Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Kardiale Effekte der m^6A-Methylierung auf micro-RNA-Bindung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Nelly Leonore Wery von Limont
aus
Hamburg

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in:	Prof. Dr. med. K. Toischer
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. A. Fischer

Prüfungskommission

Referent/in:	Prof. Dr. med. K. Toischer
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. A. Fischer
Drittreferent/in:	Prof. Dr. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 14.09.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Kardiale Effekte der m6A-Methylierung auf micro-RNA-Bindung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 09.12.2021 ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **V**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Herzinsuffizienz 1
1.1.1 Definition und Epidemiologie 1
1.1.2 Klinik der Herzinsuffizienz 3
1.1.3 Kardiales *Remodeling* 4
1.1.4 Aktuelle Behandlungsansätze der Herzinsuffizienz 9

1.2 RNA-Methylierung 11
1.2.1 m6A-Methylierung 11
1.2.2 Micro RNA 15
1.2.3 Veränderungen im kranken Herzen 20

1.3 *Human induced pluripotent stemcell-derived Cardiomyocytes* 21
1.3.1 Stimulation von Stress und Hypertrophie im *in vitro* Zellkulturmodell 23
1.3.2 Veränderungen der Expression von FTO in den hiPSC-CM 24

1.4 Fragestellungen 25

2 Material und Methoden **26**

2.1 Material 26
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, basale Medien und Enzyme 26
2.1.2 Kommerzielle Kits 27
2.1.3 Puffer und Lösungen 28
2.1.4 Medien und Lösungen in der Zellkultur 28
2.1.5 Zelllinien 30
2.1.6 RNA 30
2.1.7 qPCR-Primer 30
2.1.8 Antikörper 31
2.1.9 Labormaterialien 31
2.1.10 Laborausstattung 32
2.1.11 Software 33

2.3 Methoden 34
2.3.1 Zellkultur 34
2.3.2 Immunofluoreszenzfärbung der hiPSC-CM 39
2.3.3 Messung der Zellgröße 40
2.3.4 Isolation der RNA 40
2.3.5 Synthese der cDNA 42
2.3.6 Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion 42

2.3.7 *Methylated RNA immunoprecipitation-Sequencing* (MeRip-Seq) 43
2.3.8 Bioinformatische Analyse der MeRip-Sequenzierungsdaten 44
2.3.9 Western Blot 45
2.3.10 Software für die Visualisierung und statische Analyse 47

3 Ergebnisse 48

3.1 Differenzierung und Charakterisierung der hiPSC-CM 48

3.2 Stimulation der hiPSC-CM mit Phenylephrine und Isoprenaline 49

3.3 Stimulation der hiPSC-CM mit Endothelin-1 57

3.4 Sequenzierung der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell 64
3.4.1 Hauptkomponentenanalyse der meRip-Seq Daten 65
3.4.2 Veränderungen in der Expression der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell 67
3.4.3 Methylierung der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell 70

3.5 Etablierung des *Knock-Downs* von FTO durch siRNA-Transfektion 73

4 Diskussion 77

4.1 Erfolgreiche Etablierung eines *in vitro* Stress- und Hypertrophiemodells ...77

4.2 Charakterisierung des miRNA-Profils und dessen Methylierungsveränderungen im *in vitro* Hypertrophie-modell 80
4.2.1 Methode 81
4.2.2 Das micro RNA-Profil 83
4.2.3 Veränderung der m6A-Methylierung von miRNAs 87

4.3 Erfolgreiche Etablierung des *Knock-Downs* von FTO in den hiPSC-CM 88

4.4 Limitationen des *in vitro* Zellkulturmodells 91

4.5 Ausblick 92

5 Zusammenfassung 94

6 Anhang 97

7 Literaturverzeichnis 99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz in Deutschland 2010 im Geschlechtervergleich (NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019) 3
Abbildung 2: Kardiales *Remodeling* 5
Abbildung 3: Überblick über die Entstehung einer Herzhypertrophie bis zur Herzinsuffizienz.....6
Abbildung 4: Übersicht der am kardialen *Remodeling* beteiligten Signalwege 8
Abbildung 5: Übersicht über die m6A-Methylierung der mRNA 12
Abbildung 6: Überblick über die miRNA Biogenese 17
Abbildung 7: Zeitstrahl zum Ablauf der Differenzierung der human induced-pluripotent stemcells (hiPSCs) zu ventrikulären Kardiomyozyten (CM). Adaptiert von Cyganek et al. (2018). 35
Abbildung 8: Beispielrechnung für Zellzählung mit der Thoma-Zählkammer 36
Abbildung 9: Exemplarische Aufbereitung eines IF-Bildes zur Messung der Zellgröße 40
Abbildung 10: IF-Färbung zum Nachweis von reifen hiPSC-CM.....49
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Kontraktionsfrequenz der hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 51
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Kontraktionsfrequenz der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u 51
Abbildung 13: Expression von Nppb in den hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 nach Behandlung mit ISO oder PE 52
Abbildung 14: Expression von Nppb in den hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u nach Behandlung mit ISO oder PE.....52
Abbildung 15: Stimulation der hiPSC-CM der Zelllinie pCRTL 1.1 mit ISO 100 nm und PE 100 μm für sechs Stunden 54
Abbildung 16: Stimulation der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u mit ISO 100 nm und PE 100 μm für sechs Stunden 55
Abbildung 17: Veränderung der Stressmarker Nppb und ACTA1 bei Behandlung mit ISO und PE für sechs Stunden in der Zelllinie pCTRL 1.1.....56
Abbildung 18: Veränderung des Stressmarkers Nppb bei Behandlung mit ISO und PE für sechs Stunden in der Zelllinie WT-D2-1u 57
Abbildung 19: ET-1 Stimulation der hiPSC-CM der Zelllinie pCRTL 1.1 für 48 Stunden.....59
Abbildung 20: ET-1 Stimulation der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u für 48 Stunden.....61
Abbildung 21: Veränderung der Zellgröße der hiPSC-CM bei Behandlung mit ET-1 vs. ISO bzw. PE 63
Abbildung 22: Veränderung der Hypertrophiemarker Nppb und ACTA1 unter ET-1 in der Zelllinie pCTRL1.1 64
Abbildung 23: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der normalisierten Sequenzierungsdaten der Zelllinie pCTRL 1.1. 66
Abbildung 24: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der normalisierten Sequenzierungsdaten der Zelllinie pCTRL 1.1 nach Korrektur des *batch effect* 67
Abbildung 25: Differentiell exprimierte miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell 68

Abbildung 26: Expressionsveränderung der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell 69
Abbildung 27: Veränderung des Expressions-Levels und der Methylierungs-Level der miRNAs im i*n vitro* Hypertrophiemodell 71
Abbildung 28: Signifikant deregulierte miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell 72
Abbildung 29: Expression von FTO nach FTO-KD in den hiPSC-CM.....74
Abbildung 30: Veränderung des Proteinlevels von FTO nach FTO-KD in der Zelllinie pCTRL1.1 75
Abbildung 31: Veränderung des Proteinlevels von FTO nach FTO-KD in der Zelllinie WT-D2-1u 76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition der Herzinsuffizienz mit erhaltener (HFpEF), mäßig reduzierter (HFmrEF) und reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) adaptiert von Ponikowski et al. (2016). 2
Tabelle 2: Einteilung des Schweregrades einer Herzinsuffizienz anhand von Kriterien der NYHA (wörtlich zitiert aus der NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019 mit freundlicher Genehmigung von © ÄZQ, BÄK, KBV und AWMF 2019)....4
Tabelle 3: Therapieoptionen bei chronischer Herzinsuffizienz (wörtlich zitiert aus der NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019 mit freundlicher Genehmigung von © ÄZQ, BÄK, KBV und AWMF 2019.)....10
Tabelle 4: Chemikalien, Reagenzien, basale Medien und Enzyme 26
Tabelle 5: Kommerzielle Kits 27
Tabelle 6: Puffer und Lösungen 28
Tabelle 7: Medien und Lösungen in der Zellkultur....28
Tabelle 8: Zelllinien....30
Tabelle 9: RNA 30
Tabelle 10: qPCR-Primer 30
Tabelle 11: Primäre Antikörper....31
Tabelle 12: Sekundäre Antikörper 31
Tabelle 13: Labormaterialien 31
Tabelle 14: Labormaterialen....32
Tabelle 15: Software....33
Tabelle 16: Reaktionsansätze für Transfektion der siRNA in die hiPSC-CM. 39
Tabelle 17: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese aus RNA 42
Tabelle 18: Programm für die cDNA-Synthese im Thermo Cycler 42
Tabelle 19: Reaktionsansatz für die qPCR....43
Tabelle 20: Programm zur DNA-Amplifikation mit dem *iQ5-real time PCR* Gerät..43
Tabelle A21: Analyse der Frequenz [Hz] der hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 in den verschiedenen Konditionen Kontrolle, ISO 100 nm und 10 μm, PE 20 μm und 100 μm nach 30 min und 24 h Behandlungsdauer (n = 1). 97
Tabelle A22: Analyse der Frequenz [Hz] der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u in den verschiedenen Konditionen Kontrolle, ISO 100 nm und 10 μm, PE 20 μm und 100 μm nach 30 min und 24 h Behandlungsdauer (n = 1). 97
Tabelle A23: Veränderung der relativen Nppb-Expression in den hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Behandlung mit ISO oder PE im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 1). 97
Tabelle A24: Veränderung der relativen Nppb-Expression in den hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Behandlung mit ISO oder PE im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 1). 97

Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	*Angiotensin-converting-enzym*-Hemmer
ACTA1	*Actin alpha 1*
AGO	Argonautenprotein
ALKBH5	AlkB Homolog 5
Ang II	Angiontensin II
ANP	*Atrial natriuretic peptid*
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	*Brain natriuretic peptide*
bp	Basenpaare
CaMKII	*Calcium-Calmodulin-dependent proteinkinase II*
cAMP	*Cyclic adenosine monophosphate*
cDNA	Komplementäre DNA
cGMP	*Cyclic guanosine monophosphate*
CRT	Kardiale Resynchronisationstherapie
CT	*Cycle threshold*
cTNT	*Cardiac troponin*
DAG	*Diaglycerol*
DAPI	4‘,6-Diamidin-2-Phenylindol
DGCR8	*DiGeorge syndrome critical region gene*
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
ds	Doppelstrang
DZNE	Deutsches Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen Göttingen
ERK	*Extracellular-signal regulated kinases*
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FTO	*Fat mass and obesity-associated protein*
g	G-Zahl (Beschleunigungsgröße der Zentrifuge)
GATA4	*GATA binding protein 4*
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	*Histon deacetylase*
hESC	Humane embryonale Stammzelle
HFmrEf	Herzinsuffizienz mit mäßig reduzierter Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
hiPSC	*Human induced pluripotent stemcell*
hiPSC-CM	*Human induced pluripotent Stemcell derived Cardiomyozyte*
hnRNPs	*Heterogenous nuclear ribonucleoproteins*
ICD	Implantierbarer Defibrillator

IF	Immunofluoreszenz
IP	Immunopräzipitation
IP3	*Inositol triphosphate*
iPSC	*Induced pluripotent stemcell*
ISO	Isopreanline
JNK	*c-Jun N-terminal kinases*
KD	*Knock-Down*
KHK	Koronare Herzerkrankung
KO	*Knock-Out*
lncRNA	*Long non-coding RNA*
log2fc	log2 *fold change*
LVAD	Linksventrikuläres Herzunterstützungssytem
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
m6A	N6-Methyladenosin
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MEF2	*Myocyte-specific enhancer factor 2*
METTL14	*Methyltransferase like 14*
METTL3	*Methyltransferase like 3*
MHC	*Myosin heavy chain*
miRip-Seq	*Methyated RNA-immunoprecipitation sequencing*
miRNA	*Micro RNA*
MKK	*Mitogen-activated protein kinase kinase*
mRNA	*Messenger RNA*
NFAT	*Nuclear factor of activated T-cells*
NGS	*Next generation sequencing*
Nppa	*Natriuretic peptides A*
Nppb	*Natriuretic peptides B*
nt	Nukleotide
NYHA	New York Heart Association
P38	*P38 kinase*
padj	*Adjusted p-value*
PCA	*Principal component analsysis* (Hauptkomponentenanalyse)
PE	Phenylephrine
PKA	*Protein kinase A*
PKC α/D/G	*Proteinkinase C alpha/D/G*
PLC	*Phospholipase C*
PLN	*Phospholamban*
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ran	*Ras-relataed nuclear protein*
rcf	*Relative centrifugal force*
RISC	*RNA-induced Silencing Complex*

RNA	*Ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
ROS	*Reactive oxygen species* (Reaktive Sauerstoffspezies)
rRNA	*Ribosomale RNA*
RT	Raumtemperatur
RyR2	*Ryanodine receptor 2*
SAM	S-Adenosinmethionin
SEM	*Standard error of the mean* (Standardfehler)
SERCA2A	*Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2*
siRNA	*Small interfering RNA*
snoRNA	*Small nucleolar RNA*
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	*Transverse aortic constriction*
UTR	Untranslatierte Region
WTAP	*Wilm's tumor associated protein*
YTHDC	*YT521-B homology domain containing*
YTHDF	*YT521-B homology domain family*

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Herzinsuffizienz ist ein komplexes klinisches Syndrom, dass über ihre Symptome und Zeichen definiert wird. Es liegt eine systolische bzw. diastolische Dysfunktion des Herzens vor, die bedingt ist durch eine verminderte Auswurfsleistung bzw. erhöhte Füllungsdrücke des Herzens (Herold 2018). Die Herzinsuffizienz ist Folge verschiedener Erkrankungen. In 70 - 90% der Fälle spielen eine arterielle Hypertonie oder eine koronare Herzerkrankung (KHK) eine wichtige Rolle bei der Entstehung. Seltenere Ursachen sind hingegen Arrhythmien, nicht-ischämische Kardiomyopathien, Klappen- und Perikarderkrankungen. Zu den wichtigen Risikofaktoren für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz gehören neben arterieller Hypertonie und KHK auch Diabetes Mellitus, Rauchen, hoher Alkoholkonsum, körperliche Inaktivität, Adipositas, familiäre Disposition für Kardiomyopathien und einige Medikamente bzw. Therapien von Tumoren (NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019). Die Prognose ist stark abhängig von den jeweils vorliegenden Risikofaktoren. Insbesondere die ventrikuläre Hypertrophie stellt einen wichtigen Prädiktor für die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität dar (Samak et al. 2016).

Die Herzinsuffizienz lässt sich nach verschiedenen Kriterien einteilen. Die Einteilung nach Ort des Auftretens erfolgt in Linksherzinsuffizienz, Rechtsherzinsuffizienz sowie globale Herzinsuffizienz und nach zeitlichem Verlauf in eine akute oder chronische Form (NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019). Die gängigste Klassifizierung berücksichtigt die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF). Hieraus ergeben sich drei Untergruppen (Tabelle 1). Bei der Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) liegt die LVEF unter 40%. Diese verminderte linksventrikuläre Pumpfunktion ist bedingt durch eine Kontraktionsstörung des Herzens. Es handelt sich folglich um eine systolische Herzinsuffizienz, die mit einer exzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels einhergeht. Durch die Längenzunahme der Kardiomyozyten kommt es zu einer Wandverdünnung und es liegt ein reduziertes Verhältnis von Ventrikelmasse zu enddiastolischen Volumen vor. Bei der Herzinsuffizienz mit

mäßig reduzierter Ejektionsfraktion (HFmrEf) liegt die LVEF zwischen 40 - 49%. Die Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) ist definiert über eine erhaltene LVEF mit ≥ 50%. Hier handelt es sich um eine diastolische Herzinsuffizienz, bei der es zur gestörten Füllung des Ventrikels bei erhaltener systolischer Pumpfunktion kommt. Infolge dessen kommt es zu einer konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels, wobei das Verhältnis zwischen Ventrikelmasse und enddiastolischen Volumen erhöht ist (Braunwald 2013; Ponikowski et al. 2016; Nakamura und Sadoshima 2018).

Tabelle 1: Definition der Herzinsuffizienz mit erhaltener (HFpEF), mäßig reduzierter (HFmrEF) und reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) adaptiert von Ponikowski et al. (2016).

Herzinsuffizienztyp		**HFrEF**	**HFmrEF**	**HFpEF**
Kriterien	**1**	Symptome +/- Zeichen	Symptome +/- Zeichen	Symptome +/- Zeichen
	2	LVEF < 40%	LVEF 40 - 49%	LVEF ≥ 50%
	3	-	1. Erhöhtes Level natriuretischer Peptide 2. Mind. ein zusätzliches Kriterium: a. Relevante strukturelle Herzerkrankung b. Diastolische Dysfunktion	1. Erhöhtes Level natriuretischer Peptide 2. Mind. ein zusätzliches Kriterium: a. Relevante strukturelle Herzerkrankung b. Diastolische Dysfunktion

Mit einer Prävalenz von 1 - 2% ist die Herzinsuffizienz ein gesamtgesellschaftlich relevantes und ernstzunehmendes Krankheitsbild, deren Prävalenz in den höheren Altersgruppen zunimmt. Von den über Siebzigjährigen sind mehr als 10% betroffen (Ponikowski et al. 2016). Dies ist u. a. auf die allgemein höhere Lebenserwartung sowie die verbesserten Überlebenschancen zurückzuführen. In den letzten Jahren zeigte sich ein Anstieg der Prävalenz der HFpEF an der Gesamtprävalenz (von 41% auf 56%), während der Anteil der HFrEF (von 44% auf 31%) und HFmrEF (von 15% auf 13%) abfiel. Die Neuerkrankungsrate einer Herzinsuffizienz lag 2010 in Deutschland bei 4,7% in der erwachsenen Bevölkerung. Während die Gesamtinzidenz zwischen den Geschlechtern mit 4,2% bei den Männern und 5% bei den Frauen relativ gleich verteilt ist, weisen Männer die höchste Neuerkrankungsrate im Alter von 75 - 79 Jahren auf und Frauen im Alter von 80 - 84 Jahren (Abbildung 1). Das Lebenszeitrisiko an einer Herzinsuffizienz im Alter von 55 Jahren zu erkranken, liegt für Männer bei 33% und für Frauen bei 28%. Die Herzinsuffizienz verursachte 2015 in Deutschland 5,1% aller Todesfälle und war damit die zweit häufigste Todesursache bei Frauen und die viert häufigste bei Männern. Die Sterblichkeit ist im Geschlechtervergleich ähnlich und nimmt in Abhängigkeit von Alter und Stadium gemäß der New York Heart Association (NYHA)-Klassifikation stark zu. Im

Rahmen der Erkrankung werden jährlich fast 50% der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz einmal stationär behandelt und sie ist somit die häufigste Ursache für eine Hospitalisierung bei Erwachsenen. Hierdurch entstehen jährlich hohe Kosten für das Gesundheitssystem (2,9 Millionen Euro in Deutschland 2006 (Neumann et al. 2009)). Eine wiederholte Hospitalisierung gilt als Indikator für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko (NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019).

Abbildung 1: Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz in Deutschland 2010 (nach [24])

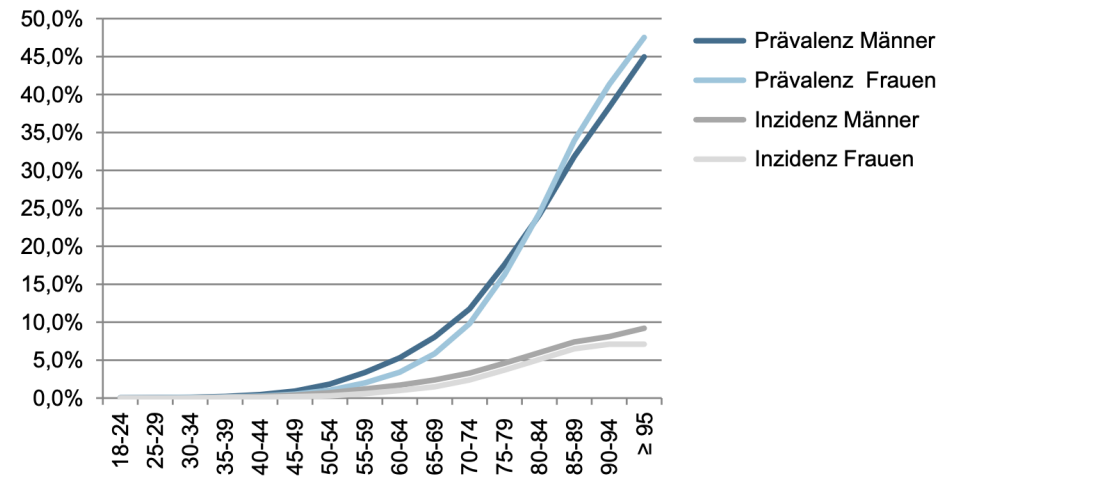

Abbildung 1: Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz in Deutschland 2010 im Geschlechtervergleich (NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019)

Übernommen aus der NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019 mit freundlicher Genehmigung von © ÄZQ, BÄK, KBV und AWMF 2019.

1.1.2 Klinik der Herzinsuffizienz

Die Symptome einer Herzinsuffizienz sind vielfältig und insbesondere von dem jeweilig zugrundeliegenden Pumpdefizit abhängig. Bei der Linksherzinsuffizienz kommt es durch die verminderte linksventrikuläre Pumpfunktion zum Rückwärtsversagen mit Rückstau des Blutes vor dem linken Herzen. Hierdurch treten Symptome wie Dyspnoe, Tachypnoe, nächtliche Hustenanfälle mit Dyspnoe (Asthma cardiale), Zyanose, pulmonale Stauung, Pleuraergüsse und Lungenödeme auf. Bei einer weiter fortgeschrittenen Dysfunktion des linken Herzens kommt es zusätzlich zum Vorwärtsversagen, wobei sich das Blut in den großen Kreislauf zurück staut. Dies führt zu Leistungsminderung und Schwächegefühlen, zerebraler Minderperfusion und renaler Perfusions- und Funktionsminderung. Bei der Rechtsherzinsuffizienz tritt das Rückwärtsversagen durch den Rückstau vor dem rechten Herzen auf, wodurch sich das Blut weiter in den systemvenösen Kreislauf zurück staut. Der hydrostatische Druck in den

Kapillaren steigt an und daraus folgt ein vermehrter Flüssigkeitsaustritt in das Interstitium. Die Patienten leiden unter Beinödemen, einer Stauungsleber mit Hepatomegalie, Gewichtszunahme, erhöhtem zentralen Venendruck mit sichtbarer Venenstauung und Stauung weiterer Organe wie Magen oder Niere. Symptome, die sowohl bei einer Links- als auch einer Rechtsherzinsuffizienz auftreten, sind Nykturie, Leistungsminderung und eine erhöhte Sympathikus-aktivität, die sich in Form einer Tachykardie oder weiteren Herzrhythmus-störungen äußern kann (Herold 2018).

Die Einteilung des Schweregrades einer Herzinsuffizienz erfolgt anhand von Kriterien der New York Heart Association (NYHA). Diese Klassifikation unterteilt die Herzinsuffizienz in die vier Stadien asymptomatisch (NYHA I), leicht (NYHA II), mittelschwer (NYHA III) und schwer (NYHA IV) anhand der subjektiven Beschwerden des Patienten (Tabelle 2) (NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019).

Tabelle 2: Einteilung des Schweregrades einer Herzinsuffizienz anhand von Kriterien der NYHA (wörtlich zitiert aus der NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019 mit freundlicher Genehmigung von © ÄZQ, BÄK, KBV und AWMF 2019)

NYHA I (asymptomatisch)	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
NYHA II (leicht)	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe und bei geringer Anstrengung. Stärkere körperliche Belastung (z. B. Bergaufgehen oder Treppensteigen) verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
NHHA III (mittelschwer)	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastungen (z. B. Gehen in der Ebene) verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
NYHA IV (schwer)	Herzerkrankung mit Beschwerden in allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe, Bettlägerigkeit.

1.1.3 Kardiales *Remodeling*

Die Herzinsuffizienz ist das Resultat einer absoluten oder relativen Erhöhung der hämodynamischen Last. Im Herzen kommt es zu komplexen und bisher nur in Ansätzen verstandenen Prozessen, die unter dem Oberbegriff kardiales *Remodeling* zusammengefasst werden (Abbildung 2). Das kardiale *Remodeling* führt zur Reduktion der kardialen Kontraktilität und Kraftentwicklung und so zu

relevanten hämodynamischen Veränderungen (Braunwald 2013; van Berlo et al. 2013) .

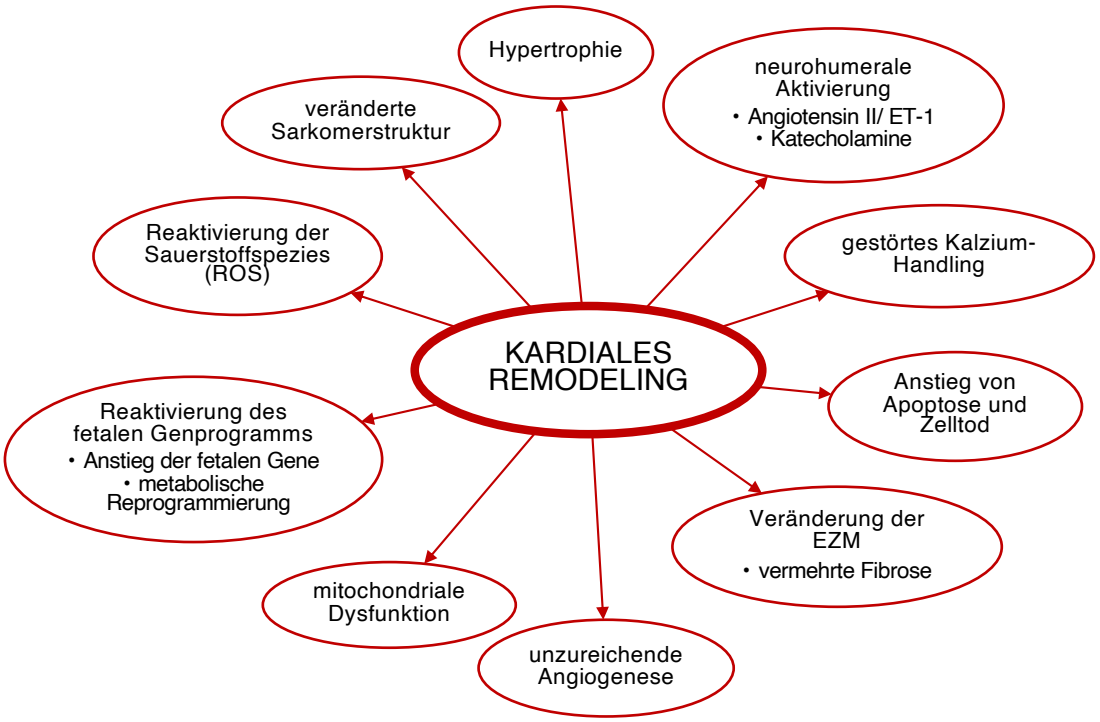

Abbildung 2: Kardiales *Remodeling*

Überblick über die Prozesse, die am kardialen *Remodeling* beteiligt sind und zur pathologischen Herzinsuffizienz führen. Adaptiert von Nakamura und Sadoshima (2018).

Die kardiale Hypertrophie ist zunächst ein kompensatorischer Prozess und wird erst im Verlauf maladaptiv (Abbildung 3). Das hypertrophe Wachstum stellt somit eine adaptive Antwort auf Stress dar, wobei die Kardiomyozyten an Zellgröße zunehmen und es so zu einer Herzvergrößerung kommt, ohne dass sich die Anzahl der Kardiomyozyten ändert. Die kardiale Leistung bessert sich temporär und die Pumpfunktion kann so aufrechterhalten werden. Die Kardiomyozyten weisen zunächst ein vermehrtes Wachstum in die Breite im Vergleich zur Länge auf, wodurch es zur konzentrischen Hypertrophie mit Wandverdickung und Verlust von Kammerfläche kommt. Die ventrikuläre Wandspannung wird durch Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels reduziert und der Sauerstoff-verbrauch sinkt. Durch anhaltenden Stress und dauerhafte Aktivierung der kompensatorischen Prozesse kommt es schließlich zur Dekompensation und Umwandlung in eine exzentrische Hypertrophie. Hierbei nehmen die Kardiomyozyten vermehrt an Länge zu, was zu einer Kammervergrößerung mit Verlust der Wanddicke und Erhöhung der Wandspannung führt. Dieser Prozess wird begleitet von kardialer Dysfunktion und Fibrose. Eine langanhaltende

Hypertrophie des Herzens steigert das Risiko für Arrhythmien, plötzlichen Herztod, dilatative Kardiomyopathie und Herzversagen (van Berlo et al. 2013; Nakamura und Sadoshima 2018).

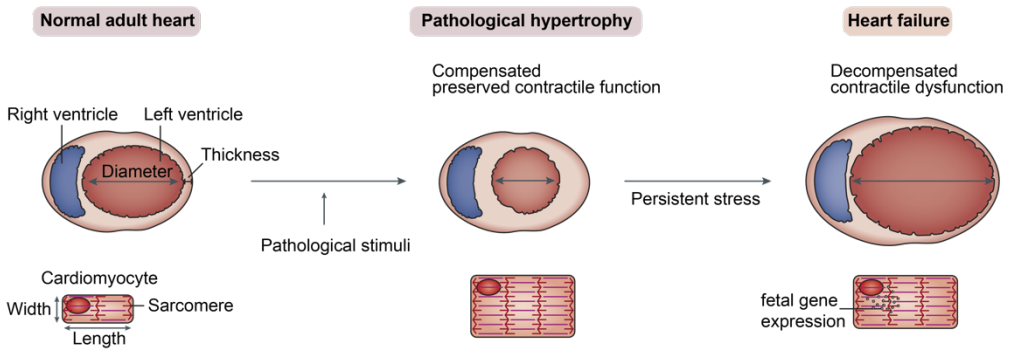

Abbildung 3: Überblick über die Entstehung einer Herzhypertrophie bis zur Herzinsuffizienz

Das normale adulte Herz (links) reagiert auf die pathologischen Stimuli mit Hilfe von Kompensationsmechanismen. Es entwickelt sich zunächst eine kompensierte kardiale Hypertrophie mit erhaltender Pump- und Kontraktionsfunktion (Mitte). Die Kardiomyozyten nehmen vermehrt an Breite zu, wodurch sich eine konzentrische Hypertrophie entwickelt. Anhaltender Stress führt unter Dekompensation der Herzfunktion zum Herzversagen (rechts). Durch eine vermehrte Zunahme in der Länge der Kardiomyozyten entwickelt sich hierunter eine exzentrische Hypertrophie. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dawid Lbik. Adaptiert von Nakamura und Sadoshima (2018).

Der vermehrte mechanische Stress auf das Herzen erhöht die Proteinbiosynthese (Liu et al. 2016) und trägt zur Veränderung der Genexpression bei, welche ihrerseits Veränderungen im Metabolismus, in Kontraktilität und im Überleben der Kardiomyozyten induziert (Nakamura und Sadoshima 2018). Stressbedingt werden neuroendokrine Hormone vermehrt ausgeschüttet und beeinflussen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren verschiedene Signalwege (Abbildung 4). Dieser zunächst hilfreiche Kompensationsmechanismus führt bei langfristiger Aktivierung ebenfalls zum maladaptiven *Remodeling* des Herzens (Braunwald 2013). Die Peptidhormone Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin II (Ang II) führen über ihre Rezeptorbindung zur Aktivierung der *phospholipase C* (PLC), welche wiederum die Synthese von *inositol triphosphate* (IP3) und *diaglycerol* (DAG) katalysiert. IP3 fördert die intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasamtischen Retikulum (SR) über IP3-Rezeptoren und trägt so zur Aktivierung des Calcium-Calmodulin-Komplexes und Calcineurin bei. Der Calcium-Calmodulin-Komplex reguliert die kardiale Kontraktilität, indem er die Phosphorylierung von *phospholamban* (PLN) reduziert und so die SERCA2A-Aktivität hemmt. Calcineurin dephosphoryliert

den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), wodurch dessen nukleäre Lokalisation zunimmt. NFAT interagiert mit dem *GATA binding protein 4* (GATA4) und *myocyte enhancer factor-2* (MEF2) zur Stimulation der Expression von prohypertrophen Genen. DAG aktiviert einerseits über die *protein kinase C* (PKC) den RAS-Signalweg konstitutiv, welcher über die *extracellular-signal regulated kinases 1/2* (ERK1/2) zur Expression prohypertropher Gene führt. Andererseits kommt es zur Hemmung der *histon deacetylase* (HDAC), was den Wegfall dessen hemmenden Einflusses im Nukleus zur Folge hat (Nakamura und Sadoshima 2018). Katecholamine sind als neuroendokrine Hormone Teil des adrenergen Systems, das ein wichtiger Regulator der kardialen Leistung ist. Über die Bindung an Beta-Rezeptoren (ß-Rezeptoren) und Erhöhung von *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) aktivieren sie physiologisch die *proteinkinase A* (PKA). Diese fördert die Phosphorylierung von Proteinen des Kalziumhaushaltes und der Kontraktilität. Es kommt zur Erhöhung der Kontraktilität (positiv inotrop), Zunahme der Schlagfrequenz (positiv chronotrop) und Umverteilung des kardialen Auswurfs. Pathologische Reize führen über eine chronische Stimulation der ß-Rezeptoren zum Verlust der positiven Effekte der Chronotropie und Inotropie. Sie fördern stattdessen die pathologische Hypertrophie und Desensibilisierung der ß-Rezeptoren (Nakamura und Sadoshima 2018). Der MAPK-Signalweg spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entstehung der pathologischen Hypertrophie. Die Aktivierung über z. B. mechanische Reize führt über die Signalwege p38, JNK und ERK zur Phosphorylierung und Aktivierung der u. a. GATA4 vermittelten Transkription im Nukleus (van Berlo et al. 2013).

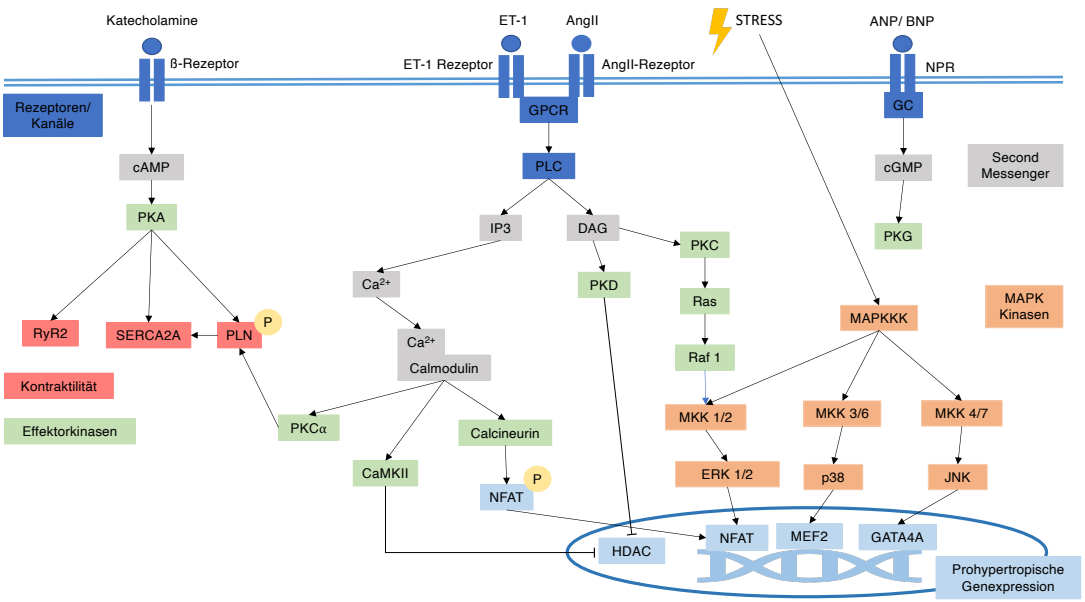

Abbildung 4: Übersicht der am kardialen *Remodeling* beteiligten Signalwege

Vereinfachte Übersicht der Signalwege, die am kardialen *Remodeling* und so bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz maßgeblich beteiligt sind. Ang II = Angiotensin II, ANP = *atrial natriuretic peptid*, BNP = *brain natriuretic peptide*, Ca^{2+} = *calcium*, CaMKII = *calcium-calmodulin-dependent proteinkinase II*, cAMP = *cyclic adenosine monophosphate*, cGMP = *cyclic guanosine monophosphate*, DAG = *diaglycerol*, ERK = *extracellular-signal regulated kinases*, ET-1 = Endothelin-1, GATA4 = *GATA binding protein 4*, GC = *guanylate cyclase*, GPCR = *G protein-coupled receptor*, HDAC = *histon deacetylase*, IP3 = *inositol triphosphate*, JNK = *c-Jun N-terminal kinases*, MAPKK= *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*, MEF2 = *myocyte-specific enhancer factor 2*, MKK = *mitogen-activated protein kinase kinase*, NFAT = *nuclear factor of activated T-cells*, NPR= *natriuretic peptide receptor*, P = *phosphat*, p38 = *p38 kinase*, PKA = *protein kinase A*, PKC α/D/G = *protein kinase C alpha/D/G*, PLC = *phospholipase C*, PLN = phosopholamban, RyR2 = *ryanodine receptor 2*, SERCA2A = *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2* (van Berlo et al. 2013; Nakamura und Sadoshima 2018).

Durch die Veränderung der Genexpression kommt es zum gestörten Kalzium-*Handling* mit Dysregulation des Kalziumflusses und Verringerung der kardialen Kontraktilität. Ein veränderter *ryanodin receptor 2* (RyR2) führt zu einem diastolischem Kalziumleck, wodurch der Kalziumgehalt des SRs abnimmt, und weniger Kalzium freigesetzt werden kann. Die Funktionsminderung der SERCA2A lässt ebenfalls den Kalziumgehalt im SR durch einen verminderten Rücktransport aus dem Zytoplasma in das SR sinken. Dies hemmt die ventrikuläre Relaxation (Braunwald 2013; Nakamura und Sadoshima 2018).

Oxidativer Stress führt zu einer Reaktivierung der *reactive oxygen species* (ROS), welche viele Signalwege aktivieren, die in hypertrophes Wachstum und *Remodeling* involviert sind (Samak et al. 2016). Des Weiteren trägt ROS zur Veränderung der extrazellulären Matrix (EZM) bei. Die verstärkte Synthese von

EZM und Ansammlung von Kollagen v. a. Typ 1 und weiteren extrazellulären Matrixproteinen führt zum fibrotischen Umbau des Herzens mit Zunahme der myokardialen Steifigkeit und Reduktion der ventrikulären Relaxations- und Kontraktionsfähigkeit. Die Ventrikelwand verdünnt sich zunehmend und die linksventrikuläre Pumpfunktion wird weiter eingeschränkt (Da Costa Martins und De Windt 2012; Samak et al. 2016; Nakamura und Sadoshima 2018).

Im Rahmen des kardialen *Remodelings* kommt es zur Reaktivierung fetaler Genprogramme, wobei Signalkaskaden aktiviert werden, die die Verschiebung des adulten zum fetalen Genprogramm fördern. Dies geschieht z. B. durch eine Druck- oder Volumenbelastung oder Stimulation mit ET-1, Ang II oder Katecholaminen. Ein Anstieg der fetalen Gene *ACTA1*, *MHY7*, *NPPA*, *NPPB* und *ß-MHC* ist charakteristisch für die pathologische Hypertrophie. Dazu kommt es zur metabolischen Reprogrammierung in Richtung fetaler Energiequellen. Die Energieproduktion aus der Fettsäure-Oxidation wird reduziert zugunsten einer Erhöhung von Kohlenhydrat-abhängigen Energiestoffwechselvorgängen wie der Glykolyse (Samak et al. 2016; Nakamura und Sadoshima 2018).

Im Zuge der vermehrten Dehnung der Ventrikel bzw. Atrien kommt es zur Freisetzung natriurtischer Peptide wie *brain natriuretic peptide* (BNP) und *atrial natriuretic peptide* (ANP). Diese wirken über Bindung an ihre entsprechenden Rezeptoren vasodilatorisch, natriuretisch und diuretisch und hemmen das sympathische und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Abbildung 4). Sie haben damit einen antihypertrophen und kardioprotektiven Effekt (Aggarwal et al. 2014; Nakamura und Sadoshima 2018). Der Spiegel von BNP und NT-pro BNP steigt bei zunehmender Herzinsuffizienz an und kann so zur Diagnosesicherung und Prognoseeinschätzung klinisch genutzt werden (Braunwald 2013).

Weitere Prozesse, die zum kardialen *Remodeling* beitragen, sind eine Zunahme der Apoptose und des Zelltods, Veränderungen der Sarkomerstrukturen, entzündliche Zellinfiltrationen, mitochondriale Dysfunktion und eine unzureichende Angiogenese (Braunwald 2013).

1.1.4 Aktuelle Behandlungsansätze der Herzinsuffizienz

Zur Prävention und zum Aufhalten der Progression einer Herzinsuffizienz müssen der hämodynamische Stress und die Herzbelastung reduziert werden (Samak et al. 2016). Der aktuelle therapeutische Ansatz einer HFrEF basiert im Wesentlichen auf vier Säulen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Therapieoptionen bei chronischer Herzinsuffizienz (wörtlich zitiert aus der NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019 mit freundlicher Genehmigung von © ÄZQ, BÄK, KBV und AWMF 2019.)

Therapieoptionen bei chronischer Herzinsuffizienz			
Kausale Therapie der Ursachen	**Nicht-medikamentöse Therapie**	**Medikamentöse Therapie**	**Apparative oder operative Therapie**
- KHK - Vitien - Arrythmien - Anämie - ...	- Schulungen - körperliches Training - Lebensstilmodifikation	- Prognoseverbessernd - Symptomverbessernd	- CRT - ICD - LVAD - Herztransplantation

Die erste Säule bildet die kausale Therapie von ursächlichen Erkrankungen wie KHK, Arrhythmien und Klappenvitien. Die zweite Säule sind nicht-medikamentöse Therapien, welche Schulungen, körperliches Training und Lebensstilmodifikation beinhalten und ein hohes Maß an Compliance des Patienten erfordern (NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019).

Bei der dritten Säule, der medikamentösen Therapie, wird zwischen prognoseverbessernden und symptomorientierten Ansätzen unterschieden. Die prognoseverbessernden Medikamente wirken vor allem über die Blockade neurohumoraler Signalwege und können so die Überlebenszeit des Patienten verbessern. Als Standardmedikation werden ab NYHA-Stadium I *Angiotensin Converting Enzym* (ACE)-Hemmer bzw. Angiotensin 1 (AT1)-Rezeptorblocker (bei bestehender Kontraindikation/ Nebenwirkungen für ACE-Hemmer) verwendet. Dies führt über die Hemmung des RAAS zu einem Rückgang der maladaptiven Hypertrophie und induziert ein positives ventrikuläres *Remodeling* (van Berlo et al. 2013; Herold 2018; Nakamura und Sadoshima 2018). Beta-Blocker wirken über die Antagonisierung der ß-adrenergen Rezeptoren, wodurch es zum Rückgang der Desensibilisierung dieser kommt. Durch ihren anti-hypertrophen Effekt können sie das negative ventrikuläre *Remodeling* und die Hypertrophieentwicklung unterdrücken (van Berlo et al. 2013; Nakamura und Sadoshima 2018). Ihr Nutzen konnte bei NYHA-Stadium I nur bei Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden und wird bei diesen Patienten standardmäßig empfohlen (Ponikowski et al. 2016; Herold 2018). Die Blockade der Aldosteronrezeptoren mit Mineralkortikoid-Rezeptoranatgonisten ist ab NYHA-Stadium II mit einer LVEF ≤ 35% empfohlen (Ponikowski et al. 2016). Ebenfalls haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass ab NYHA-Stadium II mit einer LVEF ≤ 35% Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren (ARNI) das Überleben der Patienten verbessern, wenn diese deutlich erhöhte BNP- oder ANP-Spiegel aufweisen (Ponikowski et al. 2016). Ivabradin ist ein Kanalblocker

der sog. *funny channels* im Sinusknoten und kann ab NYHA-Stadium II in Kombination mit der Basistherapien eingesetzt werden, wenn ein Sinusrhythmus mit einer Herzfrequenz > 70/min vorliegt (Ponikowski et al. 2016). Die symptomorientierten Medikamente zielen auf eine Verbesserung der Beschwerden des Patienten ab. Hierzu zählen Diuretika, die über die Einstellung und den Erhalt eines ausgeglichenen Volumenhaushalts, Symptome und Zeichen einer Stauung reduzieren können. Bei einer symptomatischen Herzinsuffizienz oder Vorliegen einer Tachyarrhythmie können Herzglykoside zur Senkung der schnellen Herzfrequenz eingesetzt werden (Ponikowski et al. 2016; Herold 2018).

Die vierte Säule in der Behandlung einer Herzinsuffizienz basiert auf apparativen und operativen Verfahren, wie der kardialen Resynchronisationstherapie (CRT), implantierbaren Defibrillatoren (ICD), linksventrikulären Herzunterstützungs-sytemen (LVAD) und als ultima ratio die Herztransplantation (NVL Chronische Herzinsuffizienz 2019). Neuere Studien konnten insbesondere für eine dauerhafte LVAD-Unterstützung eine Umkehr des kardialen *Remodelings* nachweisen (Braunwald 2013).

Die aktuellen Behandlungsansätze zielen im Wesentlichen darauf ab, die Ursachen, die pathologische Hypertrophie und das kardiale *Remodeling* über verschiedene Pharmaka zu beeinflussen. Der positive Effekt auf das Herz und die Reduktion der Hypertrophie und des *Remodelings* ist auf eine Begrenzung der neuroendokrinen und intrazellulären Signalübertragung zurückzuführen, die zum Wachstum der Kardiomyozyten beitragen. Allerdings ist die Effizienz der Ansätze limitiert und es lässt sich wenig Rückgang nachweisen. Oftmals kommt es auch unter Therapie zu einer weiteren Progression der Herzinsuffizienz (van Berlo et al. 2013). Aufgrund dieses limitierten klinischen Erfolges werden dringend neue Ansätze in der Therapie der Herzinsuffizienz benötigt, die die zugrungeliegenden Mechanismen besser erfassen und so gezielter wirken können.

1.2 RNA-Methylierung

1.2.1 m6A-Methylierung

N6-Adenosin Methylierung (m6A) ist die häufigste posttranskriptionale Modifikation in den verschiedenen *ribonucleic acid* (RNA)-Klassen und ist sowohl dynamisch und als auch reversibel (Fu et al. 2014). Sie ist nicht nur auf

messenger RNA (mRNA) (Desrosiers et al. 1974) zu finden, sondern auch auf *ribosomal RNA* (rRNA) (Meyer et al. 2012), *transfer RNA* (tRNA) (Meyer et al. 2012), *small nuclear RNA* (snRNA) (Linder et al. 2015), *long non-coding RNA* (lncRNA) (Fu et al. 2014; Patil et al. 2016) und *micro RNA* (miRNA) (Berulava et al. 2015) und ist evolutionär hochgradig konserviert. Je nach Gewebeart ist der Grad der Methylierung unterschiedlich. Die mRNA ist nicht gleichmäßig methyliert, sondern insbesondere auf langen Exons, in der Nähe von Stopcodons und in der 3'- und 5'-untranslatierten Region (UTR). Hierbei weisen die 3'UTRs ein höheres m6A-Level auf als die 5'UTRs. In der 3'UTR ist sie vor allem im ersten Viertel zu finden und die Anzahl der m6A-Modifikationen nimmt mit Länge der 3'UTR ab (Meyer et al. 2012; Berulava et al. 2015). S-Adenosinmethionin (SAM) dient als Methylgruppendonator, wobei ein hohes Level an SAM die Methylierung fördert und ein niedriges die Demethylierung (McGuinness DH und McGuinness D 2014).

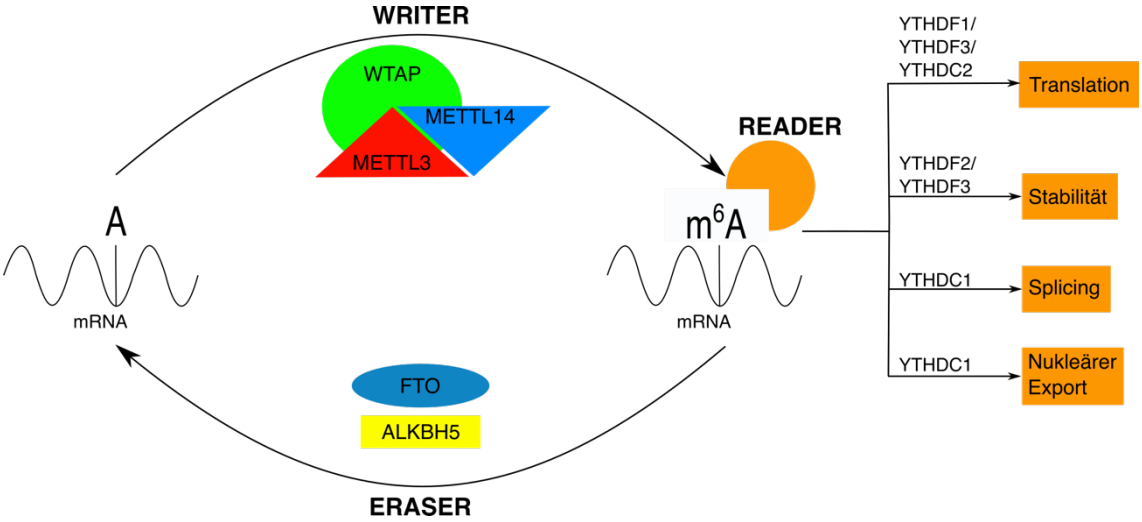

Abbildung 5: Übersicht über die m6A-Methylierung der mRNA

Der Methyltransferasekomplex besteht aus METTL3, METTL14 und WTAP und fungiert als *writer* d. h. überträgt eine Methylgruppe auf das Adenosin. Als *eraser* werden die Demethylasen FTO und ALKBH5 bezeichnet, welche die Methylgruppe wieder entfernen. Die Leseproteine, sogenannte *reader*, binden selektiv m6A auf der mRNA und vermitteln so m6A-abhängige Funktionen. Adaptiert von Deng et al. (2018).

Die Methylierung der mRNA erfolgt durch einen Methyltransferasekomplex, dessen Kern aus *methyltransferase like 3* (METTL3), *methyltransferase like 14* (METTL14) und *wilm's tumor associated protein* (WTAP) besteht (Abbildung 5). METTL3 ist ein SAM-Bindeprotein mit Methyltransferaseaktivität und befindet sich im Nukleus und Zytoplasma. Es methyliert bevorzugt die GAC bzw. AAC-Motive von Einzelstrang-RNA. Seine Bindestellen liegen vor allem in Introns (Meyer und Jaffrey 2014; Cao et al. 2016; Yang et al. 2018). METTL14 formt

zusammen mit METTL3 ein stabiles Heterodimer. Hierbei bildet METTL3 das katalytisch aktive Zentrum, während METTL14 selber katalytisch inaktiv ist, da es kein funktionsfähiges SAM-Bindemotiv besitzt (Wang X et al. 2016; Zaccara et al. 2019). Gemeinsam haben sie einen synergistischen Effekt und methylieren effektiv die Konsenssequenz GGACU (Liu et al. 2014). Die primären Funktionen von METTL14 sind die RNA-Bindung, wobei zwei CCH-Zinkfingerdomänen als RNA-Zielerkennungsdomäne dienen, sowie die allosterische Aktivierung, wodurch die METTL3-Aktivität verstärkt wird (Yang et al. 2018). Der *Knock-Down* (KD) von METTL3 und METTL14 führen einzeln als auch zusammen zu einer signifikanten Abnahme des m6A-Levels auf der mRNA. Die dritte Komponente des Kernkomplexes WTAP hat keine eigene Methyltransferaseaktvität, sondern bindet an das METTL3/14-Heterodimer, induziert dessen Translokation zu *nuclear speckles* und fördert so wahrscheinlich die Methylierung (Meyer und Jaffrey 2014). Viele Bindestellen dieses Kernkomplexes liegen in Introns, was nahelegt, dass die Methylierung vor bzw. während des Splicingvorgangs stattfindet (Fu et al. 2014). Weitere Komponenten des Methyltransfersase-komplexes sind KIAA1429, ZCH13, VIRMA und RBM15, die wahrscheinlich verschiedene regulatorische Aufgaben übernehmen (Yang et al. 2018).

Als Gegenspieler des Methyltransferasekomplexes konnten bisher die zwei Demethylasen *Fat mass and obesity-associated protein* (FTO) und AlkB Homolog 5 (ALKBH5) identifiziert werden (Abbildung 5). FTO ist ein Mitglied der Fe(II)-Oxogluterat-abhängigen AlkB Oxygenase und ist assoziiert mit Fettleibigkeit und mentaler Entwicklung (Yue et al. 2015). Es handelt sich um ein überregional vorkommendes Enzym im fetalen und adulten Gewebe und ist am stärksten exprimiert im Gehirn (Yang et al. 2018). FTO demethyliert sowohl RNA als auch *deoxyribonucleic acid* (DNA), indem es die Oxidation von N(6)-Methyladenosin zum Zwischenprodukt N(6)-Hydroxymethlyadenosin und dann weiter zum Produkt N(6)-Formlyadenosin katalysiert (Fu et al. 2014; McGuinness DH und McGuinness D 2014). Im Gegensatz zum Heterodimer METTL3/14 zeigt FTO keine Präferenz für das DRACH-Motiv, sondern hat als eigene Zielsequenz das RRACT-Motiv und bindet vermehrt an Transkriptionsstartbereichen, um Stopcodons und 100 Basenpaare (bp) aufwärts von Poly(A)-Bereichen (Bartosovic et al. 2017). FTO ist hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, hat aber auch eine zytoplasmatische Fraktion. Die Demethylase ALKBH5 ist vor allem im männlichen Hoden lokalisiert und beeinflusst die Spermatogenese und Fruchtbarkeit in Mäusen (Meyer und Jaffrey 2014; Yang et al. 2018). Im Gegensatz zu FTO demethyliert ALKBH5 bevorzugt m6A in Konsensus-

sequenzen, indem es die direkte Entfernung der Methylgruppe von m6A katalysiert. ALKBH5 befindet sich im Nukleus und beeinflusst dort den Export in das Zytoplasma. Der KD von ALKBH5 führt dazu, dass mehr mRNA sich in *nuclear speckles* befindet und weniger im Zytoplasma (Cao et al. 2016).

Die Leseproteine binden selektiv an m6A auf der mRNA und vermitteln so m6A-abhängige Funktionen (Abbildung 5). Die Familie der *YT521-B homology domain* (YTHDF) befindet sich im Zytoplasma und bindet mit ihrer YTH-Domäne die Methylgruppe bevorzugt im GGAAC-Motiv (Yue et al. 2015). YTHDF1 bindet nahe Stopcodons und durch die Interaktion mit dem Initiationskomplex wird die Translation beeinflusst. YTHDF3 nimmt ebenfalls Einfluss auf die Translation durch die Interaktion mit ribosomalen Proteinen und durch das Zusammenspiel mit YTHDF2 dient es dem mRNA- Abbau (Yang et al. 2018). YTHDF2 bindet mit seiner C-terminalen Domäne die m6A-mRNA und überführt den Komplex mit Hilfe seiner N-terminalen Domäne vom Translationspool in den Abbaubereich (*P-bodies*). Die Zielregion sind GAC-Motive in 3‘UTRs und Stopcodons, wobei YTHDF2 eine bessere Bindung zu methylierter RNA zeigt als zu nicht methylierter (Fu et al. 2014; Wang et al. 2014). Die Mitglieder der *YT521-B homology domain containing* (YTHDC)-Familie sind im Nukleus zu finden. YTHDC1 beeinflusst das Splicing, indem es den Exoneinschluss durch Rekrutierung bzw. Hemmung verschiedener Splicingfaktoren fördert, und unterstützt den nukleären Export von m6A-mRNA durch die Interaktion mit *serine and arginine rich splicing factor* (SRSF) und *nuclear RNA export factor 1* (NXF1). YTHDC2 bindet bevorzugt m6A im Konsensmotiv und verstärkt die Translationseffizienz (Yang et al. 2018). Eine weitere Gruppe der Leseproteine sind die *heterogenous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs). HNRNPC ist u. a. involviert in die pre-mRNA-Prozessierung, wobei m6A als struktureller Schalter dient. HNRNPA2B1 spielt einer Rolle in der Prozessierung von pri-miRNA zusammen mit METTL3 und bei der Regulation des alternativen Splicings (Cao et al. 2016; Yang et al. 2018).

Die Funktionen der m6A-Modifikation sind sehr vielfältig und viele Mechanismen sind noch nicht im Detail verstanden. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten bekannten Funktionen kurz skizziert. Durch die Methylierung wird die RNA-Stabilität verringert, indem die Doppelstrang-RNA-Struktur um 1,4 kcal/mol geschwächt wird. Die Basenpaarung zwischen Adenosin und Uracil wird aber nicht beeinflusst. Die methylierte RNA liegt bevorzugt als Einzelstrang vor. Es kommt zum strukturellen *Remodeling,* d. h. die mRNA nimmt in Abhängigkeit von m6A eine Sekundärstruktur ein und methylierte Bereiche zeigen weniger

Sekundärstruktur (Meyer et al. 2012; Zhao et al. 2016). m6A markiert die mRNA für den Abbau, welcher durch die Leseproteine YTHDF2/3 vermittelt wird, und fördert die Translation von mRNA, indem YTHDF1 an m6A bindet und Translationsinitiationsfaktoren rekrutiert (Zhao et al. 2016). Das alternative Splicing wird gefördert und mRNAs, die alternatives Splicing durchlaufen haben, enthalten mehr METTL3-Bindestellen und m6A-Bereiche (Meyer und Jaffrey 2014). FTO bindet an pre-mRNA im Nukleus und fördert so die Inklusion von alternativ gesplicten Exons (Yang et al. 2018). Die mRNA-Reifung wird beeinflusst. Es lassen sich mehr m6A-Bereiche auf pre-mRNA finden als auf reifer mRNA, da die Methylierung im Nukleus stattfindet und die Intronentfernung zum Verlust von m6A führt (Yang et al. 2018). Des Weiteren spielt die m6A-Modifikation eine Rolle in der Zelldifferenzierung und Reprogrammierung, verstärkt die Zellkern-Prozessierung und den mRNA-Export und verhindert das RNA-*Editing*, also die Konversion von Adenosin zu Inosin in der mRNA. Dies führt zum Verbleib von Adenosin in der mRNA (Zhao et al. 2016).

1.2.2 Micro RNA

Micro RNAs (miRNAs) sind kleine, nicht kodierende einzelsträngige RNAs mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden und sind in viele zelluläre Prozesse involviert (Gebert und MacRae 2019). Sie dienen der posttranskriptionalen Regulation der Genexpression, indem sie an bestimmte Bereiche auf der mRNA binden. Ihre Bindebereiche liegen hauptsächlich (ca. 30%) am 3‘ Ende der 3‘-UTR der mRNAs, während die m6A-Methylierung nahe Stopcodons liegt und mit Länge der 3‘-UTR abnimmt. Die m6A-Methylierung befindet sich somit vor den miRNA-Bindebereichen und die beiden Bereiche überschneiden sich nicht, sondern weisen ein anti-korrelatives Verteilungsmuster auf (Meyer et al. 2012). Jede miRNA kann auf viele verschiedene mRNAs abzielen und jede mRNA kann durch verschiedene miRNAs reguliert werden. mRNAs, die durch dieselbe miRNA reguliert werden, hängen oft funktionell zusammen und eine Gruppe verwandter miRNAs (Cluster) kann einen Signalweg auf verschiedenen Stufen beeinflussen (Condorelli et al. 2014). miRNAs mit identischer Sequenz der Nukeotide 2 bis 8 am 5‘-Ende (Kern-Sequenz) gehören derselben miRNA-Familie an. Die Kern-Sequenz ist entscheidend für die Zielerkennung. Die weiter abwärtsliegenden Nukleotide (nt) tragen zur Basenpaarung mit der Ziel-mRNA bei (Ha und Kim 2014). miRNAs können auch selber m6A-methyliert sein, allerdings ist der Effekt davon bisher noch nicht bekannt (Berulava et al. 2015).

Das Expressionsmuster der miRNAs ist gewebe- und entwicklungsspezifisch und ihre veränderte Expression ist mit vielen Krankheiten assoziiert. miRNAs zirkulieren im Komplex mit Proteinen (z. B. Argonautenproteine (AGO), plasmatische Proteine) oder in membrangebundenen Körpern (Mikropartikel, Exosomen, apoptotische Körper), wodurch sie vor dem Abbau geschützt werden. Sie sind so stabil im extrazellulären Milieu, im Blut und anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar und kommen hierdurch als potenzielle Biomarker für Krankheiten in Frage (Condorelli et al. 2014).

Gene, die für miRNAs kodieren, liegen typischerweise in Introns nicht-kodierender und kodierender Transkripte, seltener auch in Exons. Von jedem Genlokus ausgehend entstehen zwei reife miRNAs, eine vom 5‘-Strang und eine vom 3‘-Strang. Die Transkription des miRNA-Gens erfolgt durch die RNA-Polymerase II (Abbildung 6). Die pri-miRNA entsteht und besteht aus einem Stamm von 33 - 35 bp, einer terminalen Schleife und je einem Einzelstrang RNA-Segment am 5‘- und 3‘-Ende. Außerdem befindet sich am 5‘-Ende der pri-miRNA eine 7-Methylguanosin-Kappe und am 3‘-Ende ein poly(A)-Schwanz (Ha und Kim 2014; Peng und Croce 2016). Im nächsten Schritt entsteht aus der pri-miRNA die pre-miRNA, welche 60 bis 65 Nukleotide lang ist und eine charakteristische Haarnadel-Struktur aufweist. Diese Spaltung der pri-miRNA wird durch den Mikroprozessorkomplex vermittelt, der sich aus dem RNA-Bindeprotein *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8) und der Typ III RNase Drosha zusammensetzt (Ameres und Zamore 2013). DGCR8 besteht aus zwei Doppelstrang (ds)-RNA-Bindedomänen zur Erkennung der pri-miRNA, dem C-terminalen Ende zur Interaktion mit Drosha, dem N-terminalen Ende für die nukleäre Lokalisation und der zentralen Region. Letztere bindet Häm, welches wichtig für eine effiziente Prozessierung ist. Drosha zielt auf ds-RNA ab. Das N-terminale Ende dient der nuklearen Lokalisation. Am C-terminalen Ende befinden sich die RNase III-Domänen und die ds-RNA-Bindedomäne. Eine RNase III-Domäne schneidet am 3‘-Strang des Stammes und eine zweite am 5‘-Strang der pri-miRNA. So entsteht ein zwei Nukleotide langer Überhang am 3‘-Ende der pre-miRNA. DGCR8 stabilisiert Drosha über Protein-Protein-Interaktion (Ha und Kim 2014).

Die pre-miRNA wird anschließend aus dem Nukleus in das Zytoplasma exportiert. Hierfür formt Exportin 5 einen Komplex mit Guanosintriphosphat (GTP), dem GTP-bindenden *Ras-relataed nuclear protein* (Ran) und der pre-miRNA, wodurch letztere durch eine nukleäre Pore in das Zytoplasma gelangt. GTP wird hydrolysiert und der Komplex löst sich wieder auf (Ameres und Zamore

2013; Ha und Kim 2014). Im Zytoplasma findet das weitere Prozessieren der pre-miRNA zum miRNA-miRNA-Duplex durch die RNase III Dicer statt. Am C-Terminus von Dicer befindet sich eine Tandem RNase III-Domäne, die ein intramolekulares Dimer als katalytisches Zentrum formt. Eine N-terminale Helikase-Domäne erleichtert die Erkennung der pre-miRNA durch Interaktion mit der terminalen Schleife und die PAZ-Domäne bindet die pre-miRNA am 5‘- und 3‘-Ende. Dicer interagiert mit den ds-RNA-Bindeproteinen *trans-activation-responsive RNA-binding protein* (TRBP) oder dem *proteinkinase R-activating protein* (PACT) zur Modulation der Prozessierungseffizienz und Länge der reifen miRNA. Der hieraus entstandene miRNA-miRNA-Duplex besteht aus einem Leitstrang und einem passageren Strang mit je einer Länge von 20 bis 22 bp (Ha und Kim 2014; Peng und Croce 2016).

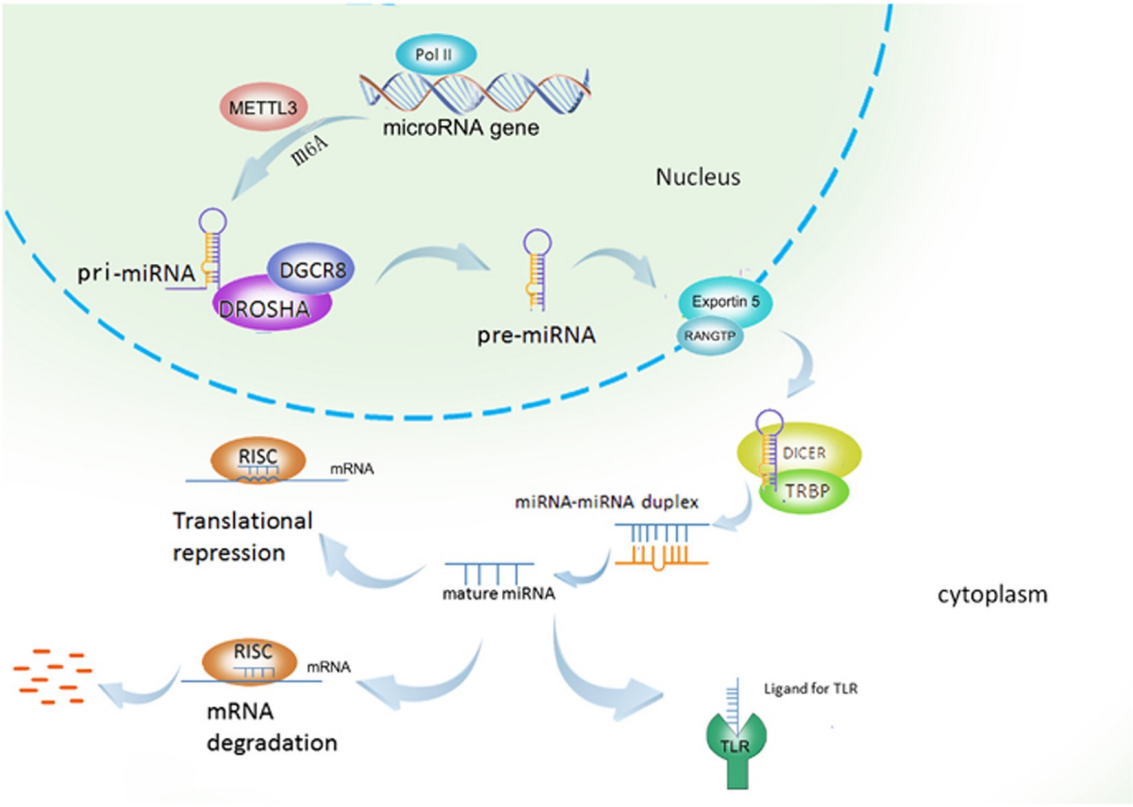

Abbildung 6: Überblick über die miRNA Biogenese

Im Nukleus wird das miRNA-Gen von der Polymerase II abgelesen und die pri-miRNA entsteht. METTL3 kann dabei die pri-miRNA methylieren und so dessen Reifung fördern. Der Mikroprozessorkomplex aus Drosha und DGCR8 spaltet die pri-miRNA zur pre-miRNA. Diese wird mithilfe eines Komplexes aus Exportin 5, Ran und GTP aus dem Nukleus in das Zytoplasma zur weiteren Prozessierung exportiert. Im Zytosol binden Dicer und TRPB an die pre-miRNA, wodurch der miRNA-miRNA-Duplex entsteht. Der miRNA-miRNA-Duplex wird abgewickelt, sodass die reife miRNA zusammen mit einem AGO-Protein den RISC formen kann. Durch diesen Komplex kann die Translation von mRNAs unterdrückt oder ihr Abbau vermittelt werden. Zusätzlich können miRNAs als Liganden für TLR fungieren. Übernommen von Peng und Croce

(2016). Lizenz durch Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) bereitgestellt.

Der miRNA-miRNA-Duplex wird auf ein Protein der AGO-Familie geladen zur Formation des *RNA-induced silencing complex* (RISC). AGO-Proteine (AGO 1-4) bestehen aus vier Domänen, welche eine bilobuläre Struktur bilden. Der N-terminale Lappen setzt sich aus der N-terminalen und der PAZ-Domäne zusammen, welche über die Verknüpfungsdomäne L1 verbunden sind. Der C-terminale Lappen besteht aus der MID- und PIWI-Domäne, welche über die Verknüpfungsdomäne L2 miteinander verknüpft sind (Gebert und MacRae 2019). Welche der beiden miRNAs zum Leitstrang wird, wird bei der Beladung auf das AGO-Protein festgelegt und basiert u. a. auf der thermodynamischen Stabilität der beiden Enden, d. h. der Strang mit relativ instabilem 5‘-Terminus wird zum Leitstrang. Weiter wird bevorzugt die miRNA zum Leitstrang, welche ein Uracil oder Adenosin an Position 1 aufweist (Ameres und Zamore 2013). Nach der Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Beladung des AGO-Proteins wird der passagere Strang ATP-unabhängig freigesetzt und abgebaut. Die Leit-miRNA ist über ihr 5‘-Monophosphat in der 5‘-Phosphat-Bindetasche zwischen der MID- und PIWI-Domäne des AGO-Proteins verankert. Diese Bindung ist schwach und hält nur länger, wenn sieben bis acht Nukleotide des Leitstrangs komplementär sind. Die AGO-Proteine werden durch die Beladung stabilisiert und nehmen bevorzugt ein miRNA-miRNA-Duplex auf, der eine Fehlpaarung an Position 2 bis 8 und 12 bis 15 aufweist. Hierdurch wird die Abwicklung der Duplex gefördert. Die Kern-Sequenz der Leit-miRNA liegt als A-Helixkonformation vor, wodurch die Suche nach der komplementären Sequenz auf der Ziel-mRNA erleichtert wird (Ha und Kim 2014; Gebert und MacRae 2019). Bei vollständiger Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA kann das AGO-Protein 2 eine Spaltung und Degradierung der passenden mRNA vermitteln. Die häufiger vorkommende unvollständige Komplementarität führt zur Translationsrepression und Gen-*silencing* vermittelt durch die AGO-Proteine 1 - 4 (Peng und Croce 2016). Im RISC dient die miRNA also der Steuerung durch Basenpaarung mit der Ziel-mRNA, wobei der Effekt auf das Ziel abhängig ist von dem Ausmaß dieser Basenpaarung. Die Assoziation der Kern-Sequenz mit der Ziel-mRNA ist entscheidend für die Zielerkennung und -bindung und ist am stärksten, wenn die Nukleotide 2 bis 8 der miRNA komplementär zum Ziel sind und sich ein Adenosin an Position 1 der miRNA (t1A) befindet. Das 3‘-Ende der miRNA kann durch Basenpaarung der Nukleotide 13 bis 16 zur Zielerkennung beitragen und führt dazu, dass miRNAs mit gleicher Kern-Sequenz verschiedene Ziel-Bereiche binden können (Gebert und MacRae 2019). Weitere Kriterien für die

Zielerkennung sind die Zugänglichkeit des Zielbereiches selber und seine Lage in der 3‘-UTR. Die AGO-Proteine sind durch die Rekrutierung von Faktoren die Ausführer im RISC, wodurch es dann zur Translationsrepression, mRNA-Deadenylation und mRNA-Abbau kommt (Ha und Kim 2014).

Die Hauptfunktion der miRNA ist die negative Regulation der Genexpression durch komplementäre Bindung der miRNA an ihrer Zielregion in der 3’UTR der Ziel-mRNA (Tatsuguchi et al. 2007). Hierdurch kann es einerseits zur reversiblen Hemmung der Translation kommen, indem der RISC die Ablösung die Translationsfaktoren eIFA-I und eIF4A-II von ihrer Ziel-mRNA vermittelt und so der Zusammenbau des Translationskomplexes und in Folge das ribosomale Ablesen gehemmt werden. Andererseits kann der RISC den Abbau der gebundenen mRNA vermitteln durch die Interaktion mit dem *glycin-typtophan protein of 182kDA* (GW182), welches von AGO rekrutiert wird (Gebert und MacRae 2019). Die meisten miRNAs justieren die Expression ihrer Ziele. Große Veränderungen in mRNA- und Proteinhäufigkeit sind seltener. miRNAs können auch zur indirekten Genaktivierung führen, wenn es durch die Repression eines Repressors zur Steigerung der Expression von Transkripten kommt (Ameres und Zamore 2013).

Der Einfluss der miRNA auf seine Zielbereiche unterliegt vielen regulatorischen Vorgängen. So können zum Beispiel Einzel-Nukleotid-Polymorphismen oder Trimmen durch exonukleolytische Resektion in der Kern-Sequenz das Ziel einer miRNA verändern. RNA-*tailing*, also das Anhängen von Adenosin oder Uracil an die miRNA, kann zur Maskierung des 2-nt-3‘-Überhangs der pre-miRNA führen und so die Erkennung durch Dicer behindern (Ameres und Zamore 2013). Beim RNA-*editing* wird durch das Enzym *adenosine deaminase acting on RNA* (ADAR) Adenosin zu Inosin umgewandelt, welches als Uracil abgelesen wird. Dadurch können Veränderungen der miRNA-Vorläufer oder auch der Kern-Sequenz auftreten. Die Reifung der pri-miRNA kann gefördert werden, indem diese durch METTL3 selber methyliert wird. Methylierte pri-miRNA wird effizienter prozessiert, da so die Erkennung durch DGCR8 erleichtert wird (Alarcón et al. 2015; Peng und Croce 2016). Durch von Drosha oder Dicer vermitteltes alternatives Splicing können isomiRs entstehen, die sich in Reifung, Stabilität, Umsatz und Ziel unterscheiden (Gebert und MacRae 2019).

Auch die Ziel-mRNA kann die Stabilität der miRNA beeinflussen, wobei eine reduzierte Komplementarität zum 5‘-Ende und eine hohe zum 3‘-Ende der miRNA den Abbau dieser induziert. Im RISC gebundene miRNAs sind sehr stabil, da die beiden Enden durch AGO geschützt werden. Veränderungen in der Sequenz und

Struktur der mRNA können die Reifung und den Umsatz der miRNA modifizieren (Ha und Kim 2014).

1.2.3 Veränderungen im kranken Herzen

Bei der Herzinsuffizienz spielt die Dysregulation der m6A-Methylierung eine wichtige Rolle. Veränderungen des m6A-Levels haben direkten Einfluss auf das kardiale Wachstum und *Remodeling*. Bei der kardialen Hypertrophie kommt es zur Zunahme der m6A-Methylierung in den Kardiomyozyten (Dorn et al. 2019). Diese Hypermethylierung von Transkripten, die u. a. in die Regulation der Herzfrequenz und Kontraktion involviert sind, führt zu deren verringerten Expression (Mathiyalagan et al. 2019).

METTL3 reguliert als Schlüssel-Methylase das kardiale m6A-Level und kontrolliert so das Zellwachstum. Der KD von METTL3 führt zu einem verringerten m6A-Level in den Kardiomyozyten und umgekehrt kommt es zur Erhöhung des m6A-Levels durch METTL3-Überexpression. Es konnte von Kmietczyk et al. (2019) gezeigt werden, dass aktives METTL3 die Zellgrößenzunahme unter Hypertrophie-Stimulation effektiv blockieren kann, während eine METTL3-Verringerung zu Vergrößerung der Zellen und Anstieg der Hypertrophiemarker führte. Dies zeigt, dass METTL3 eine wichtige Rolle in der Stressadaption der Kardiomyozyten spielt (Dorn et al. 2019). Der Gegenspieler FTO demethyliert am Herzen selektiv kontraktile Transkripte, verhindert so deren Abbau und verbessert ihre Expression unter ischämischen Bedingungen. Beim Herzversagen kommt es zur verminderten Expression von FTO und die m6A-Methylierung nimmt so insgesamt zu. Dies bedingt eine verminderte Kontraktilität der Kardiomyozyten (Berulava et al. 2019; Mathiyalagan et al. 2019). Die Zunahme der Zellgröße durch die Hypertrophie kann durch den KD von FTO verringert werden (Kmietczyk et al. 2019). Dies zeigt, dass sowohl FTO als auch METTL3 eine bedeutende Stellung in der kardialen Homöostase einnehmen und somit vielversprechende therapeutische Ansätze darstellen.

Eine Reihe von miRNAs spielen eine wichtige Rolle in der kardialen Hypertrophie und weisen darunter eine veränderte Expression und dynamische Regulation auf (Song et al. 2010). Im Folgenden sollen die wichtigsten miRNAs kurz dargestellt werden. miR-21 ist stark hochreguliert bei kardialer Hypertrophie und zeigt profibrotische Wirkungen (Hirt et al. 2015). Sie trägt u. a. zum myokardialen *Remodeling* durch die Beeinflussung des ERK-MAPK-Signalwegs bei (Da Costa Martins und De Windt 2012). Im Gegensatz dazu weist die miR-133 eine anti-hypertrophe Wirkung auf und ist herunterreguliert bei Hypertrophie. Sie

beeinflusst u. a. die Herzentwicklung, Herzfunktion und die Größe der Kardiomyozyten (Condorelli et al. 2014). Der Transkriptionsfaktor NFATc4 besitzt zwei Bindestellen für die miR-133. Durch Bindung dieser wird das mRNA-Level von NFATc4 gesenkt und seine fördernde Wirkung auf die Hypertrophie gemindert (Da Costa Martins und De Windt 2012). Die miR-26 besitzt ebenfalls eine anti-hypertrophe Wirkung. Bei Vorliegen einer Hypertrophie ist ihre Expression vermindert, wodurch GATA4 hochreguliert wird. Bei einem KD der miR-26 kommt es zur Zellvergrößerung, wohingegen die Überexpression die Hochregulation von GATA4 hemmt (Da Costa Martins und De Windt 2012).

1.3 *Human induced pluripotent stemcell-derived Cardiomyocytes*

Pluripotente Stammzellen definieren sich über ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung zu Zellen aller drei Keimblätter und der Keimbahn (Jaenisch und Young 2008). Sie unterliegen noch keiner Festlegung und können sich gewebespezifisch differenzieren. Die ersten isolierten pluripotenten Stammzellen wurden aus Embryonen gewonnen. Diese embryonalen Stammzellen (ESC) zeichnen sich durch die Expression typischer Pluripotenzgene wie *OCT4*, *SOX2* und *NANOG* aus und besitzen ein unbegrenztes Proliferationspotential (Hanna et al. 2010). Allerdings wirft ihre Verwendung zu Forschungszwecken große ethische Konflikte auf. 2006 gelang erstmals die Reprogrammierung von embryonalen/ adulten Mausfibroblasten zu pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stemcell* = iPSC) mithilfe retroviraler Transduktion der vier Induktionsfaktoren OCT3/4, SOX2, C-MYC und KLF4 (Takahashi und Yamanaka 2006). Durch Optimierung der retroviralen Transduktion konnten 2007 schließlich auch aus humanen somatischen Zellen pluripotente Stammzellen (*human induced pluripotent stemcell* = hiPSC) gewonnen werden. Die hiPSCs weisen vergleichbare Eigenschaften wie humane embryonale Stammzellen (hESC) bezüglich Morphologie, Proliferation, Oberflächenmarker, Expression bestimmter Pluripotenzgene sowie Entwicklung von Teratomen und Chimären auf und können sich *in vitro* in Zellen der drei Keimblätter differenzieren (Takahashi et al. 2007).

Die kardiale Differenzierung der hiPSC gelingt durch die Modulation des Wnt-Signalwegs. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch die Hemmung der Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) z. B. mit CHIR9902210 führt zur mesodermalen Differenzierung der hiPSC. Durch die darauffolgende Inhibition z.

B. mit IWP2 gelingt die weitere Entwicklung zu Kardiomyozyten. Bereits nach sieben bis neun Tagen können Kontraktionen der Zellen beobachtet werden. Die Reinheit der Kardiomyozyten nach erfolgreicher Differenzierung kann durch die metabolische Selektion deutlich angehoben werden. Hierbei wird das Medium RPMI1640 ohne Glukose und mit Laktatzusatz verwendet, da nur die die hiPSC-Kardiomyozyten Laktat als Energiequelle verwerten können (Burridge et al. 2014).

Die hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten (hiPSC-CM) weisen ein großes Potential zum Einsatz in der Forschung auf, da ihre Verwendung im Gegensatz zu hESCs weniger ethische Konflikte mit sich bringt und Untersuchungen an einem humanen Modell so möglich sind. Mit ihnen lassen sich Herzerkrankungen in einem definierten *in vitro* Modell in Hinblick auf ihre Entstehung, zugrundeliegende Mechanismen und Progression erforschen. Außerdem können sie der Medikamentenentwicklung und -untersuchung dienen und in der regenerativen Medizin zum Einsatz kommen.

Nach der Induktion im stabilen pluripotenten Status entwickeln sich die hiPSCs über zunächst unspezifische Kardiomyozyten-Vorläufer zu vorwiegend ventrikulären Kardiomyozyten nach 60 Tagen (Burridge et al. 2014). Diese zeichnen sich durch Expression von α-Aktinin, *myosin heavy chain* alpha/beta (α/ß-MHC) und *cardiac troponin* (cTNT) auf mRNA-Ebene aus und haben α-Aktinin und cTNT-positive Sarkomerstrukturen. Spontane Aktionspotentiale vom Schrittmacher-, ventrikulärem, atrialem und Purkinje-Typ sind nachweisbar und deuten auf das Vorliegen aller vier Zelltypen hin. Die reifen hiPSC-CM sind nicht identisch mit adulten Kardiomyozyten und weisen strukturelle und elektrophysiologische Unterschiede auf. Sie sind im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten kleiner, heterogen geformt (v. a. rund) und haben langsamere Überleitungszeiten und schwächere Kontraktionen (Streckfuss-Bömeke et al. 2013; Borchert et al. 2017).

Für diese Arbeit habe ich zwei verschiedene hiPSC-Zelllinien verwendet. Beide Zelllinien stammen von Hautfibroblasten ab, da sich hiPSC je nach Herkunft in Wachstum, Entwicklungspotential, Transkriptionsaktivität und epigenetischer Regulation unterschieden können (Streckfuss-Bömeke et al. 2013). So ist eine Vergleichbarkeit weiterhin gegeben. Allerdings wurden zur Generation zwei verschiedene Systeme verwendet, da insbesondere das Lentivirus-System zu genomischen Veränderungen führen kann.

- pCTRL 1.1: weiblich, aus Hautfibroblasten, Reprogrammierung mit Plasmid (Borchert et al. 2017)
- WT-D2-1u: weiblich, aus Hautfibroblasten, Reprogrammierung mit Lentivirus STEMCAA (Streckfuss-Bömeke et al. 2013)

1.3.1 Stimulation von Stress und Hypertrophie im *in vitro* Zellkulturmodell

Die hiPSC-CM können als *in vitro* Modell zur Untersuchung von Herzerkrankungen genutzt werden. Eine Möglichkeit zur Simulation einer Erkrankung ist die Behandlung mit einer entsprechenden Substanz. In den folgenden Abschnitten werden die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen näher beschrieben:

Phenylephrine (PE) ist als Alpha1-Adrenorezeptor Agonist ein direktes Sympathomimetikum und bindet an die G-Protein gekoppelten α1-adrenergen Rezeptoren. Hierdurch wird über die Phosoplipase C (PLC) IP3 und DAG freigesetzt. IP3 bindet an das sarkoplasmatische Retikulum und führt zur Kalzium-Freisetzung, während DAG zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs beiträgt. PE triggert die Phosphorylierung von GATA-4 und NKFB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) und die Dephosphorylierung von NFAT, was zur nukleären Akkumulation von NFAT und GATA-4 führt (Sorriento et al. 2018). Es wird eine Stressinduktion in Kardiomyozyten ausgelöst, was sich einerseits im Anstieg der mRNA-Level von ANP, BNP, α-Aktinin und ß-MHC und anderseits in der Zunahme der Zellgröße zeigt (Song et al. 2010; Hirt et al. 2012; Kinnunen et al. 2018). In der Literatur ist für die PE-Konzentrationen 100 μm (Kinnunen et al. 2018) und 20 μm (Rupert et al. 2017) ein Effekt auf hiPSC-CM nachgewiesen worden.

Bei Isoprenaline (ISO) handelt es sich um einen nicht selektiven ß-adrenergen Rezeptor Agonisten, der v. a. auf das kardiopulmonale System wirkt. Über die Stimulation von ß1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche kommt es u. a. zum Anstieg der Kontraktionskraft der Kardiomyozyten (positiv inotrop) und Zunahme der Aktionspotential-Frequenz (positiv chronotrop) (Mehta et al. 2015; Wu et al. 2015). ISO führt zu einer erhöhten Expression kardialer Stressgene wie *ANP, BNP* und *NR4A1*, einem erhöhten cAMP-Level und einer vermehrten Phosphorylierung von RyR2 und Cav1.2 (Borchert et al. 2017). Für ISO sind die Konzentrationen von 100 nm (Borchert et al. 2017) oder 10 μm (Mehta et al. 2015) als geeignet in den hiPSC-CM beschrieben worden.

Endothelin-1 (ET-1) ist ein Peptidhormon aus 21 Aminosäuren und vermittelt sowohl vasokonstriktive als auch vasodilatative Wirkungen. Die neurohumerale Stimulation der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ETA und ETB bewirkt u. a. die vermehrte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern über IP3, eine erhöhte Sensitivität des kontraktilen Apparates gegenüber Kalzium und die Induktion langfristiger Signalwege zur Förderung der zellulären Antwort durch die MAPK-Kaskade. Dies führt zur Proliferation und Hypertrophie von Kardiomyozyten, Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten und vermittelt kardiales *Remodeling* bei der systolischen Herzinsuffizienz. Die Stimulation mittels ET-1 zielt insbesondere auf die Inotropie und Chronotropie ab und es kommt zur erhöhten Expression von Hypertrophiemakern wie Nppb, Nppa und *actinin alpha 1* (ACTA1). Des Weiteren sind auch Veränderungen der miRNA-Expression durch ET-1 am Herzen beschrieben. Es wird eine Hochregulation der miR23-3p, miR-223p und miR-208-3p beschrieben, welche allesamt mit kardialer Hypertrophie assoziiert sind (Aggarwal et al. 2014).

1.3.2 Veränderungen der Expression von FTO in den hiPSC-CM

FTO stellt als wichtigste Demethylase der RNA ein Schlüsselenzym im Methylierungsgeschehen dar und neuere Untersuchungen legen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Herzhypertrophie und -insuffizienz nahe (Mathiyalagan et al. 2019). In dieser Arbeit wird zunächst einmal der Fokus auf die Unterdrückung der FTO-Expression im Sinne eines *Knock-Downs* gelegt. Unter einem *Knock-Down* (KD) versteht man die Reduktion der Genexpression auf RNA-Ebene ohne Modifikation der chromosomalen DNA. Das zu untersuchende Gen bleibt somit unberührt. Dies kann z. B. mithilfe von *small interferring RNA* (siRNA) erreicht werden. Bei siRNA handelt es sich um 18 - 24 nt lange, nicht kodierende RNA. Die zunächst doppelsträngige siRNA wird durch AGO-Proteine und weitere Komponenten des RISC gebunden. Nach der Abspaltung eines Strangs dirigiert der verbleibende Einzelstrang der siRNA den RISC zu seiner komplementären Ziel-mRNA. Wenn die siRNA zu der Ziel-mRNA komplementär ist, wird die Ziel-mRNA durch AGO-Proteine gespalten und dem Abbau zugeführt. Es kommt zur Abnahme des entsprechenden Genprodukts. Der Effekt der siRNA ist transient, d. h. das Zielgen wird nicht endgültig aus dem Genom entfernt wie bei einem *Knock-Out* (KO), sondern in einem geringen Maß weiter transkribiert (Alberts et al. 2015). Die siRNA kann in die Ziel-Zelle durch Lipotransfektion eingebracht werden (Rosales und Lizcano 2018), da Liposomen die Fähigkeit haben mit der Doppellipidmembran zu verschmelzen. Nach

Einschleusung der siRNA in das Zytosol, beginnt die Prozessierung durch den RISC. Je nach vorliegender siRNA-Sequenz werden die entsprechend komplementären mRNAs abgebaut und die Expression ihres Transkripts verringert.

1.4 Fragestellungen

Intensive Forschung in den letzten Jahren konnte zeigen, dass die m6A-Methylierung der RNA bei verschiedenen Herzerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Trotzdem ist noch wenig bekannt über die genauen Funktionen und Einflüsse der m6A-Methylierung und ihrer Regulatoren FTO und METTL3 in der Herzhypertrophie und -insuffizienz. Gleiches gilt für die Rolle von miRNAs in diesem Zusammenhang, welche ebenfalls m6A-methyliert werden können.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und Validierung eines Modells zur Simulation von Stress und Hypertrophie in hiPSC-CM. Anhand dieses Modells werden anschließend Untersuchungen zur Charakterisierung des generellen miRNA-Profils und dessen Methylierungsveränderungen in der Herzhypertrophie stattfinden. Abschließend wird die Möglichkeit der weiteren Nutzung des Modells zur Manipulation des Methylierungsapparates durch Veränderung der FTO-Expression erörtert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, basale Medien und Enzyme

Tabelle 4: Chemikalien, Reagenzien, basale Medien und Enzyme

Name	Hersteller
(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride	Sigma Aldrich #P6126-5G
0,25% Trypsin-EDTA	Gibco Life Technologies #25200-056
100 bp DNA Ladder	Thermo Fischer #SM1153
4x Laemmli Sample buffer	Bio-Rad #1610747
Albumin, human recombinant	Sigma Aldrich Life Science A9731-1G
Ammounium persulfate (APS)	Sigma Aldrich A3678
B-27® Supplement	Gibco Life Technologies #17504-044
Bovine Serum Albumine (BSA) 7,5%	Gibco Life Technologies #15260037
Casy-Buffer CASYton	OLS #5651808
CHIR99021	Merck Millipore #361559
Chloroform	Roth #3313.1
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher #R0861
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F-12) with GlutaMax, no HEPES	Gibco Life Technologies #31331-028
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco Life Technologies #14190-094
Endothelin-1 (ET-1)	Sigma Aldrich #E7764
Essential 8™ Basal Medium	Gibco Life Technologies #A15169-01
Essential E8™ Supplement (50x)	Gibco Life Technologies #A15171-01
Ethanol 99% vollvergält	Chemsolute TH GEYER #2294.1000
Ethanol absolute > 99,8% (für RNA-Isolation)	Riedel-de Haen® #32205-500ML
Ethanol absolute for molecular biology	PanReac AppliChem#A3678,1000
Fetal bovine serum (FBS), qualified	Gibco Life Technologies #10270-106
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England BioLabs #B7024S
Geltrex	Gibco Life Technologies #A1413301
GeneRuler 100 bp	Thermo Fisher Scientific #SM0321
GeneRuler 1 kb	Thermo Fisher Scientific #SM1333
Isoprenaline hydrochloride (ISO)	Sigma Aldrich Life Science #I5627
IWP2 (Inhibitor of Wnt production 2)	Merck Millipore #681671
L-ascobic Acid 2-phosphate	Sigma Aldrich Life Science #A8690-5G
Lipofectamine™ Stem Reagent	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific #STEM00008
Milchpulver	Roth #T145.3
Millipore Water	Gefiltert mit Milli-Q Filter System (Merck, Darmstadt, Deutschland)
NP40	Thermo Fisher #85124
Nucelase-free water 50 ml	QIAGEN #1039498
Oligo (dT) primers	Thermo Fischer #18418012
Opti-MEM ® I (1X)	Gibco Life Technologies #31985-062
PDK Puffer	QIAGEN #1034963

Name	Hersteller
Pierce RIPA Puffer	Thermo Fischer Scientific #89900
Ponceo S Solution	Sigma Aldrich Life Science #P7170-1L
PRMI Medium 1640, no Glucose	Gibco Life Technologies #11879-020
Protein A/B magnetic beads	Thermo Fisher #88802
Proteinase K	QIAGEN #19131
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fischer Scientific #46430
RNase Erase®	MP Biomedicals #821682
RNase-freies Wasser	QIAGEN # 129112
Roti-Histofix 4% (4% PFA)	Roth #P087.6
RPMI Medium 1640 with HEPES with GlutaMax	Gibco Life Technologies #72400-021
Sodium DL-Lactate solution 60% (w/w)	Sigma Aldrich Life Science #L4263
Superase.IN (200U/µl)	Thermo Fisher #AM2694
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific #34095
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fischer Scientific #34577
TRIS-Glycin-SDS (TGS)-Puffer 1%	Bio-Rad #1610772
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich Life Science #T9281-50ML
Thiazovivin (TZV)	Merck Millipore # 420220
Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Buffer	Bio-Rad #10026938
Tris	Roth #4855
Triton™ X-100	Sigma Aldrich Life Science #T8787-100ML
Tween® 20	Sigma Aldrich Life Science #P2287-100ML
Versene 1:5000 (1X)	Gibco Life Technologies #15040-033

2.1.2 Kommerzielle Kits

Tabelle 5: Kommerzielle Kits

Name	Hersteller
ClarityMax™ Western ECL Substrate	Bio-Rad #1705062
DNase I Set	Zymo Research # E1010
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRAD # 170-8891
NEBNext Small RNA Library Prep Set	Illumina #R73300
miRNeasy Mini Kit	QIAGEN #217004
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific #23225
Precision Plus Protein™ Standards	Bio-Rad #161-0373
Prolong gold antifade reagent with DAPI (4',6-Diamidin-2Phenylindol)	Thermo Fischer Science #P36935
QIAzol Lysis Reagent	QIAGEN #79306
RNA-Clean & Concentrator™-25 Kit	Zymoresearch #R1016
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50)	QIGAEN #74704
SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad #1725270
Superskript IV Reverse Transkriptase	Thermo Fischer #18090010
SYBR Green Supermix	Bio-Rad #1725272
TGX Stain-Free™ FastCast Acrylamide Kit, 10%	Bio-Rad #161-0183

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
1% BSA (*bovine serum albumin*)	6,5 ml DPBS + 1 ml 7,5% BSA Solution
1% Milch	10 ml 5% Milch + 40 ml 1%TBST
1% TBS (t*ris-buffered saline*)	10 mM Tris + 150 mM NaCl in Millipore Water bei pH = 7,4
1% TBS-T (t*ris-buffered saline with tween*)	20 mM Tris-base + 50 mM NaCl + 0,1% Tween 20 Bei pH = 7,5
10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	10%ige Lösung in Nukleasefreies Wasser
5% Milch	2,5 g Milchpulver + 50 ml 1% TBS-T
DTT (Dithiothreitol) 2M	2 M Lösung DTT (d. h. 0,3085 g/ml)
Immunopräzipitation (IP) Puffer	50 nM Tris + 150 mM NaCl + 0,1% NP40 Bei pH = 7,4
Resolver Solution	4 ml Resolver A + 4 ml Resolver B + 40 µL 10% APS + 4 µL TEMED
Radioimmunopräzipitationassay (RIPA) Puffer	Pierce RIPA Buffer Complete™ Protease inhibitors
Stacker Solution	1 ml Stacker A + 1 ml Stacker B + 10 µL 10% APS + 2 µL TEMED
TRIS-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	40 mM Tris + 20 mM acetic acid + 1 mM EDTA
TRIS-Borat-EDTA (TBE) Puffer	45 mM Tris-borate + 1 mM EDTA
Triton X-100 (0,1%)	0,1% Triton-X-100 + DPBS

2.1.4 Medien und Lösungen in der Zellkultur

Tabelle 7: Medien und Lösungen in der Zellkultur

Name	Zusammensetzung
Cardio Culture Medium	RPMI with HEPES und Glutamax + 1x B27 Serum-free Supplement
CHIR (12 mM) (Lagerung bei -20°C)	5 mg CHIR99029 + 894 µl DMSO

Name	Zusammensetzung
Differenzierungsmedium (C. Diff) (steril filtriert)	RPMI with HEPES und Glutamax + 250 mg humanes Albumin + 100 mg L-Ascobic Acid-2-Phosphat
Digestion-Medium	80 ml Cardio Culture Medium + 20 ml Hitze-inaktivieretes FBS + 100 µl TZV
Einfriermedium	90% FBS + 10% DMSO + 1:1000 TZV
Endothelin-1 1 nM	2 µL von 1 µM Stammlösung 1 + 1998 µl CardioCulture
Endothelin-1 1 µM (Stammlösung 1)	1 µl von ET-1 100 µM + 99 µl H2O
Endothelin-1 2 nM	4 µL von 1 µM Stammlösung 1 + 1996 µl CardioCulture
Endothelin-1 3 nM	6 µl von 1 µM Stammlösung 1 + 1994 µl CardioCulture
Essential 8 Medium (E8 Medium)	E8 Essential Basal + 1x E8 Essential 8 Supplement
Isoprenaline (ISO) 10 µM (Stammlösung 2)	10 µL von ISO 1 mM + 990 µL H20
Isoprenaline (ISO) 100 mM (Stammlösung 1)	0,248 g ISO auf 10 ml H20
Isoprenaline (ISO) 1 mM (Stammlösung 2)	10 µL von ISO 100 mM + 990 µL H20
IWP2 (5 mM)	10 mg IWP2 + 4,28 ml DMSO Lösen bei 37°C für 10 Minuten Lagern bei -20°C
Lactate/ HEPES (1 M)	3 ml Sodium DL-Lactate Solution 60% (w/w) + 18 ml 1M HEPES Sodium Salt Solution Lagerung bei -20°C
Phenylephrine (PE) 100 mM (Stammlösung 1)	0,204 g PE auf 10 ml H2O
Phenylephrine (PE) 100 µM	20 µl von 10 mM Stammlösung 2 + 1980 µl CardioCulture
Phenylephrine (PE) 10 mM (Stammlösung 2)	100 µl von PE 100 mM + 900 µl H2O
Phenylephrine (PE) 20 µM	20 µl von 2 mM Stammlösung 2 + 1980 µl CardioCulture
Phenylephrine (PE) 2 mM (Stammlösung 2)	20 µl von PE 100 mM + 980 µl H2O
Selektionsmedium	500 ml RPMI ohne Glutamax + 250 mg Albumin + 100 mg L-Ascobic Acid 2-P + 2 ml Lactat/HEPES
siRNA 10 µM	siRNA (1 nmol) in 100 µl RNA-freies Wasser gelöst
Thiazovivin (TZV) 2 nM	6,8 ml DMSO + 10 mg TZV Lagerung bei -20°C

2.1.5 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Zelltyp	Interne Identifikation	Spender	Spezifikation	Publikation
hiPSCs	pCTRL 1.1	weiblich, aus Hautfibroblasten	mittels Plasmiden reprogrammiert	(Borchert et al. 2017)
	WT-D2-1u	weiblich, aus Hautfibroblasten	mittels integrativer Lentiviren (STEMCCA) reprogrammiert	(Streckfuss-Bömeke et al. 2013)

2.1.6 RNA

Tabelle 9: RNA

Name	Sequenz	Hersteller
Spike-RNA (0,05 μmol) Norm_spike_in_dep	UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA	Dharmacon Ref# SO-2791499G CTM-497447, HR1ZN-006162
M6A_spike_in_dep: RNA (0,05 μmol)	UCACAm6aCCUAGAAAGAGUAGA	Dharmacon Ref# SO-2791499G CTM-497448, HR1ZN-006163
GeneSolution siRNA (1 nmol)	Hs_FTO_8: CAGGACGCTGAGAGAACTTACA Hs_FTO_7: TAAGAGCAGAGCAGCATACAA Hs_FTO_6: CTCCGAGAAGCCAGCAGTGTA Hs_FTO_5: CAGGTCGCGGTGGCAGTGTA	QIAGEN FlexiTube GS79068

2.1.7 qPCR-Primer

Tabelle 10: qPCR-Primer

Name	Sequenz	Hersteller
NPPB Forward	5‘CTT TCC TGG GAG GTC GTT CC 3‘	Eurofins Genomics
NPPB Reverse	5‘GTT GCG CTG CTC CTG TAA C 3’	Eurofins Genomics
ACTA1 Forward	5’AGG TCA TCA CCA TCG GCA ACG A 3‘	Eurofins Genomics
ACTA1 Reverse	5’GCT GTT GTA GGT GGT CTC GTG A 3‘	Eurofins Genomics
FTO Forward	5’GTC GAC GCC ACC ATG AAG GCG ACC CCG CCG ACT G 3‘	Eurofins Genomics
FTO Reverse	5‘AAG CTT CTA GGG TTT TGC TTC CAG AAG 3‘	Eurofins Genomics

2.1.8 Antikörper

Tabelle 11: Primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung		Hersteller
		IF	WB	
Anti-FTO (5H-2H10)	Maus		1:1000	Novusbio #NBP2-29512
Anti-GAPDH	Maus		1:10000	Merck #MAB374
Anti-Alpha-Aktinin	Maus	1:1000		Sigma Aldrich #A7811
Anti-m6a	Kaninchen	1:1000		Synaptic System #202003

Tabelle 12: Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Konjugat	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG	Alexa Fluor 488	Esel	1:5000	Thermo Fisher Scientific A21202
Anti-rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	1:1000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (A11008)
Anti-mouse IgG, HRP-linked		Ziege	1:10000	Cell Signaling Technology #7074S
Anti-mouse IgG	Alexa Fluor 647	Esel	1:5000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (A32728)

2.1.9 Labormaterialien

Tabelle 13: Labormaterialien

Name	Hersteller
0,2 µm nitrocellulose membrane	Bio-Rad #1704270
12-Well Plate with Lid	CytoOne (Starlab Int GmbH) #CC7682-7512
6-Well Plate with Lid	CytoOne (Starlab Int GmbH) #CC7682-7506
96-well Platte	Nunc #442404
Deckgläser für die Mikroskopie 18x18 mm, rund	Thermo Scientific
Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. #62.554.002, #62.547.004
Filterspitzen: 0,1 - 1000 µl	Starlab #S1120-3810, #S1122-1830, #S1120-1840
iCycler iQ® PCR Plates 96-well	Bio-Rad #2239441

Name	Hersteller
Labortücher Weiß	Kimtech Science Kimberly-Clark Professional
Microseal® 'B' seal	Bio-Rad #MSB1001
Nalgene® Cryoware	Thermo Scientific #5000-0012
Objektträger Superfrost ® Plus	Thermo Scientific #J1800AMNZ
Pasteurpipetten	LABSOLUTE Th Geyer GmbH& Co. KG #7691061
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG #0030 120.086, #0030 120.094
SafeSeal SurPhob Spitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym #VT0200, #VT0230, #VT02060
Serologische Pipette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. #86.1252.001, #86.1253.001, #86.1254.001, #86.1685.001 #86.1256.001
Steriflip® Diposable Vacuum Filtration System 0,22 µm Millipore Express ® 50 mL, 500 mL	Merck Millipore #SCGP00525, #SCGPT05RE
TC-Flache T75, T25	Sarstedt AG & Co. #83.3911.002, #83.3910.001
Thick Blot Paper Filter Paper	Bio-Rad #1650921
Transparente Entwicklungstaschen für Western Blot	Biozym #541037
Zellschaber 25 cm	Sarstedt AG & Co. #83.1830

2.1.10 Laborausstattung

Tabelle 14: Labormaterialen

Name	Hersteller
96-well Plate Reader	Bio-Tek
C02 Incubator HERACELL VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific
ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software	Bio-Rad #1708265
Heizbad: MHR 23	HLC by DITABIS Artikelnr. 9800523001
iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System Halogen Lamp Ersatz	Bio-Rad #170-8756
iQ5-real time PCR Gerät	BioRad #170-9790
Kühlschränke: Premium, Comfort	Liebherr
Magnet stirrer RSM-10HP	Phoenix Instrument
Magnetischer Ständer	Thermo Fisher #12321D
Mikroskope: Primo Vert, Oberserve.A1 mit AxioCam Mrc5, Axio Oberserver.Z1 MRm	Carl Zeiss
Mini Protean ® Short plates	Bio-Rad #1653308
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad
Multipipette® Xstream	Eppendorf
NanoDrop 2000	Thermo Fisher
Pipetten: Research Plus 2,5/ 10/ 100/ 1000 µl	Eppendorf

Name	Hersteller
Pipettierhelfer: Accu-jet pro Pipetboy 2 acu	 Brand Integra
Power Pac 3000-Power-supply	Bio-Rad
NanoPhotometer® N60	Implen
Roller RS-TR05	Phoenix Instrument
Sterile Zellkulturbank	CleanAir CA/RE 5
Thermo Cycler: iCycler, T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge CD1008	Phoenix Instrument
Trans-Blot® TurboTM System	Bio-Rad #170-4155
Überkopf-Roller	BioSan RS-24
Ultra-Low Temperature Freezer MDF-OU700VH	Panasonic
Vortexer VF2, Vortex-Genie 2 RS-VA10	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik Phoenix Instrument
Waagen: Extend ED153-CW, PA225D BJ610C	 Sartorius Precisa
Zentrifugen: 5180 R, 5415 R, 5425R Biofuge 13, Biofuge pico	 Eppendorf Heraeus Instruments (Thermo Scientific)

2.1.11 Software

Tabelle 15: Software

Name	Hersteller
AxioVision	Carl Zeiss
Bio-Rad iQ5	Bio-Rad
GNU Image Manipulation Program (Gimp)	Das GIMP-Team
Image J/FIJI	(Schindelin et al. 2012)
Image Lab Software	Bio-Rad
NanoDrop 2000 Operating Software	Thermo Fisher
Office	Microsoft
Prism 8	Graph Pad Software, Inc

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden unter folgenden Bedingungen kultiviert: 5% CO_2, 20% O_2, relative Luftfeuchte bei 37°C.

Die Platten wurden vorher mit Geltrex beschichtet, damit sich die hiPSCs an diesen anheften konnten. Hierfür wurde das Geltrex (Konzentration 2 mg/ml) in 12 ml kaltem DMEM-F12 (mit GlutaMax, kein HEPES) gelöst. Von dieser Lösung wurde 1 ml in die 6-Well-Platte, 0,5 ml in die 12-Well-Platte und 2 ml in die T25er-Flasche pipettiert und verteilt, sodass der Boden vollständig bedeckt war. Vor der Verwendung wurden die Platten für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend wurde das gelöste Geltrex vollständig abgesaugt.

2.3.1.1 hiPSC-Zellkultur

Die hiPSCs wurden auf den Geltrex-beschichteten Platten in Essential 8 (E8) Medium kultiviert und das Medium wurde täglich gewechselt. Hierfür wurde das alte Medium mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und neues E8-Medium mit einer Pipette an den Rand der Wells pipettiert (2 ml pro 6-Well und 1 ml pro 12-Well). Während der Kultivierung auf 6-Well-Platten wurden die Zellen entsprechend ihrer Dichte alle fünf bis sieben Tage passagiert. Hierfür wurde das alte E8-Medium abgesaugt, die Zellen mit Versene gewaschen (1 ml/6-Well) und zum Lösen der Zellen von der Platte erneut mit Versene (1 ml/6-Well) für drei Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Versene wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 1 ml E8-Medium (+ 2 μM TZV) von der Platte abgelöst. Die Zellen wurden in entsprechender Konzentration (1:10 und 1:8 für 6-Well-Platte; 1:12 für 12-Well Platte) auf vorgelegtes E8-Medium mit 2 μM TZV (2 ml/6-Well und 1 ml/12-Well) ausgesät.

2.3.1.2 Differenzierung der hiPSCs zu ventrikulären Kardiomyozyten

Sobald die hiPSCs auf den 12-Well Platten eine Konfluenz von 85 - 90% erreicht hatten wurde mit der Differenzierung von hiPSCs zu hiPSC-ventrikulären Kardiomyozyten begonnen (Abbildung 7). Das Differenzierungsmedium (C. Diff) setzte sich zusammen aus 500 ml RPMI 1640 mit GlutaMax, 250 mg Albumin und 100 mg L-Ascobic Acid 2-Phosphate. Zum Start der Differenzierung (Tag null) wurde das Differenzierungsmedium mit CHIR99021 (4 μM entspricht 0,33 μl/ml C.Diff) zur Aktivierung des Wnt-Signalweges versetzt und es wurden 2 ml des Mixes vorsichtig in jedes 12-Well gegeben. Nach 48 Stunden (Tag zwei)

erfolgte der Mediumwechsel zu 2,5 µM IWP2, gelöst im Differenzierungsmedium (entspricht 1 µl/ml C.Diff), und es wurden wieder 2 ml pro 12-Well draufgegeben. An Tag vier erfolgte der Mediumwechsel auf das Differenzierungsmedium ohne Zusätze (2 ml/12-Well) und an Tag sechs wurde das Medium zu Cardio Culture (2 ml/12-Well) gewechselt. Anschließend wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt, indem das alte Medium vorsichtig mit einer Pasteurpitpette abgesaugt und 2 ml Cardio Culture Medium in jedes 12-Well pipettiert wurden. Ab dem achten Tag konnten spontane Kontraktionen beobachtet werden, die sich ab dem zehnten Tag weiter zu robusten Kontraktionen entwickelten.

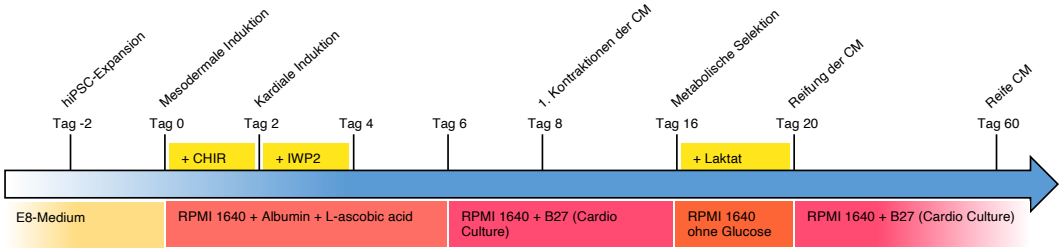

Abbildung 7: Zeitstrahl zum Ablauf der Differenzierung der human induced-pluripotent stemcells (hiPSCs) zu ventrikulären Kardiomyozyten (CM). Adaptiert von Cyganek et al. (2018).

2.3.1.3 Erster Verdau der hiPSC-CM

Die differenzierten Kardiomyozyten wurden ab Tag 15 mithilfe von Trypsin verdaut und in T25er-Flaschen neu ausplattiert. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt, jedes 12-Well mit 0,5 ml Trypsin gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin pro 12-Well für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden von der Platte mit der 1000 µl Pipette abgelöst und die Zell-Trypsin-Suspension in ein 50 ml Flacon überführt. In diesem war die doppelte Menge *Digestion*-Medium im Verhältnis zu Trypsin vorgelegt worden. Nachdem die Zellen im Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut gelöst waren, wurden sie bei 200 x g für fünf Minuten bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in der entsprechenden Menge *Digestion*-Medium resuspendiert und 1 ml der Zellsuspension wurde pro T25er Flache (auf 4 ml vorgelegtes *Digestion*-Medium) ausplattiert. Die T25er-Flaschen wurden für mindestens zwei Tage zurück in den Inkubator gestellt, bis sich die Zellen absetzen und erholen konnten.

2.3.1.4 Metabolische Selektion der hiPSC-CM

Nach dem ersten Verdau erfolgte die metabolische Selektion über insgesamt vier Tage. Das Selektionsmedium bestand aus 500 ml RMPI 1604 ohne GlutaMax,

250 mg Albumin, 100 mg L-Ascobic Acid 2-Phosphate und 2 ml Lactat/HEPES. Das *Digestion*-Medium wurde vorsichtig aus der T25er-Flasche abgesaugt und 4 ml Selektionsmedium in jede Flasche gegeben. Nach 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel erneut auf 4 ml Selektionsmedium pro Flasche. Nach insgesamt vier Tagen Selektion erfolgte der Mediumwechsel auf Cardio Culture. Bis Tag 60 wurde das Medium alle drei (4 ml/ T25er Flasche) bis vier Tage (6 ml/ T25er Flasche) gewechselt.

2.3.1.5 Zweiter Verdau der hiPSC-CM

Der zweite Verdau der Kardiomyozyten erfolgte zeitnah vor den geplanten Experimenten und die Zellen wurden von den T25er Flaschen auf 6-Well-Platten in einer definierten Menge umgesetzt, sodass man eine Einzelschicht Kardiomyozyten in jedem Well erhielt. Das alte Cardio Culture Medium wurde aus den Flaschen abgesaugt, die Zellen mit 1 ml Trypsin pro Flasche gewaschen und mit 3 ml Trypsin pro Flasche für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mit 6 ml *Digestion*-Medium pro Flasche abgestoppt und die Zell-Trypsin-Medium-Suspensionen aus den T25er-Flaschen wurde in einem 50 ml Flacon kombiniert. Zur Zellpelletierung erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 x g (RT). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 15 ml *Digestion*-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mithilfe der Thoma-Zählkammer gezählt (Abbildung 8). Hierfür wurden zweimal 10 *µ*l der Zellsuspension in die vorbereitete Zählkammer gegeben und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Nach der Berechnung wurde die errechnete Mikroliterzahl für die gewünschte Zellzahl aus der Zellsuspension auf 3 ml vorgelegtes *Digestion*-Medium pro Well ausplattiert. Zwei Tage nach dem Verdau wurde das Medium wieder auf Cardio Culture (2 ml/Well) gewechselt.

1. Zählen der einzelnen Zellen in den beiden Gittern und Berechnung des Mittelwertes:
   $$\frac{69+73}{2} = 71$$
2. Berechnung der Zellanzahl pro Milliliter:
   $$\frac{71}{64} = 1{,}11\ \mathrm{x}10^6\ \mathrm{Zellen/ml}$$
3. Berechnung der Mikroliteranzahl für 600000 Zellen pro Well:
   $$\frac{0{,}6}{1.11} = 0{,}54\ \mathrm{ml/well} \ = 540\ \mu\mathrm{l/Well}$$

Abbildung 8: Beispielrechnung für Zellzählung mit der Thoma-Zählkammer

2.3.1.6 Ernten der Zellen

Nach der festgelegten Behandlungsdauer der Zellen wurden diese geerntet. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml kaltem DPBS pro 6-Well gewaschen und dann mithilfe eines Zellschabers in 1 ml kaltem DPBS pro 6-Well abgelöst. Das Zell-DPBS-Gemisch wurde mit der 1000 μL Pipette in ein 1,5 ml Eppendorfer Tube transferiert und für eine Minute bei 13000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im 1,5 ml Eppendorfer Tube in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.3.1.7 Einfrieren der hiPSC-CM

Um die differenzierten Kardiomyozyten einzufrieren, wurden die Zellen zunächst zweimal mit DPBS (1 ml/T25er-Flasche) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin pro T25er-Flasche für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zell-Trypsin-Suspension wurde in ein 50 ml Falcon mit FBS (im Verhältnis 1:1) gegeben und für zehn Minuten bei 100 x g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen in FBS resuspendiert. Für die exakte Berechnung des Einfriergemisches wurden die Zellen gezählt. Hierfür wurden 20 μl der Zell-FBS-Suspension in 10 ml CASY-Puffer gegeben und automatisch mit dem CASY-Zellzähler gezählt. Entsprechend der gemessenen lebenden Zellzahl in Millionen/ml wurde im Verhältnis dazu 90% FBS, 10% DMSO und 1:1000 TZV dazugeben. Das ganze Volumen wurde langsam in ein Cryo-Tube gefüllt und bei -80°C eingefroren.

2.3.1.8 Auftauen der hiPSC-CM

Zum Auftauen der iPSC-CMs wurde das Cryo-Tube im Wasserbad aufgetaut, bis nur noch kleine Eiskristalle übrig waren. Die Zellsuspension wurde tröpfchenweise mit einer Pasteurpipette auf 10 ml vorgelegtes *Digestion*-Medium in einem Falcon gegeben und für zehn Minuten bei 100 x g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml *Digestion*-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf mit Geltrex beschichtete 6-Well Platten ausplattiert und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, sodass sich die Zellen besser anheften konnten. Danach wurde in jedes 6-Well 2 ml *Digestion*-Medium gegeben und die Platten zurück in den Inkubator gestellt. Nach zwei Tagen wurde das Medium auf Cardio Culture (2 ml/Well) gewechselt.

2.3.1.9 Stimulation mit Isoprenaline und Phenylephrine für sechs Stunden

Für die Stressinduktions-Experimente mit Phenylephrine und Isoprenaline wurden 600000 Zellen pro Well ausplattiert. Das Medium wurde 24 Stunden vor der Stimulation gewechselt. Für die entsprechende Konzentration von ISO und PE wurde die Stammlösung 2 (siehe Tabelle 7) mit Cardio Culture Medium im Verhältnis 1:100 verdünnt. Als Kontrolle wurde die äquivalente Menge Wasser mit Cardio Culture vermengt.

Kontrolle = 20 µl von Nuklease-freies Wasser + 1980 µl Cardio Culture

ISO 100 nM = 20 µl von 10 µM Stammlösung 2 + 1980 µl Cardio Culture

PE 100 µM = 20 µl von 10 mM Stammlösung 2 + 1980 µl Cardio Culture

Das alte Medium wurde vorsichtig abgenommen und 2 ml/Well je nach Kondition auf die Kardiomyozyten gegeben. Die Zellen wurden sechs Stunden nach der Stimulation geerntet.

2.3.1.10 Stimulation mit Endothelin-1 für 48 Stunden

Für die Hypertrophieinduktions-Experimente mit Endothelin-1 wurden 700000 Zellen pro Well ausplattiert und 24 Stunden vor der Behandlung wurde das Medium gewechselt. Für die entsprechende Konzentration von ET-1 wurde die Stammlösung 1 (siehe Tabelle 7) zunächst mit Nuklease-freiem Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt. Diese Stammlösung 2 wurde wiederum im Verhältnis 1:100 mit Cardio Culture weiter verdünnt. Als Kontrolle diente Cardio Culture, das mit der entsprechenden Menge Wasser versetzt worden war.

ET-1: 1 µM = 1 µl von ET-1 100 µM + 99 µl Nuklease-freies Wasser

3 nM = 6 µl von 1 µM Stammlösung 2 + 1994 µl Cardio Culture

Kontrolle = 6 µl Nuklease-freies Wasser + 1994 µl Cardio Culture

Das alte Medium wurde vorsichtig abgenommen und 2 ml/Well je nach Kondition auf die Kardiomyozyten gegeben. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Stimulation geerntet.

2.3.1.11 Transfektion der siRNA zum *Knock-Down* von FTO in hiPSC-CM

Zur Transfektion der siRNA in die Kardiomyozyten wurden zunächst zwei Reaktionsansätze (Tabelle 16) vorbereitet, anschließend kombiniert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 16: Reaktionsansätze für Transfektion der siRNA in die hiPSC-CM.

Reaktionskomponten	Reaktionsansatz 1	Reaktionsansatz 2
OPTI-Mem I Medium	75 µl	75 µl
Lipofectamine Stem Cell Reagent	6 µl	-
siRNA (aus 10 µM Stammlösung)	-	3 µl

Das alte Medium wurde aus der Platte entfernt und in jedes Well 1,5 ml OPTI-Mem I Medium gegeben. Dann wurden 150 µl des vorbereiteten Reaktionsansatzes in das Well dazu pipettiert und gut verteilt. Nach vier Stunden wurden erneut 1,5 ml OPTI-Mem I Medium in jedes Well hinzugefügt und nach 24 Stunden wurde das Medium auf Cardio Culture (1,5 ml/Well) gewechselt. Die Kardiomyozyten wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet (siehe 2.3.1.6).

2.3.2 Immunofluoreszenzfärbung der hiPSC-CM

Zur Charakterisierung und Messung der Zellgröße der hiPSC-CM wurden die Zellen mit α-Aktinin angefärbt. In Vorbereitung auf die die Immunofluoreszenzfärbung (IF-Färbung) wurden 30000 Zellen pro 12-Well auf 18x18 cm Deckgläschen ausplattiert (siehe 2.3.1.5).

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit DPBS gewaschen (0,5 ml/Well) und zur Fixierung mit 4% PFA für 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit DPBS gewaschen und anschließend in 1% BSA bei 4°C gelagert. Der primäre Antikörper (α-Aktinin A7811 Maus) wurde im Verhältnis 1:1000 in 1% BSA mit 0,1% Triton X zur Membranpermeabilisierung verdünnt und es wurden 100 µl pro Deckgläschen ohne Luftblasen auf Parafilm in einer Feuchtigkeitskammer pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette vorsichtig aus der 12-Well-Platte herausgeholt, mit der Zellseite nach unten auf den primären Antikörper gelegt und abgedeckt über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach oben zurück in die 12-Well-Platte gelegt und dreimal mit DPBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 488 Esel) wurde im Verhältnis 1:5000 in 1% BSA verdünnt und wie der primäre Antikörper aufgetragen. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten aufgelegt und für eine Stunde bei 37°C abgedeckt inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen wie beschrieben zurück in die 12-Well Platte gelegt, dreimal mit DPBS und abschließend einmal mit destilliertem Wasser gewaschen.

Zur Färbung des Zellkerns und gleichzeitigen Fixierung des Deckgläschens wurde das Reagenz *prolong gold antifade reagent with DAPI* ohne Luftblasen auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten daraufgelegt. Die Objektträger wurden im Dunkeln getrocknet und bei 4°C gelagert.

2.3.3 Messung der Zellgröße

Die mit Immunofluoreszenz gefärbten Objektträger wurden mit dem 40x*oil* Objektiv des Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskops und der AxioCam MR 1.4MP mikroskopiert. Pro Färbung wurden 20 Bilder aufgenommen: jeweils im Kanal DAPI und FITC. Aus den entstandenen Einzelbildern wurde anschließend künstlich ein *overlay* (DAPI + FITC) erzeugt und eingefärbt. Zur Messung der Zellgröße der hiPSC-CM wurde das Programm Fiji verwendet. Die Bildgröße wurde global auf 6,199 μm/Pixel und der Bildtyp auf 8-bit festgesetzt (Abbildung 9, Figur A). Nach der Verstärkung des Kontrasts um 0,3 (Abbildung 9, Figur B) wurde die Schwelle manuell so angepasst, dass die Kardiomyozyten komplett schwarz umrandet waren (Abbildung 9, Figur C). Mit dem Befehl *fill holes* wurden die Zellen vollständig schwarz gefärbt (Abbildung 9, Figur D), mithilfe des Tools ‚Zauberstab' ausgewählt und gemessen (in μm^2). Für jede Kondition wurden 20 Bilder von drei Deckgläschen (n = 3) ausgemessen und die Datensätze in einer Excel-Tabelle gesammelt. Für die statistische Auswertung und graphischen Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism 8 verwendet.

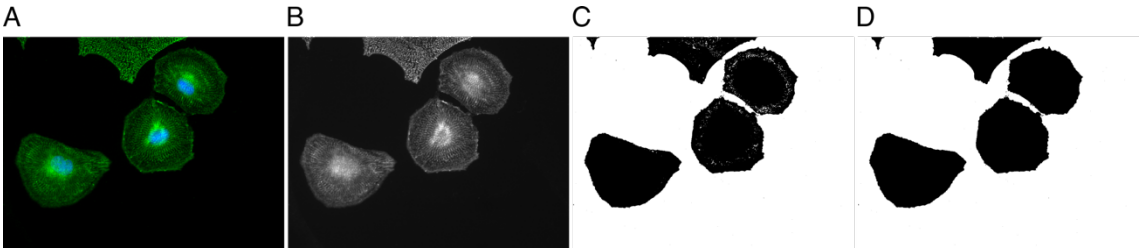

Abbildung 9: Exemplarische Aufbereitung eines IF-Bildes zur Messung der Zellgröße

A) Kontrastverstärkung um 0,3 B) Anpassung der Schwelle bis zur vollständigen Umrandung C) Befehl *fill holes* zur Schwarzfärbung D) Fertig aufbereitete hiPSC-CM, die bereit zur Zellgrößenmessung (in μm^2) ist.

2.3.4 Isolation der RNA

Für die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) und die Sequenzierung von den kultivierten hiPSC-CM wurde die RNA mithilfe des *miRNeasy Mini Kit* von QIAGEN isoliert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 10000 x g (RT) durchgeführt, sofern nicht explizit anders beschrieben. Die gewonnenen

Zellpellets (siehe 2.3.1.6) wurden mit je 700 µl *QIAzol Lysis Reagent* versetzt, für eine Minute gevortext und das Lysat für fünf Minuten inkubiert. Zu jeder Probe wurde 140 µl Chloroform gegeben, für 15 Sekunden geschüttelt und für drei Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert, sodass die Probe in drei Phasen aufgetrennt worden war. Die oberste Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 1,5-fachen Volumen 100% Ethanol versetzt. Nach und nach wurden je 700 µl der Probe auf ein Zentrifugationssäulchen (*RNeasy Mini Spin Column*) gegeben und für 15 Sekunden zentrifugiert. Auf jedes Säulchen wurden 700 µl *RNA Wash* Puffer gegeben, für 30 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der erste Waschschritt erfolgte mit 500 µl RPE Puffer für 15 Sekunden und der zweite mit 500 µl für zwei Minuten. Die Säulchen mit der aufgereinigten RNA wurde zum Trocknen der Membran für eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert und dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gestellt. Zur Elution der RNA wurden 40 µl RNase-freies Wasser mittig auf die Membran gegeben und für eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert.

Für den DNase-Verdau wurde das DNase I Set von Zymo Research verwendet. Zu den 40 µl RNA-Eluat wurden 5 µl *DNA Digestion* Puffer und 5 µl DNase I gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Separierung der RNA in die lange und kurze Fraktion und Aufreinigung wurde das *RNA-Clean & Concentrator™-25 Kit* von Zymo Research verwendet. Hierfür wurden je drei Proben einer Kondition kombiniert. Zuerst wurde der Puffer vorbereitet, indem das gleiche Volumen *RNA Bindung* Puffer mit 100% Ethanol vermengt wurde. Dann wurde zu jeder Probe (150 µl) das doppelte Volumen des angepassten Puffers gegeben. Das gesamte Volumen wurde auf eine *Zymo-Spin™ Column* geladen und für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Dadurch wurden die > 200 nt langen RNA-Fragmente in der Säulchenmembran gebunden. Der Durchfluss enthielt die 17 - 200 nt kurzen RNA-Fragmente. Dieser wurde mit dem gleichen Volumen 100% Ethanol vermengt, auf ein neues Säulchen geladen und für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, wodurch auch die kurzen RNA-Fragmente in der Membran gebunden wurde. Die anschließenden Schritte wurden für die kurze und lange RNA-Fraktion identisch durchgeführt: Auf jedes Säulchen wurden 400 µl *RNA Prep* Puffer gegeben, für 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der erste Waschschritt erfolgte mit 700 µl *RNA Wash* Puffer für 30 Sekunden und der zweite mit 400 µl für zwei Minuten bei je 11000 x g. Zur Elution der kurzen und langen RNA-Fraktion wurden 15 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben und für eine

Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Abschließend wurde die RNA-Konzentration mit dem NanoDrop gemessen, das als Photometer die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm misst. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.3.5 Synthese der cDNA

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) aus der isolierten langen RNA erfolgte mithilfe des *iScript cDNA Synthesis Kit* von BioRad. Hierfür wurde zunächst aus der gemessenen RNA-Konzentration (ng/µl) die benötigte RNA-Menge (in µl) für 250 ng cDNA berechnet. Für einen 20 µl Ansatz cDNA wurde folgender Reaktionsmix vorbereitet (Tabelle 17):

Tabelle 17: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese aus RNA

250 ng	RNA
4 µl	5x iScript Reaction Mix
1 µl	iScript Reverse Transkriptase
XX µl	Nuklease-freies Wasser
20 µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsmix wurde in einem Thermo Cycler mit folgendem Programm inkubiert (Tabelle 18):

Tabelle 18: Programm für die cDNA-Synthese im Thermo Cycler

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Anlagerung der Primer	25°C	5 min
Reverse Transkription	46°C	20 min
Inaktivierung der reversen Transkription	95°C	1 min
Optional	4°C	∞

Die cDNA-Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

2.3.6 Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion

Die quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde genutzt zur Quantifizierung bestimmter mRNAs. Nachdem die RNA, wie oben beschrieben, isoliert und zu cDNA umgeschrieben worden war, wurden die Proben, wie im nachfolgenden Schema beschrieben, für ein Well einer 96-Well Platte vorbereitet (Tabelle 19).

Tabelle 19: Reaktionsansatz für die qPCR

Reagenzien	Ein Well einer 96-Well Platte
Nuklease-freies Wasser	7,4 µl
Primer Mix 1:10 (f*orward* und r*everse*)	0,6 µl
iQ Syber Mix	10 µl
cDNA (250 ng)	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Duplikate wurden für jede Probe und den Standard pipettiert. Als Kontrolle diente die *Primer PCR Control*. Die DNA-Amplifikation erfolgte mit dem Gerät *iQ5-real time PCR* von BioRad nach folgendem Programm (Tabelle 20).

Tabelle 20: Programm zur DNA-Amplifikation mit dem *iQ5-real time PCR* Gerät

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	3 min	-
Denaturierung	95°C	10 sec	45
Anlagerung	60°C	30 sec	
Schmelzkurve	55 - 95°C 0,6°C/Schritt		-

Der *Cycle Threshold* (CT) und die Quantifizierung wurden automatisch mithilfe des Programms iQ5 analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel, wobei die CT-Werte der Proben gegen die CT-Werte der Kontrolle normalisiert wurden.

2.3.7 *Methylated RNA immunoprecipitation-Sequencing* (MeRip-Seq)

Für die Sequenzierung der kurzen RNA-Fraktion wurden 2000 ng RNA als Ausgangmenge benötigt. Diese wurde wie beschrieben (siehe 2.3.4) isoliert. Das Ziel des *methylated RNA immunoprecipitation-Sequencing* (MeRip-Seq) ist der Erhalt von m6a methylierter RNA mithilfe einer magnetisch basierten Immunopräzipitation (IP).

Zur Vorbereitung wurden die Protein A/G *beads* (30 µl pro Probe) zweimal mit 500 µl 1xIP Puffer auf einem magnetischen Ständer gewaschen und anschließend in 500 µl 1xIP Puffer resuspendiert. Es wurden 3 µg des m6A-Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Separierung der *beads* wurden diese erneut auf den magnetischen Ständer gestellt und der Überstand wurde entfernt. Nach zwei Waschschritten mit je 500 µl 1xIP Puffer wurden die *beads* in 200 µl 1xIP Puffer resuspendiert.

Die RNA-Proben (2000 ng) wurden mit *spike*-RNA (100 ng) versetzt und 210 ng wurde als *Input* aufbewahrt. Anschließend wurden die RNA-Proben mit 200 µl 1xIP Puffer inklusive 5 µl Superase.IN (200 U/µl) verdünnt, zu den vorbereiteten *beads* (s.o.) gegeben und für zwei Stunden bei 4°C auf dem Überkopf-Roller inkubiert. Die Proben wurden auf den magnetischen Ständer gestellt und der Überstand entfernt. Es wurde zweimal mit je 500 µl 1xIP Puffer gewaschen, wobei die Proben für je fünf Minuten bei 4°C rotierten. Zu den *beads* wurde 150 µl PDK Puffer, welcher mit 10 µl Proteinase K versetzt war, gegeben und für eine Stunde bei 37°C unter kontinuierlichem Rütteln inkubiert. Danach wurden die Proben auf den magnetischen Ständer gestellt und der m6A-enthaltene Überstand abgenommen und aufbewahrt. Diese beiden Schritte wurden wiederholt, sodass man am Ende ein RNA-Eluat von 300 µl erhielt.

Für die Purifikation der RNA wurde das *RNA-Clean & Concentrator™-25 Kit* von Zymo Research verwendet. Zu jeder Probe (300 µl) wurde zunächst das doppelte Volumen *RNA Binding* Puffer (600 µl) gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde mit dem gleichen Volumen 100% Ethanol (900 µl) versetzt. Nach und nach wurde das gesamte Volumen auf eine *Zymo-Spin™ IIC Column* geladen und für eine Minute bei 11000 x g (RT) zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mit *RNA Prep* Puffer und *RNA Wash* Puffer wie bereits beschrieben (siehe 2.3.4). Zur Elution der RNA wurden 8,6 µl RNase-freies Wasser mittig auf die Membran gegeben und für eine Minute bei 16000 x g (RT) zentrifugiert.

Für die cDNA-*Library* wurden die Proben von der immunopräzipierten (Iped) und der *Input* Fraktion jeweils mithilfe des *TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kits* umgeschrieben. Die *Library Preperation* wurde von Susanne Burkhard (Deutsches Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen Göttingen, DZNE) durchgeführt. Anschließend wurden die Iped und *Input* Proben mit der Illumina HiSeq2000 sequenziert.

2.3.8 Bioinformatische Analyse der MeRip-Sequenzierungsdaten

Die Sequenzierungsdaten wurden mithilfe folgender Schritte aufbereitet: Zunächst wurden die Adapter von den ursprünglichen *reads* abgetrennt, die *reads* mit einer niedrigen Qualität entfernt und die übriggebliebenen *reads* mithilfe der STAR alignenment software (v.2.5.2b) (Dobin et al. 2013) zum humanen Genom (GRChg38) abgebildet. Die *output alignement files* (im BAM-Format) wurden sortiert. Mithilfe des SAMtools (v.1.9) (Li et al. 2009) wurde ein Verzeichnis erstellt. Diese Schritte zur Datenverarbeitung wurden sowohl auf die Daten des *Inputs* als auch der IP-Fraktion für jede sequenzierte biologische

Probe (Replikat) angewendet. Alle Proben durchliefen eine Qualitätskontrolle und wurden anschließend analysiert.

Für die Transkriptomanalyse wurde die differentielle Expression der sequenzierten Daten der *Input*-Proben von Kontrolle und ET-1 mit dem Programm DESeq2 (Love et al. 2014) analysiert. Gene, deren Expressionslevel einen *2-fold change* oder mehr mit einen *adjusted p-value* (*padj*) von 0,05 oder weniger aufwiesen, wurden als differentiell exprimiert gewertet. Die Detektion und die Anpassung der Expression für unbekannte Kovarianten wurde mit dem SVAseq Programmpaket (v.3.35.2) (Leek et al. 2021) durchgeführt.

Die Detektion der m6A-angereicherten miRNAs erfolgte durch die eigens dafür entwickelte Software (Bosse 2021), basierend auf der bayesianischen Statistik, und wurde umgesetzt in R-Stan (Stan Development Team 2020). Zusammengefasst basiert das Modell auf einer Mischung von zwei negativen binominalen Verteilungen auf dem Genlevel. Die erste Komponente repräsentiert den methylierten und die zweite Komponente den nicht-methylierten Status eines bestimmten Gens. Das Modell nimmt an, dass beide Mischungen den gleichen Streuungsparameter φ haben, aber unterschiedliche Mittelwerte $\mu 1$ und $\mu 2$. Proben von der a posteriori Verteilung des Methylierungsverhältnisses $\pi = \mu 1/\mu 2$ werden benutzt, um die Methylierungswahrscheinlichkeit eines bestimmten Gens zu berechnen.

Die Datenprozessierung und bioinformatische Analyse der sequenzierten Daten wurde durchgeführt von der bioinformatischen Abteilung des Deutschen Zentrums für neurodegenerative Erkrankungen Göttingen (DZNE), insbesondere von Dr. Tea Berulava, Dr. Gaurav Jain, Dr. Tonatiuh Pena-Centeno und Nikos Bosse.

2.3.9 Western Blot

Für die Proteinisolation wurden die Zellpellets in 80 μL RIPA-Puffer (versetzt mit Proteinase und Phosphatase-Inhibitoren) resuspendiert, für zehn Minuten auf Eis gestellt und währenddessen alle zwei Minuten gevortext. Nach zwei Stunden Inkubation auf einem Überkopf-Roller bei 4°C wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C auf 16000 x g zentrifugiert und der Überstand (Protein) wurde in ein neues 1,5 ml Tube überführt. Zur Messung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. Zur Vorbereitung wurden die Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt und die Arbeitslösung aus 4 μl Reagenz B mit 200 μl Reagenz A für ein Well der 96-Well Platte hergestellt. Auf die Platte wurden je 25

µl des Standards und der Proben in Doppelbestimmung aufgetragen und dann 200 µl der Arbeitslösung in jedes Well dazugegeben. Nach der Inkubation bei 37°C für 30 Minuten wurde die Proteinkonzentration bei der Wellenlänge 562 nm mithilfe des 96-Well Plattenlesers von Biotek gemessen. Für die Gelelektrophorese wurde ein SDS-Polyacrylamid Gel (TGX *Stainfree*-System von Biorad) hergestellt, welches am Boden aus einem Auftrennungs- und oben einem Sammelanteil bestand. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Kammer eingeklemmt und diese mit 1% TBS Puffer befüllt. Für einen Reaktionsansatz von 30 µl wurde die Probe (Proteinkonzentration von 7,4 µg) mit 4xLaemmli Puffer und 0,2 M DTT im Verhältnis 1:10 versetzt und mit der entsprechender Menge Nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Die Denaturierung erfolgte bei 98°C für fünf Minuten im Thermo Cycler. Anschließend wurde das Gel mit 30 µl Proben und 6 µl Marker beladen und die Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V für 40 Minuten. Nach der Gelaktivierung mithilfe von ultraviolettem Licht für eine Minute im *Imager* folgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran im Transfer-Puffer mithilfe des TransBlot Turbo Systems. Zur Effizienzkontrolle und späteren Normalisierung wurde die Membran mit dem *stain-free* Sytsems des *Imagers* abgebildet. Zum Blocken wurde die Membran für eine Stunde in 5%ige Milch bei RT inkubiert und danach mit dem primären Antikörper (1:1000 verdünnt) in 1%ige Milch über Nacht bei 4°C auf den Roller gelegt. Die Membran wurde dreimal mit 1% TBST gewaschen und für eine Stunde mit dem sekundären Antiköper (1:10000 verdünnt) in 1%ige Milch bei RT inkubiert. Nach dem erneuten Waschen wurde die Membran in eine Detektionstasche gelegt, mit *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* beträufelt und mit dem *Imager* visualisiert. Anschließend wurde die Membran zunächst zehn Minuten mit 10 ml TBS, dann 15 Minuten mit 3 ml *Resore-Stripping* Puffer und dann erneut zehn Minuten mit TBS inkubiert. Als Ladekontrolle erfolgte die erneute Inkubation über Nacht mit den primären Antikörper GAPDH nach dem oben beschriebenen Prinzip. Die Bandenintensität wurde quantifiziert mithilfe der Hintergrundsubtraktion und normalisiert gegen das Gesamtprotein oder die Ladekontrolle mit dem Programm Excel. Die Analyse erfolgte mit einem ungepaarten zweiseitigem t-Test durch das Programm GraphPad Prism.

2.3.10 Software für die Visualisierung und statische Analyse

Die Graphen wurden mit des Programms Graph Pad Prism Software (v.8.4.2) erstellt. Die weiteren Abbildungen wurden mithilfe von Inkscape (v.1.1.0) oder Microsoft Power Point (v.16.46) ausgearbeitet. Die Signifikanzlevel sind unterhalb der Abbildungen beschrieben, wenn statistische Tests durchgeführt wurden. Dabei gilt: ns = $p \geq 0{,}05$, * = $p \leq 0{,}05$, ** = $p \leq 0{,}01$, *** = $p \leq 0{,}001$, **** = $p \leq 0{,}0001$.

3 Ergebnisse

3.1 Differenzierung und Charakterisierung der hiPSC-CM

Die Generierung und Validierung der hiPSC-Zelllinien pCTRL 1.1 und WT-D2-1u erfolgte im Vorfeld durch die Arbeitsgruppe von Katrin Streckfuß-Bömecke (Universitätsmedizin Göttingen). Die kardiale Differenzierung der hiPSCs wurde, wie in den Methoden bereits beschrieben, im stabilen pluripotenten Zustand begonnen. Ab dem achten Tag nach Start der Differenzierung konnten erste Kontraktionen unter dem Mikroskop beobachtet werden, welche mit der Zeit rhythmischer und kräftiger wurden. Die Kultivierung der hiPSC-CM erfolgte für mindestens 60 Tage unter stabilen äußeren Bedingungen und die Umsetzung der reifen Kardiomyozyten in einer definierten Anzahl wurde zeitnah vor dem geplanten Experiment durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass die Differenzierung der hiPSCs zu reifen Kardiomyozyten gelungen war, wurde eine IF-Färbung mit alpha-Aktinin in beiden Zelllinien durchgeführt. Alpha-Aktinin ist ein Strukturprotein in den Z-Scheiben der Sarkomere und färbt somit das Grundgerüst der Kardiomyozyten spezifisch an. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Bei den reifen Kardiomyozyten (Abbildung 10, Figur B) waren verschiedene Formen von rund über oval und zum Teil mit Ausläufern zu beobachten. Durch die Färbung mit alpha-Aktinin zeigte sich die hochgradig organisierte und regelmäßige Sarkomerstruktur mit ihrer typischen Streifung. Des Weiteren wiesen diese Zellen oftmals mehrere Kerne in der DAPI-Färbung auf. Insbesondere binukleäre Zellen, wie in der Abbildung 10 (Figur B) dargestellt, sind ein typisches Merkmal der Kardiomyozyten (Nilius et al. 2013). Diese Charakteristika von reifen Kardiomyozyten, wie binukleäre Zellen und alpha-Aktinin positive Sarkomerstrukturen, konnten in den beiden Zelllinien pCTRL 1.1 und WT-D2-1u nach einer Kultivierung von 60 Tagen dargestellt werden. Im Gegensatz dazu stellten sich die nicht ausdifferenzierten Zellen (Abbildung 10, Figur A) als längliche Zellen dar, die diffus bis gar nicht durch alpha-Aktinin angefärbt wurden. Es war keine streifige Sarkomerstruktur erkennbar. Die Kerne dieser nicht ausdifferenzierten Zellen wurden ebenfalls mit DAPI angefärbt, allerdings wiesen sie nur einen Zellkern auf. Der Anteil dieser nicht kardiomyozytären Zellen war nach 60 Tagen sehr gering und es lag ein großes Maß an Reinheit der reifen Kardiomyozyten vor. Die weitere Verwendung für die folgenden Experimente war somit möglich.

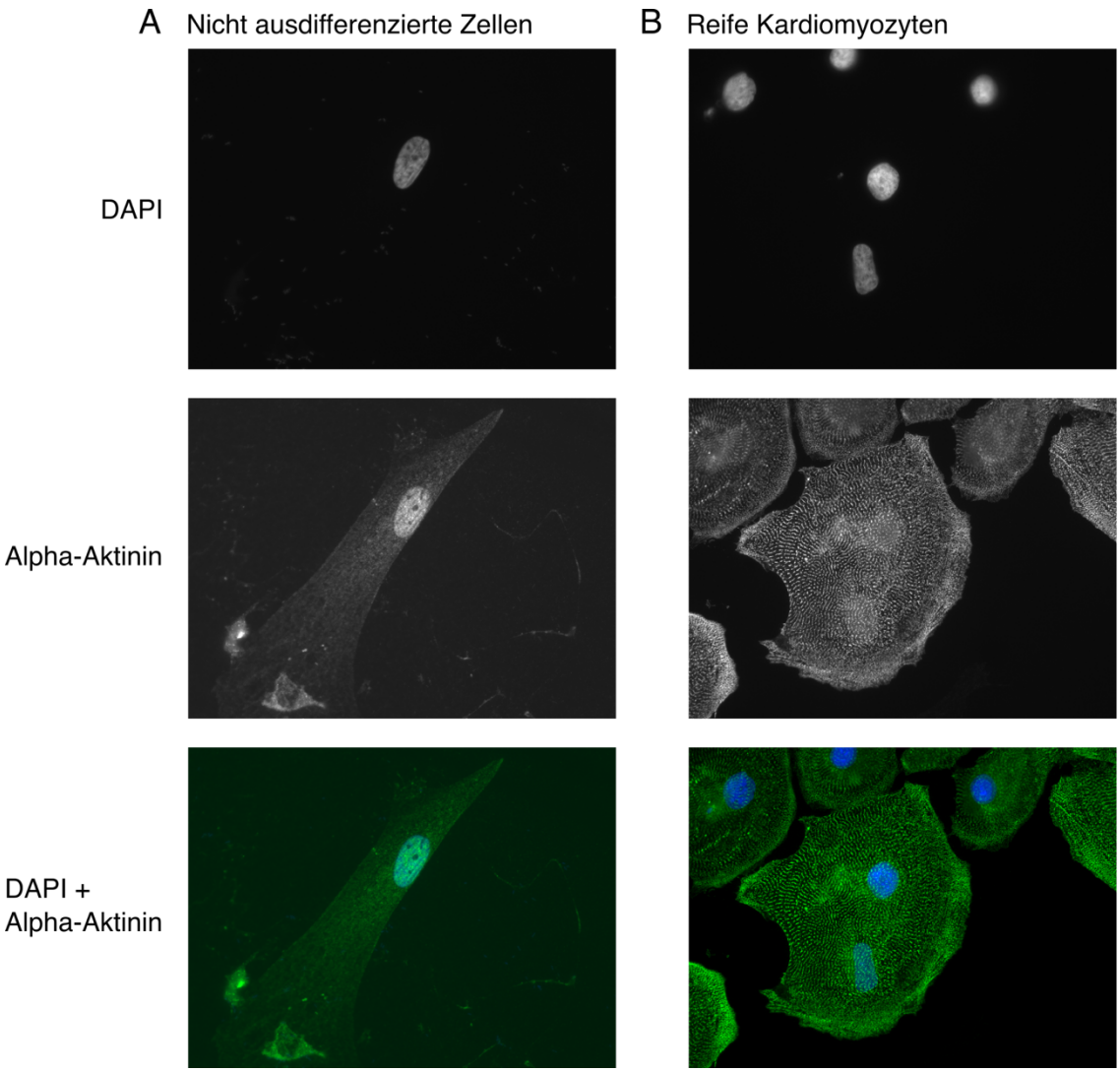

Abbildung 10: IF-Färbung zum Nachweis von reifen hiPSC-CM

IF-Färbung mit alpha-Aktinin (grün) und DAPI (blau) zum Nachweis von reifen hiPSC-CM (pCTRL 1.1) A) In der linken Spalte sind die nicht ausdifferenzierten Zellen (nicht kardiomyozytärer Natur) dargestellt, die keine streifige Sarkomerstruktur aufweisen. B) In der rechten Spalte sind die reifen Kardiomyozyten abgebildet mit ihrem typischen durch alpha-Aktinin angefärbten Zytoskelett und zwei Zellkernen.

3.2 Stimulation der hiPSC-CM mit Phenylephrine und Isoprenaline

Zur Untersuchung der durch Stress bedingten Veränderungen in den hiPSC-CM musste zunächst ein *in vitro* Stressmodell etabliert und validiert werden. Bei den hierfür verwendeten Substanzen Phenylephrine (PE) und Isoprenaline (ISO) handelte es sich um Sympathomimetika, die über zwei verschiedene Rezeptoren eine Stressreaktion auslösen. Wie bei Mehta et al. (2015) und Borchert et. al (2017) beschrieben wurden für den ß-adrenergen Agonisten ISO die

Konzentrationen 100 nm und 10 μM zum Testen gewählt. Nach Rupert et al. (2017) und Kinnun et al. (2018) wurde sich bei dem alpha-Agonisten PE für die Konzentrationen 20 μM und 100 μM entschieden. Als Kontrolle wurde Nuklease-freies Wasser verwendet. Die Experimente wurden in den beiden Zelllinien pCTRL 1.1 und WT-D2-1u durchgeführt.

Für die Wahl einer geeigneten Behandlungsdauer zur Auslösung einer Stressreaktion in den hiPSC-CM wurden zunächst die verschiedenen Behandlungszeiträume von 48 Stunden, 24 Stunden, 12 Stunden und sechs Stunden getestet. Unter dem Mikroskop zeigte sich bereits nach 30 Minuten eine Zunahme der Kontraktionsfrequenz in den mit ISO bzw. PE behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Auswertung der Frequenz, mit der die hiPSC-CM schlugen, ergab sowohl für die Zelllinie pCTRL 1.1 (Abbildung 11) als auch für WT-D2-1u (Abbildung 12) eine Zunahme der Frequenz bei der Behandlung mit PE 20 μM/100 μM und ISO 100 nm/10 μM verglichen mit der Kontrollgruppe. Nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden konnte bei der Zelllinie pCTRL 1.1 eine Abnahme der Frequenz in den behandelten Gruppen relativ zum vorherigen Messwert beobachtet werden (Abbildung 11, Tabelle A21). In der Zelllinie WT-D2-1u ließ sich ebenfalls kein weiterer Anstieg der Frequenz nach 24 Stunden im Vergleich zum Messzeitpunkt nach 30 Minuten bei den behandelten Gruppen feststellen. Stattdessen zeigte sich auch hier eine Tendenz zur Verringerung der Kontraktionsfrequenz (Abbildung 12, Tabelle A22). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass eine längere Behandlungsdauer nicht zu einer weiteren Zunahme der Frequenz bzw. Stresszunahme führen würde.

Zur Untersuchung der Veränderungen des Stressmarkers Nppb wurde eine qPCR mit der isolierten RNA aus den hiPSC-CM (n = 1) durchgeführt. Diese lieferte folgende Ergebnisse: Für die Zelllinie pCTRL 1.1 ergab sich die stärkste Zunahme des mRNA-Levels von Nppb bei den Konditionen PE 100 μM/ 20 μM für 6h, ISO 100 nM für 6 h und PE 20 μM für 24 h/ 48 h (Abbildung 13, Tabelle A23). Der stärkste Nppb-Anstieg konnte bei der Zelllinie WT-D2-1u in den Gruppen PE 100 μM für 48 h/ 6 h, PE 20 μM für 12 h und ISO 100 nm für 12 h beobachtet werden (Abbildung 14, Tabelle A24). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und dem Ziel, Stress in den hiPSC-CM zu simulieren, wurde als Behandlungszeitraum sechs Stunden festgelegt. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration der Substanzen PE und ISO zeigte sich in der eben beschriebenen qPCR mit dem Stressmarker Nppb, in Anbetracht der gewählten Dauer von sechs Stunden, in beiden Zelllinien ISO 100 nm und PE 100 μM als geeignete

Konzentrationen. Die anderen beiden Konzentrationen ISO 10 μM und PE 20 μM wurden nicht weiter untersucht.

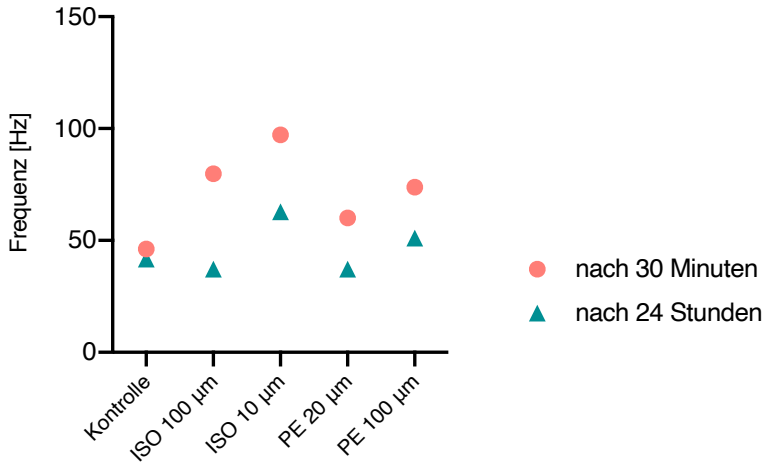

Abbildung 11: Graphische Darstellung der Kontraktionsfrequenz der hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1

Graphische Darstellung der Frequenz [Hz] der hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 in den verschiedenen Konditionen Kontrolle, ISO 100 nm und 10 μm, PE 20 μm und 100 μm nach 30 min (Kreis) und 24 h (Dreieck) Behandlungsdauer (n = 1). Es zeigte sich eine Zunahme der Frequenz nach 30-minütiger Behandlung mit PE bzw. ISO. Nach 24-stündiger Behandlung war kein weiterer Anstieg der Frequenz zu beobachten.

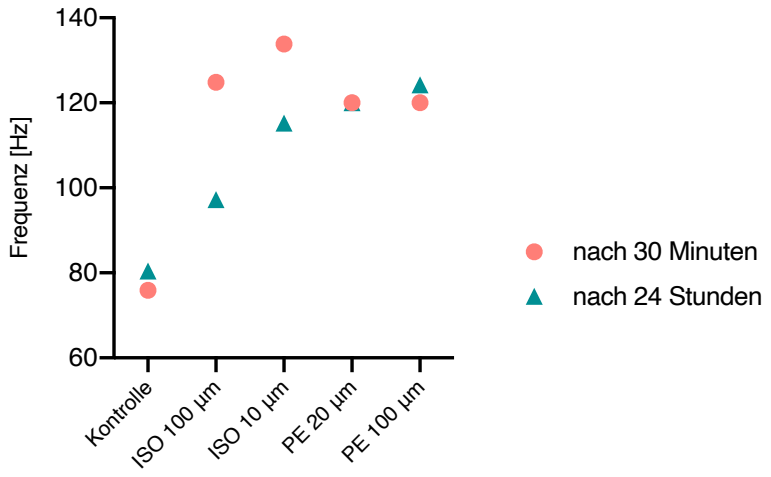

Abbildung 12: Graphische Darstellung der Kontraktionsfrequenz der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u

Graphische Darstellung der Frequenz [Hz] der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u in den verschiedenen Konditionen Kontrolle, ISO 100 nm und 10 μm, PE 20 μm und 100 μm nach 30 min (Kreis) und 24 h (Dreieck) Behandlungsdauer (n = 1). Es zeigte sich eine Zunahme der Frequenz nach 30-minütiger Behandlung mit PE bzw. ISO. Nach 24-stündiger Behandlung war kein weiterer Anstieg der Frequenz zu beobachten.

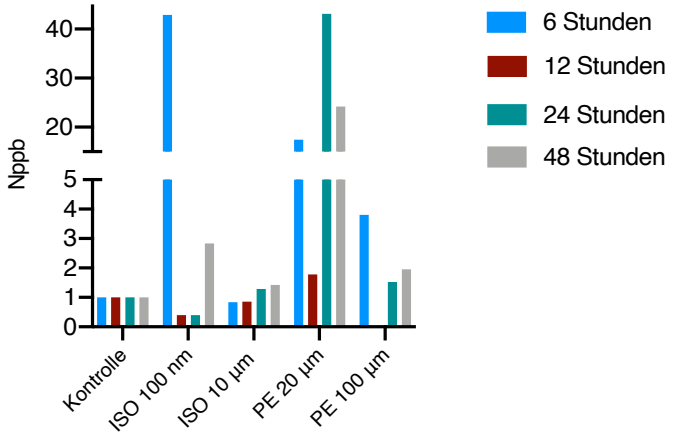

Abbildung 13: Expression von Nppb in den hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 nach Behandlung mit ISO oder PE

Graphische Darstellung der Veränderung der relativen Nppb-Expression in den hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Behandlung mit ISO oder PE im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 1). Es zeigte sich der stärkste Nppb-Anstieg bei den Konditionen PE 100 μM/ 20 μM für 6h, ISO 100 nM für 6 h und PE 20 μM für 24 h/ 48 h.

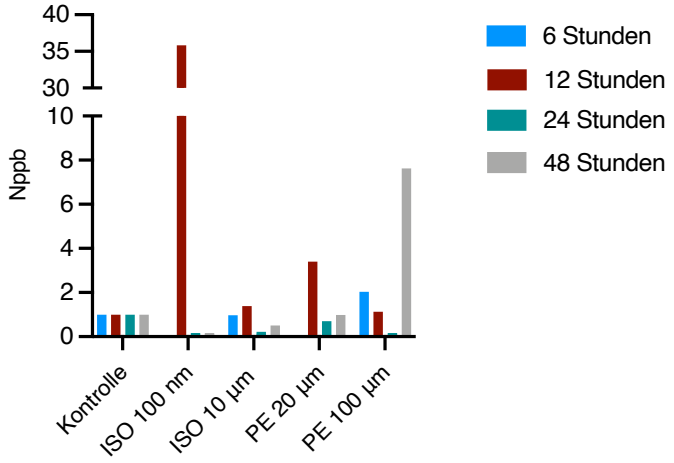

Abbildung 14: Expression von Nppb in den hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u nach Behandlung mit ISO oder PE

Graphische Darstellung der Veränderung der relativen Nppb-Expression in den hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Behandlung mit ISO oder PE im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 1). Unter der Stimulation mit PE 100 μM für 48 h/ 6 h, PE 20 μM für 12 h und ISO 100 nm für 12 h kam es zum stärksten Anstieg von Nppb.

Zur weiteren Validierung der Stressantwort bei einer Behandlung mit ISO 100 nm und PE 100 μM für sechs Stunden wurden die hiPSC-CM mit alpha-Aktinin angefärbt und die Zellgrößen (angegeben als mittlere Zellgrößenänderung ± SEM, Einheit: μm^2) gemessen. Für jede Gruppe wurde die Zellgröße anhand von 75 Mikroskopaufnahmen analysiert. Dabei war zunächst festzustellen, dass sich

bezüglich der Morphologie keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen Kontrolle, ISO und PE sowohl für die Zelllinien pCRTL 1.1 (Abbildung 15, Figur A) als auch WT-D2-1u (Abbildung 16, Figur A) ergaben. Es waren die in Abschnitt 3.1 beschriebenen Charakteristika der hiPSC-CM nachweisbar und die mit PE oder ISO behandelten Zellen wiesen ein intaktes zelluläres Grundgerüst auf, welches in der alpha-Aktinin Färbung die typische Streifung zeigte. Die Analyse der Zellgröße in der Zelllinie pCTRL 1.1 zeigte eine signifikante Zunahme der Zellgröße in den behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nach sechs Stunden. Bei der Behandlung mit ISO 100 nm kam es zu einer signifikanten Vergrößerung ($p < 0{,}0001$) der Zellen um 2267 μm^2 (SEM ± 473,4) und bei PE 100 μm um 2597 μm^2 (SEM ± 452,3) jeweils verglichen zur Kontrolle (Abbildung 15, Figur B). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Zellgröße bei der Gegenüberstellung der Konditionen ISO 100 nm und PE 100 μm ($p > 0{,}05$). Dies weist darauf hin, dass PE und ISO im gleichen Maße Stress in hiPSC-CM induzieren. Sowohl bei der Behandlung der hiPSC-CM mit ISO als auch PE zeigte sich ein hypertrophes Wachstum der Zellen, welches an der Zellgrößenverteilung zu sehen war (Abbildung 15, Figur C-E).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich auch bei der Zelllinie WT-D2-1u eine signifikante Zunahme der Zellgröße ($p < 0{,}0001$) um 2539 μm^2 (SEM ± 557,9) bei der sechsstündigen Behandlung mit ISO 100 nm im Vergleich zur Kontrolle. Ebenfalls war bei der Stimulation mit PE 100 μm eine signifikante Vergrößerung ($p < 0{,}0001$) der Zellen um durchschnittlich 3299 μm^2 (SEM ± 543,0) zu beobachten. Untereinander wiesen die behandelten Gruppen PE 100 μm und ISO 100 nm keinen signifikanten Unterschied ($p > 0{,}05$) bezüglich ihrer Zellgröße auf, d. h. beide Behandlungen führten im gleichen Maße zu Stress in den hiPSC-CM. Aus der Analyse der Zellgrößenverteilung ergab sich für die mit ISO (Abbildung 16, Figur D) als auch PE (Abbildung 16, Figur E) behandelten hiPSC-CM eine Häufung von größeren Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe. Folglich wiesen die behandelten Zellen auch hier ein hypertrophes Wachstum auf (Abbildung 16, Figur C-E).

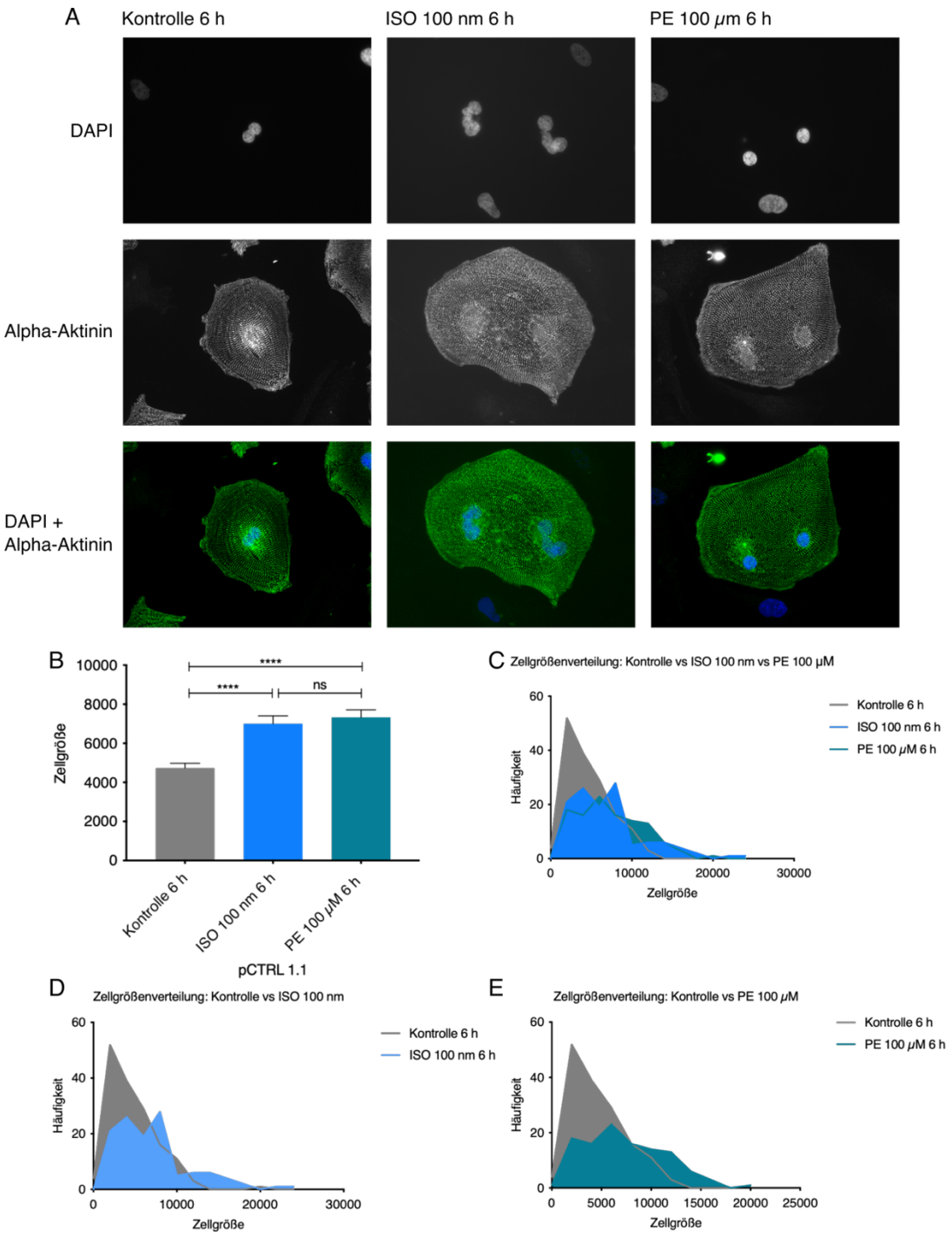

Abbildung 15: Stimulation der hiPSC-CM der Zelllinie pCRTL 1.1 mit ISO 100 nm und PE 100 µm für sechs Stunden

A) Repräsentative IF-Färbung der hiPSC-CM mit alpha-Aktinin (grün) und DAPI (blau). In allen Gruppen zeigte sich die charakteristischen Streifen des kardialen Grundgerüsts. B) Veränderung der Zellgröße durch ISO 100 nm und PE 100 µm im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellgröße bei ISO und PE. Auswertung mit ungepaarten zweiseitigem Welch's t-Test. Daten geben den Mittelwert mit SEM an, **** = $p < 0{,}0001$, ns = $p > 0{,}05$. C) Häufigkeitsverteilung der Zellgröße aller Gruppen, D) von ISO 100 nm im Vergleich zur Kontrollgruppe und E) von PE 100 µm im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten eine Zunahme der größeren Zellen in den mit ISO bzw. PE behandelten hiPSC-CM.

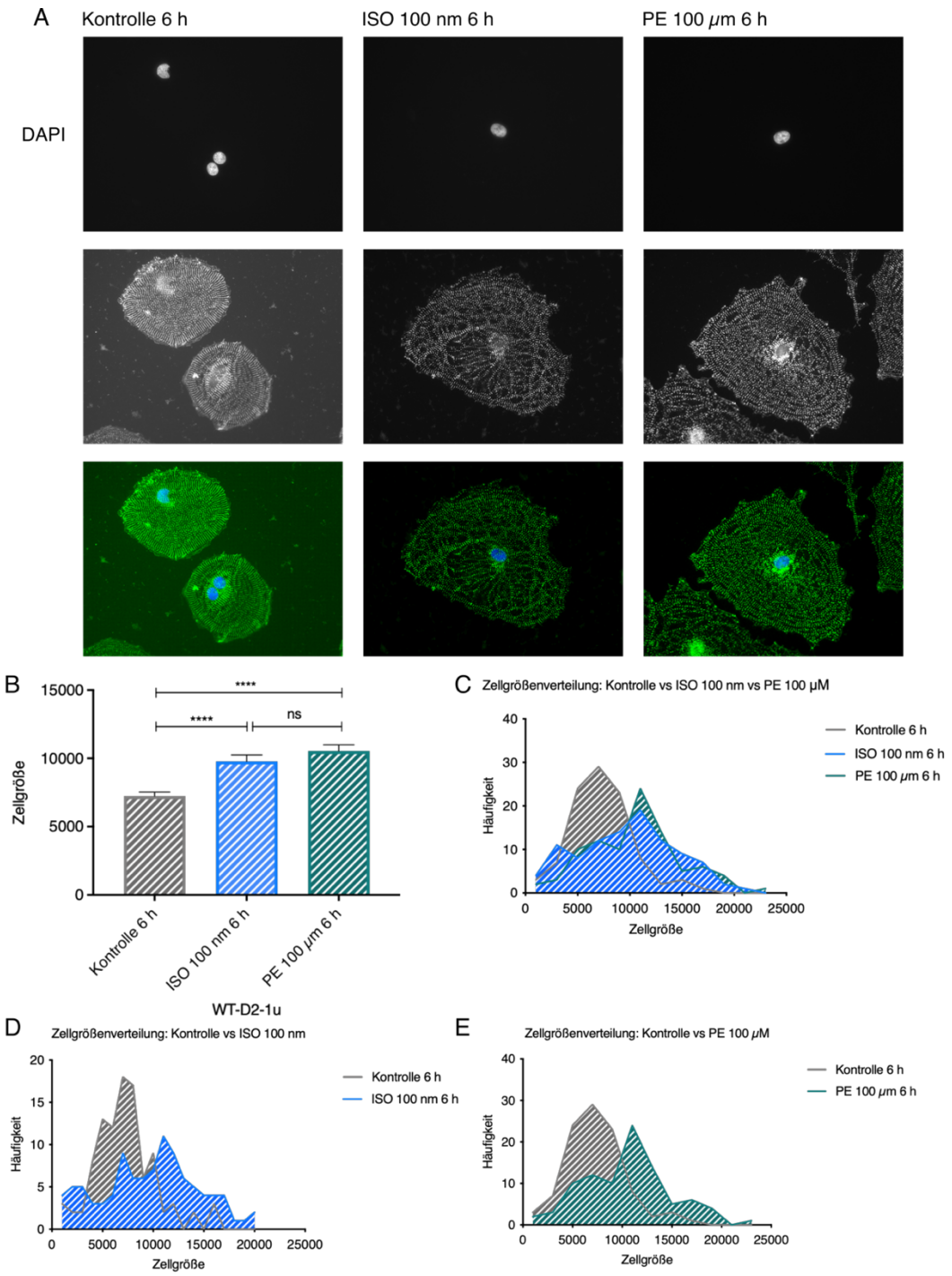

Abbildung 16: Stimulation der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u mit ISO 100 nm und PE 100 µm für sechs Stunden

A) Repräsentative IF-Färbung der hiPSC-CM mit alpha-Aktinin (grün) und DAPI (blau). In allen Gruppen zeigte sich die charakteristischen Streifen des kardialen Grundgerüsts. B) Veränderung der Zellgröße durch ISO 100 nm und PE 100 µm im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellgröße bei ISO und PE. Auswertung mit ungepaarten zweiseitigem Welch's t-Test. Daten geben den Mittelwert mit SEM an, **** = $p < 0{,}0001$, ns = $p > 0{,}05$. C) Häufigkeitsverteilung der Zellgröße aller Gruppen, D) von ISO 100 nm im Vergleich zur Kontrollgruppe und E) von PE 100 µm im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten eine Zunahme größerer Zellen in den mit ISO bzw. PE behandelten hiPSC-CM.

Die Auswirkung der Behandlung mit PE oder ISO in den hiPSC-CM auf die kardialen Stressmarker Nppb und ACTA1 wurde mithilfe weiterer qPCRs untersucht. Hierbei zeigte sich für die Zelllinie pCTRL 1.1 eine nicht signifikante Zunahme ($p > 0{,}05$) des Nppb-Levels in den hiPSC-CM unter ISO 100 nm und PE 100 μM relativ zur Kontrollgruppe (Abbildung 17, Figur A). Das mRNA-Level von ACTA1 stieg ebenfalls tendenziell unter ISO 100 nm ($p > 0{,}05$), wohingegen eine signifikante Zunahme bei PE 100 μM um das 0,64-fache (Standardabweichung ± 0,4437 mit $p < 0{,}05$) zu beobachten war (Abbildung 17, Figur B).

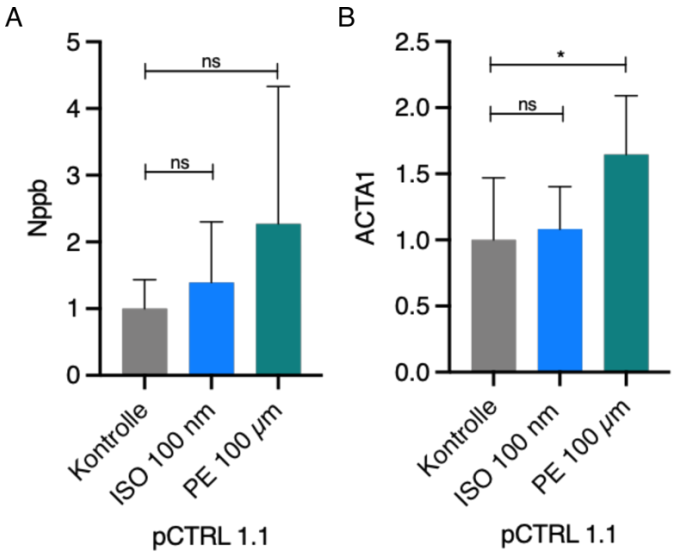

Abbildung 17: Veränderung der Stressmarker Nppb und ACTA1 bei Behandlung mit ISO und PE für sechs Stunden in der Zelllinie pCTRL 1.1

Relative Veränderung des mRNA-Level der Stressmarker in der qPCR bei Behandlung mit ISO und PE für sechs Stunden in der Zelllinie pCTRL 1.1 (n = 3). A) Nicht signifikanter Anstieg von Nppb bei ISO 100 nm und PE 100 µm im Vergleich zur Kontrollgruppe. B) Nicht signifikante Zunahme von ACTA1 bei ISO 100 nm und signifikante Zunahme bei PE 100 µm jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Auswertung mittels ungepaartem zweiseitigen Welch's t-Test und die Daten geben den Mittelwert mit Standardabweichung an, ns = $p > 0{,}05$, * = $p < 0{,}05$.

Bei der Zelllinie WT-D2-1u ergab sich für den Stressmarker Nppb in der Gruppe ISO 100 nm (Abbildung 18, Figur A) ein signifikanter Anstieg um das 7,9-fache (Standardabweichung ± 3,998 mit $p < 0{,}05$) und für PE 100 μM (Abbildung 18, Figur B) um das 8,5-fache (Standardabweichung ± 1,425 mit $p < 0{,}01$) jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe. Aufgrund geringer Probenmenge war eine Analyse von ACTA1 bei der Zelllinie WT-D2-1u nicht möglich.

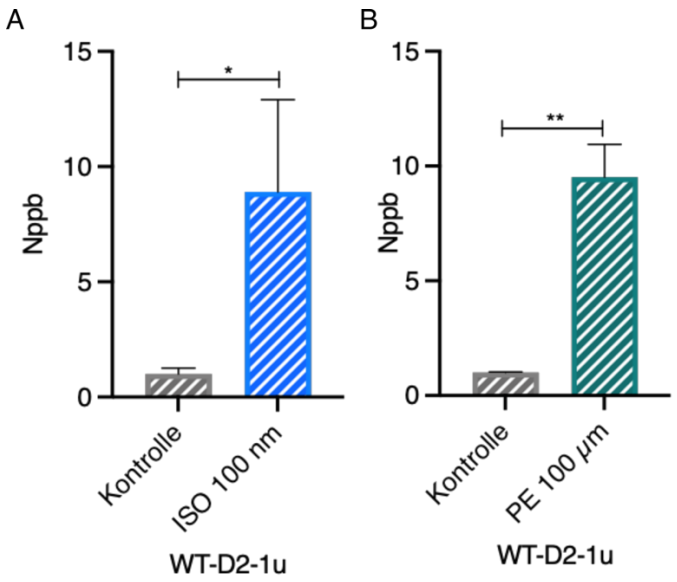

Abbildung 18: Veränderung des Stressmarkers Nppb bei Behandlung mit ISO und PE für sechs Stunden in der Zelllinie WT-D2-1u

Relative Veränderung des mRNA-Level des Stressmarkers Nppb in der qPCR bei Behandlung mit ISO und PE für sechs Stunden in der Zelllinie WT-D2-1u (n = 2). Signifikante Zunahme von Nppb A) bei ISO 100nm und B) bei PE 100 µm im Vergleich zur Kontrolle. Auswertung mittels ungepaartem zweiseitigen Welch's t-Test und die Daten geben den Mittelwert mit Standardabweichung an, * = $p < 0{,}05$, ** = $p < 0{,}01$.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei einer sechsstündigen Behandlung der hiPSC-CM mit ISO 100 nm und PE 100 µM ein Anstieg der Frequenz und eine Zunahme der Zellgröße sowie der Stressmarker bei beiden Zelllinien zu beobachten war. Es handelte sich somit um ein geeignetes *in vitro* Modell für die Untersuchung von Stress in den hiPSC-CM.

3.3 Stimulation der hiPSC-CM mit Endothelin-1

Die Zunahme der Zellgröße ist ein wesentliches Merkmal der kardialen Hypertrophie. Zur Etablierung eines *in vitro* Modells für Hypertrophie in den hiPSC-CM wurden beide Ziellinien (pCRTL 1.1 und WT-D2-1u) mit Endothelin-1 (ET-1) in verschiedenen Konzentrationen für 48 Stunden behandelt. Die Validierung der erwarteten Zellgrößenzunahme der Kardiomyozyten wurde mithilfe einer IF-Färbung mit alpha-Aktinin in beiden Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 30000 Zellen pro Well (n = 3 pro Gruppe) ausplattiert und für 48 Stunden mit ET-1 in den Konzentrationen 1 nm, 2 nm und 3 nm behandelt. Als Kontrolle wurde Nuklease-freies Wasser verwendet. Nach der Fixierung und Färbung der Zellen mit alpha-Aktinin und DAPI wurden mit einem Mikroskop Bilder der Zellen aufgenommen. Anschließend wurde die Zellgröße optometrisch

ausgewertet. Für jede Gruppe wurde die Zellgröße (angegeben als mittlere Zellgrößenänderung ± SEM, Einheit: μm^2) anhand von 60 Mikroskopaufnahmen analysiert.

In der Zellmorphologie ließen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Ziellinien finden: In der jeweiligen Kontrollgruppe zeigten sich vorwiegend kleine, runde Zellen, deren Sarkomerstruktur regelmäßig angeordnet war. Im Gegensatz dazu wiesen die mit ET-1 behandelten reifen Kardiomyozyten vermehrt polymorphe Formen mit Ausläufern auf. Das mit alpha-Aktinin angefärbte Zytoskelett war erhalten und seine charakteristischen Streifen gut erkennbar. Zum Teil zeigte sich in den mit ET-1 behandelte Zellen eine weniger regelmäßige Anordnung der Sarkomerstruktur (Figur A in Abbildung 19 und Abbildung 20).

In der Zelllinie pCTRL 1.1 ergab sich für alle Konzentration von ET-1 eine signifikante Zunahme der Zellgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 19, Figur B). Bei der ET-1 Konzentration von 1 nm kam es relativ zur Kontrollgruppe betrachtet zu einer signifikanten Zunahme ($p < 0,001$) der Zellgröße um 2101 μm^2 (SEM ± 584,6). Die Zunahme der Zellgröße fiel verglichen mit den anderen beiden ET-1 Konzentrationen am kleinsten aus. Der stärkste Anstieg ($p < 0,0001$) zur Kontrollgruppe ergab sich mit 5159 μm^2 (SEM ± 888,5) bei der Konzentration 2 nm. Für die Konzentration 3 nm konnte eine signifikante Zunahme der Zellgröße ($p < 0,0001$) um 2702 μm^2 (SEM ± 651,9) im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Wie zu erwarten, nahm die Anzahl hypertropher Zellen in den ET-1 behandelten Gruppen verglichen zur Kontrolle zu, wie in der Analyse der Zellgrößenverteilung zu sehen ist (Abbildung 19, Figur C-E). Zusammenfassend ergab sich für die Zelllinie pCTRL 1.1 somit die größte Zellgrößenzunahme für die ET-1 Konzentration 2 nm, allerdings auch mit dem größten Standardfehler (SEM). Die Konzentration 3 nm lieferte ebenfalls eine stark signifikante Veränderung der Zellgröße mit einem geringeren Standardfehler.

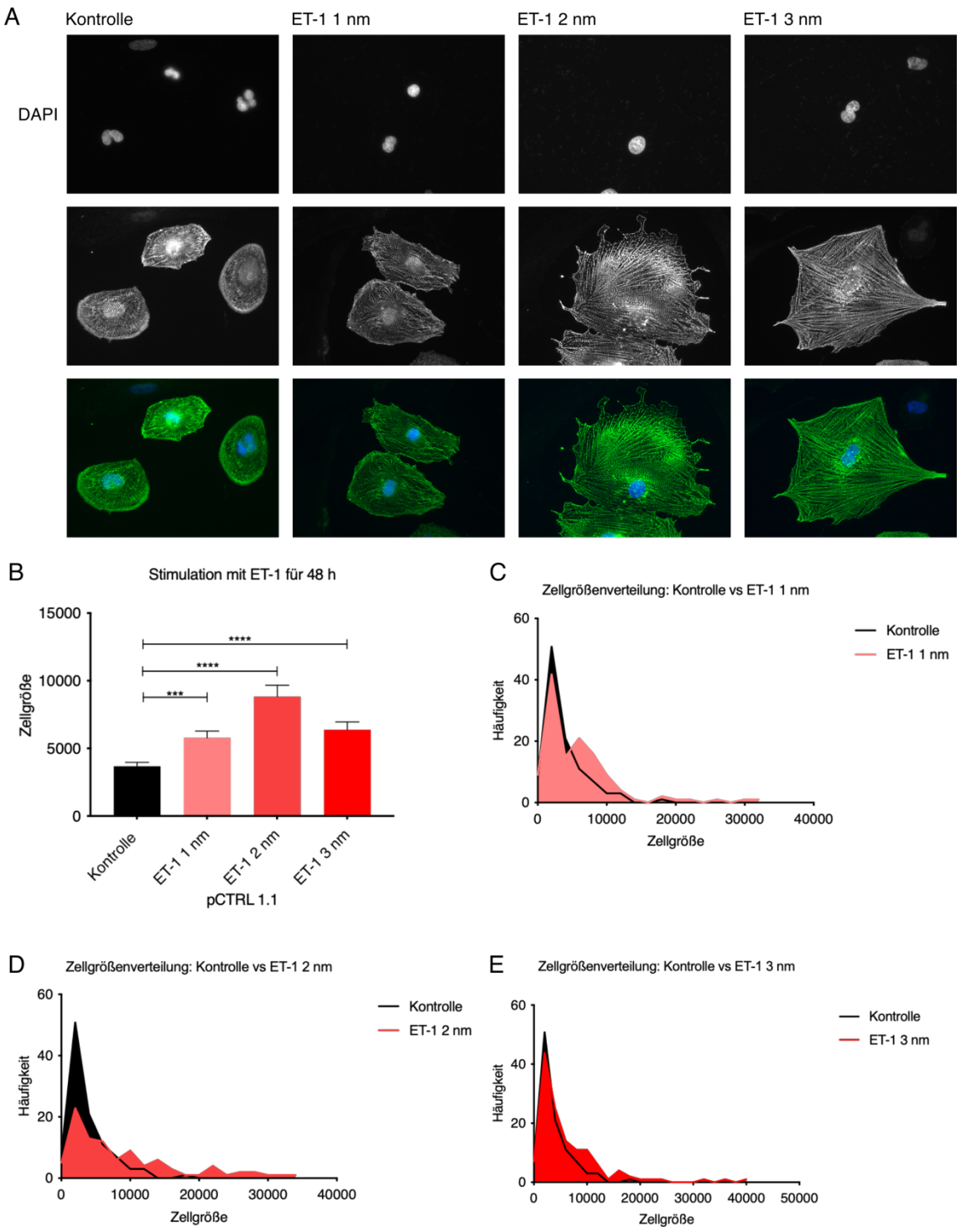

Abbildung 19: ET-1 Stimulation der hiPSC-CM der Zelllinie pCRTL 1.1 für 48 Stunden

A) Repräsentative Bilder der IF-Färbung mit alpha-Aktinin (grün) und DAPI (blau). Es zeigten sich größere Zellen in den mit ET-1 behandelten hiPSC-CM. B) Veränderung der Zellgröße durch ET-1 in den Konzentrationen 1 nm, 2 nm und 3 nm im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es war eine signifikante Zunahme der Zellgröße bei allen Konzentrationen zu beobachten. Auswertung mit ungepaarten zweiseitigem Welch's t-Test. Daten geben Mittelwert mit SEM an, *** = $p < 0{,}001$, **** = $p < 0{,}0001$. C) Häufigkeitsverteilungen der Zellgröße von ET-1 1 nm D) von ET-1 2 nm und E) von ET-1 3 nm jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten eine Zunahme größerer Zellen in den mit ET-1 behandelten hiPSC-CM und so eine Verschiebung nach rechts.

In der Zelllinie WT-D2-1u zeigte sich übereinstimmend dazu eine signifikante Vergrößerung der Zellen nach der Stimulation mit ET-1 1 nm, 2 nm und 3 nm jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 20, Figur B). Der stärkste Anstieg der Zellgröße ($p < 0,0001$) konnte mit 4341 μm^2 (SEM ± 432,39) bei ET-1 3 nm verglichen zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bei den ET-1 Konzentration 2 nm stieg die Zellgröße ($p < 0,0001$) um 3209 μm^2 (SEM ± 419,7) und bei 1 nm um 2870 μm^2 (SEM ± 431,0) relativ zur Kontrollgruppe an. Die Zellgrößenverteilung zeigte mit zunehmender Konzentration eine Verschiebung der Häufigkeit in Richtung größerer Zellen, d. h. es traten vermehrt hypertrophe Zellen nach der ET-1 Behandlung auf (Abbildung 20, Figur C-E).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus beiden Zelllinien ergab sich für ET-1 in der Konzentration 3 nm eine stabile Zunahme der Zellgröße nach 48 Stunden Behandlungsdauer.

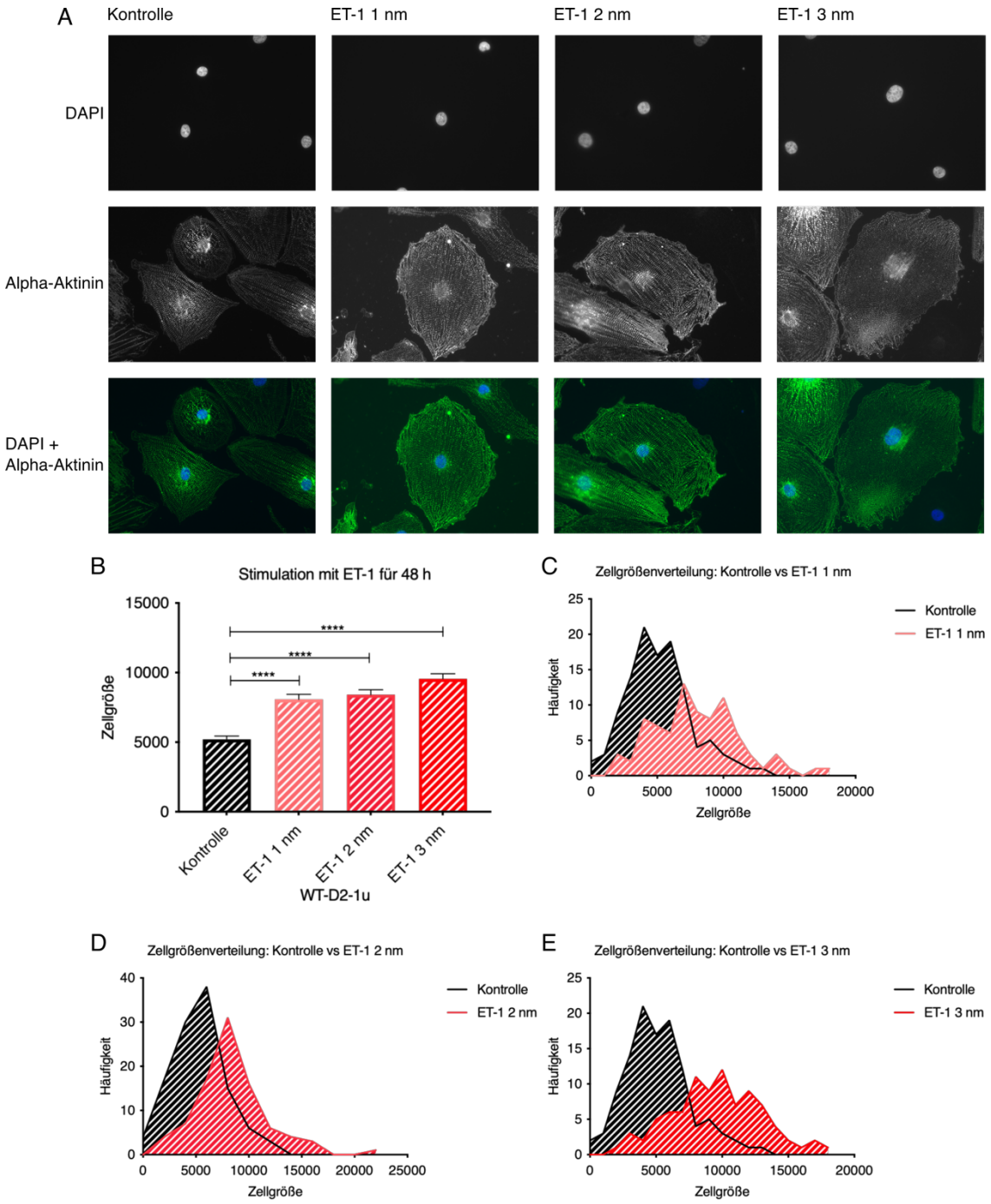

Abbildung 20: ET-1 Stimulation der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u für 48 Stunden

A) Repräsentative Bilder der IF-Färbung mit alpha-Aktinin (grün) und DAPI (blau). Es zeigten sich größere Zellen in den mit ET-1 behandelten hiPSC-CM. B) Veränderung der Zellgröße durch ET-1 in den Konzentrationen 1 nm, 2 nm und 3 nm im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es war eine signifikante Zunahme der Zellgröße bei allen ET-1 Konzentrationen zu beobachten. Auswertung mit ungepaarten zweiseitigem Welch's t-Test. Daten geben den Mittelwert mit SEM an, **** = $p < 0{,}0001$. C) Häufigkeitsverteilungen der Zellgröße von ET-1 1 nm, D) von ET-1 2 nm und E) von ET-1 3 nm jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten eine Zunahme größerer Zellen in den mit ET-1 behandelten hiPSC-CM und so eine Verschiebung nach rechts.

Um zu untersuchen, ob sich die Behandlung der hiPSC-CM mit ET-1 3 nm für 48 Stunden als Hypertrophiesimulation von der Stresssimulation mit PE 100 μm und ISO 100 nm für sechs Stunden unterscheidet, wurde eine weitere IF-Färbung mit alpha-Aktinin in beiden Zelllinien durchgeführt. Für die Zelllinie pCTRL 1.1 (Abbildung 21, Figur A) ergaben sich folgende Ergebnisse bezüglich der Zellgröße: Die beiden Kontrollgruppe 48h und 6h wiesen mit einer Zellgrößenänderung um 777,1 μm^2 (SEM ± 497,0) keinen signifikanten Unterschied untereinander auf ($p > 0,05$). Die Zunahme der Zellgröße um 6796 μm^2 (SEM ± 1203) bei ET-1 3 nm, verglichen mit der Kontrolle 48h ($p < 0,0001$), war signifikant. Bei der Stimulation mit ET-1 3 nm für 48 Stunden ergab sich eine signifikante Zunahme ($p < 0,01$) der Zellgröße um 3751 μm^2 (SEM ± 1194) verglichen zur sechsstündigen Behandlung mit ISO 100 nm. Dies zeigte sich auch im Vergleich der Behandlung mit ET-1 3 nm zur Behandlung mit PE 100 μm, wobei die Zellgröße signifikant ($p < 0,01$) um 3422 μm^2 (SEM ± 1185) anstieg. In Übereinstimmung mit diesen Resultaten zeigte sich mit einer Zellgrößenänderung um 563,5 μm^2 (SEM ± 580,6) auch in der Zelllinie WT-D2-1u (Abbildung 21, Figur B) kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den beiden Kontrollgruppen 6 h und 48 h. Hingegen kam es bei ET-1 3 nm zur signifikanten Vergrößerung der Zellen ($p < 0,0001$) um 6457 μm^2 (SEM ± 1121) verglichen zur Kontrolle 48 h. Bei der Behandlung der hiPSC-CM mit ET-1 3 nm kam es zu einer signifikanten Zellgrößenänderung ($p < 0,001$) um 4482 μm2 (SEM ± 1109) im Vergleich zur Behandlung mit ISO 100 nm. Ebenfalls führte die Behandlung mit ET-1 3 nm zum signifikanten Anstieg der Zellgröße um 3722 μm^2 (SEM ± 1101) im Vergleich zu den mit PE 100 μm behandelten hiPSC-CM.

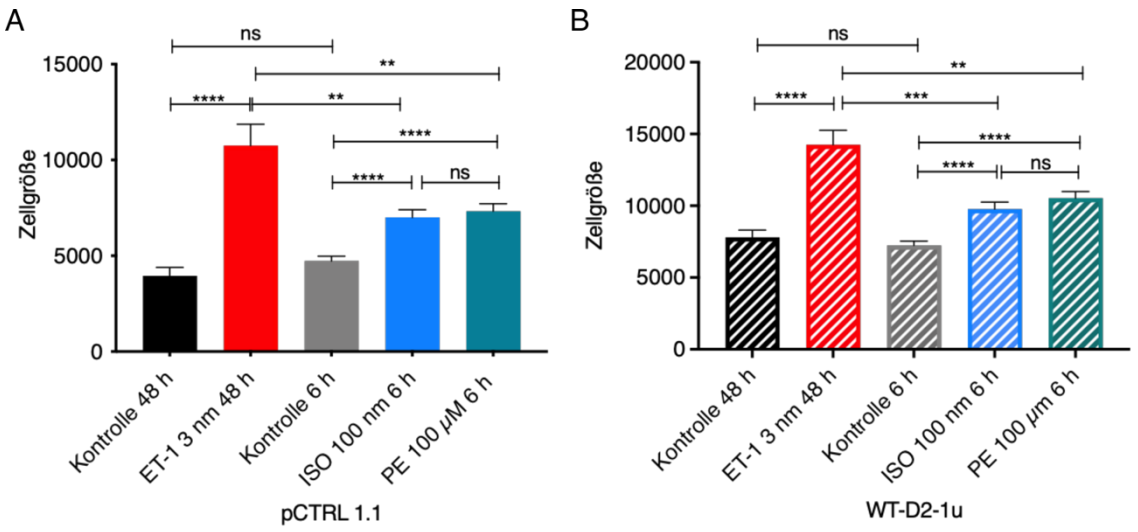

Abbildung 21: Veränderung der Zellgröße der hiPSC-CM bei Behandlung mit ET-1 vs. ISO bzw. PE

Vergleich der Veränderung der Zellgröße in den hiPSC-CM zwischen ET-1 Stimulation für 48 Stunden und PE bzw. ISO-Stimulation für sechs Stunden. A) Für die Zelllinie pCTRL 1.1 zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellgröße bei ET-1 3 nm im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zu ISO und PE. B) Bei der Zelllinie WT-D2-1u ergab sich eine signifikante Zunahme der Zellgröße bei ET-1 3 nm im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zu ISO und PE. Auswertung mit ungepaarten zweiseitigem Welch's t-Test. Daten geben den Mittelwert mit SEM an, ns = $p > 0{,}05$, ** = $p < 0{,}01$, *** = $p < 0{,}001$, **** = $p < 0{,}0001$.

Zur weiteren Validierung des *in vitro* Hypertrophiemodells mit einer ET-1 Konzentration von 3 nm wurde das mRNA-Level etablierter Hypertrophiemarker wie Nppb und ACTA1 mittels qPCR gemessen. Hierfür wurde die RNA der Zelllinie pCTRL 1.1 von mit ET-1 behandelten Zellen (n = 2) mit RNA aus Zellen der Kontrollgruppe (n = 3) verglichen. Die Analyse des Hypertrophiemarkers Nppb mittels qPCR zeigte eine signifikante Erhöhung ($p < 0{,}01$) um das 3,87-fache (Standardabweichung ± 0,9474) bei den mit ET-1 3 nm behandelten hiPSC-CM im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 22, Figur A). Für den Marker ACTA1 ergab sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg ($p < 0{,}05$) um das 2,855-fache (Standardabweichung ± 1,622) in der behandelten Gruppe relativ zur Kontrolle (Abbildung 22, Figur B). Diese Ergebnisse konnten in einem technischen Replikat bestätigt werden und bestärkten die Annahme, dass es sich bei ET-1 3 nm um eine geeignete Konzentration zur Simulation einer Hypertrophie in den hiPSC-CM handelte.

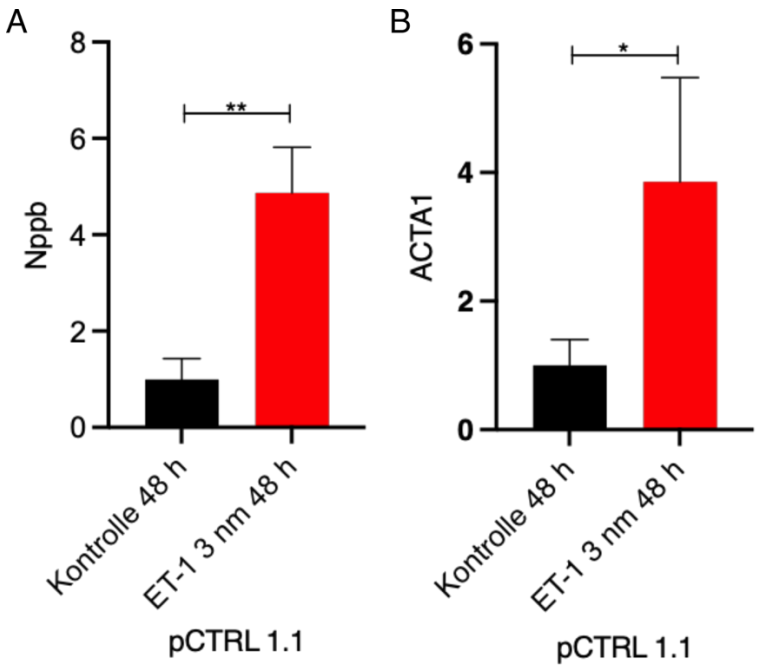

Abbildung 22: Veränderung der Hypertrophiemarker Nppb und ACTA1 unter ET-1 in der Zelllinie pCTRL1.1

Die Analyse der relativen Expression kardialer Hypertrophiemarker in hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 zeigte eine signifikante Erhöhung bei der Gruppe ET-1 3 nm (n = 2) vergleichen zur Kontrolle (n = 3) für A) Nppb und B) ACTA1 in der qPCR. Auswertung mittels ungepaartem zweiseitigen Welch's t-Test und die Daten geben den Mittelwert mit Standardabweichung an, * = $p < 0{,}05$, ** = $p < 0{,}01$.

Zusammenfassend ergab sich bei Stimulation der hiPSC-CM mit ET-1 3 nm für 48 Stunden eine signifikante Zunahme der Zellgröße als auch eine Erhöhung etablierter Hypertrophiemarker verglichen mit der Kontrolle. Ebenfalls konnte ein stärkerer Anstieg der Zellgröße bei ET-1 3 nm relativ zur Stresssimulation mit ISO und PE für sechs Stunden festgestellt werden.

3.4 Sequenzierung der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell

In diesem Abschnitt geht es um die Untersuchung möglicher Unterschiede in der Expression und der Methylierung von miRNAs durch die Behandlung mit ET-1 im *in vitro* Hypertrophiemodell der hiPSC-CM.

Hierfür wurde das bereits im vorherigen Abschnitt 3.3 etablierte und validierte *in vitro* Hypertrophiemodell in den hiPSC-CM genutzt. Es wurden jeweils drei verschiedene Differenzierungen der Zelllinie pCTRL 1.1 mit ET-1 3 nm (n = 3) behandelt (interne Bezeichnungen: Exp 9, Exp 15, Exp 19a). Als Kontrolle wurde Nuklease-freies Wasser verwendet. Nach 48 Stunden Behandlungsdauer

wurden die Zellen geerntet. Anschließend wurde die RNA isoliert und separiert in eine lange und eine kurze Fraktion. Für die Sequenzierung wurde die kurze RNA-Fraktion verwendet, welche die interessierende miRNA enthielt, und mithilfe von antikörperbasierter Methyl-RNA Immunpräzipitation (MeRIP) zum Erhalt der m6A methylierten RNA aufbereitet. Nach der Sequenzierung erfolgte die statistische Auswertung und bioinformatische Aufbereitung der Daten durch das Deutsche Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen (DZNE). Insgesamt wurden sechs Proben sequenziert und analysiert.

Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse ist in drei Abschnitte gegliedert: Zunächst wird die Hauptkomponentenanalyse erörtert, um mögliche interessante Unterschiede zwischen den Daten zu finden. Anschließend folgt die Beschreibung der differentiell exprimierten miRNAs zwischen den Konditionen ET-1 und Kontrolle. Abschließend wird auf die Methylierung der miRNAs eingegangen.

3.4.1 Hauptkomponentenanalyse der meRip-Seq Daten

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analsysis*, PCA) dient der Reduktion eines großen Datensatzes auf ihre Hauptkomponenten unter Erhalt der Informationen, um so interessante Unterschiede zwischen den Daten herauszufiltern. Es wurde eine PCA durchgeführt, um die Zusammenhänge zwischen den einzelnen sechs Proben, bestehend aus drei Kontrollen und drei ET-1 Behandlungen, untereinander in einem 2D Graphen darstellen zu können. Die Achsen (hier PC1 und PC2) sind nach ihrer Wichtigkeit geordnet. Auf der PC1-Achse wird die größte Varianz abgebildet, auf der PC2-Achse die zweitgrößte, d. h. dass Unterschiede auf PC1 wichtiger als auf PC2 waren. Es folgte der Vergleich der verschiedenen Proben bezüglich ihrer Gemeinsamkeiten, wobei ähnliche Profile in der miRNA-Expression ein Cluster ergeben.

Im ersten PCA-Diagramm (Abbildung 23) der normalisierten Sequenzierungsdaten stellte die erste Hauptkomponente PC1 (X-Achse) 78% der Varianz und die zweite Hauptkomponente (Y-Achse) 14% der Varianz dar. Damit betrug die Gesamtvarianz des PCA-Diagramms 92%. Es zeigte sich jeweils eine geringe Distanz sowohl auf der PC1 als auch auf der PC2-Achse zwischen der Kontrollgruppe und der ET-1 behandelten Gruppen bei Exp 9 und Exp 19a, was auf eine geringe interne Streuung hindeutete. Bei Exp 15 wies die mit ET-1 behandelte Gruppe auf der PC1 und PC2-Achse einen deutlichen Unterschied auf, d. h. hier lag eine größere interne Streuung vor. Insgesamt war ein *pairing*

effect jeweils zwischen der Kontrolle und der mit ET-1 behandelten Gruppe einer Differenzierung zu erkennen. Das heißt, die hiPSC-CM unterschiedlicher Differenzierungen sich voneinander unterschieden. So ergab sich eine Aufteilung in die einzelnen Differenzierungen Exp 9, Exp 15 und Exp 19a.

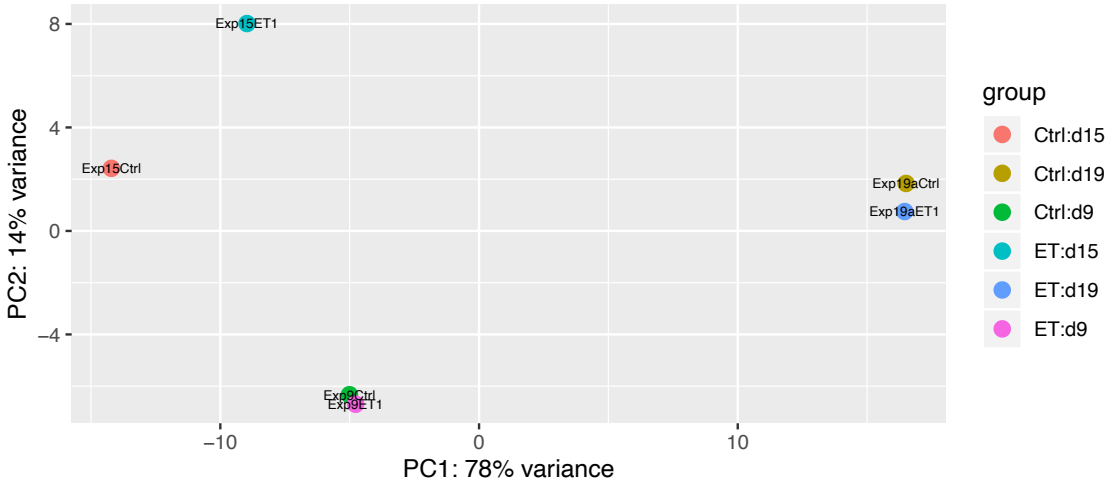

Abbildung 23: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der normalisierten Sequenzierungsdaten der Zelllinie pCTRL 1.1.

Es zeigt sich ein *pairing effect* zwischen den einzelnen Differenzierungen Exp 9, Exp 15 und Exp 19a. Die PC1-Achse bildet 78% und die PC2-Achse 14% der Varianz ab, was einer Gesamtvarianz von 92% entspricht.

Das zweite PCA-Diagramm (Abbildung 24) zeigte die normalisierten Sequenzierungsdaten nach Korrektur des *batch effect*. Die erste Hauptkomponente PC1 wies dabei eine Varianz von 57% auf und die zweite Hauptkomponente PC2 von 30%. Die Gesamtvarianz betrug 87%. Für die Differenzierung Exp 15 zeigte sich auf der PC1-Achse die größte räumliche Distanz zwischen der Kontrolle und der ET-1 behandelten Gruppe. Der Abstand zwischen den Kontrollgruppen und den ET-1 behandelten Gruppen der Differenzierungen Exp 9 und Exp 19a fiel zwar kleiner aus als bei Exp 15, war aber durch das Herausrechnen des *batch effect* deutlich zu erkennen. Es ergaben sich zwei Cluster, eins bestehend aus den Kontrollen und das andere aus den ET-1 behandelten Gruppen. Auf der zweiten Hauptkomponente PC2 zeigte sich eine weniger starke Gruppierung zwischen den Kontrollen und ET-1 Behandlungen als auf der PC1-Achse. Hier war der größte Unterschied zwischen der Kontrolle und ET-1 Behandlung bei der Differenzierung Exp 19a zu verzeichnen, gefolgt von Exp 9. Den geringsten Unterschied wies Exp 15 auf. Weiter zeigte der Vergleich der Differenzierungen untereinander, dass Exp 9 und Exp 19a mehr Gemeinsamkeiten untereinander aufwiesen als mit Exp 15.

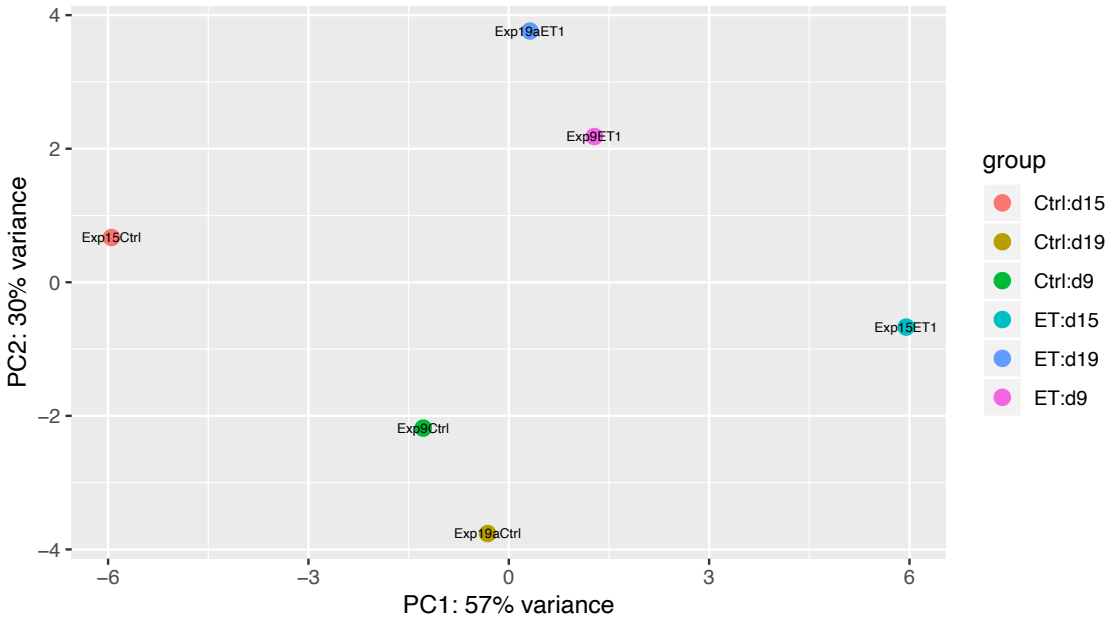

Abbildung 24: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der normalisierten Sequenzierungsdaten der Zelllinie pCTRL 1.1 nach Korrektur des *batch effect*

Es zeigt sich ein Cluster zwischen den Kontrollen (Ctrl) und ET-1 behandelten Gruppen (ET1) der Differenzierungen Exp 9, Exp 15 und Exp 19a. Die PC1-Achse bildet 57% und die PC2-Achse 30% der Varianz ab, was einer Gesamtvarianz von 87% entspricht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die verschiedenen Differenzierungen voneinander unterschieden, obwohl sie derselben Zelllinie entstammten. Nach der Herausrechnung des *batch effect* waren die Unterschiede zwischen den mit ET-1 behandelten Proben und den Kontrollen deutlich nachweisbar und in Bezug auf die PC1-Achse war eine Clusterbildung zwischen den beiden Konditionen erkennbar. Dies zeigt, dass eine Verwendung des Datensatzes für weitere Analysen möglich war.

3.4.2 Veränderungen in der Expression der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell

Zur genaueren Untersuchung der Expression der miRNAs in den hiPSC-CM wurden die erhobenen Daten bioinformatisch aufbereitet. Hierfür wurde ein *Cut-off* von 50 *reads* auf 50% der Probe angewendet, um nur sehr gering exprimierte miRNAs und Artefakte herausfiltern zu können.

Beim Vergleich zwischen den Kontrollen und den mit ET-1 behandelten hiPSC-CM zeigte sich, dass insgesamt 558 miRNAs differenziell exprimiert waren. Von diesen 558 differentiell exprimierten miRNAs waren 292 herunterreguliert (blau) und 266 hochreguliert (rot) (Abbildung 25).

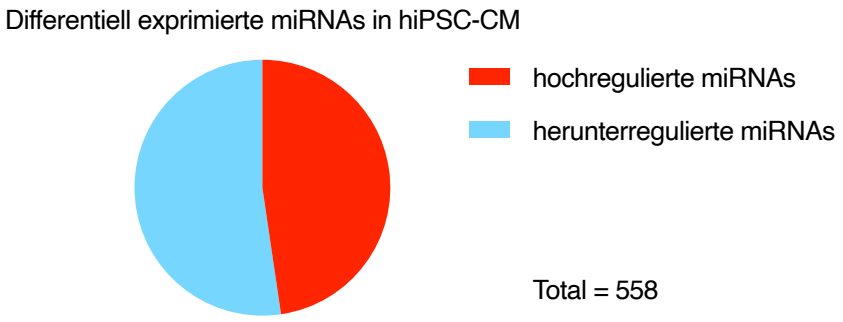

Abbildung 25: Differentiell exprimierte miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell

Kreisdiagramm zur Darstellung der differentiell exprimierten miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell der hiPSC-CM. Im Vergleich zwischen den mit ET-1 behandelten hiPSC-CM und den Kontrollen wurden 558 differentiell exprimierte miRNAs gefunden, davon waren 292 herunterreguliert (blau) und 266 hochreguliert (rot).

Zur Identifikation signifikant veränderter miRNAs im Hypertrophie-Modell wurde ein Signifikanzniveau von *padj* < 0,05 festgelegt. Die veränderte Expression der miRNAs wurde mithilfe eines *Volcano*-Diagramms (Abbildung 26) visualisiert. Hierbei wurde das Ausmaß der Veränderung als log2 *fold change* (log2fc) auf der X-Achse gegen das statistische Signifikanzniveau als negativen Logarithmus von *padj* (-log10 *padj*) auf der Y-Achse aufgetragen. Dadurch waren miRNAs, die einen hohen *fold change* hatten und dabei auch statistisch signifikant waren, gut zu erkennen. Zur besseren Übersicht der Daten wurden diese logarithmisch aufgetragen. Die am stärksten hochregulierten miRNAs befinden sich rechts auf der X-Achse, während die am stärksten herunterregulierten miRNAs links auf der X-Achse liegen. Die statistisch signifikantesten miRNAs sind durch die negative logarithmische Auftragung oben auf der Y-Achse dargestellt. Die grünen, kleineren Punkte stellen differentiell exprimierte miRNAs ohne signifikanten Unterschied (*padj* > 0,05) zwischen Kontrolle und Behandlung mit ET-1 dar. Die roten, größeren Punkte bilden die in ihrer Expression signifikant hochregulierten miRNAs zwischen den beiden Konditionen mit *padj* < 0,05 ab. Die blauen, größeren Punkte symbolisieren in ihrer Expression signifikant herunterregulierte miRNAs mit *padj* < 0,05.

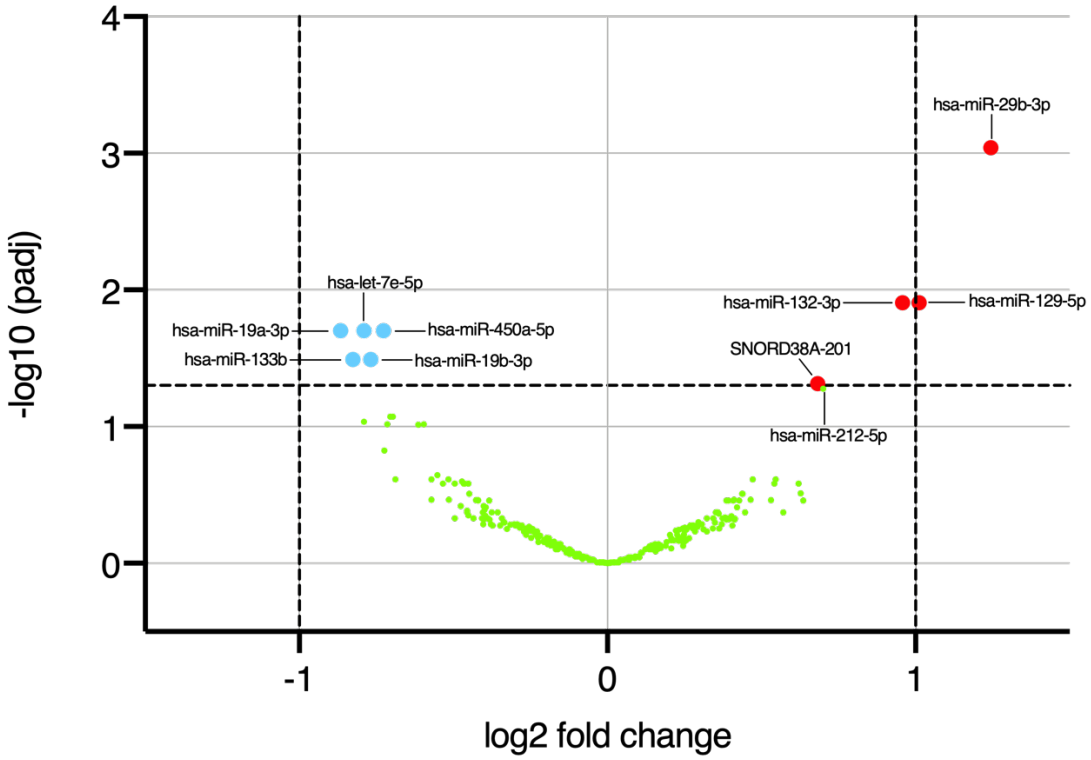

Abbildung 26: Expressionsveränderung der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell

Volcano-Diagramm zur Darstellung der Expressionsveränderung der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell. Es wurden neun signifikant differentiell exprimierte miRNAs gefunden (*padj* < 0,05), von denen vier hochreguliert (rote Punkte) und fünf herunterreguliert (blaue Punkte) unter ET-1 Behandlung sind. Die nicht signifikant differentiell exprimierten miRNAs sind als grüne Punkte dargestellt (padj > 0,05). Die X-Achse zeigt den log2 *fold change* und die Y-Achse den negativen log10 von *padj*.

Insgesamt wurden neun signifikant differentiell exprimierte miRNAs gefunden (*padj* < 0,05). Die größte Veränderung in der Expression ließ sich für die hsa-miR-29b-3p mit einem log2fc von 1,245 (*padj* 0,0009) feststellen, d. h. die Expression war unter einer Behandlung mit ET-1 mehr als verdoppelt. Die hsa-miR-129-5p wies mit einem log2fc von 1,011 (*padj* 0,012) ebenfalls eine Verdopplung in ihrer Expression auf. Auch waren die hsa-miR-132-3p mit einem log2fc von 0,957 (*padj* 0,012) und die SNORD38A-201 mit einem log2fc von 0,682 (*padj* 0,048) signifikant hochreguliert. Ebenso war die hsa-miR-212-5p mit einem log2fc von 0,7 in ihrer Expression hochreguliert; obwohl nicht signifikant ließ sich der Trend klar erkennen (*padj* = 0,052).

Zu den in ihrer Expression signifikant herunterregulierten miRNAs (blaue Punkte) zählten die hsa-miR-19a mit einem log2fc von -0,865 (*padj* 0,019), die hsa-let-7e-5p mit einem log2fc von -0,79 (*padj* 0,019), die hsa-miR-450a-5p mit einem

log2fc von -0,726 (*padj* 0,019), die hsa-miR-133b mit einem log2fc von -0,825 (*padj* 0,032) und die hsa-miR19b-3p mit einem log2fc von 0,768 (*padj* 0,032).

3.4.3 Methylierung der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell

Zur Analyse der Methylierung der miRNAs wurde für jede gefundene miRNA der Quotient aus der IP-Fraktion und der *Input*-Fraktion berechnet. Hieraus ließen sich dann nach statistischer Auswertung und bioinformatischer Aufbereitung der Daten die drei Parameter a-posteriori Wahrscheinlichkeit, Methylierungswahrscheinlichkeit und Delta berechnen. Die a-posteriori Wahrscheinlichkeit (*posterior probalility*), ein Begriff der bayesianischen Statistik gibt an, wie wahrscheinlich ein wahres Ergebnis vorliegt nach Untersuchung der Daten. Als statistisch signifikant werden nur miRNAs mit einer *posterior probability* (post prob) von > 0,95 gewertet. Die Methylierungswahrscheinlichkeit (*methylation probability*) gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit (in %) ein Transkript methyliert in der IP-Fraktion vorliegt, verglichen mit der *Input*-Fraktion. Der Parameter Delta zeigt an, wievielmal häufiger ein Transkript in der IP-Fraktion vorliegt als in der *Input*-Fraktion. Dabei gilt, je höher der Delta-Wert, desto größer der Unterschied zwischen den beiden Fraktionen. Anders als bei der Analyse der Expression konnte die Methylierungsanalyse nur für jeweils eine Kondition durchgeführt werden.

Wenn man alle gefundenen miRNAs mit einbezieht, konnte festgestellt werden, dass 558 miRNAs differenziell exprimiert (grüne Säule) waren, wohingegen in der Kontrollgruppe (lila Säule) 895 miRNAs und in der ET-1 behandelten Gruppe (pinke Säule) 914 miRNAs eine veränderte Methylierung aufwiesen (Abbildung 27). Dies zeigte, dass mehr miRNAs in ihrer Methylierung verändert waren als in ihrer Expression bei den ET-1 behandelten Zellen.

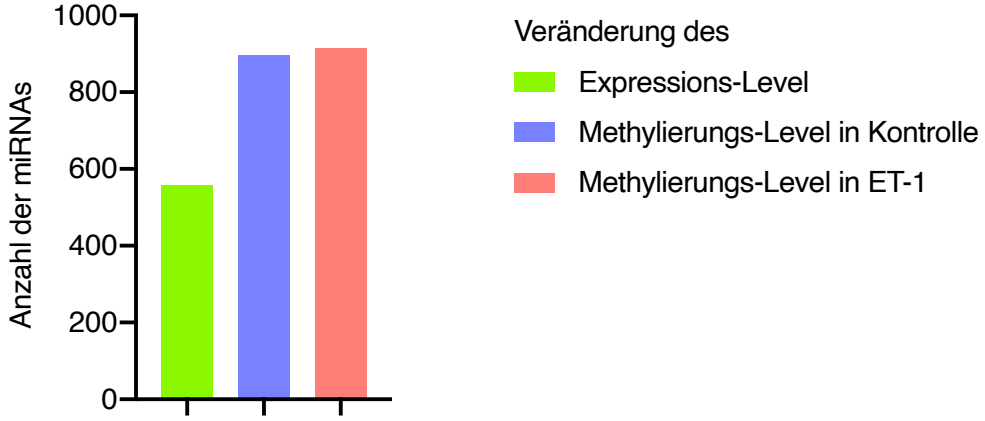

Abbildung 27: Veränderung des Expressions-Levels und der Methylierungs-Level der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell

Insgesamt zeigten 558 miRNAs Veränderung in ihrer Expression (grüne Säule). In der Kontrollgruppe (lila Säule) zeigte sich ein verändertes Methylierungs-Level bei 895 miRNAs und unter der ET-1 Behandlung (pinke Säule) bei 914 miRNAs. Damit waren mehr miRNAs in ihrer Methylierung verändert als in ihrer Expression.

Legt man den Fokus nur auf die signifikant deregulierten miRNAs, blieben nur wenige miRNAs übrig. Diese sind im nachstehenden Venn-Diagramm (Abbildung 28) dargestellt. Der grüne Kreis bildet die neun differentiell exprimierten miRNAs mit einem Signifikanzwert von *padj* < 0,05 ab, die bereits im vorherigen Abschnitt 3.4.2 ausführlich beschrieben sind. Der lila Kreis repräsentiert die zwei miRNAs, die in der Kontrollgruppe eine signifikante Methylierung aufwiesen, aber nicht unter Behandlung mit ET-1. Weiterhin zeigten diese auch keine Veränderung in ihrer Expression. Die für das Projekt besonders interessante Gruppe von miRNAs waren solche, welche in den ET-1 behandelten hiPSC-CM Veränderung bezüglich ihrer Methylierung aufwiesen, aber nicht in ihrer Expression. Diese Gruppe umfasste drei miRNAs, die durch den pinken Kreis repräsentiert sind. Die hsa-miR-1180-3p war mit einer Wahrscheinlichkeit von 77% viermal häufiger methyliert in der IP-Fraktion als in der *Input*-Fraktion vorhanden (posterior prob 0,9935). Die hsa-miR-664a-5p lag mit einer Methylierungswahrscheinlichkeit von 85,5% siebenmal häufiger als methyliertes Transkript unter ET-1 Behandlung (posterior prob 0,9935) vor. Die hsa-miR-315-5p war ebenfalls mit einer Methylierungswahrscheinlichkeit von 82% annährend sechsmal häufiger als methyliertes Transkript zu finden (posterior prob 0,9908125). Die hohe Methylierungswahrscheinlichkeit legt nahe, dass die drei miRNAs methyliert unter ET-1 Behandlung vorlagen. Diese drei miRNAs waren in ihrer Expression und in der Kontrollgruppe auf Methylierungsebene unverändert. Damit deutet die signifikante Veränderung in der Methylierung unter

ET-1 Behandlung auf einen Endothelin-1 spezifischen Effekt hin. Die letzte Gruppe (magentafarbener Kreis) zeigt miRNAs, welche sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der ET-1 behandelten Gruppe signifikant in ihrer Methylierung verändert waren, aber nicht in ihrer Expression.

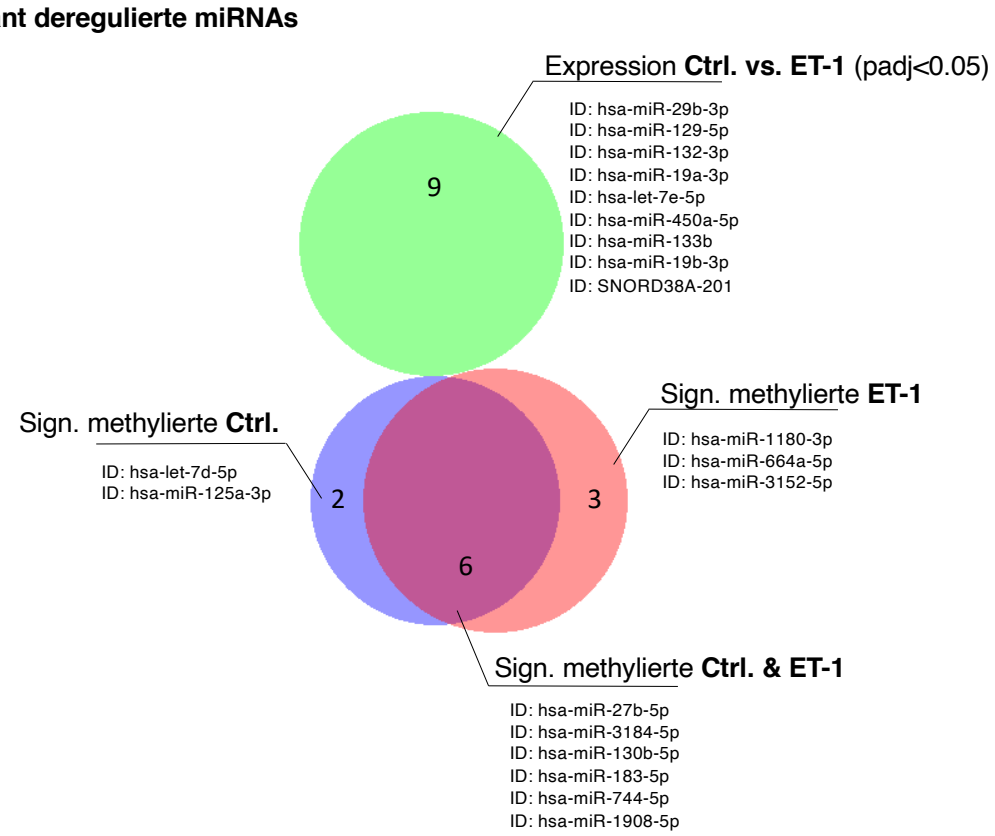

Abbildung 28: Signifikant deregulierte miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell

Venn-Diagramm der signifikant deregulierten miRNAs. Im Vergleich zwischen Kontrollen und ET-1 behandelten hiPSC-CM waren neun miRNAs in ihrer Expression signifikant verändert (grüner Kreis). Währenddessen zeigten sich zwei miRNAs in der Kontrollgruppe (lila Kreis) und drei miRNAs in der ET-1 behandelten Gruppe (pinker Kreis) signifikant methyliert, aber nicht verändert in ihrer Expression. Sechs miRNAs wiesen sowohl in der Kontrolle als auch bei ET-1 Behandlung eine signifikante Methylierung auf (magentafarbener Kreis).

Zusammenfassend zeigt die Methylierungsanalyse, dass mehr miRNAs in ihrer Methylierung verändert waren als in ihrer Expression und dass die drei signifikant methylierten miRNAs hsa-miR-1180-3p, hsa-miR-664-5p und hsa-miR-315-5p in den ET-1 behandelten hiPSC-CM eine für Endothelin spezifische Veränderung der Methylierung aufwiesen.

3.5 Etablierung des *Knock-Downs* von FTO durch siRNA-Transfektion

Die m6A-Demethylase FTO hat einen großen Einfluss auf das m6A-Level in den Kardiomyozyten und neuere Arbeiten konnten zeigen, dass die Dysregulation von FTO, Auswirkungen auf das Herz bzw. Herzerkrankungen hat (Kmietczyk et al. 2019; Mathiyalagan et al. 2019). Zur näheren Untersuchung der Rolle von FTO in den Kardiomyozyten sollte FTO in den hiPSC-CM herunterreguliert werden. Durch die Transfektion der hiPSC-CM mit siRNA konnte dieser KD von FTO erreicht werden. Hierfür musste zunächst eine geeignete siRNA aus den verschiedenen potenziellen Kandidaten identifiziert werden, die FTO am effektivsten in den hiPSC-CM herunterregulierte. Eine erfolgreiche Transfektion der siRNAs und somit ein gelungener KD von FTO wurde auf RNA-Ebene mittels qPCR und auf Proteinebene mittels Western Blot validiert. Als Kontrolle wurde eine sogenannte *scramble* siRNA verwendet, welche keine Bindestelle im humanen Transkriptom hat.

Bei der Zelllinie pCRTL 1.1 (Abbildung 29, Figur A) ergab sich in der qPCR nur für die siRNA 5 eine signifikante Verringerung ($p < 0,05$) der FTO-Expression um das 0,7-fache (Standardabweichung ± 0,1289) im Vergleich zur Kontrollgruppe (*scramble*). Die FTO-Expression in den hiPSC-CM konnte durch die siRNA 6, siRNA 7 und siRNA 8 nicht signifikant verändert werden relativ zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Für die Zelllinie WT-D2-1u (Abbildung 29, Figur B) ergaben sich folgende Ergebnisse bezüglich des RNA-Levels von FTO: Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es bei den siRNAs 5 und 6 zu einer nicht signifikanten Erhöhung des FTO-Levels ($p > 0,05$). Weiter konnte eine unerwartete signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der FTO-Expression bei der Transfektion mit siRNA 7 um das 2,792-fache (Standardabweichung ± 1,495) und mit siRNA 8 um das 1,24-fache (Standardabweichung ± 0,5976) festgestellt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei siRNA 5 um den vielversprechendsten Kandidaten für einen FTO-KD handelt und dass insbesondere siRNA 7 und 8 eher einen gegenteiligen Effekt auslösen.

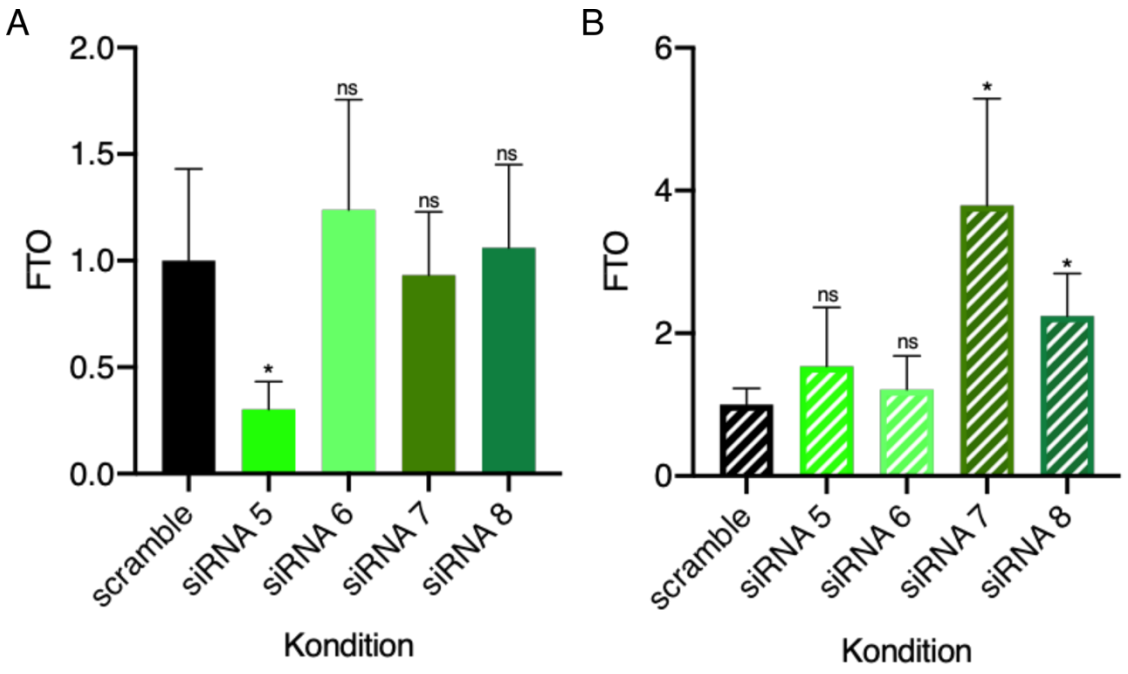

Abbildung 29: Expression von FTO nach FTO-KD in den hiPSC-CM

Analyse der relativen Expression von FTO mittels qPCR nach KD von FTO mit verschiedenen siRNAs in den hiPSC-CM im Vergleich zur Kontrollgruppe (*scramble*). A) In der Zelllinie pCRTL 1.1 zeigte sich eine signifikante Abnahme von FTO bei siRNA 5 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die anderen siRNAs 6, 7 und 8 führten zu keiner signifikanten Veränderung des FTO-Levels (n = 2). B) In der Zelllinie WT-D2-1u zeigte sich keine signifikante Veränderung für siRNAs 5 und 6, aber bei siRNA 7 und 8 kam es jeweils zur signifikanten Zunahme von FTO verglichen mit der Kontrollgruppe (n = 2). Auswertung mittels ungepaartem zweiseitigen Welch's t-Test. Daten geben den Mittelwert mit Standardabweichung an, ns = $p > 0{,}05$, * = $p < 0{,}05$.

Als Nächstes wurde für die Identifikation der geeigneten siRNA das FTO-Level auf Proteinebene mittels Western Blot bestimmt. Zur Quantifizierung wurde die FTO-Bandenintensität gegen das Gesamtprotein normalisiert.

Für die Zelllinie pCRTL 1.1 ergaben sich folgende Ergebnisse bezügliche des Proteinlevels von FTO: Im ersten Western Blot (Abbildung 30, Figur A/B) ergaben sich keine signifikanten Veränderungen ($p > 0{,}05$) bei der Transfektion der siRNAs relativ zur Kontrolle. Im zweiten Western Blot (Abbildung 30, Figur C/D) ließ sich eine tendenzielle Verringerung ($p > 0{,}05$) des FTO-Levels bei den mit siRNA behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Bei der Zusammenfassung beider Blots (Abbildung 30, Figur E) zeigte sich die stärkste Verringerung ($p > 0{,}05$) um das 0,46-fache (Standardabweichung ± 0,2745) bei der Gruppe siRNA 7 verglichen zur Kontrolle.

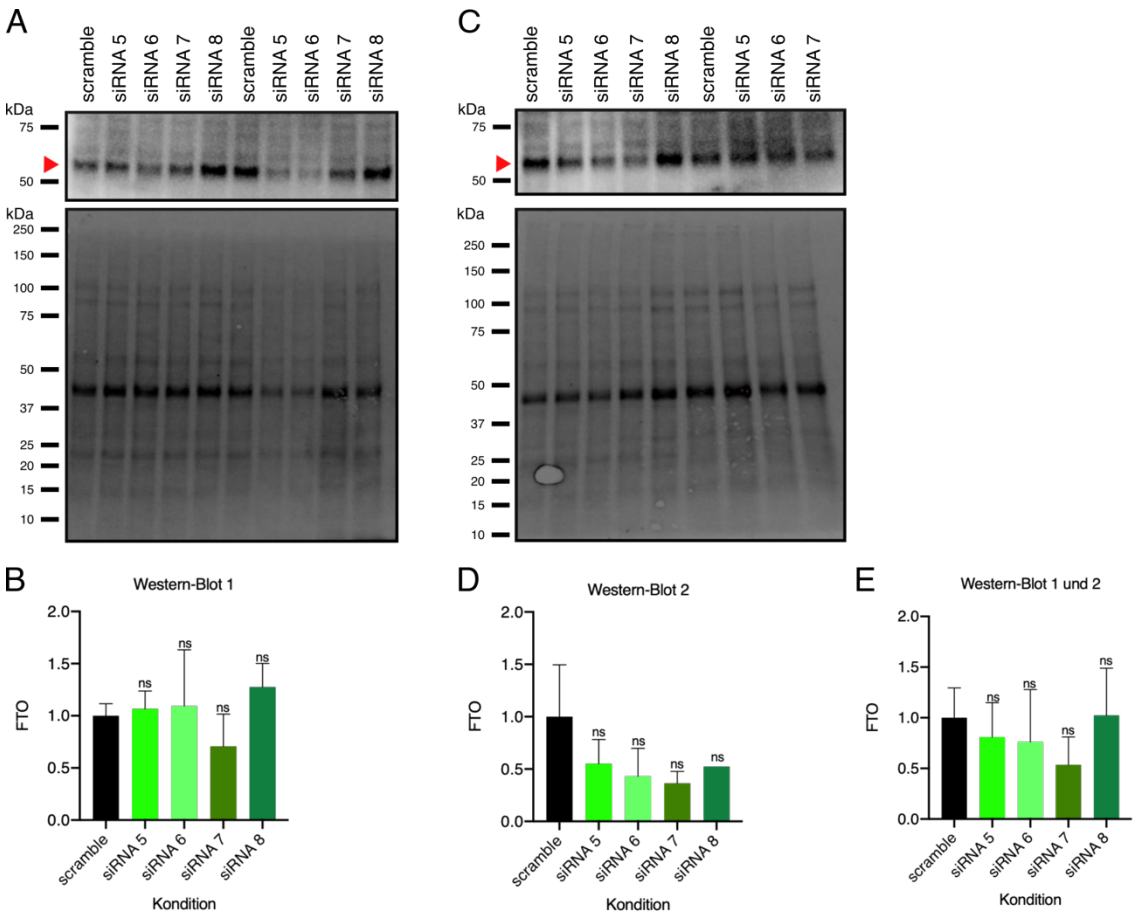

Abbildung 30: Veränderung des Proteinlevels von FTO nach FTO-KD in der Zelllinie pCTRL1.1

Western Blot nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs in den hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 zur Validierung des FTO-KD. A) + B) Der erste Blot zeigt keine signifikanten Veränderungen des FTO-Levels bei Transfektion mit siRNA 5, 6, 7 oder 8 relativ zur Kontrolle und C) + D) der zweite Blot zeigt die stärkste Abnahme (nicht signifikant) des FTO-Levels bei Transfektion mit siRNA 7. E) Die Zusammenfassung der Blots weist auf eine Verringerung (nicht signifikant) von FTO bei Behandlung mit siRNA 7 hin. Quantifizierung der FTO-Bandenintensität normalisiert gegen das Gesamtprotein (n = 2). Roter Pfeil markiert die FTO-Bande bei 58 kDa. Auswertung mittels ungepaartem zweiseitigen Welch's t-Test. Daten geben den Mittelwert mit Standardabweichung an, ns = $p > 0{,}05$.

In der Zelllinie WT-D2-1u (Abbildung 31) zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme des FTO-Levels bei der Transfektion von siRNA 5, siRNA 6, siRNA 7 und siRNA 8 im Vergleich zur Kontrolle *scramble* ($p > 0{,}05$). Die stärkste Tendenz zur Verringerung von FTO war mit einer Abnahme um das 0,73-fache (Standardabweichung ± 0,1190) bei siRNA 5 zu erkennen.

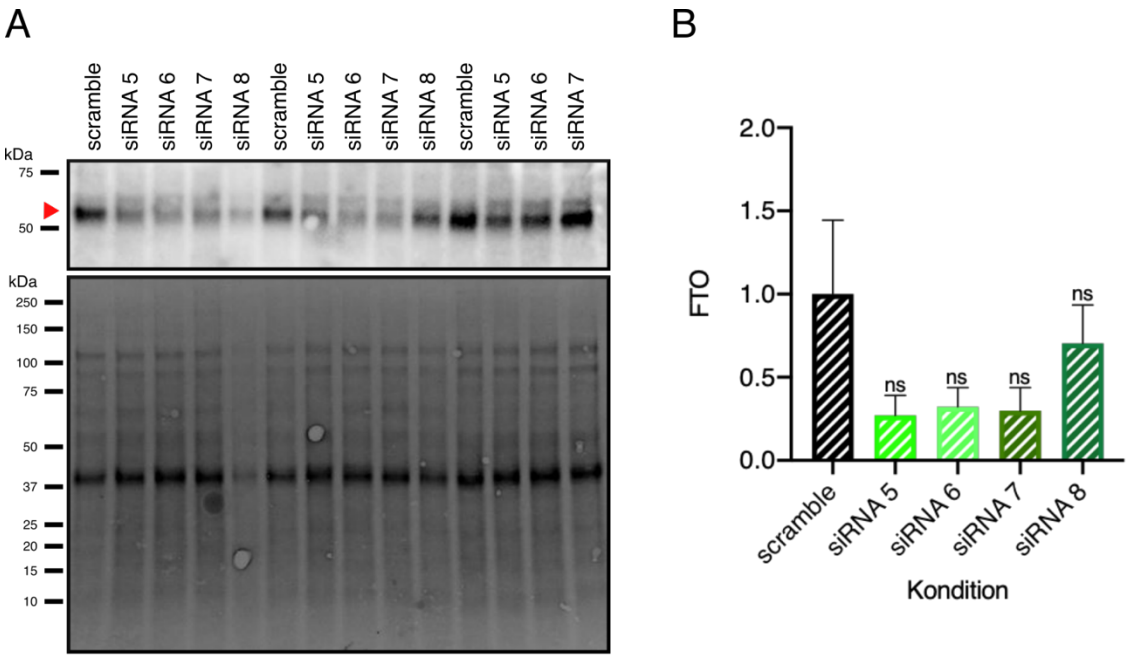

Abbildung 31: Veränderung des Proteinlevels von FTO nach FTO-KD in der Zelllinie WT-D2-1u

Western Blot nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs in den hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u zur Validierung des FTO-KD. A) + B) Der Blot zeigt die stärkste Abnahme (nicht signifikant) des FTO-Levels bei Transfektion mit siRNA 5. Quantifizierung der FTO-Bandenintensität normalisiert gegen das Gesamtprotein (n = 2 - 3). Roter Pfeil markiert die FTO-Bande bei 58 kDa. Auswertung mittels ungepaartem zweiseitigen Welch's t-Test. Daten geben den Mittelwert mit Standardabweichung an, ns = $p > 0{,}05$.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse aus den qPCRs und Western Blots beider Zelllinien ließ sich die siRNA 5 als geeigneter Kandidat für eine Herunterregulation von FTO in den hiPSC-CM identifizieren.

4 Diskussion

4.1 Erfolgreiche Etablierung eines *in vitro* Stress- und Hypertrophiemodells

Die Herzinsuffizienz ist mit einer Prävalenz von 1 - 2% ein häufig vorkommendes Krankheitsbild (Ponikowski et al. 2016). Hierbei liegt eine kardiale Dysfunktion vor, die durch eine erhöhte hämodynamische Last im Herzen ausgelöst wird (Herold 2018). Die pathologische Hypertrophie des Herzens trägt als ein wesentlicher Bestandteil zu der Entstehung einer Herzinsuffizienz bei. Sie entsteht als maladaptive Antwort auf anhaltenden Stress und ist beteiligt an zahlreichen Veränderungen auf zellulärer Ebene, in der Genexpression und in der Regulation der Signalwege (Nakamura und Sadoshima 2018; Kastner 2020). Durch die Vergrößerung der einzelnen Kardiomyozyten kommt es zur Dilatation des Herzens, insbesondere des linken Ventrikels. Dazu kommen Veränderungen der Genexpression und das kardiale *Remodeling*, welches u. a. mit vermehrter Fibrose und Apoptose verbunden ist (Berulava et al. 2019; Johansson et al. 2020). Insgesamt kommt es so zu einer reduzierten kardialen Funktion. Einige wichtige Signalwege und Mechanismen für die Entstehung der kardialen Hypertrophie konnten bereits identifiziert werden. Aber für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse sind weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere der bisher wenig untersuchten epigenetischen Regulationsmechanismen. Ein Zellkulturmodell mit hiPSC-Kardiomyozyten unter Stimulation von pharmakologischen Agenzien bietet eine geeignete Möglichkeit zur Untersuchung und Identifikation neuer Mechanismen, die am kardialen *Remodeling* beteiligt sind. Die Initiation von Stress bzw. Hypertrophie kann u. a. mithilfe von Druckbelastung *in vivo* oder neurohumeraler Stimulation *in vitro* erfolgen (Johansson et al. 2020; Kastner 2020). Die Etablierung und Validierung eines solchen *in vitro* Modells zur Simulation von Hypertrophie und Stress in den hiPSC-CM ist essenziell für alle weiteren Untersuchungen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine sechststündige Behandlung mit PE bzw. ISO Stress in hiPSC-CM auslösen kann. Die Behandlungsdauer von sechs Stunden erwies sich als geeignet, da eine längere Behandlungsdauer zu keiner weiteren Zunahme der Kontraktionsfrequenz führte. Epigenetische Veränderungen setzten frühzeitig ein, sodass bereits bei einem kurzen Behandlungszeitraum von sechs Stunden epigenetische Veränderungen zu erwarten sind. Für die Konzentrationen PE 100 μm und ISO 100 nm konnte eine

signifikante Zunahme der Zellgröße in den beiden Zelllinien pCRTL 1.1 und WT-D2-1u mithilfe einer IF-Färbung mit alpha-Aktinin nachgewiesen werden. Auf RNA-Ebene zeigte sich ein Anstieg der etablierten kardialen Stressmarker Nbbp und ACTA1 unter Stimulation mit PE 100 μm bzw. ISO 100 nm. In beiden Zelllinien kam es zur vermehrten Nppb-Expression. In der Zelllinie pCRTL 1.1. konnte zudem noch ein erhöhtes ACTA1-Level nachgewiesen werden. Zusammenfassend kam es unter der Behandlung mit PE 100 μm bzw. ISO 100 nm für sechs Stunden zum Anstieg der Kontraktionsfrequenz sowie Zunahme der Zellgröße und kardialer Stressmarker in beiden Zelllinien. Folglich handelt es sich um ein geeignetes *in vitro* Modell zur Untersuchung von Stress.

Für die Induktion einer Hypertrophie in den hiPSC-CM wurden diese mit ET-1 behandelt. Als Behandlungszeitraum wurden 48 Stunden gewählt. Zur Wahl der optimalen Konzentration von ET-1 wurde die Zellgröße der hiPSC-CM nach einer Behandlung mit ET-1 1 nm, 2 nm oder 3 nm für 48 Stunden gemessen. In den beiden Zelllinien zeigte sich bei der ET-1 Konzentration 3 nm über 48 Stunden eine signifikante Zunahme der Zellgröße verglichen mit der Kontrolle in der IF-Färbung mit alpha-Aktinin. Für die Zelllinie pCTRL1.1 ergab sich bei der Konzentration 2 nm die größte Zellgrößenzunahme, allerdings auch mit dem größten Standardfehler. Bei der Konzentration 3 nm fiel der Standardfehler geringer aus, sodass es sich bei ET-1 3 nm um eine potenziell geeignetere Konzentration zur Simulation einer Hypertrophie in den hiPSC-CM handelt. Diese Annahme konnte auf RNA-Ebene bestätigt werden, da für die Zelllinie pCTRL1.1. eine signifikante Zunahme der etablierten Hypertrophiemarker Nppb und ACTA1 unter Behandlung mit ET-1 3 nm nachgewiesen wurde. Zudem ergab sich eine größere Zunahme der Zellgröße bei ET-1 3 nm relativ zur Stresssimulation mit ISO und PE von sechs Stunden. Damit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden *in vitro* Modellen.

Durch die Nutzung von zwei unterschiedlichen hiPSC-Zelllinien kann die Konsistenz der Ergebnisse überprüft und mögliche Verfälschungen detektiert werden. Die Verwendung und Einhaltung des etablierten Protokolls für die Differenzierung zu hiPSC-CM erhöht die Reproduzierbarkeit und Konsistenz der Ergebnisse weiter. Unterstützend hierfür sind die Aussaat einer definierten Zellzahl und gleichbleibende äußere Bedingungen in der Zellkultur. Durch die IF-Färbung mit alpha-Aktinin konnte sichergestellt werden, dass es sich um reife hiPSC-CM handelt und die weitere Verwendung dieser somit möglich war. Die Ergebnisse der qPCR waren schwach signifikant bzw. es war nur eine Tendenz zu erkennen. Dies liegt an der geringen Anzahl biologischer Replikate (n = 2 bzw.

3). Mit einer größeren n-Zahl würden sich wahrscheinlich signifikantere Ergebnisse erreichen lassen. Die hier gezeigten Daten konnten aber in einem technischen Replikat bestätigt werden. Aufgrund der aufwändigen Kultivierung der Zellen und begrenzten Verfügbarkeit geeigneter Zellbatches war eine weitere Wiederholung zu diesem Zeitpunkt nicht weiter zielführend. Der Nachweis der Stimulation von Stress bzw. Hypertrophie in den hiPSC-CM ist bisher nur auf RNA-Ebene und immunohistochemisch erfolgt. Die Protein-Ebene sollte in Zukunft mit weiteren Zellbatches untersucht werden, um die Validierung der Erhöhung etablierter Hypertrophiemarker auf Proteinebene zu komplementieren.

Die Aktivierung neurohumeraler Mechanismen in einem *in vitro* Zellkulturmodell mithilfe pharmakologischer Agenzien ist eine relativ einfache Methode zur Induktion von Stress bzw. Hypertrophie verglichen zur Induktion von mechanischem Stress. Geeignete Substanzen hierfür sind neben ISO, PE und ET-1 auch Ang II und Noradrenalin (Kastner 2020). Alle binden an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Zellmembran und aktivieren so Signalwege, die beteiligt sind am kardialen *Remodeling* (Johansson et al. 2020; Kastner 2020). Es kommt zu einer Größenzunahme der Zelle und vermehrter Expression der Hypertrophiegene. Das Ausmaß der induzierten Antwort ist je nach gewählter Substanz verschieden. Weitere wichtige Einflussfaktoren sind der Behandlungszeitraum (meist zwischen 24 und 48 Stunden) und die gewählte Konzentration (Kastner 2020).

Insbesondere das Peptidhormon ET-1 wird häufig verwendet, da es eine stabile hypertrophe Antwort unabhängig von der jeweiligen Zelllinie auslösen kann (Johansson et al. 2020). In Abhängigkeit von der gewählten Konzentration kommt es zur Hochregulation der Hypertrophiemarker Nppa, Nppb und ACTA1. Eine signifikant erhöhte Sekretion des natriuretischen Peptids ANP ist nach 24 bis 96 Stunden zu verzeichnen, wobei das höchste Expressionslevel nach einer Stimulationsdauer von 48 Stunden beschrieben wird. Anschließend kommt es wieder zur Verringerung des ANP-Levels (Johansson et al. 2020). Der Zeitraum der Stimulation hat einen großen Einfluss auf das Ausmaß des hypertrophen Effekts. Von Johansson et al. (2020) wurde nach einer 48-stündigen Behandlungsdauer die größte Zunahme der Zellgröße im Sinne einer hypertrophen Antwort beschrieben. Aufgrund dieser vorbeschriebenen Ergebnisse wurde für diese Arbeit ein Behandlungszeitraum von 48 Stunden gewählt. Die verschiedenen ET-1 Konzentrationen wurden vor den eigentlichen Versuchen getestet, um einen optimalen hypertrophen Effekt bei Vermeidung von Toxizität zu erzielen (Kastner 2020). Ein Vergleich von *in vitro*

Veränderungen der Genexpression durch ET-1 zu Expressionsveränderungen *in vivo* wies ein hohes Maß an Übereinstimmung nach. Johannes et al. (2020) konnten u. a. zeigen, dass die Gene *COL12A1*, *THBS1*, *HSP70* und *ACTN1* bei beiden Modellen hochreguliert waren. Bekanntermaßen fördern *COL12A1* und *THBS1* die Fibrose und das kardiale *Remodeling*, während *HSP70* zur Induktion von kardialer Hypertrophie beiträgt. *ACTN1* liegt erhöht beim Herzversagen vor. Folglich ist davon auszugehen, dass die hier gezeigten Ergebnisse zu einem gewissen Maße auf den Menschen übertragbar sind. Es ist allerdings zu bedenken, dass durch die chemische Stimulation nicht alle Signalwege beeinflusst werden, wie in einem *in vivo* Modell, und es so zu einer falschen Datenauslese und Interpretation kommen kann (Kastner 2020).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in dieser Arbeit zwei *in vitro* Modelle zur Simulation von Stress bzw. Hypertrophie in hiPSC-CM in zwei verschiedenen Zelllinien etabliert und validiert werden konnten. Die weitere Nutzung zur Untersuchung von Mechanismen, die an der Entstehung von Stress und Hypertrophie beteiligt sind, ist somit gegeben.

4.2 Charakterisierung des miRNA-Profils und dessen Methylierungsveränderungen im *in vitro* Hypertrophie-modell

Micro RNAs spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression, indem sie fast alle biologischen Prozesse auf posttranskriptionaler Ebene beeinflussen (Wehbe et al. 2019). Viele Erkrankungen zeichnen sich durch eine abnorme Expression von miRNAs aus. Die kardiale Pathophysiologie wird u. a. von verschiedenen miRNAs reguliert, die oftmals nicht funktionell begrenzt wirken, sondern unterschiedliche Prozesse beeinflussen. Bei der Herz-hypertrophie sind viele miRNAs differentiell exprimiert und beeinflussen die Entstehung und das Fortschreiten durch eine pro- oder antihypertrophe Aktivität (Jeong et al. 2012). Die miRNAs selber werden u. a. als Antwort auf Stresssignale reguliert und beeinflussen so das Expressionslevel von Gennetzwerken, die in das kardiale *Remodeling* involviert sind (Divakaran und Mann 2008). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind weitestgehend noch unbekannt. Die Identifikation von miRNAs, welche in diese Prozesse involviert sind, ist entscheidend für die Aufdeckung der an Hypertrophie beteiligten Mechanismen und Entwicklung neuer Therapieansätze in der Zukunft.

Die N6-Adenosin Methylierung (m6A) ist die häufigste posttranskriptionale Modifikation auf den verschiedenen RNA-Klassen. Berulava et al. (2015) haben gezeigt, dass auch miRNAs selbst m6A-methyliert sein können. Der Effekt einer veränderten Methylierung von miRNAs auf die kardiale Hypertrophie ist bisher nicht bekannt.

4.2.1 Methode

Für die Charakterisierung des miRNA-Profils und Veränderungen in der Methylierung der miRNAs im *in vitro* Hypertrophiemodell wurde eine *methylated RNA immunoprecipitation-Sequencing* (MeRip-Seq) durchgeführt. Dies ist eine etablierte Methode bei der zur spezifischen Detektion von m6A-methylierter RNA die Immunopräzipitation und das *Next Generation Sequencing* (NGS) kombiniert werden (Meyer et al. 2012; Dominissini et al. 2013).

Für diese Arbeit wurde sich auf ein MeRip-Seq der Zelllinie pCTRL1.1 beschränkt, da bei dieser kein Lentivirus zur Reprogrammierung verwendet wurde und somit weniger genomische Veränderungen zu erwarten sind. Voraussetzung für das Gelingen der MeRip-Seq ist eine gute Aufbereitung der Proben. Die erforderliche RNA-Isolation aus den gewonnenen Zellpellets erfolgte mithilfe einer Säulchen-basierten Aufreinigung, wie von Dominissini et al. (2013) empfohlen. Diese liefert eine gute RNA-Qualität und Ausbeute und ist auch wegen ihrer einfachen Handhabung vorteilhaft. Nach dem Austesten von verschiedenen kommerziell erhältlichen RNA-Isolationskits fiel die Entscheidung auf das Qiazol von QIAGEN, da mit diesem die höchste RNA-Konzentration in einer guten Qualität aus den hiPSC-CM gewonnen werden konnte. Kritische Punkte bei der RNA-Isolation sind ein ausreichendes Startmaterial, da für die *Library Preperation* 2000 ng RNA notwendig sind, das Vermeiden einer DNA-Kontamination mithilfe einer DNase Behandlung und die Beibehaltung der RNA-Integrität. Für die Analyse von miRNAs wurde die RNA in kurze und lange Fragmente aufgetrennt. Bei der herkömmlichen MeRip-Seq erfolgt die Fragmentierung der RNA in ca. 100 nt lange Fragmente erst kurz vor der Immunopräzipitation (Meyer et al. 2012; Dominissini et al. 2013). Abschließend wurde die Konzentration der RNA gemessen und ihre Qualität überprüft. Dies sind entscheidende Schritte für die Weiterverwendung der isolierten RNA. Die Reproduzierbarkeit lässt sich erhöhen, indem nur wenige Proben gleichzeitig extrahiert werden, um die Arbeitsschritte so kurz wie möglich zu halten und die RNA-Qualität so zu erhalten. Weiter sollten nur kleine Volumina bei der Elution sowie ein Thermocycyler verwendet werden (Dominissini et al. 2013), um die

RNA-Ausbeute zu erhöhen. Unter Berücksichtigung dieser potenziellen Fehlerquellen konnte aus den Zellpellets der hiPSC-CM für jeden Probe eine ausreichende RNA-Menge von 2000 ng in einer guten Qualität gewonnen werden.

Zur Detektion von m6A-methylierter miRNA erfolgte die Immunopräzipitation (IP) mit einem spezifischen m6A-Antikörper. Die Methylierung der N6-Position des Adenosins (m6A) hat keinen Einfluss auf die Basenpaarung, d. h. m6A geht dieselbe Basenpaarung wie unmodifiziertes Adenosin ein. Sie ist deswegen nicht mit der Standard-Sequenzierung nachweisbar (Meyer et al. 2012). Vor der IP wird ein Teil der isolierten RNA als *Input* aufbewahrt, um bei der Analyse Signalanreicherungen in der IP-Fraktion erkennen zu können. Durch die Bindung des spezifischen m6A-Antikörper an die m6A-modifzierten Reste und anschließende Sequenzierung dieser kann die Methylierung detektiert werden. Für die Identifikation von Positionen mit Signalanreicherung auf den miRNAs erfolgt der Vergleich mit dem *Input* (Dominissini et al. 2013). So werden m6A-*peaks* generiert, welche die Lokalisation der m6A-Reste ungefähr abbilden können. Dabei gilt je kürzer die Fragmente sind, desto höher und genauer ist die Auflösung der m6A-*peaks* (Meyer und Jaffrey 2014). Technische Limitationen dieser Methode sind, dass die Lokalisationen der m6A-Position nicht exakt detektiert werden und die quantitative Menge eines methylierten Transkripts nicht messbar ist (McIntyre et al. 2020). Die Nutzung mehrerer Replikate ist entscheidend, um die Varianz zwischen ihnen zu ermitteln und die statistischen Effekte einer Behandlung auszuwerten. Empfohlen werden zwei bis drei Replikate (McIntyre et al. 2020). In dieser Arbeit erfolgte die Analyse anhand von drei Replikaten jeder Kondition.

Nach erfolgreicher miRip-Seq erfolgte die bioinformatische Aufbereitung und Analyse der gewonnenen Daten. Für die Expressionsanalyse der miRNAs wurde jeweils das Verhältnis zwischen IP und *Input* einer Probe mithilfe des R-Paketes DESeq2 berechnet (Love et al. 2014) und Ergebnisse mit $padj < 0{,}05$ als signifikant gewertet. Die Detektion m6A-angereicherter miRNAs stellte eine besondere Herausforderung dar, weil es bisher kein geeignetes Programm hierfür gab. Die bioinformatische Abteilung des DZNE entwickelte eigens ein Programm mit dessen Hilfe die Methylierungswahrscheinlichkeit einer miRNA berechnet werden konnte (Bosse 2021). Die Diskussion der Ergebnisse der Expressions- und Methylierungsanalyse erfolgt in den nachfolgenden Abschnitten. Vorausgehend erfolgte eine Hauptkomponentenanalyse (PCA), um mögliche interessante Unterschiede zwischen den Daten zu finden. Im ersten

PCA-Diagramm (Abbildung 23) war ein *pairing effect* zwischen der Kontrolle und der mit ET-1 behandelten Gruppe einer Differenzierung zu erkennen. Dies weist daraufhin, dass sich die einzelnen Differenzierungen der Zelllinie pCTRL 1.1 voneinander unterscheiden und somit eine biologische Variabilität zwischen ihnen besteht. Dies führte dazu, dass die Konditionen ET-1 und die Kontrolle einer Differenzierung mehr Gemeinsamkeiten aufwiesen als die Kontrollen verglichen mit den ET-1 behandelten Gruppen. Die Herausrechnung dieses *batch effects* war notwendig für die weitere Auswertung des Datensatzes. Die Datentransformation und statistische Analyse wurde von Tonatiuh Pena (DZNE) durchgeführt. Anschließend waren die Unterschiede zwischen den mit ET-1 behandelten Proben und den Kontrollen deutlich erkennbar und die erwartete Clusterbildung auf der PC1-Achse zwischen den beiden Konditionen nachweisbar (Abbildung 24). Die in dieser Arbeit beschriebene biologische Heterogenität zwischen den einzelnen Differenzierungen einer Zelllinie der hiPSC-CM ist ein bekanntes Problem, insbesondere im Rahmen von NGS (Yoshihara et al. 2017). Sie basiert auf drei verschiedenen Ursprüngen: Erstens gibt es vorbestehende genetische Variationen in den parentalen somatischen Zellen, zweitens entstehen durch die Reprogrammierung zu hiPSCs weitere somatische Mutationen und drittens kommen bei jedem Passagieren der hiPSCs weitere Variationen hinzu (Yoshihara et al. 2017; Volpato und Webber 2020). Zur Reduktion der Variabilität zwischen den hiPSC-CM ist es wichtig standardisierte Differenzierungsprotokolle zu verwenden und eine möglichst große n-Zahl in die Untersuchung einzuschließen. Weiter können bioinformatische Ansätze helfen die ungewollten Variationen zu identifizieren und zu entfernen, um die interessierenden Unterschiede erkennen zu können (Volpato und Webber 2020). Es ist wichtig die Gründe für die Entstehung der biologischen Heterogenität zu erkennen und zu verstehen, um in zukünftigen Untersuchungen ihren Einfluss auf die Ergebnisse weiter reduzieren zu können.

4.2.2 Das micro RNA-Profil

Eine große Anzahl von miRNAs liegt differentiell exprimiert bei der Herzhypertrophie vor. Sowohl eine hochregulierte als auch eine herunter-regulierte Expression dieser miRNAs kann zur Initiation von pathologischen Prozessen im Herzen führen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 558 miRNAs differentiell exprimiert im *in vitro* Hypertrophiemodell vorlagen. Von diesen 558 differentiell exprimierten miRNAs waren 292 herunterreguliert und 266 hochreguliert (Abbildung 25). Signifikant hochregulierte miRNAs (*padj* <

0,05) waren die hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-132-3p und SNORD38A-201. Die hsa-miR-212 war ebenfalls vermehrt exprimiert und obwohl nicht signifikant, lässt sich der Trend erkennen. Die miRNAs hsa-miR-19a, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-405-5p, hsa-miR-133b und hsa-miR19b-3p hingegen zeigten eine signifikant verminderte Expression (*padj* < 0,05).

Die Identifikation für die Hypertrophie spezifischer miRNAs ist ein wichtiger erster Schritt, um Fragen bezüglich eines möglichen Expressionsprofils, einer Involvierung in bestimmte Signalwege und Interaktionen mit diesen Signalwegen während der pathologischen Hypertrophie zu beantworten.

Das Vorkommen der hsa-miR-29b-3p hat sich unter Behandlung mit ET-1 verdoppelt. Die hier gezeigte Hochregulation bei kardialer Hypertrophie wird auch von Jeong et al. (2012) und Wehbe et al. (2019) beschrieben. Die hsa-miR-29-3p weist eine pro-hypertrophe Funktion auf. Im *in vivo transverse aortic constriction* (TAC)-Modell konnte nachgewiesen werden, dass ihre gezielte Hemmung vor einer TAC-induzierten kardialen Hypertrophie schützt. Ihre Überexpression trägt zu einer verstärkten Hypertrophie und Fibrose bei (Sassi et al. 2017). Die miR-29 Familie reguliert insbesondere die Expression pro-fibrotischer Gene wie Fibrillin 1, Kollagen Typ V α1/2 und Kollagen Typ III α1 und fördert dadurch die Entwicklung einer Fibrose im Herzen (Wang et al. 2014; Wehbe et al. 2019). Zudem reguliert die hsa-miR-29-3p indirekt den Wnt-Signalweg (Sassi et al. 2017), welcher ebenfalls über die Aktivierung der Signalwege JNK, PKC und CaMKII sowie des Proteins ß-Catenin das kardiale *Remodeling* beeinflusst (Malekar et al. 2010).

Die hsa-miR-129-5p ist am zweitstärksten im *in vitro* Hypertrophiemodell hochreguliert. Passend zu diesem Ergebnis wird von Thum et al. (2007) gezeigt, dass die hsa-miR-129b bei Herzversagen eine erhöhte Expression aufweist. Weiter ist beschrieben, dass die hsa-miR-129-5p im Plasma von Patienten mit Herzversagen erhöht vorliegt (Tijsen et al. 2010). Zhang et al. (2018) haben *ATG14*, das eine wichtige Rolle bei der Induktion der Autophagie spielt, als ein direktes Ziel der miR-129-5p identifiziert. Durch die Überexpression der miR-129-5p kommt es zur Herunterregulation von *ATG14* und so werden über die PI3K/Akt/mTOR-Signalwege Autophagie und Apoptose in H9c2-Zellen gehemmt. Welchen Einfluss die hsa-miR-129b auf die Autophagie im Herzen hat, bedarf noch weiterer Forschung.

Die signifikant hochregulierte hsa-miR-132-3p gehört zusammen hsa-miR-212-5p zur miR-212/132-Familie. Passend zu den hier gezeigten Ergebnissen haben

Ucar et al. (2012) nachgewiesen, dass sich die Expression von miR-212 und miR-132 in Kardiomyozyten unter Hypertrophie-Induktion mit z. B. Ang II, ISO oder PE erhöht. Im *in vivo* Mausmodell kam es durch Überexpression der miR-212/132 zur Hypertrophie mit Zunahme der Zellgröße und Anstieg der Hypertrophie-marker ANP und BNP. Die Deletion der beiden miRNAs hingegen schützt vor einer TAC-induzierten Hypertrophie und Fibrose und die Größe der Kardiomyozyten nimmt ab. Es wird angenommen, dass die miR-212/132-Familie hypertrophe Signalwege direkt über die Herunterregulation der FoxO3-Expression beeinflusst. Dies führt dann zu einer Hyperaktivierung des prohypertrophen Calcineurin/NFAT-Signalwegs und letztlich zur Entstehung von kardialer Hypertrophie und Herzversagen (Wang X et al. 2016; Colpaert und Calore 2019).

Bei der SNORD38A-201 handelt es sich um eine *small nucleolar RNA* (snoRNA) und sie gehört zu der Klasse der C/D Box snoRNAs. Diese snoRNAs sind involviert in der 2'O-Methylierungen von Ribosen. Nach Bindung an ihre komplementäre Sequenz auf der rRNA wird mithilfe einer katalytischen Untereinheit die Methylgruppe von SAM auf die Ribose übertragen (Filipowicz et al. 1999). Ein Zusammenhang mit der kardialen Hypertrophie ist bisher noch nicht beschrieben. Ob und auf welche Weise die SNOR38A-201 Einfluss auf die Hypertrophie nimmt, erfordert weitere Untersuchungen.

Die miRNAs hsa-miR-19a-3p und hsa-miR-19b-3p weisen eine signifikant verringerte Expression unter der ET-1 Behandlung auf. Beide miRNAs gehören zum miR-17-92 Cluster und haben eine übereinstimmende Kernsequenz (Mendel et al. 2018). Bei kardialer Hypertrophie liegen die miR-19a/b-3p differentiell exprimiert vor. Liu et al. (2018) zeigten, dass es zu einer reduzierten Expression von miR-19a/b-3p bei Ang II induzierter Hypertrophie kommt. Im transgenen Mausmodell schützen die miR-19a/b-3p vor einer Progression der Hypertrophie und des kardialen *Remodelings*. Bei Patienten mit Herzversagen wurde eine verringerte Plasmakonzentration von miR-19a/b-3p nachgewiesen (Zou et al. 2016). Diese Ergebnisse weisen auf eine anti-hypertrophe Funktion der miR-19a/b-3p hin. Als direkte Ziele sind u. a. der TGF-ß RII, welcher assoziiert ist mit Autophagie, Fibrose und EZM-Produktion, als auch *PDE5A*, ein Regulator des cGMP-Signalwegs, identifiziert worden (Zou et al. 2016; Liu et al. 2018).

Die hsa-let-7e-5p, die im *in vitro* Hypertrophiemodell signifikant herunterreguliert ist, gehört zur let-7 Familie. Diese Gruppe besteht aus 13 Mitgliedern und ist stark im kardiovaskulären System exprimiert. Es kommt zu einer veränderten

Expression der let-7 Mitglieder im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen, der Herzentwicklung und -differenzierung (Bao et al. 2013). Für die hsa-let-7e ist eine erhöhte Expression bei Hypertension und in der Herzentwicklung beschrieben (Bao et al. 2013). Bisher ist keine direkte Verbindung zur Hypertrophie gezeigt worden. Allerdings weisen andere Mitglieder der let-7 Familie wie let-7b, -7c und -7d eine dynamische Expression bei Hypertrophie auf, aber ihre genaue Funktion ist bisher noch unklar (Bao et al. 2013). Vor dem Hintergrund, dass andere Mitglieder der let-7 Familie in die Regulation der Hypertrophie involviert sind, ist es wahrscheinlich, dass auch die hsa-let-7e-5p eine Rolle hierbei spielen könnte. Zur Bestätigung dieser neuen Beobachtung und Untersuchung ihrer Funktion ist weitere Forschung notwendig.

Die hsa-miR-450a-5p ist vermindert exprimiert unter der ET-1 Behandlung im *in vitro* Hypertrophiemodell. In Übereinstimmung zu diesem Ergebnis zeigten Jeong et al. (2012), dass es bei PE-induzierter Hypertrophie zu einer signifikanten Hemmung der miR-450-5p kommt. Der Anstieg von ANP und ß-MHC unter PE konnte durch miR-450a-5p-Mimics gehemmt werden, währenddessen entsprechende Antagomirs zur Verstärkung führten. Zusammen mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen, deutet dies auf eine anti-hypertrophe Funktion der hsa-miR-450a hin.

Unter der Behandlung mit ET-1 ist die hsa-miR-133b signifikant herunterreguliert in den hiPSC-CM. Die hsa-miR-133b spielt eine wichtige Rolle bei Herzerkrankungen (Song et al. 2010). Ihr wird eine anti-hypertrophe Funktion zugesprochen und ihre Expression weist eine inverse Korrelation mit der Schwere der kardialen Hypertrophie auf (Da Costa Martins und De Windt 2012; Condorelli et al. 2014; Li et al. 2018). Die Überexpression der hsa-miR-133b hemmt das hypertrophe Wachstum und die kardiale Fibrose (Li et al. 2018). Eine Herunterregulation hingegen ermöglicht die vermehrte Expression von wachstumsassoziierten Genen, eine erhöhte Kalzium-Signalübertragung und eine Förderung des kardialen *Remodelings* (Divakaran und Mann 2008; Colpaert und Calore 2019). Die hsa-miR-133b beeinflusst die Expression diverser Gene, wie z. B. *RhoA*, *Cdc42*, *HERG* und *PI3k/Akt* und ist u. a. involviert in die MAPK-, RAS- und Gq-Signalwege (Feng et al. 2014; Wang J et al. 2016; Li et al. 2018). Es ist anzunehmen, dass die hsa-miR-133b dem kardialen *Remodeling* und der Hypertrophie entgegenwirkt und so einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt darstellen könnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit gefundenen signifikant differentiell exprimierten miRNAs größtenteils im Zusammenhang mit

dem Herzen vorbeschrieben sind und sich in ihrer Hoch- bzw. Herunterregulation eine Übereinstimmung mit anderen Hypertrophiemodellen zeigt. Dies bekräftigt noch einmal die Annahme, dass es sich bei dem hier verwendeten *in vitro* Hypertrophiemodell um eine geeignete Methode handelt, um die Hypertrophie auch auf molekularer Ebene zu untersuchen. Es konnten vielversprechende miRNAs identifiziert werden, die über unterschiedliche Ziele und Signalwege die Hypertrophie beeinflussen. Dies kann dazu beitragen, die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen. Mithilfe von *Knock-Down* oder Überexpression der differentiell exprimierten miRNAs könnte ihr spezifischer Einfluss auf die Entwicklung und Progression der kardialen Hypertrophie weiter untersucht werden.

4.2.3 Veränderung der m6A-Methylierung von miRNAs

Neben der differentiellen Expression von miRNAs während der Herzhypertrophie sind miRNAs mit einer veränderten m6a-Methylierung besonders relevant. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass 558 miRNAs in ihrer Expression unter der Behandlung mit ET-1 verändert sind. Ein verändertes Methylierungs-Level lag bei 895 miRNAs in der Kontrollgruppe und bei 914 miRNAs in den ET-1 behandelten hiPSC-CM vor (Abbildung 27). Es sind also mehr miRNAs in ihrer Methylierung verändert als in ihrer Expression. Die miRNAs, die nur eine veränderte Methylierung und keine veränderte Expression unter der ET-1 Stimulation aufweisen, sind besonders interessant. Dies betrifft die drei miRNAs hsa-miR-1180-3p, hsa-miR-664-5p und hsa-miR-315-5p (Abbildung 28). Sie zeigen eine signifikante Methylierung in den ET-1 behandelten hiPSC-CM, was auf einen Endothelin-1 spezifischen Effekt hindeutet, da nur die Methylierung und nicht die Expression dieser miRNAs verändert ist.

Berulava et al. (2015) konnten zeigen, dass miRNAs selbst auch m6a-methyliert sein können. Der Effekt dieser Methylierung ist bisher weitestgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass durch die Methylierung der miRNAs ihre Biogenese, Stabilität und Funktion beeinflusst wird (Berulava et al. 2015; Chen et al. 2020). Der Fokus der Forschung lag vor allem auf der Veränderung der miRNA-Expression und anhand dieser wurde ihre biologische Relevanz bewertet. Insbesondere in der Krebsforschung gab es vermehrt Hinweise darauf, dass die Methylierungsveränderungen der miRNAs besser zur Bewertung ihrer Wichtigkeit als ihre Expressionslevels geeignet sein könnten (Konno et al. 2019). Berulava et al. (2019) konnten zeigen, dass die m6A-Methylierung der mRNA während der Entwicklung eines Herzversagens dereguliert ist. Mehr Transkripte

weisen Veränderungen in ihrer m6A-Methylierung auf als Gene in ihrer Expression. Die differentiell exprimierten Gene unterscheiden sich hierbei signifikant von den differentiell methylierten Transkripten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Veränderungen der m6A-Methylierung und der Genexpression verschiedene Antworten auf kardialen Stress darstellen. Passend dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch eine größere Zahl miRNAs in ihrer Methylierung verändert sind als in ihrer Expression. Die Bedeutung und Funktion dieser veränderten Methylierung von miRNAs ist noch unbekannt, aber es ist anzunehmen, dass es sich um einen spezifischen durch die Hypertrophie ausgelösten Effekt handelt.

Die hsa-miR-1880-3p, die unter ET-1 nur in ihrer Methylierung und nicht in ihrer Expression signifikant verändert vorliegt, fördert die Zellproliferation und den Zellzyklus. Sie zielt direkt auf *NKIRAS2* ab und reguliert so den NFkB Signalweg, der eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, Differenzierung, Immunantwort und Karzinogenese spielt. Ding et al. (2020) konnten zeigen, dass die miR-1880 den Wiedereintritt von Kardiomyozyten in den Zellzyklus und kardiale Reparaturvorgänge nach myokardialer Verletzung positiv beeinflusst. Die hsa-miR-664-5p und hsa-miR-315-5p wurden bisher noch nicht im Herzen beschrieben, aber es ist naheliegend, dass auch diese eine wichtige Rolle bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie übernehmen könnten. Abschließend lässt sich feststellen, dass die Methylierungsanalyse der miRNAs interessante neue Ergebnisse gezeigt hat. Die gefundenen miRNAs werden Gegenstand weiterer Forschung sein, um mehr Kenntnisse über ihre Funktion und ihr Bindungsverhalten zu erlangen.

4.3 Erfolgreiche Etablierung des *Knock-Downs* von FTO in den hiPSC-CM

Die Demethylase FTO spielt eine zentrale Rolle im Methylierungsgeschehen. Berulava et al. (2019) konnten im Mausmodell zeigen, dass im Vergleich zur Kontrolle ein *Knock-Out* (KO) von FTO in Kardiomyozyten zu einem schnelleren Fortschreiten des Herzversagens mit Reduktion der Ejektionsfraktion und vermehrter Ventrikeldilatation des Herzens führt. Dies legt nahe, dass die kardiale Funktion von FTO und der zellulären m6A-Verteilung abhängig ist (Zou et al. 2016). Im Rahmen eines Herzversagens nimmt die Expression von FTO ab und die m6A-Methylierung so zu, was zu einer Reduktion der kardialen Kontraktilität beiträgt (Mathiyalagan et al. 2019). Diese neueren Untersuchungen

zeigen, dass FTO eine bedeutende Stellung bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz einnimmt und hier ein großer Forschungsbedarf besteht.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses einer verminderten FTO-Expression auf das Herzen, wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit eines KD von FTO in den hiPSC-CM verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von FTO mithilfe von siRNA in den hiPSC-CM transient unterdrückt werden kann. Die siRNA wurde mithilfe von Lipotransfektion in die hiPSC-CM eingebracht. Hierfür wurde das *Lipofectamin Stem Transfection Reagent* genutzt. Da die Effizienz eines KDs je nach siRNA und Zielgen variiert, musste zunächst eine geeignete siRNA aus den verschiedenen potenziellen Kandidaten identifiziert werden, die FTO am effektivsten in den hiPSC-CM herunterreguliert. Die siRNA 5 erwies sich als geeignet für die Herunterregulation von FTO in den hiPSC-CM. Auf der RNA-Ebene zeigte sich bei der Zelllinie pCTRL 1.1 eine signifikante Verringerung der FTO-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für beide Zelllinien konnte auf der Proteinebene eine klar erkennbare Verringerung des FTO-Levels für die siRNA 5 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ergab sich für die alternativen siRNAs 6, 7 und 8 keine signifikante Verringerung des FTO-Levels auf RNA- oder Protein-Ebene.

Zur Validierung der hier gezeigten Ergebnisse ist es notwendig, die Anzahl der biologischen Replikate der Gruppen (n-Zahl) zu erhöhen, um Unterschiede zwischen den einzelnen Differenzierungen auszugleichen. Ergänzend dazu sollten in mindestens einem technischen Replikat der qPCR und des Western Blots die Ergebnisse bestätigt werden, um methodische Probleme auszuschließen zu können. Die durchgeführte qPCR der Zelllinie WT-D2-1u (Abbildung 29) legt nahe, dass hier ein methodisches Problem vorlag. Es ergab sich für die siRNA 5 eine nicht signifikante Erhöhung des FTO-Levels auf RNA-Ebene, welches sich aber auf der Proteinebene nicht zeigte (Abbildung 31). Stattdessen konnte eine tendenzielle Verringerung der FTO-Expression nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Verwendung der Negativkontrolle (*scramble*), die keine komplementäre Bindesequenz im humanen Genom aufweist und so das Gen-*silencing* nicht beeinflusst, könnte der Einsatz einer Positivkontrolle die Validität der Methode weiter unterstützen.

Für einen KD mithilfe von siRNA in hiPSC-CM sind bisher wenige Daten vorbeschrieben. Allgemein gelten Stammzellen und die von ihnen abgeleiteten Zellen als *hard-to-transfect,* und insbesondere die Methode zur Einbringung der siRNA ohne Beeinträchtigung der Lebens- und Funktionsfähigkeit der Zelle stellt ein Problem dar (Ma et al. 2010). Die Lipofektion z. B. mit Lipofectamine

RNAiMAX hat sich als geeignete Methode erwiesen zur Einschleusung der siRNA in die hiPSC-CM (Rosales und Lizcano 2018). In dieser Arbeit wurde das *Lipofectamin Stem Transfection Reagent* verwendet, welches für die schonende Transfektion von Stammzellen geeignet ist. Die Nutzung des Opti-MEM I als Transfektionsmedium soll verhindern, dass das normale Zellkulturmedium (hier Cardio Culture) die Lipotransfektion der siRNA negativ beeinflusst. Die Zugabe des regulären Zellkulturmediums Cardio Culture erfolgte erst vier Stunden nach dem Transfektionsbeginn zur Erhöhung des Zellüberlebens. Die Transfektionsdauer von 24 Stunden wurde gewählt, da für diesen Zeitraum ein stabiler KD bei geringer Zytotoxizität beschrieben ist (Ma et al. 2010; Rosales und Lizcano 2018). Ma et al. (2010) konnten zeigen, dass eine erneute Transfektion nach 48 Stunden die Effizienz des KDs weiter erhöht und so ein stabiles KD-Level für sechs Tage erreicht werden kann. Dies legt nahe, dass zusätzliche Transfektionsrunden einen guten Ansatz zur Optimierung des KDs darstellen könnten.

Eine Alternative zur Manipulation der Genexpression in den hiPSC-CM ist die Nutzung eines Lentivirus. Problematisch hierbei ist aber die Viruskonstruktion, Verpackung des Virus und Beibehaltung eines suffizient hohen Titers (Ma et al. 2010). Nicht-virale Technologien basieren auf Nukleasen, die so verändert wurden, dass sie spezifische Zielsequenzen im Genom schneiden können. Hierzu zählen u. a. *zinc finger nucleases* (ZFN), *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN) und *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) *nucleases* (Costa et al. 2017).

Die siRNA 5 hat sich als geeigneter Kandidat für den FTO-KD in den hiPSC-CM erwiesen, aber für die weitere Verwendung der Methode muss die Effektivität des KDs verbessert werden. Nach weiterer Optimierung des Transfektionsprotokolls ist davon auszugehen, dass sich die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen lassen würden. Es sollte hierbei zu einer signifikanten Abnahme des FTO-Levels bei Transfektion mit siRNA 5 auf RNA- und Proteinebene kommen. Ansatzpunkte zur Verbesserung sind die Menge an transfizierter siRNA, das Verhältnis von siRNA zum Transfektionsreagenz, die Zelldichte bei Transfektion und die Dauer der Transfektion. Eine erneute Transfektion (im Sinne einer Doppeltransfektion) nach 24 Stunden könnte die Effizienz und die Dauer des KDs weiter steigern. Die Verwendung eines anderen Transfektionsreagenz, wie z. B. *HiPerFect Transfection Reagents* von QIAGEN könnte ebenfalls zu einer Steigerung des KDs beitragen. Für einen potenten KD ist es wichtig zuerst möglichst optimale Versuchsbedingungen zu schaffen, da der Erfolg stark abhängig ist von der siRNA, dem Zelltyp und dem Zielgen (Costa et al. 2017).

4.4 Limitationen des *in vitro* Zellkulturmodells

Zellkulturmodelle konnten bereits zur Entdeckung wichtiger Signalwege und zellulärer Mechanismen der Hypertrophie beitragen. Lange Zeit wurden nur Tier-basierte Modelle z. B. aus Ratten- oder Mäuseherzzellen als Alternative zu *in vivo* Tiermodellen verwendet. Da aber entscheidende Unterschiede zwischen dem humanen und tierischen kardiovaskulären Systemen vorliegen, z. B. bezüglich der Stressantwort oder der Ionenkanalexpression, ist es sinnvoll für ein besseres Verständnis der beteiligten Mechanismen und Signalwege auf *in vitro* Modelle basierend auf humanen Stammzellen zurückzugreifen (Yang et al. 2014; Johansson et al. 2020). Diese bieten den Vorteil, dass man die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen eines Krankheitsbildes in einem humanen Setting untersuchen kann. Es ist möglich durch Kontrolle der äußeren Bedingungen und definierte Zellzahlen, stabile Bedingungen zu schaffen, die sich zwischen den verschiedenen Versuchsreihen reproduzieren lassen. Weiter bieten *in vitro* Zellkulturmodelle eine einfache Möglichkeit der Intervention z. B. durch pharmakologische Substanzen (Kastner 2020). In diesen Punkten sind sie auch dem *in vivo* Tiermodell überlegen, das aber die humane Physiologie und Pathologie besser simulieren kann (Kastner 2020). Während der Differenzierung der hiPSC zu ventrikulären Kardiomyozyten kommt es zwar spontan auch zur Entstehung von atrialen Kardiomyozyten und endothel-ähnlichen Zellen, aber größtenteils liegt nur ein Zelltyp vor. Dies ist ein entscheidender Nachteil des *in vitro* Zellkulturmodells, da das Herz nicht ausschließlich aus Kardiomyozyten besteht, sondern aus einem Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen z. B. Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen (Yang et al. 2014; Kastner 2020). Diese sind ebenso in die Prozesse der Hypertrophieentwicklung involviert wie die Kardiomyozyten selbst. Fibroblasten spielen z. B. eine wichtige Rolle in der Entstehung der Fibrose beim kardialen *Remodeling* (Kastner 2020). Es kann folglich zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen, da man sowohl die Interaktionen der verschiedenen Zelltypen untereinander als auch das Verhalten im Organismus selbst nicht mit einbezieht. Ein nächster Schritt wäre die Kultivierung der hiPSCs in oragnoide Kulturen oder 3D Zellkulturen für ein genaueres *in vitro* Krankheitsmodell und um auch andere Zelltypen und ihre Interaktion untereinander in die Untersuchungen miteinbeziehen zu können (Lancaster und Knoblich 2014; Borchert et al. 2017; Kastner 2020). Der Reifegrad der kultivieren hiPSC-CM stellt ebenfalls ein Problem dar (Yang et al. 2014). Die hiPSC-CM weisen auch nach 60 Tagen Kultivierung eine unzureichende Reife auf und entsprechen damit nicht den adulten humanen Kardiomyozyten (Jung et

al. 2016; Yoshihara et al. 2017). Die hiPSC-CM unterscheiden sich in ihrer Morphologie von den adulten Herzzellen (Yang et al. 2014). Sie weisen runde bis polymorphe Formen auf, während die adulten Kardiomyozyten stabförmig sind. Der Zellursprung der hiPSCs ist entscheidend für die Generation qualitativ hochwertiger hiPSC-CM mit einem hohen Maß an Reinheit und kardialer Funktionalität. Hierbei konnte eine verlängerte Kultivierungszeit die Reifung der hiPSC-CM verbessern (Yang et al. 2014; Jung et al. 2016). Allerdings entstehen durch den langwierigen und anfälligen Prozess der Differenzierung und Kultivierung Limitationen, sodass es zu einer geringen Probeanzahl kommen kann. Dies führt insbesondere in Kombination mit der natürlich vorkommenden genetischen Variabilität zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse. Durch die unterschiedlichen experimentellen Settings inklusive verschiedenen Startmaterialien, Zellkulturmethoden, Differenzierungsprotokollen gibt es eine große Variabilität zwischen den einzelnen Studien, was ihre Vergleichbarkeit untereinander erschwert (Johansson et al. 2020). Bei den auf Stammzellen basierenden *in vitro* Modellen handelt es sich um eine punktuelle Simulation der Hypertrophie und die Analyse erfolgt zu einem vorher definierten Zeitpunkt. Man erhält damit keine Informationen über die Entwicklung und Dynamik der Hypertrophie über längere Zeiträume (Johansson et al. 2020). Insgesamt sind die auf Stammzellen basierenden *in vitro* Modelle zur Untersuchung der Hypertrophie auf zellulärer Ebene geeignet, wenn man sich der Einschränkungen des Modells bewusst ist. Sie stellen eine gute Möglichkeit zur Identifikation beteiligter Signalwege oder neuer *targets* dar, bevor diese weiter in den teureren *in vivo* Tiermodellen untersucht werden (Kastner 2020).

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Etablierung des *in vitro* Hypertrophie-Modells in den hiPSC-CM erfolgreich war und das es somit für weitere Untersuchungen der zugrundliegenden Mechanismen einer Hypertrophie geeignet ist.

Die Weiterverwendung des *in vitro* Hypertrophie-Modells für eine miRNA-Sequenzierungsanalyse war möglich, welche interessante neue Ergebnisse bezüglich des Expressions- und Methylierungsverhaltens von miRNAs geliefert hat. Die hier in ihrer Expression signifikant veränderten miRNAs sollten in Hinblick auf ihre Funktion und ihr Bindungsverhalten genauer betrachtet werden. Es ist notwendig einen Vergleich, der hier beschriebenen miRip-Seq Ergebnisse mit den aus humanen Herzgewebe gewonnen Daten zu machen, um

herauszufinden, inwieweit das Modell aus hiPSC-CM mit dem humanen Herzgewebe korreliert und die Ergebnisse übertragbar sind.

In Hinblick auf weitere Untersuchungen konnte ein FTO-KD Modell in den hiPSC-CM erfolgreich etabliert werden, welches in Zukunft mit dem *in vitro* Hypertrophie-Modell kombiniert werden kann. Dieser nächste Schritt wird bereits in der Arbeitsgruppe weiterverfolgt, um den Einfluss von FTO auf die Hypertrophie genauer zu untersuchen. Hierfür ist eine weitere Optimierung und Expansion dieses FTO-KD Modells notwendig, um noch validere Ergebnisse zu erhalten. Für zukünftige Untersuchungen wäre es auch interessant die Überexpression von FTO mithilfe eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) in den hiPSC-CM zu untersuchen, sowohl basal als auch unter Hypertrophie-Simulation.

5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist ein häufig vorkommendes Krankheitsbild und von bedeutender klinischer Relevanz. Durch eine vermehrte Belastung des Herzens vergrößern sich die Kardiomyozyten, wodurch das Herz hypertrophiert. Hinzu kommen Veränderungen der Genexpression und das kardiale *Remodeling*. Die kardiale Pumpfunktion wird dadurch stark reduziert und es treten klinische Symptome wie Leistungsminderung und Belastungsdyspnoe auf. Die aktuellen Behandlungsansätze basieren vor allem auf einer Hemmung der neuroendokrinen und intrazellulären Signalwege, die zum kardialen *Remodeling* beitragen. Ihre Effizienz ist aber limitiert.

Durch intensive Forschung in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die m6A-Methylierung der RNA bei der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle spielen könnte. Insbesondere die miRNAs nehmen durch ihre regulatorische Funktion auf die Genexpression einen großen Stellenwert ein. Sie beeinflussen fast alle biologischen Prozesse auf posttranskriptionaler Ebene. Bei der Herzhypertrophie sind viele miRNAs differentiell exprimiert und beeinflussen die Entstehung und das Fortschreiten durch eine pro- oder antihypertrophe Aktivität. Über die genauen Funktionen und Einflüsse der m6A-Methylierung und ihrer Regulatoren FTO und METTL3 in der Herzhypertrophie und -insuffizienz ist bisher aber noch wenig bekannt. Gleiches gilt in diesem Zusammenhang für die Rolle von miRNAs, welche ebenfalls m6A-methyliert werden können.

Ein Zellkulturmodell aus hiPSC-Kardiomyozyten (hiPSC-CM) unter Stimulation von pharmakologischen Agenzien stellt eine geeignete Möglichkeit zur Untersuchung und Identifikation neuer Mechanismen dar, die am kardialen *Remodeling* beteiligt sind.

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Validierung eines solchen Modells zur Simulation von Stress bzw. Hypertrophie in hiPSC-CM. Zur Simulation von Stress in den hiPSC-CM erwies sich eine sechsstündige Behandlung mit Isoprenaline (ISO) 100 nm bzw. Phenylephrine (PE) 100 μm als geeignet. Die Induktion von Hypertrophie in den hiPSC-CM konnte durch eine Behandlung mit Endothelin-1 (ET-1) in der Konzentration 3 nm über 48 Stunden erreicht werden. Hierrunter kam es in den hiPSC-CM zu einer signifikanten Zunahme der Zellgröße und Erhöhung etablierter Hypertrophiemarker (Nppb, ACTA1) verglichen mit der Kontrollgruppe.

Anschließend folgte die Untersuchung zur Charakterisierung des generellen miRNA-Profils und dessen Methylierungsveränderungen in der Herz-

hypertrophie. Hierfür wurde das vorher etablierte *in vitro* Hypertrophiemodell mit ET-1 verwendet. Zunächst wurde aus den gewonnenen Proben die RNA isoliert, fraktioniert und eine *methylated RNA immunoprecipitation sequencing* (meRip-Seq) durchgeführt. Hierfür wurde die kurze RNA-Fraktion genutzt, die die miRNAs enthält. Die Datentransformation und statistische Analyse wurde vom Deutschen Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) durchgeführt. Insgesamt konnten im Vergleich zwischen den mit ET-1 behandelten hiPSC-CM und den Kontrollen 558 differentiell exprimierte miRNAs identifiziert werden. Davon waren 292 herunterreguliert und 266 hochreguliert. Signifikant hochregulierte miRNAs waren die hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-132-3p und SNORD38A-201. Die miRNAs hsa-miR-19a, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-405-5p, hsa-miR-133b und hsa-miR19b-3p hingegen zeigten eine signifikant verminderte Expression. Die in dieser Arbeit gefundenen signifikant differentiell exprimierten miRNAs zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung bezüglich ihrer Hoch- bzw. Herunterregulation mit anderen Hypertrophiemodellen. Es konnten vielversprechende miRNAs identifiziert werden, die über unterschiedliche Ziele und Signalwege die Hypertrophie beeinflussen.

Die miRNAs selber können auch m6a-methyliert sein, wobei der Effekt dieser Methylierung noch weitestgehend unbekannt ist. Mithilfe einer Methylierungsanalyse konnte gezeigt, dass unter ET-1 Behandlung mehr miRNAs in ihrer Methylierung verändert waren als in ihrer Expression. Hiervon wiesen die drei miRNAs hsa-miR-1180-3p, hsa-miR-664-5p und hsa-miR-315-5p eine signifikante Methylierung in den ET-1 behandelten hiPSC-CM auf, aber keine veränderte Expression. Dies deutet auf eine Endothelin spezifische Veränderung der Methylierung hin.

Bei Herzversagen nimmt die Expression von FTO ab und die m6A-Methylierung zu, was zu einer Reduktion der kardialen Kontraktilität beiträgt. Diese neueren Erkenntnisse zeigen, dass FTO eine bedeutende Stellung in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz einnimmt. Zur weiteren Untersuchung der Rolle von FTO bei der Herzinsuffizienz wurde in dieser Arbeit die Verwendung des Zellkulturmodells zur Manipulation des Methylierungsapparates untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von FTO sich mithilfe von einer siRNA in den hiPSC-CM transient unterdrücken lässt. Die siRNA wurde mithilfe von Lipotransfektion erfolgreich in die hiPSC-CM eingebracht. Nach Austestung verschiedene potenzieller Kandidaten erwies sich die siRNA 5 als geeignet für eine Herunterregulation von FTO in den hiPSC-CM. In einem nächsten Schritt kann dieses FTO-*Knock-Down*-Modell mit dem *in vitro* Hypertrophie-Modell

kombiniert werden, um den Einfluss von FTO auf die Hypertrophie genauer zu untersuchen.

6 Anhang

Tabelle A21: Analyse der Frequenz [Hz] der hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 in den verschiedenen Konditionen Kontrolle, ISO 100 nm und 10 µm, PE 20 µm und 100 µm nach 30 min und 24 h Behandlungsdauer (n = 1).

pCTRL 1.1	Frequenz nach 30 Minuten [Hz]	Frequenz nach 24 h [Hz]
Kontrolle	46,2	41,7
ISO 100 nm	79,8	37,2
ISO 10 µm	97,2	64,8
PE 20 µm	60	37,2
PE 100 µm	73,8	51

Tabelle A22: Analyse der Frequenz [Hz] der hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u in den verschiedenen Konditionen Kontrolle, ISO 100 nm und 10 µm, PE 20 µm und 100 µm nach 30 min und 24 h Behandlungsdauer (n = 1).

WT-D2-1u	Frequenz nach 30 Minuten [Hz]	Frequenz nach 24 h [Hz]
Kontrolle	75,9	80,4
ISO 100 nm	124,8	97,2
ISO 10 µm	133,8	115,2
PE 20 µm	120	120
PE 100 µm	120	124,2

Tabelle A23: Veränderung der relativen Nppb-Expression in den hiPSC-CM der Zelllinie pCTRL 1.1 nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Behandlung mit ISO oder PE im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 1).

pCRTL 1.1	6 h	12 h	24 h	48 h
Kontrolle	1	1	1	1
Iso 100 nm	42,9108004	0,3995824	0,40201444	2,83124784
Iso 10 µM	0,83626457	0,85410723	1,28529728	1,41958823
PE 20 µM	17,4183878	1,7821754	43,0910777	24,2120452
PE 100 µM	3,80849687	Kein Wert	1,52700209	1,95133224

Tabelle A24: Veränderung der relativen Nppb-Expression in den hiPSC-CM der Zelllinie WT-D2-1u nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Behandlung mit ISO oder PE im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 1).

WT-D2-1u	6 h	12 h	24 h	48 h
Kontrolle	1	1	1	1

Iso 100 nm	0,05349904	35,8256156	0,13048111	0,14886851
Iso 10 μM	0,9717393	1,3844865	0,2080401	0,50841859
PE 20 μM	0,04435131	3,40168283	0,69929845	0,98296513
PE 100 μM	2,0383836	1,13070222	0,14607239	7,62070158

7 Literaturverzeichnis

Aggarwal P, Turner A, Matter A, Kattman SJ, Stoddard A, Lorier R, Swanson BJ, Arnett DK, Broeckel U (2014): RNA Expression Profiling of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes in a Cardiac Hypertrophy Model. PLoS One 9, e108051

Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF (2015): N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. Nature 519, 482–485

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular biology of the cell. 6th Edition; Garland Science Taylor&Francis Group, New York 2015

Ameres SL, Zamore PD (2013): Diversifying microRNA sequence and function. Nat Rev Mol Cell Biol 14, 475–488

Bao M-H, Feng X, Zhang Y-W, Lou X-Y, Cheng Y, Zhou H-H (2013): Let-7 in Cardiovascular Diseases, Heart Development and Cardiovascular Differentiation from Stem Cells. Int J Mol Sci 14, 23086–23102

Bartosovic M, Molares HC, Gregorova P, Hrossova D, Kudla G, Vanacova S (2017): N6-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3′-end processing. Nucleic Acids Res 45, 11356–11370

van Berlo JH, Maillet M, Molkentin JD (2013): Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. J Clin Invest 123, 37–45

Berulava T, Rahmann S, Rademacher K, Klein-Hitpass L, Horsthemke B (2015): N6-Adenosine Methylation in MiRNAs. PLoS One 10, e0118438

Berulava T, Buchholz E, Elerdashvili V, Pena T, Islam R, Lbik D, Mohamed BA, Renner A (2019): Changes in m6A RNA methylation contribute to heart failure progression by modulating translation. Eur J Heart Fail 22, 54–66

Borchert T, Hübscher D, Guessoum CI, Lam T-DD, Ghadri JR, Schellinger IN, Tiburcy M, Liaw NY, Li Y, Haas J, et al. (2017): Catecholamine-Dependent β-Adrenergic Signaling in a Pluripotent Stem Cell Model of Takotsubo Cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 70, 975–991

Bosse N: mirmeth: Alpha version. Zenodo 2021. DOI: 10.5281/ZENODO.4968865

Braunwald E (2013): Heart Failure. JACC Heart Fail 1, 1–20

Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2019): Nationale Versorgungs Leitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 3. Auflage. Version 2. DOI:

10.6101/AZQ/000467. www.herzinsuffizienz.versorgungsleitlinien.de; abgerufen am 15.06.2020

Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, et al. (2014): Chemically defined generation of human cardiomyocytes. Nat Methods 11, 855–860

Cao G, Li H-B, Yin Z, Flavell RA (2016): Recent advances in dynamic m6A RNA modification. Open Biol 6, 160003

Chen Y, Lin Y, Shu Y, He J, Gao W (2020): Interaction between N6-methyladenosine (m6A) modification and noncoding RNAs in cancer. Mol Cancer 19, 94

Colpaert RMW, Calore M (2019): MicroRNAs in Cardiac Diseases. Cells 8, 737

Condorelli G, Latronico MVG, Cavarretta E (2014): microRNAs in Cardiovascular Diseases. J Am Coll Cardiol 63, 2177–2187

Costa JR, Bejcek BE, McGee JE, Fogel AI, Brimacombe KR, Ketteler R: Genome Editing Using Engineered Nucleases and Their Use in Genomic Screening. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al. (Hrsg.): Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD) 2004

Da Costa Martins PA, De Windt LJ (2012): MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res 93, 563–572

Cyganek L, Tiburcy M, Sekeres K, Gerstenberg K, Bohnenberger H, Lenz C, Henze S, Stauske M, Salinas G, Zimmermann W-H, et al. (2018): Deep phenotyping of human induced pluripotent stem cell–derived atrial and ventricular cardiomyocytes. JCI Insight 3, e99941

Deng X, Su R, Weng H, Huang H, Li Z, Chen J (2018): RNA N6-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives. Cell Research 28, 507–517

Desrosiers R, Friderici K, Rottman F (1974): Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells. Proc Natl Acad Sci USA 71, 3971–3975

Ding Y, Bi L, Wang J (2020): MiR-1180 promotes cardiomyocyte cell cycle re-entry after injury through the NKIRAS2–NFκB pathway. Biochem Cell Biol 98, 449–457

Divakaran V, Mann DL (2008): The Emerging Role of MicroRNAs in Cardiac Remodeling and Heart Failure. Circ Res 103, 1072–1083

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013): STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29, 15–21

Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Salmon-Divon M, Amariglio N, Rechavi G (2013): Transcriptome-wide mapping of N6-methyladenosine by m6A-seq based on immunocapturing and massively parallel sequencing. Nat Protoc 8, 176–189

Dorn LE, Lasman L, Chen J, Xu X, Hund TJ, Medvedovic M, Hanna JH, van Berlo JH, Accornero F (2019): The N6-Methyladenosine mRNA Methylase METTL3 Controls Cardiac Homeostasis and Hypertrophy. Circulation 139, 533–545

Feng HJ, Ouyang W, Liu JH, Sun YG, Hu R, Huang LH, Xian JL, Jing CF, Zhou MJ (2014): Global microRNA profiles and signaling pathways in the development of cardiac hypertrophy. Braz J Med Biol Res 47, 361–368

Filipowicz W, Pelczar P, Pogacic V, Dragon F (1999): Structure and biogenesis of small nucleolar RNAs acting as guides for ribosomal RNA modification. Acta Biochim Pol 46, 377–389

Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C (2014): Gene expression regulation mediated through reversible m6A RNA methylation. Nature Rev Genet 15, 293–306

Gebert LFR, MacRae IJ (2019): Regulation of microRNA function in animals. Nat Rev Mol Cell Biol 20, 21–37

Ha M, Kim VN (2014): Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 15, 509–524

Hanna JH, Saha K, Jaenisch R (2010): Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. Cell 143, 508–525

Herold G (Hrsg.): Herzinsuffizienz. In: Innere Medizin. Gerd Herold Verlag, Köln 2018, 209–223

Hirt MN, Sörensen NA, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A, Vollert I, Stöhr A, Schulze T, Witten A, et al. (2012): Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. Basic Res Cardiol 107, 307

Hirt MN, Werner T, Indenbirken D, Alawi M, Demin P, Kunze A-C, Stenzig J, Starbatty J, Hansen A, Fiedler J, et al. (2015): Deciphering the microRNA signature of pathological cardiac hypertrophy by engineered heart tissue- and sequencing-technology. J Mol Cell Cardiol 81, 1–9

Jaenisch R, Young R (2008): Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. Cell 132, 567–582

Jeong MH, Lee JS, Kim DH, Park WJ, Yang DK (2012): Identification of novel microRNAs negatively regulating cardiac hypertrophy. Biochem Biophys Res Commun 428, 191–196

Johansson M, Ulfenborg B, Andersson CX, Heydarkhan-Hagvall S, Jeppsson A, Sartipy P, Synnergren J (2020): Cardiac hypertrophy in a dish: a human stem cell based model. Biol Open 9, bio052381

Jung G, Fajardo G, Ribeiro AJS, Kooiker KB, Coronado M, Zhao M, Hu D, Reddy S, Kodo K, Sriram K, et al. (2016): Time-dependent evolution of functional vs. remodeling signaling in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and induced maturation with biomechanical stimulation. FASEB J 30, 1464–1479

Kastner N (2020): New Insights and Current Approaches in Cardiac Hypertrophy Cell Culture, Tissue Engineering Models, and Novel Pathways Involving Non-Coding RNA. Front Pharmacol 11, 1314

Kinnunen SM, Tölli M, Välimäki MJ, Gao E, Szabo Z, Rysä J, Ferreira MPA, Ohukainen P, Serpi R, Correia A, et al. (2018): Cardiac Actions of a Small Molecule Inhibitor Targeting GATA4–NKX2-5 Interaction. Sci Rep 8, 4611

Kmietczyk V, Riechert E, Kalinski L, Boileau E, Malovrh E, Malone B, Gorska A, Hofmann C, Varma E, Jürgensen L, et al. (2019): m6A-mRNA methylation regulates cardiac gene expression and cellular growth. Life Sci Alliance 2, e201800233

Konno M, Koseki J, Asai A, Yamagata A, Shimamura T, Motooka D, Okuzaki D, Kawamoto K, Mizushima T, Eguchi H, et al. (2019): Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers. Nat Commun 10, 3888

Lancaster MA, Knoblich JA (2014): Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. Nat Protoc 9, 2329–2340

Leek J, Johnson W, Parker H, Fertig E, Jaffe A, Zhang Y, Storey J, Torres LC (2021): sva: Surrogate Variable Analysis. R package version 3.38.0

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009): The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25, 2078–2079

Li N, Zhou H, Tang Q (2018): miR-133: A Suppressor of Cardiac Remodeling? Front Pharmacol 9, 903

Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, Meydan C, Mason CE, Jaffrey SR (2015): Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. Nat Methods 12, 767–772

Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu Y, Zhang L, Jia G, Yu M, Lu Z, Deng X, et al. (2014): A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. Nat Chem Biol 10, 93–95

Liu K, Hao Q, Wei J, Li G-H, Wu Y, Zhao Y-F (2018): MicroRNA-19a/b-3p protect the heart from hypertension-induced pathological cardiac hypertrophy through PDE5A. J Hypertens 36, 1847–1857

Liu Y, Wang Z, Xiao W (2016): MicroRNA-26a protects against cardiac hypertrophy via inhibiting GATA4 in rat model and cultured cardiomyocytes. Mol Med Rep 14, 2860–2866

Love MI, Huber W, Anders S (2014): Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol 15, 550

Ma Y, Jin J, Dong C, Cheng E-C, Lin H, Huang Y, Qiu C (2010): High-efficiency siRNA-based gene knockdown in human embryonic stem cells. RNA 16, 2564–2569

Malekar P, Hagenmueller M, Anyanwu A, Buss S, Streit MR, Weiss CS, Wolf D, Riffel J, Bauer A, Katus HA, Hardt SE (2010): Wnt Signaling Is Critical for Maladaptive Cardiac Hypertrophy and Accelerates Myocardial Remodeling. Hypertension 55, 939–945

Mathiyalagan P, Adamiak M, Mayourian J, Sassi Y, Liang Y, Agarwal N, Jha D, Zhang S, Kohlbrenner E, Chepurko E, et al. (2019): FTO-Dependent N6-Methyladenosine Regulates Cardiac Function During Remodeling and Repair. Circulation 139, 518–532

McGuinness DH, McGuinness D (2014): m6a RNA Methylation: The Implications for Health and Disease. J Cancer Sci Clin Oncol 1, 105

McIntyre ABR, Gokhale NS, Cerchietti L, Jaffrey SR, Horner SM, Mason CE (2020): Limits in the detection of m6A changes using MeRIP/m6A-seq. Sci Rep 10, 6590

Mehta G, Kumarasamy S, Wu J, Walsh A, Liu L, Williams K, Joe B, de la Serna IL (2015): MITF interacts with the SWI/SNF subunit, BRG1, to promote GATA4 expression in cardiac hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 88, 101–110

Mendel M, Chen K-M, Homolka D, Gos P, Pandey RR, McCarthy AA, Pillai RS (2018): Methylation of Structured RNA by the m6A Writer METTL16 Is Essential for Mouse Embryonic Development. Mol Cell 71, 1–15

Meyer KD, Jaffrey SR (2014): The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. Nat Rev Mol Cell Biol 15, 313–326

Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR (2012): Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3′ UTRs and near Stop Codons. Cell 149, 1635–1646

Nakamura M, Sadoshima J (2018): Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. Nat Rev Cardiol 15, 387–407

Neumann T, Biermann J, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R, Erbel R (2009): Heart Failure. Dtsch Arztebl Int 106, 269–75

Nilius B, Amara SG, Gudermann T, Jahn R, Lill R, Offermanns S, Petersen OH (Hrsg.): Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Band 165; Springer International Publishing, Cham 2013

NVL chronische Herzinsuffizienz: siehe BÄK et al. 2019

Patil DP, Chen C-K, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, Jaffrey SR (2016): m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. Nature 537, 369–373

Peng Y, Croce CM (2016): The role of MicroRNAs in human cancer. Signal Transduct Target Ther 1, 15004

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. Eur J Heart Fail 18, 891–975

Rosales W, Lizcano F (2018): The Histone Demethylase JMJD2A Modulates the Induction of Hypertrophy Markers in iPSC-Derived Cardiomyocytes. Front Genet 9, 14

Rupert CE, Chang HH, Coulombe KLK (2017): Hypertrophy Changes 3D Shape of hiPSC-Cardiomyocytes: Implications for Cellular Maturation in Regenerative Medicine. Cell Mol Bioeng 10, 54–62

Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, Zeriouh M, Schmack B, Farag M, Popov A-F, Dohmen PM, Choi Y-H, Wahlers T, Weymann A (2016): Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. Med Sci Monit Basic Res 22, 75–79

Sassi Y, Avramopoulos P, Ramanujam D, Grüter L, Werfel S, Giosele S, Brunner A-D, Esfandyari D, Papadopoulou AS, De Strooper B, et al. (2017): Cardiac myocyte miR-29 promotes pathological remodeling of the heart by activating Wnt signaling. Nat Commun 8, 1614

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 9, 676–682

Song X-W, Li Q, Lin L, Wang X-C, Li D-F, Wang G-K, Ren A-J, Wang Y-R, Qin Y-W, Yuan W-J, Jing Q (2010): MicroRNAs are dynamically regulated in hypertrophic hearts, and miR-199a is essential for the maintenance of cell size in cardiomyocytes. J Cell Physiol 225, 437–443

Sorriento D, Santulli G, Ciccarelli M, Maione A, Illario M, Trimarco B, Iaccarino G (2018): The Amino-Terminal Domain of GRK5 Inhibits Cardiac

Hypertrophy through the Regulation of Calcium-Calmodulin Dependent Transcription Factors. Int J Mol Sci 19, 861

Stan Development Team (2020): RStan: the R interface to Stan. R package version 2.21.2, http://mc-stan.org/

Streckfuss-Bömeke K, Wolf F, Azizian A, Stauske M, Tiburcy M, Wagner S, Hübscher D, Dressel R, Chen S, Jende J, et al. (2013): Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. Eur Heart J 34, 2618–2629

Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell 126, 663–676

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007): Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell 131, 861–872

Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen J-F, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang D-Z (2007): Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 42, 1137–1141

Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, et al. (2007): MicroRNAs in the Human Heart: A Clue to Fetal Gene Reprogramming in Heart Failure. Circulation 116, 258–267

Tijsen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM (2010): MiR423-5p As a Circulating Biomarker for Heart Failure. Circ Res 106, 1035–1039

Ucar A, Gupta SK, Fiedler J, Erikci E, Kardasinski M, Batkai S, Dangwal S, Kumarswamy R, Bang C, Holzmann A, et al. (2012): The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. Nat Commun 3, 1078

Volpato V, Webber C (2020): Addressing variability in iPSC-derived models of human disease: guidelines to promote reproducibility. Dis Model Mech 13, dmm042317

Wang J, Liew O, Richards A, Chen Y-T (2016): Overview of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Apoptosis. Int J Mol Sci 17, 749

Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, et al. (2014): N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. Nature 505, 117–120

Wang X, Feng J, Xue Y, Guan Z, Zhang D, Liu Z, Gong Z, Wang Q, Huang J, Tang C, et al. (2016): Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. Nature 534, 575–578

Wehbe N, Nasser S, Pintus G, Badran A, Eid A, Baydoun E (2019): MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy. Int J Mol Sci 20, 4714

Wu H, Lee J, Vincent LG, Wang Q, Gu M, Lan F, Churko J, Sallam K, Matsa E, Sharma A, et al. (2015): Epigenetic Regulation of Phosphodiesterases 2A and 3A Underlies Compromised β-adrenergic Signaling in an iPSC Model of Dilated Cardiomyopathy. Cell Stem Cell 17, 89–100

Yang X, Pabon L, Murry CE (2014): Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes. Circ Res 114, 511–523

Yang Y, Hsu PJ, Chen Y-S, Yang Y-G (2018): Dynamic transcriptomic m6A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. Cell Res 28, 616–624

Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y (2017): Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. Stem Cell Rev and Rep 13, 7–16

Yue Y, Liu J, He C (2015): RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. Genes Dev 29, 1343–1355

Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR (2019): Reading, writing and erasing mRNA methylation. Nat Rev Mol Cell Biol 20, 608–624

Zhang H, Zhang X, Zhang J (2018): MiR-129-5p inhibits autophagy and apoptosis of H9c2 cells induced by hydrogen peroxide via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by targeting ATG14. Biochem Biophys Res Com 506, 272–277

Zhao BS, Roundtree IA, He C (2016): Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. Nat Rev Mol Cell Biol 18, 31–42

Zou M, Wang F, Gao R, Wu J, Ou Y, Chen X, Wang T, Zhou X, Zhu W, Li P, et al. (2016): Autophagy inhibition of hsa-miR-19a-3p/19b-3p by targeting TGF-β R II during TGF-β1-induced fibrogenesis in human cardiac fibroblasts. Sci Rep 6, 24747

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Karl Toischer danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat Teil seiner Arbeitsgruppe zu sein und mich im Rahmen der Grundlagenforschung mit der Herzinsuffizienz auseinanderzusetzen. Er hat mich sehr gut mit gezielter Anleitung und Hilfestellungen unterstützt.

Insbesondere danke ich Dr. Eric Buchholz für die großartige Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Er stand mir jederzeit engagiert zur Seite und hat mich in dieser Arbeit durch sein Interesse maßgeblich gefordert und gefördert.

Weiter möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe ‚Kardiales Remodeling' danken, dass sie mich so herzlich aufgenommen und mir bei Fragen immer weitergeholfen hat.

Ein großer Dank gilt meinem Zweitbetreuer Prof. Andre Fischer und dem Deutschen Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich hier Dr. Tea Berulava, Dr. Gaurav Jain, Dr. Tonatiuh Pena-Centeno und Nikos Bosse für die Datenprozessierung und bioinformatische Analyse der sequenzierten Daten danken sowie Susanne Burkhard für die Durchführung der Library Preperation.

Ganz herzlich danke ich auch der gesamten Arbeitsgruppe von Dr. Katrin Streckfuß-Bömecke für die Bereitstellung der hiPSC-Zellen sowie Hilfe und Unterstützung bei Fragen bezüglich der Zellkultur.

Abschließend danke ich dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf (DZHK) für die finanzielle Förderung während meines Freisemesters.