG-eGFP-Anillin *in vivo* und *in vitro* erlaubt eine exakte Differenzierung der Unterphasen der M-Phase. Insbesondere durch die Visualisierung des kontraktilen Rings und des Mittelkörpers wird eine genauere Unterscheidung von Zellteilung und azytokinetischer Mitose ermöglicht als durch immunohistochemische Marker (Abb. 4).

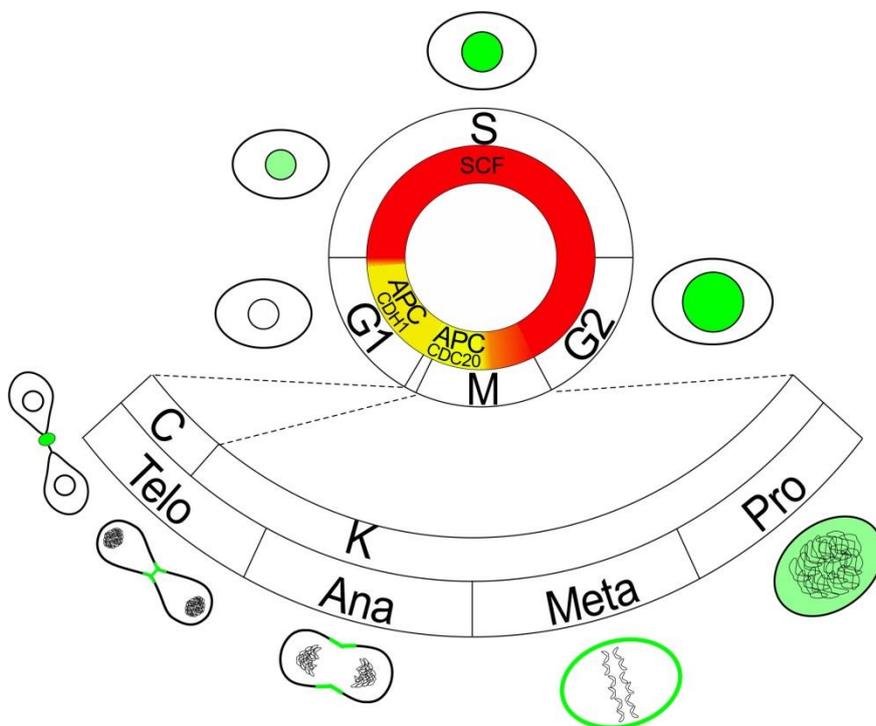


Abb. 4: CAG-eGFP-Anillin. Lokalisationen von eGFP-Anillin während des Zellzyklus. K: Karyokinese, C: Zytokinese. Hesse et al., 2012 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

1.3.2 Die transgene Mauslinie α MHC-H2B-mCherry

Die Mauslinie α MHC-H2B-mCherry (Raulf et al., 2015) erlaubt die Identifikation von KM anhand der Zellkerne ohne Immunfluoreszenzfärbung. Da nur ca. 20 % der Zellen im murinen Herz KM sind (Soonpaa et al., 1996; Raulf et al., 2015), ist eine korrekte Identifikation der KM essenziell bei der Analyse der Zellzyklusaktivität. Die Sensitivität

der Identifikation von KM-Kernen durch Färbung zytoplasmatischer Proteine in Kombination mit der Färbung durch DNA-Interkalatoren liegt unter 40 % und stellt somit eine schwerwiegende Fehlerquelle in Untersuchungen von KM dar (Ang et al., 2010). Der α MHC Promotor kodiert für die α MHC Untereinheit der schweren Kette des kardialen Myosins und ist somit spezifisch für KM. In α MHC-H2B-mCherry Mäusen wurde ein Fusionsprotein aus dem menschlichen Histon 2b und dem aus der Scheibenanemone *Discosoma* sp. stammenden Fluoreszenzprotein mCherry exprimiert. Die H2B-mCherry Sequenz wird gefolgt von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES Sequenz) und einer Puromycinresistenz kodierenden Sequenz. Durch die IRES wird eine direkte Translation des Proteins der Puromycinresistenz ermöglicht. Somit können KM in Kultur durch Puromycinbehandlung aufgereinigt werden. Die Kreuzung dieser Mauslinie mit der CAG-eGFP-Anillin Mauslinie erlaubt die sichere Identifikation von KM-Kernen bei der Analyse der Zellzyklusaktivität (Abb. 5).

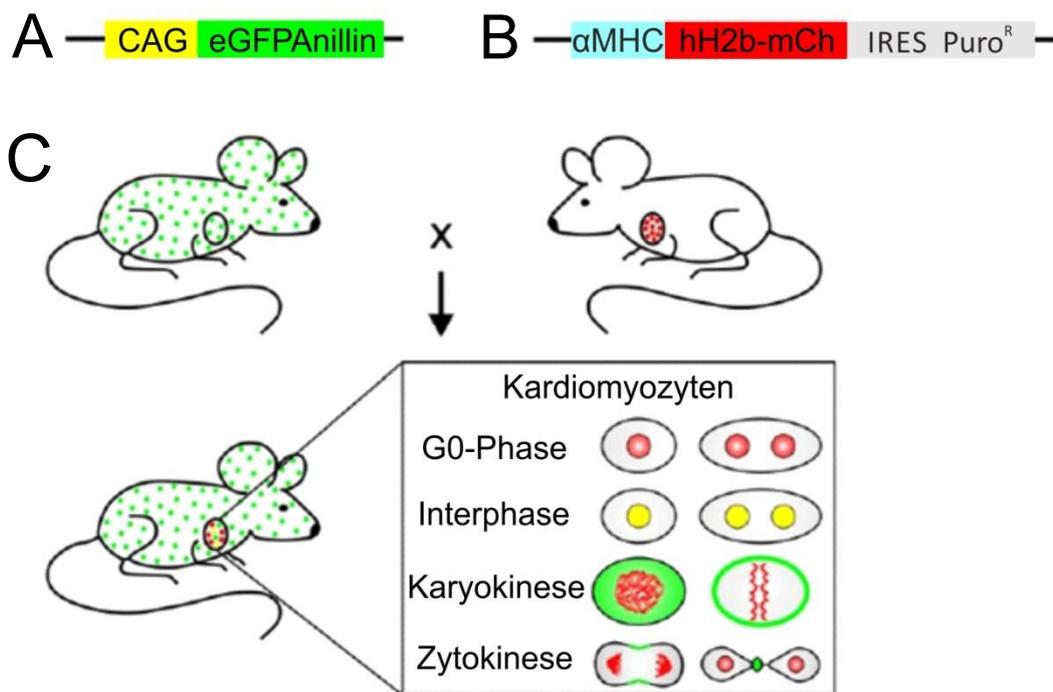


Abb. 5: Die doppelt transgene Mauslinie CAG-eGFP-Anillin- α MHC-H2B-mCherry. A: Transgen CAG-eGFP-Anillin. B: Transgen α MHC-H2B-mCherry. C: eGFP-Anillin wird in sämtlichen Zelltypen exprimiert. Die Kreuzung mit einer α MHC-H2B-mCherry-Maus erlaubt die gezielte Identifikation von KM, die zellzyklusaktiv sind. Modifiziert nach: Raulf et al., 2015 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1.4 Zellkultur von KM

Um Zellzyklusvariationen in KM adäquat untersuchen zu können sind optimale Zellzyklusbedingungen essenziell. Einige Bestandteile standardmäßig verwendeter Zellkulturmedien, wie z.B. Fötale Kälber Serum (FKS), induzieren möglicherweise selbst Zellzyklusaktivität in KM. FKS enthält für die Zellkultur benötigte Proteine, unter anderem Albumin und Wachstumsfaktoren, und wird aus dem Blut fötaler Kälber gewonnen (Arora, 2013). Die genaue Zusammensetzung von FKS variiert zwischen unterschiedlichen Chargen. Diese fehlende Standardisierung bedingt, dass FKS von verschiedenen Laboren in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet wird und somit die Vergleichbarkeit von Experimenten erschwert. Es ist seit langem bekannt, dass FKS in neonatalen KM der Ratte Hypertrophie induziert (Simpson et al., 1982). Auch in humanen, aus Stammzellen abgeleiteten KM konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (Dambrot et al., 2014). Des Weiteren induziert FKS ab einer Konzentration von 10 % auch Zweikernigkeit in postnatalen KM (Engel et al., 2006).

Zusätzlich können für die Zellkultur verschiedene Substanzen zur Beschichtung der Kulturschalen genutzt werden, die ebenfalls Einfluss auf die darauf anwachsenden Zellen haben können. Für KM werden typischerweise Fibronectin oder Gelatine benutzt. Für Fibronectin wurde die Induktion von Hypertrophie in KM der Ratte beschrieben (Ogawa et al., 2000).

1.5 Induktion von Zellzyklusaktivität

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Herunterregulation der im folgenden Abschnitt aufgelisteten Gene, sowie der Transfektion von KM mit der miR-199, Zellzyklusaktivität in KM induzieren. Der tatsächliche Nachweis von Zellteilung (siehe 1.3) gegenüber dem Auftreten der erwähnten Zellzyklusvariationen in KM wurde in diesen Studien jedoch nicht erbracht.

1.5.1 Degradierung von eGFP-Anillin durch das Fizzy-related Protein

Das Fizzy-related Protein (Fzr-1; auch: Cdh1) ist ein Kofaktor des Anaphase-promoting-complex (APC). Der APC^{Cdh1} ist eine Ubiquitin-Ligase und markiert durch Ubiquitinierung diverse Substrate für den Abbau im Proteasom. Im Rahmen der Mitose initiiert er den Übertritt von der Meta- zur Anaphase, indem er durch Ubiquitinierung verschiedener Proteine die Trennung der Schwesterchromatiden ermöglicht (Peters,

1999). Gegen Ende der Mitose und in der G1-Phase verhindert er das verfrühte Anfluten promitotischer Faktoren. Des Weiteren ist er für die Degradierung von eGFP-Anillin verantwortlich (s. 1.4.1), was eine Akkumulation der eGFP-Anillinsignale bei einem Fzr-1 Knockdown erwarten lässt. Somit könnten nukleäre eGFP-Anillinsignale näherungsweise als Kontrolle für die Transfektionseffizienz bei Transfektion eGFP-Anillin⁺ Zellen (s. 2.11) dienen.

1.5.2 Aktivierung des Zellzyklus in KM durch miR-199

In der Erforschung des Proliferationsverhaltens postnataler KM ist die miRNA 199 (miR-199) von besonderem Interesse (Lagos-Quintana et al., 2003). Die miR-199 beeinflusst unter anderem Zelldifferenzierung, embryonale Entwicklung und Zellproliferation. Ein verändertes Expressionsniveau der miR-199 lässt sich in der Genese verschiedener Tumore feststellen (Gu und Chan, 2012). Es konnten Effekte der miR-199 auf die Proliferation muriner KM nachgewiesen werden (Eulalio et al., 2012). Des Weiteren zeigte sich nach Transfektion mit der miR-199 in vitro, sowie nach Injektion der miR-199 in neonatale Herzen (P0-P1) eine gesteigerte Zellzyklusaktivität in KM. In adulten Mäusen zeigte sich nach Infarzierung des Myokards ebenfalls eine gesteigerte Zellzyklusaktivität. Welche Gene genau von der miR-199 beeinflusst werden und die Zunahme der Zellzyklusaktivität verursachen ist bisher ungeklärt.

1.5.3 Hemmung des Zellzyklus von KM durch die Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27

Die Wirkung der an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligten CdKI p21 und p27 (vgl. 1.2.1) auf Proliferation von KM wurde bereits untersucht. Während das Expressionsniveau von p21 und p27 im embryonalen, mitotisch aktivem Herzen sehr gering ist steigt es postnatal an (Ahuja et al., 2007). Nach gleichzeitiger Herunterregulation von p21 und p27 wurden vermehrt Zellen in der S-Phase und zu einem geringen Anteil auch mitotische Signale beobachtet (Di Stefano et al., 2011). Dies lässt vermuten, dass die CdKIs an der Aufrechterhaltung des postmitotischen Zustandes der KM beteiligt sind.

1.5.4 Hemmung der KM-Zellzyklusaktivität durch Meis1

Das Meis1-Gen kodiert für ein gleichnamiges Homöobox-Protein, das zu den TALE-Transkriptionsfaktoren (three amino acid loop extension) gehört und neben der

embryonalen Hämatopoese und Angiogenese (Azcroitia et al., 2005) auch an der postnatalen Herzentwicklung beteiligt ist (Mahmoud et al., 2013). Nach Herunterregulation von Meis1 mittels siRNA in neonatalen KM der Ratte (P0) wurde bei einer Restexpression von ~15 % ein dreifacher Anstieg des Mitosemarkers pHH3 beobachtet. Der Zeitraum, in dem pHH3⁺ KM detektiert werden konnten, verlängerte sich in Meis1 Knockout-Mäusen auf 14 Tage (Wildtyp: 7 Tage). In Folge dieser Ergebnisse ist Meis1 derzeit ein interessanter Gegenstand in der Erforschung des postnatalen Herzwachstums. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Meis1 die Expression des bereits beschriebenen CdKI p21 stimuliert und so zur Inhibierung des Zellzyklus in KM beitragen könnte (Mahmoud et al., 2013).

1.5.5 Hemmung des Zellzyklus von KM durch Geminin

Geminin ist ein nukleäres Protein, welches im aktiven Zustand die Endoreplikation in eukaryoten Zellen unterdrückt. In der frühen embryonalen Entwicklung können Zellen in Geminin Knockout-Mäusen ausschließlich zu endoreplizierenden polyploiden Trophoblastenzellen differenzieren (Gonzalez et al., 2006). Der Einfluss von Geminin auf Endoreplikation in KM wurde bisher nicht erforscht. Nach Herunterregulation ist jedoch das verstärkte Auftreten von Endoreplikation zu erwarten.

1.6 RNA-Interferenz

Der Begriff RNA-Interferenz beschreibt die posttranskriptionale Kontrolle von Genexpression durch kurzsträngige RNA-Moleküle, sogenannte siRNAs (si=small interfering) und miRNAs (mi=micro) und wurde erstmals im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998).

SiRNAs entstehen aus langen doppelsträngigen RNA-Molekülen (dsRNA; häufig virale RNA), die durch die RNase-Funktion des Enzyms Dicer in kurze 20-24 Basenpaare lange Segmente geschnitten werden (Alberts, 2008). Diese Segmente verfügen über ein phosphoryliertes 5'- sowie ein hydroxyliertes 3'-Ende und haben endständig je zwei überhängende Nukleotide. Im Folgenden wird die doppelsträngige siRNA in den RNA-induced-silencing-complex (RISC-Komplex) integriert und von diesem in Einzelstränge gespalten. Nach Abbau eines Stranges ist der verbleibende Strang in der Lage spezifisch eine mRNA zu binden, welche in der Folge durch ein Argonaut-Protein des RISC-Komplexes abgebaut wird (Martinez et al., 2002). Die Hauptaufgabe der durch

siRNAs vermittelten RNA-Interferenz ist die Detektion und Zerstörung parasitärer Nukleinsäuren, sowie die Hemmung der Translation von viralen Proteinen (Abb. 6A; Siomi und Siomi, 2009).

Die spezifische Bindung einer mRNA durch eine siRNA bietet eine ausgezeichnete Möglichkeit die Funktion einzelner Gene zu untersuchen. Für jedes bekannte Gen ist es möglich eine passende siRNA zu synthetisieren, die einen temporären Knockdown des gewünschten Genes bewirkt (Caplen et al., 2001). Somit kann die Rolle eines Gens deutlich einfacher untersucht werden als durch die Zeit- und kostenintensive Entwicklung von Knockout-Organismen.

Während die meisten siRNAs aus viraler RNA hervorgehen, sind die Gene für die ebenfalls regulatorischen miRNAs bei Tieren, Pflanzen und Viren Teil des Genoms. Im Gegensatz zu siRNAs beeinflussen miRNAs jeweils hunderte Transkriptionsprodukte und ungefähr ein Drittel der menschlichen Gene sind Zielgene von miRNAs (Lewis et al., 2005). Im Zellkern wird durch eine RNA-Polymerase zunächst die pri-miRNA synthetisiert, die noch im Zellkern zur pre-miRNA verkürzt wird, welche eine Haarnadelstruktur aufweist. Die pre-miRNA wird ins Zytosol exportiert und dort durch das Enzym Dicer zur endgültigen miRNA (ca. 20 Basenpaare) gespalten. Die miRNA bindet an den RISC, wo analog zur siRNA ein Strang abgebaut wird. Der verbleibende Strang ist in der Lage durch Basenpaarung mRNAs zu binden. Bei großer Übereinstimmung von miRNA und mRNA mit ausgiebiger Basenpaarung wird durch das Argonautprotein zunächst der Poly-A-Schwanz der mRNA abgetrennt und dann die mRNA abgebaut. Ist die Basenpaarung gering kommt es nicht zur Entfernung, sondern zu einer Verkürzung des Poly-A-Schwanzes. Dies destabilisiert die mRNA und hemmt die Translation. Der Abbau der mRNA erfolgt in sogenannten Processing Bodies (Abb. 6 B).

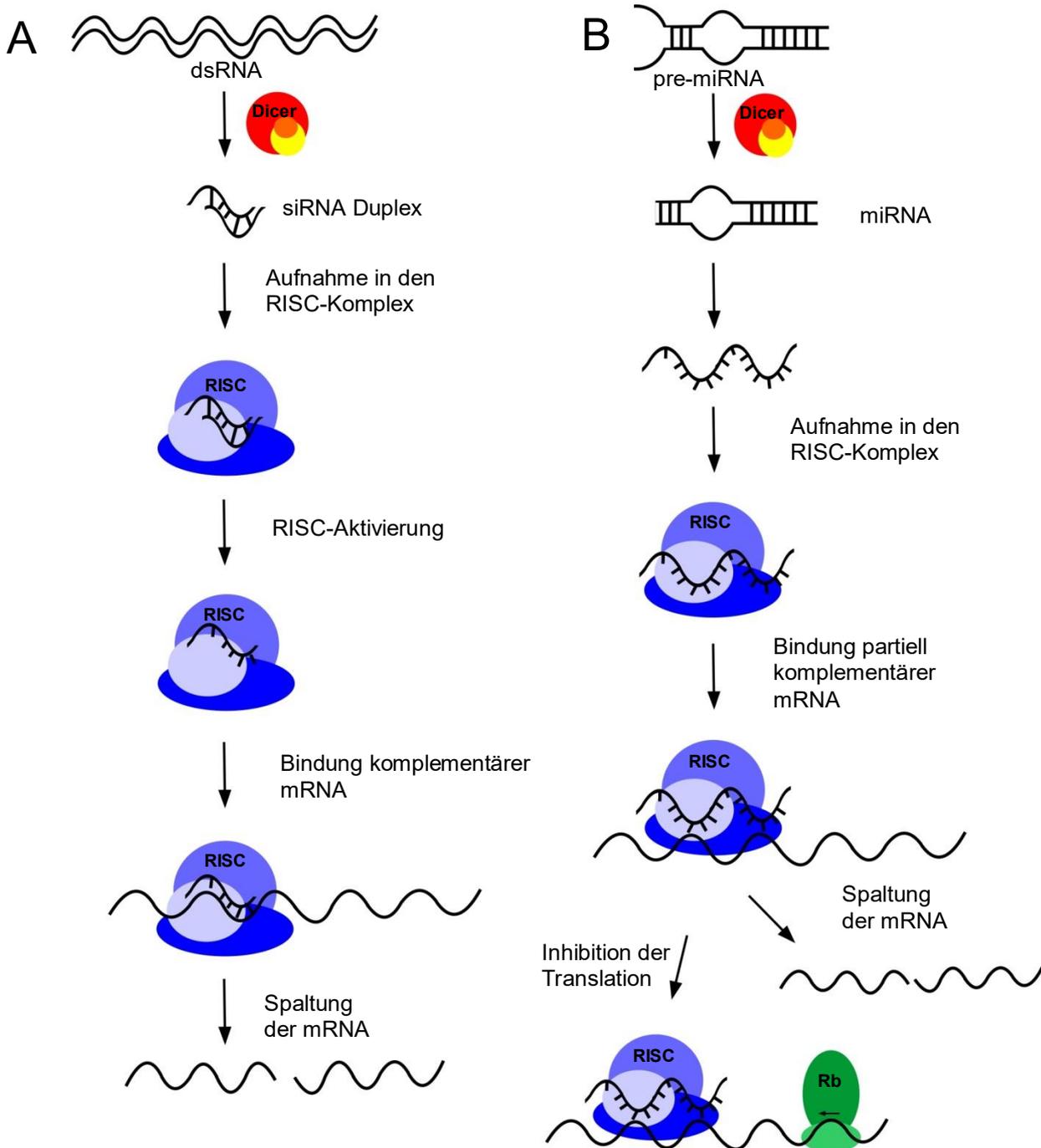


Abb. 6: Mechanismus der RNA-Interferenz. (A) Signalweg der siRNA-Interferenz. (B) Signalweg der miRNA-Interferenz. dsRNA: double-stranded RNA. RISC: RNA-induced silencing complex. Rb: Ribosom. Modifiziert nach: Dykxhoorn et al. (2003).

1.7 Zielsetzung

Eine kurative Therapie struktureller Herzerkrankungen würde darauf abzielen durch Aktivierung des endogenen Regenerationspotenzials Zellteilung in vorhandenen KM zu induzieren, auch, da die bisher erforschten exogenen Reparaturansätze nicht überzeugen konnten. Die Suche nach Substanzen, welche vollständige Zellteilung in KM induzieren, wird durch die Zellzyklusvariationen erschwert, da durch herkömmliche immunhistochemische Färbungen eine eindeutige Unterscheidung zwischen Zellteilung und azytokinetischer Mitose bzw. Endoreplikation nicht möglich ist. Daher ist ein Untersuchungsverfahren, das Endoreplikation und azytokinetischer Mitose von tatsächlicher Zellteilung unterscheidet, für diese Suche essentiell.

Ziel dieser Arbeit war es die Grundlage für ein Screeningverfahren zu entwickeln, welches die systematische Bestimmung von Faktoren, die vollständige Zellteilung in KM induzieren, ermöglicht.

Daher wurden Gene, von denen beschrieben wurde, dass sie den Zellzyklus in KM aktivieren, detailliert in Hinblick auf ihr Potenzial vollständige Zellteilung in primären KM der Maus zu induzieren untersucht. Mithilfe synthetischer siRNAs sollten die für die Regulation des Zellzyklus bedeutsamen Proteine p21, p27, Meis1, Geminin, Fzr-1, sowie die Zielproteine der miR-199 in murinen postnatalen KM (P1, P3, P5) *in vitro* herunterreguliert werden. Hierbei sollte die Verwendung des transgenen Mausmodells CAG-eGFP-Anillin/ α MHC-H2B-mCherry die exakte Identifikation von KM und die Unterscheidung der auftretenden Zellzyklusvariationen von echter Zellteilung ermöglichen. Insbesondere sollte untersucht werden ob symmetrische und asymmetrische Mittelkörper ein Unterscheidungsmerkmal von vollständiger Zellteilung und azytokinetischer Mitose darstellen. Die mikroskopische Analyse sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Diese sollte einerseits nach mehrtätiger Zellkultur, Fixierung und immunhistochemischer Färbung erfolgen, um die eGFP-Anillinsignale der Subphasen der Zellteilung sowie die Anzahl zweikerniger KM auszuwerten. Andererseits sollten mittels Langzeitmikroskopie vollständige Zellteilung und Zellzyklusvariationen anhand lebender Zellen unterschieden werden. Für diejenigen Gene, deren Knockdown in der Zellkultur Effekte auf den Zellzyklus zeigen, sollte mittels quantitativer PCR und Western Blots der Signalmechanismus in Hinblick auf die für das Wachstum des Herzens bedeutsamen Signalwege Hippo, Notch und mTor untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Software

CorelDRAW Graphics Suite X6

GraphPad Prism 5

Image Lab 5.2.1

Rotorgene-Q Series Software 1.7

NIS Elements AR 4.12.01-4.30.02-64bit

ZEN 2

Corel Corporation, München

GraphPad Software (La Jolla USA)

BioRAD, München

Qiagen (Hilden, Deutschland)

Nikon Instruments, Düsseldorf

Carl Zeiss, Jena

2.2 Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)

DNA-Ladepuffer (6x)

Esenserum

Ethidiumbromid-Lösung

Formaldehyd-Lösung (36 %)

Fibronektin-Lösung (0,1 %)

Fötale Kälberserum

Gelatine

Hoechst 33342 (1 mg/ml)

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

β -Mercaptoethanol

Magermilchpulver

Nicht essentielle Aminosäuren, MEM

dNTP Mix (jeweils 2,5 mM)

Penicillin/Streptomycin

Phosphate buffered saline (PBS)

Proteinmarker Precision Plus Dual Color

SDS (Natriumdodecylsulfat)

Sigma Aldrich, Taufkirchen

Peqlab, Erlangen

Jackson Immuno Research,
Suffolk, UK

Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim

Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim

PromoCell, Heidelberg

Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma Aldrich, Taufkirchen

Gibco/Life Technologies,
Darmstadt

Sigma-Aldrich, Steinheim

Merck, Darmstadt

Gibco/Life Technologies,
Darmstadt

Qiagen, Hilden

Gibco/Life Technologies,
Darmstadt

Sigma-Aldrich, Steinheim

BioRAD, München

Sigma-Aldrich, Steinheim

Tetramethyldiamin (TEMED)

Sigma-Aldrich, Steinheim

2.3 Puffer und Lösungen

Tab. 1: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Semidryblot-Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 20 % Methanol 0,1 % SDS pH 8,8
TBST (10x)	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl 0,5 % Tween20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl pH 6,8
SDS-Laufpuffer (10x; pH 8,8)	1,92 M Glycin 0,25 M Tris-HCl 1 % SDS
SDS-Probenpuffer (5x)	60 mM Tris-HCl 7,5 % β -Mercaptoethanol
4 % Paraformaldehyd	40 g PFA 1000 ml Reinstwasser 60 °C zum Lösen 5N NaOH zum Klären, abkühlen 2 PBS Tabletten pH 7.4 einstellen
1 μ g/ml Hoechstlösung	1 ml Hoechst 33342 (1mg/ml) 999 ml PBS

2.4 Reagenziensätze und Verbrauchsmaterialien

BCA Protein Assay Kit

Thermo Fischer Scientific,
Waltham, USA

ECL Western Blotting Analysis System

GE Healthcare Life Sciences,
Freiburg

Neonatal Heart Dissociation Kit

Miltenyi Biotech,
Bergisch Gladbach

Nitrocellulosemembran Protran BA 85	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Plastikware für die Zellkultur	Falcon, Gräfeling-Lochmann Greiner Bio-one, Frickenhausen Eppendorf, Weseling-Berzdorf Sarstedt, Nümbrecht
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
RNaseZap	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
RNeasy Micro Kit	Quiagen Hilden
Superscript VILO cDNA Synthesis Kit	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Thoma-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen

2.5 Geräte

ApoTome	Carl Zeiss, Jena
AxioCam MRm	Carl Zeiss, Jena
AxioObserver 2.1	Carl Zeiss, Jena
ChemiDoc MP Imaging System	BioRAD, München
Gelelektrophoresekammern	BioRAD, München
Horizontalschüttler	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Laser Scanning Mikroskop Eclipse Ti	Nikoninstruments, Düsseldorf
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
qPCR-Gerät, Rotor-Gene 6000	Corbett/Qiagen, Hilden
Pipetten	Gilson S.A.S., Villiers Le Bel, Frankreich
Pipettierhilfe	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Plattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz

NanoDrop 100 Spektrometer	Peqlab, Erlangen
Steril HERAsafe	Heraeus, Hanau
Thermocycler Professional	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Waage 440-45	KERN, Balingen
Vortexer	VWR, Darmstadt
Zellinkubator HERAcell 240	Heraeus, Hanau

2.6 Molekularbiologische Materialien

miRNAs:

Tab. 2: Verwendete miRNAs

miRNA	Arbeitskonzentration	Hersteller
mirVana miRNA mimic, hsa-miR-199a-3p	1 μ M	Ambion/Thermo Fischer Scientific

siRNAs:

Tab. 3: Verwendete siRNAs

siRNA	Arbeitskonzentration	Hersteller
P21	1 μ M	Ambion/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
P27	1 μ M	Ambion/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Meis1	1 μ M	Ambion/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Meis1	1 μ M	Qiagen, Hilden
Geminin	1 μ M	Ambion/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Negativkontrolle (scrambled RNA)	1 μ M	Ambion/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Fzr-1	1 μ M	Ambion/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

TaqMan Sonden

Tab. 4: TaqMan Sonden

Bezeichnung	Reporter	Hersteller
18S-RNA	VIC-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Geminin	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Meis	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
mTor	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Notch	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
P21	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
P27	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
S6-Kinase	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Salvador	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Lats 1/2	FAM-MGB	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt

2.7 Zellkulturmedien

Iscove's Modified Eagle Medium (IMDM) Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

OPTI-MEM I Reduced Serum Medium Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.7.1 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Tab. 5: Verwendete Zellkulturmedien

Medium	Zusätze
0,5/1/2/5/10/20%iges IMDM	x % FKS 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin 0,1 mM NEAA (nicht essentielle Aminosäuren) 0,1 mM β-Mercaptoethanol

2.7.2 Verwendete Mauslinien

CAG-eGFP-Anillin

Hesse et al., 2012

α MHC-H2B-mCh/CAG-eGFP-Anillin

Raulf et al., 2015

2.8 Immunzytochemische Materialien

2.8.1 Verwendete Antikörper

Tab. 6: Verwendete primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Alpha-Aktinin EA-53	Maus IgG	1:400	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ki-67	Kaninchen IgG	1:400	Abcam, Cambridge, Großbritannien
PCM-1	Kaninchen IgG	1:300	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
S6 Kinase	Maus IgG1	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phosphorylierte S6 Kinase	Kaninchen IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti- β -Aktin, Peroxidase gekoppelt	Maus IgG1	1:10000	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tab. 7: Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Fluorochrom	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Maus IgG	Cy3	Esel IgG	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Maus IgG	Cy5	Esel IgG	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Rabbit IgG	Cy5	Esel IgG	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Maus IgG	Peroxidase gekoppelt	Ziege IgG	1:10000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien

Kaninchen IgG	Peroxidase gekoppelt	Ziege IgG	1:10000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
---------------	----------------------	-----------	---------	---

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis der Transgene α MHC-H2B-mCherry und CAG-eGFP-Anillin in den verwendeten Mauslinien wurde die von Mullis et al. 1(986) erstmals beschriebene Polymerase-Chain-Reaction (PCR) verwendet. Mithilfe einer hitzebeständigen, aus dem Bakterium *Thermus Aquaticus* isolierten DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), spezifischer Primer und Nukleotiden ermöglicht die PCR die gezielte Amplifikation definierter DNA-Bereiche und somit deren spätere Detektion. Zunächst wurde DNA aus den Schwanzspitzen junger Mäuse gewonnen und mit dem Genra Purogene Mouse Tail Kit (Qiagen) aufgereinigt. Um eine größere Anzahl Proben zu untersuchen, wurde zunächst ein Mastermix aus den für die PCR benötigten Substanzen hergestellt.

Tab. 8: PCR Ansatz

Bestandteile	20 μ l Ansatz
10x Puffer mit $MgCl_2$	2,6 μ l
dNTPs (2,5 mM)	1,6 μ l
Vorwärtsprimer (10 μ M)	1 μ l
Rückwärtsprimer (10 μ M)	1 μ l
DNA	X μ l
DNA-Polymerase	0,4 μ l
Aqua dest.	Ad 20

Zunächst wird der Reaktionsansatz initial auf 95 °C erhitzt um die DNA-Doppelstränge aufzutrennen (Denaturierung). Nach dem Abkühlen auf die Anlagerungstemperatur kommt es zum Anlagern der Primer. Im folgenden Schritt kommt es nach leichter Erhöhung der Temperatur zur Synthese des komplementären Stranges durch die Taq-

Polymerase (Elongationstemperatur). Durch Erhitzen auf die Denaturierungstemperatur werden die Stränge wieder getrennt und ein weiterer Zyklus (Denaturierung, Primeranlagerung, Elongation) der Reaktion folgt.

Tab. 9: Genotypisierungs-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	45 s
Anlagerung	X °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	10 min

Genotypisierung	Anlagerungstemperatur
H2B-mCherry	63 °C
eGFP-Anillin	61 °C

2.9.2 Synthese von cDNA

Aus Gesamt-RNA wurde komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe des Reagenziensatzes „SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit“ hergestellt. Diese wurde für die quantitative Echtzeit-PCR benötigt.

Bei dieser sogenannten reversen Transkription synthetisiert das Enzym reverse Transkriptase anhand eines RNA-Strangs einen komplementären cDNA-Strang. Der RNA-Strang wird anschließend durch das Enzym RnaseH abgebaut und mithilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase der cDNA-Doppelstrang synthetisiert.

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 4 µl 5 x Reaktionsmix
- 2 µl 10 x Enzymmix
- X µl Gesamt-RNA (2 µg)

Ad 20 µl mit DEPC-Wasser

Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42 °C für 60 min. Durch fünfminütige Hitzeinaktivierung bei 85 °C und Abkühlung auf 4 °C wurde die Reaktion beendet.

2.9.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde angewandt, um durch Bestimmung der mRNA-Menge den Knockdown einzelner Gene nach siRNA-Transfektion zu quantifizieren sowie um den Einfluss der herunterregulierten Gene auf verschiedene proliferationsregulierende Signalwege zu bestimmen.

Die quantitative PCR basiert auf dem Prinzip der normalen PCR, ermöglicht aber zusätzlich über Fluoreszenzintensitätsmessungen eine Quantifizierung der DNA-Menge in Echtzeit. Es wurden TaqMan-Sonden verwendet, die auf dem Prinzip der FRET Technik (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) basieren (Förster, 1948). Die TaqMan Probe enthält spezifische 3'- und 5'-Primer für das zu amplifizierende Zielgen, sowie eine Oligonukleotidsequenz (Sonde), die spezifisch mit dem Zielgen hybridisiert. An dieses Oligonukleotid ist am 5'-Ende ein fluoreszenter Donor und am 3'-Ende ein Akzeptor gekoppelt. Die vom Donor ausgehende Fluoreszenz wird bedingt durch die geringe Distanz zum Akzeptor von diesem absorbiert und es wird kein Licht emittiert. Synthetisiert nun während der PCR-Reaktion die Taq-Polymerase einen Tochterstrang, wird die Sonde durch die 5'-Exonuklease Funktion der Polymerase degradiert. Da so die Nähe von Reporter und Quencher nicht mehr gegeben ist, kommt es zur Emission von Fluoreszenzlicht, das detektiert werden kann. Über die Intensität der gemessenen Fluoreszenz lässt sich in der exponentiellen Phase der qPCR auf die Menge der vorhandenen cDNA, bzw. mRNA schließen. Es wurden TaqMan Sonden verwendet, die an den Reporter Carboxyfluorescein (FAM) gekoppelt sind und im grünen Kanal detektiert werden. Da die Ausgangsmengen an cDNA in unterschiedlichen Experimenten variieren, erfolgte keine absolute, sondern eine relative Quantifizierung. Hierbei wird die mRNA-Menge in Relation zu einem weiteren Gen-Transkript (meist eines sogenannten „Housekeeping-Genes“) angegeben. In den vorliegenden Experimenten wurde eine VIC gekoppelte 18s RNA-Sonde verwendet. Diese wurde im gelben Kanal detektiert.

Es wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Tab. 10: qPCR-Ansatz

Bestandteile	Volumen
TaqMan Master Mix	10 µl
cDNA	1 µl
TaqMan Sonde	1 µl
18s RNA-Sonde	1 µl
Wasser	7 µl

Auf eine 10-minütige Denaturierungsphase folgten 50 Zyklen mit jeweils 10 s bei 95 °C und 60 s bei 60 °C. Jede cDNA wurde als Triplikat gemessen. Um die unterschiedlichen PCR Durchläufe vergleichen zu können, wurde in der Analyse immer der gleiche Schwellenwert (Cycle Threshold; Ct) gesetzt (0,3).

Die relative mRNA Menge der untersuchten Gene wurde folgendermaßen bestimmt:

1. Im Rahmen der Signalweg Analysen: $\text{Relative mRNA Menge} = 2^{-(\text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(18\text{s}))}$.
2. Im Rahmen der Knockdown Analysen: $2^{-((\text{Ct}(\text{Knockdown}) - \text{Ct}(18\text{s})) - (\text{Ct}(\text{Negativkontrolle}) - \text{Ct}(18\text{s})))}$.

2.9.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

Die in der PCR amplifizierten Zielsequenzen genomischer DNA wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Agarose-Gele bilden ein dreidimensionales, engmaschiges Netz aus, durch das geladene DNA-Moleküle bei angelegter Spannung je nach Größe unterschiedlich weit wandern. DNA-Moleküle sind durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen und wandern somit in einem elektrischen Feld zur Anode (Pluspol). Es entstehen charakteristische Banden aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Längen im Gel.

Es wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Die benötigte Agarose wurde mit 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und danach mit dem Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 µl / 10ml) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA. Durch die damit einhergehende Änderung seines Absorptionsspektrums entsteht bei Anregung mit ultra-violettem Licht eine gesteigerte Fluoreszenzemission (Waring, 1965). Somit können DNA-Banden sichtbar gemacht werden.

Die Agaroselösung wurde zum Aushärten in eine Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Dieser hinterlässt nach dem Entfernen Taschen für das Einfüllen der Proben im Gel. Anschließend wurde das Gel in eine mit 1 x TAE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die Elektrophorese mit einer Spannung von 90 V durchgeführt.

2.9.5 Isolation von mRNA aus Zellen

Um die Einflüsse verschiedener Knockdowns von Zellzyklusregulatoren auf den Hippo-, Notch- und mTor-Signalweg zu untersuchen, wurden qPCRs mit den verschiedenen transfizierten KM durchgeführt.

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und dann pro Loch 15 µl Trypsin zugegeben, um die Zellen von der Oberfläche zu lösen. Nach fünf-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 85 µl 20 % IMDM Medium hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen und das Zelllysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es wurde 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in RLT Puffer resuspendiert. Die weitere RNA Isolation wurde mithilfe des RNeasy Micro Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.9.6 Überprüfung der RNA Qualität

Um eine einheitliche Qualität der in der qPCR analysierten RNA zu gewährleisten, wurde die Qualität der RNA mithilfe des BioAnalyzers 2100 nach Herstellerangaben bestimmt. Der BioAnalyzer ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung der RNA in Microchips und bestimmt die sogenannte RNA-integrity-number (RIN) anhand der ribosomalen RNA Banden. Nur Proben, die eine RIN > 6 aufwiesen, wurden für die qPCR verwendet.

2.10 Biochemische Methoden

2.10.1 Isolation von Protein aus Zellen

Um die Einflüsse verschiedener RNAs auf den Hippo-, Notch- und mTor-Signalweg genauer zu untersuchen wurden Western Blots (erstmalig 1980 von Burnette beschrieben) mit Protein aus den durchgeführten Transfektionen durchgeführt. Beim Western Blot werden die zu untersuchenden Proteine zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose Membran übertragen und durch Bindung von

spezifischen chemilumineszenten Antikörpern sichtbar gemacht. Um eine für den Western Blot ausreichende Menge an Protein zu erzielen, wurden die Transfektionen statt im 96-Loch Format (10.000 Zellen in 140 µl) im 24-Loch Format (150.000 Zellen in 2100 µl) durchgeführt. Für die Protein-Isolation wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 50 µl RIPA Puffer, sowie Proteaseinhibitoren (1:25) und Phosphataseinhibitoren (1:100) versetzt und dadurch lysiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und 10 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des *BCA Protein Assays* (ThermoFisher) nach Herstellerangaben bestimmt. Die einzelnen Probenvolumina wurden so gewählt, dass die Proteinmenge identisch war.

2.10.2 SDS-PAGE

Die Proteinfragmente wurden zunächst durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierbei erfolgt zunächst die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel, bevor sie im Trenngel entsprechend ihrer Größe separiert werden. Die benötigten Gele wurden mit folgender Zusammensetzung gegossen:

Tab. 11: Zusammensetzung Trenngel

Bestandteile Trenngel	Zusammensetzung
Tris HCl 1,5 M, pH: 8,8	1 ml
SDS 20 %	160 µl
Acrylamat 40 %	1 ml
H ₂ O	1,84 ml
TEMED	2,5 µl
ABS 10 %	40 µl

Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und vor dem Aushärten mit einem Probenkamm versehen.

Tab. 12: Zusammensetzung Sammelgel

Sammelgel	Zusammensetzung
Tris HCl 1,5 M, pH: 6,8	0,5
SDS 20 %	80 µl
Acrylamid 40 %	200 µl
H ₂ O	1,22 ml
TEMED	2,5 µl
ABS 10 %	20 µl

Es wurden jeweils 10 µg Protein 5 min bei 95 °C denaturiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und in die Probestaschen des Sammelgels gegeben. Die Gelelektrophorese wurde 20 min bei 80 V und 60 min bei 120 V durchgeführt. Um die Größe der Proteinfragmente anschließend beurteilen zu können, wurde ebenfalls eine „Proteinleiter“ mit Fragmenten bekannter Größe (10 kD-250 kD) aufgetragen.

2.10.3 SemiDry-Blot und Immundetektion

Um die Proteine auf die Nitrozellulose-Membran zu übertragen, wurde das SemiDry Blot Verfahren benutzt. Der Blot setzte sich zusammen aus Filterpapier, der Membran, dem Gel und einer weiteren Lage Filterpapier. Hierbei wandern die im Polyacrylamidgel befindlichen negativ geladenen Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung, die senkrecht zum Gel verläuft, Richtung Anode aus dem Gel heraus auf die Membran. Der Proteintransfer wurde über 30 min bei 12 V durchgeführt.

Um zu verhindern, dass weitere Antikörper unspezifisch an freie Bindungsstellen der Membran binden, wurde die Membran mit 5 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur für 30 min blockiert. Der Erstantikörper wurde auf die Membran gegeben und diese nach Inkubation über Nacht dreimalig mit 1x TBST Puffer gewaschen und für eine Stunde mit dem an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper inkubiert.

Der Proteinnachweis erfolgte durch den Nachweis der Peroxidase-Aktivität. Die Membran wurde mit ECL-Entwicklerlösung nach Herstellerangaben inkubiert und die

Chemilumineszenz mithilfe des *ChemiDoc MP Imaging System* aufgenommen. Es wurde die relative Proteinmenge gemessen, indem auf das Haushaltsgen β -Aktin normalisiert wurde.

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Transiente Lipofektion

Postnatale Kardiomyozyten wurden nach dem Prinzip der Lipofektion mithilfe des Transfektionsreagens RNAiMAX mit verschiedenen miRNAs und siRNAs transfiziert, um deren Wirkung auf die Proliferation zu untersuchen. Bei der Lipofektion wird die in eine Zelle einzubringende Nukleinsäure in ein Vesikel aus kationischen Lipiden (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) eingeschlossen, welches die Zellmembran überwinden kann (Felgner et al., 1987). Das in normalem Differenzierungsmedium enthaltende Serum enthält Proteine, die die Lipofektion stören können. Daher wurde die Lipofektion in Serum reduziertem Opti-MEM Medium durchgeführt. Des Weiteren wurden alle Arbeitsgegenstände vorab zur Entfernung von RNAsen mit RNAZap gereinigt und die Transfektion auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die siRNAs mit OPTI-MEM auf 1 μ M verdünnt. Für die Transfektion auf 96-Loch Platten (10000 Zellen) wurden die siRNAs ein weiteres Mal auf 50 nM verdünnt (pro Loch 4 μ l eines 1 μ M Stocks und 6 μ l Opti-Mem). Pro Loch wurden 10 μ l RNA Mix pipettiert. Es wurde ein Mastermix für den Transfektionsansatz aus OPTI-MEM und RNAiMAX hergestellt und die Mengen so gewählt, dass pro Loch 0,6 μ l RNAiMAX und 9,4 μ l OPTI-MEM pipettiert werden. Die siRNA und der Transfektionsansatz wurden 1:1 zusammengegeben, 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 20 μ l in jedes Loch pipettiert. Für die folgenden 48 h wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert, worauf ein Medienwechsel erfolgte, der die Transfektion beendete. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen fixiert oder für Präparation der mRNA oder Proteinanalysen benutzt.

Um eine ausreichend große Menge Protein für Proteinanalysen durch Western Blot zu gewinnen wurden die jeweiligen Transfektionen im 24-Loch Format durchgeführt. Hierzu wurden 150 μ l des 50 nM RNA Mixes sowie 150 μ l des Transfektionsansatzes (141 μ l Opti-Mem + 9 μ l RNAiMax) verwendet.

2.11.2 Langzeitbeobachtung von Zellkulturen

Mithilfe des Zeiss AxioObserver 2.1 Mikroskops wurden nach 48 h Zellkultur in einer Inkubationskammer Langzeitaufnahmen von transgenen KM bei 5 % CO₂ Gehalt und 37 °C durchgeführt. Hierbei wurden über 12 h alle 6-8 min 8-10 Aufnahmen in unterschiedlichen Z-Ebenen von ausgewählten KM mit eGFP-Anillin⁺ Zellkernen angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit der Zen 2 Software.

2.11.3 Isolation und Dissoziation von postnatalen Kardiomyozyten

Zunächst wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops die für die Untersuchung benötigten, doppelt transgenen Herzen (CAG-eGFP-Anillin/ α MHC-H2B-mCherry) identifiziert. Anschließend folgte die Dissoziation mithilfe des „Neonatal Heart Dissociation“ Kits. Nach Entfernung von Geweberesten, der großen Gefäße und der Atrien der Herzen wurden zwei Enzymmische wie folgt hergestellt.

Tab. 13: Ansatz der Enzymmische

Enzymmix 1		Enzymmix 2		
Enzym P	Enzym X	Enzym Y	Enzym A	Enzym D
62,5 μ l	2300 μ l	25 μ l	12,5 μ l	100 μ l

Mix 1 wurde 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit Mix 2 in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß zusammengegeben. Die postnatalen Herzen wurden hinzugefügt und mithilfe einer Schere so weit wie möglich zerkleinert. Die Zell-Suspension wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert und alle 15 min mithilfe einer 5 ml Pipette durchmischt. Nach 45 min wurde die enzymatische Reaktion mit 20 % IMDM Medium gestoppt und die Suspension durch ein 70 μ m Sieb gefiltert, um größere Gewebebestandteile zu beseitigen. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 600 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 μ l 2%igem IMDM-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Thoma Zählkammer bestimmt. Pro Loch (96 Loch Platte) wurden 10.000 Zellen in 120 μ l Medium ausgesät.

2.12 Tierexperimente

2.12.1 Präparation postnataler Mäuse

Postnatale Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Mithilfe einer Schere wurde die Haut in der Linie des Diaphragmas sowie des Sternums durchtrennt. Nach Eröffnen des

Thorax mit einer Schere wurden die Herzen mit einer Pinzette entnommen und in eiskaltes PBS gegeben.

2.13 Immunzytochemische Methoden

2.13.1 Fixierung von Zellen

Die Fixierung von Zellen erfolgte durch 4%ige Formaldehydlösung. Bei der Fixierung mit Formaldehyd kommt es zu Quervernetzungen von Proteinen. Da es nicht zu einer Veränderung der Morphologie der Zellen oder Fluoreszenzproteine kommt eignet sich diese Methode, um die Zellen anschließend immunhistochemisch zu färben und mikroskopisch zu untersuchen. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 45 min mit 4 % Formaldehydlösung bedeckt um sie zu fixieren. Das Formaldehyd wurde abpipettiert, die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS bedeckt bei 4 °C aufbewahrt oder immunhistochemisch gefärbt.

2.13.2 Immunhistochemische Färbungen

Es wurden immunhistochemische Färbungen zur Beurteilung der Zellmorphologie, Zellidentität sowie der Zellteilungsaktivität durchgeführt. Hierbei bindet ein Antikörper (Erstantikörper) spezifisch an ein Protein (Epitop) und bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex aus. In einem zweiten Schritt bindet ein mit einem Fluoreszenzprotein gekoppelter Antikörper (Zweitantikörper) an den Fc-Abschnitt des Erstantikörpers, wodurch eine Detektion des Proteins mit dem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht wird. Um diese Reaktion zu ermöglichen, müssen Erst- und Zweitantikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen (z.B. Maus und Ratte). Der primäre Antikörper wurde in 0,2 % Triton-Lösung mit 5 % Eseserum verdünnt. Nach mindestens 2h Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde der Antikörper entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Der Zweitantikörper wurde in einer Lösung aus PBS und Hoechst-Farbstoff verdünnt und für mindestens 1 h bei RT unter Schutz vor Licht inkubiert. Der Hoechst Farbstoff ist ein DNA-Interkalator und ermöglicht so die Anfärbung sämtlicher Zellkerne. Zur Quantifizierung der Effekte der siRNAs wurden mithilfe eines konfokalen Lasermikroskops Übersichtsaufnahmen mit einem 20 x Luftobjektiv angefertigt. Es wurden Laser mit folgenden Wellenlängen benutzt: 403,7

nm, 488 nm, 543 nm/562 nm, 642,1 nm. Die Auswertung erfolgte mit der „NIS Elements AR 4.12.01 64 bit“ Software.

2.14 Schematische Darstellung des experimentellen Prozedere

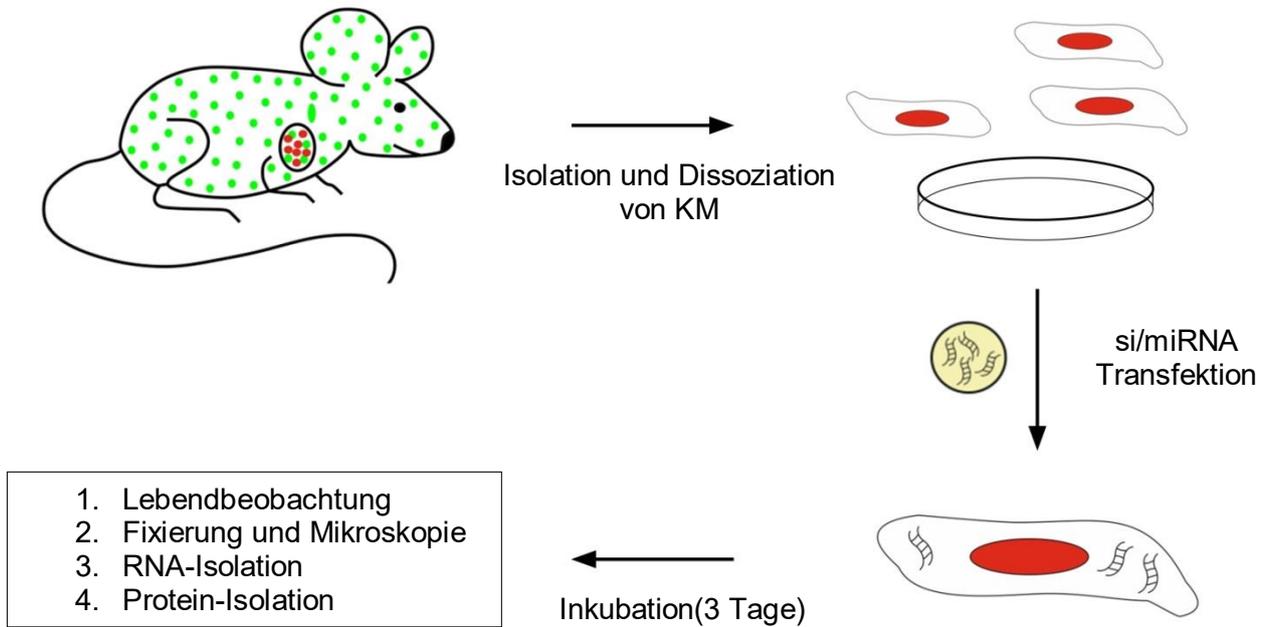


Abb. 7: Schematische Darstellung des experimentellen Prozedere

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der Bedingungen zur Kultur postnataler KM

Zunächst wurden Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von KM bei unterschiedlichen Zellkulturbedingungen durchgeführt. Herzen von α MHC-H2B-mCherry doppelt-transgenen Mäusen wurden am postnatalen Tag zwei (P2) entnommen, dissoziiert und die gewonnene Zellsuspension mit FKS Konzentrationen zwischen 0,5 % und 20 % auf mit Gelatine oder mit Fibronectin beschichteten Gewebekulturschalen ausgesät, um zu testen, ob diese Adhäsionsfaktoren in murinen KM Hypertrophie induzieren. An den folgenden drei Tagen wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt und die Zellen am dritten Tag fixiert. Zur genauen Identifikation der KM wurden immunhistochemische Färbungen mit Hoechst und Antikörpern gegen α -Aktinin durchgeführt und unter Fluoreszenzlicht aufgenommen. Es ließ sich durch Ausmessen der Zellfläche anhand der α -Aktininfärbung eine Zunahme der Zellgröße der auf Fibronectin kultivierten KM gegenüber den auf Gelatine kultivierten KM bei den FKS Konzentrationen 2 %, 5 % und 10 % nachweisen (Abb. 8 A-C), was darauf hinweist, dass Fibronectin Hypertrophie in KM induziert. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Induktion von Hypertrophie zu vermeiden wurden die neonatalen KM bei allen weiteren Experimenten auf Gelatine kultiviert.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der FKS-Konzentration des Kulturmediums auf KM untersucht, indem diese in IMDM Medium mit den FKS Konzentrationen 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, und 20 % ausgesät wurden. Die höchste Zunahme von KM-Kernen ließ sich in den Lebend-Aufnahmen der Zellen nach drei Tagen bei 2 % FKS feststellen (Abb. 8D). Da dies auf optimale Wachstumsbedingungen für KM bei 2 % FKS schließen lässt wurde diese Konzentration für alle weiteren Experimente gewählt.

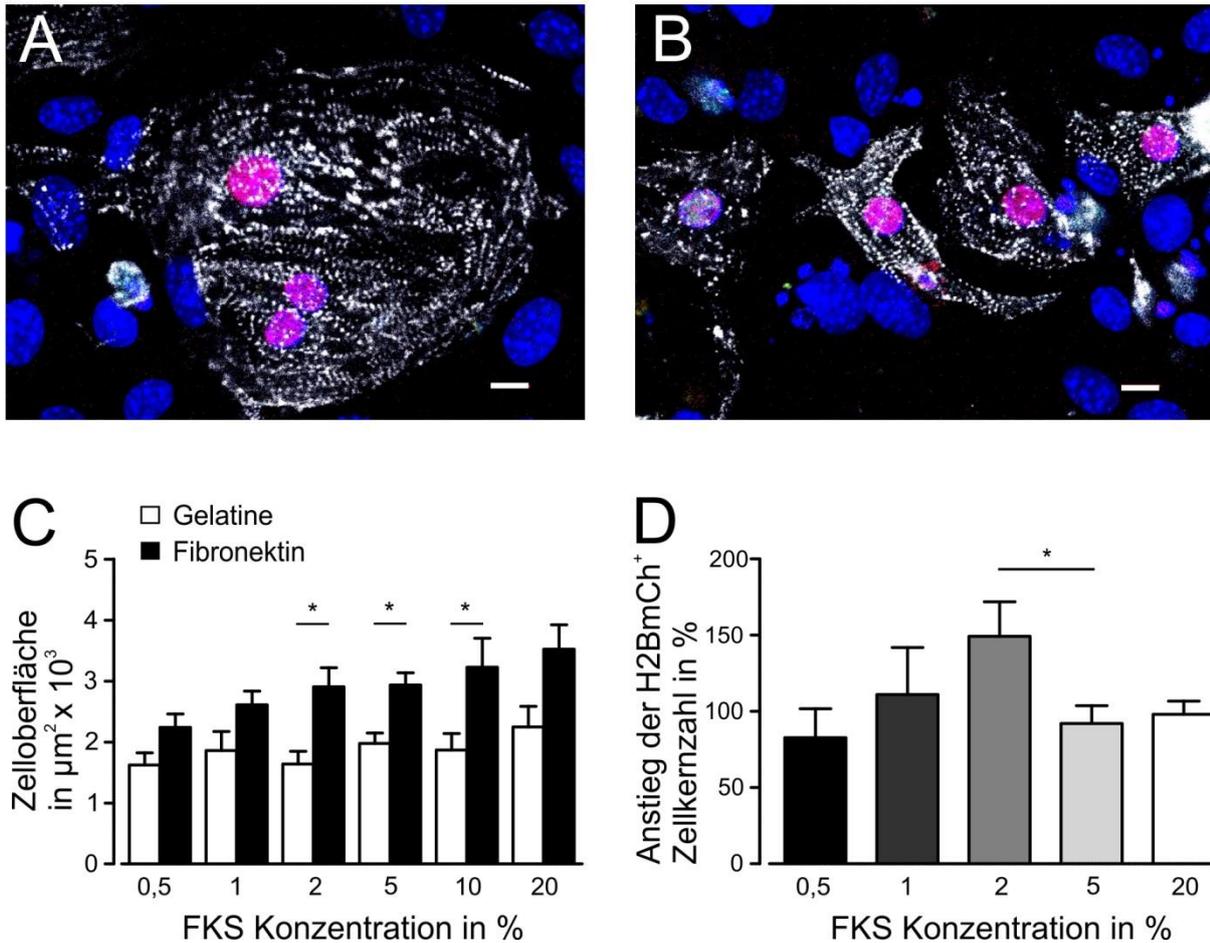


Abb. 8: Einfluss der Beschichtung der Kulturplatte und der FKS-Konzentration auf die Kultur postnater KM. Auf Fibronektin (A) und auf Gelatine (B) kultivierte KM. Maßstabsbalken: 10 μm . (C) Zellgröße von KM (P2) in Abhängigkeit von FKS Konzentration und des Beschichtungsmediums. T-test. $^* = p < 0,05$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $n = 6$. (D) Relative Zunahme der KM-Kernzahl nach Kultivierung in Medien mit unterschiedlicher FKS Konzentration. Mittelwert \pm SEM. T-test. $^* = p < 0,05$. $n = 3$.

3.2 Knockdown des Fizzy-related Protein (Fzr-1)

Nach Transfektion von KM (P3) mit einer siRNA gegen Fzr-1 wurden $39,78 \pm 13,56$ % eGFP-Anillin⁺ KM gezählt. Da Fzr-1 als Kofaktor des APC an der Degradierung des Proteins Anillin beteiligt ist, können die eGFP-Anillinsignale nicht als Marker für Zellzyklusaktivität genutzt werden. Durch Färbung gegen Ki-67 wurde überprüft (Abb. 9 A/B), ob es sich um Zellzyklusaktivität oder Akkumulation von eGFP-Anillin handelt. Nur ein verschwindend geringer Anteil der eGFP-Anillin⁺ KM war auch Ki-67⁺ ($1,32 \pm$

0,76%). Das vermehrte Auftreten von eGFP-Anillinsignalen geht auf Akkumulation von Anillin durch Inaktivierung des APC^{Fzr-1} in der G1-Phase des Zellzyklus zurück. Die Anzahl eGFP-Anillin⁺ KM nach Fzr-1 Knockdown lässt sich somit zur Kontrolle der Transfektionseffizienz nutzen.

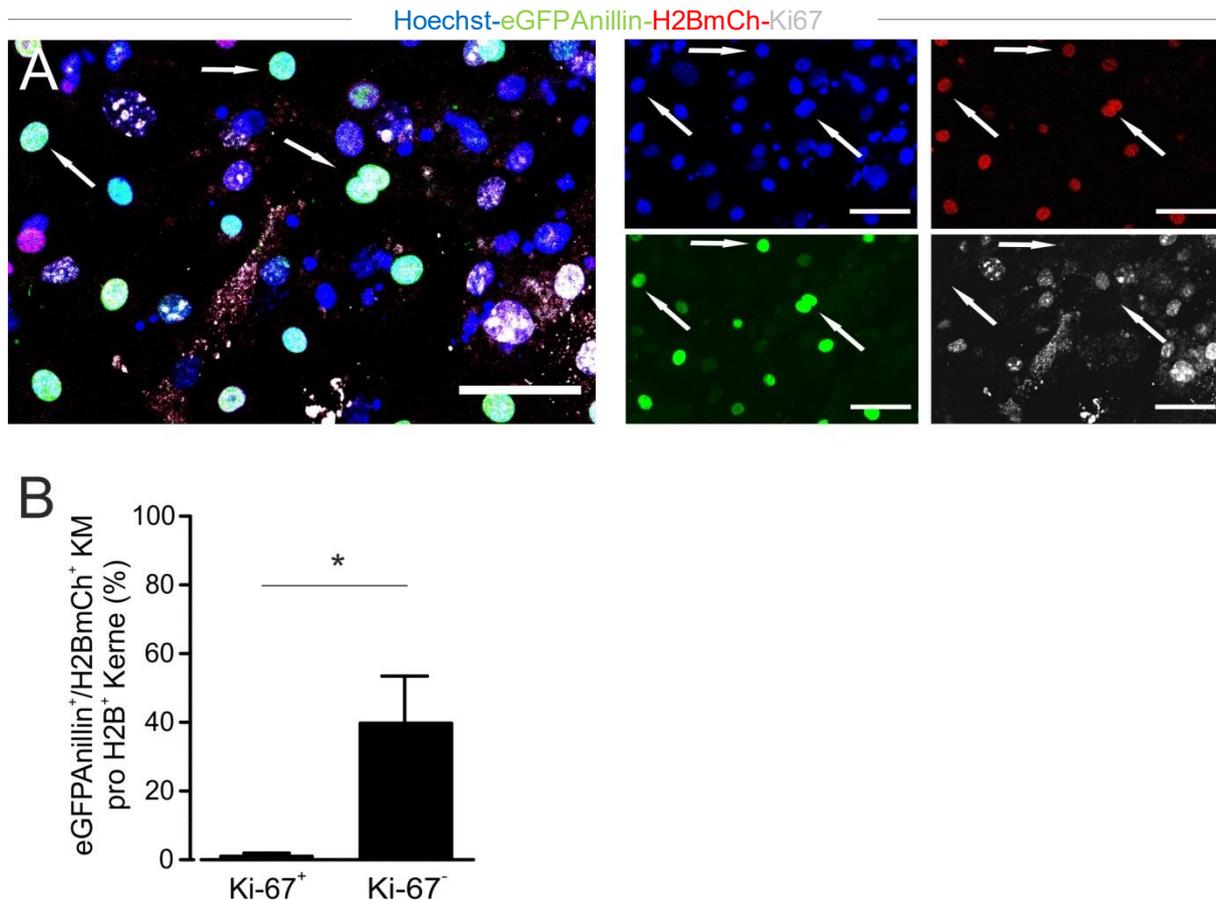


Abb. 9: Fzr-1-related Protein. (A) eGFP-Anillinsignale nach Fzr-1 Knockdown. Pfeile: eGFP-Anillin⁺/Ki-67⁻ KM. Maßstabsbalken: 50 μ m (B) eGFP-Anillin⁺ KM, aufgeteilt in Ki-67^{+/-} (Anzahl analysierter Zellen: 185). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. T-Test. $p < 0,05$. $n = 3$.

3.3 Transfektion von KM mit der miR-199

Als Positivkontrolle für die Induktion von Zellzyklusaktivität wurde die miR-199 aufgrund ihrer in der Literatur beschriebenen Wirkung auf den Zellzyklus von KM genutzt. Aus Herzen von P1, P3 und P5 alten Mäusen wurden KM dissoziiert und anschließend mit der miR-199 durch transiente Lipofektion transfiziert und nach drei Tagen fixiert sowie immunhistochemisch gefärbt. Die KM wurden anhand der H2B-mCherry- und α -Aktinin-

Signale, Zellzyklus-aktive Zellen anhand der eGFP-Anillinsignale mikroskopisch quantifiziert. Der Anteil Zellzyklus-aktiver KM lag an P1 bei $16,90 \pm 3,52$ % (NK: $1,00 \pm 0,31$ %) und an P3 bei $12,46 \pm 1,61$ % (NK: $2,05 \pm 0,52$ %). An P5 sank der Anteil eGFP-Anillin⁺ KM auf $14,35 \pm 3,04$ % (NK: $0,95 \pm 0,95$ %; Abb. 10 B-D).

Im Folgenden wurden die eGFP-Anillin⁺ KM weiter nach den verschiedenen Lokalisationen des eGFP-Anillins während der Zellteilung quantifiziert. Es wurde hierbei zwischen symmetrischen und asymmetrischen Mittelkörpern, welche als Hinweis auf azytokinetische Mitose gewertet wurden (vgl. 1.3.1), unterschieden. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 zusammengefasst. An P1 wurden $89,39 \pm 3,25$ % nukleäre Signale, $2,93 \pm 2,04$ % zytoplasmatische Signale, $1,70 \pm 0,91$ % kontraktile Ringe, $2,78 \pm 1,26$ % Mittelkörper und $3,18 \pm 2,63$ % asymmetrische Mittelkörper beobachtet. An P3 $79,46 \pm 1,92$ % nukleäre Signale, $9,13 \pm 4,63$ % zytoplasmatische Signale, $5,81 \pm 2,26$ % kontraktile Ringe, $1,96 \pm 1,96$ % Mittelkörper und $4,38 \pm 3,71$ % asymmetrische Mittelkörper. An P5 fanden sich $88,40 \pm 3,81$ % nukleäre Signale, 0 % zytoplasmatische Signale, $3,90 \pm 3,9$ % kontraktile Ringe, $1,96 \pm 1,96$ % Mittelkörper und $5,68 \pm 3,65$ % asymmetrische Mittelkörper.

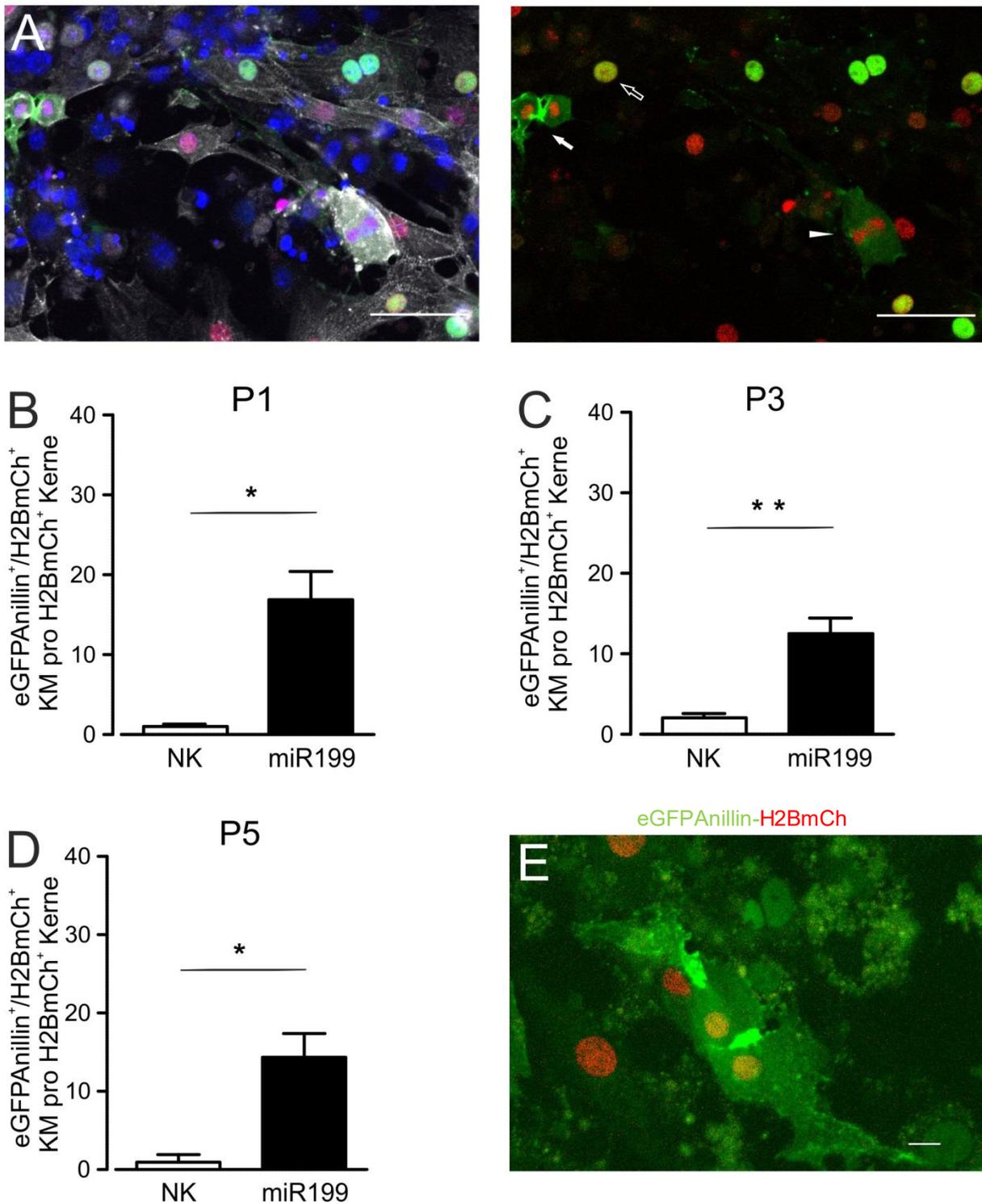
Hoechst-eGFPAnillin-H2BmCh- α Actinin

Abb. 10: KM nach Transfektion mit miR-199 an P1, 3 und 5. (A) Fixierte KM (P3) nach Transfektion mit miR-199. Sichtbar sind (rechtes Bild) ein kontraktiver Ring (solider Pfeil), nukleäres eGFP-Anillinsignal (durchsichtiger Pfeil), zytoplasmatisches eGFP-Anillinsignal (Pfeilkopf). Maßstabsbalken: 50 μ m. (B) Quantifizierung von eGFP-Anillin⁺ KM nach Transfektion mit miR-199 an P1 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 1280; miR199: 1415), (C) an P3 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 1736; miR199: 2119) und (D)

an P5 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 333; miR199: 419). NK: Negativkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. T-Test. * $p < 0,05$. Jeweils $n=3$. (E) Zytokinese eines KM mit asymmetrischem Mittelkörper. Maßstabsbalken: 10 μm .

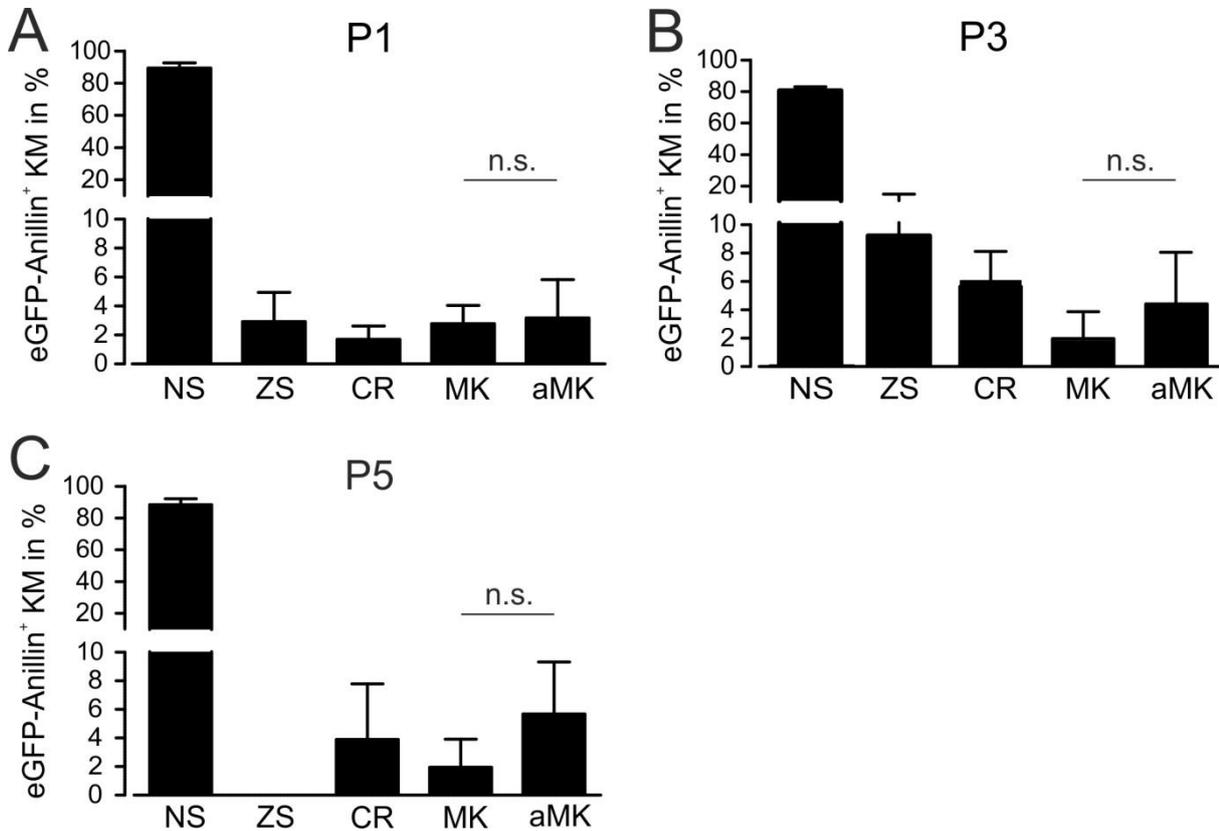


Abb. 11: Subzelluläre Lokalisation der eGFP-Anillinsignale in KM nach Transfektion mit der miR-199. (A) Quantifizierung der eGFP-Anillinsignale nach Transfektion mit der miR-199 an P1 (Anzahl analysierter Zellen: 234), (B) an P3 (Anzahl analysierter Zellen: 245) und (C) an P5 (Anzahl analysierter Zellen: 55). NS: nukleäres Signal; ZS: zytoplasmatisches Signal; CR: kontraktile Ring; MK: Mittelkörper, aMK: asymmetrischer Mittelkörper. Student's T-Test. * $p > 0,05$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. Jeweils $n=3$.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Zellzyklusaktivität ein Hinweis auf Zellteilung oder azytokinetische Mitose ist, wurde die Anzahl zweikerniger KM an P3 bestimmt (Abb. 12). Nach Transfektion mit der miR-199 kam es zu einer 75%igen Zunahme der binukleären KM (miR-199: $23,87 \pm 8,10$ %; Negativkontrolle: $13,41 \pm 0,9$ %).

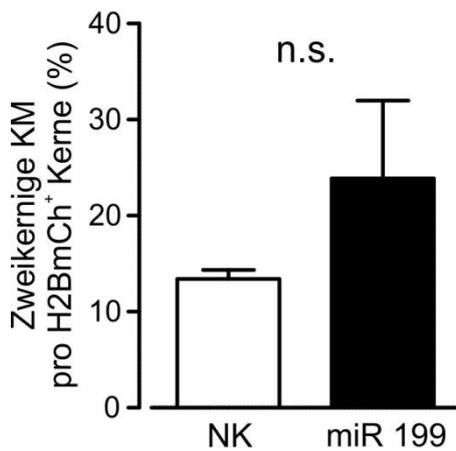


Abb. 12: Zweikernige KM nach Transfektion mit miR-199 (P3).

Anzahl analysierter Zellen: NK: 380; miR 199: 270. NK: Negativkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. T-Test. $P > 0,05$. $n=3$.

Zusätzlich wurden Langzeitaufnahmen der Zellen angefertigt. Nach 48 h Zellkultur wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C mit dem *Zeiss Axiovert* Mikroskop über 12 h alle 6-8 Minuten Aufnahmen ausgewählter Zellen mit eGFP-Anillin⁺ Zellkernen angefertigt. Nach Transfektion mit miR-199 ließen sich Zellteilungen mit unvollständiger Zytokinese beobachten. Bei diesen bildete sich nach dem kontraktiven Ring ein seitlich verlagerter Mittelkörper und eine vollständige Abschnürung des Zytoplasmas blieb aus, sodass zweikernige KM entstanden. Eine solche azytokinetische Teilung ist in Abb. 13 dargestellt. In der Negativkontrolle ließ sich keine Zellzyklusaktivität anhand der eGFP-Anillinsignale feststellen.

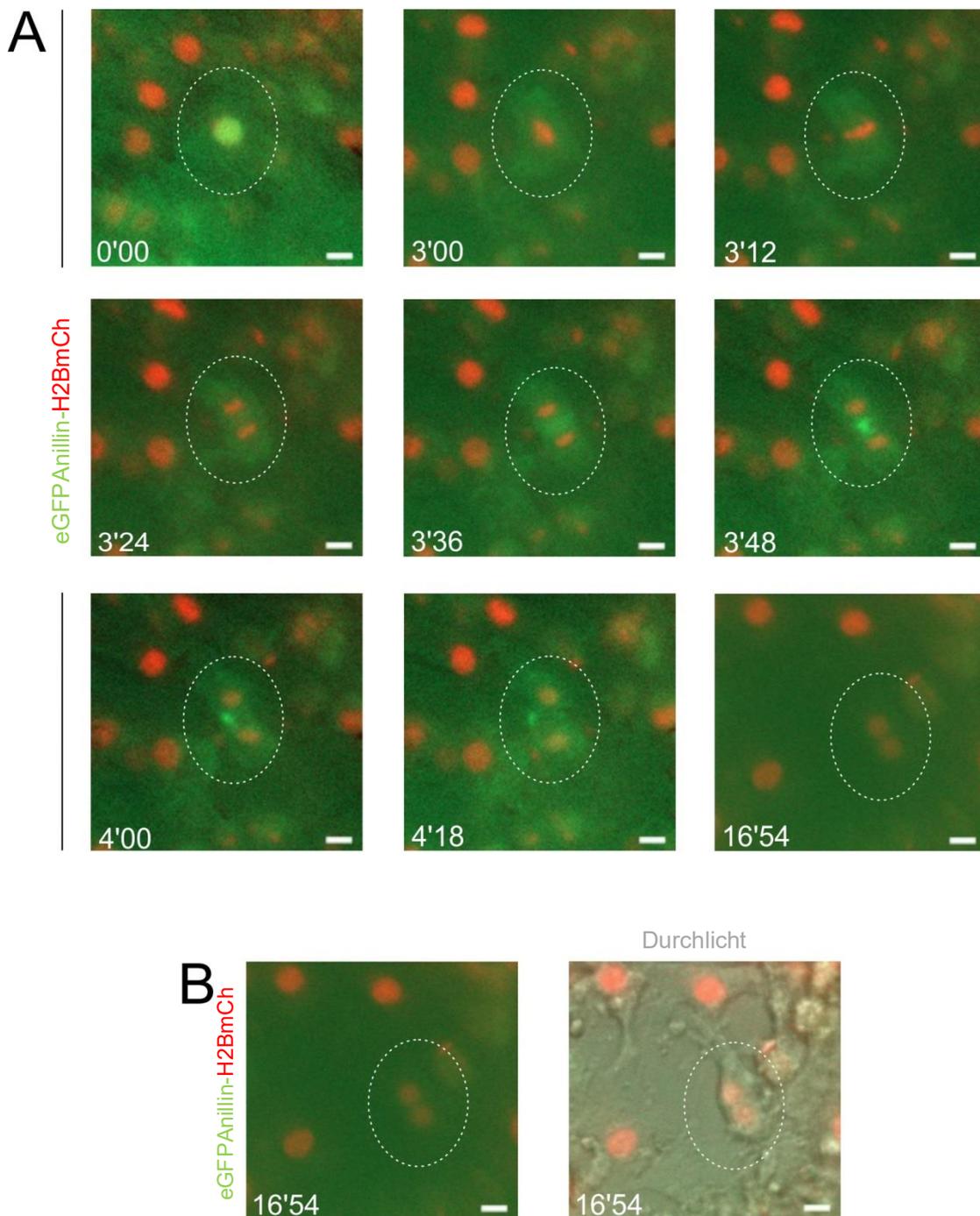


Abb. 13: Videomikroskopische Aufnahme einer azytokinetischen Teilung eines KM nach Transfektion mit der miR-199 (P3). (A) 0'00: nukleäres eGFP-Anillin Signal; 3'00: Prometaphase; 3'24: Metaphase; 3'36: Ausbildung eines kontraktiven Ringes; 3'48: zunächst symmetrisch liegender Mittelkörper; 4'00/4'18: asymmetrisch lokalisierter Mittelkörper; 16'54: binukleärer KM. (B) Durchlichtaufnahme zum Zeitpunkt 16'54: beide Zellkerne liegen innerhalb einer Zelle. Zeitangaben in Stunden und Minuten. Maßstabsbalken: 10 μ m.

3.4 Knockdown von p21 in KM

Durch siRNA Knockdown wurde die Rolle von p21 in der Regulation des Zellzyklus von KM untersucht. Um Effizienz des siRNA Knockdowns zu ermitteln wurde mittels qPCR die Restexpression von p21 anhand der mRNA Menge bestimmt. Die Restexpression von p21 lag nach siRNA Knockdown bei $5,57 \pm 1,91$ % verglichen mit der Expression von p21 in der Negativkontrolle (Abb. 14).

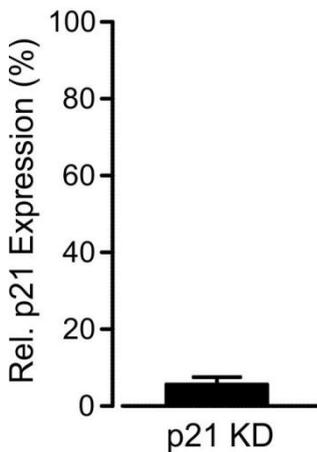


Abb. 14: Relative p21 Expression nach siRNA Knockdown. Relative p21 mRNA Expression in KM nach siRNA Knockdown von p21. KD: Knockdown. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. n=3.

Zunächst wurde der Gesamtanteil eGFP-Anillin⁺ KM bestimmt (Abb. 15B-D). An P1 fanden sich nach p21 Knockdown $13,89 \pm 4,35$ % eGFP-Anillin⁺ KM, (NK: $1,00 \pm 0,31$ %), während an P3 der Anteil eGFP-Anillin⁺ KM nach Knockdown auf $17,59 \pm 3,76$ % anstieg (NK: $2,05 \pm 0,52$ %). An P5 sank der Anteil eGFP-Anillin⁺ KM deutlich auf $4,26 \pm 1,40$ % (NK: $0,96 \pm 0,96$ %).

Die Aufschlüsselung der verschiedenen eGFP-Anillinsignale nach Lokalisation ist in Abb. 16 dargestellt. An P1 wurden $94,37 \pm 2,38$ % nukleäre, $4,67 \pm 2,91$ % zytoplasmatische Signale, keine kontraktile Ringe oder Mittelkörper und $0,6 \pm 0,6$ % asymmetrische Mittelkörper gezählt. An P3 fanden sich etwas weniger nukleäre ($92,45 \pm 2,93$ %) und ein leicht erhöhter Anteil mitotischer Signale (zytoplasmatische Signale, $2,00 \pm 1,58$ % kontraktile Ringe, $2,03 \pm 1,58$ % Mittelkörper und $3,23 \pm 2,09$ %

asymmetrische Mittelkörper). An P5 wurden ausschließlich (100 %) nukleäre Signale gezählt, was auf ausschließliche Endoreplikation hindeutete.

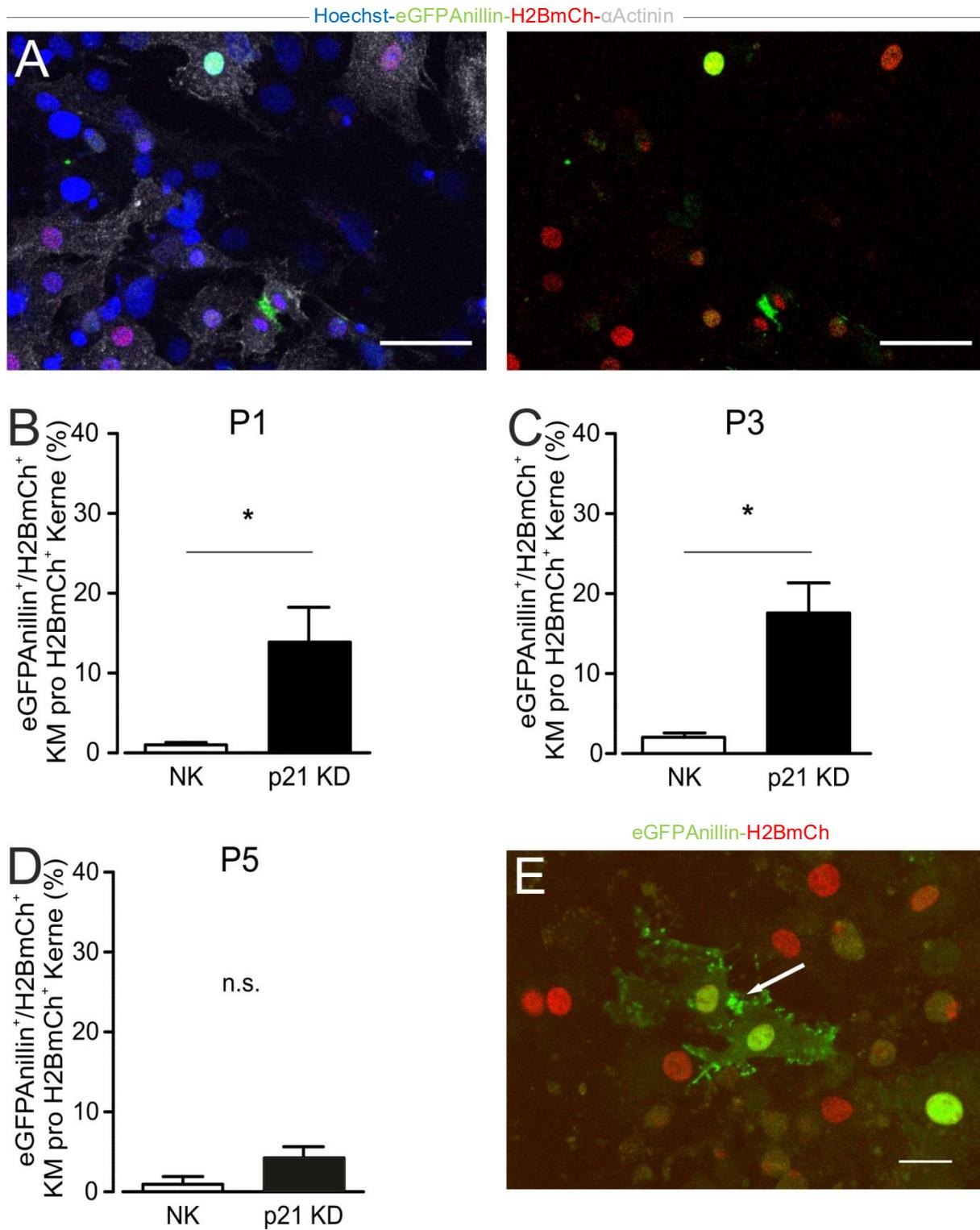


Abb. 15: P21 Knockdown in KM an P1, 3 und 5. (A) fixierte KM (P3) nach Transfektion mit siRNA gegen p21. Maßstabsbalken: 50 μ m. (B) eGFP-Anillin⁺ KM nach p21

Knockdown (p21 KD) an P1 (Anzahl analysierter Zellen; NK: 1280; p21 KD: 1489), (C) an P3 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 1734; p21 KD: 817) und (D) an P5 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 333; p21 KD: 491). NK: Negativkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. T-Test. $P < 0,05$. $n = 3$. (E) Zytokinese eines KM mit asymmetrischem Mittelkörper (Pfeil), Abbildung C und E aus Hesse et al. (2018). Maßstabsbalken: 20 μm .

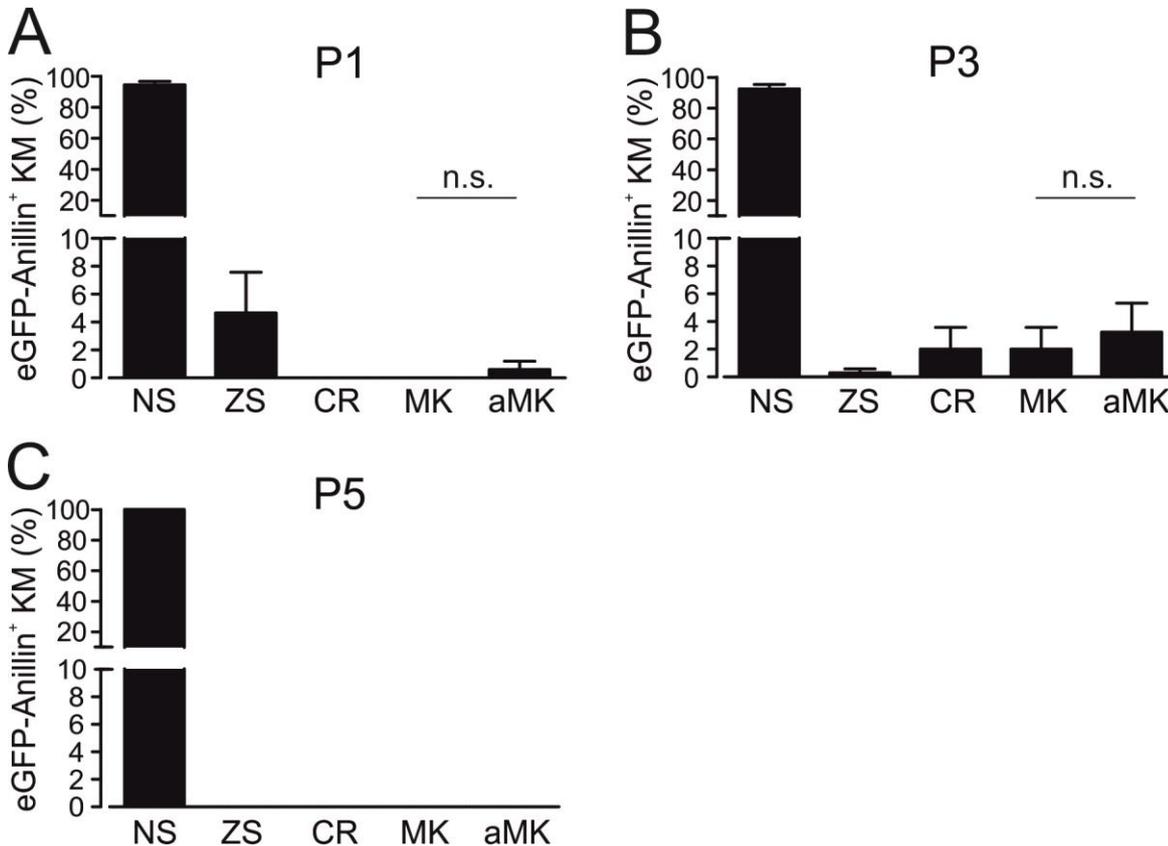


Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation der eGFP-Anillinsignale in KM nach p21 Knockdown. (A) Quantifizierung der eGFP-Anillinsignale nach p21 Knockdown an P1 (Anzahl analysierter Zellen: 172), (B) an P3 (Anzahl analysierter Zellen: 165) und (C) an P5 (Anzahl analysierter Zellen: 19). NS: nukleäres Signal; ZS: zytoplasmatisches Signal; CR: kontraktile Ringe; MK: Mittelkörper; aMK: asymmetrischer Mittelkörper. Student's T-Test. $*p > 0,05$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $n = 3$.

Um zu überprüfen, ob die asymmetrischen Mittelkörper ein Hinweis auf azytokinetische Teilung sind, wurden auch hier exemplarisch mikroskopische Videoaufnahmen angefertigt. Es ließen sich KM beobachten, die nach Ausbildung eines asymmetrischen Mittelkörpers keine vollständige Zytokinese durchliefen, sondern zweikernig wurden (Abb. 17). Der Anteil zweikerniger KM wurde in den fixierten Zellen (P3) ausgezählt. Nach p21 Knockdown lag der Anteil binukleärer KM bei $23,89 \pm 0,24$ % im Vergleich zu

13,41 ± 0,94 % in der Negativkontrolle (Abb. 18). Dies unterstützt die Hypothese, dass asymmetrische Mittelkörper während einer azytokinetischen Mitose entstehen.

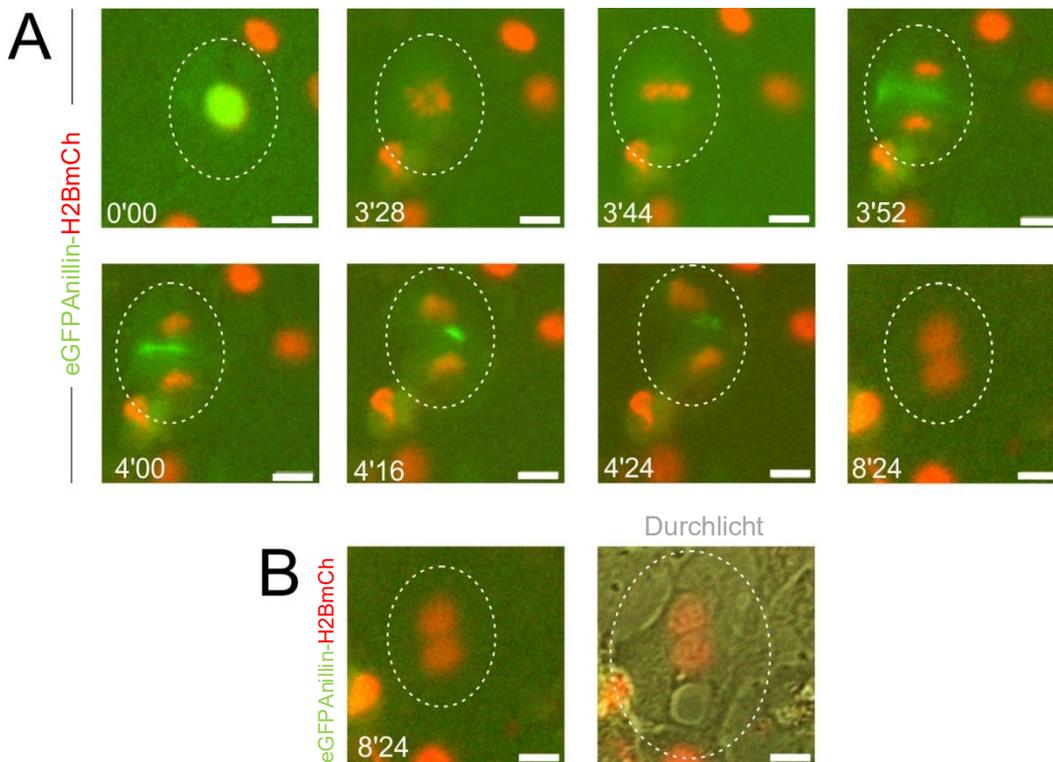


Abb. 17: Videomikroskopische Aufnahme einer azytokinetischen Teilung eines KM nach p21 Knockdown (P3). (A) 0'00: nukleäres eGFP-Anillinsignal; 3'28: Prometaphase; 3'44: Metaphase; 3'52: Ausbildung eines kontraktiven Ringes; 3'48: 4'16 / 4'24: asymmetrisch lokalisierter Mittelkörper; 8'24: binukleärer KM. (B) Durchlichtaufnahme zum Zeitpunkt 8'24: beide Zellkerne liegen innerhalb einer Zelle. Zeitangaben in Stunden und Minuten. Maßstabsbalken: 10 µm. Abbildung aus Hesse et al. (2018).

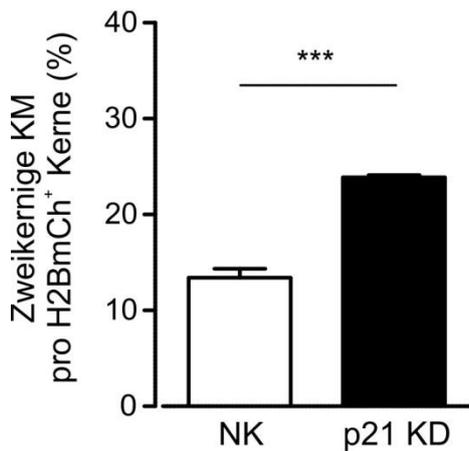


Abb. 18: Anteil zweikerniger KM nach p21 Knockdown in KM (P3). Der Anteil zweikerniger KM ist nach p21 Knockdown signifikant größer als in der Negativkontrolle (Anzahl analysierter Zellen: NK: 380; p21 KD: 263). NK: Negativkontrolle. KD: Knockdown. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. T-Test. $P < 0,001$. $n=3$.

3.5 Knockdown von p27 in KM

Auch nach siRNA-Knockdown von p27 wurde zunächst die Effizienz des Knockdowns durch qPCR quantifiziert (Abb. 19). Die Restexpression von p27 lag bei $36,39 \pm 8,45$ % im Vergleich zur Negativkontrolle.

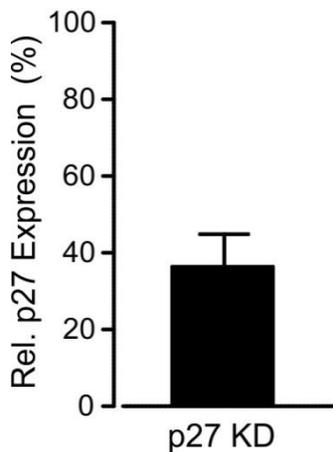


Abb. 19: Relative p27 Expression nach siRNA Knockdown. Relative p27 mRNA Expression in KM nach 72 h siRNA Knockdown. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $n=3$.

Der Anteil an eGFP-Anillin⁺ KM wurde untersucht. Nach siRNA Knockdown von p27 fand sich an P1 eine Fraktion von $4,11 \pm 1,10$ % eGFP-Anillin⁺ KM (NK: $0,47 \pm 0,28$ %), an P3 von $3,72 \pm 1,24$ % (NK: $1,66 \pm 0,78$ %) und an P5 von $3,85 \pm 2,53$ % (NK: $0,96 \pm 0,96$ %; Abb. 20). Die Untersuchung der eGFP-Anillin-Lokalisationen zeigte, dass es sich ausschließlich um nukleäre Signale handelte, was vermuten lässt, dass der Knockdown von p27 ausschließlich Endoreplikation bewirkt. In den angefertigten Videos fanden sich ebenfalls keine Zellen, die mitotische eGFP-Anillinsignale zeigten. Die Untersuchung der Zweikernigkeit (Abb. 21) an fixierten Zellen ($17,64 \pm 4,09$ %) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle ($13,41 \pm 0,93$ %).

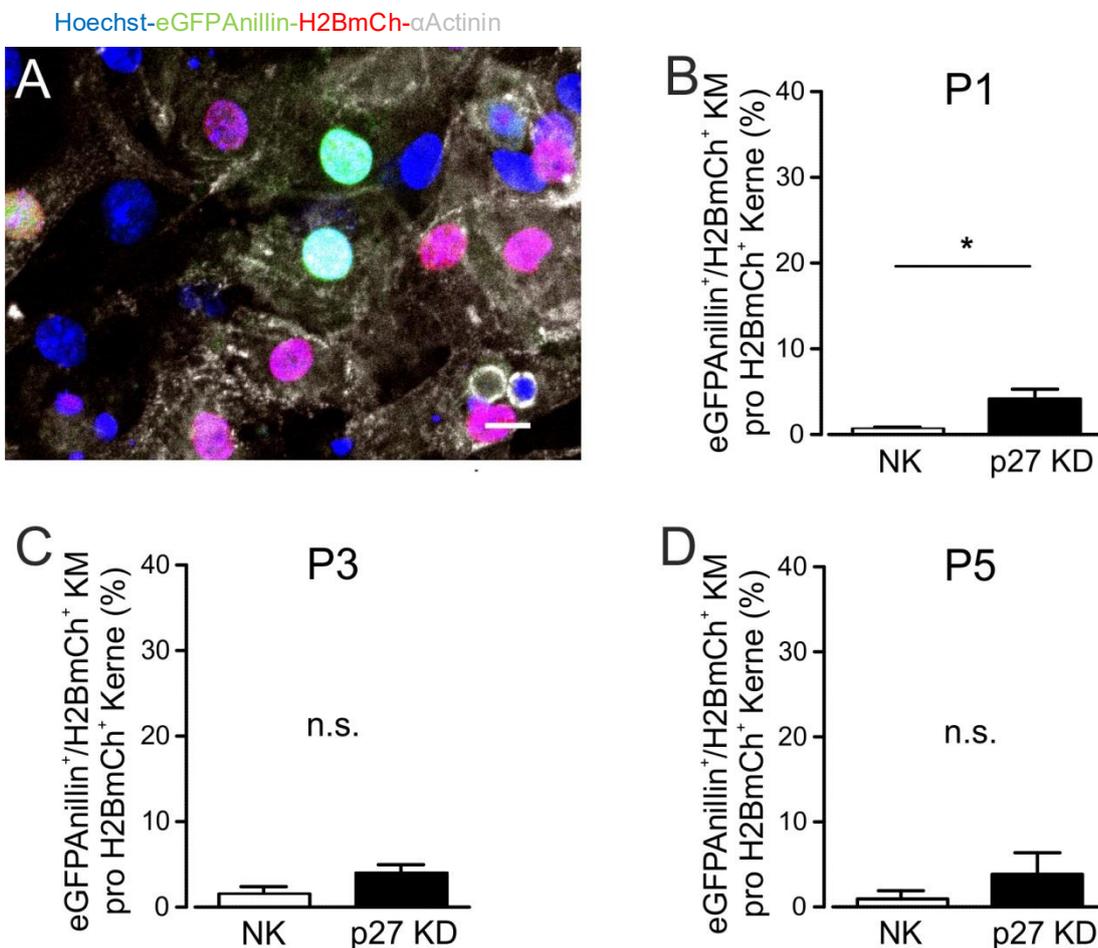


Abb. 20: P27 Knockdown in KM an P1, 3 und 5. (A) fixierte KM (P3) nach Transfektion mit siRNA gegen p27. Maßstabsbalken: 50 μ m. (B) eGFP-Anillin⁺ KM nach p27 Knockdown (p27 KD) an P1 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 1276; p27 KD: 1610), (C) an P3 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 1730; p27 KD: 1773) und (D) an P5 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 327; p27 KD: 492). NK: Negativkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. T-Test. $P > 0,05$. $n = 3$. Maßstabsbalken: 10 μ m.

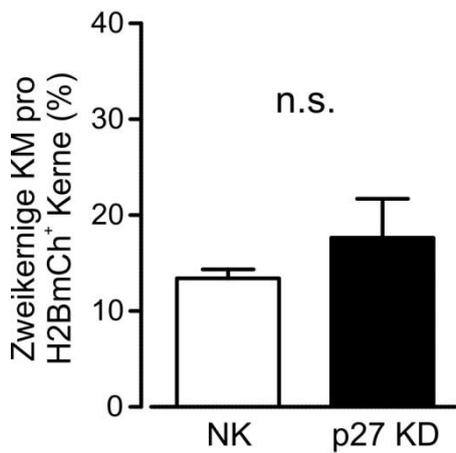


Abb. 21: Anteil zweikerniger KM nach p27 Knockdown. Anzahl analysierter Zellen: NK: 380; p27 KD: 384. NK: Negativkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. T-Test. $P > 0,05$. $n=3$

3.6 Knockdown von Meis1 in KM

Die Meis1 Knockdown wurde an P3 durchgeführt. Die Knockdown-Effizienz wurde durch qPCR untersucht und ergab eine Restexpression von Meis1 von $21,15 \pm 1,62$ % (Abb. 22 B) gegenüber der Negativkontrolle. Die Analyse der fixierten Zellen zeigte jedoch keinen Unterschied der Zellzyklusaktivität ($0,61 \pm 0,61$ %) im Vergleich zur Negativkontrolle ($0,38 \pm 0,38$ %; Abb. 22 C). Demzufolge scheint Meis1 keinen Einfluss auf die Zellzyklusaktivität von KM zu haben.

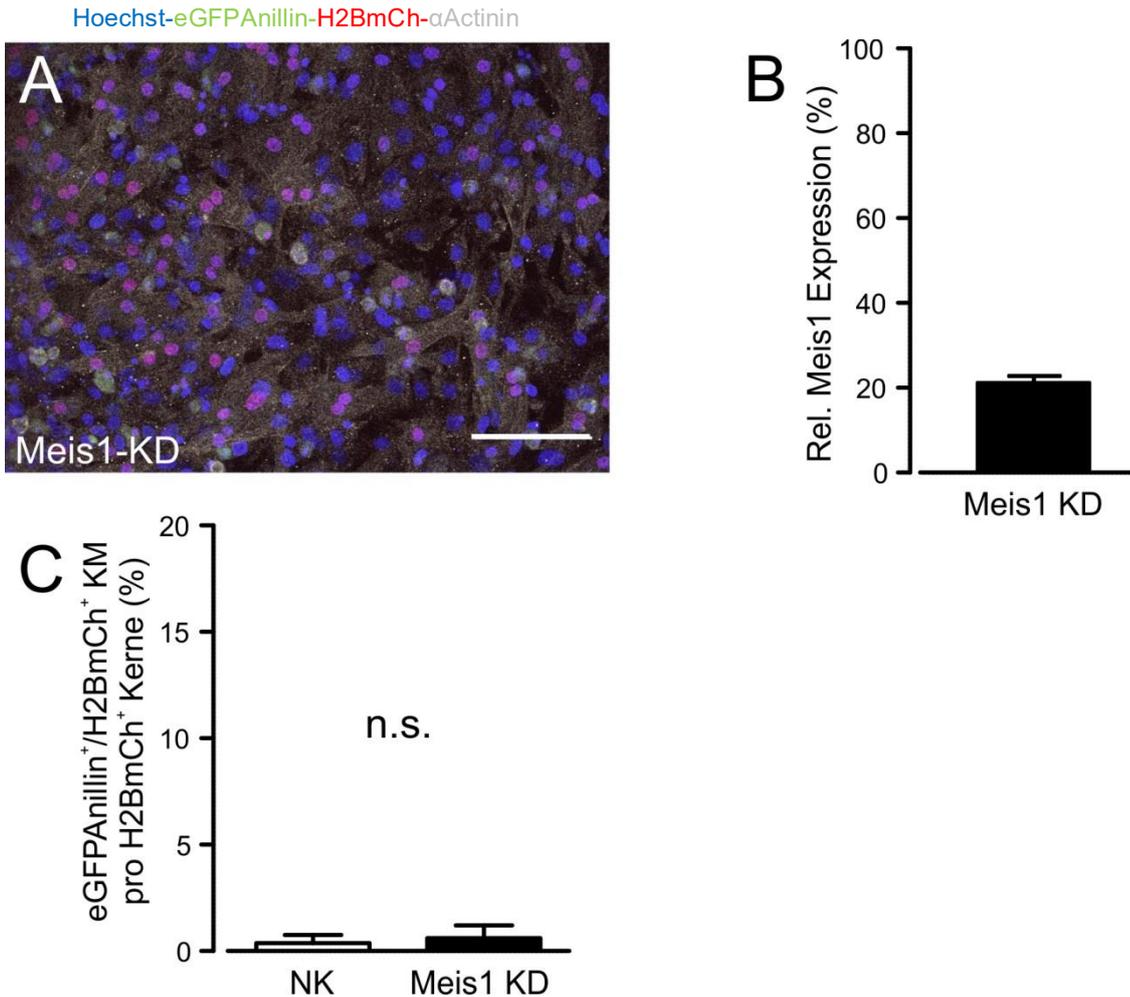


Abb. 22: Meis1 Knockdown in KM an P3. Meis1 Knockdown (A). Maßstabsbalken: 100 μ m. (B) Restexpression von Meis1 nach Knockdown. (C) eGFP-Anillin⁺ KM nach Meis1 Knockdown und nach Transfektion mit scrambled siRNA (NK) an P3 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 1216; Meis KD: 1391) Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $P > 0,05$. $n=3$.

3.7. Knockdown von Geminin in KM

Bei einer relativen Geminin RNA-Menge nach Knockdown von $3,16 \pm 2,00$ % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 23B) ergab sich kein relevanter Unterschied in der Anzahl der eGFP-Anillin⁺ Zellen nach Geminin Knockdown ($1,88 \pm 1,34$ %) verglichen mit der Negativkontrolle ($0,88 \pm 0,45$ %; Abb. 23 C). Anhand des eGFP-Anillinsystems lässt sich somit kein Einfluss auf die Zellzyklusaktivität von KM nachweisen.

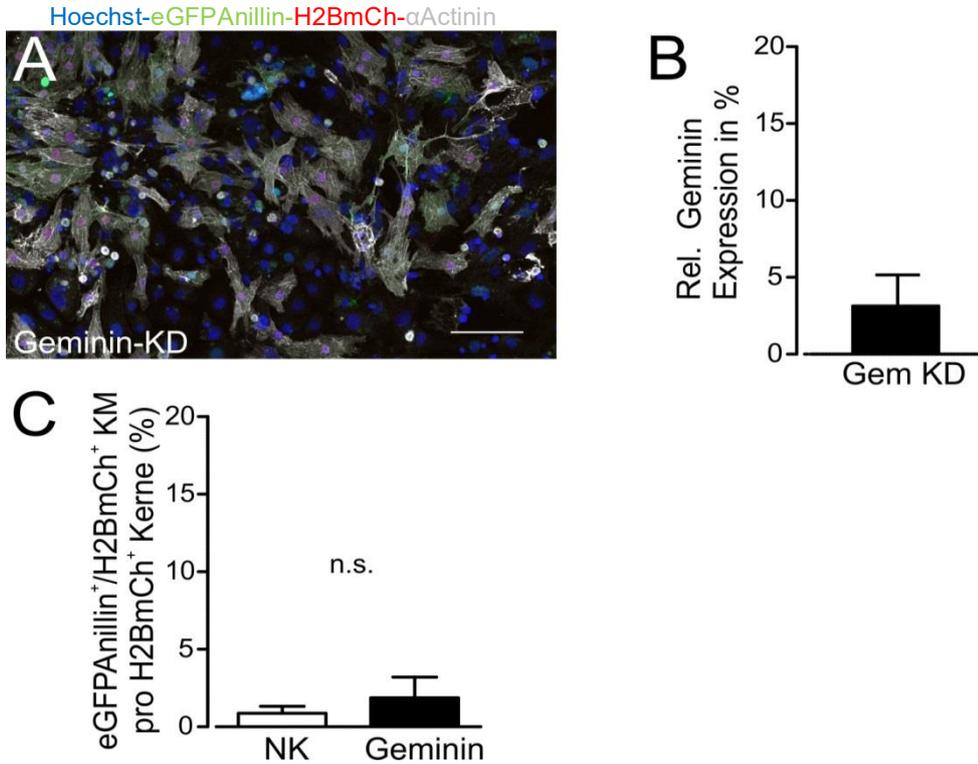


Abb. 23: Geminin Knockdown in KM an P3. Knockdown von Geminin durch siRNA in KM (A). Maßstabsbalken: 100 μ m. (B) Restexpression von Geminin nach siRNA Knockdown. (C) Quantifizierung eGFP-Anillin⁺ KM nach Geminin Knockdown und nach Transfektion mit scrambled siRNA (NK) an P3 (Anzahl analysierter Zellen: NK: 927; Geminin: 861). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $P > 0,05$. $n = 3$.

3.8 Untersuchung des Hippo-, Notch- und mTor-Signalweges in postnatalen KM

Für diejenigen Gene, bei deren Knockdown sich in der Zellkultur Effekte auf den Zellzyklus zeigten, wurde mittels quantitativer PCR und Western Blot der Signalmechanismus untersucht. Hierbei lag der Fokus auf den für die Herzentwicklung bedeutsamen Signalwegen Hippo, Notch und mTor.

3.8.1. Analyse der Beeinflussung des Hippo-Signalwegs in KM durch Transfektion mit miR-199, oder Knockdown von p21 und p27

Mittels quantitativer PCR wurden die Expressionsmuster der Hippo-Signalwegproteine Salvador und Lats1/2 untersucht (Abb. 24). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen, auf 18s bezogenen, Expression der Kinase Lats1/2 (NK:

12,31 ± 2,06; miR-199: 12,85 ± 2,94; p21: 9,16 ± 0,25; p27: 10,62 ± 1,49). Ebenso fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression von Salvador zwischen der Negativkontrolle (28,49 ± 1,96) und nach Transfektion mit miR-199 (22,21 ± 2,54), nach p21 Knockdown (19,21 ± 2,39) und nach p27 Knockdown (19,5 ± 9,07).

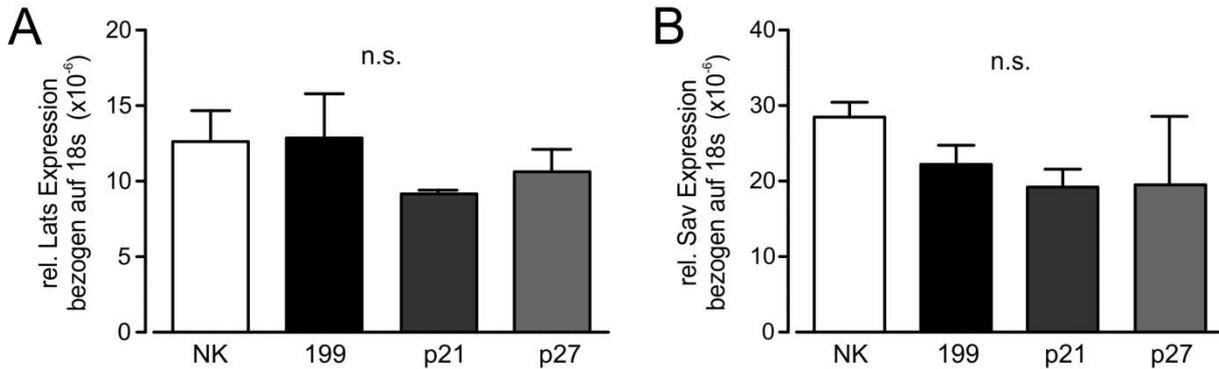


Abb. 24: qPCR Analyse der Lats (A) und Salvador (B) Expression.

Dargestellt sind die relativen Transkriptionsmengenunterschiede von Lats und Salvador bezogen auf 18s RNA. Sav: Salvador; NK: Negativkontrolle; 199: nach Transfektion mit miR-199; p21: nach siRNA knockdown von p21; p27: nach siRNA Knockdown von p27. ANOVA. $P > 0.05$. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. $n = 3$.

3.8.2. Analyse der Beeinflussung des Notch-Signalwegs in KM durch Transfektion mit miR-199, oder Knockdown von p21 und p27

Die Analyse der relativen, auf 18s bezogenen Notch-Expression mittels qPCR ergab für keinen der untersuchten Knockdowns einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle. Es ergaben sich die folgenden Expressionsniveaus bezogen auf 18s: 5,99 ± 0,23 in der Negativkontrolle; 5,32 ± 0,75 nach Transfektion mit der miR-199; 6,97 ± 2,16 nach p21 Knockdown; 6,03 ± 1,27 nach p27 Knockdown (Abb. 25).

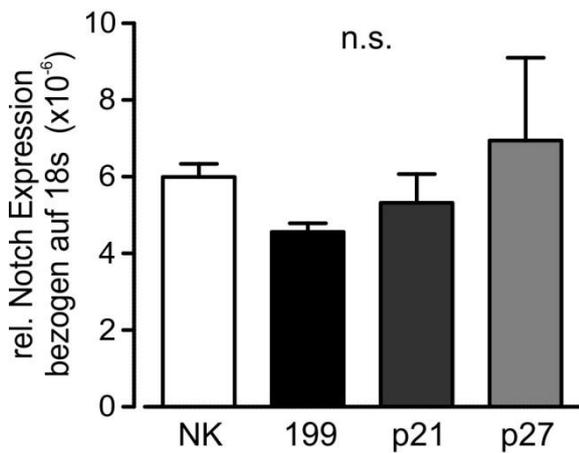


Abb. 25: qPCR Analyse der Notch Expression. Dargestellt sind die relativen Transkriptionsmengenunterschiede von Notch bezogen auf 18s RNA. NK: Negativkontrolle; 199: nach Transfektion mit miR-199; p21: nach siRNA Knockdown von p21; p27: nach siRNA Knockdown von p27. ANOVA. $P > 0.05$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $n=3$.

3.8.3 Analyse der Beeinflussung des mTor-Signalwegs in KM durch Transfektion mit miR-199, oder Knockdown von p21 und p27

Auch die Aktivität des mTor-Signalwegs nach mi/siRNA Transfektion wurde zunächst mittels qPCR untersucht. Es wurde sowohl die Expression des mTor Gens als auch der S6 Effektor kinase untersucht (Abb. 26). Für mTor fand sich eine statistisch signifikante Reduktion des relativen, auf 18s bezogenen Expressionsniveaus auf $< 1/3$ nach Transfektion mit miR-199 ($13 \pm 3,28$) verglichen mit der Negativkontrolle ($46,25 \pm 2,18$). Für den p21-Knockdown ($30,93 \pm 11,34$) und den p27-Knockdown ($37,46 \pm 2,95$) fand sich kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle. Die qPCR Analyse der relativen S6-Expression ergab keinerlei Unterschiede der behandelten Zellen gegenüber der Negativkontrolle (NK: $5,69 \pm 1,99$; miR-199: $7,09 \pm 3,06$; p21: $6,84 \pm 3,90$; p27: $6,06 \pm 2,22$).

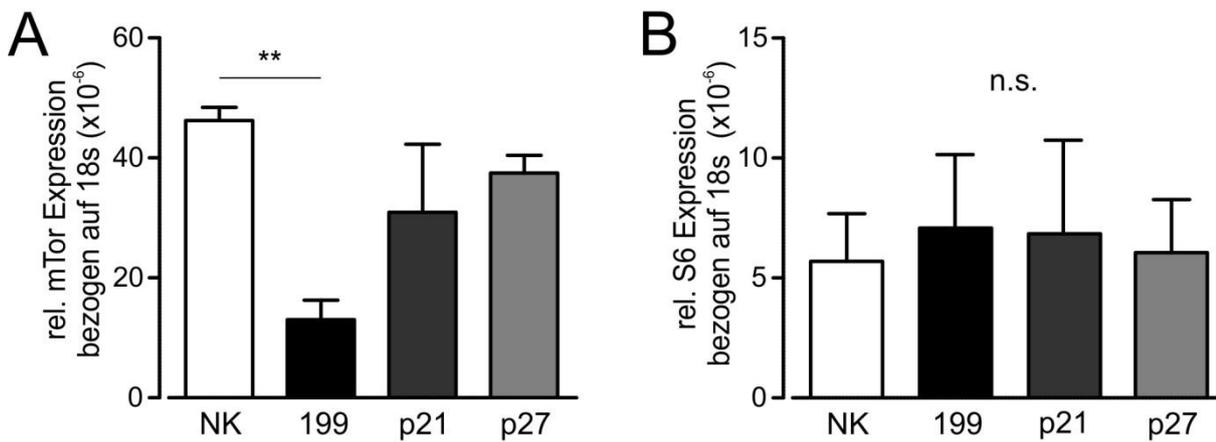


Abb. 26: qPCR Analyse der mTor(A) und s6 Expression (B). Dargestellt sind die relativen Transkriptionsmengenunterschiede von mTor und der S6-Kinase bezogen auf 18s RNA. NK: Negativkontrolle; 199: nach Transfektion mit miR-199; p21: nach siRNA Knockdown von p21; p27: nach siRNA Knockdown von p27. ANOVA. (A) Signifikant geringere mTor Expression nach Transfektion mit miR-199. $P < 0.01$ (B) $P > 0.05$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $n=3$.

Das Ergebnis der qPCR wurde auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse überprüft. Als Effektorprotein von mTor wurde die S6-Kinase untersucht. Die Analyse auf Proteinebene erlaubt eine Unterscheidung zwischen der durch mTor aktivierten (phosphorylierten) und der inaktiven (nicht phosphorylierten) Form der S6-Kinase. Es wurde das Verhältnis aus phosphoryliertem zu unphosphoryliertem S6 bestimmt (Abb. 27 B). Dieses lag nach Transfektion mit miR-199 bei $32,05 \pm 11,05$ (Negativkontrolle: $15,55 \pm 4,84$) und konnte somit eine Beeinflussung der S6 Aktivität durch die miR-199 nicht bestätigen.

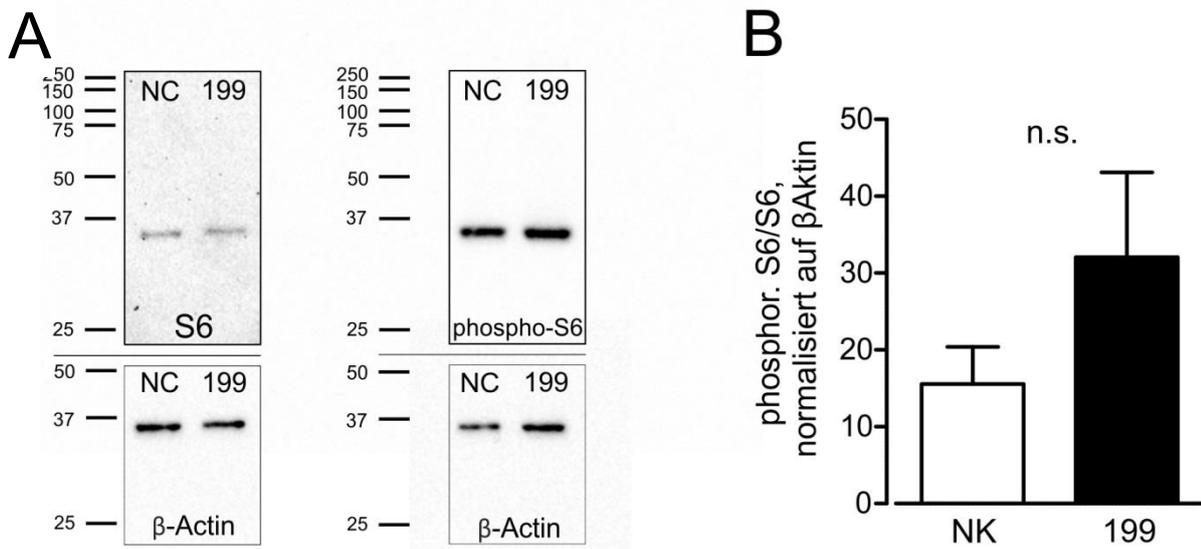


Abb. 27: Western Blot-Analyse der S6-Kinase nach Transfektion mit miR-199. (A) Western Blot gegen phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes S6, normiert auf β -Aktin. (B) Verhältnis von phosphorylierten zu unphosphoryliertem S6. T-Test. $p > 0,05$. $n=3$.

4. Diskussion

4.1 Aktivierung des Zellzyklus in postnatalen KM

Die eindeutige Identifizierung vollständiger Zellteilung von KM ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Myokardregeneration und verlangt eine klare Unterscheidung von vollständiger Zellteilung gegenüber Zellzyklusvariationen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gene, denen in der Literatur zugeschrieben wurde Zellzyklusaktivität in KM zu induzieren, detailliert in Hinblick auf ihr proliferatives Potential in primären KM der Maus untersucht. Die Verwendung des CAG-eGFP-Anillin/ α MHCmCherry Modells ermöglichte hierbei sowohl eine genaue Identifikation der KM, als auch die exakte Unterscheidung unterschiedlicher Phasen und Varianten des Zellzyklus.

Um die Effekte von Genen auf die Zellzyklusaktivität adäquat untersuchen zu können, wurde zunächst die Etablierung optimaler Zellkulturbedingungen durchgeführt. Es wurde die Verwendung einer möglichst geringen FKS-Konzentration angestrebt, um die in der Literatur beschriebene Induktion von Hypertrophie (Simpson et al., 1982) und Zweikernigkeit (Engel et al., 2006) durch FKS in KM möglichst gering zu halten. Da in der Literatur bereits eine FKS Konzentration von 5 % zur Verdopplung bis Verdreifachung der Zellgröße von KM aus postnatalen Ratten führte (Simpson et al., 1982) wurde für die hier durchgeführten Experimente eine FKS Konzentration von unter 5 % angestrebt. Die FKS Konzentration von 2 % wurde gewählt, da bei dieser die stärkste Zunahme an KM-Kernen von d1 nach d3 zu beobachten war. Die Zunahme der Zellkerne von d1 nach d3 könnte einerseits durch spätes Anwachsen von KM nach Anfertigung der Aufnahmen an d1 bedingt sein. Andererseits kann es sich auch um eine FKS-induzierte Zweikernigkeit handeln, da bei der Quantifizierung von KM-Kernen in lebenden Zellkulturen durch teilweise sehr dichtes Wachstum nicht immer eindeutig zwischen mono- und binukleären Zellen unterschieden werden kann.

Das Aussehen von postnatalen KM auf mit Fibronectin oder mit Gelatine beschichtete Kulturschalen zeigte, dass auf Fibronectin ausgesäte KM signifikant größer waren als auf Gelatine ausgesäte KM. Dies stimmt mit Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe überein, die zeigen konnten, dass das Extrazellulärprotein Fibronectin in neonatalen KM der Ratte Hypertrophie induziert (Ogawa et al., 2000). Hypertrophie von KM kann

wiederum mit einer Erhöhung der Ploidie einhergehen (Liu et al., 2010). In Untersuchungen der Zellzyklusaktivität von KM ist die Beschichtung von Kulturschalen mit Fibronectin somit kritisch zu betrachten, da es möglicherweise die Ergebnisse verfälscht. In dieser Arbeit wurden Zellkulturen folglich ausschließlich auf mit Gelatine beschichtete Kulturschalen ausgesät.

Im Folgenden wurde mithilfe von siRNAs die Knockdowns verschiedener Gene, welche anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Wirkung auf den Zellzyklus von KM ausgewählt wurden, sowie die miR-199 untersucht. Nach Knockdown des Fzr-1 Proteins, welches unter anderem für die Degradierung von Anillin verantwortlich ist, zeigte sich ausschließlich ein starker Anstieg der nukleären, S-Phase spezifischen eGFP-Anillinsignale. Die zusätzlich durchgeführte immunhistochemische Färbung gegen Ki-67 bestätigte die Vermutung, dass es sich hierbei nicht um tatsächliche Zellzyklusaktivität handelt, sondern dass ohne den Kofaktor Fzr-1 eGFP-Anillin durch den APC^{Fzr-1} nicht abgebaut werden kann (Vgl. 1.5.1). Somit ermöglicht der Fzr-1 Knockdown anhand des akkumulierenden nukleären eGFP-Anillins eine Einschätzung der Transfektionseffizienz. Zusätzlich ist demnach festzustellen, dass Faktoren, die auf den APC^{Fzr-1} wirken, mithilfe des eGFP-Anillinsystems nicht adäquat untersucht werden können.

Die Untersuchung der Effekte der miR-199 auf die Zellzyklusaktivität von KM lieferte ähnliche Ergebnisse zu denen Experimenten von Eulalio et al. (2012), die erstmals die zellzyklusaktivierende Wirkung der miR-199 auf KM in vivo und in vitro beschrieben haben. Die Transfektion von KM von P1, P3, und P5 Mäusen mit der miR-199 zeigte S-Phase und M-Phase spezifische eGFP-Anillinsignale, wobei der höchste Anteil zellzyklusaktiver Zellen mit ~16 % an P1 detektiert wurde. Das Auftreten von kontraktile Ringe und Mittelkörpern beweist eine Progression der Mitose bis zur Zytokinese, wobei ein höherer Anteil asymmetrischer Mittelkörper als symmetrischer Mittelkörper gezählt wurde. Der Anteil asymmetrischer Mittelkörper steigt von P3 zu P5 hin an. Von Engel et al. (2006) wurde bereits beschrieben, dass einer azytokineticen Mitose die Ausbildung eines asymmetrischen Mittelkörpers vorrausgeht. Dies deckte sich mit den in dieser Arbeit angefertigten Videoaufnahmen, die ausschließlich das Entstehen zweikerniger Zellen nach Ausbildung eines asymmetrischen Mittelkörpers zeigten. Die Quantifizierung der zweikernigen Zellen nach Transfektion mit miR-199 konnte jedoch aufgrund von

Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten ein Vorherrschen azytokinetischer Mitose nicht bestätigen.

Von Eulalio et al. (2012) war eine stärkere Zellzyklusaktivierung durch die miR-199 festgestellt worden als in der vorliegenden Arbeit. In neonatalen KM (P0) konnten sie nach Transfektion mit miR-199 in ca. 38 % der KM Zellzyklusaktivität und in ca. 3 % die Bildung von Mittelkörpern feststellen. Diese Werte liegen deutlich über denen in dieser Arbeit ermittelten Werten (P1: eGFP-Anillin⁺: 16,9 %; Mittelkörper: ~1 %). Mögliche Gründe für diese Diskrepanz könnten die Verwendung unterschiedlich alter neonataler Mäuse (P0 versus P1), sowie die Verwendung unterschiedlicher FKS Konzentrationen (5 % versus 2 %) sein. Nach Myokardinfarzierung in adulten Mäusen zeigte sich nach viraler Transduktion eines miR-199 Expressionskonstrukts eine verbesserte linksventrikuläre Ejektionsfraktion und ein verkleinertes Infarktareal (Eulalio et al., 2012). In den Randzonen der Infarktareale konnte eine 5-fache Erhöhung EdU⁺ Zellkerne und somit eine gesteigerte DNA-Produktion der KM nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse konnten von derselben Arbeitsgruppe nach intrakardialer Injektion der miRNA 199 in Mäuse gezeigt werden (Lesizza et al., 2017). Somit könnte die miR-199, wenngleich hier durch EdU-Inkorporation lediglich DNA-Synthese nachgewiesen wurde, durch die nachgewiesene verbesserte Ejektionsfraktion eine interessante Therapieoption struktureller Herzkrankheiten darstellen. Da jedoch Tumorstimulierende Effekte der miR-199 bei Pankreaskarzinomen beschrieben worden sind (Kuninty et al., 2016), ist Kardioselektivität im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Nutzung eine zwingende Voraussetzung für einen sicheren Einsatz.

Des Weiteren wurde durch siRNA Transfektion der Knockout der CdKIs p21 und p27 durchgeführt. Der Knockout von p21 hatte ähnliche Effekte auf die Zellzyklusaktivität wie die Transfektion mit der miR-199. An P1 und P3 wurden S-Phase sowie M-Phase Signale beobachtet, wobei die höhere Zellzyklusaktivität an P3 beobachtet wurde.

Analog zu den Ergebnissen nach Transfektion mit der miR-199 wurde ein höherer Anteil asymmetrischer Mittelkörper als symmetrischer Mittelkörper gezählt. Ebenfalls zeigte sich in den Videoanalysen ausschließlich die Bildung zweikerniger Zellen nach Ausbildung eines asymmetrischen Mittelkörpers und es konnte ein signifikant erhöhter Anteil binukleärer KM quantifiziert werden. An P5 ließen sich ausschließlich S-Phase Signale nachweisen, demzufolge die Mitose nicht erreicht wurde. Die geringere

Zellzyklusaktivität an P5 könnte damit zusammenhängen, dass die p21-Expression an P5 einen Höhepunkt erreicht (Tane et al., 2014) und somit eine höhere Restaktivität von p21 als an P1/3 vorhanden ist. Zusätzlich ist es möglich, dass weitere Faktoren zum Zeitpunkt P5 die Zellzyklusaktivität hemmen. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass nach Transfektion mit der miR-199 die stärkste Zellzyklusaktivität ebenfalls an P1 und P3 zu beobachten war. Zusammenfassend führte der p21-Knockdown in den hier durchgeführten Experimenten zu vermehrter azytokinischer Mitose. Als ein Ansatz um Zellteilung in KM zu induzieren scheint ein solches Vorgehen somit nicht geeignet. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen an p21-Knockout-Mäusen, in denen KM ebenfalls nicht proliferieren, sondern lediglich einen erhöhten DNA-Inhalt sowohl in mono- als auch in binukleären Zellen aufweisen (Tane et al., 2014).

Neben dem Knockdown von p21 wurde ebenfalls der Knockdown des CdkI p27 durchgeführt. Dieser führte im Gegensatz zum p21-Knockdown ausschließlich zu einer Zunahme von S-Phase spezifischen eGFP-Anillinsignalen an P1 und somit vermutlich zu Endoreplikation. An P3 und P5 war keine signifikante Zunahme der Zellzyklusaktivität zu beobachten. Analog zu p21 erreichte auch die p27-Expression an P5 ihr Maximum (Tane et al., 2014), was möglicherweise die verringerte Zellzyklusaktivität gegenüber dem Knockdown zum Zeitpunkt P1 erklärt. Die Beobachtung von Endoreplikation deckt sich mit Untersuchungen an p27-Knockout-Mäusen, die ebenfalls einen erhöhten DNA-Gehalt von KM aufweisen (Tane et al., 2014).

Der zeitgleiche Knockdown von p21 und p27 in postnatalen KM (P1-2) zeigte einen Anstieg der S-Phasesignale, mitotischer Signale, sowie der Zweikernigkeit (Di Stefano et al., 2011). Der Vergleich, der in dieser Arbeit durchgeführten separierten Knockdowns von p21 und p27, mit den Ergebnissen von Di Stefano et al. (2011) legt nahe, dass die beobachtete Zunahme mitotischer Aktivität und der Zweikernigkeit an P1-2 auf den Knockdown von p21 zurückzuführen ist. Die Knockdowneffizienz von p27 war jedoch in den von mir durchgeführten Experimenten mit ca. 60 % deutlich schlechter als die von p21 mit ca. 95 %, was die Vergleichbarkeit der Effekte der beiden CdkI einschränkt.

Zusätzlich wurde der Knockdown des Meis1 Gens durchgeführt. Hier konnte an P3 bei einer Restexpression von ca. 20 % kein Anstieg der Zellzyklusaktivität gegenüber der Negativkontrolle nachgewiesen werden. Mahmoud et al. (2013) zeigten, dass Meis1 im postnatalen und adulten Herzen gegenüber dem embryonalen Expressionsniveau

hochreguliert ist. Ein zu meinen Experimenten ähnlicher Meis1 Knockdown in KM der Ratte an P1 zeigte bei einer Restaktivität von ca. 10 % eine deutliche Zunahme der S- und M-Phasemarker BrdU, pHH3 und Aurora B Kinase (Mahmoud et al., 2013). Ferner stellten sie in Meis1-Knockout-Mäusen in P14 KM und in adulten Herzen einen Anstieg der Zellzyklusaktivitätsmarker pHH3 und Aurora-B-Kinase fest. Des Weiteren zeigten sie eine Hochregulation des in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten CdKI p21 in Mäusen, die Meis1 überexprimieren. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass die Proliferation von Kardiomyozyten durch eine erhöhte Expression von Meis1 im postnatalen und adulten Herz die Proliferation von KM inhibiert.

Im Gegensatz zur Arbeit vom Mahmoud et al. stellte eine Publikation von Andersen et al. (2014) fest, dass die Expression von Meis1 im embryonalen Herz erhöht und postnatal sowie im adulten Herz erniedrigt ist. Diese Ergebnisse widersprechen einer wichtigen Rolle von Meis1 als Proliferationsinhibitor. Ähnlich zu meinen Ergebnissen konnte der von Mahmoud et al. beobachtete Effekt nicht reproduziert werden, wobei über mögliche Gründe nur spekuliert werden kann: Unterschiede im experimentellen Aufbau liegen in der Nutzung von KM unterschiedlicher Spezies sowie von unterschiedlich alten Tieren. In der vorliegenden Arbeit habe ich P3 Mäuse untersucht, während in der Arbeit von Mahmoud et al. P0-1 Ratten verwendet wurden.

Der Knockdown des nukleären Proteins Geminin zeigte bei einer Knockdowneffizienz von ~97 % auf RNA-Ebene keinen Effekt auf die Zellzyklusaktivität von KM. Obwohl Geminin eine entscheidende Rolle in der Regulation der Polyploidie in frühen embryonalen Stadien in endoreplizierenden Zellen spielt (vgl. 1.5.5), scheint die in KM auftretende Polyploidie auf andere Faktoren zurückzuführen zu sein. Der Knockdown von Geminin kann somit nicht als Positivkontrolle für das Auftreten von Endoreplikation im CAG-eGFP-Anillin Modell genutzt werden.

4.2 Die Rolle des Hippo-, Notch- und mTor-Signalweges in postnatalen KM

Neben der Analyse der Zellzyklusvariationen wurde für den Knockdown von p21, p27, sowie die Transfektion mit der miR-199 zusätzlich der zugrundeliegende Signalmechanismus in Hinblick auf die Signalwege Hippo, Notch und mTor untersucht.

Der Notch-Signalweg beeinflusst sowohl die Zellzyklusaktivität in neonatalen und adulten Herzen, als auch nach myokardialer Ischämie (MacGrogan et al., 2010). In

neonatalen KM der Ratte (P0) konnte nach Stimulation des Notch-Signalweges (vgl. 1.2.2) gesteigerte Zellzyklusaktivität, nach seiner Inhibierung verringerte Zellzyklusaktivität nachgewiesen werden (Collesi et al., 2008). Nach Myokardinfarkt und Stimulation der Notch-Expression fanden sich im adulten Herzen der Maus eine verkleinerte fibrotische Narbe, eine gesteigerte linksventrikuläre Auswurffraktion sowie ein Anstieg mitotischer Signale (Gude et al., 2008; Kratsios et al., 2010). Nach Herunterregulation von p21 und p27 durch siRNAs sowie nach Transfektion mit der miR-199 zeigte sich keine Veränderung der Notch-mRNA-Expression in den von mir durchgeführten Experimenten. Die nach den Transfektionen beobachtete Zunahme der Zellzyklusaktivität scheint somit unabhängig von der Zellzyklusstimulation durch den Notch-Signalweg zu sein.

Der mTor-Signalweg, der an der Regulation von Zellwachstum, Proliferation und Zellmetabolismus beteiligt ist, spielt im gesunden wie kranken Herzen eine wichtige Rolle (Sciarretta et al., 2014). Ein mTor-Knockout ist in der Maus bereits im frühen Embryonalstadium letal (Murakami et al., 2004), während ein KM-spezifischer mTor-Knockout, bedingt durch gesteigerte Apoptose und verringerte Proliferation, zu einer dilatativen Kardiomyopathie und zum Tod im späten Embryonalstadium führt (Zhu et al., 2013). Mäuse, in denen postnatal oder im adulten Stadium eine mTor-Deletion induziert wurde, entwickelten ebenfalls dilatative Kardiomyopathien (Mazelin et al., 2016; Zhang et al., 2010). Diese Studien konnten jeweils eine verringerte Anzahl von KM in dilatiertem Myokard nachweisen, welche vorrangig durch Apoptose bedingt war.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Interaktionen von p21, p27 und miR-199 mit dem mTor Signalweg untersucht. Während sich mittels qPCR nach Knockdown von p21 und p27 keine Veränderungen in der Expression von mTor und S6 nachweisen ließen, zeigte sich nach Transfektion mit der miR-199 eine signifikante Abnahme der Expression von mTor-mRNA. Da bisherige Studien vor allem auf eine Bedeutung des mTorC1-Komplexes in der Herzentwicklung hinweisen (Sciarretta et al., 2014) wurde ein Western Blot gegen die mTorC1-Effektorkinase S6 durchgeführt, welche von mTorC1 durch Phosphorylierung aktiviert wird. Hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung im Vergleich zur Negativkontrolle.

Der Hippo-Signalweg (Vgl. 1.2.2) scheint sowohl im Rahmen des Herzwachstums als auch der neonatalen Herzregeneration die Proliferation von KM zu kontrollieren und ist

somit ein zentraler Signalweg in der Erforschung der Proliferationsregulation von KM. Im Rahmen des Herzwachstums der Maus ist er maßgeblich an der Kontrolle der Herzgröße beteiligt. Heallen et al. (2011) konnten eine ca. 1,5-fache Herzvergrößerung in murinen Embryos zeigen, bei denen ein Knockout des Proteins Salvador besteht, welches eine Komponente des Hippo-Signalweges darstellt. Durch die fehlende Inhibition der Transkriptionsfaktoren Yap/Taz durch den Hippo-Signalweg kommt es bei unveränderter Zellgröße der KM zur Herzvergrößerung, was auf vermehrte Proliferation der KM zurückzuführen ist. Der Hippo-Signalweg hemmt den proliferationsstimulierenden Wnt-Signalweg und reguliert so die Begrenzung des Herzwachstums (Heallen et al., 2011). Die Begrenzung des Herzwachstums blieb im genannten Knockout Modellorganismus aus und es kam zur Hyperplasie des Herzens, die postnatal bei den untersuchten Tieren durch Herzinsuffizienz zum Tod führte. Eine Begrenzung des Herzwachstums scheint somit für eine regelrechte Funktion essentiell zu sein.

Es wird vermutet, dass der Hippo-Signalweg in adulten KM Zellzyklusaktivität inhibiert. In der Tat finden sich in adulten Mäusen, in denen Knockouts der Hippo-Signalweg-Proteine Lats1/2 und Salvador induziert wurden, eine gesteigerte EdU-Inkorporation, sowie vereinzelt Hinweise auf Zytokinese (Heallen et al., 2013). Des Weiteren zeigten eine Woche alte Salvador-Knockout-Mäuse nach Herzinfarkt durch Verschluss des Ramus interventricularis anterior eine verbesserte Ejektionsfraktion sowie eine verkleinerte fibrotische Narbe im Vergleich zu den Herzen der Negativkontrolle. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für 2 Monate alte Mäuse gezeigt werden. In beiden Fällen wurde ebenfalls eine gesteigerte EdU-Inkorporation sowie vereinzelt Aurora B Kinase⁺ KM als Hinweis auf Zytokinese detektiert. Ob die beobachtete Verbesserung der Ejektionsfraktion tatsächlich auf Proliferation von KM zurückzuführen war, lässt sich anhand dieser Untersuchungsmethoden jedoch nicht klar beurteilen. Alternativ könnte auch eine Hypertrophie der KM als Folge von Zellzyklusvariationen oder parakrine Effekte ursächlich für die verbesserte Pumpfunktion sein.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mittels qPCR konnten keine Beeinflussung des Hippo-Signalweges durch die miRNA199 oder die CdKIs p21 und p27 nachweisen. Deren Zellzyklus-stimulierenden Effekte sind somit wahrscheinlich nicht durch den Hippo-Signalweg bedingt.

4.3 Die Rolle von Zellzyklusvariationen in KM

Es stellt sich die Frage, welche Funktion die Zellzyklus-Varianten Endoreplikation und Zweikernigkeit in KM erfüllen. Ein gesteigerter DNA-Gehalt lässt sich in Pflanzen und Tieren in verschiedenen Zelltypen beobachten und kann sowohl physiologisch als auch pathologisch bedingt sein. Bei Säugetieren spielt Polyploidie neben dem Herz insbesondere in der Leber mit 90 % polyploiden Hepatozyten in der Maus und 50 % im Menschen eine wichtige Rolle, wobei die Funktion der Polyploidie nicht abschließend geklärt ist (Duncan, 2013). Der erhöhte DNA Gehalt erlaubt zum einen eine gesteigerte Proteinbiosynthese gegenüber diploiden Zellen (Orr-Weaver, 2015). Polyploidie könnte zum anderen durch eine gesteigerte Anzahl der Genomkopien Hepatozyten vor toxischer Schädigung des Genoms schützen, welcher die Leber durch ihre Funktion der Metabolisierung und Elimination toxischer Stoffe in erhöhtem Maße ausgesetzt ist (Gentric et al., 2012).

Neben dem physiologischem Auftreten kann Polyploidie in Hepatozyten auch eine pathologische Reaktion auf Stress darstellen. Ein Anstieg der Ploidie von Hepatozyten wird unter oxidativem Stress beobachtet (Gorla et al., 2001) sowie nach Überladung der Hepatozyten mit Kupfer oder Eisen (Yamada et al., 1998; Madra et al., 1995), welche auch im Rahmen von Speicherkrankheiten wie dem Morbus Wilson oder der Hämochromatose auftreten. Die Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie geht ebenfalls teilweise auf Hypertrophie und Polyplodie der Hepatozyten zurück (Lazzerini Denchi et al., 2006; Miyaoka et al., 2012).

Des Weiteren kann das obligatorische Auflösen von Zellkontakten während der Mitose in bestimmten Geweben von Nachteil sein. Ein Beispiel ist die subperineurale Glia in *Drosophila melanogaster*, welche durch Tight Junctions die Blut-Hirn-Schranke bildet (Orr-Weaver, 2015). Während des Wachstums des zentralen Nervensystems wächst die subperineurale Glia durch Größenzunahme der einzelnen Zellen, welche dabei polyploid werden. Nach Inhibierung der Endoreplikation kam es zur Ruptur der die Blut-Hirn-Schranke aufrechthaltenden Tight Junctions. Somit scheint die Polyploidie zur Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke während des Wachstums beizutragen, da so ein Auflösen der Tight Junctions bei der Mitose vermieden wird (Unhavaithaya und Orr-Weaver, 2012).

Auch bei KM wird ein hemmender Einfluss der Zellkontakte, insbesondere der Gap Junctions auf das Proliferationspotenzial, diskutiert. Der siRNA-Knockdown von Connexin 43 in KM führt zu vermehrter Zellzyklusaktivität (Matsuyama und Kawahara, 2009). Möglicherweise ist der Ab- und Aufbau der Gap Junctions energetisch extrem ungünstig, wodurch das Organwachstum durch Größenzunahme der einzelnen Zellen durch Endoreplikation ohne Auflösung der Gap Junctions einen Vorteil darstellt.

Generell wird im Fall von KM angenommen, dass große, polyploide oder binukleäre Zellen mit mehreren Genomkopien mehr mRNA produzieren können und durch die daraus resultierende gesteigerte Proteinsynthese besser zur Kontraktilität beitragen können als ein vergleichbares Volumen diploider, mononukleärer Zellen (Pandit et al., 2013). In adulten Mäusen konnten in den Randzonen von Infarkten eine gesteigerte Endoreplikation nachgewiesen werden (Hesse et al., 2012). Auch humane KM in den Randzonen von Infarktarealen verfügen über einen höheren DNA-Gehalt sowie eine größere Anzahl an Zellkernen als Herzen der Kontrollgruppe (Herget et al., 1997; Meckert et al., 2005). CyclinG1-defiziente Mäuse, die einen verringerten Anteil polyploider und binukleärer KM haben, weisen eine signifikant schlechtere Ejektionsfraktion nach Myokardinfarkt auf als Wildtyp-Mäuse (Liu et al., 2010). In fetalen Schafsherzen konnte sowohl nach Induktion von hämodynamischem Stress durch arterielle Hypertonie, als auch durch Anämie eine verfrühte Zunahme binukleärer KM beobachtet werden (Jonker et al., 2007; Jonker et al., 2010). Zusammen betrachtet unterstützen diese Studienergebnisse aus unterschiedlichen Säugetier-Spezies die Hypothese, dass binukleäre oder polyploide Zellen für die Kontraktilität des Myokards von Vorteil sind.

4.4 Screening proliferationsinduzierender Faktoren mithilfe postnataler KM von CAG-eGFP-Anillin/H2B-mCherry Mäusen

Es wurden bisher viele verschiedene genetische Faktoren und Substanzen beschrieben, die in der Lage sein sollen Proliferation in KM zu induzieren.

Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die Inhibition der p38 MAP Kinase einen gesteigerten Anteil von KM, die in die Zytokinese eintreten, induziert (Engel et al., 2005). Inhibition der miRNA-15 Gruppe führte in neonatalen Mäusen zur Regeneration von infarziertem Myokard. Dieser Effekt ließ sich in Mäusen, die sieben Tage oder älter waren, jedoch nicht reproduzieren (Porrello et al., 2013). Nach Injektion des

Wachstumsfaktors Neuregulin in murine Herzen, welche zuvor infarziert worden waren, zeigte sich eine Besserung der Pumpfunktion, was auf eine verbesserte Regeneration der Myokardnarbe zurückgeführt wurde. Des Weiteren wurde in der Literatur beschrieben, dass Neuregulin die Zellteilung in adulten KM zu induziert (Bersell et al., 2009). Nach Injektion von Neuregulin in neonatale Mausherzen, in welchen zuvor ein Infarkt induziert worden war, zeigte sich eine Besserung der Pumpfunktion, was auf eine verbesserte Regeneration der Myokardnarbe zurückgeführt wurde (Polizzotti et al., 2015). In weiteren Experimenten konnte der proliferationsstimulierende Effekt auf KM in adulten Mäuseherzen jedoch nicht bestätigt werden (Reuter et al., 2014). Neben den bereits beschriebenen Ergebnissen die miR-199 betreffend konnte dieselbe Arbeitsgruppe zellzyklusaktivierende Effekte der miR-590 auf KM in vivo und in vitro zeigen (Eulalio et al., 2012; Lesizza et al., 2017). Durch Überexpression des Transkriptionsfaktors PPAR δ in KM der Ratte wurde nach Myokardinfarkt gesteigerte Zellzyklusaktivität beobachtet (Magadum et al., 2017).

Den genannten Studien ist gemein, dass ,neben dem grundsätzlichen Nachweis von Zellzyklusaktivität durch die Marker Ki-67, EdU und BrdU, die Färbung des Zytokinesmarkers Aurora B Kinase in Kombination mit Quantifizierung von KM als Beweis von KM-Proliferation genutzt werden. Die in dieser Arbeit angefertigten Lebendaufnahmen zeigten, dass das Erreichen der Zytokinese kein ausreichender Beweis für Zellteilung von KM ist. Nach Ausbilden eines kontraktiven Ringes erfolgte dessen Einschnürung nicht immer symmetrisch zur Achse der Zellkerne hin, sondern auch einseitig. Infolgedessen entstand ein asymmetrisch liegender Mittelkörper und die vollständige Abschnürung der Tochterzellen voneinander blieb aus. Diese Resultate stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Engel et al. (2006), die ebenfalls eine asymmetrische Kontraktion des kontraktiven Ringes beim Entstehen zweikerniger KM in vitro zeigen konnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zwischen symmetrischen und asymmetrischen Mittelkörpern unterschieden. Ob asymmetrisch liegende Mittelkörper in fixierten Zellen als Beweis für azytokinetische Teilungen betrachtet werden können, kann jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden. Zum einen können die angefertigten Lebendaufnahmen azytokinetischer Zellteilungen aufgrund der geringen Anzahl nur exemplarisch betrachtet

werden, zum anderen wurden in den durchgeführten Lebendaufnahmen keine vergleichenden vollständigen Zellteilungen bei symmetrischen Mittelkörpern beobachtet. Um die Unterscheidung zwischen azytokinetischer und vollständiger Zellteilung anhand der Position der Mittelkörper zu ermöglichen, führte meine Arbeitsgruppe mikroskopische Aufnahmen von Dickschnitten des Herzens nach Transfektion mit miR-199 oder p21 Knockout durch. Hierbei konnten asymmetrische Mittelkörper, die in der Ausbildung einer zweikernigen Zelle endeten, von symmetrischen Mittelkörpern, welchen eine vollständige Zellteilung folgte, unterschieden werden (Hesse et al., 2018). Dies untermauert die Vermutung, dass auch die in Zellkulturen beobachteten asymmetrischen Mittelkörper als Hinweis auf Zweikernigkeit betrachtet werden können. Das Fehlen vollständiger Zellteilungen in den von mir durchgeführten Lebendbeobachtungen in Zellkulturen könnte technische Gründe haben. Beispielsweise könnten die verwendeten Fluoreszenzlampen direkt phototoxisch auf die Zellen wirken oder zu Veränderungen des Zellkulturmediums führen.

Die exemplarischen azytokinetischen Mitosen zeigen, dass die Verwendung von M-Phase- und Zytokinesemarkern in Zellkulturen von KM nicht als ausreichend zum Nachweis von Zellteilung betrachtet werden können. Ein Untersuchungsmodell, das vollständige Zellteilung zuverlässig detektiert, ist bei der Suche nach proliferationsinduzierenden Faktoren in KM deshalb von essenzieller Bedeutung.

Die Lebend-Aufnahmen von CAG-eGFP-Anillin/ α MHC-H2B-mCherry⁺ KM in Kombination mit Quantifizierungen der Zweikernigkeit können durch eindeutige Identifikation von KM-Kernen und der Subphasen des Zellzyklus genauere Angaben ermöglichen. Zur Testung einer größeren Gruppe von Faktoren kann zunächst der beschriebene siRNA-Knockdown in CAG-eGFP-Anillin/ α MHC-H2B-mCherry⁺ KM in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Eine erste Einschätzung, ob Zellzyklus aktivierende Effekte vorliegen, kann durch Auszählen der kernständigen eGFP-Anillinsignale erfolgen. Finden sich Hinweise auf Zellzyklusaktivität, kann im nächsten Schritt das Vorliegen von eGFP-Anillinsignalen der M-Phase untersucht werden. Wenn Mittelkörper gefunden werden, kann im letzten Schritt mittels Lebend-Beobachtung überprüft werden, ob azytokinetische oder vollständige Zellteilung vorliegt. Kann in der Zellkultur vollständige Zellteilung beobachtet werden, könnten in einem weiteren Schritt Dickschnitte CAG-eGFP-Anillin/ α MHC-H2B-mCherry⁺ Herzen, welche den

physiologischen Gegebenheiten des Säugerherzens näherkommen als die Zellkultur, auf das Auftreten vollständiger Teilung von KM untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Herz-Kreislaufkrankungen, insbesondere der Myokardinfarkt, sind die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Bei einem Myokardinfarkt kommt es durch den thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes zur Ischämie, welche durch die Ausbildung einer fibrotischen, nicht kontraktiven Narbe zu einer irreversiblen Schädigung des Myokards führt. Dies geht auf die mangelhafte Regenerationsfähigkeit der adulten KM zurück. Das Potential zur Zellteilung von KM erlischt bei Säugern kurz nach der Geburt. Zu diesem Zeitpunkt geht das Wachstum des Herzens von der hyperplastischen in die hypertrophe Wachstumsphase über, welche durch Variationen des Zellzyklus gekennzeichnet ist. Es werden die azytokinetische Mitose, welche zur Ausbildung einer zweikernigen Zelle führt, sowie die Endoreplikation, bei der weder die Karyokinese noch die Zytokinese vollendet wird und der KM lediglich seinen DNA-Inhalt vergrößert, beobachtet. Die Differenzierung dieser Variationen von vollständiger Zellteilung mithilfe der üblicherweise verwendeten immunhistochemischen Proliferationsmarker (Ki-67, pHH3, Thymidin-Analoga) ist nicht sicher möglich. Die Verwendung des doppelt transgenen Mausmodell α MHC-H2B-mCherry/CAG-eGFP-Anillin erlaubt durch sichere Identifikation von KM-Kernen auf der einen und Identifikation der Subphasen der Mitose auf der anderen Seite die klare Abgrenzung von Zellteilung und Zellzyklusvariationen (Raulf et al., 2015; Hesse et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der Literatur als bedeutsam für die Regulation des Zellzyklus beschriebenen Proteine p21, p27, Meis1, Geminin, Fzr-1 mithilfe synthetischer siRNAs sowie die Zielproteine der miR-199 in postnatalen, α MHC-H2B-mCherry/CAG-eGFP-Anillin⁺ KM in vitro herunterreguliert und die Effekte auf den Zellzyklus der KM analysiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie sowohl nach mehrtätiger Zellkultur, Fixierung und immunhistochemischer Färbung als auch mittels Langzeitmikroskopie der lebenden Zellen. Die miR-199, sowie der Knockdown von p21 führten zu einer Zunahme azytokinetischer Mitosen in KM, während der p27 Knockdown Endoreplikation in KM induzierte. Der Knockdown von Meis1 und Geminin führte zu keiner Zunahme der Zellzyklusaktivität. Der Knockdown von Fzr-1, einem Kofaktor des APC, welcher auch für den Abbau des Proteins Anillin verantwortlich ist, führte zu einer Akkumulation von eGFP-Anillin. Es konnte mittels qPCR und Western Blot kein Zusammenhang zwischen den zellzyklusaktivierenden Effekten der miR-199 sowie der

Knockdowns von p21 und p27 und den Signalwegen Notch, mTor und Hippo festgestellt werden. Das experimentelle Vorgehen kann als Grundlage für ein Screeningverfahren, welches die systematische Identifizierung von Faktoren erlaubt, die terminal differenzierte KM wieder in Zellteilung bringen, genutzt werden.

6. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Stadien der Herzentwicklung (Mensch)	14
Abb. 2: Das postnatale Herzwachstum im Menschen und in der Maus	16
Abb. 3: Zellzyklusvariationen	17
Abb. 4: CAG-eGFP-Anillin	19
Abb. 5: Die doppelt transgene Mauslinie CAG-eGFP-Anillin- α MHC-H2B-mCherry	20
Abb. 6: Mechanismus der RNA-Interferenz	25
Abb. 7: Schematische Darstellung des experimentellen Prozedere	43
Abb. 8: Einfluss der Beschichtung der Kulturplatte und der FKS-Konzentration auf die Kultur postnataler KM	46
Abb. 9: Fzr-1-related Protein	46
Abb. 10: KM nach Transfektion mit miR-199 an P1, 3 und 5	48
Abb. 11: Subzelluläre Lokalisation der eGFP-Anillinsignale in KM nach Transfektion mit der miR-199	50
Abb. 12: Zweikernige KM nach Transfektion mit miR-199 (P3).	50
Abb. 13: Videomikroskopische Aufnahme einer azytokinetischen Teilung eines KM nach Transfektion mit der miR-199 (P3)	52
Abb. 14: Relative p21 Expression nach siRNA Knockdown	52
Abb. 15: P21 Knockdown in KM an P1, 3 und 5. (A) fixierte KM (P3) nach Transfektion mit siRNA gegen p21	54
Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation der eGFP-Anillinsignale in KM nach p21 Knockdown	55
Abb. 17: Videomikroskopische Aufnahme einer azytokinetische Teilung eines KM nach p21 Knockdown (P3)	56
Abb. 18: Anteil zweikerniger KM nach p21 Knockdown in KM (P3)	56
Abb. 19: Relative p27 Expression nach siRNA Knockdown	56
Abb. 20: P27 Knockdown in KM an P1, 3 und 5	57
Abb. 21: Anteil zweikerniger KM nach p27 Knockdown	58
Abb. 22: Meis1 Knockdown in KM an P3	59
Abb. 23: Geminin Knockdown in KM an P3	60
Abb. 24: qPCR Analyse der Lats (A) und Salvador (B) Expression	61
Abb. 25: qPCR Analyse der Notch Expression	62

Abb. 26: qPCR Analyse der mTor(A) und s6 Expression (B)	63
Abb. 27: Western Blot-Analyse der S6-Kinase nach Transfektion mit miR-199	64

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Puffer und Lösungen	28
Tab. 2: Verwendete miRNAs	30
Tab. 3: Verwendete siRNAs	30
Tab. 4: TaqMan Sonden	31
Tab. 5: Verwendete Zellkulturmedien	31
Tab. 6: Verwendete primäre Antikörper	32
Tab. 7: Verwendete sekundäre Antikörper	32
Tab. 8: PCR Ansatz	33
Tab. 9: Genotypisierungs-PCR	34
Tab. 10: qPCR-Ansatz	36
Tab. 11: Zusammensetzung Trenngel	38
Tab. 12: Zusammensetzung Sammelgel	39
Tab. 13: Ansatz der Enzymmixe	41

8. Literaturverzeichnis

- Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiological reviews*. 2007. 87: 521–544
- Alberts B. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science. 2008
- Andersen P, Tampakakis E, Jimenez DV, Kannan S, Miyamoto M, Shin HK, Saberi A, Murphy S, Sulistio E, Chelko SP, Kwon C. Precardiac organoids form two heart fields via Bmp/Wnt signaling. *Nature communications*. 2018. 9: 3140
- Anderson ME, Goldhaber J, Houser SR, Puceat M, Sussman MA. Embryonic stem cell-derived cardiac myocytes are not ready for human trials. *Circulation research*. 2014. 115: 335–338
- Ang K-L, Shenje LT, Reuter S, Soonpaa MH, Rubart M, Field LJ, Galinanes M. Limitations of conventional approaches to identify myocyte nuclei in histologic sections of the heart. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2010. 298: C1603-9
- Arora M. *Cell Culture Media*. MATER METHODS. 2013. 3
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002. 106: 3009–3017
- Azcoitia V, Aracil M, Martinez-A C, Torres M. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Developmental biology*. 2005. 280: 307–320
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, N.Y.)*. 2009. 324: 98–102
- Bersell K, Arab S, Haring B, Kühn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*. 2009. 138: 257–270
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors. *Developmental cell*. 2008. 14: 159–169

- Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JWU, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SEW, Fleischmann BK. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 2007. 110: 1362–1369
- Brodsky V, Chernyaev AL, Vasilyeva IA. Variability of the cardiomyocyte ploidy in normal human hearts. *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology*. 1991. 61: 289–294
- Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature reviews. Genetics*. 2005. 6: 826–835
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. 98: 9742–9747
- Chong JJH, Yang X, Don CW, Minami E, Liu Y-W, Weyers JJ, Mahoney WM, van Biber B, Cook SM, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem H-P, Laflamme MA, Murry CE. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014. 510: 273–277
- Collesi C, Zentilin L, Sinagra G, Giacca M. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes. *The Journal of cell biology*. 2008. 183: 117–128
- Cunningham TJ, Yu MS, McKeithan WL, Spiering S, Carrette F, Huang C-T, Bushway PJ, Tierney M, Albin S, Giacca M, Mano M, Puri PL, Sacco A, Ruiz-Lozano P, Riou J-F, Umbhauer M, Duester G, Mercola M, Colas AR. Id genes are essential for early heart formation. *Genes & development*. 2017. 31: 1325–1338
- Dambrot C, Braam SR, Tertoolen LGJ, Birket M, Atsma DE, Mummery CL. Serum supplemented culture medium masks hypertrophic phenotypes in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014. 18: 1509–1518

- Di Stefano V, Giacca M, Capogrossi MC, Crescenzi M, Martelli F. Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle. *The Journal of biological chemistry*. 2011. 286: 8644–8654
- Duckers HJ, Houtgraaf J, Hehrlein C, Schofer J, Waltenberger J, Gershlick A, Bartunek J, Nienaber C, Macaya C, Peters N, Smits P, Siminiak T, van Mieghem W, Legrand V, Serruys PW. Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2011. 6: 805–812
- Duncan AW. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Seminars in cell & developmental biology*. 2013. 24: 347–356
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2003. 4: 457–467
- Echard A, Hickson GRX, Foley E, O'Farrell PH. Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen. *Current biology : CB*. 2004. 14: 1685–1693
- Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes & development*. 2005. 19: 1175–1187
- Engel FB, Schebesta M, Keating MT. Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006. 41: 601–612
- 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: 376–381
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987. 84: 7413–7417
- Fernandes S, Naumova AV, Zhu WZ, Laflamme MA, Gold J, Murry CE. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling

- after chronic infarction in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010. 49: 941–949
- Field CM, Alberts BM. Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex. *The Journal of cell biology*. 1995. 131: 165–178
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998. 391: 806–811
- Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 1948. 437: 55–75
- Gentric G, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2012. 36: 29–34
- Gonzalez MA, Tachibana K-eK, Adams DJ, van der Weyden L, Hemberger M, Coleman N, Bradley A, Laskey RA. Geminin is essential to prevent endoreduplication and to form pluripotent cells during mammalian development. *Genes & development*. 2006. 20: 1880–1884
- Gorla GR, Malhi H, Gupta S. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *Journal of cell science*. 2001. 114: 2943–2951
- Gu S, Chan W-Y. Flexible and versatile as a chameleon-sophisticated functions of microRNA-199a. *International journal of molecular sciences*. 2012. 13: 8449–8466
- Gude NA, Emmanuel G, Wu W, Cottage CT, Fischer K, Quijada P, Muraski JA, Alvarez R, Rubio M, Schaefer E, Sussman MA. Activation of Notch-mediated protective signaling in the myocardium. *Circulation research*. 2008. 102: 1025–1035
- Gyöngyösi M, Wojakowski W, Lemarchand P, Lunde K, Tendera M, Bartunek J, Marban E, Assmus B, Henry TD, Traverse JH, Moyé LA, Sürder D, Corti R, Huikuri H, Miettinen J, Wöhrle J, Obradovic S, Roncalli J, Malliaras K, Pokushalov E, Romanov A, Kastrup J, Bergmann MW, Atsma DE, Diederichsen A, Edes I, Benedek I, Benedek T, Pejkov H, Nyolczas N, Pavo N, Bergler-Klein J, Pavo IJ, Sylven C, Berti S, Navarese EP, Maurer G. Meta-Analysis of Cell-based CaRdiac stUdiEs (ACCRUE) in patients with acute

- myocardial infarction based on individual patient data. *Circulation research*. 2015. 116: 1346–1360
- Heallen T, Morikawa Y, Leach J, Tao G, Willerson JT, Johnson RL, Martin JF. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development (Cambridge, England)*. 2013. 140: 4683–4690
- Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysiak E, Johnson RL, Martin JF. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science (New York, N.Y.)*. 2011. 332: 458–461
- Herget G, Neuburger M, Plagwitz R, Adler C. DNA content, ploidy level and number of nuclei in the human heart after myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 1997. 36: 45–51
- Hesse M, Doengi M, Becker A, Kimura K, Voeltz N, Stein V, Fleischmann BK. Midbody Positioning and Distance Between Daughter Nuclei Enable Unequivocal Identification of Cardiomyocyte Cell Division in Mice. *Circulation research*. 2018. 123: 1039–1052
- Hesse M, Raulf A, Pilz G-A, Haberlandt C, Klein AM, Jabs R, Zaehres H, Fugemann CJ, Zimmermann K, Trebicka J, Welz A, Pfeifer A, Roll W, Kotlikoff MI, Steinhauser C, Gotz M, Scholer HR, Fleischmann BK. Direct visualization of cell division using high-resolution imaging of M-phase of the cell cycle. *Nature communications*. 2012. 3: 1076
- Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development (Cambridge, England)*. 2000. 127: 1607–1616
- Jonker SS, Faber JJ, Anderson DF, Thornburg KL, Louey S, Giraud GD. Sequential growth of fetal sheep cardiac myocytes in response to simultaneous arterial and venous hypertension. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007. 292: R913-9
- Jonker SS, Giraud MK, Giraud GD, Chattergoon NN, Louey S, Davis LE, Faber JJ, Thornburg KL. Cardiomyocyte enlargement, proliferation and maturation during chronic fetal anaemia in sheep. *Experimental physiology*. 2010. 95: 131–139

- Kellerman S, Moore JA, Zierhut W, Zimmer HG, Campbell J, Gerdes AM. Nuclear DNA content and nucleation patterns in rat cardiac myocytes from different models of cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1992. 24: 497–505
- Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, Macrae CA, Stainier DYR, Poss KD. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4(+)* cardiomyocytes. *Nature*. 2010. 464: 601–605
- Kirklin JK, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, Myers SL, Miller MA, Baldwin JT, Young JB, Naftel DC. Eighth annual INTERMACS report. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2017. 36: 1080–1086
- Kolossov E, Lu Z, Drobinskaya I, Gassanov N, Duan Y, Sauer H, Manzke O, Bloch W, Bohlen H, Hescheler J, Fleischmann BK. Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005. 19: 577–579
- Kratsios P, Catela C, Salimova E, Huth M, Berno V, Rosenthal N, Mourkioti F. Distinct roles for cell-autonomous Notch signaling in cardiomyocytes of the embryonic and adult heart. *Circulation research*. 2010. 106: 559–572
- Krishnan A, Samtani R, Dhanantwari P, Lee E, Yamada S, Shiota K, Donofrio MT, Leatherbury L, Lo CW. A detailed comparison of mouse and human cardiac development. *Pediatric research*. 2014. 76: 500–507
- Kuninty PR, Bojmar L, Tjomsland V, Larsson M, Storm G, Östman A, Sandström P, Prakash J. MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor. *Oncotarget*. 2016. 7: 16396–16408
- La Pompa JL de, Epstein JA. Coordinating tissue interactions. *Developmental cell*. 2012. 22: 244–254
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA (New York, N.Y.)*. 2003. 9: 175–179

- Lazzerini Denchi E, Celli G, Lange T de. Hepatocytes with extensive telomere deprotection and fusion remain viable and regenerate liver mass through endoreduplication. *Genes & development*. 2006. 20: 2648–2653
- Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication. *Genes & development*. 2009. 23: 2461–2477
- Left Ventricular Assist Devices for Destination Therapy. Ontario health technology assessment series. 2016. 16: 1–60
- Lesizza P, Prosdocimo G, Martinelli V, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circulation research*. 2017. 120: 1298–1304
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005. 120: 15–20
- Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports*. 2015. 11: 1566–1572
- Lindsey SE, Butcher JT, Yalcin HC. Mechanical regulation of cardiac development. *Frontiers in physiology*. 2014. 5: 318
- Liu Z, Yue S, Chen X, Kubin T, Braun T. Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circulation research*. 2010. 106: 1498–1506
- MacGrogan D, Nus M, La Pompa JL de. Notch Signaling in Cardiac Development and Disease Notch Signaling: Elsevier, 2010: 333–365
- Madra S, Styles J, Smith AG. Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSn mice during carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1995. 16: 719–727
- Magadum A, Ding Y, He L, Kim T, Vasudevarao MD, Long Q, Yang K, Wickramasinghe N, Renikunta HV, Dubois N, Weidinger G, Yang Q, Engel FB. Live cell screening platform identifies PPAR δ as a regulator of cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Cell research*. 2017. 27: 1002–1019

- Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, Kimura W, Koura AS, Thet S, Porrello ER, Sadek HA. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*. 2013. 497: 249–253
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002. 110: 563–574
- Matsuyama D, Kawahara K. Proliferation of neonatal cardiomyocytes by connexin43 knockdown via synergistic inactivation of p38 MAPK and increased expression of FGF1. *Basic research in cardiology*. 2009. 104: 631–642
- Mazelin L, Panthu B, Nicot A-S, Belotti E, Tintignac L, Teixeira G, Zhang Q, Risson V, Baas D, Delaune E, Derumeaux G, Taillandier D, Ohlmann T, Ovize M, Gangloff Y-G, Schaeffer L. mTOR inactivation in myocardium from infant mice rapidly leads to dilated cardiomyopathy due to translation defects and p53/JNK-mediated apoptosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016. 97: 213–225
- Meckert PC, Rivello HG, Vigliano C, González P, Favaloro R, Laguens R. Endomitosis and polyploidization of myocardial cells in the periphery of human acute myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2005. 67: 116–123
- Ménard C, Hagège AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Pucéat M, Menasché P. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium. *Lancet (London, England)*. 2005. 366: 1005–1012
- Miller KG, Field CM, Alberts BM. Actin-binding proteins from *Drosophila* embryos. *The Journal of cell biology*. 1989. 109: 2963–2975
- Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gnechi M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011. 50: 280–289
- Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current biology : CB*. 2012. 22: 1166–1175

- Mollova M, Bersell K, Walsh S, Savla J, Das LT, Park S-Y, Silberstein LE, Dos Remedios CG, Graham D, Colan S, Kühn B. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. 110: 1446–1451
- Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*. 2004. 24: 6710–6718
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbart M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SEW. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature medicine*. 2004. 10: 494–501
- Ogawa E, Saito Y, Harada M, Kamitani S, Kuwahara K, Miyamoto Y, Ishikawa M, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Nakagawa O, Masuda I, Kishimoto I, Nakao K. Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000. 32: 765–776
- Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Corradi D, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1996. 28: 1463–1477
- Orr-Weaver TL. When bigger is better. *Trends in genetics : TIG*. 2015. 31: 307–315
- Pandit SK, Westendorp B, Bruin A de. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends in cell biology*. 2013. 23: 556–566
- Peters JM. Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Experimental cell research*. 1999. 248: 339–349
- Philipp J, Vo K, Gurley KE, Seidel K, Kemp CJ. Tumor suppression by p27Kip1 and p21Cip1 during chemically induced skin carcinogenesis. *Oncogene*. 1999. 18: 4689–4698

- Polizzotti BD, Ganapathy B, Walsh S, Choudhury S, Ammanamanchi N, Bennett DG, Dos Remedios CG, Haubner BJ, Penninger JM, Kühn B. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. *Science translational medicine*. 2015. 7: 281ra45
- Poole AJ, Heap D, Carroll RE, Tyner AL. Tumor suppressor functions for the Cdk inhibitor p21 in the mouse colon. *Oncogene*. 2004. 23: 8128–8134
- Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (New York, N.Y.)*. 2011. 331: 1078–1080
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. 110: 187–192
- Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*. 2002. 298: 2188–2190
- Raulf A, Horder H, Tarnawski L, Geisen C, Ottersbach A, Roll W, Jovinge S, Fleischmann BK, Hesse M. Transgenic systems for unequivocal identification of cardiac myocyte nuclei and analysis of cardiomyocyte cell cycle status. *Basic research in cardiology*. 2015. 110: 33
- Reinecke H, Minami E, Poppa V, Murry CE. Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circulation research*. 2004. 94: e56-60
- Reuter S, Soonpaa MH, Firulli AB, Chang AN, Field LJ. Recombinant neuregulin 1 does not activate cardiomyocyte DNA synthesis in normal or infarcted adult mice. *PloS one*. 2014. 9: e115871
- Rumyantsev PP. Post-injury DNA synthesis, mitosis and ultrastructural reorganization of adult frog cardiac myocytes. An electron microscopic-autoradiographic study. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*. 1973. 139: 431–450

- Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circulation research*. 2014. 114: 549–564
- Seglen PO. DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell biology and toxicology*. 1997. 13: 301–315
- Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, Wu T-D, Guerquin-Kern J-L, Lechene CP, Lee RT. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013. 493: 433–436
- Shiba Y, Fernandes S, Zhu W-Z, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, van Biber B, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature*. 2012. 489: 322–325
- Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*. 2016. 538: 388–391
- Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circulation research*. 1982. 51: 787–801
- Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*. 2009. 457: 396–404
- Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *The American journal of physiology*. 1996. 271: H2183-9
- Statistisches Bundesamt, 2019: Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html#fussnote-1-119570> (Zugriffsdatum: 10.04.2019)

Steendijk P, Smits PC, Valgimigli M, van der Giessen WJ, Onderwater EEM, Serruys PW. Intramyocardial injection of skeletal myoblasts. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*. 2006. 3 Suppl 1: S94-100

Stevenson WG. Ventricular scars and ventricular tachycardia. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2009. 120: 403–412

Suzuki K, Murtuza B, Suzuki N, Smolenski RT, Yacoub MH. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. *Circulation*. 2001. 104: I213-7

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006. 126: 663–676

Tane S, Ikenishi A, Okayama H, Iwamoto N, Nakayama KI, Takeuchi T. CDK inhibitors, p21(Cip1) and p27(Kip1), participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014. 443: 1105–1109

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*. 1998. 282: 1145–1147

Toyoda H, Bregerie O, Vallet A, Nalpas B, Pivert G, Brechot C, Desdouets C. Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut*. 2005. 54: 297–302

Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DXM, Ellis SG, Forder JR, Anderson RD, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Chambers J, Baran KW, Raveendran G, Lambert C, Lerman A, Simon DI, Vaughan DE, Lai D, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Kappenman C, Westbrook L, Piller LB, Simpson LM, Baraniuk S, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Spoon DB, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction. *JAMA*. 2012. 308: 2380–2389

Unhavaithaya Y, Orr-Weaver TL. Polyploidization of glia in neural development links tissue growth to blood-brain barrier integrity. *Genes & development*. 2012. 26: 31–36

Urbanek K, Cabral-da-Silva MC, Ide-Iwata N, Maestroni S, Delucchi F, Zheng H, Ferreira-Martins J, Ogórek B, D'Amario D, Bauer M, Zerbini G, Rota M, Hosoda T, Liao R, Anversa P, Kajstura J, Leri A. Inhibition of notch1-dependent cardiomyogenesis leads to a dilated myopathy in the neonatal heart. *Circulation research*. 2010. 107: 429–441

Waring MJ. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of molecular biology*. 1965. 13: 269–282

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction. *Lancet (London, England)*. 2004. 364: 141–148

Yamada T, Sogawa K, Kim JK, Izumi K, Suzuki Y, Muramatsu Y, Sumida T, Hamakawa H, Matsumoto K. Increased polyploidy, delayed mitosis and reduced protein phosphatase-1 activity associated with excess copper in the Long Evans Cinnamon rat. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*. 1998. 99: 283–304

Zhang D, Contu R, Latronico MVG, Zhang J, Zhang JL, Rizzi R, Catalucci D, Miyamoto S, Huang K, Ceci M, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Guan K-L, Brown JH, Chen J, Sonenberg N, Condorelli G. MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010. 120: 2805–2816

Zhang P, Shan T, Liang X, Deng C, Kuang S. Mammalian target of rapamycin is essential for cardiomyocyte survival and heart development in mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014. 452: 53–59

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 & development*. 2007. 21: 2747–2761

Zhao W-M, Fang G. Anillin is a substrate of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) that controls spatial contractility of myosin during late cytokinesis. *The Journal of biological chemistry*. 2005. 280: 33516–33524

Zhou Q, Li L, Zhao B, Guan K-L. The hippo pathway in heart development, regeneration, and diseases. *Circulation research*. 2015. 116: 1431–1447

Zhu K, Wu Q, Ni C, Zhang P, Zhong Z, Wu Y, Wang Y, Xu Y, Kong M, Cheng H, Tao Z, Yang Q, Liang H, Jiang Y, Li Q, Zhao J, Huang J, Zhang F, Chen Q, Li Y, Chen J, Zhu W, Yu H, Zhang J, Yang H-T, Hu X, Wang J. Lack of Remuscularization Following Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitor Cells in Infarcted Nonhuman Primates. *Circulation research*. 2018. 122: 958–969

Zhu Y, Pires KMP, Whitehead KJ, Olsen CD, Wayment B, Zhang YC, Bugger H, Ilkun O, Litwin SE, Thomas G, Kozma SC, Abel ED. Mechanistic target of rapamycin (Mtor) is essential for murine embryonic heart development and growth. *PloS one*. 2013. 8: e54221

9. Danksagung

Zu Beginn möchte ich Prof. Dr. med. B. K. Fleischmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Ich weiß die Gelegenheit sehr zu schätzen, dieses spannende Dissertationsthema in seinem Labor und unter den damit einhergehenden herausragenden Forschungsbedingungen bearbeiten zu dürfen.

Weiterhin danke ich dem BONFOR-Forschungsförderprogramm für die wissenschaftliche Weiterbildung und die finanzielle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Hesse, der für meine Fragen stets ein offenes Ohr hatte und mir bei Problemen jeglicher Art mit Anregungen und fachlichem Rat zur Seite stand.

Ich möchte Dr. Alexandra Becker für die hervorragende Einarbeitung in die Thematik und die Laborarbeit danken. Mit ihrem praktischen und theoretischen Wissen hat sie mich bei der Anfertigung dieser Dissertation tatkräftig unterstützt.

Bedanken möchte mich auch bei allen Mitarbeitern der AG Fleischmann für die gute Arbeitsatmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors. Ein herzliches Dankeschön gilt Dr. Sarah Rieck für die Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots.

Meinem Freund Jan danke ich von Herzen für seine liebevolle Unterstützung durch die vielen herausfordernden Phasen des Studiums und der Dissertation.

Meine Eltern haben den Grundstein für meine Ausbildung gelegt und mich auf meinem Weg immer unterstützt. Dafür gebührt ihnen mein größter Dank.